



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Obtención de una línea celular *knock-out* para el gen RNASEL, utilizando el sistema CRISPR/Cas9 y su uso para la caracterización del ciclo replicativo de Rotavirus

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Francisco Giovani Elizarrarás Chávez

TUTOR PRINCIPAL

Susana López Charretón

[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

José Luis Puente García

[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Martín Gustavo Pedraza Alva

[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos.

Noviembre, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado

Presidente	Dr. Mario Enrique Zurita Ortega
Secretario	Dr. Takuya Nishigaki Shimizu
Vocal	Dr. Ramón González García-Conde
Vocal	Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano
Vocal	Dr. Ernesto Ortiz Suri

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología Molecular del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría de la Dra. Susana López Charretón. En la realización de la presente se contó con beca otorgada por CONACYT (631304), además de contar con el apoyo del PAEP para asistir al IX Congreso Nacional de Virología.

Agradecimientos

A Susana López por aceptarme en el laboratorio, apoyarme, guiarme y tenerme más paciencia de la que merecía en muchos momentos. Aunque no lo creas y no se note me caes muy bien.

A Liliana Sánchez por ser una excelente amiga, guía científica, apoyo moral y espiritual. Le debo más de lo que se imagina ella o yo. Te debo vino y pan infinito.

A Rafaela "Rafita" Espinosa a quien tener sentada enfrente hizo de mis días pesados algo llevadero y de mis dudas y problemas, planes y soluciones.

A Alfonso "Poncho" Ocegüera porque, aunque me daba miedo al principio, *RBF*, su amabilidad, capacidad y apoyo (a veces hasta de más) en experimentos me mostraron a una gran persona.

A Banano, Roscar, Almita, Naye, Joaquín, José Luis, Marco, Carlos Arias, Pavel, Blanca, Tomás, Maet, Carlos, Nalle y Lore por su apoyo, amistad, comentarios al proyecto o a mi persona, por hacerme reír, reconsiderar errores o darme esa patadita necesaria. Pero más que nada a los que me apoyaron cuando no era necesario.

A Paulina Torres por su apoyo en el aislamiento de las mutantes. Su calidez humana y pasión científica ayudaron (hicieron posible) la realización de esta tesis.

A Sara(i), Noé y Nita por ser los mejores *roomies* que pude tener. Sus risas, apoyo, regaños, compañía y paciencia conmigo fueron necesarios muchos días para que pudiera seguir adelante. Ver SU sin ustedes le quitó algo a la serie.

A Azarath y Kophe que me daban compañía y comprensión cuando no quería que nadie lo hiciera.

A mis amistades del IBt que habláramos mucho o poco siempre fue un placer cruzar camino y poder tener pláticas, salir a comer, beber, pasear o lo que fuera.

A mi familia - Ma, Pa, Er - porque, aunque me iban a extrañar me dejaron ir, aunque no les hablara seguido seguían contestando rápido mis llamadas, aunque no les dijera sabían cuando no andaba tan bien y porque siempre me ayudaron, aunque hubiera fricciones.

Dedicatoria

A mi niño interior, que siempre quiso ser científico y ahora sabe lo hermosa y cruel que puede ser la ciencia.

“Cuando la vida te de limones, determínales el pH.”

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Rotavirus	4
1.1.1. Genoma y proteínas	4
1.2. VP3	6
1.3. Inmunidad innata	7
1.3.1. Respuesta celular contra dsRNA	7
1.3.2. Vía 2-5 OAS/RNasa L	7
1.4. RNasa L	9
1.4.1. Actividad de endonucleasa	9
1.4.2. Asociación a citoesqueleto	9
1.5. Sistemas de modificación del genoma	10
1.5.1. Endonucleasas guiadas por RNA	10
2. ANTECEDENTES	12
3. HIPÓTESIS.....	13
4. OBJETIVOS.....	13
5. METODOLOGÍA	14
5.1. Diseño y clonación del sgRNA	14
5.1.1. Diseño de sgRNA	14
5.1.2. Clonación de sgRNA	14
5.1.3. Lipofección	16
5.1.4. Citometría de flujo	16
5.2. Aislamiento y caracterización de mutantes.....	16
5.2.1. Aislamiento	16
5.2.2. Caracterización por western blot	17
5.2.3. Genotipificación por PCR.....	18
5.2.4. Secuenciación	19
5.2.5. Síntesis de proteínas	19
5.2.6. Análisis de la degradación de rRNA	20
5.3. Infección con Rotavirus	20
5.3.1. Infectividad.....	20
5.3.2. Progenie viral	20
5.3.3. Lipofección con DLPs.....	21
6. RESULTADOS	22

6.1.	Diseño y clonación del sgRNA	22
6.1.1.	Diseño de sgRNA	22
6.1.2.	Clonación de sgRNA y lipofección a células MA104	23
6.2.	Cell sorting.....	24
6.3.	Aislamiento y caracterización de mutantes.....	25
6.3.1.	Caracterización por western blot	25
6.3.2.	Genotipificación por PCR.....	25
6.3.3.	Secuenciación	26
6.3.4.	Síntesis de proteínas	28
6.3.5.	Degradación de rRNA.....	30
6.4.	Infección con Rotavirus	31
6.4.1.	Infectividad.....	31
6.4.2.	Progenie viral	32
6.4.3.	Infección con DLPs.....	33
7.	DISCUSIÓN	35
8.	CONCLUSIONES.....	39
10.	PERSPECTIVAS	40
11.	REFERENCIAS	41
12.	ANEXOS.....	43
P1:	Diseño de sgRNAs usados en el sistema CRISPR/Cas 9	44
P2:	Clonación de sgRNA en pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)	48
P3:	Transformación de bacterias electrocompetentes	49
P4:	Cultivo y subcultivo de células	50
P5:	Lipofección de plásmidos.	51
P6:	Clasificación por citometría de flujo (Cell sorting)	52
P7:	SDS-PAGE y western blot	53
P8:	Congelamiento de células de mamífero.....	55
P9:	Purificación de DNA de células de mamífero.....	56
P10:	Síntesis de dsRNA in vitro.....	57
P11:	Inhibición de síntesis de proteínas	58
P12:	Infección con Rotavirus	59
P13:	Obtención de lisado viral, TLPs y DLPs	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de VP3.	6
Figura 2. Vía 2-5 OAS/RNasa L.	8
Figura 3. Esquema de los sistemas CRISPR/Cas.	11
Figura 4. Importancia de la regulación de la vía OAS/RNasa L por VP3.	12
Figura 5. Mapa del plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP.	15
Figura 6. En negro están marcadas las secuencias de los sgRNA dentro del plásmido.	23
Figura 7. Clonas mutantes, ausencia de RNasa L.	25
Figura 8. Esquema de sitios de corte de sgRNAs y primers para PCR.	26
Figura 9. PCR para evaluar ambos sitios de mutación.	26
Figura 10. Secuencia del sitio V2 de la clona 5A.	27
Figura 11. Alineamiento y secuencia de la clona 3D.	28
Figura 12. Secuencia de aminoácidos de RNasa L silvestre y las proteínas teóricas generadas por 5A y 3D.	29
Figura 13. Ensayo de síntesis de proteínas.	30
Figura 14. Degradación de rRNA en clonas mutantes.	31
Figura 15. Infectividad de las clonas con Rotavirus.	31
Figura 16. Progenie viral de cepas de Rotavirus.	33
Figura 17. Infectividad de las clonas con DLPs.	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genoma de Rotavirus RRV y proteínas codificadas por cada segmento.	5
Tabla 2. Primers PCR sitios de mutación.	18
Tabla 3. sgRNAs diseñados.	22
Tabla 4. Gráficos de población de las células separadas por citometría de flujo.	24

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Diluciones realizadas para obtener un mejor aislamiento de las clonas.	17
Diagrama 2. Criterio de selección de clonas mutantes.	18
Diagrama 3. Infectividad y progenie viral en la clona 3D.	32

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Rotavirus

De acuerdo con la OMS las principales causas de muerte, en países en desarrollo, para niños menores de 5 años son: parto prematuro (17.2%), neumonía (15.4%), complicaciones en el parto (11.4%), y diarrea (9.6%). Los casos de diarrea son la segunda causa por infección y de decesos infantiles, lo cual representa alrededor de 476 000 muertes al año. Rotavirus es uno de los principales agentes causales en este grupo poblacional, siendo responsable de 220,000 muertes (~50%) (World Health Organization 2017).

Los rotavirus pertenecen a la familia Reoviridae, cuyos miembros infectan una gran y diversa cantidad de organismos como mamíferos, aves, peces, reptiles, insectos, hongos, levaduras, plantas, y algas. Las partículas infecciosas de esta familia son muy estables y pueden permanecer en el medio por periodos prolongados. Las enfermedades causadas por esta familia de virus pueden ser leves o asintomáticas, sin embargo, algunos miembros de esta familia representan importantes problemas de salud animal y vegetal, tales como los *Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus*, y *Seadornavirus* (Modrow 2013).

1.1.1. *Genoma y proteínas*

La estructura de los rotavirus es icosaédrica, con un tamaño de 70 - 80 nm. La cápside está formada por tres capas concéntricas de proteínas y carece de una cubierta lipídica. Dentro de la partícula viral está el genoma que consiste en once segmentos de RNA de doble cadena o dsRNA. Los once segmentos codifican para doce proteínas virales (Fields & Knipe 2007). Los mRNAs virales contienen en su extremo 5' una estructura *cap* y en el extremo 3', no poliadenilado, tienen una secuencia conservada (GACC). Con la excepción del segmento 11 del genoma de los Rotavirus (que codifica para dos proteínas), todos los demás segmentos codifican únicamente para una proteína viral (Deo, Groft et al. 2002, Pesavento, Crawford et al. 2006) como se presenta en la **Tabla 1**.

Las proteínas virales que forman la partícula infecciosa son: VP1 y VP3 que, junto con el genoma, están en la nucleocápside o *core* del virus, VP2 que rodea al *core* e interactúa con las dos proteínas anteriores, VP6 que forma la cápside intermedia, y VP4 y VP7 que forman la cápside externa del virus. La función de estas proteínas no es únicamente estructural. VP1 es una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp, *RNA dependent RNA polymerase*), VP3 tiene actividad de metil-guanilil transferasa y VP2 es necesaria para la replicación, por su función de modular la

actividad de VP1 y por su capacidad de unión a RNA. En conjunto VP1, VP2 y VP3 forman el complejo para la replicación y transcripción del genoma de Rotavirus (RV). VP6 es la proteína más abundante de la cápside, es el principal antígeno del virus y también es necesaria para la transcripción del RNA viral. VP4 es un antígeno de neutralización, participa en la unión del virus a la célula huésped, es responsable de la infectividad mediada por tripsina, y es un factor de virulencia; su corte con tripsina genera las proteínas VP5 y VP8. VP7 es una glicoproteína que se ensambla en forma de trímeros en la partícula viral, al igual que VP4 induce anticuerpos neutralizantes, y su trimerización es dependiente de calcio (Fields & Knipe 2007, Modrow 2013).

Tabla 1. Genoma de Rotavirus RRV y proteínas codificadas por cada segmento.

Proteínas estructurales				Proteínas no estructurales			
Segmento	Longitud (pb)	Proteína	Peso molecular (kDa)	Segmento	Longitud (pb)	Proteína	Peso molecular (kDa)
1	3266-3302	VP1	125	5	1581-1611	NSP1	53
2	2687-2690	VP2	95	7	1075-1104	NSP3	34
3	2591	VP3	88	8	1059-1062	NSP2	35
4	2350-2364	VP4	85	10	750-751	NSP4	20
6	1356	VP6	45	11	663-667	NSP5	26
9	1062	VP7	34			NSP6	11

Las proteínas no estructurales, o NSP (por sus siglas en inglés *Non-Structural Proteins*), son producidas durante la infección de rotavirus dentro de la célula huésped. Estas proteínas son responsables de regular la replicación viral al igual que la morfogénesis del virus. NSP1 tiene un papel como reguladora de la respuesta mediada por interferón al unirse a varios factores de la vía de interferón (IRF-3, 5 y 7 o NfκB) e inducir su degradación (Arnold 2016). NSP2, forma octámeros que tienen actividad de unión de RNA (sin secuencia específica), tiene actividad de NTPasa dependiente de Mg²⁺, y de helicasa. La interacción de NSP2 con el extremo N-terminal de NSP5 promueve la formación de viroplasmos, estructuras especializadas en el empaquetamiento de RNA viral. NSP3 es una proteína de carácter básico y con actividad únicamente cuando forma dímeros. Se une de manera específica a los extremos 3' del mRNA viral a través de sus motivos de dedos de zinc; de manera independiente, esta proteína interacciona con el factor de traducción eIF4G en el mismo sitio en el que se une la proteína de unión a poliA, lo que desplaza a los mRNA celulares del complejo eIF4 inhibiendo su traducción (Lopez, Ocegüera et al. 2016). NSP4 es una

glicoproteína que se ancla al retículo endoplásmico (RE) por su extremo N-terminal y funciona como receptor de VP6 para que las partículas de doble capa (*double layered particles, DLP*) recién ensambladas en los viroplasmos transloquen hacia el interior del RE durante la morfogénesis del virus. Además, la actividad proteolítica de una enzima, aún no descrita, escinde a NSP4 y libera el extremo C-terminal, el cual viaja a citoplasma y posteriormente es transportado fuera de la célula, donde funciona como virotoxina, causando un desequilibrio iónico en el transporte de iones Cl^- , lo que provoca un desbalance en la absorción de solutos, siendo una de las causas de la diarrea (Lorrot & Vasseur 2007). NSP5 es una proteína con carácter ácido y con actividad en su forma de dímero, en la cual se permite su fosforilación. Es, junto con NSP2, el principal componente de los viroplasmos (o fábricas virales, donde inicia la morfogénesis del virus). Interactúa con NSP2 por medio de su extremo N-terminal y con NSP6 por medio de su extremo C-terminal. NSP5 une RNA de cadena sencilla (ssRNA) y de cadena doble (dsRNA) de manera inespecífica. NSP6 es una proteína codificada en un marco de lectura alterno en el segmento 11 que está ausente en todos los Rotavirus del serogrupo C y algunos del serogrupo A, su función no ha sido elucidada plenamente (Pesavento, Crawford et al. 2006, Fields & Knipe 2007).

1.2. VP3

VP3 es la enzima viral que regula la adición de 7-metilguanosina al extremo 5' del RNA viral con enlace particular 5'-5' fosfodiéster, conocido como *cap*. Esta proteína está codificada en el segmento 3 del genoma de rotavirus y tiene 4 dominios funcionales (**Figura 1**). En estudios recientes se encontró que además, VP3 tiene actividad de 2'-5' fosfodiesterasa, lo que le permite

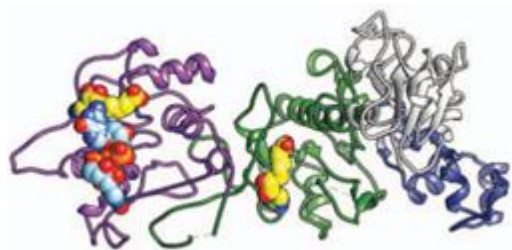


Figura 1. Estructura de VP3.

Predicción por homología PHYRE usando la proteína VP4 de BTV10. En gris el extremo N-terminal, verde el dominio N7-MTasa, morado el dominio 2'-O-MTasa, y azul los dominios GTPasa/RTPasa.

degradar oligonucleótidos con enlace 2'-5' fosfodiéster, algunos son una señal importante de mecanismos de inmunidad innata, en particular los 2-5A (participantes de la vía OAS/RNasa L; descrita más adelante) (Zhang, Jha et al. 2013, Ogden, Snyder et al. 2014, Sanchez-Tacuba, Rojas et al. 2015).

1.3. Inmunidad innata

Al depender de la maquinaria de la célula, los virus ocasionan un desbalance en la homeostasis de su huésped. Muchas enfermedades infecciosas son resultado de estas alteraciones. La manera en la que organismos vertebrados se protegen de patógenos es por medio del sistema inmune. Este a su vez se divide en sistema inmune innato y adaptativo. El sistema inmune innato se compone de células y biomoléculas presentes en todo momento con capacidad de evitar la entrada, degradar y/o atacar microorganismos patógenos; el tiempo de reacción de este sistema es de minutos a horas. El sistema inmune adaptativo es desarrollado en respuesta al reconocimiento, procesamiento y presentación de antígenos específicos del patógeno; es propiciado por células especializadas y ocurre en días o semanas. A lo largo de la vida de los organismos vertebrados se establecen respuestas inmunes hacia una gran diversidad de patógenos. Por lo tanto los miembros jóvenes de muchas especies son susceptibles a enfermedades de todo tipo al no haber sido aún expuestos a un gran número de retos, así como tener un sistema inmune adaptativo inmaduro (Murphy, Janeway et al. 2012).

1.3.1. *Respuesta celular contra dsRNA*

Cuando un virus entra a la célula incita una respuesta inmune innata mediada por varios mecanismos. Algunas moléculas que regulan la defensa viral por medio de la detección de RNA exógeno son la proteína-quinasa de RNA (PKR) (que se activa en respuesta a dsRNA), la *Toll-like receptor protein* (TLR3), presente en membranas endosomales, y miembros de la familia RLR (*RIG-I like receptors*) como RIG-I y MDA5, y las proteínas oligoadenilato sintetetasas (OAS). Las OAS, en particular, forman parte del sistema 2-5 OAS/RNasa L, que se detalla a continuación (Gantier & Williams 2007).

1.3.2. *Vía 2-5 OAS/RNasa L*

Cuando los monómeros de las OAS interactúan con dsRNA forman entre ellos un homotetrámero. Este tetrámero tiene actividad enzimática y usando ATP del citoplasma sintetiza oligómeros (de 2 a 5 unidades, teniendo mayor actividad los de 3) de adeninas con enlaces 2'-5' fosfodiéster; a estos compuestos se les conoce como 2'-5' oligoadenilatos (2-5A). Los 2-5A, en especial los trímeros, se unen con gran afinidad y muy baja concentración, a RNasa L para convertirla de un monómero inactivo a un dímero con actividad de endorribonucleasa que corta preferencialmente río abajo de dímeros 5'-UU-3' y 5'-UA-3'. Por lo tanto, la endonucleasa RNasa L es una proteína muy activa por dos razones: su activación a concentraciones picomolares de 2-

5A y su actividad en sitios tan comunes (UN[^]N¹) (Han, Donovan et al. 2014). Como resultado de la activación de esta vía hay una severa degradación tanto del RNA celular (mRNA y rRNA), como del RNA viral (**Figura 2**). Aparte de ser constitutiva, esta respuesta también es dependiente de interferón, IFN-β principalmente, ya que este estimula la síntesis de las OAS y RNasa L cuando se activa la vía de IFN (Chakrabarti, Jha et al. 2011). Además de ser un efector antiviral, la actividad de RNasa L se asocia a diversos eventos biológicos tales como: senescencia, diferenciación celular, autofagia, desmielinización de axones, almacenamiento de lípidos, unión a citoesqueleto, regulador de mRNA (en su forma activa, endonucleasa) y progresión de diabetes; también se ha observado en eventos antitumorales con una actividad antiproliferativa y proapoptótica (Brennan-Laun, Ezelle et al. 2014, Ezelle, Malathi et al. 2016).

