



Universidad Nacional Autónoma de México
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**Organización nuclear de oncogenes de cáncer de mama: un nuevo abordaje
utilizando la tecnología CRISPR-dCas9**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

BIOL. PABLO ANTONIO ROJAS REYES

Tutor:

DRA. LORENA AGUILAR ARNAL
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Miembros del Comité Tutor:

DRA. MAYRA FURLAN MAGARIL
Instituto de Fisiología Celular

DRA. MA. DE LA PAZ SÁNCHEZ JIMÉNEZ
Instituto de Ecología

Ciudad de México. Marzo, 2019



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.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de la
Dra. Lorena Aguilar Arnal
del Departamento Biología Celular y Fisiología
del Instituto de Investigaciones Biomédicas
de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos Institucionales

Al sistema de **Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas** (PMDCB) de la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad para continuar mis estudios, así como al **Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM** por ser sede del laboratorio dónde se realizó este proyecto.

Este trabajo contó con financiamiento PAPIIT IA201717 y del Human Frontiers Science Program Research Grants RGY0078/2017 además de recibir una beca del entonces Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) CVU 654446.

A mi tutora, la **Dra. Lorena Aguilar Arnal** por asesorar y dirigir este trabajo durante más de dos años.

A mi comité tutor conformado por la **Dra. Mayra Furlan Magaril** del Instituto de Fisiología Celular y la **Dra. Ma. De la Paz Sánchez Jiménez** del Instituto de Ecología por todos sus comentarios a lo largo de este proyecto.

Al **Dr. León del Rio**, responsable del programa institucional para el estudio de cáncer de mama del IIB por las líneas celulares que proporciono a este proyecto. Además, al técnico académico **Salvador Ramírez Jiménez** por su ayuda para obtener estas líneas celulares.

A la maestra **Marcia Bustamante Zepeda** por todo su ayuda en el manejo de líneas celulares y protocolos de clonación.

Al **Dr. Miguel Tapia Rodríguez** por conocimiento y asesoramiento en la Unidad de Microscopía del IIB para la obtención de imágenes.

Índice

1. Resumen.....	9
2. Introducción	10
2.1. La estructura del genoma	10
2.1.1. Distribución del genoma en el núcleo celular	13
2.2.1. Microscopía: FISH y Super resolución.....	15
2.2.2. Técnicas basadas en captura conformacional de la cromatina (3C).....	17
2.3. Organización espacial del genoma en cáncer.....	17
2.4. CRISPR.....	23
2.4.1 CRISPR-Cas9	24
2.4.2. CRISPR- <i>dCas9</i>	26
3. Planteamiento del problema y justificación	29
4. Hipótesis	30
5. Objetivos.....	31
6. Estrategia experimental.....	32
6.1. Plásmidos del sistema CRISPR- <i>dCas9</i>	32
6.2. Generación de bacterias competentes <i>E. coli</i> XL1-Blue, DB 3.1 y STBL.2.....	35
6.3. Transformación de bacterias con plásmidos	36
6.4. Miniprep por lisis alcalina.....	37
6.5. Ensayos de restricción de plásmidos y electroforesis en gel de agarosa.....	38
6.6. Maxi y Midiprep de plásmidos	39
6.7. Preparación del vector pLH-stsgRNA 3.1 para clonación de sgRNAs.....	39
6.8. Diseño de sgRNAs	41
6.9. Clonación de sgRNAs dentro de plásmidos CRISPR	43
6.10. Cultivo de líneas celulares de cáncer de mama.....	44
6.11. Transfección de plásmidos CRISPR a líneas celulares de cáncer de mama	44
6.11.1. Placas Petri.....	44
6.11.2. Número inicial de células para los ensayos de transfección	45
6.11.3. Transfección.....	45
6.12. Microscopía.....	47
6.13. Análisis de imágenes.....	47
6.14. Extracción de RNA total con Reagent® Trizol	48
6.15. Síntesis de <i>cDNA</i>	48

6.16. qPCR o PCR en tiempo Real	49
7. Resultados	50
7.1 El clonaje de los sgRNAs en pLH-stgRNA3.1 es eficaz para los tres sgRNAs diseñados.....	50
7.2. La expresión del transcrito de HER2 corresponde a cada subtipo de línea celular.....	53
7.3. Los ensayos de transfección muestran elevada variabilidad entre los distintos agentes de transfección.....	55
7.4. El sistema CRISPR Multicolor es capaz de detectar la ubicación de <i>HER2</i> en líneas celulares con y sin amplificación.	65
7.5. A través del sistema CRISPR Multicolor puede evaluarse la dispersión espacial de <i>HER2</i>	71
8.Discusión.....	74
9. Perspectivas.....	78
11. Bibliografía	80

Índice de figuras

I1. Diagrama de organización de cromosomas.....	10
I2. Los dominios de eucromatina y heterocromatina tienen características estructurales y funcionales distintas.....	12
I3. Diferencias morfológicas y estructurales entre el cromosoma 18 y 19 visualizadas por FISH en linfocitos humanos.....	14
I4. Territorios cromosómicos.....	16
I5. Reorganización espacial en el cáncer de mama.....	19
I6. Detección de amplificación de Her2.....	21
I7. Frecuencia de amplificación de genes en el “pangenoma del cáncer”.....	22
I8. Agrupación de genes expresados de forma única en tumores HER2.....	23
I9: Resumen del mecanismo de inmunidad bacteriana CRISPR/Cas.....	26
I10. Relación intercromosomal e intracromosomal por CRISPR-dCas9.....	28
M1. Mapa de plásmidos pLH-stsgRNA3.1. y pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls.....	34
M2. Mapa del plásmido pLH-sgRNA1-2XPP7, pHAGE-EFS-PCP-3XGFPnls y pHAGE-TO-dCas9.....	36
M3. Patrón de bandeo esperado tras la restricción de los plásmidos.....	39
M4. Esquema de la secuencia del sitio de corte de BbsI en el vector pLH-stsgRNA.....	41
M5. Patrón de bandeo esperado tras la restricción de pLH-stsgRNA 3.1 con BbsI.....	41
M6. Esquema del diseño de sgRNAs.....	42
M7. Reconocimiento de los sgRNA en la secuencia diana.....	43
M8. Patrón de bandeo esperado tras la restricción con HindIII de las clonaciones.....	44
R1. Electroforesis en gel de agarosa de Miniprep de plásmidos del sistema CRISPR que confirma la integridad de los plásmidos.....	51
R2. Ensayo de restricción. Electroforesis en gel de agarosa de DNA plasmídico digeridos con enzimas de restricción.....	52
R3. Electroforesis en gel de agarosa de DNA plasmídicos obtenidos por Maxiprep y Midiprep.....	53
R4. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pLH stsgRNA 3.1 con la enzima BbsI.....	53
R5. Restricción de plásmidos obtenidos de colonias transformadas con sgRNAs.....	54
R6. Análisis de la expresión de Her2 en 4 líneas celulares de cáncer de mama.....	56
R7. Microscopia de línea celular MCF-7 transfectadas con 4 µl de lipofectamina y 3 sgRNAs dirigidos contra Her2.....	57
R8. Microscopia de la línea celular MCF-7 transfectada con 6 µl de lipofectamina y plásmido vector sin sgRNAs clonados.....	57

R9. Morfología de la línea celular MCF-7 en células transfectadas con distintos reactivos de transfección.	58
R10. Transfección del sistema CRISPR multicolor en la línea celular MCF-7 con el reactivo TransIT-2020 en diferentes concentraciones.....	59
R11. Transfección del sistema CRISPR multicolor en la línea celular MCF-7 con el reactivo Bio-T en diferentes concentraciones.....	60
R12. Transfección del sistema CRISPR multicolor en la línea celular MCF-7 con el reactivo Lipofectamine® LTX con Plus™ Reagent en diferentes concentraciones.....	61
R13. Morfología de la línea celular SKBr-3 en células transfectadas con distintos reactivos de transfección.....	62
R14. Transfección del sistema CRISPR multicolor en la línea celular SKBr-3 con el reactivo TransIT-2020 de Mirus® en diferentes concentraciones.....	63
R15. Transfección del sistema CRISPR multicolor en la línea celular MCF-7 con el reactivo Lipofectamine® LTX con Plus™ Reagent en diferentes concentraciones.....	64
R16. Transfección del sistema CRISPR multicolor en la línea celular MCF-7 con el reactivo Bio-T en diferentes concentraciones.....	65
R17. Eficacia de transfección estimada para cada línea celular utilizando tres reactivos de transfección en distintas concentraciones.....	66
R18. Célula MCF-7 transfectada con el sistema CRISPR Multicolor con 3 sgRNAs dirigidos contra el primero exón de HER2.....	67
R19. Célula MCF-7 transfectada con el sistema CRISPR Multicolor con 3 sgRNAs dirigidos contra el primero exón de HER2.....	68
R20. Célula SKBr-3 transfectada con el sistema CRISPR Multicolor con 3 sgRNAs dirigidos contra el primero exón de HER2.....	69
R21. Célula SKBr-3 transfectada con el sistema CRISPR Multicolor con 3 sgRNAs dirigidos contra el primero exón de HER2.....	70
R22. Célula MCF-7 transfectada con el sistema CRISPR Multicolor sin sgRNAs dirigidos.....	71
R23. Célula SKBr-3 transfectada con el sistema CRISPR Multicolor con 3 sgRNAs dirigidos contra el primero exón de HER2.....	71
R24. Dispersión de HER2 dentro del núcleo de una célula MCF-7.....	72
R25. Gráfico de dispersión de la ubicación de HER2 dentro del núcleo celular.....	74
D1. Comparación entre imágenes obtenidas por FISH en dos estudios distintos y el sistema CRISPR Multicolor.....	78

Índice de tablas

Tabla I1. Modificaciones postraduccionales de las histonas.

Tabla M1. Características de las cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio.

Tabla M2. Diseño de sgRNAs para el primer exón del Her2.

Tabla M3. Líneas celulares de cáncer de mama.

Tabla M4. Concentración de plásmidos y reactivos para transfección con BioT (Bioland Scientific).

Tabla M5: Primers utilizados para la PCR's en tiempo real.

Tabla R1. Concentraciones de los plásmidos obtenidos y su pureza medidos por Nanodrop.

Tabla R2. Cuantificación de plásmidos obtenidos por Maxiprep y Midiprep.

Tabla R3. Concentraciones de RNA y relaciones de pureza de 4 líneas celulares de mama distintas.

Tabla R4. Distancias entre el centro del núcleo y la periferia nuclear para cada señal. Cada distancia se expresa en μm .

Abreviaturas:

- DNA/ADN: ácido desoxirribonucleico.
- CISH: hibridación cromogénica *in situ* (Chromogenic *in situ* hybridization).
- FISH: Hibridación con fluorescencia *in situ* (Fluorescence *in situ* hybridization).
- TADs: Dominios topológicamente asociados (topologically associating domains).
- HER2: human epidermal growth factor receptor 2
- RNA/ARN: ácido ribonucleico...
- CRISPR: repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats).
- sgRNA: RNA guía (short guide RNA).
- MYC: oncogén Myc (Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog).
- EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor receptor).
- TOP2A: DNA Topoisomerasa II Alpha.
- CCND1: Ciclina D1.
- FGFR1: Receptor del factor de crecimiento fibroblástico 1 (Fibroblast growth factor receptor 1).
- PGR: Receptor de progesterona.
- ESR1: Receptor de estrógeno 1.
- NAD: Dominios asociados al nucléolo (Nucleolus-associated domains).
- LAD: Dominios asociados a Lamina (Lamina-associated domains).
- TAD: Dominios asociados topológicamente (topologically associating domain).
- crRNA: RNA crispr.
- tracrRNA: RNA transactivador de crRNA.
- PAM: motivo adyacente de protoespaciador (Protospacer adjacent motif).
- ZFN: dedos de Zinc (Zinc fingers)
- TALEN: nucleasa de actividad similar a activador de transcripción (transcription activator-like effector nuclease).
- GFP: proteína fluorescente verde (Green fluorescent protein).
- RFP: proteína fluorescente roja (Red fluorescent protein).
- BFP: proteína fluorescente azul (Blue fluorescent protein).
- nls: señal de localización nuclear (nuclear localization signal).

1. Resumen

Durante gran parte del siglo XX se aceptó como cierto que durante la interfase el *DNA* se encuentra desorganizado en el núcleo celular y así fue como se esquematizó en decenas de libros de biología celular y molecular: mostrando al *DNA* como un entramado de fibras que únicamente adquiere un alto nivel de organización cuando es necesaria la formación de cromosomas durante la división celular.

A finales del siglo XIX, observaciones con microscopía óptica demostraron que, tras la división celular, los cromosomas de unas algunas especies mantenían cierta identidad que delimitaba su espacio en el núcleo celular. La evidencia temprana mostrada por el desarrollo de la microscopía electrónica no pudo sostener esta hipótesis y la investigación sobre la organización del genoma durante la interfase fue abandonada; a excepción de un contado número de investigadores que siguieron apoyando la idea de un genoma organizado. Es hasta finales del siglo pasado y comienzos del actual que el avance en la microscopía electrónica e implementaciones de técnicas como *FISH* (hibridación fluorescente “*in situ*”), determinaron que el *DNA* en interfase no se distribuye de manera aleatoria en el núcleo, sino que presenta niveles de organización definidos y, aunque aún es bastante desconocida la dinámica *in vivo* del plegamiento de la cromatina, se ha adquirido bastante información sobre la organización espacial de los genomas.

Hoy en día, se acepta que la expresión génica se da un contexto tridimensional donde la transcripción del *DNA* es regulada por la interacción de decenas de secuencias *trans* y *cis*, el estado conformacional de la cromatina, la exposición a factores de transcripción, la respuesta a señales externas y las necesidades funcionales y energéticas de la célula.

Todo este conocimiento ha iniciado interesantes campos de investigación básica en la genómica, epigenética y epigenómica, con resultados que, aunque tempranos, pueden ser interpretados en contextos de salud y enfermedad junto con aplicaciones en el tratamiento de enfermedades como el cáncer. Este proyecto pretende intervenir en estas investigaciones, con la implementación de un método de estudio que permite visualizar *in vivo* la localización de *locis* específicos en el núcleo celular a través de un sistema novedoso y con ventajas prácticas y económicas sobre los métodos actuales, y además correlacionar estos estudios con la expresión génica durante el desarrollo del cáncer de mama.

2. Introducción

El *DNA* posee un alto nivel de organización que influye en la expresión de genes, el comportamiento y la función celular. Esta organización está regulada en distintos niveles y suele ser específica para los distintos linajes celulares. Desde cómo el *DNA* se compacta hasta estructuras como el cromosoma y después, cómo los cromosomas se organizan en el núcleo de una célula son temas de investigación que actualmente arrojan valiosa información sobre el desarrollo de una célula.

2.1. La estructura del genoma

Los miles de millones de pares de bases que conforman el *DNA* se localizan dentro del núcleo celular organizados en cromosomas que pueden ser visualizados durante la mitosis. Cada cromosoma está formado por una larga molécula de *DNA* que se asocia repetitivamente con moléculas que lo pliegan y empaquetan formando una estructura compacta llamada cromatina (Kornberg, 1974). Tradicionalmente, las proteínas que se unen al *DNA* de los cromosomas eucariontes se clasifican en dos grupos: las histonas y no-histonas. Las proteínas histonas son responsables del primer y más básico nivel de empaquetamiento del genoma, el nucleosoma: estructuras compuestas de un octámero de histonas (dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4), que forman un núcleo de proteínas alrededor del cual se enrollan aproximadamente 146 pares de bases del *DNA*; cada nucleosoma está separado del siguiente por una región de *DNA* puente o espaciador, de una longitud que varía de unos pocos hasta más de 80 pares de nucleótidos (Figura I1) (Felsenfeld et al., 1996; Kornberg and Lorch, 1999).

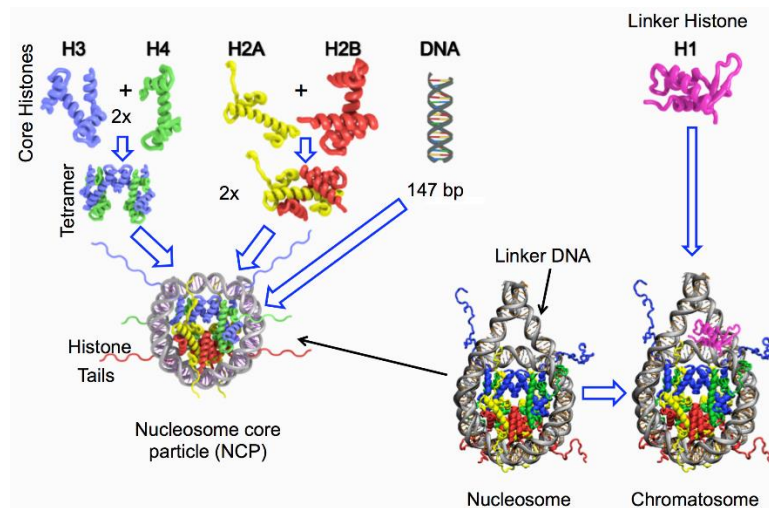


Figura I1. Diagrama de organización del nucleosoma. Los nucleosomas son las unidades básicas de compactación de la cromatina. Las partículas del núcleo del nucleosoma (NCP) envuelven alrededor de 147 pb de ADN en ~ 1.7 vueltas súper helicoidales zurdas alrededor de un octámero de cuatro tipos de histonas centrales (H3, H4, H2A y H2B - dos copias de cada uno) [1,2]. Los NCP están conectados además por cadenas de ADN enlazadoras y una histona H1 enlazadora interactúa aún más con los NCP y el ADN enlazador para facilitar la formación de estructuras de cromatina de orden superior. Los nucleosomas desempeñan funciones clave en la regulación epigenética de la transcripción, la replicación, la reparación del ADN y la reprogramación celular. (adaptado de Shaytan et al, 2015 y 2016)

Anteriormente se ha descrito un modelo jerárquico de organización en donde el plegamiento repetitivo de los nucleosomas forma una fibra similar a un «collar de perlas» de 10 nm de diámetro, que se pliega en forma de fibras de 30 nm, que a su vez se compacta progresivamente en fibras más grandes de 100-200 nm (Robinson and Rhodes, 2006). Sin embargo, otras investigaciones no han podido comprobar por técnicas de microscopía la existencia de la fibra de 30 nm (Fussner et al., 2012; Joti et al., 2012; Nishino et al., 2012). Esta reorganización estructural entre fibras de 10 y 30 nm se supone que corresponde a las transiciones entre la cromatina activa y reprimida al proporcionar barreras físicas que limitan el acceso al *DNA* de proteínas que son esenciales para procesos como la transcripción, replicación y reparación. (Fussner et al., 2012). Aunque aún no es clara la presencia de una fibra de 30 nm, nuevas investigaciones utilizando nanoscopía han demostrado que, en lugar de una alta organización de los nucleosomas, estos se organizan en grupos discretos denominados «*clutches*», de diferentes tamaños y densidades, que están espaciadas por regiones pobres en nucleosomas (Ricci et al., 2015).

Los grandes *clutches* se relacionan con un estado conformacional de la cromatina llamado heterocromatina que es transcripcionalmente inactivo (Berger, 2007). Por otro lado, los pequeños grupos de nucleosomas con menor compactación corresponden a regiones cromatina activa, eucromatina, ya que están asociados a la ARN polimerasa II (Berger, 2007; Kouzarides, 2007; Ricci et al., 2015) (figura I2). El estado conformacional de la cromatina en que se encuentre un gen es un mecanismo central de regulación epigenética. Las diferencias entre que la cromatina se compacte hasta heterocromatina o se encuentre de manera laxa en forma de eucromatina, reside en una combinación del estado de metilación del *DNA* y modificaciones postraduccionales de histonas (Bernstein et al., 2007) (Figura I2).

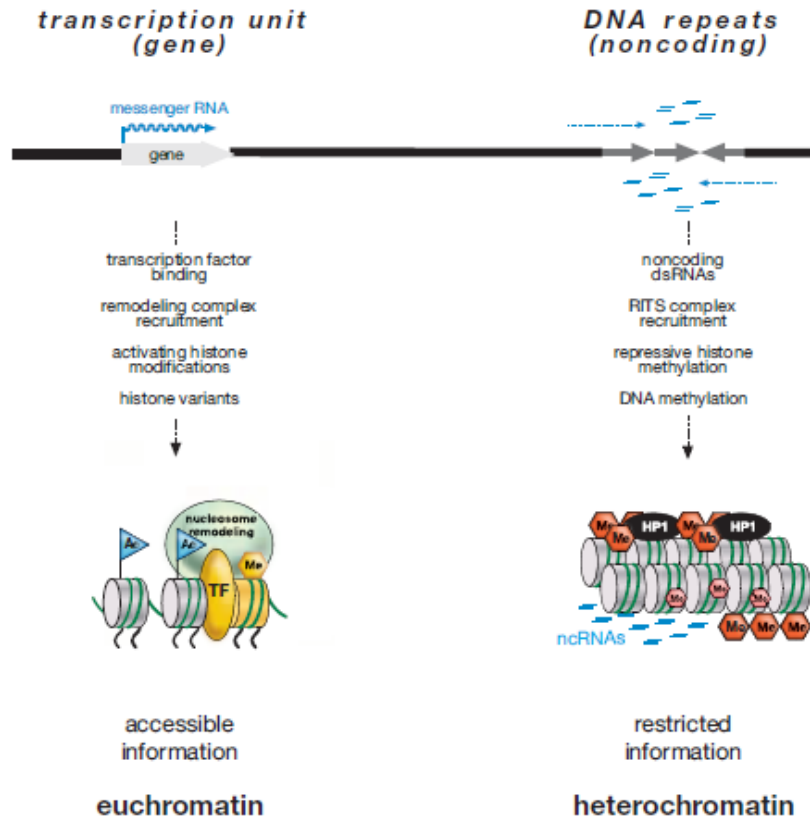


Figura 11 Los dominios de euromatina y heterocromatina tienen características estructurales y funcionales distintivas. Se representa un esquema de los procesos que generan y distinguen la euromatina de la heterocromatina constitutiva. Ambos dominios cromatínicos se diferencian en el tipo de transcritos de RNA producidos, el tipo de complejos proteicos que reclutan, las distintas modificaciones covalentes de las histonas, la composición en variantes de histonas y el grado de metilación del DNA (adaptado de Allis et al, 2015)

La metilación del *DNA* es un proceso post-replicativo que ocurre principalmente en pequeñas secuencias del *DNA*. En vertebrados, esta modificación ocurre sólo en el dinucleótido CpG (Bird, 2002). La distribución en el genoma de los dinucleótidos CpG en las que se produce la metilación del *DNA* suele ocurrir en secuencias de *DNA* de aproximadamente 200 pares de bases, con un alto contenido de guaninas y citosinas que están asociadas con la región promotora de aproximadamente el 60% de todos los genes (Bird, 2002; Klose and Bird, 2006; Li and Zhang, 2014). Normalmente, en los sitios de genes activos con islas CpG no metiladas en regiones promotoras, los nucleosomas están ampliamente espaciados irregularmente y de una manera favorable para el acceso de las proteínas que activan la transcripción. En contraste, cuando las islas CpG en regiones promotoras están fuertemente metiladas, los nucleosomas están fuertemente compactados y regularmente espaciados, esta configuración excluye proteínas que activan la

transcripción de genes o les impide actuar como activadores de genes. (Li et al., 2007; Li and Zhang, 2014).