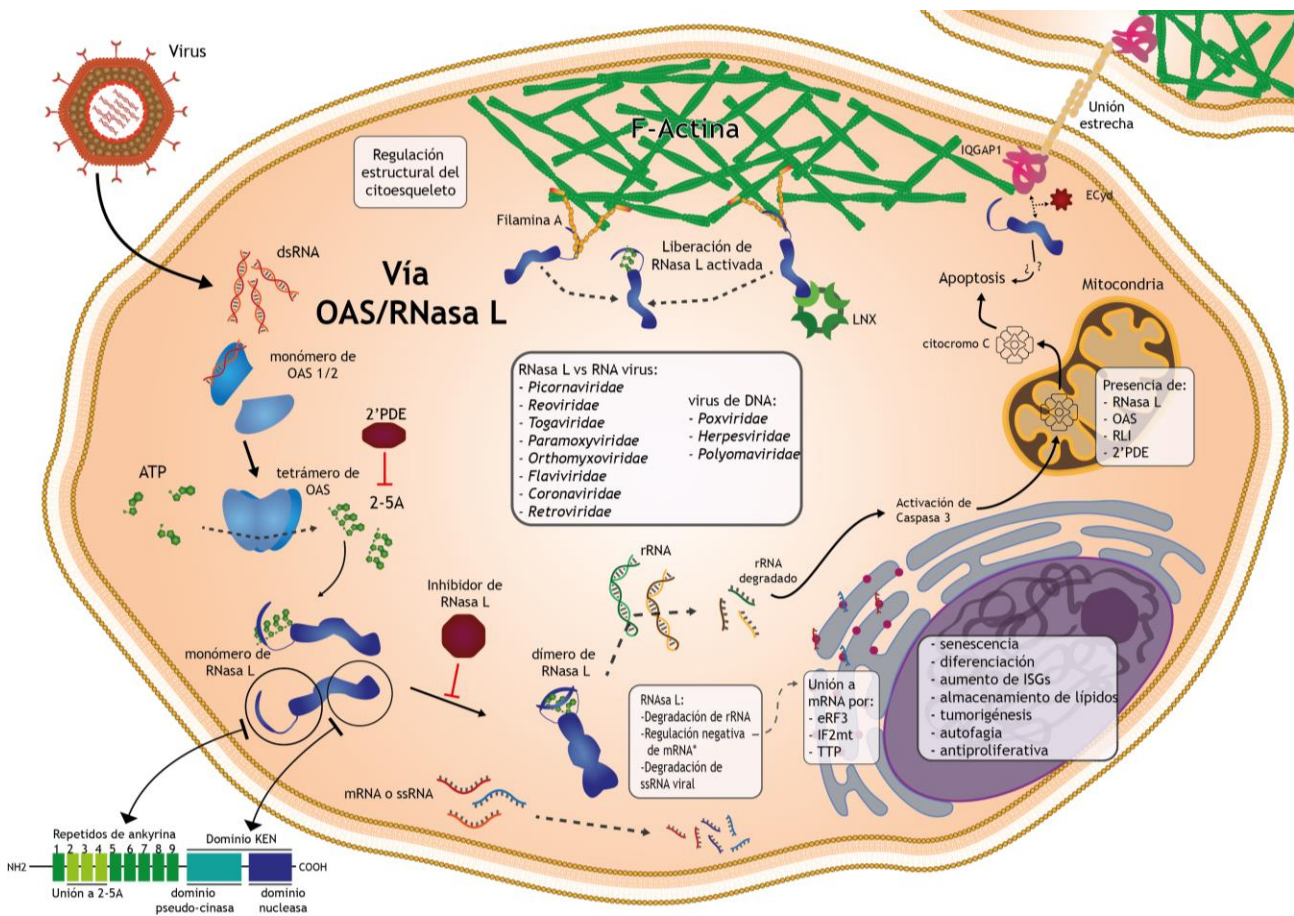


Figura 2. Vía 2-5 OAS/RNasa L.

¹ Donde U es uracilo, N es cualquier nucleótido y ^ es el sitio de corte.

1.4. RNasa L

1.4.1. *Actividad de endonucleasa*

Canónicamente la RNasa L se encarga de la degradación de ssRNA, ante la presencia de dsRNA, como se describió previamente. La degradación de ssRNA no solo tiene como consecuencia la inhibición de la traducción de mensajeros celulares y virales (y por lo tanto inhibiendo el ciclo replicativo de los virus), sino también se ha observado que los fragmentos de RNA producidos durante la degradación son responsables de la activación de RIG-I y subsecuentemente la transcripción de IFN β , seguido de la activación de ISGs (*interferon stimulated genes*) promoviendo así un estado antiviral en las células vecinas, **Figura 2**. Una vía colateral relacionada a la degradación del mRNA celular es la apoptosis. La degradación de ssRNA, en especial del rRNA 18S, produce pequeños fragmentos de RNA que provocan la liberación de citocromo C de la mitocondria, iniciando así la apoptosis (Rusch, Zhou et al. 2000). De manera similar – asociada con PKR y la cinasa N-terminal c-Jun– induce autofagia al degradar a la proteína p62 y promover la conversión de LC3B1/LC3B2, resultando en la acumulación de autofagosomas. Un tercer efecto de la activación de la RNasa L es la activación del inflamosoma por medio de pequeños RNA (productos de degradación) que se unen a la helicasa DHX33, la cual a su vez se une a la proteína de la familia NLR con dominio pirina 3, NLRP3, y la proteína mitocondrial de señalización antiviral (MAVS, por sus siglas en inglés) para formar un complejo de activación y aumentar la producción de la interleucina IL-1 β , **Figura 2** (Chakrabarti, Jha et al. 2011, Drappier & Michiels 2015).

1.4.2. *Asociación a citoesqueleto*

Por otra parte, varios estudios han descrito la asociación de la RNasa L a citoesqueleto. Se ha observado que la RNasa L se asocia a dos proteínas en particular: IQGAP1 y filamina A (FLNA). IQGAP1 es una proteína de andamiaje relacionada con la reorganización de la actina, esta proteína comparte con la RNasa L su asociación con ciertas funciones biológicas como son la proliferación, apoptosis y la diferenciación (Abel, Schuldt et al. 2015). Solo existe un estudio que analiza la interacción entre estas dos proteínas y aún no se ha logrado elucidar el mecanismo de acción, pero sí se ha establecido la necesidad de ambas proteínas para la inducción de apoptosis mediada por ECyd, compuesto citotóxico análogo a la citidina (Sato, Naito et al. 2010).

FLNA es una proteína que se encarga de mediar la interacción de varias proteínas con el citoesqueleto, principalmente con actina. FLNA se une al extremo N-terminal de RNasa L y así con el citoesqueleto y esta unión solo se rompe durante la activación de RNasa L con 2-5 A o durante la infección con el virus de encefalomiocarditis. El complejo formado por FLNA solo requiere del

dominio de repetidos de ankyrina de RNasa L. En el modelo *knockout* de RNasa L de fibroblastos de embrión murino se observó la disminución de actina polimerizada; en modelos carentes de RNasa L, FLNA, o ambos, se ha observado un aumento, de hasta 4 veces contra el control, en la entrada del virus de Sendai (Malathi, Siddiqui et al. 2014, Ezelle, Malathi et al. 2016).

1.5. Sistemas de modificación del genoma

Una manera de evaluar la función de una proteína dada es disminuir (*knockdown*) o eliminar (*knockout*) su presencia en la célula. Hoy en día existen varias metodologías para realizar el *knockout* de un gen. Entre las más usadas están los dedos de zinc (ZFs), los *transcription activator-like effector nuclease* (TALENs) y más recientemente el sistema de endonucleasas guiadas por RNA (gRNA por sus siglas en inglés *guide RNA*), siendo el más conocido y explotado por el momento, el sistema CRISPR/Cas 9 (del inglés *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/ CRISPR-associated protein 9*). Una de las desventajas que presentan los sistemas de ZFs y TALENs es que dependen de una biblioteca de proteínas para poder construir una proteína grande que sea específica para modificar una secuencia determinada. En cambio, los sistemas endonucleasa/gRNA presentan la ventaja de ser de fácil aplicación y relativamente específicos ya que son mediados por el apareamiento Watson-Crick de un gRNA al DNA blanco utilizando un oligonucleótido de un tamaño promedio de 20 pb (Doudna & Charpentier 2014).

1.5.1. Endonucleasas guiadas por RNA

Hasta el momento existen varios sistemas de endonucleasa/gRNA. El más conocido es el sistema CRISPR/Cas9, otros en desarrollo y con gran potencial son los que contienen a las endonucleasas Cpf1 y C2C2. La diferencia más importante entre cada una de estas nucleasas es el sitio PAM (del inglés *Protospacer Adjacent Motif* que reconocen (ver más adelante), el tipo de corte que hacen, ya sea romo (Cas9) o escalonado (Cpf1) y los nucleótidos objetivo dsDNA o ssRNA (C2C2) (Hsu, Lander et al. 2014, Zetsche, Gootenberg et al. 2015, Abudayyeh, Gootenberg et al. 2016).

Los sistemas CRISPR/Cas (en este caso solo nos enfocamos en el CRISPR/Cas9) se encuentran de manera natural en bacterias, arqueas y virus, en los cuales fungen como vías de defensa antiviral (Levasseur, Bekliz et al. 2016). El complejo consta de dos partes: una enzima con actividad de endonucleasa (llamada Cas9, Cpf1, C2C2, etc.) y un RNA guía o gRNA. Cuando la endonucleasa y el gRNA se acoplan, el complejo se une por homología a una región de DNA que determina el sitio de corte de la endonucleasa al igual que su activación. En su forma nativa (en bacterias) el gRNA se compone por dos partes: el crRNA y el tracrRNA, al menos para el sistema dependiente de Cas 9. El crRNA es la región que determina el sitio de corte por homología, y en promedio consta de

20 pb. El tracrRNA es un RNA que sirve como andamiaje para el crRNA y como transactivador de la endonucleasa. Sistemas como Cpf1 y C2C2 tienen un gRNA diferente. El crRNA y el tracrRNA deben de hibridar entre sí para poder unirse a la endonucleasa, Cas9, y que ésta ejerza la actividad de corte guiado (**Figura 3**) (Hsu, Lander et al. 2014, Zetsche, Gootenberg et al. 2015, Abudayyeh, Gootenberg et al. 2016).

Para simplificar su uso, se han unido, por ingeniería genética, el crRNA y el tracrRNA para obtener un sgRNA lineal (*single-guide RNA*). El sistema también permite su adaptación para el uso de una secuencia diseñada en lugar del crRNA y así permite dirigir el corte de Cas9 a otros blancos, aunque no sean de origen viral. La única limitante es que la secuencia de DNA debe de contener una región específica río abajo de la secuencia blanco, denominada PAM que es un sitio de reconocimiento específico para la endonucleasa; la secuencia PAM de Cas 9 es: 5'-NGG-3'. La transfección de un plásmido que codifique para el transcrito de Cas9 y para un sgRNA en una célula eucarionte es suficiente para lograr la expresión heteróloga y funcional de este sistema. Una vez que el sistema CRISPR/Cas9 corta su secuencia objetivo, la célula repara el daño por la vía NHEJ (por sus siglas en inglés *Non-Homologous End Joining*) o HR (por sus siglas en inglés, *Homologous Recombination*). La reparación por NHEJ es proclive a la inserción o deleción de bases (*indels*), los cuales pueden afectar el transcrito de genes y generar un *knockout* (Ran, Hsu et al. 2013).

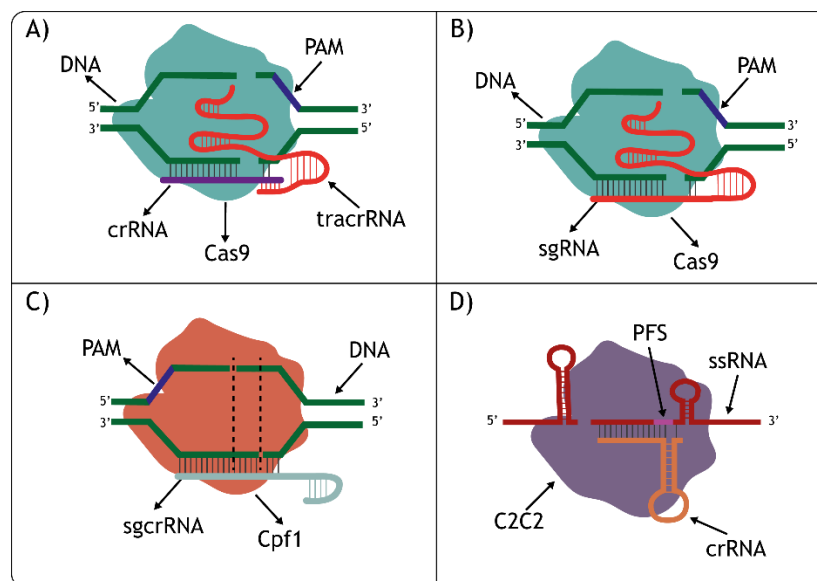


Figura 3. Esquema de los sistemas CRISPR/Cas.

A) sistema Cas9 nativo; depende de dos RNAs para funcionar: crRNA y tracrRNA B) mismo sistema que A, pero modificado para sólo requerir un RNA. Ambos sistemas realizan un corte romo y doble en DNA, ambos identifican un sitio PAM (5'-NGG-3') adyacente al sitio de corte. C) sistema Cpf1; este depende de un crRNA, realiza un corte escalonado en DNA y el sitio PAM (5'-TTN-3') está lejos del sitio de corte. D) sistema C2C2, que requiere de un crRNA simple, corta RNA e identifica un sitio PFS (análogo al PAM).

2. ANTECEDENTES

Estudios previos del laboratorio han establecido que durante la infección con la cepa RRV de rotavirus, la vía 2-5 OAS/RNasa L puede ser controlada en dos niveles. El primero, durante la entrada del virus (cuyos efectores aún no están definidos) y el segundo, más tardío, en el que la proteína VP3 tiene un papel importante, ya que con su actividad de 2-5 fosfodiesterasa degrada los 2-5A y previene la activación de la RNasa L. Se ha descrito que al silenciar VP3 durante la infección, el rRNA es degradado debido a la actividad de RNasa L. Concomitantemente se observó una severa inhibición en la producción de partículas virales infecciosas, sugiriendo que VP3 es esencial para la replicación adecuada del virus. Por otra parte, Sánchez et al encontraron que al silenciar la expresión de la RNasa L en células infectadas con rotavirus hubo un incremento en la cantidad de virus infeccioso de hasta dos veces (Figura 4) (Sanchez-Tacuba, Rojas et al. 2015). Al silenciar simultáneamente VP3 y RNasa L se encontró una producción de virus infeccioso aún mayor que la que se obtiene en condiciones control (sin silenciar ningún gen). Estos resultados sugieren que la actividad de *capping* de VP3 puede no ser esencial en el ciclo de replicación viral, pues en ausencia de RNasa L no es necesaria la actividad de fosfodiesterasa de VP3 y hay una buena replicación del virus (Sanchez-Tacuba, Rojas et al. 2015). Dado que la actividad de RNasa L es muy potente, incluso a bajas concentraciones de la proteína, un *knock-down* puede presentar un fenotipo de células con RNasa L y células sin RNasa L. Un estudio más limpio generaría datos más claros sobre la actividad que tiene esta proteína en el ciclo replicativo de rotavirus.

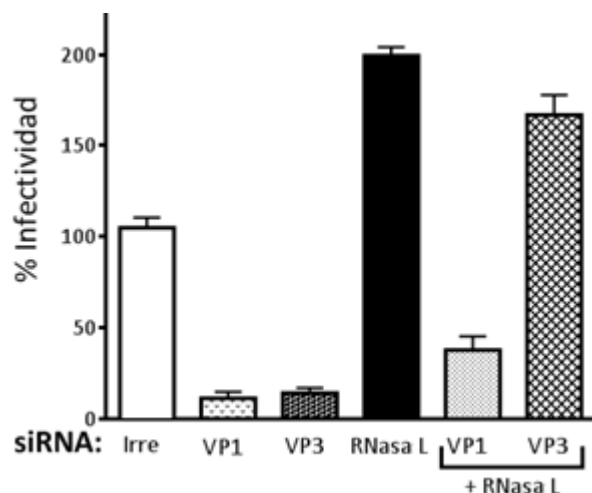


Figura 4. Importancia de la regulación de la vía OAS/RNasa L por VP3.

Gráfico de progenie viral, cantidad de virus infeccioso obtenido de cada tratamiento. En ausencia de RNasa L existe un aumento del doble en la producción de virus infeccioso. En ausencia de VP3 se ve reducida la producción de virus infeccioso. En ausencia de RNasa L y VP3 vuelve a aumentar a casi el doble la producción de virus infeccioso.

3. HIPÓTESIS

La proteína RNasa L tiene una relevancia antagonica en el ciclo replicativo de Rotavirus y su ausencia, *knock-out* mediante CRISPR/Cas9, permitirá observar el comportamiento de la célula en ausencia de la proteína y del ciclo replicativo de Rotavirus.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar el ciclo de replicación de Rotavirus en ausencia de RNasa L

OBJETIVOS PARTICULARES

- i. Obtener una clona de células MA104 en la que se inactive la producción de RNasa L
- ii. Estudiar el efecto de la ausencia de RNasa L en la célula, durante la infección con rotavirus

5. METODOLOGÍA

5.1. Diseño y clonación del sgRNA

5.1.1. *Diseño de sgRNA*

Se diseñaron dos RNA guía (sgRNA) usando el software: *Design sgRNAs for CRISPRko (S. pyogenes and S. aureus)* (Broad-Institute 2017).

El primer sgRNA se diseñó con base en un algoritmo sencillo, en el cual solo se realizaba una estimación de la eficiencia de corte en el sitio blanco. El segundo sgRNA se diseñó con base en un algoritmo más complejo (dada una actualización del software antes mencionado) que asociaba dos parámetros importantes: i) eficiencia de corte en el sitio blanco y ii) cortes en sitios alternativos (*off-targets*). Una guía detallada del protocolo seguido se encuentra en el anexo **P1: Diseño de sgRNA usados en el sistema CRISPR/Cas 9**.

5.1.2. *Clonación de sgRNA*

Se siguió el protocolo establecido por Cong (Cong, Ran et al. 2013). La descripción de este protocolo se encuentra en el anexo **P2: Clonación de sgRNA en pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)**.

El plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) tiene un tamaño aproximado de 9 300 pb, contiene un gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección en bacterias, **Figura 5**. En células animales expresa la enzima Cas9 y parte del sgRNA; contiene un sitio de clonación para insertar la secuencia guía del sgRNA. Contiene además el gen de EGFP como marcador de selección en células de mamífero. Los plásmidos se transformaron por electroporación en células competentes JM101 siguiendo el protocolo **P3: Transformación de bacterias electrocompetentes**.

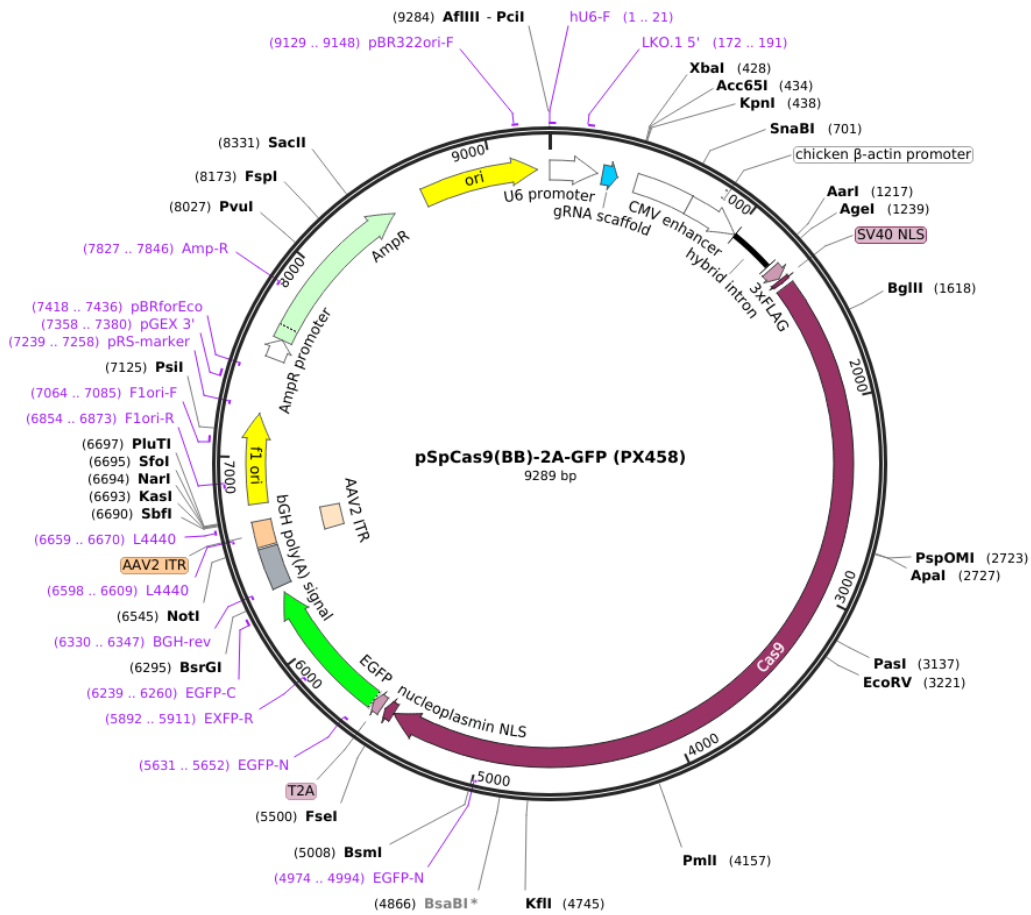


Figura 5. Mapa del plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP.

Para el análisis de la clonación y para su secuenciación, los plásmidos en los que se clonaron los sgRNA se purificaron usando el kit GeneJet Plasmid Mini Prep (Thermo Scientific) siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. La secuenciación se realizó usando un *primer* dirigido al promotor U6 con la secuencia 5'-GGACTATCATATGCTTACCG-3'. Cuando se confirmaba la presencia correcta de los sgRNA en los plásmidos, estos se purificaban en grandes cantidades para su uso en lipofección. El plásmido para lipofección se purificó usando el kit QIAfilter™ Plasmid Midi Prep (Qiagen).

Lipofección y separación de células por citometría (cell sorting)

Se usó la línea celular MA104 (ATCC), células epiteliales de riñón de mono verde (*Chlorocebus aethiops*). Se cultivaron en medio *Dulbecco Modified Eagle Media - Reduced in Serum* (Thermo Scientific Hyclone), suplementado con 5 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado (Biowest). Para ciertos protocolos se usó medio *Minimum Essential Medium* sin suero (MEM s/suero) adicionado

con bicarbonato de sodio 4.4% m/v (2.0 mM L-glutamina, sin bicarbonato de sodio, Sigma-Aldrich). Las células se cultivaron en ambiente húmedo, a 37 °C y 5 % de CO₂. Al llegar a confluencia, las células en monocapa disgregaron usando EDTA 0.02 % y tripsina 0.01 %. Un protocolo detallado para el subcultivo de células se encuentra en el anexo **P4: Cultivo y subcultivo de células**.

5.1.3. Lipofección

Veinticuatro horas antes de la lipofección se sembraron células en pozos de una placa de 12, para alcanzar una confluencia del 60 - 80%. Dos pozos se lipofectaron con el guía V2 y dos pozos con ambos guías, V1 y V2, y dos pozos se usaron como control. Para la lipofección se usó *Lipofectamine® LTX and Plus™ Reagent*, (Invitrogen, Thermo Fisher). Un protocolo detallado se encuentra en **P5: Lipofección de plásmidos**. Las células así tratadas fueron separadas por citometría de flujo 48 horas después de la lipofección.

5.1.4. Citometría de flujo

Las células lipofectadas se resuspendieron usando EDTA 0.02 %, tripsina 0.01 %. Una vez resuspendidas se agregó medio de clonación (Tabla A4. Medio de clonación.) para un volumen final de 500 µL. Estas células se separaron en un citómetro de flujo FACS Aria Fusion (BD Biosciences) usando como control negativo células sin lipofectar. Se separó y recuperó solo la población de interés: células individuales y con señal de fluorescencia EGFP ($\lambda = 488$ nm). Las células se colectaron en un tubo de citometría con 500 µL de medio de clonación y 50 µL de SFB. Una versión más detallada de lo realizado está en la sección: **P6: Clasificación por citometría de flujo (Cell sorting)**.

5.2. Aislamiento y caracterización de mutantes

5.2.1. Aislamiento

De los 550 µL de suspensión celular obtenidos de la separación por citometría de flujo (lipofección V2 y V1&V2 (V12)) se sembraron 3 pozos P96 con 150 µL y un pozo con 100 µL al cual se le adicionaron otros 50 µL de medio de clonación y se rotularon (e.g. Pozo 1= P1). Se dejaron crecer 96 horas sin ninguna perturbación a 37 °C, 5 % CO₂ y ambiente húmedo. No se esperaba desde un principio obtener clonas a partir de una célula ya que experimentos previos mostraron que el aislamiento de una célula de MA104 resultaba en su muerte; para que las células se propagaran se requería de un mayor número (>5).

Después de 96 horas se resuspendieron con EDTA 0.02 % y tripsina 0.01 %. Se llevaron a un volumen final de 200 μ L usando medio de clonación y se sembró 150 μ L de esta suspensión celular en un pozo P96. A partir de este pozo se realizaron cinco diluciones seriadas de manera horizontal y después cuatro diluciones seriadas de manera vertical obteniendo las diluciones de suspensión celular ejemplificadas en el **Diagrama 1**.

Diagrama 1. Diluciones realizadas para obtener un mejor aislamiento de las clonas.

Las diluciones de hicieron primero de izquierda a derecha en la fila superior y después de arriba abajo.

	1	2	3	4	5	6
A	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
B	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
C	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
D	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
E	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256

Como la quinta fila de las diluciones contenía el mismo volumen de suspensión celular se considera que es similar a la cuarta. Los pozos fueron rotulados con base en su columna (números) y su fila (letras). Las clonas fueron rotuladas con base en los sgRNA lipofectados, V2 o V12, el pozo inicial de la dilución (P1, P2, o P3) y la dilución en la que fue aislada, e.g. V2P3-4E: lipofectada solo con el plásmido V2, obtenida del pozo 3 y la dilución 4E. Las células diluidas se dejaron crecer el tiempo necesario hasta confluencia total para después resuspenderlas y pasar la mitad a una caja de 48 pozos (P48) y la otra mitad a una caja de 96 pozos (P96). El formato P48 era para amplificar la población celular y el formato P96 sería usado para analizar la presencia de RNasa L por ensayos de *western blot*.

5.2.2. Caracterización por *western blot*

Los pozos de células diluidas se lisaron con 50 μ L de amortiguador Laemmli y se evaluó la presencia de RNasa L (proteína de interés) y de vimentina (usada como control de carga) siguiendo el protocolo **P7: SDS-PAGE y *western blot***. Se analizaron aproximadamente 90 muestras. Para las seis poblaciones separadas: lipofección V2 y V12, pozo 1, 2, y 3 de cada una (P1, 2, 3), diluidas en 30 pozos, 1A, 2A, 3A ... 5E, y 6E. Una vez que se tuvieron los resultados se analizaron las posibles clonas con fenotipo KO para RNASEL. Varios pozos presentaron clonas ausencia de RNasa L, pero solo se consideraron aquellos pozos cuyas diluciones menores y directas de estos (el pozo de arriba) seguían presentando ausencia de RNasa L, solo así se consideraban como posibles mutantes, **Diagrama 2**. En caso contrario se consideraban como mutantes falsos positivos o poblaciones probablemente mezcladas con genotipo silvestre. Una vez

que se tenían candidatos probables se repetía el *western blot* y se obtenían dos revelados, uno normal y otro sobreexpuesto², para verificar la ausencia de la proteína.

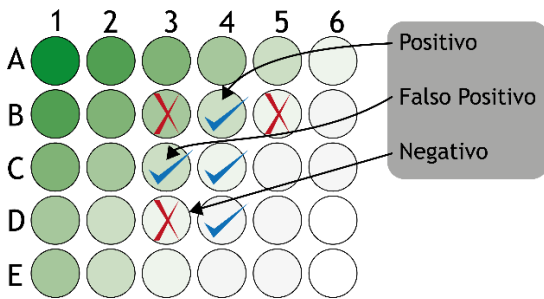


Diagrama 2. Criterio de selección de clonas mutantes.

5.2.3. Genotipificación por PCR

Para identificar las regiones mutadas se diseñaron dos pares de *primers* para amplificar la región alrededor del blanco del sgRNA por PCR. Un par estaba dirigido para la región circundante al sitio de mutación V1 y otro par al sitio V2. En Tabla 2 se muestra un resumen de los *primers* usados.

Tabla 2. *Primers* PCR sitios de mutación.

Sitio	Forward primer	Reverse primer	T _m (°C)	Tamaño del producto (pb)
V1	ACGCAGTACAAATGAGCAGG	CTTTCCTCAGCCGCTCTTGA	59	306
V2	GTGCAAACGTGGAGCCAGTA	TGTGGCTCTCACTCCCATAGA	59	404
V12	V1	V2	59	1086

Dado que las clonas mutantes obtenidas eran resultado de la lipofección de dos sgRNA se tenían cuatro posibilidades de mutación: i) sólo el sitio V1, ii) sólo el sitio V2, iii) en ambos sitios y iv) en ambos sitios con la delección de un segmento contenido entre ambos sitios. Para evaluar las cuatro posibilidades se usó el *forward primer* del sitio V1 y el *reverse primer* del sitio V2 (PCR V12), lo cual debía generar un producto de 1086 pb si no había delección, y de 328 pb si había una delección. En la **Tabla A5** se encuentra la secuencia completa del gen RNASEL indicando las posiciones de los *primers* y los sitios de mutación identificados.

² Dado que existe una variabilidad entre anticuerpos primarios y secundarios, los tiempos de exposición no son siempre constantes por variabilidad entre lote y lote de anticuerpos secundarios, soluciones de revelado, etc. Por estas razones se omiten los tiempos de revelado, tanto normal como sobreexpuesto.

El DNA genómico de las clonas celulares aisladas se extrajo siguiendo el protocolo **P9: Purificación de DNA de células de mamífero**. Una vez que se obtuvo el DNA, se hizo la reacción de PCR con la enzima *Taq DNA Polymerase (recombinant)* (Thermo Scientific) y los *primers* indicados. Los productos se resolvieron en un gel de agarosa al 1.5 % m/v en amortiguador TAE.

La genotipificación de 16 clonas carentes de RNAsa L reveló la existencia de 10 clonas que presentaban la delección del segmento del genoma evaluado y 6 clonas sin delección. A partir de esta genotipificación parcial se seleccionaron dos clonas, con las cuales se continuó el resto de los experimentos: **V12P2-5A** y **V12P2-3D**. La clona 5A sin delección y la clona 3D con delección.

Las 16 clonas se amplificaron y se congelaron siguiendo el protocolo **P8: Congelamiento de células de mamífero**.

5.2.4. Secuenciación

Los productos de PCR V12 obtenidos de MA104, V12P2-5A y V12P2-3D se secuenciaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología, UNAM en un secuenciador 3130xl (Applied Biosystems). Las secuencias se analizaron con el programa BioEdit (Tom Hall, Ibis Biosciences).

5.2.5. Síntesis de proteínas

Para estudiar la activación de RNAsa L y la inhibición de síntesis de proteínas se utilizó dsRNA sintetizado *in vitro*, para esto se siguió el protocolo **P10: Síntesis de dsRNA in vitro** y este dsRNA se usó en una cantidad de 300 ng por pozo para los ensayos siguientes.

Se sembraron células MA104, V12P2-5A, y V12P2-3D por triplicado en pozos P48, tres pozos para cada línea celular. Cada línea celular se sembró en: un pozo doble negativo (sólo MEM s/suero), un pozo negativo (solución de lipofectante, Lipofectamine 2000 (Invitrogen)) y un pozo positivo (lipofección de dsRNA). Posterior a la lipofección de dsRNA, 5 h 30 min, se marcó con Easy Tag Express ³⁵S (Dupont NEN) por 30 min, para detectar el efecto del dsRNA sobre la síntesis de proteínas; finalmente las células fueron lisadas con amortiguador Laemmli.

Las proteínas presentes en los lisados fueron resueltas por SDS-PAGE 10 % (acril-bis 30 % - 0.8 %). El gel se tiñó con azul de Coomassie y posteriormente se secó y se colocó en un cassette con una pantalla sensible a la radiación Phosphor Screen (GE Healthcare); la pantalla se reveló en el

equipo Typhoon FLA 9500 (GE). El protocolo detallado se encuentra en la sección **P11: Inhibición de síntesis de proteínas**.

5.2.6. Análisis de la degradación de rRNA

Se sembraron por duplicado pozos P48, para células MA104, V12P2-5A, y V12P2-3D. Un pozo como control negativo y un pozo lipofectado con dsRNA. Se siguió un protocolo similar al **P11: Inhibición de síntesis de proteínas** pero el tiempo de incubación después de la adsorción de dsRNA fue de 6 horas. A este tiempo las células se lisaron y el RNA total se purificó con el kit Pure Link™ RNA Mini (Ambion), siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. El RNA purificado se almacenó a -70 °C hasta su uso.

El RNA se cuantificó en NanoDrop ND-1000 y se usaron cantidades iguales de RNA para cargar en los pozos de un RNA Nano Chip (Agilent Technologies), usando el kit Agilent RNA 6000 Nano Reagents (Agilent Technologies) siguiendo el protocolo establecido por el proveedor. El chip con RNA se sometió a análisis en el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer.

5.3. Infección con Rotavirus

Se infectaron células con dos cepas de rotavirus: RRV (Rhesus rotavirus; obtenida de H.B. Greenberg, Stanford U.) y UK (Rotavirus Bovino; obtenida de Y. Hoshino, NIH). El protocolo de infección se encuentra en **P12: Infección con Rotavirus** y para obtener el lisado viral se utilizó el protocolo **P13: Obtención de lisado viral, TLPs y DLPs**.

5.3.1. Infectividad

Se sembraron 4 filas de 12 pozos de placa P96 con MA104, V12P2-5A, o V12P2-3D. Se realizaron diluciones seriadas de virus, RRV o UK, y se infectaron las células; 14 h después se fijaron y revelaron focos (inmunoperoxidasa) siguiendo lo establecido en **P12: Infección con Rotavirus**.

5.3.2. Progenie viral

Se sembraron pozos P48 con células MA104 y se infectaron por duplicado a una MOI=3 con RRV o UK; 14 h postinfección se lisaron con amortiguador PV y se cuantificó la producción de progenie viral en un ensayo de focos peroxidados **P12: Infección con Rotavirus**.

5.3.3. Lipofección con DLPs

Se purificaron partículas virales de triple capa (TLPs) y doble capa (DLPs, transcripcionalmente activas, pero sin capacidad de entrada) por ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio. El protocolo en detalle es **P13: Obtención de lisado viral, TLPs y DLPs.**

Antes de la lipofección de DLPs se tomó un volumen de DLPs suspendidas en CsCl y se desalaron usando Sephadex G-25 (Sigma Aldrich). Las partículas desaladas se cuantificaron en NanoDrop ND-1000 y se usaron para preparar complejos lipofectante: DLP, usando Lipofectamine (Invitrogen). Los complejos se lipofectaron y 14 h después se fijaron y revelaron focos infecciosos siguiendo el **P12: Infección con Rotavirus.**

6. RESULTADOS

6.1. Diseño y clonación del sgRNA

6.1.1. Diseño de sgRNA

Para hacer una línea celular carente de RNAsa L, nos basamos en la secuencia del gen de referencia humano RNASEL (GENBANK: NM_021133.3) y se diseñaron dos sgRNA utilizando el programa sgRNA Design del Broad Institute. No se usó la secuencia de la línea celular MA104 ya que se obtenían sgRNA poco adecuados; esto se debe a que el algoritmo de selección es diferente entre sgRNA diseñados a partir de una secuencia procesada (base de datos) y los obtenidos por una secuencia introducida por el usuario; aparte de que no se genera un análisis de sitios *off-target*. Los guías seleccionados y ciertas características de éstos se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. sgRNA diseñados.

En verde y azul nombres y secuencias objetivo de sgRNA; el número denomina la versión del software usado. La tabla es un resumen modificado del reporte (noviembre 2016). Una tabla más completa se encuentra en anexos, Tabla A1.

sgRNA	Secuencia 5' → 3'	Eficiencia de corte	No. de <i>off-targets</i> en regiones codificantes				No. de <i>off-targets</i> en regiones no codificantes de genes codificantes				No. de <i>off-targets</i> en genes no codificantes				No. de <i>off-targets</i> en demás regiones del genoma			
			MB-I	MB-II	MB-III	MB-IV	MB-I	MB-II	MB-III	MB-IV	MB-I	MB-II	MB-III	MB-IV	MB-I	MB-II	MB-III	MB-IV
V1- RNASEL	TTATCCTCGC AGCGATTGCG	0,5751	0	2	3	1	0	4	10	8	0	1	4	3	0	6	14	3
V2- RNASEL	TGAGTTTGCC AATCATAGGG	0,7025	0	0	1	0	0	32	35	24	0	13	14	9	0	38	32	47

En esta tabla se puede observar que el número de sitios *off-target* en el guía V1-RNASEL (V1) es mayor en regiones codificantes, pero mucho menor en las demás. La eficiencia de corte del guía V2-RNASEL (V2) es mayor, por lo que incluso con la desventaja de realizar más cortes en otras regiones del genoma, queda en mejor posición ponderando ambos criterios, eficiencia y número de *off-targets* (la relación al ponderar ambos es eficiencia >> #*off-targets*). Cabe mencionar que cuando el criterio de eficiencia no es afectado por errores de apareamiento³ entre el sitio y el sgRNA (MB-I), no hay sitios *off-target* para ninguno de los sgRNA. Los sitios *off-target* sólo son posibles cuando se permiten errores de apareamiento del sgRNA con el DNA objetivo, como serían los casos MB-(II-IV).

³ Los errores de apareamiento permitidos por el *software* son: bases erróneas en el DNA, incluidas inserciones o deleciones en el sitio objetivo (mayor o menor número de bases) y diferentes bases en el sitio PAM; estos errores tienen diferente peso dependiendo de su locación en el sitio objetivo (de la posición 1 a la 20, cada posición interfiere en menor o mayor medida con la eficiencia final) y en el PAM.

6.1.2. Clonación de sgRNA y lipofección a células MA104

Con base en el análisis anterior se sintetizaron los oligonucleótidos: V1 y V2; ambos con las adiciones necesarias para ser insertados en el plásmido que contenía el sistema CRISPR/Cas9 (como se describió en la sección de materiales y métodos). Se clonaron ambos insertos, cada uno en un plásmido. Estos se transformaron en bacterias por electroporación y las recombinantes que contenían el plásmido se seleccionaron usando carbenicilina.

De estas clonaciones se seleccionaron dos plásmidos conteniendo las secuencias V1 y V2, mismos que fueron secuenciados para corroborar la correcta inserción de la secuencia guía. Se muestran de manera representativa dos histogramas de las secuencias obtenidas de V1 y V2 (**Figura 6**).

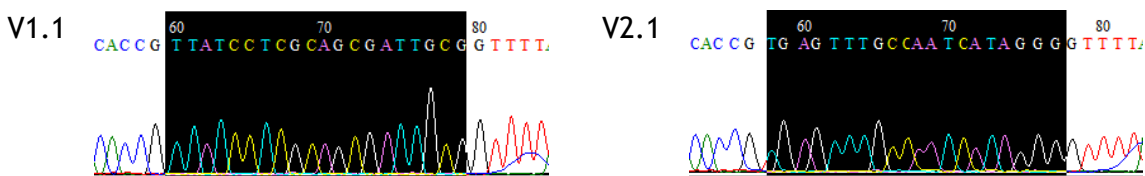
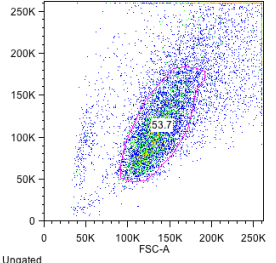
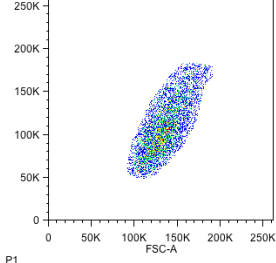
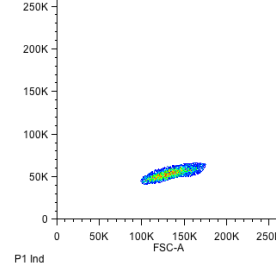
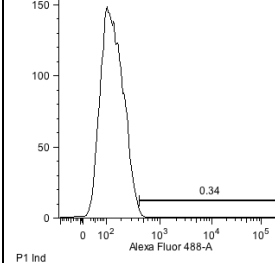
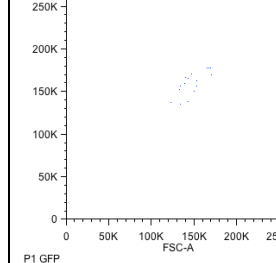
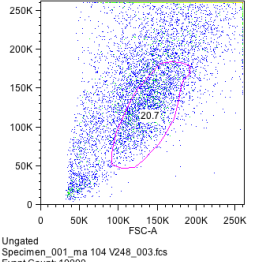
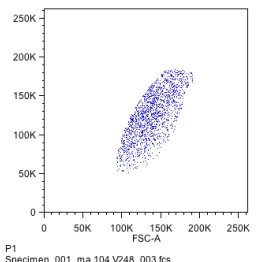
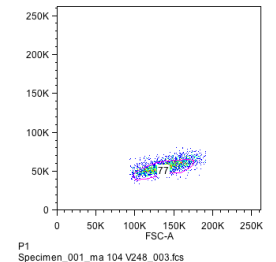
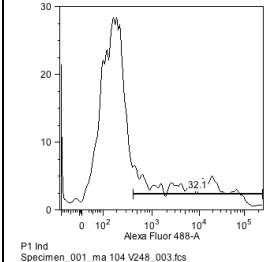
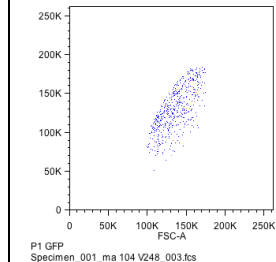
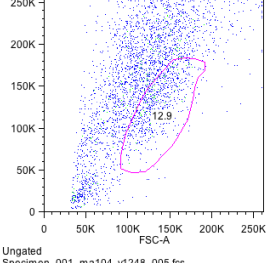
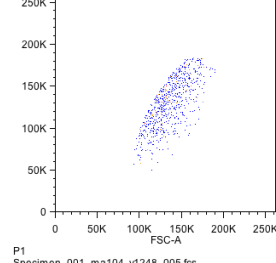
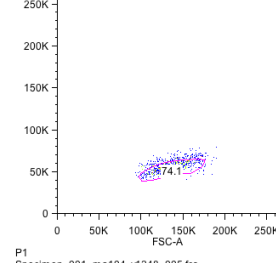
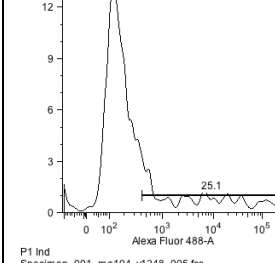
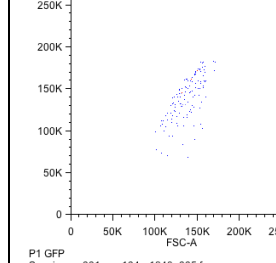


Figura 6. En negro están marcadas las secuencias de los sgRNA dentro del plásmido.