El otro mecanismo de regulación de los nucleosomas se encuentra en las modificaciones postraduccionales de ciertos residuos de aminoácidos de las histonas. Las histonas centrales que conforman el nucleosoma están sujetas a más de 100 modificaciones postraduccionales diferentes, incluyendo acetilación, metilación, fosforilación sumoilación y ubiquitinación (Berger, 2007; Bernstein et al., 2007). Estas se producen principalmente en posiciones específicas amino-terminal dentro de las colas de las histonas y dependiendo del tipo de modificación y sustrato, además de una sumatoria de las demás modificaciones, la cromatina puede encontrarse en un estado activo o inactivo (tabla I1).

Modificaciones identificadas en histonas

Chromatin Modifications	Residues Modified	Functions Regulated
Acetylation	K-ac	Transcription, Repair, Replication, Condensation
Methylation (lysines)	K-me1 K-me2 K-me3	Transcription, Repair
Methylation (arginines)	R-me1 R-me2a R-me2s	Transcription
Phosphorylation	S-ph T-ph	Transcription, Repair, Condensation
Ubiquitylation	K-ub	Transcription, Repair
Sumoylation	K-su	Transcription
ADP ribosylation	E-ar	Transcription
Deimination	R > Cit	Transcription
Proline Isomerization	P-cis > P-trans	Transcription
O-GlcNAc glycosylation	S-Glc T-Glc	Transcription
Propionylation	K-	Unknown
Butyrylation	K-Bu	Unknown
Crotonylation	K-	Transcription?
2-Hydroxyisobutyrylation	K-	Transcription?
Malonylation	K-	Unknown
Formylation	K-	DNA damage?
Hydroxylation	K-OH Y-OH	Unknown

Tabla I1. Modificaciones postraduccionales de las histonas

2.1.1. Distribución del genoma en el núcleo celular

El cómo se organiza el *DNA* durante la interfase en el núcleo celular ha sido un área explorada por distintos investigadores y técnicas. Las primeras observaciones sobre la organización del genoma durante la interfase fueron hechas por Carl Rabl a finales del siglo XIX (Rabl, 1885). Poco después, Theodor Boveri observó en embriones de gusano que los cromosomas divididos después de la profase conservan su identidad durante la interfase y se localizan en regiones definidas dentro del núcleo celular en *territorios cromosómicos* (Bober, 1909). Sin embargo, las observaciones con microscopia electrónica de la década de los 70's no mostraba signos de organización alguna del

DNA durante la interfase (Stack et al., 1977; Wischnitzer, 1973), sino fibras de cromatina con distinta densidad, desorganizadas a lo largo del núcleo, lo que propicio que la idea de una DNA organizado fuera dejada de lado por la mayoría de los investigadores.

A mediados de la década de 1980, se desarrolla la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) del DNA, una técnica que se hizo posible la visualización directa de los territorios cromosómicos y con esto la organización y distribución de los cromosomas durante la interfase (Manuelidis, 1985; Schardin et al., 1985). Uno de los primeros trabajos que utilizaron FISH para determinar la posición de cromosomas durante la interfase se realizó en el núcleo de linfocitos, este trabajo pionero encontró diferencias consistentes y distintivas en la localización y la morfología de los cromosomas 18 y 19 (Croft et al., 1999). El cromosoma 19 es el que contiene más genes transcripcionalmente activos del genoma y se ubica de manera recurrente en el centro del núcleo. Por el contrario, el cromosoma 18 es pobre en genes, e interesantemente se encuentra en estado de heterocromatina y preferentemente asociado a la lámina nuclear (Figura I3).

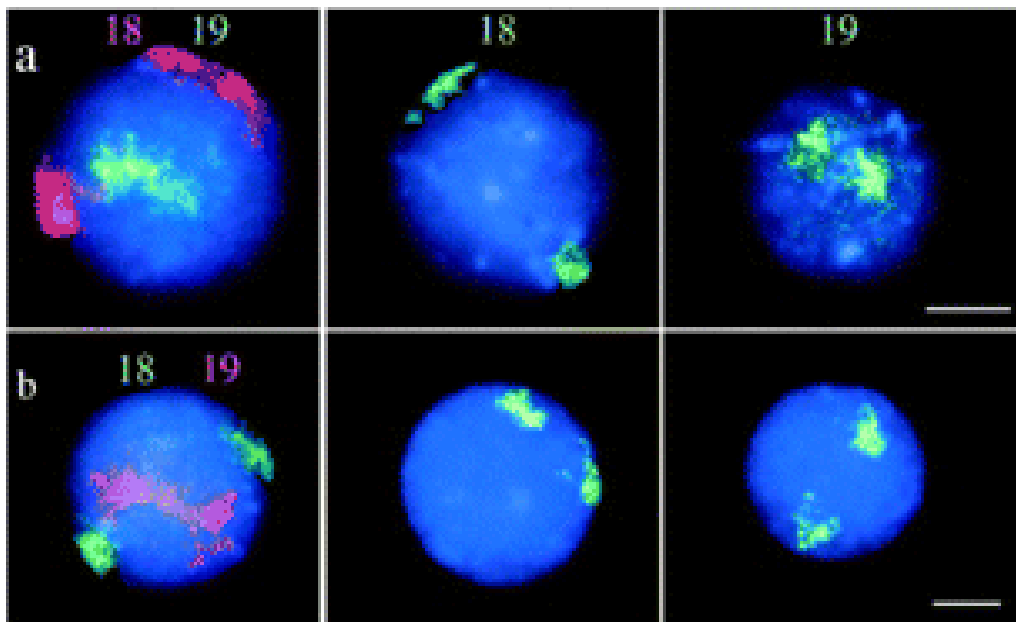


Figura 12 Diferencias morfológicas y estructurales entre el cromosoma 18 y 19 visualizadas por FISH en linfocitos humanos. El cromosoma 19 humano denso en genes se encuentra constantemente en el interior de núcleos humanos de linfocitos y fibroblastos, mientras que el cromosoma el gen de pobre 18 se encuentra preferentemente en la periferia nuclear (Croft, et. *al.*, 1999).

La organización del genoma también está dirigida por la asociación del *DNA* con estructuras del núcleo celular. Los dominios asociados a la lámina (LADs) (Zuleger et al., 2011) y dominios asociados al nucléolo (NADs) (Brodsky et al., 2005), interactúan con componentes de la lámina nuclear y del nucléolo, respectivamente. Los cromosomas que particularmente poseen LADs son pobres en genes o se encuentran transcripcionalmente inactivos en un estado de heterocromatina peri-centromérica, contribuyendo con la organización espacial del genoma (Fraser et al., 2015). De manera similar NADs sobrelapan con LADs, pero se encuentran en locus pobres en genes y en GC que precipitan con el nucléolo transcripcionalmente inactivo.

Además de heterocromatina, a lo largo de la lámina nuclear pueden encontrarse zonas de exclusión de heterocromatina muy cercanas al ambiente del poro nuclear (Krull et al., 2010). En estas zonas el genoma se encuentra en estado de eucromatina y aunque los resultados no han sido concluyentes, se piensa que las proteínas del poro nuclear pueden afectar las marcas de la cromatina y contribuir a la expresión génica (Liang et al., 2013).

La organización territorial de los cromosomas en interfase y la importancia funcional de la estructura tridimensional del genoma son ahora generalmente aceptados como un principio básico de la organización nuclear, tanto en animales (Cremer et al., 2008) y plantas (Shaw *et al.*, 2002), y puede incluso llevar a cabo para eucariotas unicelulares.

2.2.1. Microscopía: FISH y Super resolución

A mediados de la década de 1980, con el desarrollo de la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) del *DNA*, se hizo posible la visualización directa de los territorios cromosómicos y con esto la organización y distribución de los cromosomas durante la interfase (Manuelidis, 1985; Schardin *et al.*, 1985). Actualmente, nuestra información sobre la organización del genoma está principalmente construida por los resultados expuestos por dos tipos de enfoque. El primero de ellos es la hibridación fluorescente *in situ*, visualizada por microscopía. FISH es una técnica citológica de marcaje de cromosomas por la cual éstos se hibridan con sondas fluorescentes complementarias, y permiten la visualización directa de los cromosomas, y su identificación. Hoy en día, el método de FISH ha evolucionado hasta enfoques de FISH multicolor de tres dimensiones (Figura I4), que permiten la coloración simultánea de múltiples cromosomas y en combinación con microscopía tridimensional y técnicas de reconstrucción de imágenes, revelan la dispersión radial y la posición de los cromosomas en núcleos preservados en interfase (Bolzer et al., 2005;

Cremer et al., 2008). Este enfoque se ha convertido en un método revelador para el estudio de los arreglos de orden superior en lo que conocemos como territorios cromosómicos (Wendt y Grosveld, 2014)

La capacidad para caracterizar la estructura de la cromatina por FISH-3D se encuentra con limitaciones técnicas incluyendo las diferencias en los métodos de fijación y la eficiencia de la sonda en los pares de cromosomas, así como una baja resolución sobre las interacciones físicas entre secuencias específicas y la dinámica nuclear de la cromatina, las cuales pueden afectar la delimitación del territorio cromosómico (Ta et al., 2014).

Pese a las adversidades presentes en la metodología de FISH-3D, el desarrollo de formación de imágenes de inmunofluorescencia con microscopia de súper resolución, con la ventaja de eludir el límite de difracción clásica, ha revolucionado la forma en que se puede estudiar la estructura tridimensional del núcleo celular (Jungmann et al., 2014). Esta nueva herramienta permite la evaluación cuantitativa de los diferentes niveles de compactación de la cromatina, los que reflejan diferentes regiones o sub-compartimentos del paisaje nuclear 3D, y las mediciones de distancias absolutas entre los sitios de diferente compactación de la cromatina. Además, estas herramientas permiten el mapeo 3D de secuencias de *DNA/RNA* específicas y proteínas nucleares relativos a los mapas de la cromatina de compactación 3D y comparaciones de múltiples núcleos celulares (Schmid et al., 2017).

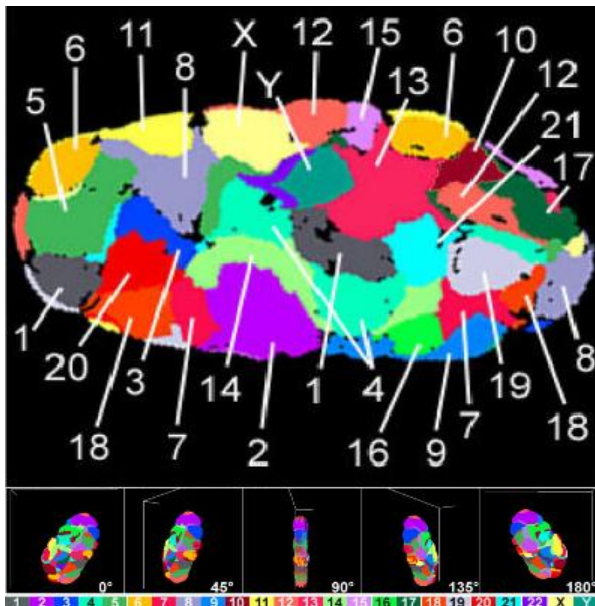


Figura 3. **Territorios cromosómicos.** Arriba. Representación de color de todos los TC visibles en esta sección después de la clasificación con 1 FISH de colores. Abajo. Reconstrucción 3D de la disposición de territorios cromosómicos en el núcleo desde diferentes ángulos (Tomada de Bolzer et al., 2005).

2.2.2. Técnicas basadas en captura conformacional de la cromatina (3C)

Las técnicas para definir los límites de los territorios basadas en el principio de la captura conformacional de la cromatina (3C), han aportado evidencia sobre un sistema de regulación influenciado por la organización espacial del genoma. Estudios 3C han demostrado la comunicación de largo alcance entre potenciadores y genes se lleva a cabo a través de un bucle de la cromatina, factores de transcripción y represores transcripcionales (Dekker *et al.* 2002).

Junto con las técnicas que posteriormente se desarrollaron con el principio de 3C (Denker A y de Laat W, 2016), a introducción de tecnologías de alto rendimiento, combinado con metodologías bioquímicas existentes condujo al desarrollo de técnicas que permiten la exploración de la organización del genoma a una escala global (Dekker *et al.*, 2002). Entre los descubrimientos más importantes ha sido la demostración de que los cromosomas se subdividen en dominios estructurales conocidos como *TADs* (dominios topológicamente asociados) (Figura I5). Cada TAD es considerado como la unidad funcional del cromosoma con organización espacial definida en el que los promotores pueden encontrar sus respectivos potenciadores y viceversa (Shen Y *et al.*, 2012). Con este enfoque, se ha hecho posible determinar interacciones espaciales no aleatorias del genoma entre segmentos de *DNA* específicos en *cis* y *trans* a un locus de referencia sobre un determinado territorio cromosómico (Miele y Dekker, 2008; Baù y *t D*, Marti-Renom, 2011).

Sin embargo, las técnicas basadas en 3C tienen dos limitaciones para poder ofrecer una imagen completa de la organización del genoma. En primer lugar, algunas de las características genómicas emergentes cambian dependiendo de la escala a la que se estudia el genoma. Por ejemplo, la existencia de los TADs es cuestionada cuando el genoma es interrogado a escalas más finas. En segundo lugar, los experimentos basados en 3C normalmente se llevan a cabo con decenas de millones de células, esto indica que el análisis de matrices de interacción basado en 3C requiere de análisis estadísticos rigurosos.

2.3. Organización espacial del genoma en cáncer

Incluso con toda la información disponible sobre la organización del genoma, el efecto que tiene la reorganización de genes o incluso de cromosomas completos en distintas enfermedades aún no es claro; aunque ahora es posible reconocer cambios discretos y cuantificables entre células. La epilepsia fue la primera enfermedad en donde se observó el reposicionamiento del centrómero del cromosoma X hacia la envoltura nuclear o en el borde del nucléolo en neuronas del foco epiléptico,

a diferencia de las células no afectadas de los pacientes (Borden and Manuelidis, 1988). Desde entonces, el reordenamiento del material genético se ha asociado una amplia lista de enfermedades como el síndrome de Hutchinson-Gilford (McCord et al., 2013; Taimen et al., 2009), síndrome de Down (Paz et al., 2015), infecciones del virus Epstein-Barr (Li et al., 2010) y sobre todo con el cáncer (Yu and Mitchell, 2014), en donde el alto nivel de inestabilidad genómica (Hanahan and Weinberg, 2011), resulta en una interrupción global de la organización espacial del genoma.

El cáncer es el resultado de mutaciones somáticas (Hanahan and Weinberg, 2000) y cambios en el perfil epigenético de las células (Jones and Baylin, 2007), e incluso mutaciones heredadas a través de la línea germinal que predisponen al individuo hacia la enfermedad (Hall et al., 2016). La inestabilidad genómica del núcleo celular es causa de fallos en los mecanismos de mantenimiento y reparación del genoma, por ejemplo, los controlados por el gen *housekeeping TP53* (Lane, 1992; Sigal and Rotter, 2000), que resultan ser ventajosamente selectivos y decisivos para el desarrollo del fenotipo cancerígeno (Hanahan and Weinberg, 2011).

Los eventos de reorganización genómica más conocidos en el desarrollo del cáncer son debidos a translocaciones del genoma y el incremento del número de copias de una región cromosómica. Ambos mecanismos son la forma frecuente del porqué los proto-oncogenes se transforman en oncogenes. Entre estos proto-oncogenes, el receptor del factor de crecimiento epidermal humano (*Her2*), se destaca por ser un marcador clínico que se encuentra amplificado entre el 10-20% de todos los casos de cáncer de mama. La sobre expresión de este gen está relacionado con un pobre pronóstico y resistencia a quimioterapia. Hoy en día, existen tratamientos contra tumores de cáncer de mama subtipo *Her2*, con trastuzumab y lapatinib, sin embargo, tumores con alteraciones genéticas de *Her2* suelen tener resistencia a estas terapias y una baja tasa de supervivencia. Los mecanismos por los que cánceres *Her2* positivos pueden o no mostrar resistencia son poco conocidos. Hasta ahora son pocos los estudios que han abordado la relación entre la relocalización específica de genes con el desarrollo del cáncer. En el caso del cáncer de mama destacan las investigaciones realizadas por un grupo de investigación estadounidense que ha demostrado que la reorganización del genoma se da en etapas tempranas de la diferenciación del tejido mamario y del tejido cancerígeno (Meaburn and Misteli, 2008). Específicamente, durante el desarrollo de células cancerígenas impulsado por mutaciones inducidas en *Her2*, los genes *AKT1*, *BCL2* y *VEGF*, incluido *Her2*, se relocalizan en el núcleo celular. Además, esta relocalización tiene implicaciones

con el nivel de expresión de cada gen. Otro estudio ha demostrado que los genes *FLII*, *HES5*, *MMP9*, *HSP90AA1*, *TGFB3*, *MYC*, *Her2*, *FOSL2*, *CSF1R* y *AKT1* cambian la posición radial en el núcleo celular.

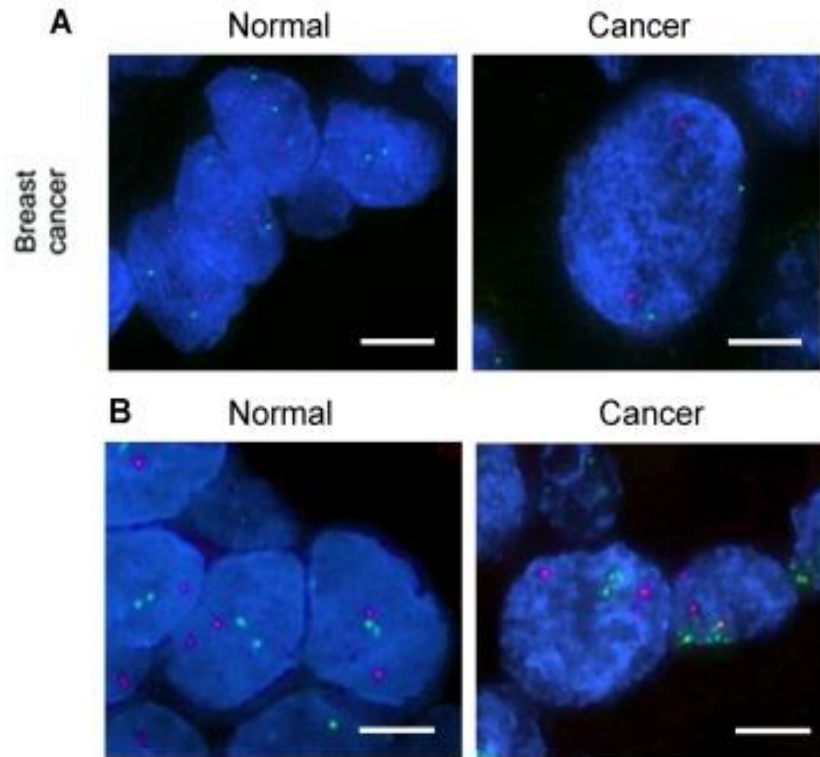


Figura 14 **Reorganización espacial en el cáncer de mama.** (A) FOSL2 (verde) y CSF1R (rojo), y (B) de ERBB2 (verde) y MYC (rojo) son detectados por FISH en un panel de 11 tejidos normales y 14 de carcinoma humano de mama invasivos. Se confirma la relocalización de genes hacia la periferia del núcleo y la amplificación del gen Her2 en el desarrollo del cáncer de mama (Tomado de Meaburn et al., 2009).

Se ha comprobado que en líneas celulares de cáncer de mama se produce un cambio significativo en un conjunto de genes que son vecinos cercanos espaciales del gen que codifica la proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina (*IGFBP3*) (Zeitz et al., 2013). *IGFBP3* es una proteína que modula el crecimiento y la supervivencia celular mediante la unión a los factores de crecimiento similares a la insulina I y II, y la regulación de su biodisponibilidad (Firth and Baxter, 2002). Durante el desarrollo del cáncer de mama, *IGFBP3* funciona como un modulador del crecimiento de células cancerígenas independientemente de los factores de crecimiento similares a la insulina (Mohan and Baylink, 2002) y se relaciona con casos de cáncer con pronóstico pobre (Yu et al., 1998). Los cambios en las interacciones de *IGFBP3* permite que

interactúe espacialmente con EGFR y con la familia de genes BCAS, aumentando el perfil de expresión de este conjunto de genes y promoviendo su actividad, lo que conlleva al aumento proliferativo de las células de cáncer de mama (Butt et al., 2004; Zeitz et al., 2013).