Los plásmidos seleccionados se purificaron por columnas midi-preps de Qiagen para obtener una alta concentración de plásmidos recombinantes y de buena calidad para lipofectarlos dentro de células en cultivo (MA104), como se describió previamente, y 48 h posterior a la lipofección, las células se resuspendieron y se separaron por citometría de flujo usando GFP como criterio de selección positivo, ya que el plásmido codifica este reportero como marcador de transfección. Las lipofecciones realizadas y las células obtenidas de la separación por citometría se muestran en la **Tabla 4**, la cual contiene los gráficos de población que se eligieron para su separación a partir de una “ventana” control, que fue establecida en principio con células no transfectadas y mostrada en color rosa alrededor de la población de células individuales (columna de población total). En las dos columnas posteriores se muestra una selección más detallada de células individuales. En la columna “Rango de detección EGFP (+)” se establece en el control la fluorescencia base de las células MA104; cualquier evento que se encuentre a la derecha del histograma base es considerado como evento positivo. Cabe mencionar que la probabilidad de un evento falso positivo es de ~3 de cada 1000, y un evento positivo es alrededor de diez veces mayor en ambas lipofecciones. En la columna de población única y EGFP (+) se separan las células individuales y con señal de GFP, positivas para lipofección y que por lo tanto tienen una alta probabilidad de expresar el sistema CRISPR/Cas9. De cada ensayo de lipofección se separaron no más de 1200 células.

6.2. Cell sorting

Tabla 4. Gráficos de población de las células separadas por citometría de flujo.

	Población total	Células promedio	Células individuales	Rango de detección EGFP (+)	Población individual y EGFP (+)	Porcentaje de células EGFP (+)
Control	 <p>Ungated Specimen_001_ma104_001.fcs Event Count: 10000</p>	 <p>P1 Specimen_001_ma104_001.fcs Event Count: 5368</p>	 <p>P1 Ind Specimen_001_ma104_001.fcs Event Count: 4693</p>	 <p>P1 Ind Specimen_001_ma104_001.fcs Event Count: 4693</p>	 <p>P1 GFP Specimen_001_ma104_001.fcs Event Count: 16</p>	0.34 % (Falsos positivos; 3 de cada 1000)
V2	 <p>Ungated Specimen_001_ma104_V248_003.fcs Event Count: 10000</p>	 <p>P1 Specimen_001_ma104_V248_003.fcs Event Count: 2074</p>	 <p>P1 Specimen_001_ma104_V248_003.fcs Event Count: 2074</p>	 <p>P1 Ind Specimen_001_ma104_V248_003.fcs Event Count: 1598</p>	 <p>P1 GFP Specimen_001_ma104_V248_003.fcs Event Count: 513</p>	32.1 % de células positivas (321 de cada 1000)
V1 + V2	 <p>Ungated Specimen_001_ma104_v1248_005.fcs Event Count: 5222</p>	 <p>P1 Specimen_001_ma104_v1248_005.fcs Event Count: 673</p>	 <p>P1 Specimen_001_ma104_v1248_005.fcs Event Count: 673</p>	 <p>P1 Ind Specimen_001_ma104_v1248_005.fcs Event Count: 499</p>	 <p>P1 GFP Specimen_001_ma104_v1248_005.fcs Event Count: 125</p>	25.1 % de células positivas (251 de cada 1000)

6.3. Aislamiento y caracterización de mutantes

6.3.1. Caracterización por western blot

Las células seleccionadas por citometría de flujo se sembraron en cajas de 96 pozos y dos semanas después se dividieron haciendo 30 diluciones en serie, como se menciona en la sección de metodología. Una vez que las células llegaban a confluencia se volvían a dividir: un pozo para propagación y otro para evaluar la presencia de RNasa L mediante *western blot* (WB). Se obtuvieron varias clonas carentes de RNasa L pero la mayoría se consideraron falsos positivos pues aunque no presentaban RNasa L por WB, tanto la dilución celular que le precedía como la que le sucedía, sí presentaban RNasa L, por lo que se esperaba un nivel de mezcla entre RNasa L mutantes y las silvestres (**Diagrama 2**). Solo las clonas aisladas de la colipofección de los plásmidos V1 y V2, y provenientes del pozo 2 (V12P2) fueron todas negativas para RNasa L. Las muestras fueron evaluadas nuevamente para corroborar la ausencia de RNasa L (**Figura 7**).

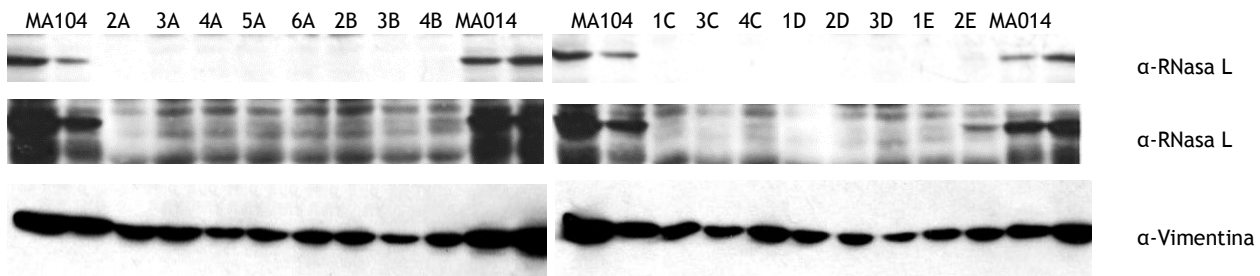


Figura 7. Clonas mutantes, ausencia de RNasa L.

Se muestran dos exposiciones de RNasa L, una normal, superior, y una toma sobreexpuesta, intermedia. Aunque no todas las muestras tenían la misma cantidad de proteína, control de carga vimentina, todas las clonas presentaban ausencia de RNasa L, incluso en la sobre exposición.

6.3.2. Genotipificación por PCR

Una vez que se obtuvieron clonas carentes de RNasa L se caracterizó si la ausencia de RNasa L se debía a una mutación causada por uno o ambos sgRNA. Como se mencionó en la sección de metodología se sintetizaron dos pares de oligonucleótidos para PCR de los sitios que flanquean a las regiones objetivo de sgRNA V1 y V2. Se usó el oligonucleótido *forward* de V1 y el *reverse* de V2 para cubrir ambas áreas y evaluar preferencialmente uno de los escenarios posibles de la doble transfección, es decir, la escisión de un fragmento de genoma, **Figura 8**. El resultado de estos ensayos de PCR se muestra en la **Figura 9**.

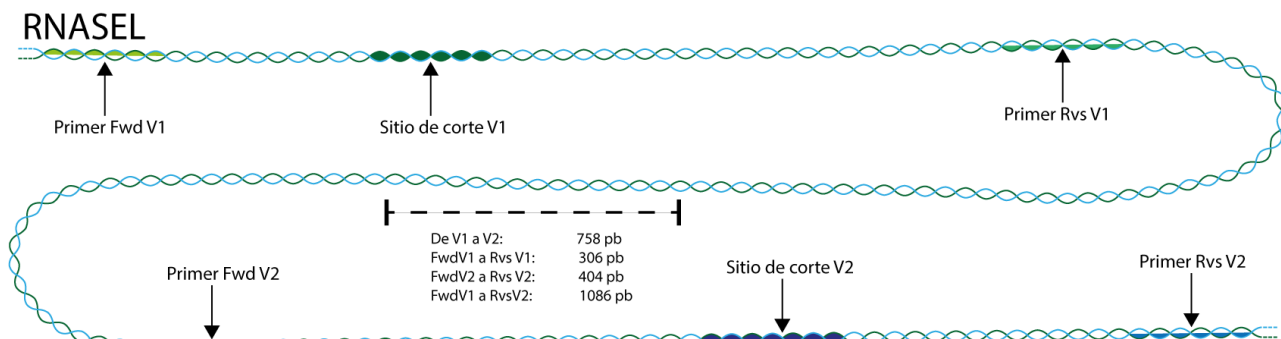


Figura 8. Esquema de sitios de corte de sgRNAs y primers para PCR.

Varias de las clonas obtenidas mostraban, en población única o mezclada, el genotipo de delección de un segmento del genoma (2A, 3A, 6A, 2B, 3B, 1C, 3C, 4C, 1D, 3D, 1E) (Figura 9). Hubo clonas que sólo mostraron el genotipo similar al silvestre por lo que se presume son mutaciones puntuales. Solo la clona 4A tuvo bandas muy tenues, en 1000 y 300 pb. Rotuladas en rojo se marcan las clonas con las cuales se trabajó el resto de los experimentos, las clonas V12P2-5A y 3D. Se eligieron estas dos clonas ya que presentaban un único genotipo.

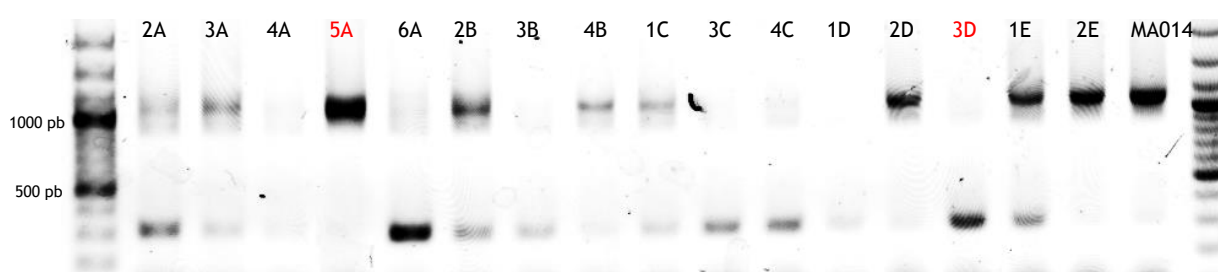


Figura 9. PCR para evaluar ambos sitios de mutación.

Las clonas seleccionadas están marcadas en rojo para su uso en experimentos posteriores.

6.3.3. Secuenciación

Ponderando los resultados anteriores se secuenciaron los fragmentos de PCR de las clonas 5A y 3D usando los mismos oligonucleótidos que para la PCR de genotipificación; el fragmento de PCR (~1080 pb) contenía ambos sitios de mutación, V1 y V2. Como control se usó la línea celular MA104. Usando el programa BioEdit se comparó la secuencia control con la secuencia humana (GENBANK: NM_021133.3) con la cual tuvo un 94.9 % de identidad; la secuencia humana fue la usada para diseñar los sgRNA. Ya que la secuencia humana difería con la de MA104 (*Chlorocephus aethiops*) se evaluaron los sitios de mutación y sólo el sitio V1 era diferente del teórico en dos bases. Las discrepancias en el apareamiento generaban una disminución en la eficiencia del

sgRNA; la eficiencia “real”⁴ del sgRNA V1 (calculada nuevamente con base en la tabla suplementaria de Doench et al) fue de $e = 0.1327$ ⁵ (Doench, Fusi et al. 2016). El sitio V2 no tuvo alteraciones y su eficiencia es la misma que la reportada por el *software* de diseño (sgRNA design, Broad Institute).

La clona 5A tuvo una mutación en el sitio V2, inserción de una T. En la **Figura 10**, la secuencia superior es la correspondiente al control, MA104, las siguientes son de la secuenciación usando el oligo *forward* de V1 y aparte el *reverse* V2 con la finalidad de tener una secuencia lo más fiel posible. Se separaron las secuencias en tres segmentos: 5 pb río arriba del sitio PAM, el sitio PAM, y el sitio guía para el sgRNA⁶.

~ATATA~CCG~CCC~TATGATTGGCAAACCTCA~
 ~ATATA~CCG~CCCTTATGATTGGCAAACCTCA~
 ~ATATA~CCG~CCCTTATGATTGGCAAACCTCA~

Figura 10. Secuencia del sitio V2 de la clona 5A.
 La secuencia superior es la secuencia de MA104, control.
 La secuencia intermedia es la obtenida por secuenciación con *primer forward* y la secuencia inferior es la obtenida por secuenciación con *primer reverse*.

La clona 3D tuvo una delección de ~780 pb de su genoma que corresponde a un corte entre los sitios V1 y V2, mostrados en la **figura 9**. Usando el programa BioEdit se obtuvieron los gráficos mostrados en la **Figura 11A**, donde se muestra de manera gráfica la alineación entre MA104 (eje x) y 3D (eje y), si existe igualdad entre las bases se graficará un punto, si no existe se pasa

al siguiente par de bases. En la **Figura 11B** se muestra la secuencia control y la de la clona 3D donde es clara la delección del segmento que se encuentra entre los sitios V1 y V2.

⁴ Durante el desarrollo de este proyecto se encontraron dos nuevas actualizaciones en el *software* de diseño de sgRNA. Tanto las matrices de datos, como los algoritmos de cálculo de valores están en constante evaluación y desarrollo por lo que la eficiencia real de un sgRNA es válida para la versión del software usado y la matriz de datos de la cual esta eficiencia se obtuvo.

⁵ Hubo dos errores de apareamiento, *mismatch*, de tipo RNA (rN, donde N es cualquier nucleótido): DNA (dN, donde N es cualquier nucleótido) en la posición 6 [rC: dC] y en la 19 [rC : dA]; estos errores disminuían la eficiencia en un 50 % y 46.15 %, respectivamente.

⁶ Considerar que la secuencia y diseño de V2 se basan en la hebra antisentido y la secuencia que se muestra corresponde a la hebra sentido, como se encuentra reportada en bases de datos.

Secuencia MA104



Figura 11. Alineamiento y secuencia de la clona 3D.

A) Alineamiento gráfico de la secuencia de MA104, eje de las abscisas, contra la secuencia de 3D, eje de las ordenadas; los puntos que presenten identidad se grafican generando una recta en caso de un alineamiento continuo. B) Secuencia de MA104 alineada con la secuencia de 3D mostrando la delección después del sitio V1 y finalizando en el sitio V2.

Aunque la línea celular MA104 es diploide, no presenta claramente otra mutación en ninguno de los dos casos, 5A o 3D. Sólo en la genotipificación de 3D, tanto PCR como secuenciación, se presentó una segunda secuencia con un tamaño similar al silvestre, pero en mucho menor intensidad de banda o cantidad de lecturas. El tipo de mutación que presenta esta secuencia, en caso de no ser un artefacto o contaminación, no fue relevante dado que no afectaba el fenotipo deseado y no se podía analizar eficientemente.

De manera teórica se comprobó que las mutaciones, sobre todo la de 5A, generan un cambio en el marco de lectura. En la **Figura 12** se muestran las secuencias de proteínas para los marcos de lectura de MA104, 5A y 3D, obtenidos con el programa de traducción del sitio web ExPASy. Ambas clonas tienen una alteración en el marco de lectura y generan proteínas truncas; la clona 3D, con delección genómica, no pasa de los primeros 107 aminoácidos, mientras que la clona 5A llega al

aminoácido 365. Bajo cualquier circunstancia los dominios de nucleasa de RNasa L se encuentran en el extremo C-terminal y este extremo no está presente en ambas clonas mutantes⁷.

```

MA104-RL-Prot MESRDHNNPQEGPTSSSGRRRAVEDNHLLIKAVQNEVDVLDVQQLEGGANVNFQEEGGWTFPHNAVQMSREDIVELLRHGADPVLRRKNGATPFILAAIAGSVKLLKFLSKGADVNECDFYGFATFM
5A-RL-Prot MESRDHNNPQEGPTSSSGRRRAVEDNHLLIKAVQNEVDVLDVQQLEGGANVNFQEEGGWTFPHNAVQMSREDIVELLRHGADPVLRRKNGATPFILAAIAGSVKLLKFLSKGADVNECDFYGFATFM
3D-RL-Prot MESRDHNNPQEGPTSSSGRRRAVEDNHLLIKAVQNEVDVLDVQQLEGGANVNFQEEGGWTFPHNAVQMSREDIVELLRHGADPVLRRKNGATPFILAAIAGSVKLLKFLSKGADVNECDFYGFATFM-

MA104-RL-Prot EAAVYGVKALKFLYKRGANVNLRRKTKEDQERLRKGGATALMDAAEKGHVEVLKILLDEMGADVACDNMGRNALIHALLSSDDSDVEAITHLLLDHGADVNVVGERGKTPILAVEKHLGLVQRLLLE
5A-RL-Prot EAAVYGVKALKFLYKRGANVNLRRKTKEDQERLRKGGATALMDAAEKGHVEVLKILLDEMGADVACDNMGRNALIHALLSSDDSDVEAITHLLLDHGADVNVVGERGKTPILAVEKHLGLVQRLLLE
3D-RL-Prot EAAVYGVKALKFLYKRGANVNLRRKTKEDQERLRKGGATALMDAAEKGHVEVLKILLDEMGADVACDNMGRNALIHALLSSDDSDVEAITHLLLDHGADVNVVGERGKTPILAVEKHLGLVQRLLLE

MA104-RL-Prot QEHEIINDTSDGKTALLLAVELKLLKIAELLCKRGASTDCGDLVMTARRNYDHSLVKVLSSHGAKEDFHPPAEDWKPQSSHWGAALKDLHRIYRPMIGLKKFFIDEKYKIADTSEGGIYLGFIYKQVEVA
5A-RL-Prot QEHEIINDTSDGKTALLLAVELKLLKIAELLCKRGASTDCGDLVMTARRNYDHSLVKVLSSHGAKEDFHPPAEDWKPQSSHWGAALKDLHRIYRPMIGLKKFFIDEKYKIADTSEGGIYLGFIYKQVEVA
3D-RL-Prot QEHEIINDTSDGKTALLLAVELKLLKIAELLCKRGASTDCGDLVMTARRNYDHSLVKVLSSHGAKEDFHPPAEDWKPQSSHWGAALKDLHRIYRPMIGLKKFFIDEKYKIADTSEGGIYLGFIYKQVEVA

MA104-RL-Prot VKTFCEGSPRAQREVSCLQSSRENSHLVTFYGSESHRGLFVVCVTLEACELDVHRGEDVENEDEFARNVLSIIFKAVQELHLSGCGYTHQDLQPQNILIDSKAAHLADFDSIKWAGDPQEVKRD
5A-RL-Prot VKTFCEGSPRAQREVSCLQSSRENSHLVTFYGSESHRGLFVVCVTLEACELDVHRGEDVENEDEFARNVLSIIFKAVQELHLSGCGYTHQDLQPQNILIDSKAAHLADFDSIKWAGDPQEVKRD
3D-RL-Prot VKTFCEGSPRAQREVSCLQSSRENSHLVTFYGSESHRGLFVVCVTLEACELDVHRGEDVENEDEFARNVLSIIFKAVQELHLSGCGYTHQDLQPQNILIDSKAAHLADFDSIKWAGDPQEVKRD

MA104-RL-Prot LEDLGRVLVYVVKGSISFEDLKAQSNEEVVQLSPDEETKDLIHLRHFHPGHEVDRDCLSDLLGHPFFWTWESRYRILRNVGNESDIKTRKSESEILRLQLPGPSEHSKSFDKWTTKINECVMKMKNFYEK
5A-RL-Prot LEDLGRVLVYVVKGSISFEDLKAQSNEEVVQLSPDEETKDLIHLRHFHPGHEVDRDCLSDLLGHPFFWTWESRYRILRNVGNESDIKTRKSESEILRLQLPGPSEHSKSFDKWTTKINECVMKMKNFYEK
3D-RL-Prot LEDLGRVLVYVVKGSISFEDLKAQSNEEVVQLSPDEETKDLIHLRHFHPGHEVDRDCLSDLLGHPFFWTWESRYRILRNVGNESDIKTRKSESEILRLQLPGPSEHSKSFDKWTTKINECVMKMKNFYEK

MA104-RL-Prot RGNFYQNTVGDLLKFIRNLGEHIDEKHKMKLIGDPSLYFQKTFPDLVIVYVYTKLQNTYRKHFPQTHSPNKPQCDGAGGASGLASFGC-
5A-RL-Prot RGNFYQNTVGDLLKFIRNLGEHIDEKHKMKLIGDPSLYFQKTFPDLVIVYVYTKLQNTYRKHFPQTHSPNKPQCDGAGGASGLASFGC-
3D-RL-Prot RGNFYQNTVGDLLKFIRNLGEHIDEKHKMKLIGDPSLYFQKTFPDLVIVYVYTKLQNTYRKHFPQTHSPNKPQCDGAGGASGLASFGC-

```

Figura 12. Secuencia de aminoácidos de RNasa L silvestre y las proteínas teóricas generadas por 5A y 3D.

Una vez que se determinó que las células mutantes seleccionadas no producían RNasa L debido a mutaciones en el gen que codifica esta enzima, se realizaron pruebas de actividad de RNasa L, con la finalidad de descartar cualquier efector alternativo y/o posible actividad por proteínas truncas y para corroborar la importancia de esta proteína como efectora de inmunidad innata.