El reposicionamiento espacial de genes influenciado por eventos de amplificación génica, como los observados en el caso del gen *HER2* (Figura I6), es un efecto significativo de la inestabilidad genómica asociada al desarrollo de cáncer. Además, numerosos estudios han evidenciado una relación entre la ploidía del *DNA* con el riesgo de recurrencia y mortalidad en cáncer de mama. Aunque los resultados han causado opiniones controvertidas, recientemente un metaanálisis que emplea análisis estadísticos sobre más de 140,000 muestras clínicas de varios tipos de cáncer, demostró que los eventos de amplificación génica determinan buena parte de los aspectos clínicos del cáncer de mama, y que muchas veces estos están asociados con casos de cáncer más agresivos y avanzados como es el caso del impulsado por las amplificaciones del gen *HER2* (Zack et al., 2013).

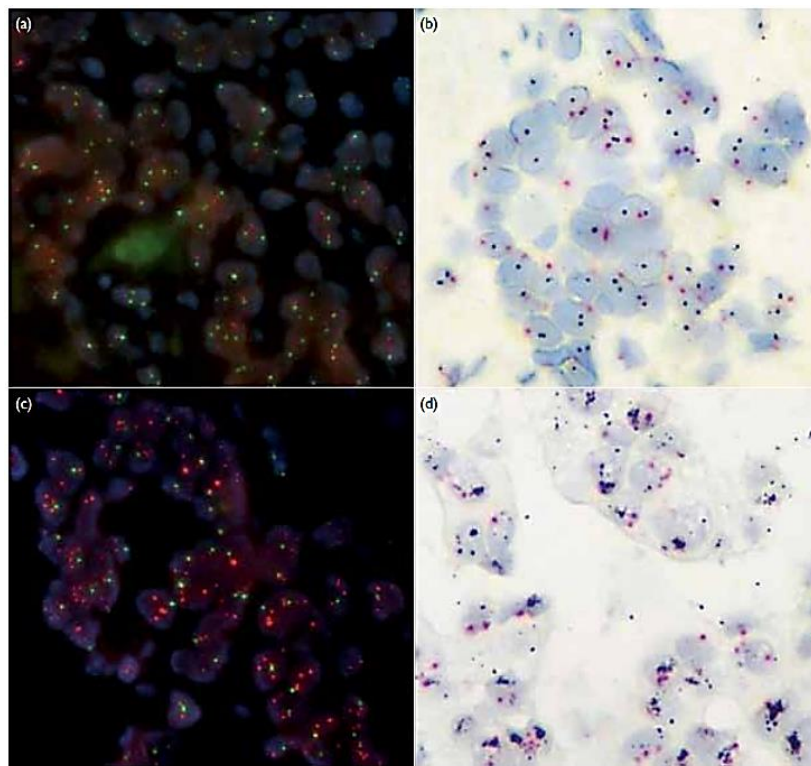


Figura 15 Detección de amplificación de *Her2*. Arriba (a) Resultado de FISH con una relación de señal de 1.22 (no amplificado). (b) resultado DISH del mismo paciente con una relación de señal de 1,45 (no amplificado). Abajo (c) Resultado de FISH con una relación de señal de 4.4 (amplificada). (d) resultado DISH del mismo paciente con una relación de señal de 4.97 (amplificada) (Tomada de Zack et al., 2013).

Estudios sobre la amplificación de oncogenes con técnicas como FISH (Meaburn et al., 2009; Zeitz et al., 2013) y genómica comparativa (Zack et al., 2013), han descrito la amplificación recurrente del número de copias de un número significativo de oncogenes específicos con importancia clínica, incluyendo *ERBB2* (*Her2*), *MYC*, *EGFR*, *TOP2A*, *CCND1*, *EMSYT*, *FGFR1*, *ESR1*, *PGR* y *ESR1* (Figura I7).

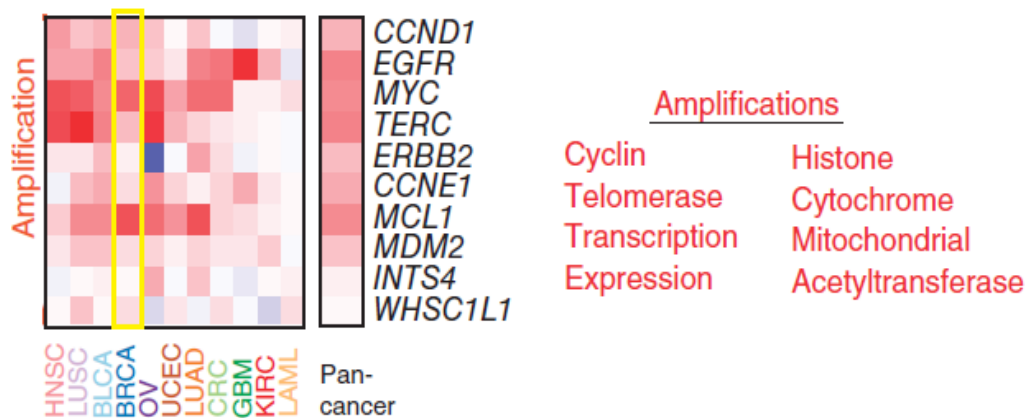


Figura 16 Frecuencia de amplificación de genes en el “pangenoma del cáncer”. En el caso del cáncer de mama (BRCA, recuadro amarillo), MYC, MCL1, EGFR son comúnmente amplificados. Los genes relacionados con la amplificación codifican para proteínas que regulan el ciclo celular, la expresión génica, entre otras (LUAD: adenocarcinoma de pulmón; LUSC, células escamosas del pulmón; HNSC, células escamosas de cabeza y cuello; KIRC, cáncer renal; BRCA, cáncer de mama; BLCA, cáncer de vejiga; CRC, cáncer colorrectal; UCEC, cáncer cervical uterino; GBM, glioblastoma multiforme; OV, cáncer de ovario) (Tomado de Zack *et al.*, 2013).

Específicamente, un cambio de expresión global de tumores con amplificación del gen *Her2* en contraste con tumores estrógeno positivo, triple negativo y tumores benignos fue por primera vez reportado por Kalari et al. (2013), donde se describe que los cánceres de mama *HER2+* expresan de manera diferencial 685 genes en comparación con los otros subtipos de cáncer (Figura I8). Además, esta diferencia de expresión estaría relacionada con el establecimiento y biología de tumores *HER2+* al favorecer la transducción de señales y transcripción; síntesis, degradación y secreción de proteínas; procesamiento de ARN; y procesos asociados con la fase G2/M del ciclo celular. Entre estos procesos están la señalización de integrina, la señalización de la GTPasa de la familia RHO y procesos relacionados con el citoesqueleto (por ejemplo, la progresión de la fase M), los cuales representan un conjunto de funciones interconectadas que son críticas para el establecimiento y/o mantenimiento del tumor *HER2+*.

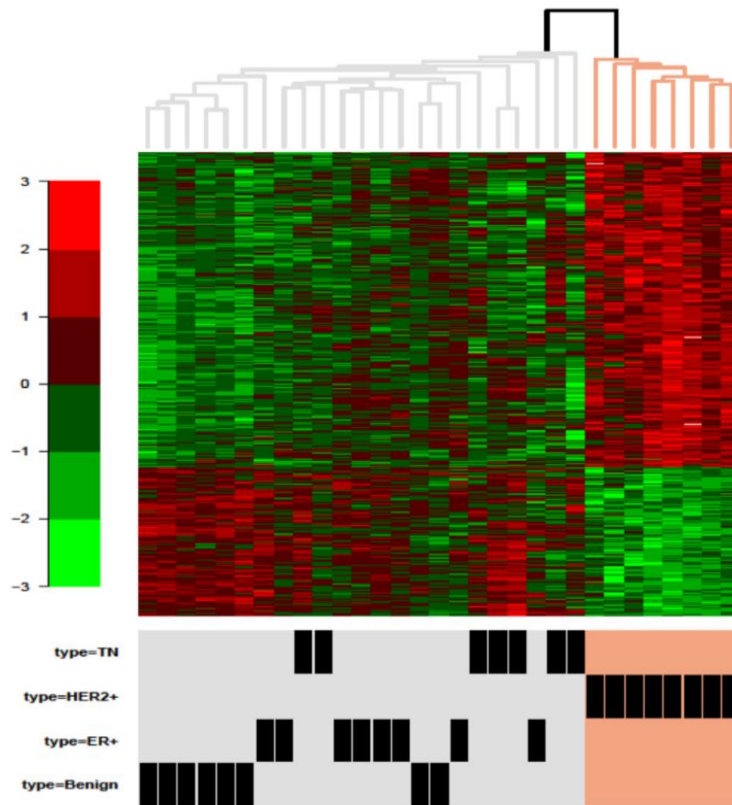


Figura 17 Agrupación de genes expresados de forma única en tumores HER2. Agrupamiento jerárquico de 685 genes expresados diferencialmente en tumores HER2-positivos en comparación con otros subtipos de tumores. Tomado de Kalari et al. (2013).

Las diferencias entre los patrones de posicionamiento del genoma entre los tejidos normales y el cáncer, o entre diferentes subtipos de cáncer, independientemente de por qué el genoma se reorganiza tienen el potencial de ser explotados para uso diagnóstico (Meaburn, 2016). Actualmente, los programas de detección temprana del cáncer, en particular aquellos dirigidos a la población, tales como la mamografía, las exploraciones con tomografía computarizada o los niveles séricos del antígeno prostático específico, son a menudo causa de sobrediagnóstico que puede derivar en un tratamiento innecesario para el paciente. Por otro lado, los cánceres derivados del mismo órgano pueden ser bastante heterogéneos entre sí, y su clasificación se basa en patrones morfológicos, características clínicas y/o características moleculares (Yu and Mitchell, 2014).

Sin embargo los actuales métodos histológicos de diagnóstico son insuficientes, ya que en la mayoría de los casos existe un límite a la información de pronóstico que puede ser obtenida a partir del análisis histológico, y el patólogo puede ser incapaz de distinguir de cánceres agresivos con un

alto grado de certeza, así que pacientes con tumores histológicamente similares pueden tener distintos resultados clínicos, por lo que predecir la supervivencia del paciente sigue siendo difícil (Meaburn, 2016).

Es importante destacar que, el mapeo de los patrones de posicionamiento espacial de los loci genómico específico puede distinguir el tejido canceroso del benigno con gran precisión. Así el posicionamiento genómico surge como un atractivo nuevo biomarcador. Definir los patrones de posicionamiento génicos para oncogenes del cáncer de mama y de tejido normal podría integrarse en el uso clínico, ya que sólo requiere una pequeña muestra de tejido para el análisis (100-1000 células), lo que significa que no requiere procedimientos invasivos adicionales para el paciente. Aunque actualmente CISH y en menor medida FISH, ya se utiliza en los laboratorios de diagnóstico, la infraestructura para este tipo de análisis es costosa y sólo es común en países desarrollados. Queda por ver la viabilidad de esta tecnología de diagnóstico para todas las economías en desarrollo.

Los recientes avances en una técnica de edición de genomas llamada CRISPR-Cas9 han implementado nuevas metodologías para localizar loci con alta precisión en las células vivas (Chen et al., 2013; Ma et al., 2015). Con ventajas prácticas y económicas sobre los métodos convencionales, los estudios sobre la aneuploidía, las translocaciones y el reposicionamiento de genes, podrían ser implementados de manera rutinaria en las clínicas de diagnóstico.

2.4. CRISPR

El sistema CRISPR se ha identificado en una amplia gama de bacterias y arqueas como un tipo de sistema inmunológico adaptativo que las protege contra la invasión de material genético viral o de otros plásmidos bacterianos. En conjunto el sistema está compuesto por un locus de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) asociadas a genes *Cas*, RNAs no codificantes y un conjunto distintivo de elementos repetitivos derivados de *DNA* exógeno conocido como *protospacers*, separados por secuencias variables cortas, que en conjunto constituyen la matriz ARN CRISPR (*crRNA*). Cada protospacer siempre se asocia con una secuencia de 3 pares de bases llamada *protospacer adjacent motif* (PAM), que puede variar dependiendo del sistema específico CRISPR (Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005).

El sistema CRISPR tipo II es el mejor caracterizado. Consiste en la nucleasa Cas9, la matriz *crRNA* que codifica el RNA guía y un RNA auxiliar de transactivación, *tracrRNA*, que facilita el

procesamiento de la matriz crRNA en unidades discretas. Cada unidad crRNA contiene la secuencia guía de 20 nucleótidos y una repetición directa parcial, donde el primero dirige a Cas9 a través de un apareamiento de bases (Makarova et al., 2013) (figura I9).

La vía por la cual CRISPR tipo II defiende a una bacteria de la introducción de material extraño está dividida en tres etapas. 1) Adquisición: en donde material genético de virus u otras bacterias se introducen en la bacteria, entonces Cas1, Cas2 y Cas9 en conjunto con un tracrRNA seleccionan una secuencia del material genético foráneo a través del reconocimiento de un dominio PAM. Un corto *spacer* de aproximadamente 20 nucleótidos adyacente al PAM es escindido y dirigido al locus de cadena sencilla CRISPR inmediatamente después del locus de proteínas Cas y un tracrRNA. 2) Transcripción y maduración del crRNA: el arreglo CRISPR y tracrRNA es transcrito y se une a Cas9 donde un crRNA es escindido de manera específica por la RNasa III. El complejo crRNA:tracrRNA permanece unido a Cas9 de manera estable como un heterodúplex. 3) Identificación y clivaje: durante una reinfección con *DNA* foráneo, el *spacer* del complejo Cas9:RNAs se une de forma secuencia complementaria con el material genético foráneo, es entonces cuando Cas9 adopta una conformación activa y provoca un rompimiento de doble cadena de la cadena de ácidos nucleicos foráneos, protegiendo a la célula (Makarova et al., 2013; Ratner et al., 2016) (Figura I9A).

2.4.1 CRISPR-Cas9

Desde que se publicó la utilidad del sistema CRISPR-Cas9 para la edición de genomas (Jinek et al., 2012), rápidamente fue adaptado para su uso en células eucariotas e implementado en diversos proyectos dada la facilidad con la que puede modificar de manera precisa la secuencia de un gen, y también cambiar el perfil de expresión de una célula. Una quimera tracrRNA:crRNA fue diseñado como un *small guide RNA* (sgRNA) que posee dos características críticas: la secuencia de 20 nucleótidos en el extremo 5' del sgRNA que determina el sitio diana de *DNA* al que se unirá por emparejamiento de bases, y una secuencia de doble cadena en el lado 3' de la secuencia guía que se une a Cas9. Esto creó un simple sistema de dos componentes en el que cambia a la secuencia de guía (20 nucleótidos en el ARN nativo) de la sgRNA se puede utilizar para programar CRISPR-Cas9 para dirigirse a cualquier secuencia de ADN de interés, siempre que sea adyacente a un PAM.

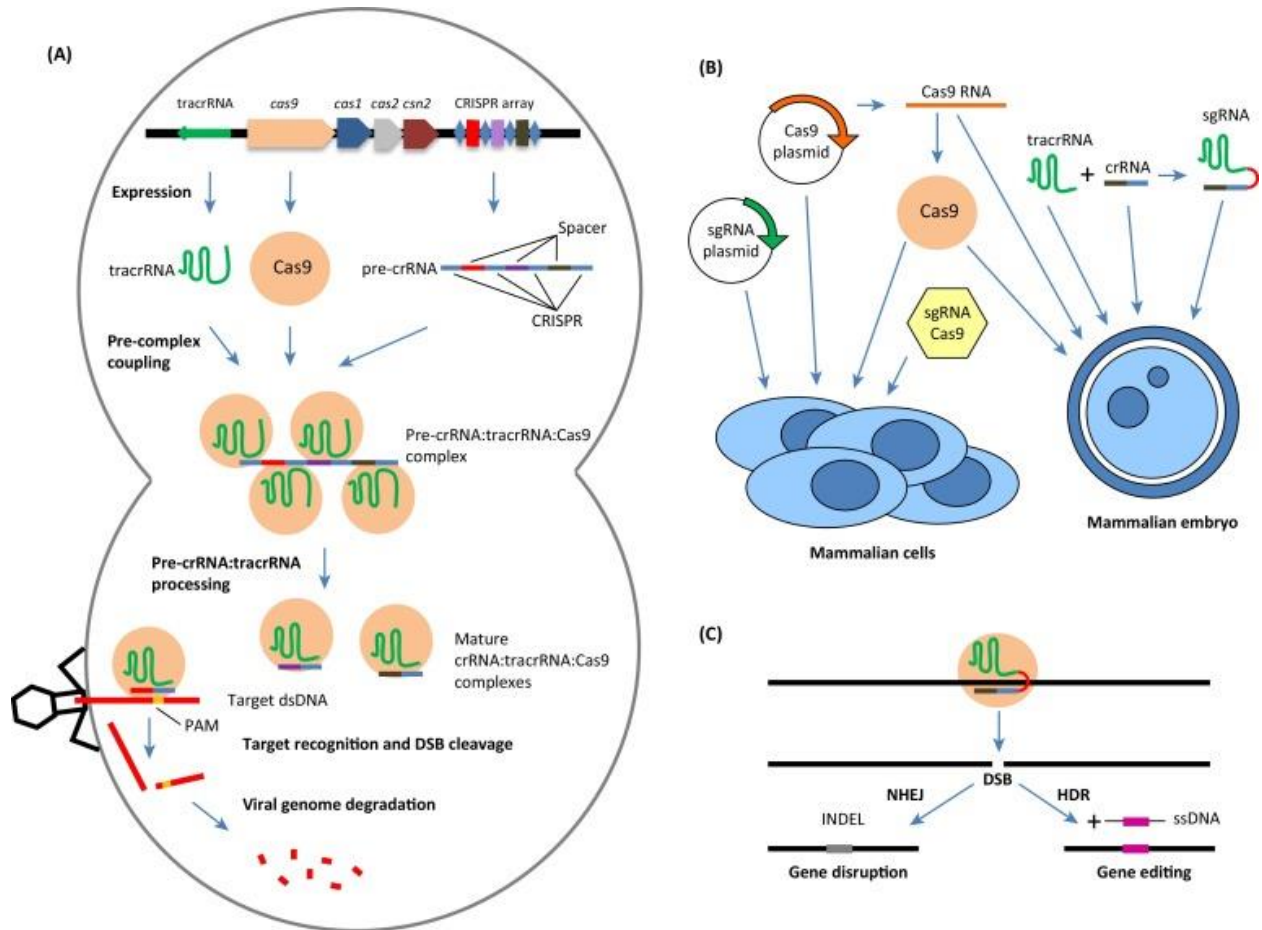


Figura 18 Resumen del mecanismo de inmunidad bacteriana CRISPR/Cas. A) Se representa el mecanismo de defensa contra virus CRISPR-Cas tipo II de *Streptococcus pyogenes*. El locus CRISPR-Cas contiene cuatro genes Cas, una región codificante para el tracrRNA y un arreglo tipo CRISPR-spacer. Las proteínas Cas9 y el transcrito precursor pre-crRNA junto con moléculas de tracrRNA dan lugar a los complejos maduros crRNA:tracrRNA:Cas9. Cuando se detecta una secuencia PAM en el genoma de un virus invasor (NGG en *S. pyogenes*) y la región adyacente es complementaria al spacer del crRNA, Cas9 cataliza una rotura de doble cadena que detiene el proceso de infección viral. (B) La herramienta CRISPR-Cas9 ha sido adaptada para su uso en la edición del genoma de células eucariotas, así como en embriones, a través del uso de plásmidos que codifican para la nucleasa Cas9 y un single-guide RNA (sgRNA). (C) En el núcleo de las células eucariotas, el sistema CRISPR-Cas9 corta el DNA con una rotura de doble cadena, que puede ser reparada. El mecanismo de reparación de “nonhomologous end-joining (NHEJ)” da lugar a inserciones y deleciones (INDEL) de nucleótidos, mientras que el mecanismo “homology-directed repair (HDR)”, puede ser utilizado para generar inserciones o ediciones dirigidas y precisas del genoma a través de la presencia de brazos de homología que se introducen junto con el sistema CRISPR. Adaptado de Montoliu y Mujica, 2016

Anteriormente, nucleasas de dedos de zinc (*ZFN*) (Bibikova et al., 2003; Bibikova et al., 2002) y nucleasas tipo activadores de transcripción (*TALEN*) (Boch et al., 2009; Christian et al., 2010; Moscou and Bogdanove, 2009), habían sido utilizadas para la edición de genomas, sin embargo, requerían de la ingeniería de proteínas para cada sitio diana que quería ser modificado. La ventaja que supone el sistema de edición del genoma mediado por CRISPR-Cas9 frente a estos otros es

que CRISPR/Cas9 requiere sólo un cambio en la secuencia guía de RNA para dirigir la edición a prácticamente cualquier sitio del genoma (Jinek et al., 2012).

2.4.2. CRISPR-*dCas9*

Basado en el funcionamiento de CRISPR, un nuevo enfoque puede localizar secuencias in vivo a través de 1) Cas9-nucleasa inactiva, *dCas9* (*d*, del inglés *dead*), que conserva su capacidad de reconocer específicamente un loci en el *DNA*, pero sin cortarlo, además de que en un sistema es posible agregar secuencias codificantes de proteínas fluorescentes; 2) sgRNA específico para una secuencia que dirige el reconocimiento específico al loci en el *DNA*. El resultado obtenido es una secuencia específica enriquecida con señales fluorescentes que pueden visualizarse in vivo por microscopia (Chen et al., 2013; Ma et al., 2015).

El sistema CRISPR-*dCas9* ha sido desarrollado en tres trabajos distintos. El primero utilizó el sistema CRISPR-*dCas9* con señales de la proteína EGFP para visualizar la localización del gen MUC4, dirigiendo los sgRNA hacia secuencias repetitivas localizadas entre los primero exones e intrones del gen (Chen et al., 2013). Después, otro grupo de investigación diseñó un sistema «multicolor» para poder rastrear secuencias con tres proteínas fluorescentes distintas: proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja (RFP) y proteína fluorescente azul (BFP) (Ma et al., 2015). En el trabajo de Ma *et al.* (Figura I8), cada par de plasmidos sgRNA-CRISPR-*dCas9* pertenece al sistema CRISPR de tres bacterias distintas: *S. pyogenes*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus thermophilus* en donde se expresa una proteína de color distintas. *S. pyogenes* con RFP, *N. meningitidis* con GFP y *S. thermophilus* con BFP. La metodología CRISPR-*dCas9* evaluó las relaciones espaciales intercromosomales o intracromosomales de dos *locis* aleatorios del genoma. En la figura #A se visualiza una secuencia aleatoria del cromosoma 9 a través de dos proteínas fluorescentes distintas (roja y verde). La relación espacial es constante entre ambas pruebas. En #B se examina la relación intercromosomal de una secuencia aleatoria del cromosoma 9 y otra del cromosoma 13 y, por último, en C se analiza la relación espacial intracromosomal de dos secuencias aleatorias del cromosoma 9 que se ubican a 75 Mbs de distancia. Los resultados obtenidos son comparables con metodologías FISH sobre la distancia en μm a la que se encuentran estas dos secuencias. CRISPR-*dCas9* tiene la capacidad para distinguir entre dos secuencias que se ubican hasta 2 Mbs de distancia.

Dos secuencias del cromosoma 13 y otra secuencia telomérica ubicada a 2 Mbs fueron visualizadas con colores distintos. Primero en la figura I10. A se visualizan dos secuencias aleatorias que se encuentra a 2 Mbs de distancia. En la figura 8.B a se visualizan dos secuencias aleatorias del cromosoma 13. La fusión de imágenes de ambas pruebas muestra las dos señales fluorescentes muy cercanas una de otra, lo que esperaría dada la distancia a la que se encuentra.

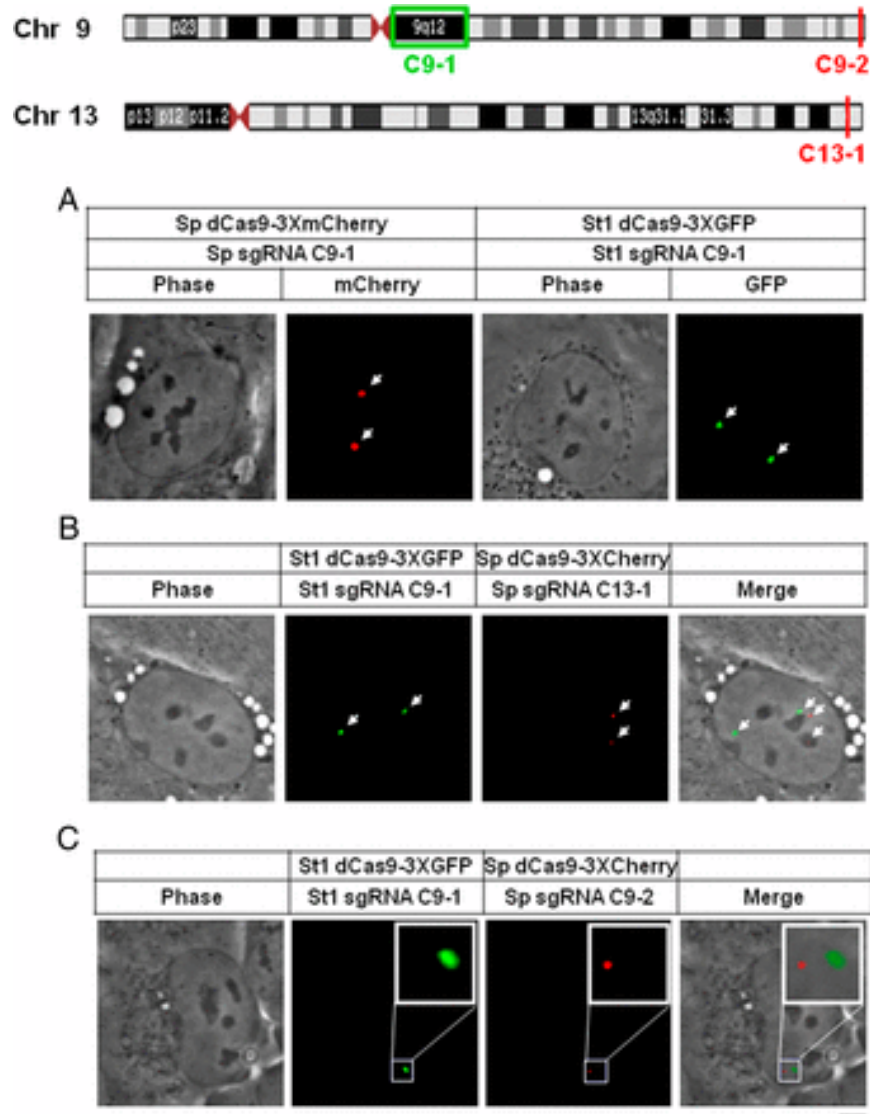


Figura 19 **Relación intercromosomal e intracromosomal por CRISPR-dCas9.** A. Localización de una secuencia específica del cromosoma 9, C9-1, con dos proteínas fluorescentes distintas. B. Relación intercromosomal entre C9-1 y C13-1. C. Relación intracromosomal entre dos secuencias aleatorias del cromosoma 9 ubicadas a 75 Mbs de distancia (Tomado de Maa et al., 2015)

Aprovechando la precisión del sistema CRISPR-dCas9 para localizar *locis* específicos de forma *in vivo*, este trabajo pretende localizar de forma específica oncogenes con importancia clínica en el cáncer de mama. De esta manera comprobar que CRISPR-dCas9 es capaz de detectar el número de copias de un gen en el núcleo, relocalización específica de genes y patrones de reorganización establecidos durante el desarrollo del cáncer de mama.

3. Planteamiento del problema y justificación

La reorganización espacial intranuclear de ciertos oncogenes se ha observado en diversos tipos de cáncer. Además, los eventos de amplificación génica específicos para oncogenes y su participación en el cáncer de mama también han sido estudiados desde hace varios años. En este contexto, la relocalización en el núcleo de oncogenes, amplificados o no, podría indicar cambios en el perfil de expresión. Estos cambios topológicos podrían utilizarse como un biomarcador para entender el desarrollo del cáncer de mama y el pronóstico de la enfermedad.

Además, tecnologías innovadoras como CRISPR-dCas9, pueden proporcionar información precisa, por encima de técnicas como FISH, sobre el estado de la localización de genes y su reorganización espacial en el núcleo durante el desarrollo de cáncer de mama. En este escenario, la tecnología CRISPR-dCas9 para marcar locis genómicos en células vivas surge como una alternativa al FISH. Además, el campo de la oncología avanza hacia una medicina más personalizada para los pacientes, por lo que el uso de cultivos primarios para caracterizar tumores se está generalizando poco a poco. El sistema CRISPR-dCas9 para visualizar arreglos genómicos, reorganización espacial de genes, amplificaciones o deleciones de genes marcadores e incluso heterogeneidad tumoral puede aportar información muy valiosa en dicha caracterización de cultivos primarios tumorales.

4. Hipótesis

La reorganización espacial de tipo loci específico dentro del núcleo en interfase de células provenientes de cáncer de mama, promovida por eventos de amplificación génica o inestabilidad genómica pueden ser visualizado mediante el sistema CRISPR-dCas9 en células vivas y así poder proporcionar una valiosa herramienta para la caracterización de algunos tipos de tumores.

5. Objetivos

Objetivo general:

Desarrollar un protocolo CRISPR-dCas9 en líneas celulares de cáncer de mama para visualizar la localización de oncogenes con importancia clínica y cuya amplificación ha sido reportada en el desarrollo y pronóstico de la enfermedad.

Objetivos particulares:

- 1) Construir plásmidos que dirijan a un complejo dCas9 marcado con proteína fluorescente verde al loci genómico de HER2
- 2) Transfectar líneas celulares modelo para el estudio molecular del cáncer mama, pertenecientes a dos distintos subtipos, con los plásmidos construidos para visualizar la localización intracelular del gen HER2 las células individuales vivas.
- 3) Cuantificar el posicionamiento radial de HER2 al interior del núcleo, así como su posible amplificación, y evaluar el potencial de la herramienta construida.

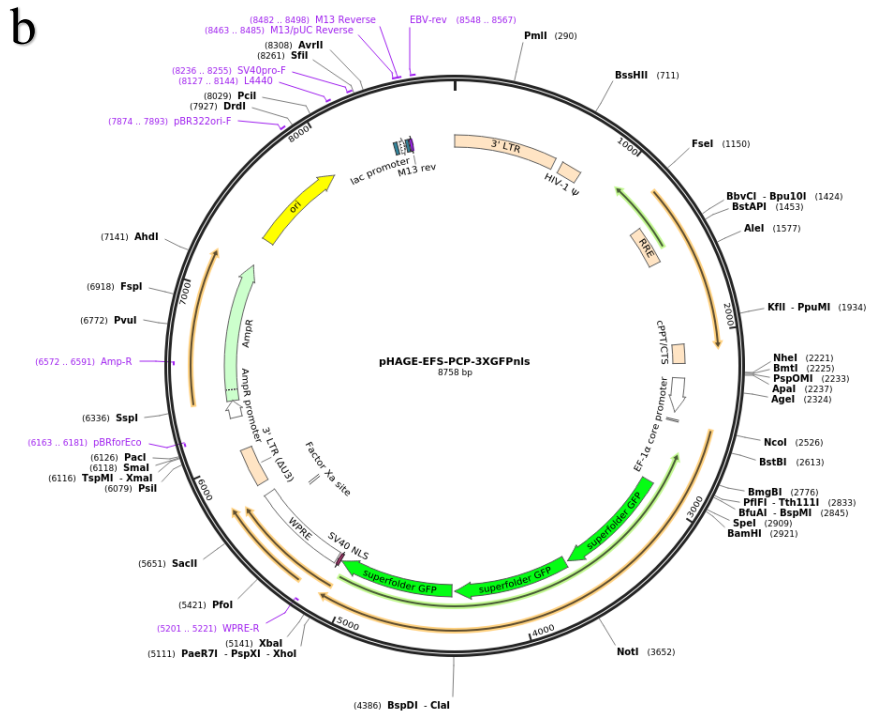
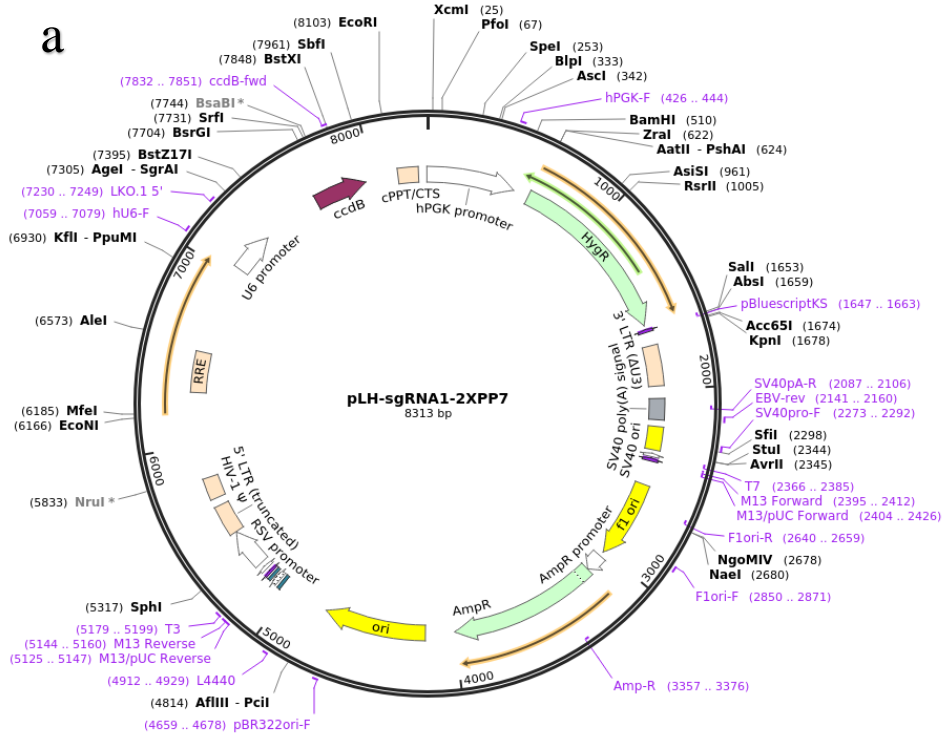
6. Estrategia experimental

6.1. Plásmidos del sistema CRISPR-*dCas9*

Para la transfección de la endonucleasa inactiva *dCas9* y los sgRNAs, se utilizaron los plásmidos del sistema CRISPR-*dCas9* multicolor (Ma et al., 2015).

En el sistema CRISPR multicolor, el vector de expresión para los sgRNA, pLH-stsgRNA3.1 (Addgene #64118), está basado en el plásmido de expresión lentiviral pLKO.1 que contiene dos sitios de corte por la enzima de restricción BbsI para la inserción de la secuencia sgRNA (Figura M1a). Los sgRNAs se insertan unas pocas pares de bases después del promotor hU6 entre la secuencia del gen *ccdb*. El vector de expresión de *dCas9*-GFP es pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls (Addgene #64113) (Figura M1b).

El sistema CRISPRainbow es una mejora del sistema CRISPR multicolor que permite, a través de la combinación de proteínas fluorescentes, detectar hasta 7 locis distintos en la misma célula. El sistema utiliza tres plásmidos: I) un plásmido que codifica un sgRNA fusionado a aptámeros que pueden unir proteínas fluorescentes y que en conjunto dirige a *dCas9* hacia un gen diana: pLH-sgRNA1-2XPP7 (Addgene #75390)(Figura M2a) II) un plásmido que codifica una proteína fluorescente específica (GFP, RFP, BFP) fusionado a una secuencia crCRISPR: pHAGE-EFS-PCP-3XGFPnls (Addgene #75385) y III) (Figure M2b) un plásmido que codifica el CRISPR-*dCas9*: pHAGE-TO-*dCas9* (Addgene #75381) (Figura M2c). Los aptámeros que se encuentran en el sgRNA pueden unir una, dos o tres proteínas fluorescentes distintas y con esto obtener además de los colores verde, azul y rojo; los colores secundarios magenta, cian, amarillo y blanco (Ma et al., 2016).



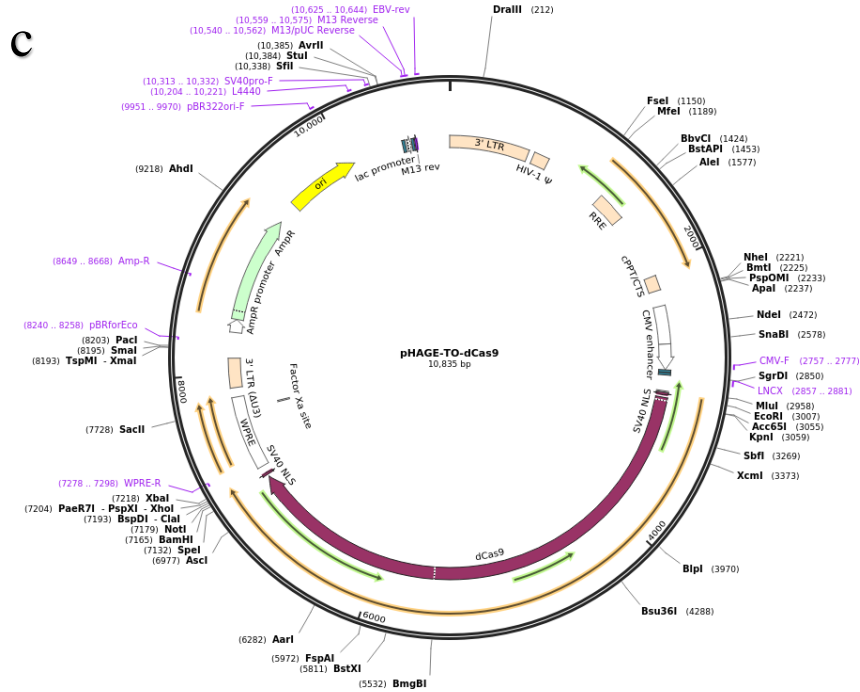


Figura M1 a. Mapa del plásmido pLH-sgRNA1-2XPP7. b. Mapa del plasmido pHAGE-EFS-PCP-3XGFPnls c. Mapa del plásmido pHAGE-TO-dCas9 Mapas fueron generados con el software Snapgene® V4.9.

6.2. Generación de bacterias competentes *E. coli* XL1-Blue, DB 3.1 y STBL.2

Se generaron bacterias competentes *E. coli* XL1-Blue, DB 3.1 y STBL.2 (Tabla M1) conservadas en glicerol y almacenadas a -80 °C.

Cepa de <i>E.coli</i>	Resistencia natural	Uso primario	Genotipo
XL1 Blue	Tetraciclina	Clonaciones rutinarias. Selección mediante azul/blanco.	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)
DB3.1	Estreptomicina	Para propagar plásmidos que expresen el gen <i>ccdB</i> .	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r _B ⁻ , m _B ⁻) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm ^r) xyl5 Δleu mtl1
STBL2		Para propagar y almacenar vectores virales. Sensibles a la toxina <i>ccdB</i> , por lo que son útiles para la selección de este sistema	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ(lac-proAB) mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) λ ⁻

Tabla M1. Características de las cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio.

Brevemente, se crecieron las bacterias en tubos de 15 ml que contengan 10 ml de medio LB precalentado a 37 °C, para cada cepa. Se incuban en agitación constante a 37°C, *overnight*. Después de la incubación, se transfiere un 1 ml del cultivo a un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio LB precalentado a 28 °C y se agita a 37° C hasta que la absorbancia del cultivo alcance un valor de 0.6 a 0.8 nm calibrado a OD600 (el tiempo aproximado para llegar a este punto es de 2 horas). Después de la incubación se coloca el matraz en hielo por 5 minutos para después transferir el cultivo a un tubo de 50 ml. Se centrifuga a 4000 x g por 5 minutos a 4°C y se desecha el sobrenadante. Se transfieren los 50 ml restantes y se repite la centrifugación. Desde este paso las bacterias son mantenidas en hielo hasta la congelación. El precipitado de bacterias se resuspende en 30 ml de buffer TFB1 (RbCl 100 mM, MnCl₂50 mM, acetato de potasio 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol al 15%, pH 5.8). Se incuba en hielo por 90 minutos, después se centrifuga a 4000 x g por 5 min a 4°C y se descarta el sobrenadante. El precipitado es resuspendido en 4 ml de buffer TFB2 (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol 15%, pH 6.8. Por último, se alicuotan las bacterias competentes (50 µl) en tubos de microcentrífuga previamente enfriados, se congelan rápidamente en hielo seco y se almacenan a -70°C hasta su utilización.

6.3. Transformación de bacterias con plásmidos

En condiciones estériles, se descongelan en hielo 50 µl de bacterias competentes y se les agregan 1-5 µl de *DNA* plasmídico (50-300 ng de plásmido). Se mezcla suavemente, y se incuba la mezcla de células competente/*DNA* en hielo durante 20-30 minutos. Tras la incubación, se expone la mezcla a un choque térmico mediante la colocación de la parte inferior del tubo en un baño de agua a 42 °C durante exactamente 45 segundos. Inmediatamente después del choque térmico, se colocan los tubos de nuevo en hielo durante 2 min. Posteriormente, se añaden 500 µl de LB (sin antibiótico) a las bacterias e incuban a 37 °C con agitación durante 45 min-1hora. Este paso permite que las bacterias sinteticen las proteínas que les confieren resistencia a antibióticos, las cuales están codificadas en el esqueleto del plásmido. Finalmente, se siembran 300 µl y 30 µl (1:10) de las bacterias transformadas en dos placas de agar LB suplementado con el antibiótico correspondiente (ejemplo, ampicilina 1 mg/ml) y se reparten homogéneamente por la placa con un asa bacteriológica de vidrio estéril. Las placas, se incuban a 37 ° *overnight*. Al día siguiente se retiran las placas con las colonias resistentes que han incorporado el plásmido de la incubadora y.

6.4. Miniprep por lisis alcalina.

Primero, con un asa bacteriológica se toma una colonia de las placas de LB + antibiótico y se inocula en 5 ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente (ej. Ampicilina 1mg/ml). Se incuba en agitación constante a 37 °C, durante toda la noche. Después de la incubación, se transfiere el cultivo a tubos de microcentrifuga de 1.5 ml y se centrifuga a 10 000 x g durante 30 segundos, se desecha el sobrenadante y se repite la centrifugación hasta que sólo quede un ml del cultivo, el cual debe ser almacenado a 4 °C por si se debe recuperar. El botón precipitado de bacterias se resuspende en 200 µl de solución de Miniprep I (Tris-HCl 25 mM (pH 8), Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM), en este punto es importante asegurarse que las bacterias estén completamente resuspendidas Después se añaden 400 µl de solución de Miniprep II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se mezcla suavemente invirtiendo el tubo varias veces. Se incuba en hielo durante exactamente 5 minutos. Se agregan 300 µl de solución de Miniprep III (acetato de potasio 3M, ácido acético glacial 2M) enfriada a 4 °C. Se mezcla invirtiendo el tubo varias veces y se incuba en hielo durante 5 minutos. Después se centrifuga a 12 000 x g durante 5 minutos, se recoge el sobrenadante en un nuevo tubo en donde se agregan 630 µl (0.7 volúmenes) de isopropanol y se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos para después precipitar el *DNA* por centrifugación a 12 000 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante, en este punto el precipitado se seca a temperatura ambiente. Una vez que el precipitado se ha secado se agregan 100 µl de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) y 3 µl de RNasa (2 mg/ml), y se incuba a 37 °C durante 1 hora. Después se añaden 100 µl más de buffer TE y se procede con la extracción del *DNA* añadiendo a la mezcla 200 µl de solución fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1) Se mezcla adecuadamente invirtiendo el tubo varias veces. El *DNA* se extrae por centrifugación a 10 000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente; en este punto se forman 3 fases de donde se debe recuperar la fase acuosa (superior), la cual contiene el *DNA*, en un nuevo tubo de microcentrifuga. A la fase recuperada se añaden 20 µl de NaAc 3M, 500 µl de etanol 100% frío y se incuba *overnight* a -20 °C.