6.3.4. Síntesis de proteínas

Dado que no existen ensayos específicos para medir la actividad de RNasa L *in vivo*, la actividad de esta proteína se evalúa de manera indirecta. Una de estas maneras es a través de la caracterización de la inhibición de síntesis de proteínas. Cuando RNasa L se activa por la vía 2-5 OAS/RNasa L se degrada el ssRNA, rRNA siendo un objetivo colateral, como resultado disminuye la capacidad de la célula para sintetizar proteínas nuevas. En este ensayo se midió la incorporación de metionina marcada con azufre radioactivo, ³⁵S, en células tratadas o no con dsRNA. En la **Figura 13**, se puede observar que la respuesta celular ante un insulto de dsRNA (de 700 -1000 pb)

⁷ Los nueve dominios de ankyrina abarcan los primeros ~330 aa, de 741 aa, el dominio de protein cinasa (necesario para la dimerización) abarca del aa 365 al aa 586, el dominio de nucleasa se encuentra en los últimos ~150 aa después del 589 aa.

fue muy marcada en las células MA104, carril 3, y no tan severa en las clonas mutantes, carriles 6 y 9. Las clonas presentan un fenotipo similar al control sin tratar con dsRNA sugiriendo la ausencia de actividad de RNasa L. Otro mecanismo activado por el tratamiento de las células con dsRNA que causa inhibición de síntesis de proteínas es la activación de la PKR, el que en estos ensayos no parece tener mayor relevancia o depende de la actividad de RNasa L para un efecto sinérgico. Esta puede ser la razón de la leve disminución de señal en las columnas 6 y 9.

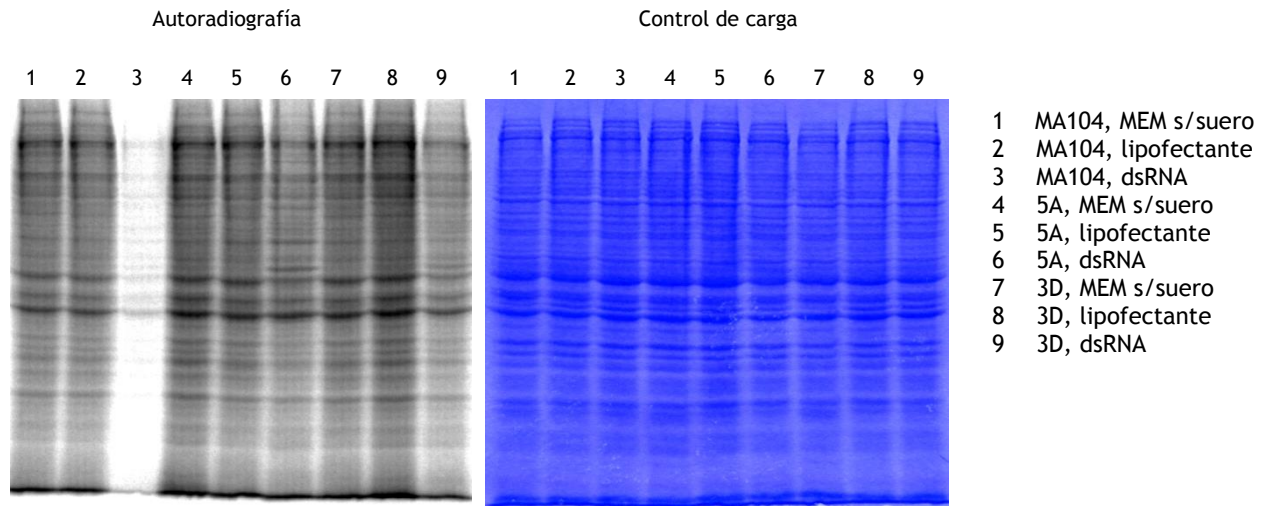


Figura 13. Ensayo de síntesis de proteínas. Se muestra el gel revelado en pantalla sensible a la radiación, autoradiografía, y el gel tenido con Coomassie como control de carga.

6.3.5. Degradación de rRNA

Como se mencionó previamente, la RNasa L al ser activada degrada los rRNA; esta degradación se puede evaluar de manera directa al comparar los patrones de RNA ribosomales en extractos de células tratadas o no con dsRNA. En la **Figura 14** se muestran las bandas características que se ven al realizar una electroforesis de RNA total en el equipo BioAnalyzer; las bandas representativas corresponden a los rRNA 18S y 28S mostradas en el control de células sin lipofectar. Cuando existe degradación de rRNA, en este caso por lipofección de dsRNA, estas bandas disminuyen en intensidad y se presentan productos de corte de menor peso molecular, como es notorio solo en el caso de células MA104 silvestres tratadas con dsRNA. Este resultado indica que las clonas seleccionadas no muestran actividad de RNasa L.

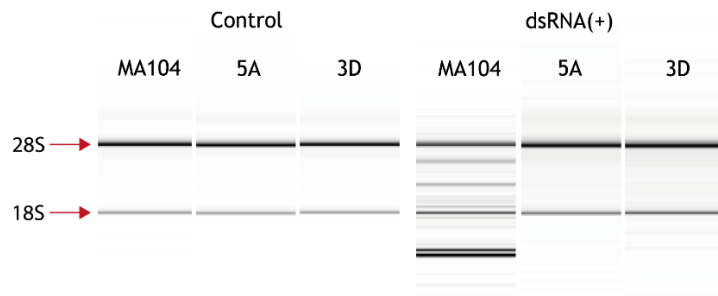


Figura 14. Degradación de rRNA en clonas mutantes. Los primeros carriles corresponden a los rRNA en condiciones control; los siguientes tres carriles a rRNA degradado, para MA104 y no degradado, incluso en condiciones de activación por dsRNA.

6.4. Infección con Rotavirus

6.4.1. *Infectividad*

A continuación, se evaluó el efecto de la ausencia de RNAsa L en estas células mutantes sobre la infectividad de rotavirus, para esto las células silvestres y las dos mutantes se infectaron con una cantidad igual (misma dilución, no se usó MOI) de las cepas de rotavirus RRV o UK, y 14 horas postinfección se contó el número de células infectadas (por inmunoperoxidasa) en cada condición. Encontramos que la cepa RRV tuvo una disminución del ~50% en la infectividad en la clona 3D, mientras que no hubo cambio de la infectividad en la clona 5A comparándolas con las células silvestres (**Figura 15A**). Estos resultados fueron diferentes al infectar las células con la cepa bovina UK, en este caso, aparentemente no hubo cambios significativos en la infectividad del virus en ninguna de las células estudiadas (**Figura 15B**). Estos resultados son contrarios a lo descrito previamente en el laboratorio por Sánchez-Tacuba L. donde no se encuentran variaciones en la infectividad en la cepa de rotavirus RRV y UK (Sanchez-Tacuba, Rojas et al. 2015).

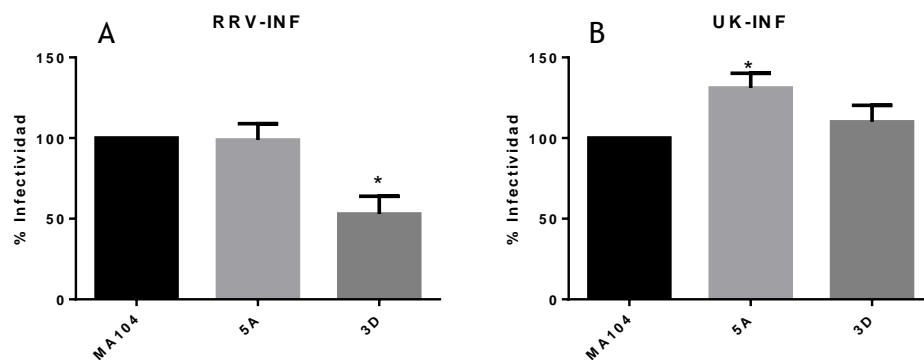


Figura 15. Infectividad de las clonas con Rotavirus.

Se evaluó la infectividad con la cepa RRV y UK. Para RRV sólo 3D tuvo un cambio en la infectividad, disminución. Para UK solo 5A tuvo un cambio, un ligero aumento.

6.4.2. Progenie viral

También se caracterizó el efecto de la ausencia de RNAsaL en la producción de progenie viral infecciosa. En estos ensayos, las células se infectaron con la misma cantidad (MOI=3) de virus UK o RRV 16 h postinfección, se cosecharon los lisados virales y se tituló la cantidad de virus infeccioso producido en cada línea celular (mediante inmunoperoxidasa). Como se mencionó previamente, Sánchez et. al habían reportado que el silenciamiento del gen RNASEL resultaba en un aumento de alrededor del doble en la producción de virus infeccioso, en el caso de RRV (Sanchez-Tacuba, Rojas et al. 2015). Por lo tanto, el *knockout* de este gen debía de tener un efecto similar o mayor.

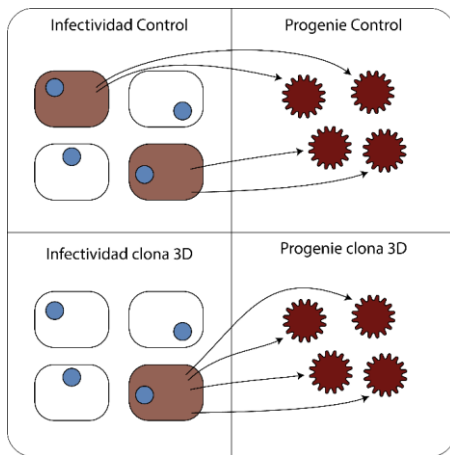


Diagrama 3. Infektividad y progenie viral en la clona 3D

Acorde con ello, encontramos que en la clona 5A hubo un aumento de alrededor del doble en la producción de virus infeccioso RRV, **Figura 16 A**. En contraste, encontramos que en la clona 3D no hubo un aumento de la progenie viral comparado con la producción de este virus en las células silvestres, **Figura 16 A**. Aunque no se presenta un cambio en la progenie viral producida entre la clona 3D y el control, el experimento de infektividad de esta clona muestra una disminución de un ~50 % comparando con el

control, por lo que se puede considerar que la producción de virus infeccioso de la clona contra el control es del doble, Diagrama 3. Esto confirma el papel de RNasa L en el control del ciclo viral de Rotavirus.

De nuevo, encontramos que los cambios de producción de virus infeccioso con la cepa bovina UK parecen no ser significativamente sensibles a la ausencia de RNasa L ya que la cantidad de virus infeccioso obtenido en las tres líneas celulares fue muy similar (**Figura 16 B**).

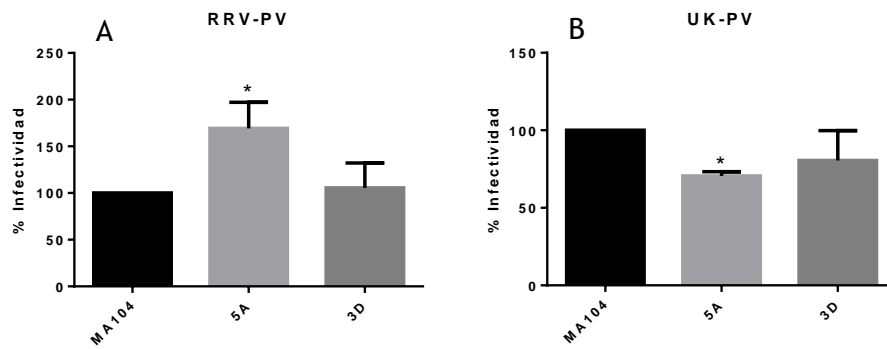


Figura 16. Progenie viral de cepas de Rotavirus. Se evaluó la producción de virus de cepas RRV y UK. Sólo 5A generó -2 veces más virus, 3D no tuvo un cambio. En UK hubo una disminución en la producción de virus en la clona 5A y no hubo cambio en la clona 3D.

6.4.3. Infección con DLPs

Para determinar si la reducción en la infectividad observada en la línea 3D era debida a algún posible efecto de la RNasa L durante la entrada del virus (RNasa L está asociada a varias proteínas del citoesqueleto) se realizó un ensayo en el que se introdujeron partículas virales de RRV carentes de la capa externa (DLPs), a las células, mediante lipofección; estas partículas son transcripcionalmente activas y una vez dentro de la célula pueden iniciar un ciclo infeccioso. Como carecen de la capa externa no tienen la capacidad de unirse y entrar a las células por la vía tradicional del virus. Este tipo de ensayo nos permite descartar si la RNasa L tiene un papel en la entrada viral. Encontramos que en ambas clonas hubo una disminución en la infectividad comparándolas con la línea silvestre (**Figura 17**), sugiriendo que la RNasa L podría tener alguna función ya sea directa o indirecta en la entrada, regulando la localización o estabilidad de proteínas de entrada usadas por el virus.

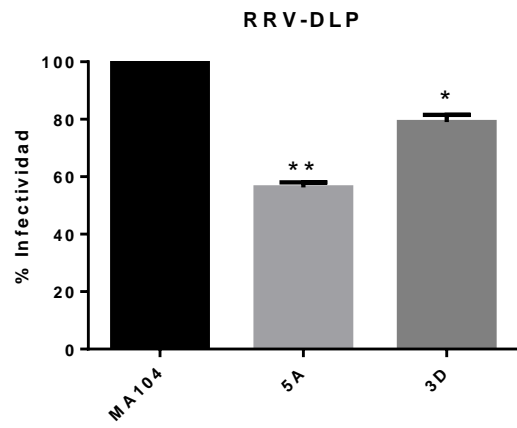


Figura 17. Infectividad de las clonas con DLPs. Ambas clonas presentan una disminución en su infectividad cuando el paso de entrada es omitido y las partículas infecciosas son introducidas por vías alternas a la vía de infección canónica.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo logramos obtener dos líneas estables con *knockouts* para la proteína RNAsa L (RNASEL^{-/-}) utilizando el sistema CRISPR/Cas9 recientemente descrito. Esto nos ha permitido demostrar que la línea celular MA104 que es la línea en la que más se trabaja en nuestro laboratorio es permisiva para llevar a cabo este tipo de manipulaciones genéticas.

Al transfectar células con el sistema CRISPR/Cas9, con secuencias de RNA guías dirigidos contra el gen RNASEL, se obtuvieron varias clonas mutantes RNASEL^{-/-}. La caracterización de estas clonas mediante ensayos de *western blot* evidenció la ausencia de esta proteína en los extractos celulares y la genotipificación por PCR mostró ciertas clonas aisladas, o poblaciones mezcladas, con la delección de un segmento de más de 700 pb; otras clonas mostraron cambios genómicos menores, posiblemente mutaciones puntuales. La única clona secuenciada de este tipo tuvo la inserción de una base en uno de los sitios de mutación.

Experimentalmente fue útil y viable el sistema, pero solo en las condiciones aquí descritas. Antes de obtener las clonas reportadas en este trabajo se aislaron poblaciones de células en las que había una disminución de la cantidad de RNasa L observada por *western blot*. Esto sugería que eran mezclas de células mutantes y silvestres ya que no existía una ausencia de la proteína, sino una disminución. La separación de estas poblaciones, para aislar clonas mutantes, resultó difícil y nunca se obtuvieron resultados por más de unos pocos pases. El mejor resultado que obtuvimos fue separando desde un inicio la población lipofectada mediante citometría de flujo, seleccionando aquellas células que expresaran la proteína verde fluorescente, lo que indicaba que pertenecían a la población de células transfectadas con el sistema CRISPR/Cas9, aunque esto no garantizaba que las células así separadas contuviesen alguna mutación. El separar las células transfectadas de aquellas que no recibieron el plásmido nos facilitó la selección de células con las mutaciones deseadas.

Dado que no es posible determinar la ausencia total de la proteína por ensayos de *western blot* (dado el límite de sensibilidad de este ensayo) y que tanto la secuenciación como la PCR de mutantes puntuales pueden estar en poblaciones mixtas (dos o más mutaciones puntuales) se repitieron los ensayos de WB y PCR varios pases después (solo para 5A y 3D, figuras no mostradas). El segundo WB de fenotipificación (pase ~50, WB inicial pase 3) mostró que persistía la ausencia de RNasa L. La PCR de la clona 3D mostró la misma delección y la clona 5A tuvo la banda en un tamaño molecular similar al control (la inserción de una base no es fácil de evaluar

por electroforesis en gel de agarosa). Para 5A no se repitió la secuenciación, pero ya que continuaba la ausencia de RNasa L en WB se consideró innecesario volver a secuenciarla; 3D al ser una delección de más de 700 pb no requería de una segunda secuenciación al ser una mutación obvia.

La evaluación de la actividad de RNasa L tuvo resultados interesantes en cuanto al metabolismo y relevancia de la vía y la proteína en la célula. Con el tratamiento de dsRNA la síntesis de proteínas se veía, en general, conservada en las clonas y abatida en el control. Esto nos dice que aunque existan vías que interfieran con la síntesis de proteínas (e.g. activación de PKR), la vía OAS/RNasa L es necesaria para una respuesta antagónica robusta por parte de la célula; aunque esto podría ser solo un efecto sinérgico de RNasa L potenciando la respuesta inmune junto con otras proteínas, como PKR (Liu & Moss 2016).

Los ensayos en los que se cuantificó la degradación de rRNA evidenciaron la abrogación de la actividad de RNasa L que es partícipe en la degradación de los rRNA 28S y 18S, y demostrando además que no hay otra proteína celular capaz de degradar a los rRNA cuando las células son tratadas con dsRNA. Demostrar que la actividad de endonucleasa de RNasa L está abrogada implica que su papel en la regulación negativa de ciertos mRNA celulares también queda ausente por lo que vías de diferenciación, proliferación, e inhibición de apoptosis tienen una probable regulación positiva (Brennan-Laun, Ezelle et al. 2014). Evaluar la relevancia y regulación de estas vías no fue parte del trabajo, pero podría ser relevante en trabajos posteriores.

De interés fue la diferencia en fenotipos de infección y progenie viral entre las clonas 5A y 3D. Esto se puede deber a dos factores: diferencias en la célula progenitora o desarrollo inesperado de un genotipo inespecífico.

La inestabilidad genómica es un evento no tan probable pero posible, sobre todo para la clona 3D en la que un segmento de su genoma fue removido. Rearreglos cromosómicos podrían llegar a suceder siendo la causa de una alteración en el metabolismo de la célula, desembocando así en fenotipos alterados. Dado que RNasa L es un gen supresor de tumores que sufrió una alteración en su secuencia, y un distintivo de inicio de cáncer es la expresión de oncogenes o la inhibición de genes supresores de tumores, no se puede desechar por completo la participación de este evento en la diferencia de fenotipos observados. De igual manera como reporta Schaefer et al. dado que la tecnología CRISPR/Cas9 es reciente hay muchas problemáticas por resolver, una de ellas siendo el corte en sitios inespecíficos (Schaefer, Wu et al. 2017). Como se mencionó previamente, la

eficiencia real para el sitio V1 era menor de la esperada, $e_{\text{real}} = 0.1327 / e_{\text{teórica}} = 0.5751$, y basándonos en esto es probable que los sitios *off-target* que podrían no tener relevancia la tuvieran, ya que al menos los sitios incluidos por los criterios de *Match Bin II y III* (apareamientos errados, **Tabla 3**) entrarían en el panorama posible con esta evidencia experimental.

A manera de resolver este dilema se pueden realizar experimentos de expresión heteróloga de RNasa L en las clonas mutantes, esto debe de resolver las discrepancias observadas. Existen dos posibles resoluciones a partir de este experimento: si es por el origen celular de la mutante las diferencias se deben de mantener, si es por la ausencia de RNasa L se deberían de resolver. En caso de deberse a mutación de genes en sitios inespecíficos, sólo una secuenciación de genoma completo podría resolver la duda.

Un fenotipo esperado era el aumento de la infectividad en las clonas ya que está reportado el aumento en la endocitosis de partículas virales en células carentes de RNasa L (Malathi, Siddiqui et al. 2014). Se había observado anteriormente en el laboratorio que no existía un cambio en la infectividad en células silenciadas para RNasa L, por lo tanto, el comportamiento inesperado lo presenta la clona 3D. La disminución en la infectividad (sólo 3D) se puede deber a varios factores, desde vías de proliferación alteradas a alteraciones en el citoesqueleto, sistema inmune innato o mutaciones fuera de lugar. RIG-I es una proteína del sistema inmune innato que detecta dsRNA asociándose a extremos 5' trifosfatados. En un experimento en el que se usaba citocalasina D, agente disruptor del citoesqueleto, se encontró que RIG-I se relocizaba en puntos específicos del citoplasma e inducía las vías de IFN- β y NF- κ B (Mukherjee, Morosky et al. 2009). Estudios preliminares realizados en las clonas (datos no presentados) mostraron una reorganización del citoesqueleto de actina, por lo que es posible que la ausencia de RNasa L tenga un efecto similar al del fármaco citocalasina D, relocizando RIG-I y propiciando un estado de alerta anticipado, consecuentemente disminuyendo la infectividad, como se observó con las DLPs.

En cuanto a la progenie viral en ambas clonas celulares evaluadas se observó que se producía alrededor del doble de virus. En 3D se observa una cantidad de virus infeccioso similar al control, pero se debe de recordar que 3D se infecta en menor cantidad, un 50 % del control, por lo que para poder tener cantidades similares de virus infeccioso –considerando una relación 1:1 donde una célula infectada produce en promedio una N cantidad de virus infeccioso– la célula debe permitir una mayor producción de virus infeccioso. Esto se puede comprobar al infectar una misma cantidad de células en el control y en la clona 3D, con la desventaja de usar MOI diferentes, y evaluando al final la progenie viral producida en ambos casos.

En cuanto a los valores de infectividad y progenie de UK, aunque sean estadísticamente relevantes no se puede decir que hay un cambio significativo ya que tanto la infectividad como la progenie tienen cambios excusables, de un 20 - 25 %. Cabe mencionar que en estudios previos de laboratorio realizados por Sánchez L. se observó un aumento marcado en la progenie viral de UK (~3 veces más) en células silenciadas para RNasa L. Evaluar la validez de los datos sería útil para esclarecer el papel de RNasa L y si la mutación puede generar fenotipos diferentes de un silenciamiento. Este proyecto brindó luz a esta posibilidad pues al eliminar a RNasa L de la célula se observaron nuevos fenotipos no presentes en silenciamiento, como lo fue el de infectividad en RRV.

La disminución en la infectividad de DLPs se puede deber a un estado de alerta anticipado dentro de la célula, como se propuso anteriormente. Con base en lo descrito por Sánchez L. la regulación de RNasa L se da en dos puntos, durante la entrada y durante la infección (Sanchez-Tacuba, Rojas et al. 2015). Aquí observamos que en la clona 5A, omitir la entrada canónica de rotavirus, le impide generar un estado celular conveniente para la infección del virus. La clona 3D parece tener una leve ventaja en su infectividad aumentando en un aparente 20 %, comparada con 5A, pero siendo aun así significativamente menor que el control; no hay información suficiente para evaluar el comportamiento de 3D, pero parece que rotavirus no ocupa las mismas vías de infección, entrada y replicación, en ambas líneas celulares.

Es aún prematuro llegar a conclusiones con respecto al fenotipo de las células RNASEL^{-/-} aisladas en este trabajo, pero una caracterización más detallada sobre los cambios en la susceptibilidad a la infección por rotavirus nos debe de aclarar el papel de esta respuesta inmune de la célula y las contramedidas desarrolladas por los rotavirus para sobrepasarla.

8. CONCLUSIONES

Se obtuvieron y caracterizaron dos líneas celulares *knockout* RNASEL^{-/-}: V12P2-5A y V12P2-3D. La clona 5A presenta una mutación puntual y la clona 3D una delección de ~780 pb.

Durante la infección con la cepa de rotavirus RRV, en ambas clonas se produce el doble de virus infeccioso, aunque la clona 3D se infecta en menor medida.

En la infección con la cepa UK no se detectaron cambios ni en la infectividad, ni en la producción de progenie viral comparándolos con las células silvestres. Estos datos deben de ser validados ya que son contrarios a lo reportado anteriormente por nuestro laboratorio.

La RNasa L es una proteína con diversas funciones dentro de la célula, su ausencia puede generar alteraciones en varias vías metabólicas, por lo que cambios en el ciclo de replicación de rotavirus pueden deberse a efectos colaterales y no a una interacción directa de la RNasa L con componentes del ciclo de replicación del virus.

10. PERSPECTIVAS

Evaluar el comportamiento del citoesqueleto de las células RNASEL^{-/-}.

Transfectar las células RNASEL^{-/-} con un plásmido que codifique por la RNasa L para determinar si las diferencias en el fenotipo de las dos clonas aisladas se deben a la ausencia de RNasa L o a mutaciones fuera del sitio diseñado (*off-target mutations*).

Evaluar si la sobreexpresión de RNasa L restaura el fenotipo de las células *knockout* en cuanto a la degradación de rRNA ribosomales y a la permisividad a la infección por rotavirus.

11. REFERENCIAS

- Abel, A. M., K. M. Schuldt, K. Rajasekaran, D. Hwang, M. J. Riese, S. Rao, M. S. Thakar & S. Malarkannan (2015). "IQGAP1: insights into the function of a molecular puppeteer." Mol Immunol **65**(2): 336-349.
- Abudayyeh, O. O., J. S. Gootenberg, S. Konermann, J. Joung, I. M. Slaymaker, D. B. Cox, S. Shmakov, K. S. Makarova, E. Semenova, L. Minakhin, K. Severinov, A. Regev, E. S. Lander, E. V. Koonin & F. Zhang (2016). "C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector." Science **353**(6299): aaf5573.
- Arnold, M. M. (2016). "The Rotavirus Interferon Antagonist NSP1: Many Targets, Many Questions." J Virol **90**(11): 5212-5215.
- Brennan-Laun, S. E., H. J. Ezelle, X. L. Li & B. A. Hassel (2014). "RNase-L control of cellular mRNAs: roles in biologic functions and mechanisms of substrate targeting." J Interferon Cytokine Res **34**(4): 275-288.
- Broad-Institute. (2017). "Design sgRNAs for CRISPRko (*S. pyogenes* and *S. aureus*)." Retrieved Julio, 2017, from <https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>.
- Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini & F. Zhang (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." Science **339**(6121): 819-823.
- Chakrabarti, A., B. K. Jha & R. H. Silverman (2011). "New insights into the role of RNase L in innate immunity." J Interferon Cytokine Res **31**(1): 49-57.
- Deo, R. C., C. M. Groft, K. R. Rajashankar & S. K. Burley (2002). "Recognition of the rotavirus mRNA 3' consensus by an asymmetric NSP3 homodimer." Cell **108**(1): 71-81.
- Doench, J. G., N. Fusi, M. Sullender, M. Hegde, E. W. Vaimberg, K. F. Donovan, I. Smith, Z. Tothova, C. Wilen, R. Orchard, H. W. Virgin, J. Listgarten & D. E. Root (2016). "Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9." Nat Biotechnol **34**(2): 184-191.
- Doudna, J. A. & E. Charpentier (2014). "Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9." Science **346**(6213): 1258096.
- Drappier, M. & T. Michiels (2015). "Inhibition of the OAS/RNase L pathway by viruses." Curr Opin Virol **15**: 19-26.
- Ezelle, H. J., K. Malathi & B. A. Hassel (2016). "The Roles of RNase-L in Antimicrobial Immunity and the Cytoskeleton-Associated Innate Response." Int J Mol Sci **17**(1).
- Fields, B. N. & D. M. Knipe (2007). Fields' virology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Gantier, M. P. & B. R. Williams (2007). "The response of mammalian cells to double-stranded RNA." Cytokine Growth Factor Rev **18**(5-6): 363-371.
- Han, Y., J. Donovan, S. Rath, G. Whitney, A. Chitrakar & A. Korennykh (2014). "Structure of human RNase L reveals the basis for regulated RNA decay in the IFN response." Science **343**(6176): 1244-1248.
- Hsu, P. D., E. S. Lander & F. Zhang (2014). "Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering." Cell **157**(6): 1262-1278.

- Levasseur, A., M. Bekliz, E. Chabriere, P. Pontarotti, B. La Scola & D. Raoult (2016). "MIMIVIRE is a defence system in mimivirus that confers resistance to virophage." *Nature* **531**(7593): 249-252.
- Liu, R. & B. Moss (2016). "Opposing Roles of Double-Stranded RNA Effector Pathways and Viral Defense Proteins Revealed with CRISPR-Cas9 Knockout Cell Lines and Vaccinia Virus Mutants." *J Virol* **90**(17): 7864-7879.
- Lopez, S., A. Ocegüera & C. Sandoval-Jaime (2016). "Stress Response and Translation Control in Rotavirus Infection." *Viruses* **8**(6).
- Lorrot, M. & M. Vasseur (2007). "How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea?" *Virol J* **4**: 31.
- Malathi, K., M. A. Siddiqui, S. Dayal, M. Naji, H. J. Ezelle, C. Zeng, A. Zhou & B. A. Hassel (2014). "RNase L interacts with Filamin A to regulate actin dynamics and barrier function for viral entry." *MBio* **5**(6): e02012.
- Modrow, S. (2013). *Molecular Virology*. Berlin, Springer.
- Mukherjee, A., S. A. Morosky, L. Shen, C. R. Weber, J. R. Turner, K. S. Kim, T. Wang & C. B. Coyne (2009). "Retinoic acid-induced gene-1 (RIG-I) associates with the actin cytoskeleton via caspase activation and recruitment domain-dependent interactions." *J Biol Chem* **284**(10): 6486-6494.
- Murphy, K., C. A. Janeway & A. Mowat (2012). *Janeway's immunobiology*. New York, Garland Science.
- Ogden, K. M., M. J. Snyder, A. F. Dennis & J. T. Patton (2014). "Predicted structure and domain organization of rotavirus capping enzyme and innate immune antagonist VP3." *J Virol* **88**(16): 9072-9085.
- Pesavento, J. B., S. E. Crawford, M. K. Estes & B. V. Prasad (2006). "Rotavirus proteins: structure and assembly." *Curr Top Microbiol Immunol* **309**: 189-219.
- Ran, F. A., P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott & F. Zhang (2013). "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system." *Nat Protoc* **8**(11): 2281-2308.
- Rusch, L., A. Zhou & R. H. Silverman (2000). "Caspase-dependent apoptosis by 2',5'-oligoadenylate activation of RNase L is enhanced by IFN-beta." *J Interferon Cytokine Res* **20**(12): 1091-1100.
- Sanchez-Tacuba, L., M. Rojas, C. F. Arias & S. Lopez (2015). "Rotavirus Controls Activation of the 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase/RNase L Pathway Using at Least Two Distinct Mechanisms." *J Virol* **89**(23): 12145-12153.
- Sato, A., T. Naito, A. Hiramoto, K. Goda, T. Omi, Y. Kitade, T. Sasaki, A. Matsuda, M. Fukushima, Y. Wataya & H. S. Kim (2010). "Association of RNase L with a Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 in mediating the apoptosis of a human cancer cell-line." *FEBS J* **277**(21): 4464-4473.
- Schaefer, K. A., W. H. Wu, D. F. Colgan, S. H. Tsang, A. G. Bassuk & V. B. Mahajan (2017). "Unexpected mutations after CRISPR-Cas9 editing in vivo." *Nat Methods* **14**(6): 547-548.
- World Health Organization. (2017). "WHO | Child Mortality." Retrieved 04 April, 2017, from http://www.who.int/pmnch/media/press_materials/fs/fs_mdg4_childmortality/en/.
- Zetsche, B., J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, I. M. Slaymaker, K. S. Makarova, P. Essletzbichler, S. E. Volz, J. Joung, J. van der Oost, A. Regev, E. V. Koonin & F. Zhang (2015). "Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system." *Cell* **163**(3): 759-771.
- Zhang, R., B. K. Jha, K. M. Ogden, B. Dong, L. Zhao, R. Elliott, J. T. Patton, R. H. Silverman & S. R. Weiss (2013). "Homologous 2',5'-phosphodiesterases from disparate RNA viruses antagonize antiviral innate immunity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(32): 13114-13119.

12. ANEXOS

ÍNDICE DE PROTOCOLOS

P1: Diseño de sgRNAs usados en el sistema CRISPR/Cas 9	44
P2: Clonación de sgRNA en pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458).....	48
P3: Transformación de bacterias electrocompetentes	49
P4: Cultivo y subcultivo de células.....	50
P5: Lipofección de plásmidos.	51
P6: Clasificación por citometría de flujo (Cell sorting)	52
P7: SDS-PAGE y western blot.....	53
P8: Congelamiento de células de mamífero.	55
P9: Purificación de DNA de células de mamífero.	56
P10: Síntesis de dsRNA in vitro	57
P11: Inhibición de síntesis de proteínas	58
P12: Infección con Rotavirus	59
P13: Obtención de lisado viral, TLPs y DLPs	60

ÍNDICE DE TABLAS A

Tabla A1. Reporte editado: Selección de sgRNAs para el gen RNASEL.	47
Tabla A2. Formatos de cultivo.	50
Tabla A3. Lipofección de placas multipozo.	51
Tabla A4. Medio de clonación.....	52
Tabla A5. Gen RNASEL humano.	54

P1: Diseño de sgRNA usados en el sistema CRISPR/Cas 9

Buscar el gen de interés en la base de datos en línea <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>,

En la página de resultados en la columna izquierda filtrar los resultados a solo animales. Seleccionar más filtros de ser necesario. En la columna derecha aparecen los organismos más buscados, humano y ratón están en esa lista (hasta noviembre de 2016 el *software* de diseño de sgRNA sólo está automatizado para estos dos organismos). Abrir el enlace del gen de interés.

Una vez en la página del gen de interés copiar la clave de referencia de la secuencia. E.g. NM_021133.3

Pegar la clave en la caja de texto del software en línea:

<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>

Elegir como taxón humano o ratón, dependiendo del origen del gen. No elegir taxón si se trabaja con una secuencia de otro origen.

Ajustar la cuota de sgRNA a un número elegido. El software elige cuota de 5 por *default*, aunque entrega todos los resultados posibles si se elige la opción de reportar todas las secuencias no elegidas (de preferencia). Si no se quieren todas las secuencias el reporte final sólo contendrá el número de secuencias elegidas en la cuota. Someter a análisis el gen.

Bajar el archivo que contiene los sgRNA y el reporte de selección, seleccionando el enlace “*sgRNA picking results*”.

Abrir el reporte de sgRNA, seleccionar todo y copiar. Pegar el texto copiado en Excel lo cual genera una tabla con varias columnas de datos:

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
1	Input	Quota	Target Taxo	Target Gen	Target Gen	Target Tran	Custom Tar	Target Mod	PAM Policy	Initial Spac	Off-Target I	Off-Target I	Off-Target I	Reference S	Position of	Strand	sgRNA Targ	Target Cont	PAM Seque
2	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182585740	antisense	TGAGTTTGC	AACCTGAGT	CGG		
3	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182585464	sense	CGCTGTTTG	GGAAGCGT	AGG		
4	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182585624	sense	AGCTGTGAF	AAGTAGCTG	AGG		
5	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182585374	sense	CAAGAACTA	TGTTCAAGA	TGG		
6	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182585883	sense	ATCTTGTTA	GGGGATCTT	CGG		
7	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182585858	antisense	AGAGAGAAI	CATGAGAG	GGG		
8	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182585886	sense	GGGATCTTG	TGTGGGGA	AGG		
9	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182586407	antisense	TTTTGACTT	GGGCTTTG	CGG		
10	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182585752	antisense	TCATAGGGC	CCAATCATA	TGG		
11	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182582251	antisense	CATAGAGGA	ACCACATAG	AGG		
12	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182585936	antisense	TCACGTTT	TGCTCCAO	CGG		
13	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182586779	sense	GGATCATAA	GCAGGGAT	AGG		
14	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182585518	antisense	GGGTGACAK	CAGAGGGT	TGG		
15	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182586338	sense	GAATTTGAC	ATGTGAAT	AGG		
16	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182586511	antisense	CGCTCCCCG	TTCAGCTCT	AGG		
17	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182576323	sense	CAATTTCTA	GAGGCAAT	TGG		
18	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182584122	sense	TTTTGATAA	CAGATTTTG	GGG		
19	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182586782	sense	GCCGAGTTG	AGAGCCGA	TGG		
20	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182586782	sense	CAGGGATCF	AGAGCAGG	AGG		
21	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182585410	antisense	CAGCCTTAA	TGAACAGCC	AGG		
22	NM_021133	5	9606	6041 RNASEL	NM_021133.3	CDS	NGG	5	1	1	5.20.100	NC_000001:	182586324	sense	AGACAAAGC	CGAAAGACA	CGG		

Dado que solo unas pocas columnas son relevantes se puede crear una tabla con las columnas:

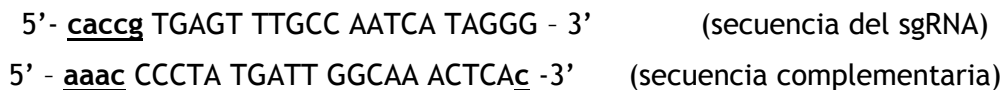
Target Gene Symbol	Strand	sgRNA Target Sequence	PAM Sequence
Contiene el nombre clave del gen objetivo.	Sentido o antisentido, es la hebra en la que se encuentra la secuencia complementaria al sgRNA.	Secuencia de 20 pb que sirve de guía para la endonucleasa. Es seguida de un sitio PAM en la dirección 5'-3'.	Secuencia de tres nucleótidos del estilo 5'-NGG-3'

# Off-Target Tier I Match Bin I Matches	# Off-Target Tier II Match Bin I Matches	# Off-Target Tier III Match Bin I Matches	# Off-Target Tier IV Match Bin I Matches	...	# Off-Target Tier I Match Bin IV Matches	# Off-Target Tier II Match Bin IV Matches	# Off-Target Tier III Match Bin IV Matches	# Off-Target Tier IV Match Bin IV Matches
---	--	---	--	-----	--	---	--	---

Las 16 columnas que reportan el número de sitios de corte incorrectos “*off-targets*” se basan en cuatro criterios *tier* diferentes:
 Tier I: corte en regiones codificantes, Tier II: corte en regiones no codificantes de genes codificantes (e.g. UTR), Tier III: corte en exones o intrones de genes no codificantes, Tier IV: demás regiones no incluidas en los anteriores.
 El criterio secundario es *match bin* que define la eficiencia de corte con base en ciertas penalizaciones (*mismatches*, inserciones, o deleciones). Donde *match bin I* es el apareamiento perfecto entre el sgRNA y la secuencia objetivo, *match bin II* es el apareamiento imperfecto, del 20 al 99.99% de eficiencia, *match bin III* del 5 al 19.99%, y *match bin IV* menor al 4.99% de eficiencia.
 Las columnas se combinan con base en el *match bin*. Primero los cuatro *tier* con *match bin I*, seguidos de los cuatro *tier* con el *match bin II* y así sucesivamente.

On-Target Efficacy Score	On-Target Rank	Off-Target Rank	Combined Rank	Pick Order	Picking Round	Picking Notes
Puntaje de 0-1 el cual determina la probabilidad de corte por el sgRNA.	Posición que tiene el sgRNA con base en su eficacia de corte. El número 1 tiene la mayor eficacia, la más cercana a 1.	Posición que tiene el sgRNA con base en el número de cortes incorrectos que realiza. Se basa en las 16 columnas de <i>tier</i> y <i>match bin</i> .	Posición que pondera las dos listas anteriores para determinar la mejor combinación de eficacia y número de cortes incorrectos.	Posición en la que se deben de elegir los sgRNA con base en criterios como espacio entre sgRNA, localización en la región codificante, número de cortes incorrectos, etc.	Ronda en la que se eligió el sgRNA.	Error por el cual no se eligió el sgRNA en la columna <i>Pick order</i> . Error craso del sgRNA, e.g. gran número de <i>off-targets</i> , incompatibilidad con clonación, etc.

Una vez que se eligió la secuencia del sgRNA se tiene que mandar a sintetizar añadiendo ciertos nucleótidos y una secuencia complementaria a este, para su posterior clonación en el plásmido **pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)**. Usando como ejemplo el *primer* sgRNA de la Tabla A1:



En minúsculas y subrayadas están las bases que se añaden a las secuencias y el sentido en el que se mandan a sintetizar. Indistinto del sentido en el que se encuentran en la secuencia de referencia.

En la Tabla A1 viene un ejemplo editado del reporte generado por el *software*.

Notas importantes:

La línea celular que se usó en este trabajo experimental fue aislada de mono verde (*Chlorocebus aethiops*). Dado que ambos genomas son similares y RNASEL es un gen muy conservado se pudieron diseñar los sgRNA con ciertas reservas de antemano. Sin embargo, se puede dar el caso en el que el sgRNA diseñado no sea compatible con el genoma de MA104 por variaciones. El diseño de más de un sgRNA es necesario, y buscar los sgRNA en el genoma del organismo experimental (si no es humano o ratón) es indispensable.

El *software* de diseño de sgRNA puede funcionar de manera “manual” cuando se introduce una secuencia objetivo, no más de 10 kpb, con base en la cual se diseñarán todos los sgRNA posibles. Tiene la desventaja de no localizar sitios *off-target*, comienzo y final de la secuencia codificante, o algún otro desperfecto. Elegir más de un sgRNA en este caso es imperativo. Se pueden hacer las evaluaciones de localizar el sgRNA dentro del mensajero, y también en la parte del mensajero que codifica (en línea existen diversos sitios que contiene *software* especializado).

Existe acceso a más *softwares* de diseño de sgRNA con diferentes algoritmos de diseño. Algunos de los más usados son:

Sitio web	Especies disponibles	Análisis de <i>off-targets</i>	Secuencia por analizar
http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html	31	Sí	Gen completo o secuencia
http://chopchop.cbu.uib.no/	23	Sí	Gen completo o secuencia
http://crispr.mit.edu/	15	Sí	Secuencia corta

Dos de estos, e-CRISP y CHOPCHOP, permiten introducir el nombre del gen objetivo, (fácil de obtener por medio de páginas como GeneCards), elegir el organismo blanco y genera un reporte con los mejores sgRNA.

Tabla A1. Reporte editado: Selección de sgRNAs para el gen RNASEL.