Al día siguiente se centrifuga el tubo a 13,000 rpm a 4 °C durante 1 hora. Se desecha el sobrenadante, se lava el precipitado de *DNA* con 1 ml de etanol 75% y se centrifuga el tubo a 13000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Se desecha el sobrenadante y se deja secar el precipitado. Por último, se resuspende el *DNA* plasmídico en 50 µl de agua estéril y se almacena a -20 °C. Las

concentraciones de plásmido obtenidas son medidas en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 de Thermo Fisher Scientific.

6.5. Ensayos de restricción de plásmidos y electroforesis en gel de agarosa

Se determinaron los sitios de corte para enzimas de restricción que están presentes en el vector final utilizando los programas Snapgene V. 4.1.9 (GSL Biotech LLC) o NEBcutter V2.0 (Vincze T, 2003). Se seleccionaron las enzimas EcoRI o BamHI o ClaI, que corten el vector en dos fragmentos, y preferiblemente que puedan cortar en buffers compatibles. Para el plásmido pLH-stsgRNA3.1 se seleccionaron las enzimas EcoRI y ClaI; para pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls las enzimas EcorI y BamHI; para pHAGE-EFS-PCP-3XGFPnls se utilizaron BamHI y ClaI y por último, para pHAGE-TO-dCas9 se utilizó EcorI y BamHI. Para el plásmido pLH-stsgRNA3.1 se seleccionaron las enzimas EcoRI y ClaI; para pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls las enzimas EcorI y BamHI; para pHAGE-EFS-PCP-3XGFPnls se utilizaron BamHI y ClaI y, por último, para pHAGE-TO-dCas9 se utilizó EcorI y BamHI. Se prepararon las reacciones de la siguiente manera: 0.5 µg del plásmido, 1 unidad de cada enzima de restricción, 2.5 µl de 10X SURE/Cut buffer B, ddH₂O hasta los 25 µl. La reacción se incubó a 37°C durante toda la noche.

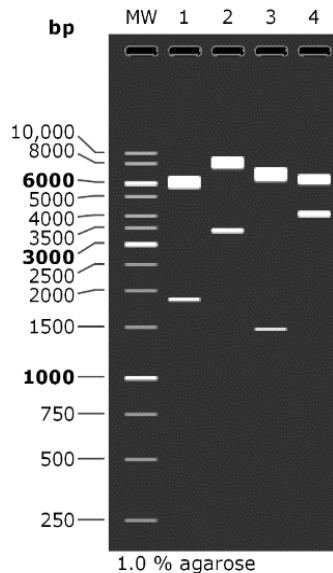


Figura M3. Patrón de bandeos esperado tras la restricción de los plásmidos.

Los plásmidos obtenidos en la miniprep y fragmentos generados por el ensayo de restricción son resueltos en un gel de agarosa 1%, TBE 1X a 100 V durante 3 horas para la miniprep y 1 hora para los productos de digestión. En el gel de electroforesis se incluye 1µg del marcador de peso

Figura M4. Esquema de la secuencia del sitio de corte de BbsI en el vector pLH-stsgRNA. El fragmento que queda eliminado del plásmido tras la digestión se indica en un cuadro sombreado, y la secuencia consenso de reconocimiento de BbsI se indica en negritas. Los números indican la posición de la secuencia dentro del plásmido.

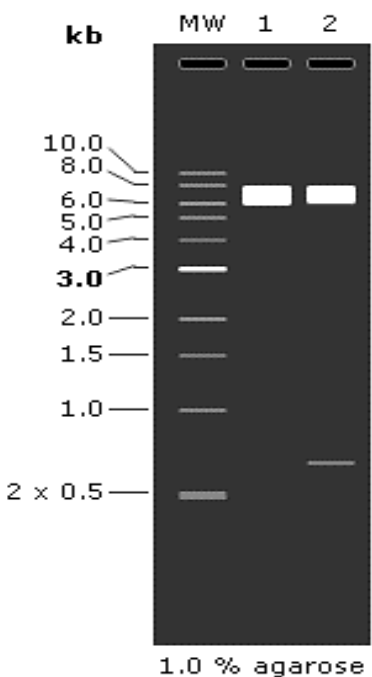


Figura M5. Patrón de bandeo esperado tras la restricción de pLH-stsgRNA 3.1 con BbsI. El carril uno es el vector y el carril dos la digestión en dónde se generan dos frangmetos, uno de 7621 pb y otro de 669 pb. Generado con Snapgene.

Para ello se digirieron 5 µg del plásmido pLH-stsgRNA en 5 µl de NEB Buffer 2.1, 2 µl de la enzima BbsI (NEB R0539S; 10,000 unidades/ml) y agua hasta un volumen final de 50 µl. La reacción de digestión se incubó a 37 °C, *overnight*. Al día siguiente la enzima BbsI es desactivada a 65 °C por 10 minutos.

Para prevenir la posible recircularización del plásmido y evitar así la aparición de falsos positivos, se sometió al plásmido linearizado a una reacción de desfosforilación en una reacción con 48 µl de plásmido linearizado, 5 µl de 10X FastAP Buffer, 1 µl de FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/µL) (Thermo Fisher, EF0654) y 44 µL de agua, para un volumen final de 100 µl. La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora y después se inactiva agregando 1 µl de EDTA 0.5 M pH 8.0 a la mezcla y calentando a 65°C por 10 minutos.

La digestión fue resuelta en un gel de agarosa 1%, TBE 1X a 100 V durante 3 horas, cargando los 50 µl de reacción junto con 16.5 µl de Gel Loading Dye, Purple (6X) enteramente en un solo pozo del gel que se generó uniendo dos pocillos con masking tape en el peine al polimerizar el gel. La electroforesis revelará dos fragmentos (Figura M5), uno con un tamaño de 7621 pb,

correspondiente al vector linealizado pLH-stsgRNA en el que se clonarán los sgRNAs, y otro de 669 pb que contiene a parte de la secuencia que codifica la toxina *ccdb*. La banda de 7621 pb fue visualizada mediante transiluminación con luz UV, cortada con un bisturí y transferida a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml para purificarla.

La purificación se realizó con el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). De manera resumida, el fragmento cortado del gel es resuspendido en 3 volúmenes de buffer PG por cada volumen de gel, se incuba para solubilizar la agarosa a 50 °C durante 10 minutos con agitación por vortex cada 2 minutos para facilitar la solubilización. Luego, se agrega 1 volumen de isopropanol y se transfiere la mezcla a una columna que está dentro de un tubo colector. Se centrifuga la columna a 13 000 rpm durante 1 minuto. Una vez que se ha centrifugado la totalidad de la mezcla, el *DNA* se encuentra unido a la columna y se lava con 0.5 ml de buffer QG y se centrifuga a la misma velocidad. A continuación, se agrega a la columna 0.75 ml de buffer PE y se centrifuga a 13 000 rpm. Repetir la centrifugación para eliminar el exceso de etanol. Por último, se coloca la columna en un tubo de microcentrífuga nuevo, se agregan 50 µl de buffer EB y se eluye el *DNA* centrifugando a 13 000 rpm. 2 µl del vector linealizado se visualizaron en un gel de agarosa 1% para comprobar su integridad tras la purificación.

6.8. Diseño de sgRNAs

Los sgRNA fueron diseñados para rastrear un gen con importancia clínica durante el desarrollo del cáncer de mama y con amplificación reportadas: *Her2*. Se utilizó la herramienta en línea *Chop* (Montague et al., 2014) con la opción de búsqueda de PAM; NGG y NNAGAAW (Chari et al., 2015), de la Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. Cada sgRNA tiene 20 pares de bases específicas para la secuencia del gen diana (Figura M6, letras en color azul), un nucleótido G que se ha confirmado aumenta la eficacia de la localización (en color rojo) y las secuencias complementarias generadas por la enzima de restricción para su inserción en el plásmido (dentro de recuadros).

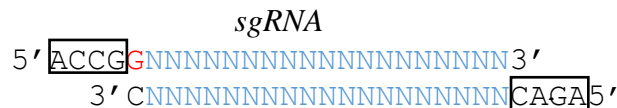


Figura. M6. Esquema del diseño de sgRNAs.

El *pool* de sgRNA se buscaron en 2000 pb dentro del primer exón del gen *Her2* (8.1. Secuencia de 2 kb del primer exón del gen *Her2*) y pueden localizarse tanto en la hebra sentido como

antisentido del gen. Están inmediatamente situados al lado de una secuencia PAM *NGG* y no se sobrelapan entre sí. Se utilizaron aquellos sgRNA que predecían un mayor nivel de eficacia según los parámetros de la herramienta en línea (Tabla M2). Adicionalmente las secuencias fueron buscadas en todo el genoma con el programa en línea BLASTn para descartar uniones inespecíficas. El valor de eficiencia está calculado según el número posible de *off targets* que pueda presentar el sgRNA, la posibilidad de formar estructuras secundarias, porcentaje de GC e impedimento estérico con reguladores de la transcripción.

Her 2 (ERBB2) receptor tyrosine kinase 2 [<i>Homo sapiens</i> (human)]					
NGG (<i>S. pyogenes</i>) CRISPR multicolor					
#	Secuencia diana	sgRNA	Cadena	GC (%)	Eficiencia
1	ATTGAAGTACCACCTCCCGAGGG	Phos5' -ACCGGATTGAAGTACCACCTCCCGA-3' 3' -CTAACTTCATGGTGGAGGGCTCAGA-5' Phos	+	57	0.70
2	AGGGACATAGCCCTCTGAAGCGG	Phos5' -ACCGGAGGGACATAGCCCTCTGAAG-3' 3' -CTCCCTGTATCGGGAGACTTCCAGA-5' Phos	-	61	0.66
3	CAAAGGTCTACCCCGCATGGGG	Phos5' -ACCGGCAAAGGTCTACCCCGCATG-3' 3' -CGTTTCCAAGATGGGGCGTACCAGA-5' Phos	-	61	0.67

Tabla M2. Diseño de sgRNAs para el primer exón del *Her2*.

En la figura M7, se muestra el modo en el que el sgRNA reconoce la secuencia diana, tanto en la hebra sentido como la antisentido. Además de posición adyacente de la secuencia PAM *NGG* y la secuencia del sgRNA junto con las características mencionadas anteriormente, sobre la secuencia de los sgRNAs.

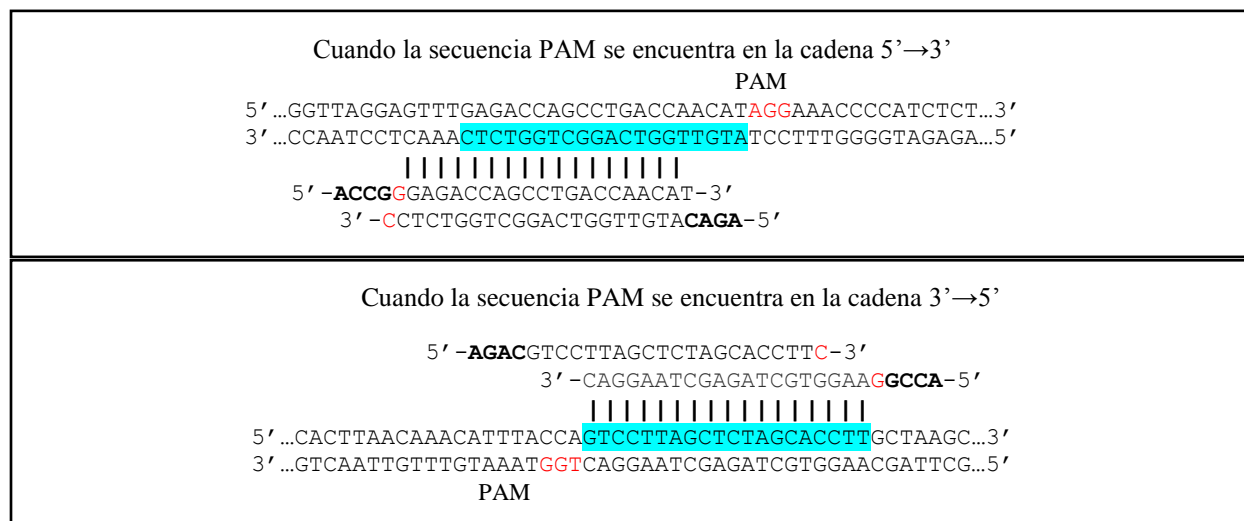


Figura M7. Reconocimiento de los sgRNA en la secuencia diana. En rojo se indica la secuencia PAM, en azul se la secuencia diana, El sgRNA puede reconocer secuencias tanto en cadena sentido como anti-sentido.

6.9. Clonación de sgRNAs dentro de plásmidos CRISPR

Los sgRNAs complementarios se hibridaron para generar fragmentos de doble cadena listos para el clonaje. Para ello, se preparó una reacción con y 1 μ l de cada oligo (100 μ M) y 8 μ l de ddH₂O. Se coloca la reacción en un termociclador a 37 °C, 5 min; 95°C, 5 min; 25 °C a 5 °C min⁻¹.

Después se realiza la reacción de clonación con condiciones distintas. Primero, en 3 tubos de PCR se mezclaron 150 ng del vector digerido y purificado de la agarosa, 1, 2 y 5.8 μ l de los oligos alineados y fosforilados, respectivamente, 2.4 μ l de 5X Ligase Reaction Buffer, 1 μ l de T4 DNA Ligase y ddH₂O hasta los 12 μ l. Se incubó la reacción a 37 °C *overnight*.

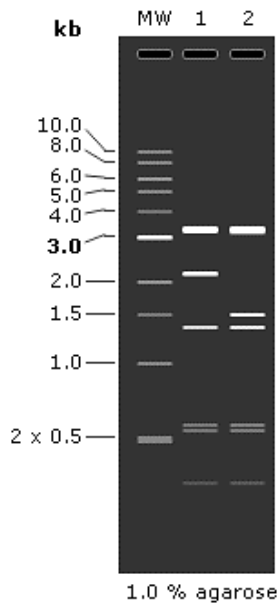


Figura M8. Patrón de bandeo esperado tras la restricción con HindIII de las clonaciones. El carril uno es el fragmento lineal de 7621 pb y el carril dos un plásmido recircularizado por la ligación del sgRNA. Generado con SnapGene

Al día siguiente, con 5 μ l de la reacción de cada clonación se transformaron bacterias competentes *E. coli* Stb12, las cuales son sensibles a la toxina *cccb* (Tabla M1), lo cual representa un sistema de contra selección que nos permite eliminar falsos positivos. Las colonias que crecieron fueron aisladas y se realizaron minipreps de cada una de ellas. Los plásmidos obtenidos se cortaron con la enzima de restricción HindIII, esto porque la clonación del sgRNA genera un patrón de bandeo distinto que el fragmento de 7621 pb (Figura M8 Carril uno, fragmento de 7621 pb linealizado; carril dos, clonación). Los plásmidos que generaron un patrón de bandeo esperado (que sí hubiera incorporación del sgRNA) se secuenciaron con los primers hU6 y LKO.1 5' para confirmar la clonación (Ver Anexo 8.2).

6.10. Cultivo de líneas celulares de cáncer de mama

Las líneas celulares de cáncer de mama fueron donadas por el Programa Institucional para el Estudio del Cáncer de Mama del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Después de su descongelación, son cultivadas en medio RPMI suplementado al 10% con suero fetal bovino y antibióticos 1 mg/ml Se mantienen a 37 °C con una atmosfera saturante de CO₂ al 5%, el medio de crecimiento se remplazó cada 2 o 3 días.

Las líneas celulares utilizadas son modelos de estudio para la amplificación positiva o negativa del gen *Her2* se enlistan en la siguiente tabla (Tabla M3).

Línea celular	Medio de cultivo	Amplificación de HER2
MCF-7	RPMI con SFB 10%, Pen-Strep 1%	Positiva
SKBR3	RPMI con SFB 10%, Pen-Strep 1%	Negativa

Tabla M3. Líneas celulares de cáncer de mama.

Las líneas celulares se probaron para la contaminación con Mycoplasma. Las líneas celulares que estaban contaminadas fueron tratadas con antibióticos BIOMYCTTM-1 & BIOMYCTTM-2 según las instrucciones del fabricante hasta su descontaminación.

6.11. Transfección de plásmidos CRISPR a líneas celulares de cáncer de mama.

6.11.1. Placas Petri

Los primeros ensayos de microscopia se probaron sobre la línea celular MCF-7 en cajas Petri de 35 mm en las que se realiza un agujero de 1 cm de diámetro con una broca y después se pegaba un cubreobjetos de 22 x 22mm con silicón. El silicón se deja secar durante toda la noche y al día siguiente se esterilizan las cajas sumergiéndolas en solución de cloro 5%, se dejan secar durante unos minutos y después dentro de una campana de flujo laminar se sumergen en agua estéril para lavar el exceso de cloro e inmediatamente son sumergidas por pocos segundos en etanol 75%, después se dejan secar durante tres horas en la campana y expuestas a luz UV. Después las cajas son tratadas con 300µl de solución Poli-L-lisina 0.1 % (w/v) en H₂O SIGMA® durante 5 minutos

y después se lavan con 1 ml de H₂O estéril y se retira el agua por aspiración, las cajas se dejan secar en la campana de flujo laminar antes de ser utilizadas inmediatamente o guardadas a 4 °C hasta su uso.

También se utilizaron cajas Petri de 35 mm con un cubreobjetos de 22x22mm tratados para la favorecer la adhesión celular con 500 µl de fibronectina de plasma humano 100 ng/µl (Sigma-Aldrich®), después se retira el exceso de fibronectina y se deja secar durante 1 hora. Las cajas Petri pueden ser utilizadas inmediatamente o guardadas a 4 °C hasta su uso. Para microscopia confocal se utilizaron placas estériles con fondo de vidrio de 12 mm WillCo-dish que fueron tratadas con fibronectina.

6.11.2. Número inicial de células para los ensayos de transfección

Para cada ensayo de transfección, 24 horas antes se cultivan células para tener entre el 50 y 80% de confluencia celular al momento de la transfección y que 48 horas después no sobrepasen el 90% de confluencia. El número inicial de células MCF-7 utilizadas se ensayó con 2×10^5 y 2.5×10^5 células MCF7. En el caso de la línea celular SkBR3 se ensayó 2.5×10^5 y 3×10^5 células. Las células fueron contadas utilizando cámara de Neubauer.

6.11.3. Transfección

En todos los ensayos de transfección los plásmidos se transfectan en una proporción 1:5 entre el plásmido pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls y los plásmidos vectores de sgRNA. Se realizaron ensayos de estandarización de transfección con tres reactivos de transfección distintos.

El primero es Lipofectamine® 2000 y Lipofectamine® LTX with Plus™ Reagent (Invitrogen). Con el fin de identificar las mejores condiciones de transfección, se probaron 4 concentraciones distintas de lipofectamina. Para cada condición de transfección, se preparan dos tubos de microcentrífuga con 50 µl de Gibco® Opti-MEM I Media. En 4 de los tubos se agrega un total 2.0 µg de un plásmido clonados con los sgRNAs y 500 ng del plásmido pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls por cada tubo. En el caso de Lipofectamine® LTX, se agrega 2.5, 5.0, 7.5 y 14µl del Plus Reagent a los tubos con los plásmidos, respectivamente. En los otros tubos se agregan 2.5, 5.0, 7.5 o 10µl de lipofectamina según la condición a probar, y se incuban durante 5 minutos a

temperatura ambiente. Después, se añaden los plásmidos diluidos en Opti-MEM a cada tubo conteniendo lipofectamina. La mezcla de lipofectamina y plásmidos se incuba durante 40 minutos a temperatura ambiente. Minutos antes de que termine esta incubación, se retira el medio de las cajas Petri que contienen las células y se lavan con RPMI 1640.

Para Lipofectamine® 2000, posterior al tiempo de incubación al tubo se agregan 400 µl de medio completo a cada tubo, y se transfiere esta mezcla a las cajas Petri con las células. Se mantienen a 37 °C y CO₂ al 5%. Cinco horas después, se añade 1.5 ml de medio completo a cada caja. Al día siguiente, se cambia el medio de las cajas por 2 ml de medio RPMI completo. Las células se incuban 24 horas más., periodo tras el cual se considera que la transfección alcanza su máximo. En el caso de Lipofectamine® LTX, después de lavar las cajas con las células se agrega 1 ml de medio suplementado y a los tubos con los complejos de transfección se agrega 900 µl de medio suplementado y después se transfiere a las cajas Petri. No es necesario cambiar el medio, 48 horas después son observadas al microscopio.

El otro reactivo de transfección utilizado fue TransIT-2020® (Mirus). A fin de estandarizar las condiciones con este reactivo, se probaron 4 condiciones distintas. Para cada condición, se mezclan 100 µl de Gibco® Opti-MEM I Media, 2 µg del plásmido con los sgRNAs, (individualmente o en *pool*) y 500 ng del plásmido pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls. A la mezcla se le añade con 2.5, 5.0, 7.5 y 10µl de reactivo de transfección TransIT 2020® y se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente. Posterior al tiempo de incubación, se renueva el medio de las placas Petri con las células, y se agrega la mezcla de transfección. Las células se mantienen a 37 °C y CO₂ al 5% durante 48 horas.

El tercer reactivo es Bio-T (Bioland Scientific). Para su uso, se coloca en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, 100 µl de medio RPMI 1640 sin suplementar. A continuación, se agrega el *pool* de plásmidos vector de sgRNA y del plásmido pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls en una relación 1:1.5 con el reactivo que se agrega inmediatamente. Las concentraciones se resumen en la tabla M3. Los complejos se dejan incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente se cambia el medio de las placas con medio completo y se agrega la mezcla de transfección. Las células se mantienen a 37 °C y 5% de CO₂, durante 48 horas, periodo tras el cual se considera que la transfección alcanza su máxima eficacia.