Target Gene Symbol	Strand	sgRNA Target Sequence	PAM Sequence	# Off-Target Tier I Match Bin I	# Off-Target Tier II Match Bin I	# Off-Target Tier III Match Bin I	# Off-Target Tier IV Match Bin I	# Off-Target Tier I Match Bin II	# Off-Target Tier II Match Bin II	# Off-Target Tier III Match Bin II	# Off-Target Tier IV Match Bin II	# Off-Target Tier I Match Bin III	# Off-Target Tier II Match Bin III	# Off-Target Tier III Match Bin III	# Off-Target Tier IV Match Bin III	# Off-Target Tier I Match Bin IV	# Off-Target Tier II Match Bin IV	# Off-Target Tier III Match Bin IV	# Off-Target Tier IV Match Bin IV
				Matches	Matches	Matches	Matches	Matches	Matches	Matches	Matches	Matches	Matches	Matches	Matches	Matches	Matches	Matches	Matches
RNASEL	antisense	TGAGTTTGCCAATCATAGGG	CGG	0	0	0	0	0	32	13	38	1	35	14	32	0	24	9	47
RNASEL	sense	GCGTGTGGATGTGCACAG	AGG	0	0	0	0	0	145	90	205	2	156	60	148	8	456	145	382
RNASEL	sense	AGCTGTGAAGACGTTCTGTG	AGG	0	0	0	0	0	32	19	34	7	87	29	65	3	87	34	78
RNASEL	antisense	AGAGAGAAGAACCTTCACAA	GGG	0	0	0	0	1	63	35	51	8	114	62	165	17	198	87	174
RNASEL	sense	GGGATCTTGTATGACAGCG	AGG	0	0	0	0	1	42	19	35	2	45	16	43	1	50	22	51
RNASEL	antisense	TTTGACCTTACCATACACAG	CGG	0	0	0	0	2	33	11	29	3	56	25	40	4	52	25	57
RNASEL	antisense	TCATAGGGCGGTATATTCTG	TGG	0	0	0	0	1	41	9	25	0	16	5	19	1	26	18	33
RNASEL	antisense	CATAGAGGACCAGCCGTCCA	AGG	0	0	0	0	1	9	9	9	8	41	6	15	21	120	46	96
RNASEL	sense	GATTCTCCTTGATGAGATGG	GGG	0	0	0	0	3	106	32	101	25	108	43	115	19	159	100	121
RNASEL	sense	TCAGAAGGAGGCATCTACCT	GGG	0	0	0	0	0	38	10	24	12	97	38	66	25	167	75	212
RNASEL	sense	TTATCTCGCAGCGATTGCG	GGG	0	0	0	0	2	4	1	6	3	10	4	14	1	8	3	3
RNASEL	sense	AAAATTGCTGATACTTCAGA	AGG	0	0	0	0	3	109	37	129	7	123	59	147	5	153	90	201
RNASEL	sense	GATCATAACAACCCAGGA	GGG	0	0	0	0	5	54	20	39	5	103	21	81	3	86	28	89
RNASEL	sense	CGTGGAGCCAGTACAGATTG	TGG	0	0	0	0	1	65	16	74	13	99	32	60	3	100	38	129
RNASEL	antisense	CCACCAGCTCCATCACACTG	AGG	0	0	0	0	6	108	63	144	15	323	147	458	30	275	92	248
RNASEL	sense	TAGTCATCTTCAGCCGCTAT	AGG	0	0	0	0	0	3	3	5	3	19	11	18	10	50	19	68

Continuación Tabla A1

On-Target Efficacy Score	On-Target Rank	Off-Target Rank	Combined Rank	Pick Order	Picking Round	Picking Notes
0.7025	15	9	1	1	1	
0.7569	2	24	2	2	1	
0.6688	31	10	3	3	1	
0.7371	4	49	6			Spacing Violation: Too close to earlier pick at position 923
0.7011	16	39	7			Spacing Violation: Too close to earlier pick at position 923
0.7665	1	67	8	5	1	
0.6541	40	38	9			Spacing Violation: Too close to earlier pick at position 1066
0.6417	54	28	10			Outside Target Window: 5-65%
0.6536	42	115	42			Quota Met
0.5245	147	12	43			Spacing Violation: Too close to earlier picks at positions 1066, 1182
0.5751	98	63	44			Spacing Violation: Too close to earlier pick at position 399
0.6433	51	116	45			Spacing Violation: Too close to earlier picks at positions 1066, 1182
0.6812	25	145	46			Outside Target Window: 5-65%
0.5430	128	50	54			Spacing Violation: Too close to earlier pick at position 923
0.7254	8	171	55			Outside Target Window: 5-65%
0.4940	178	1	56			Outside Target Window: 5-65%

En azul el sgRNA con el mejor rango combinado de eficiencia/No. de cortes incorrectos, elegido. En verde el primer sgRNA diseñado, y elegido, con el software anterior.

En morado el sgRNA que tiene la mejor eficiencia, pero mala posición en el rango de *off-targets* y con posición combinada de 8.

En rojo el sgRNA con el menor número de cortes incorrectos, pero pésima eficiencia de corte y una posición combinada de 56.

P2: Clonación de sgRNA en pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)

❖ Linearización del plásmido

1 µg de plásmido
2 µL BbsI
2 µL amortiguador 2.1 10X NEB (*puede ser NEB 2*)
Cbp 20 µL H₂O

→ Incubar 80 minutos en baño a 37 °C

❖ A la reacción anterior añadir:

0.5 µL amortiguador CIP
1 µL CIP
3.5 µL H₂O

→ Incubar 30 minutos en baño a 37°C

❖ Purificar DNA con kit [*DNA Clean & Concentrator, Zymo Research*] → se cuantificó en NanoDrop ND-1000.

❖ Preparar el inserto (sgRNA)

1 µL Fwd sgRNA (100 µM)
1 µL Rvs sgRNA (100 µM)
1 µL 10x amortiguador ligasa
0.5 µL T4 PNK
6.5 µL H₂O

En termociclador programar: 30 minutos a 37 °C, 5 minutos a 95 °C, y después un

gradiente de T de 95 a 25 °C que disminuya 5 °C por minuto.

❖ Ligación

1 µL de vector (de 40 - 60 ng)
1 µL de inserto 1:250 (*de la reacción para preparar el inserto hacer una dilución 1:250; si se repite la ligación siempre usar dilución nueva*)
1 µL amortiguador ligasa 10X
1 µL T4 DNA Ligasa
6 µL H₂O

→ 10 minutos a temperatura ambiente (*toda la noche a 14 °C es otra opción*). Inactivar a 65 °C por 10 minutos.

❖ Usar 5 µL de la reacción de ligación para realizar la transformación en bacterias electrocompetentes.

P3: Transformación de bacterias electrocompetentes

- I) Usar la cepa JM101 (o cualquier cepa competente; *almacenamiento a -70 °C*)
- Descongelar la cepa en hielo por 20 - 30'
 - Preparar 1 mL de LB (por transformación) complementado con 20 µL de MgCl 1M y 20 µL glucosa 1 M
- II) Al tubo con bacterias la cantidad necesaria de plásmido, y mezclar con cuidado.
- III) Preparar una cubeta para electroporación, si está nueva usarla directamente para la transformación, si es de reuso se lava de la siguiente manera:
- Colocar cloro, mezclar por inversión 15 segundos y removerlo.
 - Enjuagar con agua destilada hasta remover el cloro (*ausencia de olor*)
 - Realizar dos enjuagues con etanol absoluto. Dejar secar.
 - Colocar bajo luz UV por 15' y tapar.
- IV) En la cubeta poner la mezcla de DNA con bacterias *sin hacer burbujas.*
- Tomar el volumen de bacterias del tubo usando una micropipeta de punta amarilla.
 - Se baja el volumen de bacterias con la cubeta ladeada y colocando la punta en un extremo de la ranura interna de la cubeta, entre placa y placa metálica; no se colocan todas las bacterias para evitar introducir burbujas.
 - Golpear la cubeta suavemente sobre una superficie plana para bajar las bacterias y dejar la cubeta en hielo hasta la transformación.
- V) Antes de poner la cubeta en el electroporador secarla evitando el contacto de dedos con la parte metálica exterior.
- VI) Ajustar el electroporador a las condiciones de electroporación:
- 25 uF
 - 200 Ohms
 - 1.6 mV
- VII) Colocar la cubeta en la posición adecuada dentro del equipo; presionar los dos botones al mismo tiempo, por dos segundos y retirar la cubeta.
- VIII) Pasar las bacterias de la cubeta al medio complementado usando una micropipeta.
- IX) Reposar 1h a 37° C.
- X) Centrifugar 20 segundos a velocidad máxima. Retirar la mitad del volumen, 500 µL, y resuspender bacterias.
- XI) Sembrar en placas con antibiótico de selección, e.g. carbenicilina, (el establecido por el plásmido usado). *Sembrar una placa con 1/5 del volumen final de bacterias y otra con 4/5 del volumen final.*
- XII) Incubar a 37 °C.
- XIII) Elegir colonias para evaluar.
- XIV) Cultivar bacterias en formatos adecuados y extraer plásmido para determinar la presencia del sgRNA
- Para el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) evaluar la presencia del inserto: doble digestión del plásmido con Agel y BbsI. Agel sólo lineariza el plásmido si tiene inserto, en caso contrario habrá doble acción de Agel y BbsI y se liberará un fragmento del plásmido.
- Para 5 plásmidos a evaluar (3 muestras, control positivo, y control negativo):
- +200 ng de plásmido
 - +H₂O cbp 6 µL
 - +7 µL de:
 - 6.5 µL amortiguador 2.0 (NEB)
 - 26.5 µL H₂O
 - 1 µL BbsI
 - 1 µL Agel
- ➔ 1h, 37° C; resolver en gel de agarosa 1%

P4: Cultivo y subcultivo de células

El siguiente protocolo puede ser usado para las líneas celulares MA104, HEK-294, HUH-7 (y subclonas de estas líneas).

- Evaluar la confluencia de las células, si se encuentran en un 90 - 100 % de confluencia se pueden subcultivar.
 - Para un F-25 (o placa de 60 mm):
 - Retirar el medio, desecharlo. Lavar con 2 mL de EDTA al 0.02 % por 1 minuto.
 - Retirar el EDTA, desecharlo. Colocar 500 µL de tripsina al 0.01 %.
 - Incubar 3 - 5 minutos a 37 °C, 5 % CO₂.
 - Evaluar si las células siguen adheridas o si se han desprendido, golpear ligeramente un lado del contenedor, si se despegan fácilmente continuar, si no continuar incubando.
 - Añadir 1500 µL de medio de cultivo completo (con SFB).
 - Despegar del contenedor las células que puedan seguir adheridas.
 - Resuspender las células por pipeteo.
- Dependiendo de cuando se necesiten las células es que se hace el pase; en 24 h se ocupa 1 mL de la suspensión celular (1:2), en 48 horas 500 µL (1:4) y en 72 h 330 µL (1:6), todas para un formato similar F-25. Diluciones menores no son recomendables.
Para sembrar placas multipozo P48 se ocupan 40 µL de suspensión celular por pozo, en un volumen total de 300 µL (40 µL suspensión celular+ 260 µL medio de cultivo). Escalar a otros formatos duplicando o dividiendo los volúmenes de suspensión celular y usando los volúmenes de cultivo de la tabla A2.
 - Con base en la Tabla A2 completar con cuanto baste de medio de cultivo para el contenedor de cultivo celular. E.g. para un F-25 con pase 1:4 completar con 3.5 mL de medio completo.
 - Cultivar en ambiente húmedo, a 37 °C, 5 % CO₂ hasta su siguiente subcultivo.

Nota:

Cultivos para infección incubar 48 h para mejorar la adherencia de las células y promover la formación de una monocapa adecuada.

Para diferentes formatos de subcultivo escalar los volúmenes de EDTA, tripsina, y medio para resuspender.

Contenedor cultivo celular	Área de cultivo (cm ²)	No. de células	V de incubación. (por pozo donde aplique)	V para infección*	
Placa multipozo	P96	0.5	4.5x10 ⁴	150 µL	50 µL
	P48	1	1.3x10 ⁵	300 µL	100 µL
	P24	2	2.5x10 ⁵	600 µL	200 µL
	P12	4	5x10 ⁵	1 mL	400 µL
	P6	9.5	1.2x10 ⁶	2 mL	800 µL
Placa	Ø 35 mm	9.6	1x10 ⁶	2 mL	800 µL
	Ø 60 mm	28.3	2.6 x10 ⁶	4 mL	1.5 mL
	Ø 100 mm	78	7 x10 ⁶	8 mL	3 mL
	Ø 150 mm	176	1.8 x10 ⁷	15 mL	6 mL
Frasco	F25	25	3.1x10 ⁶	5 mL	1.5 mL
	F75	75	9.4 x10 ⁶	12 mL	3 mL
	F150	150	2 x10 ⁷	25 mL	6 mL

Tabla A2. Formatos de cultivo.

Área de crecimiento, aproximado de número de células por formato, y volúmenes de incubación y ensayo.

*Los volúmenes de infección son similares a los de lipofección, tripsina, soluciones fijadoras, entre otras.

P5: Lipofección de plásmidos.

- Recomendaciones:
- Usar pases jóvenes de células.
 - Sembrar células 24 h antes a una confluencia de 60 - 80 %.
 - Usar tubos de poliestireno (5mL-75x13 mm, Sarstedt) para preparar las soluciones de lipofectamina y/o DNA.
- I. Lavar las células con MEM s/suero. Incubar en la mitad del volumen de incubación.
 - II. Preparar la cantidad necesaria de solución de lipofectamina con base en la **Tabla A3**. Lipofección de placas multipozo. *Colocar primero el medio y después la lipofectamina. Mezclar lentamente por pipeteo de 5-7 veces. Reposar 10' a TA.*
 - III. Preparar la cantidad necesaria de solución de plásmido con base en la **Tabla A3**. Lipofección de placas multipozo. *Colocar primero el medio y después el plásmido (y PLUS). Mezclar por pipeteo 5 - 7 veces. Si se agrega el reactivo PLUS se hace en una proporción de 2 µL: 1000 ng plásmido; la mezcla plásmido PLUS debe incubarse mínimo 10' a TA y es estable por 2 h.*
 - IV. Mezclar las dos soluciones, lipofectamina y plásmido. *Mezclar lentamente por pipeteo de 5 - 7 veces. Reposar 20' a TA.*
 - V. Colocar en cada pozo el volumen total indicado.
 - VI. Reposar 6 h, a 37 °C, 5 % CO₂.
 - VII. Cambiar por medio completo de cultivo.
 - VIII. Evaluar la eficiencia de transfección 24 - 48 h después de la lipofección.

Tabla A3. Lipofección de placas multipozo.

Volúmenes o cantidades de reactivos usados por pozo. La dilución de lipofectante se hace en el volumen indicado; la dilución de plásmido se hace en el volumen indicado. El volumen total es el usado para lipofectar cada pozo.

Formato	V Lipofectamine LTX y PLUS (µL)	V Lipofectamine 2000 (µL)	cbp MEM s/suero (µL)	Plásmido (ng)	cbp MEM s/suero (µL)	V total (µL)
P96	1	0.5	25	250	25	50
P48	2	1	50	500	50	100
P24	4	2	100	1000	100	200
P12	8	4	200	2000	200	400
P6	16	8	400	4000	400	800

P6: Clasificación por citometría de flujo (*Cell sorting*)

Antes de realizar el *cell sorting* se resuspenden las células. Lavar con EDTA 0.02 %, colocar tripsina 0.01 %, esperar hasta que se desprenda la monocapa. Neutralizar la tripsina con medio de clonación, Tabla A4.

Colocar la suspensión celular en un tubo de citometría y cubrir con tapón o parafilm.

Colocar las células en el citómetro y comenzar su análisis. El citómetro de flujo mide tres parámetros importantes: tamaño, granularidad y fluorescencia. Los valores obtenidos por FSC se refieren a tamaño, SSC a granularidad y rotulados por longitud de onda. A y H se refieren al área de la señal y la altura, respectivamente. La separación de las células se ejecuta sobre un flujo continuo. Cuando una célula cumple con los criterios seleccionados, dos placas deflectoras (con un voltaje de 2 kV), atraen o repelen el flujo de suspensión celular por medio de un campo electrostático y de esta manera lo desvían para un contenedor determinado. El flujo restante, población no deseada, es desechado.

Elegir la población de interés usando la suspensión de células control. Establecer los valores de voltaje en los cuales se observa la población de interés; descartar debris celular, y agrupaciones celulares; graficar FSC-A vs SSC-A (x,y). Usando el *software* del equipo hacer la selección de la población de células promedio usando *gates* o ventanas. Una vez elegida la población de células

promedio, cambiar el valor de SSC-A (y) por FSC-H (y), para establecer un segundo *gate* y elegir la población de células unitarias, eliminando agrupaciones. Esta población se separa por un tercer *gate*, el de rango de fluorescencia. En este último se determina la fluorescencia basal de las células y se establece el rango en el que se detectará señal positiva del fluoróforo.

Una vez elegida la población de células de interés someter a análisis las células lipofectadas. Las células se analizan bajo los mismos *gates* que las células control. Ningún parámetro se cambia. Entre cada población analizada se pueden desplazar las poblaciones, pero parte de estas sigue cayendo dentro del *gate* y estas son separadas por el equipo.

Separar las células positivas en tubos humedecidos con no más de 500 µL de medio de clonación adicionado con 50 µL de SFB. Colocar el medio y el SFB dentro del tubo de citometría, tapar y rotar el tubo de tal manera que el medio se esparza por las paredes internas del tubo.

Una vez finalizado el proceso de separación volver a rotar el tubo para resuspender cualquier número de células que estuviera en pared, en el medio.

Cultivar las células bajo cualquier formato y/o dilución. Esperar de 48 - 96 horas para realizar cualquier subcultivo o dilución posterior.

Tabla A4. Medio de clonación.

Reactivo	Cantidad	Especificaciones
Medio metabolizado (condicionado)	30 %	Medio recuperado de cultivos en crecimiento; mínimo de 48 horas post subcultivo y tomado el mismo día de la clonación/ <i>cell sorting</i> . El contenido de esta fracción del medio, y por lo tanto el medio de clonación, es viable solo diez días.
Suero Fetal Bovino (SFB)	20 %	Es el porcentaje final considerando el SFB contenido en el medio normal de cultivo.
Antibiótico	Cbp	Usar una combinación de penicilina (10k U/mL)/estreptomicina (10mg/mL)→[100x] o ciprofloxacino (200 mg/mL)→[200x]
OPI	Cbp	Solución de Oxalacetato de sodio [100 mM], piruvato de sodio [45mM] e insulina [20 U/mL] y es usada como un concentrado [100x].
Medio de cultivo	cbp	Medio de normal de cultivo adicionado con SFB.

P7: SDS-PAGE y western blot

Reactivo o equipo	Especificaciones
Amortiguador Laemli 3X	SDS 6 %, Tris pH = 6.8 180 mM, Glicerol 30 %, azul de bromofenol 0.03 %. Almacenar a temperatura ambiente. Añadir 50 µL de β-mercaptoetanol por cada 950 µL de amortiguador 3X. Diluir antes de usar.
Amortiguador de corrida	Tris-Cl 25 mM, 250 mM glicina, 0.1 % SDS
Reactivos para geles de poliacrilamida	Solución acrilamida/bis-acrilamida 30/0.8 % Persulfato de amonio 10 %, Tris pH = 6.8 y pH = 8.8, SDS 10 % TEMED.
Amortiguador de transferencia	10 mM CAPS, 10 % metanol
Membranas de transferencia	Nitrocelulosa o PVDF
Solución rojo de Ponceau S	0.1 % Ponceau S, 5 % ácido acético.
Solución de leche en polvo (sin grasa)	Leche en polvo 5 %, PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄), Tween20 0.1 %
Dilución de anticuerpos	Anticuerpo primario (contra la proteína de interés) y secundario (fusionado con otra proteína o fluoróforo y es contra el animal en el cual fue obtenido el primario). La dilución depende del anticuerpo, pero se diluyen en solución de leche en polvo.
Solución reveladora	Preparar 5 minutos antes de ocupar y se usan 400 µL de solución total por membrana completa.