	1	2	3	4
DNA	1 µg	2 µg	3 µg	4 µg
Bio-T	1.5 µl	3 µl	4.5 µl	6 µl
sgRNA 1	0.21 µg	0.42 µg	0.63 µg	0.84 µg
sgRNA 2	0.21 µg	0.42 µg	0.63 µg	0.84 µg
sgRNA 3	0.21 µg	0.42 µg	0.63 µg	0.84 µg
Phage-dCas9-GFP	0.17 µg	0.34 µg	0.51 µg	0.68 µg

Tabla M4. **Concentración de plásmidos y reactivos para transfección con BioT (Bioland Scientific).**

6.12. Microscopia

Para contrastar el DNA, las células transfectadas fueron tratadas con el reactivo de tinción de núcleos Red Dot1™ (Biotium)., Para ello, se aspira el medio de las placas y se agrega 1 ml de solución Red Dot1™ 1X en cada caja. Se incuban durante 15 minutos a 37 °C, CO₂ al 5%, periodo tras el cual las células están listas para ser observadas al microscopio.

Las células utilizadas para la estandarización de las transfecciones con los distintos reactivos fueron observadas por microscopia de fluorescencia en un microscopio invertido Olympus BX51 recogiendo imágenes en el campo claro y canal verde ocupando una lampara de mercurio.

Las células utilizadas para reconstrucción tridimensional de los núcleos fueron cultivadas en placas Petri de 35 mm con fondo de vidrio de 12 mm, y fueron observadas en el microscopio confocal Nikon A1R+ STORM en la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas. La proteína GFP es excitada a 488 nm, y su emisión es detectada a 512/23 nm, mientras que el Red Dot1™ es un colorante que se excita con el láser de 540 nm y emite en el espectro del rojo lejano.

6.13. Análisis de imágenes

Los canales de las imágenes tomadas con el microscopio Olympus BX51 fueron separados en el paquete de procesamiento de imágenes de código abierto basado en ImageJ, FIJI. Las imágenes adquiridas con el microscopio Confocal Nikon A1R+STORM, el ajuste del color, brillo y contraste de cada canal (verde y azul), proyecciones en el eje z, reconstrucción tridimensional y mediciones entre las señales, la periferia nuclear y el centro de los núcleos fueron realizados con el software NIS-Elements Advanced Research. En la vista en la que se desplazaba mínimamente del eje de

rotación y la señal se encontraba lo más alejada del centro del núcleo se consideró la fuente ortogonal óptima del núcleo. Las distancias fueron normalizadas al tamaño de cada núcleo para buscar distancias comunes de localización de la señal con referencia al centro del núcleo y a la periferia nuclear.

6.14. Extracción de RNA total con Reagent® Trizol

En una caja Petri 3 mm se dejan crecer células hasta un 85% de confluencia celular. Después se remueve el medio de la caja y se añade 1 ml de TRIzol™ (Invitrogen) por cada caja Petri de 3 mm. Se lisan las células por pipeteo y después se transfiere en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se incuba el lisado de células durante 5 minutos a temperatura ambiente y se añaden 200 µl de cloroformo. La mezcla se realiza en vortex durante 15 segundos, y tras incubar 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifuga a 12 000 x g a 4 °C durante 15 minutos. En este punto la mezcla se separa en tres fases: una fase inferior color rojo fenol-cloroformo, una interfase con mayor proporción de proteínas, y una fase acuosa superior incolora en la cual se encuentra el RNA. Se recupera la fase acuosa en un nuevo tubo de microcentrífuga, se añaden 500 µl de isopropanol 100 % y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifuga a 12 000 x g a 4 °C durante 10 minutos, se desecha el sobrenadante con precaución de no perder el precipitado de RNA, y se lava con 1 ml de etanol al 75%. Se centrifuga a 7 500 x g a 4 °C durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y se permite secar el precipitado durante 10 minutos. Por último, se resuspende el RNA en 30 µl de agua libre de RNasa y se almacena a -20 °C. Las concentraciones de RNA fueron medidas en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 de Thermo Fisher Scientific.

6.15. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA a partir del RNA extraído de las líneas celulares de cáncer de mama fueron realizadas en una reacción de retrotranscripción con un volumen de 10 µl con el kit iScript™ cDNA kit de BioRad (Cat. 1708890) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, primero se mezclan 2 µl de 5x iSCRIPT Advance Reaction Mix, 1 µg de RNA total, 0.5 µl iSCRIPT Advance Reverse Transcriptasa y 6.5 µl de agua estéril. Se lleva a cabo la síntesis de cDNA en un termociclador durante 20 minutos a 46 °C y se detiene la reacción con 1 minuto a 95

°C. El *cDNA* generado puede ser utilizado inmediatamente para llevar a cabo la reacción de qPCR o puede almacenarse a -20 °C hasta su uso.

6.16. qPCR o PCR en tiempo Real

qPCR se realiza en el equipo Applied Biosystems® 7500 utilizando SYBR Green de Kappa® Biosystems. Las condiciones de reacción son: desnaturalización, 94 °C por 5 minutos, seguido por 44 ciclos de desnaturalización de 94 °C por 35 segundos, alineamiento a 60 °C (para HER2) o 59 °C (para GAPDH o β -actina) por 30 segundos y finalmente, extensión a 72 °C por 35 segundos. Los ciclos son seguidos por un último paso de extensión a 72 °C por 8 minutos, y las curvas melting son determinadas desde 70 °C hasta 90 °C. La intensidad de fluorescencia es obtenida después de terminar cada ciclo de extensión. Los datos son expresados como el número de ciclos “threshold” (Ct), el número de ciclo PCR en el que la señal fluorescente en cada reacción alcanza un umbral preestablecido por encima del fondo. Se crea una curva melting usando el programa de curvas melting incorporado para confirmar la presencia de un solo producto de PCR. El mRNA de GAPDH y β -actina se utiliza como un control interno para cada muestra. Los primers utilizados para la qPCRs se muestran en la Tabla M5. La cuantificación del mRNA se realizó utilizando el método de $\Delta\Delta Ct$.

Gen	Secuencia	Referencia
Her-2	F: 5' -ACCGGCACAGACATGAAGCT-3' R: 5' -AGGAAGGACAGGCTGGCATT-3'	(Qian et al., 2016)
GAPDH	F: 5' -GCCGGTGCTGAGTATGTC-3' R: 5' -CTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'	(Chen et al., 2014)
β-actina.	F: 5' -GCCGGTGCTGAGTATGTC-3' R: 5' -CTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'	(Chen et al., 2014)

Tabla M5: Primers utilizados para la PCR's en tiempo real.

7. Resultados

7.1 El clonaje de los sgRNAs en pLH-stgRNA3.1 es eficaz para los tres sgRNAs diseñados.

Los plásmidos necesarios para el sistema de CRISPR Rainbow y Multicolor fueron obtenidos de Addgene, y se recuperaron de los filtros mediante transformación en bacterias *E. coli* XL-Blue competentes. El plásmido orientado al clonaje de los sgRNAs del sistema CRISPRainbow no pudo ser obtenido por la transformación de la cepa de *E. coli* XL1-Blue, y se procedió a intentar la transformación en la cepa *E. coli* DB 3.1, la cual tampoco resultó ser exitosa.

Para el resto de los plásmidos recuperados, se realizaron minipreps utilizando el método de la lisis alcalina, por triplicado. Las concentraciones obtenidas y las relaciones entre las absorbancias 260 y 280 muestran, primero cantidad de plásmido alta y segundo, un valor de pureza adecuado en relación con la absorbancia de proteínas y valores elevados de la relación 260/230, sin embargo, no interfieren con los siguientes ensayos (Tabla R1). La visualización de los plásmidos obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa 1% confirmó la integridad (Figura R1).

#	Plásmido	Concentración	A260	A280	260/280	260/230
1	pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls	3676.415	73.527	37.686	1.95	2.48
2	pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls	3984.38	79.235	41.797	1.9	2.48
3	pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls	3937.07	78.934	41.644	1.9	2.51
4	pLH-stsgRNA3.1	4067.785	81.194	42.475	1.91	2.5
5	pLH-stsgRNA3.1	4045.735	80.714	42.366	1.91	2.48
6	pLH-stsgRNA3.1	4117.9	82.03	43.512	1.89	2.48
7	pHAGE-EFS-PCP-3XGFPnls	2556.595	51.115	25.833	1.98	2.58
8	pHAGE-EFS-PCP-3XGFPnls	3692.095	72.104	37.249	1.94	2.53
9	pHAGE-EFS-PCP-3XGFPnls	3989.135	79.697	41.885	1.9	2.47
10	pHAGE-TO-dCas9	3034.315	61.691	31.523	1.96	2.58
11	pHAGE-TO-dCas9	4408.145	89.316	48.753	1.83	2.35
12	pHAGE-TO-dCas9	3879.205	77.709	41.125	1.89	2.48

Tabla R1. Concentraciones de los plásmidos obtenidos y su pureza medidos por Nanodrop

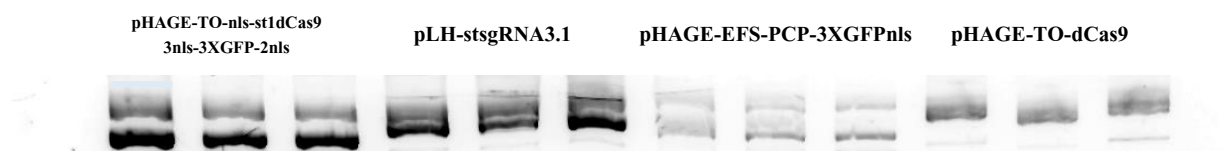


Figura R1. Electroforesis en gel de agarosa de Miniprep de plásmidos del sistema CRISPR que confirma la integridad de los plásmidos

Para comprobar la identidad de los plásmidos se realizaron ensayos de restricción, Para el plásmido pLH-stsgRNA3.1 se seleccionaron las enzimas EcoRI y ClaI; para pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls las enzimas EcorI y BamHI; para pHAGE-EFS-PCP-3XGFPnls se utilizaron BamHI y ClaI y por último, para pHAGE-TO-dCas9 se utilizó EcorI y BamHI. (Figura R2). Cada banda coincide con el tamaño de banda esperado que se generó por la herramienta NEB Cutter (ver métodos, Figura M3).

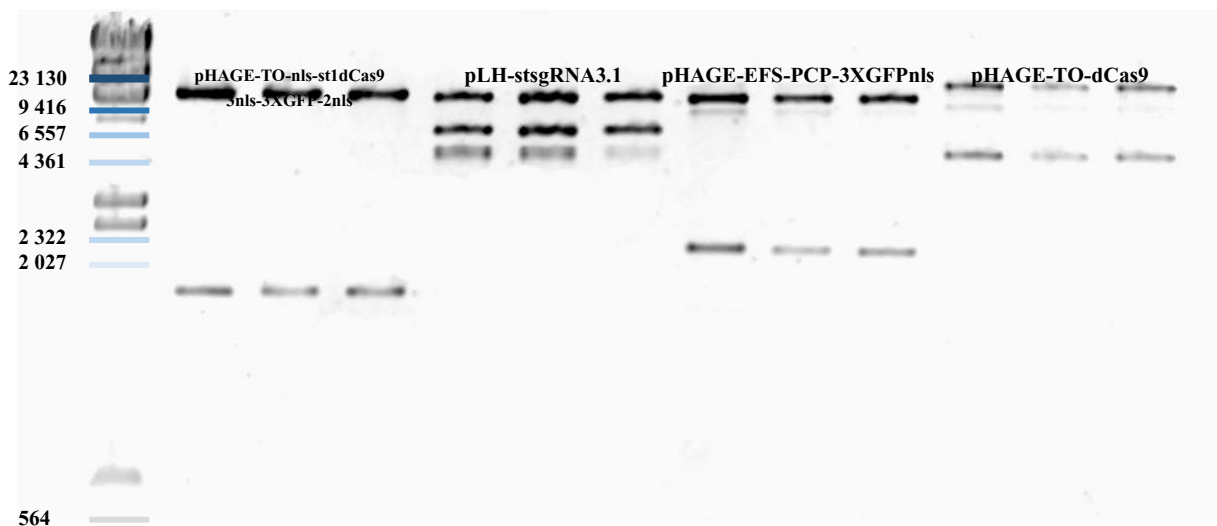


Figura R2. Ensayo de restricción. Electroforesis en gel de agarosa de DNA plasmídico digeridos con enzimas de restricción.

Después de comprobar la identidad de cada plásmido se realizaron midiprep o maxiprep del cada cultivo cuya banda en la electroforesis fue más intensa (muestras 1, 5, 7 y 10). En un primer ensayo, la midiprep de plásmido pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls tuvo una concentración muy baja en comparación con los otros plásmidos así que se realizó una maxiprep para obtener mayor concentración (Tabla R2 y Figura R3).

#	Plásmido	ng/μl	A260	A280	260/280
1	pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls	30.79	0.616	0.3363	1.853
2	pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls	45.725	0.914	0.4895	1.87
3	pLH-stsgRNA3.1	1538.215	30.764	16.304	1.885
4	pHAGE-EFS-PCP-3XGFPnls	3339.705	66.794	36.2825	1.84
5	pHAGE-TO-dCas9	530.23	10.60433333	5.789	1.83

Tabla R2. Cuantificación de plásmidos obtenidos por Maxiprep y Midiprep.

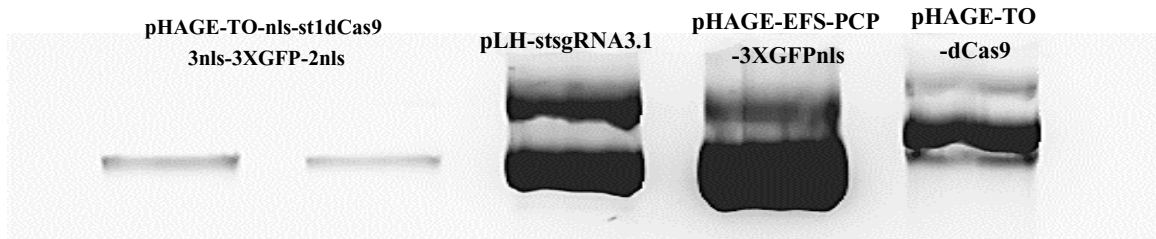


Figura R3. Electroforesis en gel de agarosa de *DNA* plasmídicos obtenidos por Maxiprep y Midiprep.

Después de obtener los plásmidos y comprobar su integridad se obtuvo el fragmento del plásmido pLH-stsgRNA3.1 que se necesita para clonar los sgRNAs. La figura R4, muestra la restricción del plásmido pLH-stsgRNA3.1 con la enzima BbsI, para generar dos fragmentos, uno de 7621 pb y otro de 669 pb. El primer fragmento fue purificado del gel de agarosa y posteriormente cuantificado en el Nano-Drop, la concentración obtenida fue de 70.23 ng/μl y la relación 260/280 fue de 1.82, indicada para realizar la ligación de los 3 sgRNAs distintos.

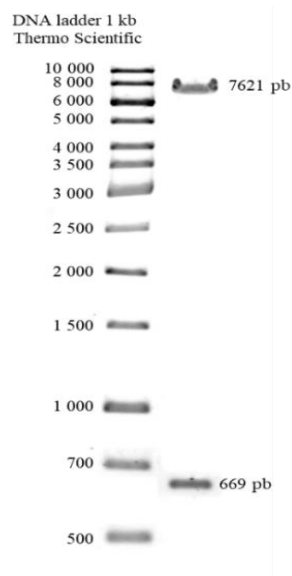


Figura R4. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pLH stsgRNA 3.1 con la enzima BbsI. Se indican la banda de 7621 pb que es posteriormente purificada y la banda de 669 pb, ambas producto de la digestión de BbsI.

Después de realizada la clonación, se transformaron bacterias competentes XL- Blue con la reacción de clonación. Las colonias resultantes se volvieron a sembrar y una fracción de ellas fue utilizada para realizar minipreps. Las colonias que contenían el plásmido con algún sgRNA

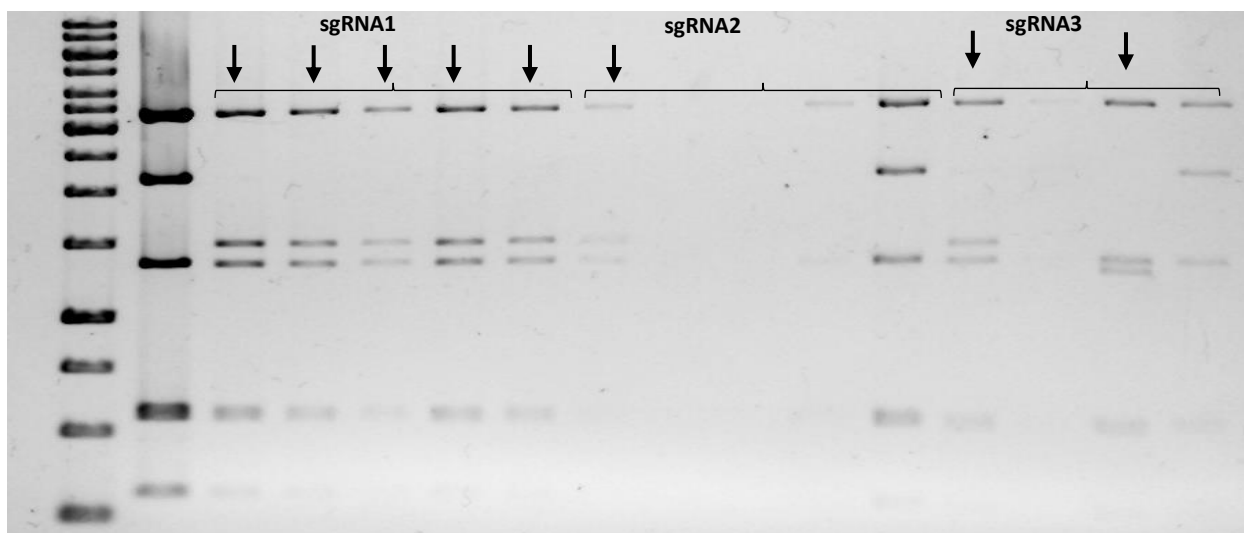


Figura R5. Restricción de plásmidos obtenidos de colonias transformadas con sgRNAs. Los primeros 5 carriles corresponden a colonias del primer par de sgRNAs, 5 siguientes para el segundo par de sgRNAs y 4 últimos para el tercer par de sgRNAs. Los carriles señalados con una flecha indican el patrón de bandeo esperado (Ver figura M8).

generaron un patrón de bandeo esperado cuando fue cortado con la enzima HindIII, a diferencia de aquellas colonias que no lo tenía en su genoma, esto debido a la circularización del plásmido (Figura R5).

Los plásmidos que generaron un patrón de bandeo correspondiente al de la correcta clonación fueron secuenciados para confirmar la inserción del sgRNA con los primers hU6 y LKO'1.5. Por este método se pudo obtener la clonación de los 3 sgRNAs específicos de HER.

7.2. La expresión del transcrito de HER2 corresponde a cada subtipo de línea celular

Con el objetivo de caracterizar la expresión de HER2 en las líneas celulares de cáncer de mama, se procedió a extraer RNA total y realizar ensayos de PCR en tiempo real. Para ello, primero se seleccionaron 4 líneas celulares de cáncer de mama donadas por el Programa de Cáncer de Mama del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, consistentes en las líneas MCF7, T47D, SKBR3 y BT474. . En el caso de MCF-7 y T47D, son negativas para amplificación de HER2, por el contrario, SKBr3 y BT 474 son líneas celulares derivadas de cánceres impulsados por la amplificación del gen HER2. La tabla R3 resume las concentraciones de RNA obtenido en cada línea celular, y las relaciones de pureza obtenidas.

#	Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
1	MCF7	542.79	10.856	5.624	1.93	1.97
2	MCF7	546.25	10.925	5.646	1.94	2.08
3	T47D	110.24	2.756	1.439	1.92	1.7
4	T47D	145.58	3.639	1.925	1.89	2.43
5	SKBr3	240.01	4.8	2.489	1.93	1.12
6	SKBr3	156.67	3.131	1.623	1.93	0.97
7	BT 474	222.03	4.441	2.398	1.85	0.76
8	BT 474	344.61	6.892	3.633	1.9	0.95

Tabla R3. Concentraciones de RNA y relaciones de pureza de 4 líneas celulares de mama distintas.

Como es de esperarse, la línea celular T47D, también negativa para la expresión de HER2, no muestra cambios significativos para la expresión de HER2 con respecto a MCF-7 (Figura R6). En cambio, las líneas celulares SKBr3 y BT 474, muestran altos niveles de expresión del mensajero de Her2. Las diferencias entre la sobre expresión de HER2 en SKBr3 y BT 474 concuerdan con otros trabajos que han descrito la expresión de HER2 en estas líneas celulares (Vicario R *et al.*2015). En base a estos resultados, se decidió proseguir nuestro estudio en las líneas celulares MCF7, como modelo de HER2-, y SKBR3 para HER2+, puesto que estas presentan resultados de expresión acorde a lo esperado y las condiciones de cultivo nos resultaron más adecuadas. Además, los cambios esperados en SKBR3 en la amplificación y localización de HER2 podrían ser más sutiles que en BT 474. Por ello, si logramos encontrar diferencias significativas en la localización intranuclear y amplificación de HER2 entre las líneas MCF7 y SKBR3 podría ser indicativo de la eficiencia de la técnica con mayor confianza que si eligiésemos como modelo de HER2+ para nuestro estudio a BT 474.

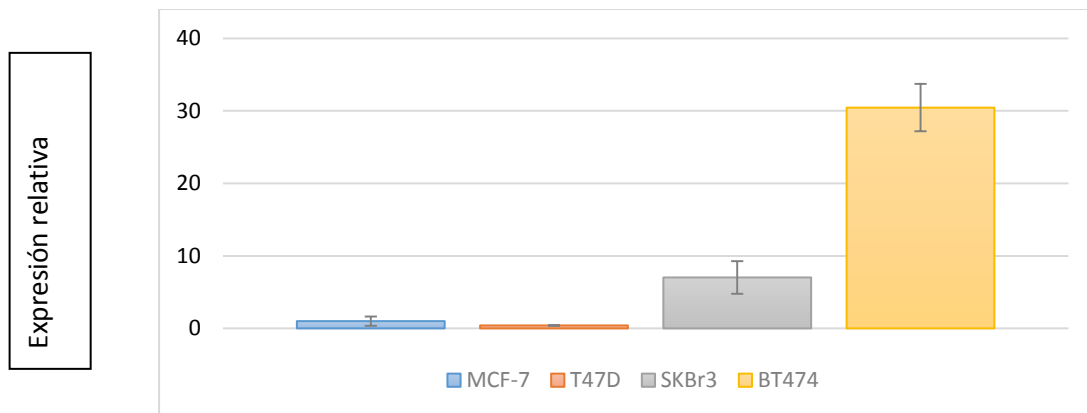


Figura R6. **Análisis de la expresión de Her2 en 4 líneas celulares de cáncer de mama.** Se realizó un análisis cuantitativo por medio de PCR en tiempo real para la expresión del gen HER2 en las líneas celulares indicadas. La expresión en las células MCF7 se tomó como 1 y se utilizó como valor de referencia. La expresión de HER2 se normalizó para los genes de Actina y de GAPDH, se muestra la expresión media \pm error estándar de dos replicados biológicos y tres técnicos. Se presenta el análisis estadístico mediante t-test de dos colas; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)

7.3. Los ensayos de transfección muestran elevada variabilidad entre los distintos agentes de transfección

Con el fin de encontrar unas condiciones en las cuales podamos analizar de manera efectiva la localización intracelular del gen HER2 con el sistema CRISPR-dCas9, se procedió a estandarizar y evaluar distintos métodos de transfección para las dos líneas. Es sabido que la eficiencia de transfección varía según el tipo celular, las condiciones del cultivo, el agente de transfección, la calidad y estructura de los plásmidos, así como la preparación de la mezcla de transfección. Para nuestros ensayos, nos aseguramos de tener líneas celulares libres de micoplasma, creciendo en óptimas condiciones con los medios de cultivo adecuados (ver sección métodos) y con pases menores a p10. Además, los plásmidos utilizados provienen de purificación por columna, por lo que su pureza está bien garantizada. Para optimizar los agentes de transfección para cada línea celular, se procedió a realizar distintos ensayos detallados en la sección métodos. Cuando utilizamos la línea celular MCF7, observamos que el agente más comúnmente utilizado, la lipofectamina 2000, tan sólo nos garantizaba una eficacia de transfección de ~10 % (Figura R7).

Además, se realizaron ensayos control transfectando únicamente los vectores pLH-stsgRNA 3.1 y pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls (Figura R8).

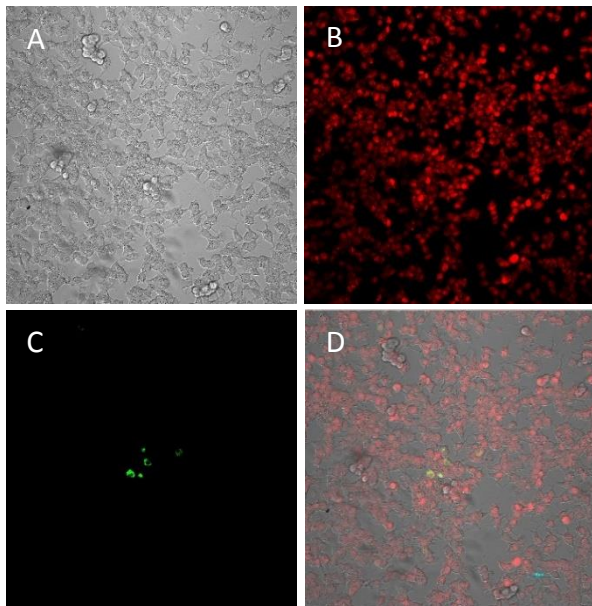


Figura R7. Microscopia de línea celular MCF-7 transfectadas con 4 µl de lipofectamina y 3 sgRNAs dirigidos contra Her2. La transfección con 4 µl de lipofectamina 2000 obtuvo una baja tasa de transfección menor al 10% . A. Campo claro. B. Canal Rojo, Tinción de núcleos con RedDot1. C. Canal verde, células transfectadas. D. Todos los canales. Aumento 20X. n= 3 replicados biológicos y 3 replicados técnicos.

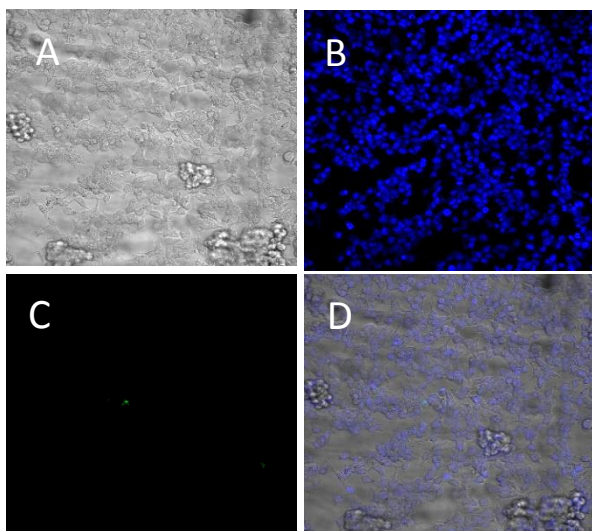


Figura R8. Microscopia de la línea celular MCF-7 transfectada con 6 µl de lipofectamina y plásmido vector sin sgRNAs clonados. Un conteo número de células muestra una débil señal de la proteína fluorescente verde. A. Campo claro. B. Canal Rojo, Tinción de núcleos con RedDot1. C. Canal verde, célula transfectada. D. Todos los canales. Aumento 20x. n= 3 replicados biológicos y 3 replicados técnicos.

Para mejorar la eficacia de transfección, se procedió a evaluar los tres agentes de transfección TransIT-2020 (Mirus®), Bio-T (Bioland Scientific) y Lipofectamine® LTX con Plus™ Reagent (Thermo Fisher Scientific) (Ver métodos, sección 6.11.3).

Primero se analizó la morfología que presentaba la línea celular MCF-7 tras las distintas transfecciones. Se observó un cambio en la morfología de las células dependiendo del reactivo de transfección utilizado (Figura R9). Las células que aparecieron menos afectadas tras la transfección fueron las tratadas con Bio-T, seguido por las células transfectadas con TransIT 2020

(Figura R9, c y b, respectivamente). Las células transfectadas con Lipofectamina LTX, presentan grandes cambios en la morfología y confluencia de las células en comparación con células no transfectadas, que consisten en cambios en la forma de la membrana nuclear, en lugar de ser esféricas y ovaladas son irregulares además de tener un menor tamaño, así como células en muerte celular. (Figura R9, d).

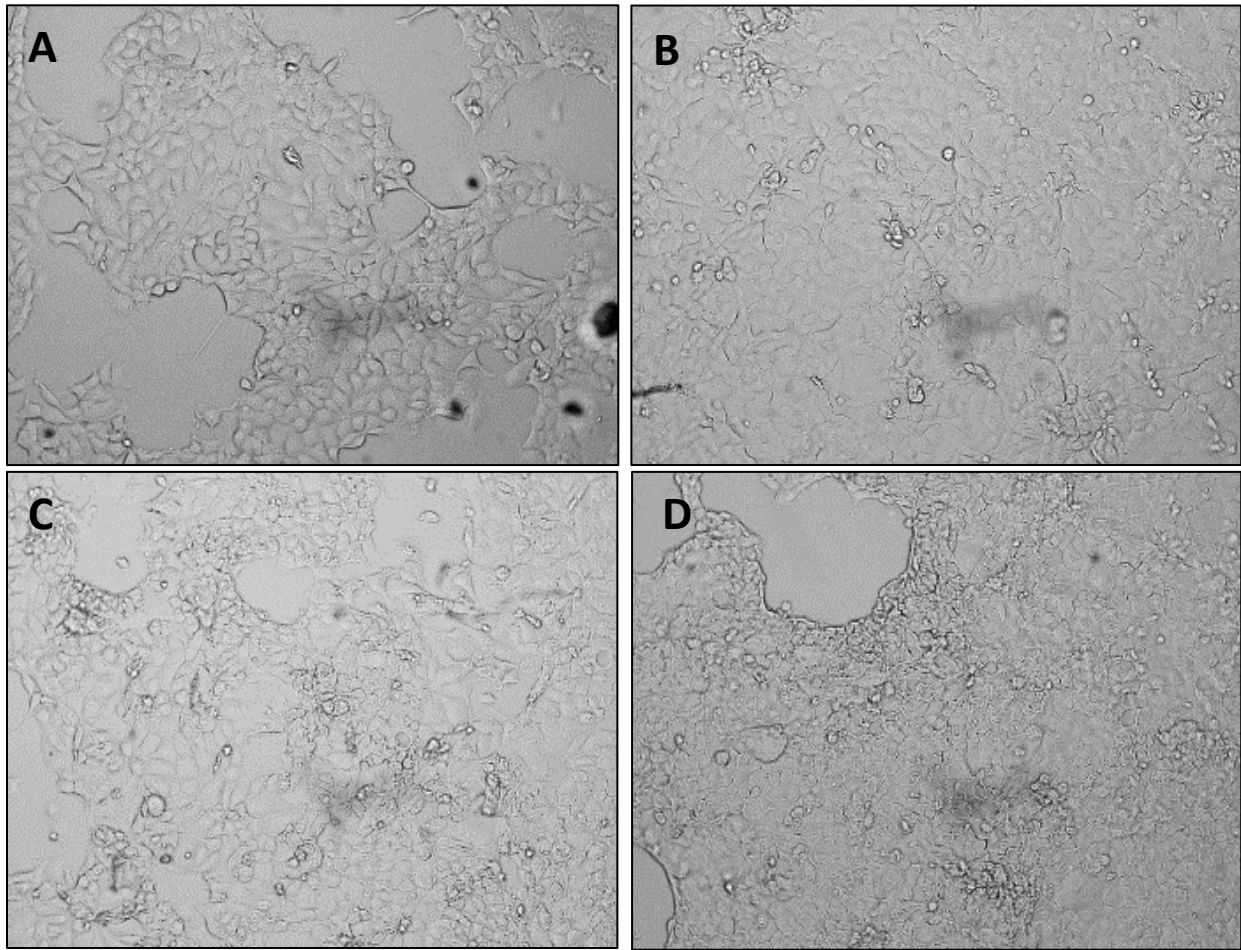


Figura R9. Morfología de la línea celular MCF-7 en células transfectadas con distintos reactivos de transfección. Todas las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos tratados con fibronectina dentro de una caja Petri de 35 mm. El número inicial para cada caja Petri fue de 2.5×10^5 células. Después de 24 horas de ser cultivadas fueron transfectadas y 48 horas después vistas al microscopio. a) células sin transfectar. b) células transfectadas con TransIT 2020. c) células transfectadas con Bio-T. d) células transfectadas con Lipofectamina LTX. Aumento 20X.

Se procedió a estandarizar las condiciones de transfección (Ver métodos, sección 6.11.3). Los resultados se muestran en las figuras R10, R11 y R12 para la línea celular MCF7..

Transfecciones con el reactivo TransIT-2020 en MCF-7

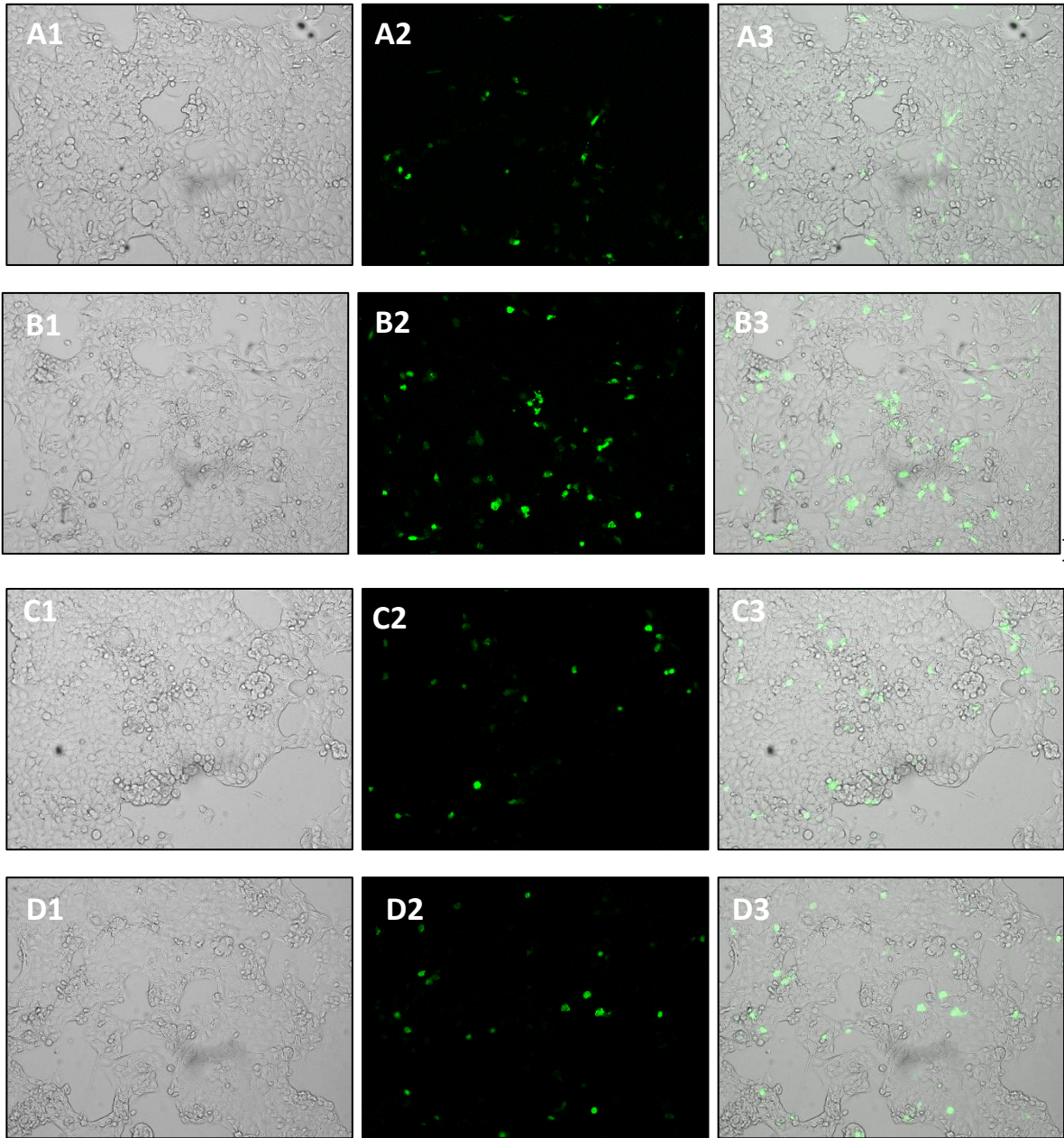


Figura R10. Transfección del sistema CRISPR multicolor en la línea celular MCF-7 con el reactivo TransIT-2020 en diferentes concentraciones. Todas las transfecciones se realizaron utilizando un total de 2.5 µg de plásmidos del sistema CRISPR Multicolor con un *pool* de 3 sgRNAs dirigidos contra el primer exón de HER2 y un plásmido que codifica para la proteína dCas9 fusionada a 3 GFP, en una relación 5:1, respectivamente. a). Condición 1: 2.5µl de reactivo de transfección. b) Condición 2: 5 µl de reactivo de transfección. c) Condición 3: 7.5 µl de reactivo de transfección. d) Condición 4: 10 µl de reactivo de transfección. Derecha: campo claro; centro: canal verde; izquierda: fusión de imágenes. Aumento 20X.

Transfecciones con el reactivo Bio-T en MCF-7

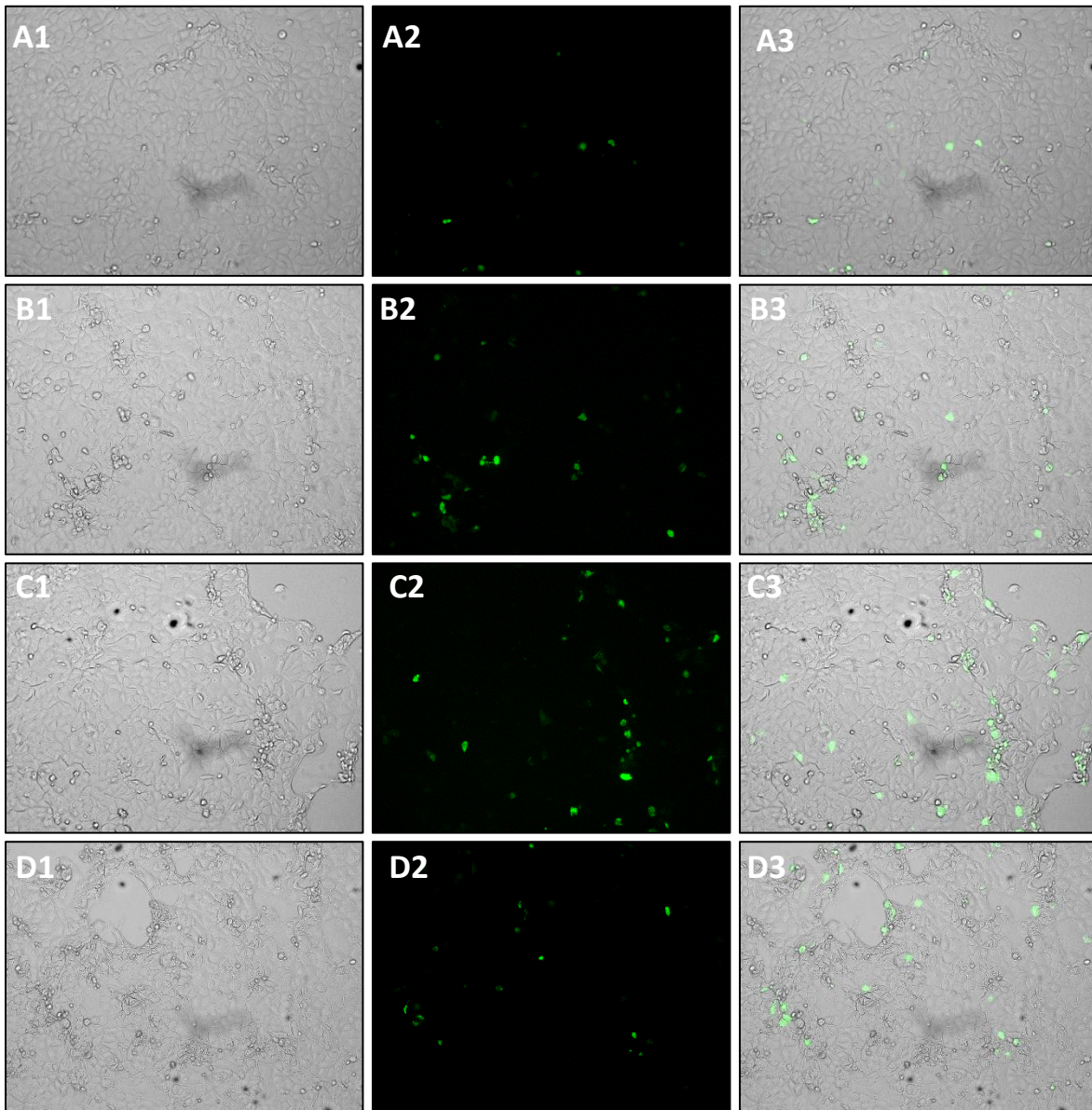


Figura R11. Transfección del sistema CRISPR multicolor en la línea celular MCF-7 con el reactivo Bio-T en diferentes concentraciones. Todas las transfecciones se realizaron utilizando de plásmidos del sistema CRISPR Multicolor con un *pool* de 3 sgRNAs dirigidos contra el primer exón de HER2 y un plásmido que codifica para la proteína dCas9 fusionada a 3 GFP, en una relación 5:1, respectivamente. El reactivo de transfección se utiliza en una proporción 1.5:1 con respecto a la concentración de plásmidos transfectados a) Condición 1: 1.0 µg de plásmidos y 1.5µl de reactivo de transfección. b) Condición 2: 2.0 µg de plásmidos y 3 µl de reactivo de transfección. c) Condición 3: 3.0 µg de plásmidos y 4.5 µl de reactivo de transfección. d) Condición 4: 3.0 µg de plásmidos y 6 µl de reactivo de transfección. Derecha: campo claro; centro: canal verde; izquierda: fusión de imágenes. Aumento 20X.