- Lisar las células con amortiguador Laemli 1X. Para un formato P96 usar 50 µL, para un P48 100 µL.
- Recolectar en un tubo eppendorf de 0.6 o 1.5 mL y hervir de 5 - 10 minutos.
- Preparar los geles de poliacrilamida al porcentaje requerido (basarse en el porcentaje de acrilamida y no de bis-acrilamida) que puede ir de 7.5 - 15%. Limpiar los vidrios con alcohol al 70% antes de usarlos. Usar 100 µL de solución de gel separador catalizados con TEMED para sellar la parte inferior de los vidrios y evitar fugas. Usar -2.85 mL de solución gel separador y cbp de solución gel concentrador.
- Cargar los pozos necesarios con 14 µL de muestra y un pozo antes y otro después con marcador de peso molecular, [1 µL marcador + 13 µL amortiguador Laemli 1x]. En caso de ser necesario cargar pozos vacíos con amortiguador Laemli 1X.
- Cubrir el gel con amortiguador de corrida usando una micropipeta y teniendo cuidado de no sacar la muestra del pozo.
- Llenar el cassette con amortiguador de corrida (revisar que no haya fugas de líquido) y colocarlo dentro de la cámara de electroforesis. Llenar la cámara con el volumen adecuado de amortiguador de corrida. Cerrar la cámara, conectar los cables a la fuente de poder. Correr a voltaje constante y por el tiempo necesario (hasta que el frente de corrida llegue a la parte baja del gel o salga).
- Remover el gel de entre los vidrios. Sumergir la membrana en amortiguador de

- transferencia (o activarla con metanol si es PVDF). Colocar el gel arriba de la membrana de transferencia y preparar ambos para transferencia. En el cassette poner una esponja seguida de papel filtro y después la membrana. Colocar el gel y después papel filtro y al último otra esponja. Cerrar el cassette y colocar el lado del gel con el polo negativo de la cámara de transferencia.
- Transferir por el tiempo necesario (el tiempo depende del peso molecular de la proteína, mayor peso más tiempo) a corriente constante.
 - Remover la membrana del cassette y colocarla en un recipiente adecuado. Teñir con rojo de Ponceau por 5 minutos para confirmar la transferencia.
 - Lavar con solución PBS 1X/Tween20 0.1 %.
 - Colocar solución de leche 5 % por una hora a temperatura ambiente o 12 - 16 h a 4 °C en agitación constante.
 - Colocar dilución de anticuerpos por 1 hora a TA o 12 - 16 h a 4 °C. Al retirar cada anticuerpo realizar 3 lavados de 10 minutos con PBS 1X/Tween20 0.1 %.
 - Revelar la membrana.

*Se pueden trabajar varias membranas en un mismo recipiente. Se han trabajado 8 membranas en 50 mL de dilución de anticuerpo; el revelado se puede hacer en escáner o en *film*. Si es en *film* estos tendrán fondo. Se recomienda hacer esto sólo para evaluaciones preliminares.

P8: Congelamiento de células de mamífero.

Cubeta con hielo	Los medios para congelar se colocan aquí mientras no estén en uso.
Crioviales	4 por cada F75 (o una placa de 100 mm) y hasta 2 por cada F25 (o placa de 60 mm). Rotular cada tubo con la línea celular por congelar, número de pase, fecha de congelamiento y usuario.
Medio de cultivo (con 10 % SFB)	
EDTA 0.02 % (o PBS 1X)	
Tripsina 0.01 %	
Medio para congelar	Medio donde se crecen las células adicionado con 20 % SFB (total) y 10 % DMSO.
Tubos falcon para centrifugar	15 mL, uno por línea celular.

Por cada F75 (placa 100 mm):

1. Lavar las células con 5 mL de EDTA 0,02 % (o PBS).
2. Tripsinizar las células y resuspender en 5 mL totales usando medio con 10 % SFB
3. Centrifugar 5', 1000 rpm
4. Retirar el sobrenadante.
5. Resuspender las células en 4 mL de medio de congelación.
6. Colocar 1 mL de suspensión celular en cada criovial.
7. Colocar crioviales en hielo inmediatamente.
8. Llevar a -20°C por 30 - 60'.
9. Pasar a -70 °C toda la noche.

10. Tomar uno de los crioviales con células y descongelar para realizar una prueba de viabilidad.

- a. Se saca el criovial y se pone a 37 °C a descongelar, en baño o incubadora, no más de 5 minutos. Se resuspenden las células en un tubo Falcon de 15 mL con 5 mL de medio de cultivo completo y se centrifuga a 1000 rpm por 5 minutos. Se retira el medio y se resuspende en 5 mL y se siembra en un F25 (o placa de 60 mm).

11. Si las células se encuentran estables 24 horas después de cultivarlas se colocan los crioviales en tanque de nitrógeno; si no se repite el protocolo.

P9: Purificación de DNA de células de mamífero.

Reactivo o equipo	
Amortiguador de lisis 1X	10 mM Tris pH = 8 100 mM NaCl 10 mM EDTA 0,1% Triton
Amortiguador TE	10 mM Tris pH = 8 1 mM EDTA
Acetato de Na (o K)	3 M (pH ~ 8)
Fenol	Solución saturada con pH ~ 7.5
Cloroformo	Grado analítico
3 tubos Eppendorf de 1.5 mL	Un set para cada muestra; los tres etiquetados de la misma manera
Centrífuga refrigerada	Rotor para tubos Eppendorf

- Tripsinizar células y resuspender en medio. Incluso el sobrante de los pases puede ser útil. Un volumen óptimo para una suspensión celular es de 300 µL de una suspensión de 2 mL obtenida de un F25 confluyente, para MA104. Se pueden usar incluso 20 µL de una suspensión celular, el rendimiento será bajo.
 - Pasar la suspensión a un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
 - Centrifugar las células 5' a 2000 rpm. Remover el sobrenadante teniendo cuidado con el *pellet*.
 - Lisar las células con amortiguador de lisis. Si se usaron 200 - 300 µL de suspensión celular usar 200 µL de amortiguador; para 50 - 150 µL de suspensión celular usar 100 µL de amortiguador. No usar más de 450 µL de amortiguador.
 - Poner las muestras en vórtex por 15''.
 - Añadir 1V de fenol. Mezclar por vórtex rápido hasta obtener una mezcla blanca.
 - Añadir 1V de cloroformo. Mezclar por vórtex 5''. Las muestras en este paso se pueden almacenar a -70°C por una semana. Al descongelar mezclar por vórtex 5''.
 - Centrifugar 5', 13K rpm. Extraer fase acuosa (superior) teniendo cuidado de no llevarse debris celular o fase orgánica.
 - Añadir 1V de cloroformo. Mezclar por vórtex 5''.
 - Centrifugar 5', 13K rpm. Extraer fase acuosa (superior) teniendo cuidado de no llevarse debris celular o fase orgánica. Extraer V µL. Colocar en un nuevo tubo.
 - Añadir 2V de EtOH Abs y 1/10V de acetato de Na. Mezclar por vórtex rápido.
 - Incubar a -20 °C por 30'. No más de 1 h. En este tiempo prender la centrífuga refrigerada.
 - Centrifugar 15', 4°C, VMax. (13.5 - 14K rpm)
 - Retirar el sobrenadante teniendo cuidado con el *pellet*. Puede que el *pellet* no sea visible.
 - Añadir 2V de EtOH.
 - Centrifugar 15', 4° C, VMax. (14K rpm)
 - Retirar el sobrenadante teniendo cuidado con el *pellet*. Dejar secar 10' a TA.
 - Resuspender en 11.5 µL de amortiguador TE. Entre menor fuera la cantidad de muestra obtenida menor V de TE ~6.5 µL.
- ***V= volumen elegido por el usuario

P10: Síntesis de dsRNA *in vitro*

- A partir del plásmido pGem-3Z fusionado con el gen NSP4 de RV realizar dos cortes:
 - i) Con KpnI para usar con el kit MEGA Transcript SP6 (Ambion) (Amortiguador KpnI ó NEBI+BSA)
 - ii) Con SacII para usar con el kit MEGA Transcript T7 (Ambion) (Amortiguador NEB4)
 - + 14 µL de H₂O
 - + 2 µL de amortiguador
 - + 2 µL de DNA (~1 µg)
 - + 2 µL de enzima
 - 37° c x 2h

Como control realizar un gel para evaluar el corte; en el primer carril el marcador de peso, en el segundo 100 ng del plásmido sin cortar y en los otros dos carriles 1 µL de la reacción.

- Inactivar las enzimas. (Kpn no lo requiere y SacII es a 65° C por 20')
- Purificar con fenol/cloroformo:
 - o Llevar la reacción anterior a 200 µL. +180 µL de H₂O DEPC
 - o Añadir 200 µL de cloroformo y 200 µL de fenol.
 - o Vórtex y centrifugar 5' a 13k rpm.
 - o Extraer fase superior (acuosa) y colocar en un nuevo tubo.
 - o Añadir 200 µL de cloroformo.
 - o Vórtex y centrifugar 5' 13k rpm.
 - o Extraer fase superior, colocar en nuevo tubo y añadir 1 V de EtOH absoluto y 20 µL de acetato de sodio 3M.
 - o Vórtex e incubar 20' a -20° C (de preferencia 2 h)
 - o Centrifugar 15', a 4° C a 14k rpm
 - o Retirar el sobrenadante teniendo cuidado con el pellet.
 - o Añadir 400 µL de EtOH y centrifugar otros 15', 4 °C, 14k rpm.
 - o Retirar el sobrenadante teniendo cuidado con el *pellet* y dejar el tubo de cabeza para secarlo por 5'.
 - o Resuspender en 11.5 µL de amortiguador TE.
- o Cuantificar en NanoDrop usando 1.5 µL y como blanco el amortiguador TE.
- Usar ~500 ng de plásmido cortado para la siguiente rxn:
 - Usar el kit SP6 para el corte con KpnI.**
 - + 2 µL de ATP
 - + 2 µL de GTP
 - + 2 µL de UTP
 - + 2 µL de CTP
 - + 2 µL de amortiguador
 - + 4 µL de plásmido cortado
 - + 4 µL de H₂O DEPC
 - + 2 µL de *enzyme mix*
 - 37 °C, 8 h (de preferencia 12 - 16 h)
 - o Cuando termine la reacción añadir 30 µL de LiCl y 30 µL de H₂O DEPC.
 - o Dejar precipitar 2h a -20 °C (de preferencia +8 h)
 - o Centrifugar 15', 4 °C, 14k rpm.
 - o Quitar el sobrenadante teniendo cuidado con el *pellet*.
 - o Lavar con EtOH abs, + 400 µL.
 - o Centrifugar 15', 4 °C, 14k rpm.
 - o Remover sobrenadante teniendo cuidado con el *pellet*.
 - o Resuspender en 26 o 21 µL de TE.
 - o Cuantificar en NanoDrop usando 1 µL.
 - o Resolver en un gel para evaluar la presencia del RNA.
 - Usar el kit T7 para el corte con SacII.**
 - + X µL de RNA SP6
 - + X µL de RNA T7
 - o En un termociclador:
 - 5' a 95 °C
 - Bajar 5 °C x minuto hasta 25°C.
 - o Correr un gel usando como controles los ssRNA de SP6 y T7. Usar como muestra el dsRNA.
- Realizar el protocolo de hibridación con cantidades equimolares de RNA SP6 y T7 (en este caso por tener el mismo número de pb usar la misma cantidad de ng)
- Realizar pruebas biológicas al dsRNA. (Inhibición de síntesis de proteínas)

P11: Inhibición de síntesis de proteínas

Material	
Puntas de varias medidas	Con filtro
Bolsa de desecho	Aparte. Desechar en esta todo el material radioactivo.
Papel aluminio y papel absorbente	Suficiente para cubrir una adecuada área de trabajo dentro de la campana de flujo. Colocar papel absorbente sobre el aluminio. Asegurar el aluminio con cinta adhesiva.
Medio sin metionina	Para un pozo P48 se usan 100 μL
Easy Tag Express ^{35}S	Usar 10 μL (~25 μCi) por cada 1000 μL de medio total. (10 μL + 990 μL medio sin metionina)
Lipofectamina 2000	2 μL por cada pozo P48.

- Sembrar pozos P48, 48h antes del ensayo para tener una monocapa confluyente.
- Antes de lipofectar retirar el medio y colocar MEM s/suero.
- Preparar la mezcla de lipofección usando la cantidad de dsRNA necesaria. *El dsRNA puede ser de origen viral, o de síntesis in vitro.*
 - Para el total de pozos a lipofectar (X) preparar X.3 (0.3 de sobrante) en tubos de poliestireno. Colocar primero la cantidad de MEM s/suero necesario (50 μL por cada pozo) restando el volumen de dsRNA requerido.
 - Colocar MEM s/suero (cbp) la cantidad de pozos a lipofectar y agregar la cantidad de Lipofectamina 2000 necesaria. Mezclar por pipeteo y dejar reposar 10 minutos a TA.
 - Mezclar las soluciones de dsRNA y Lipofectamina 2000 y reposar 20 minutos a TA. Si se ocupa control de lipofectamina mezclar con MEM s/suero.
- Retirar el medio de las células y colocar los complejos lipofectante:dsRNA, y controles negativos (lipofectante y MEM s/suero, como sea necesario)
- Adsorber por 2 horas a 37 °C, 5 % CO₂, ambiente húmedo.
- Retirar los complejos y reponer con 200 μL de MEM s/suero.
- Incubar por 5 h 30 min a 37 °C, 5 % CO₂, ambiente húmedo. Antes de que termine el tiempo de incubación preparar la campana de flujo laminar asegurando papel aluminio y papel absorbente en esta. Tener listas las puntas con filtro y preparar el medio con marca radioactiva (~25 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$; 10 μL de marca para 990 μL de medio sin metionina). Se pueden usar puntas sin filtro, pero para toda muestra o medio marcado se usan puntas con filtro. Transportar la marca en el contenedor adecuado. Abrir el contenedor en campana y dentro del área de trabajo.
- Acabando el tiempo retirar el medio y colocar 100 μL de medio marcado. Incubar 30 minutos a 37 °C, 5 % CO₂, ambiente húmedo.
- Lisar las células con amortiguador Laemmli y recolectar en tubos eppendorf de 1.5 mL. Hervir las muestras por 5', resolver por SDS-PAGE 10% (30 % - 0.8 %), teñir con azul de Coomassie y secar.
- Revelar el gel. Hay dos métodos. Colocar el gel en una placa sensible a radioactividad por 6 - 24 h y revelar en escáner de láser. Colocar el gel dentro de un casete de revelado y sobre el gel un film; cerrar el casete y almacenar a -70 °C por 48 - 96h. Revelar el *film*.
- Como control de carga usar el gel seco. La tinción con azul de Coomassie ayuda a estimar una cantidad de proteína cargada por carril.

P12: Infección con Rotavirus

1. Sembrar el formato de cultivo 48 - 72 horas previas a la infección.
2. Previo a la infección remover el medio de cultivo y colocar MEM s/suero (opcional).
3. Activar el virus con tripsina (10 µg/mL) durante 20 - 30 minutos a 37 °C.
4. Realizar las diluciones necesarias del virus.
5. Remover medio y colocar suspensión viral.
6. Incubar 1 h, 37 °C, 5 % CO₂.
7. Remover el medio con virus y colocar MEM s/suero. Para un P96 100 µL, 200 para un P48 y escalar. Para formatos mayores a placa multipozo ajustar a alrededor de 2/3 del volumen de incubación.
8. Incubar 12 - 16 h a 37 °C, 5 % CO₂.
9. Pasado el tiempo de infección trabajar las células infectadas de acuerdo al protocolo para el que se realizó la infección.

Infectividad

Hay dos protocolos para realizar infectividad:

- i) Diluciones seriadas:
En una placa P96 sembrada con células colocar diluciones seriadas, 1:2, de virus activado empezando con una dilución inicial 1:20, 1:50, o 1:100. Se cuentan dos o tres diluciones y es necesario contar mínimo tres pozos de cada dilución. De esta manera también se cuantifica el título viral.
- ii) Infectar 3 pozos P96 a una MOI = 0.025. Útil y más sencillo si se conoce el título viral del lisado para infección. Único protocolo para realizar infectividad en silenciamientos y tratamientos con fármacos.

Para evaluar **Infectividad con DLPs:**

- Sembrar pozos P96 por triplicado 48 h antes.
- Una hora antes desalar las partículas usando Sephadex G-25. En punta amarilla colocar una cantidad de SG-25, esta punta montarla en la tapa perforada de eppendorf de 1.5 mL. Centrifugar 1' a 1k rpm para retirar líquido. Tomar de 10 - 20 µL de partículas y colocarlos en la columna. Centrifugar 1' a 1k rpm. Cuantificar proteína en NanoDrop.
- Preparar la solución de lipofectante 24 µL de MEM s/suero+ 1 µL de Lipofectamin por pozo. Reposar 10', TA.
- Preparar la dilución de partículas virales; 30 - 100 ng y cbp MEM s/suero para 25 µL.
- Mezclar partículas virales y lipofectante, reposar 20', TA.
- Retirar el medio y colocar los complejos virus:lipofectante; reposar 2 h, 37 °C, 5 % CO₂.
- Retirar la solución con complejos. Incubar 12 - 16 h, 37 °C, 5 % CO₂.
- Procesar la muestra.

*MOI se refiere a la relación de partículas infecciosas por número de células; el cálculo se basa en el número de células establecido en la aproximación de la Tabla A3. Lipofección de placas multipozo.

**El virus una vez activado con tripsina se puede almacenar 5 días a -70 °C.

Progenie viral

Sembrar pozos P48 con la línea celular y tratamiento de interés.

Infectar a una MOI = 3 (u otra).

Lisar con amortiguador PV (Triton X100 0.1%, NaCl 150 mM, Tris pH = 8 50 mM, inhibidor de proteasas, y esterilizado por filtración)

Usar el lisado obtenido, 50 µL, para infectar una placa P96 por diluciones seriadas, 1:2.

Inmunoperoxidasa (detección de focos infecciosos)

Fijar las células con acetona al 80% en PBS 1X por 12-20 minutos.

Lavar con PBS 1X.

Colocar anticuerpo primario (anti-TLPs, policlonal hecho en conejo, propio del laboratorio) en una dilución 1:3000. Incubar a 37 °C, 1 h.

Lavar una vez con PBS 1X.

Colocar anticuerpo secundario (anticonejo acoplado a peroxidasa de rábano) en una dilución 1:3000 o 1:4000.

Incubar a 37 °C por 1 h.

Lavar dos veces con PBS 1X.

Revelar con carbazol:

Amortiguador de acetatos 0.05 M, pH = 5.5	4250 µL
Carbazol 0.4 % (diluido en N- N dimetil formamida)	1300 µL
H ₂ O ₂ 3 %	13 µL

Estos volúmenes son para toda una placa P96, colocando 50 µL por pozo. Ajustar a mayor o menor cantidad.

Filtrar con jeringa e incubar a TA por 5 minutos. Evaluar en microscopio la presencia de color y cuando sea satisfactoria retirar el carbazol en tarja y lavar la placa con cuidado y en agua corriente.

P13: Obtención de lisado viral, TLPs y DLPs

- I. Células confluentes fueron crecidas 48 - 72 h previas a la infección con Rotavirus.
- II. Se realiza la infección a una MOI = 1 - 3 y 16 h después se congelan/descongelan las células 3 veces a -70 °C/TA.
- III. Se recolecta el lisado en campana de flujo laminar dentro de un tubo de 15 mL, se centrifuga 5 minutos a 1500 rpm y el pellet se resuspende por sonicación.
- IV. El lisado se titula por diluciones seriadas en placa P96 o se usa para purificar partículas virales.

Purificación de TLPs y DLPs

El lisado se activa 25 minutos a 37 °C con 10 µg/mL de tripsina.

Se inactiva la tripsina con inhibidor de tripsina 10 µg/mL.

Se concentran las partículas virales por ultracentrifugación en rotor SW40 (Beckman) durante 2h. Retirar el sobrenadante teniendo cuidado de no perturbar el *pellet*.

Los *pellets* obtenidos se resuspenden en 1 mL de amortiguador TNC (10 mM Tris pH=7.5, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂). Se pasa a un tubo Falcon de 15 mL.

Realizar dos extracciones con triclorofluorometano (Freón II). Mantener el Freón en hielo al igual que los tubos. Al tomar el Freón pipetear dos veces para temperar la punta. Preparar una centrifuga refrigerada con rotor que pueda contener tubos falcon de 15 mL.

Agregar 2.5 mL de Freón por cada tubo con muestra. Mezclar en vórtex por 1 minuto.

Llevar el tubo a hielo, retirar la tapa para liberar gas.

Mezclar por vórtex hasta observar la formación de una emulsión rosa.

Centrifugar 5 minutos, 6000 rpm, 4 °C.

Retirar el sobrenadante, color rosa, y guardarlo en un tubo de ultracentrifugación. A la fracción

orgánica, Freón, se le añade nuevamente 1 mL de amortiguador TNC para realizar otra extracción.

Enfriar el rotor SW 50.1 a 4°C. Cuarto frío o refrigerador.

Pesar 2.200 g de CsCl ($\rho = 1.36 \text{ g/mL}$) y colocarlos en cada tubo con muestra. *Balancear los tubos con amortiguador TNC.*

Colocar los tubos en el rotor, el rotor en la ultracentrífuga y centrifugar 18 h, 35k rpm, 4 °C.

Remover con mucho cuidado los tubos y por punción extraer las bandas opalescentes de partículas virales. Hay tres bandas, la superior y no tan notoria está compuesta por cápsides vacías, la intermedia y más notoria por TLPs y la inferior por DLPs. Se realiza la punción con una jeringa de insulina y se almacenan las partículas en un tubo Eppendorf de 1.5 mL a 4 °C.

*El lisado viral es viable a -70 °C por 6 meses. Cualquier alícuota de virus activado es viable por 5 días.

** Las partículas suspendidas en CsCl son viables por 3 años, o más, a 4 °C. Una vez desalados son viables 3 horas en hielo.