Transfecciones con el reactivo Lipofectamina® LTX con Plus Reagent en MCF-7

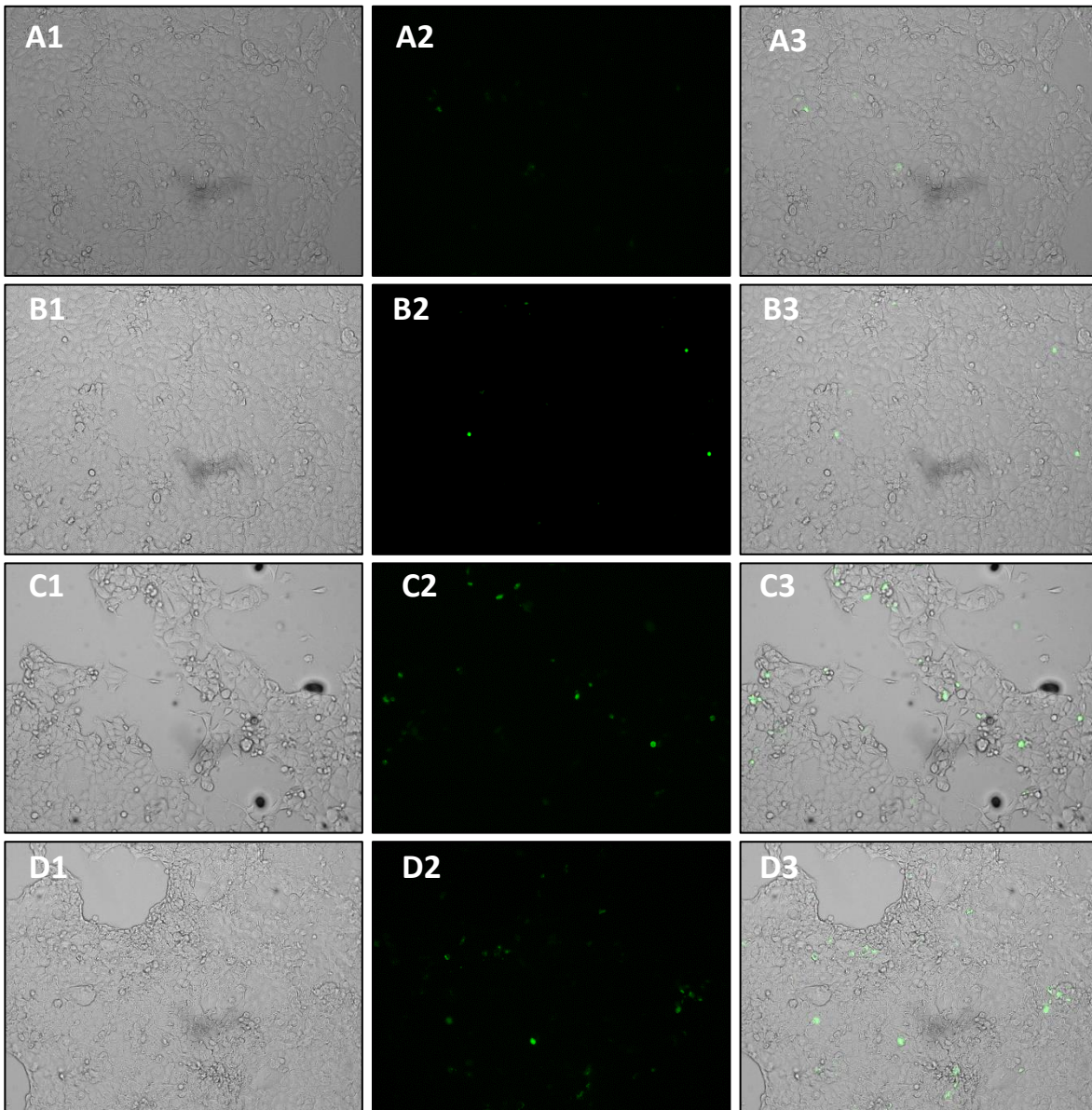


Figura R12. Transfección del sistema CRISPR multicolor en la línea celular MCF-7 con el reactivo Lipofectamine® LTX con Plus™ Reagent en diferentes concentraciones. Todas las transfecciones se realizaron utilizando un total de 2.5 µg de plásmidos del sistema CRISPR Multicolor con un *pool* de 3 sgrNAs dirigidos contra el primer exón de HER2 y un plásmido que codifica para la proteína dCas9 fusionada a 3 GFP, en una relación 5:1, respectivamente. a). Condición 1: 2.5µl de reactivo de transfección. b) Condición 2: 5 µl de reactivo de transfección. c) Condición 3: 7.5 µl de reactivo de transfección. d) Condición 4: 10 µl de reactivo de transfección. Derecha: campo claro; centro: canal verde; izquierda: fusión de imágenes. Aumento 20X.

En cuanto a la línea celular SKBr-3, los distintos agentes de transfección no afectan la morfología o la confluencia celular de los cultivos de forma dramática y visualmente detectable (Figura R13), contrariamente a lo que sucedió con MCF-7. Se procedió a estandarizar las condiciones de transfección (Ver métodos, sección 6.11.3).

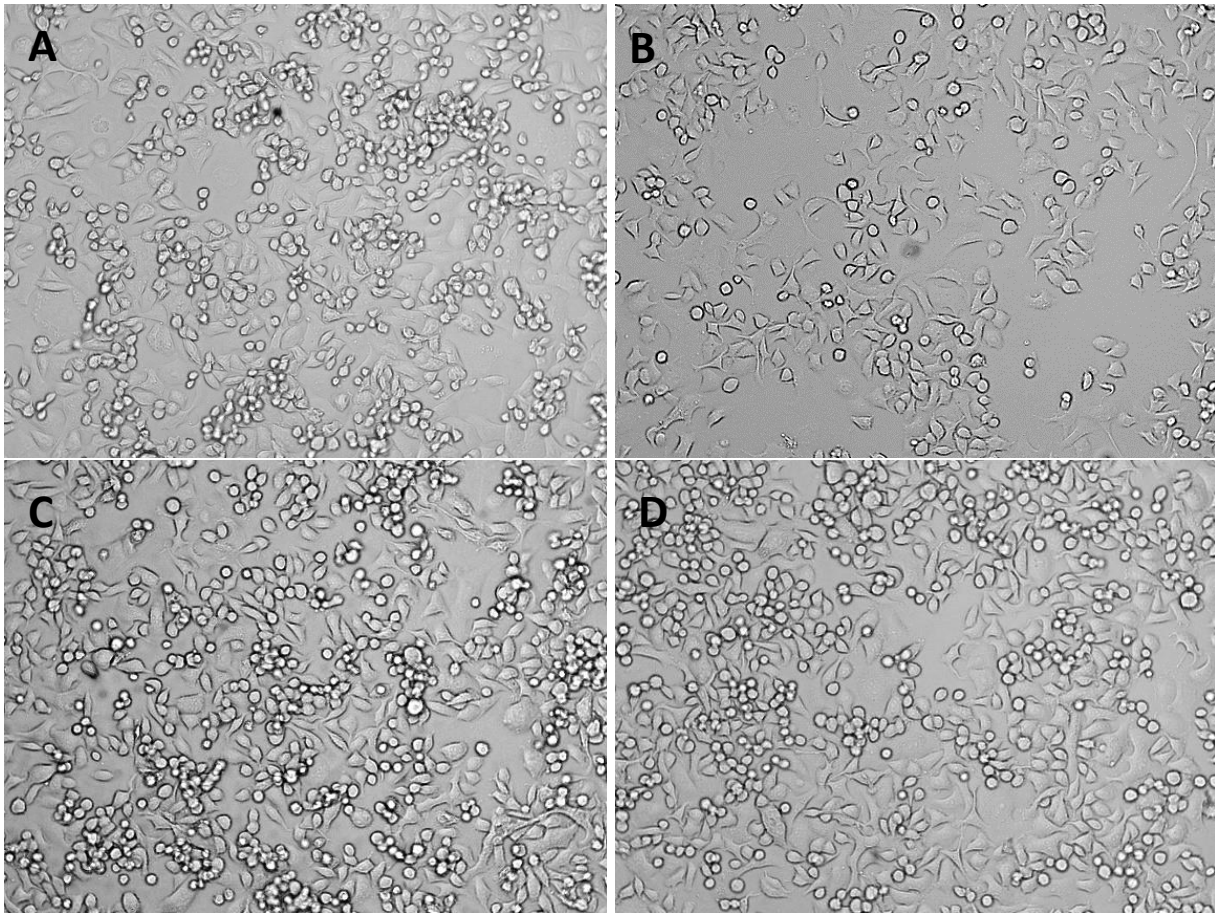


Figura R13. Morfología de la línea celular SKBr-3 en células transfectadas con distintos reactivos de transfección. Todas las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos tratados con fibronectina dentro de una caja Petri de 35 mm. El número inicial para cada caja Petri fue de 3.0×10^5 células. Después de 24 horas de ser cultivadas fueron transfectadas y 48 horas después vistas al microscopio. a) células sin transfectar. b) células transfectadas con TransIT 2020. c) células transfectadas con Bio-T. d) células transfectadas con Lipofectamina LTX. Aumento 20X.

Las figuras R14, 15, 16 muestran los resultados de las transfecciones en la línea SKBr-3 en 4 condiciones distintas de concentración de reactivos de transfección y/o plásmidos.

Transfecciones con el reactivo TransIT-2020 en SKBr-3

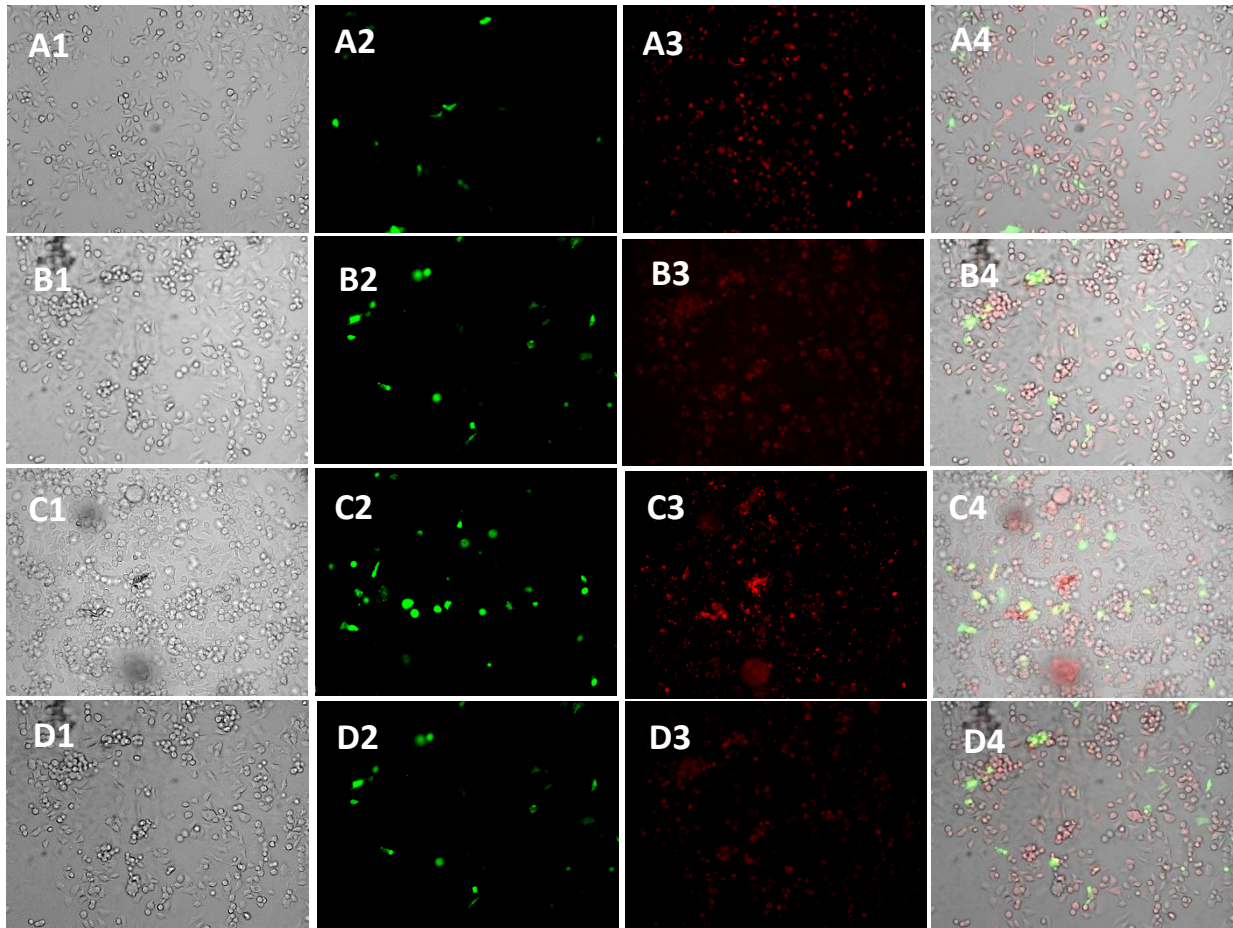


Figura R14. Transfección del sistema CRISPR multicolor en la línea celular SKBr-3 con el reactivo TransIT-2020 de Mirus® en diferentes concentraciones. Todas las transfecciones se realizaron utilizando un total de 2.5 µg de plásmidos del sistema CRISPR Multicolor con un *pool* de 3 sgRNAs dirigidos contra el primer exón de HER2 y un plásmido que codifica para la proteína dCas9 fusionada a 3 GFP, en una relación 5:1, respectivamente. a). Condición 1: 2.5µl de reactivo de transfección. b) Condición 2: 5 µl de reactivo de transfección. c) Condición 3: 7.5 µl de reactivo de transfección. d) Condición 4: 10 µl de reactivo de transfección. Derecha: campo claro; centro: canal verde; izquierda: fusión de imágenes. Aumento 20X.

Transfecciones con el reactivo Lipofectamina en SKBr-3

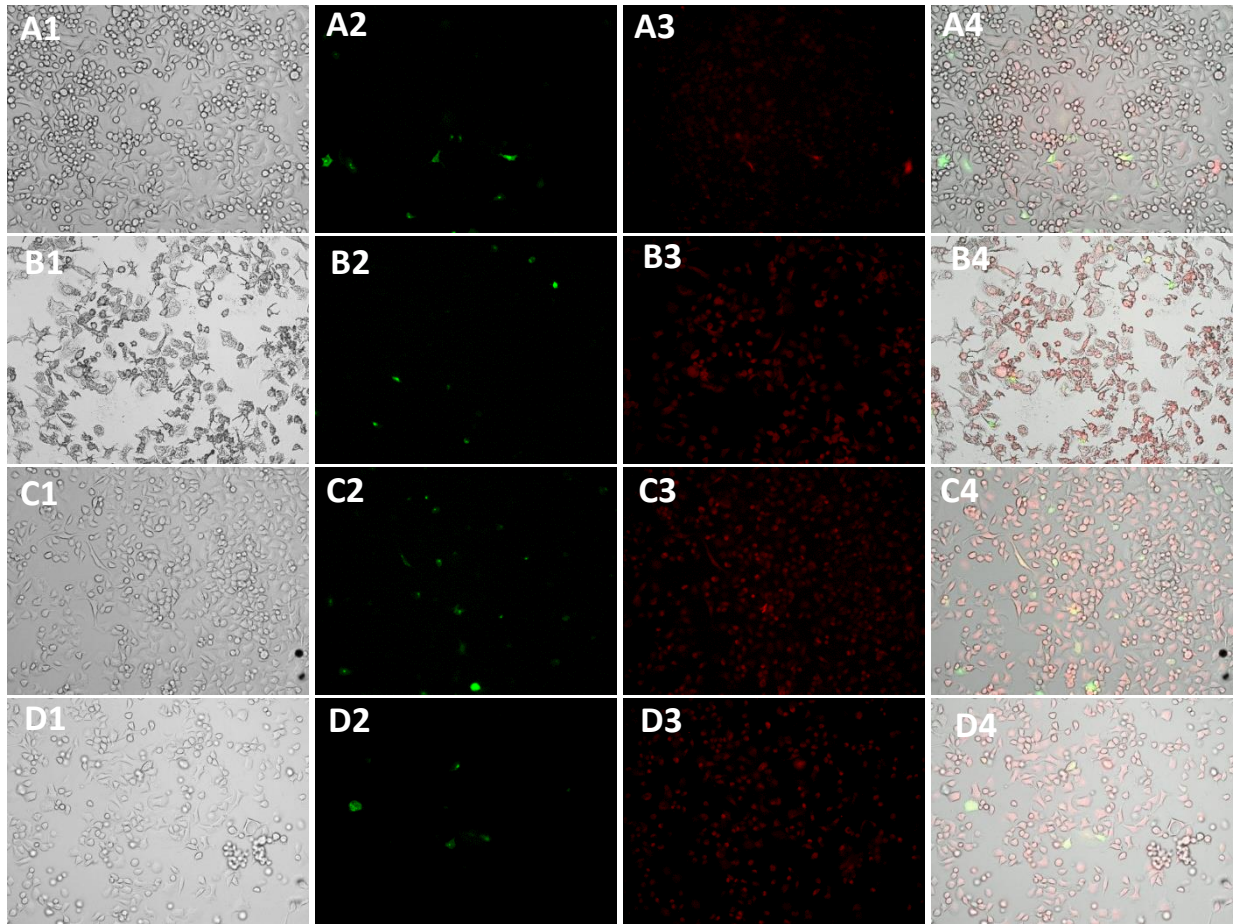


Figura R15. Transfección del sistema CRISPR multicolor en la línea celular MCF-7 con el reactivo Lipofectamine® LTX con Plus™ Reagent en diferentes concentraciones. Todas las transfecciones se realizaron utilizando un total de 2.5 µg de plásmidos del sistema CRISPR Multicolor con un *pool* de 3 sgrNAs dirigidos contra el primer exón de HER2 y un plásmido que codifica para la proteína dCas9 fusionada a 3 GFP, en una relación 5:1, respectivamente. a). Condición 1: 2.5µl de reactivo de transfección. b) Condición 2: 5 µl de reactivo de transfección. c) Condición 3: 7.5 µl de reactivo de transfección. d) Condición 4: 10 µl de reactivo de transfección. Derecha: campo claro; centro: canal verde; izquierda: fusión de imágenes. Aumento 20X.

Transfecciones con el reactivo Bio-T en SKBr-3

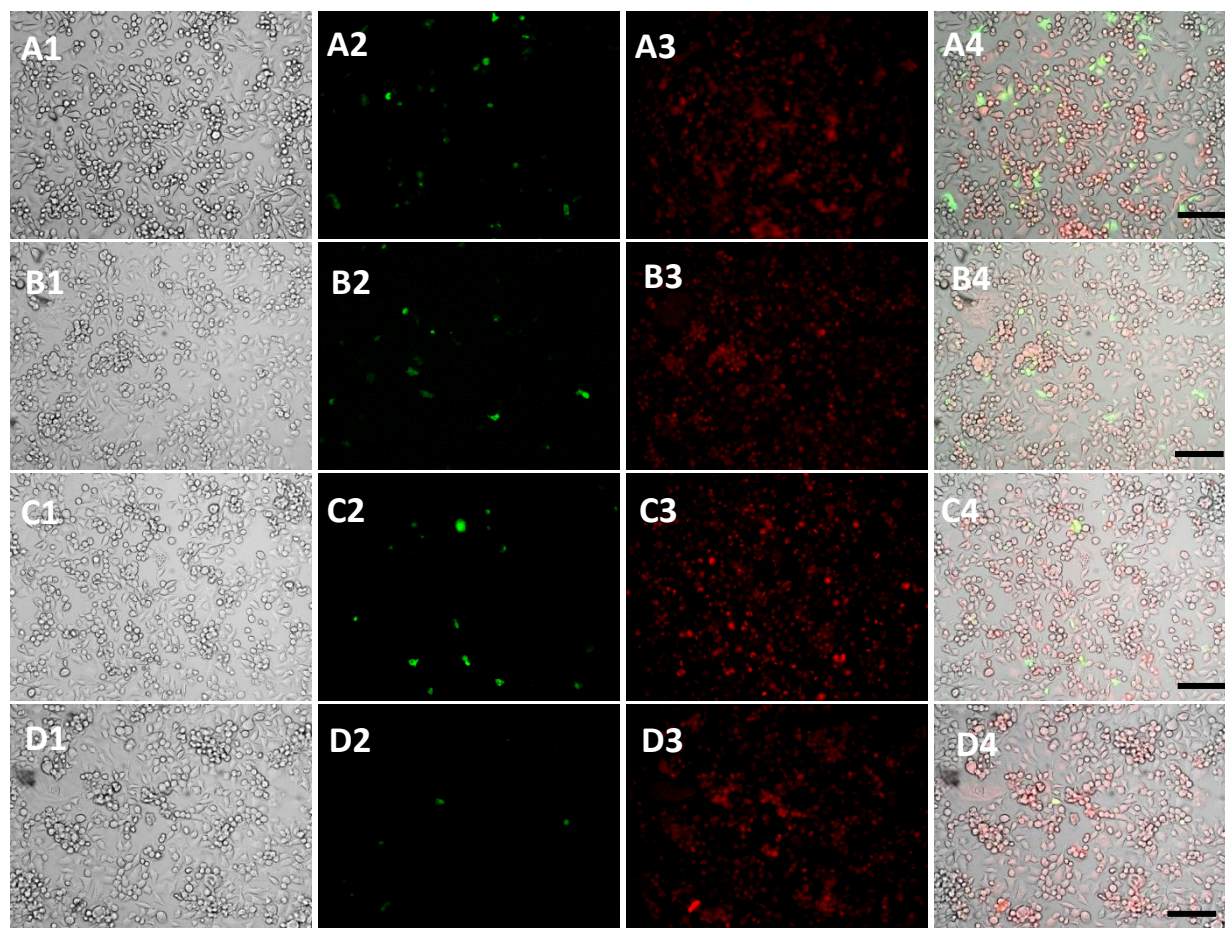


Figura R16. Transfección del sistema CRISPR multicolor en la línea celular MCF-7 con el reactivo Bio-T en diferentes concentraciones. Todas las transfecciones se realizaron utilizando de plásmidos del sistema CRISPR Multicolor con un *pool* de 3 sgRNAs dirigidos contra el primer exón de HER2 y un plásmido que codifica para la proteína dCas9 fusionada a 3 GFP, en una relación 5:1, respectivamente. El reactivo de transfección se utiliza en una proporción 1.5:1 con respecto a la concentración de plásmidos transfectados a) Condición 1: 1.0 μg de plásmidos y 1.5 μl de reactivo de transfección. b) Condición 2: 2.0 μg de plásmidos y 3 μl de reactivo de transfección. c) Condición 3: 3.0 μg de plásmidos y 4.5 μl de reactivo de transfección. d) Condición 4: 3.0 μg de plásmidos y 6 μl de reactivo de transfección. Derecha: campo claro; centro: canal verde; izquierda: fusión de imágenes. Aumento 20X. La barra representa 50 μm .

Posterior a la captura de imágenes, se contaron el número total de células en cada campo claro y el número de células que mostraron señal de la proteína fluorescente verde para estimar la eficacia de transfección de cada reactivo de transfección. El análisis muestra que utilizando 5 μl el reactivo de transfección TransIT-2020 se obtiene una eficacia de transfección de casi el 70 % (Figura R17, izquierda). Para la línea celular SKBr-3, se alcanza un 16% con el reactivo TranIT-2020 usando 5 y 10 μl de reactivo (Figura R17, derecha). En los protocolos publicados para estos ensayos se tiene un máximo de 80% de transfección para la línea celular MCF-7 y de 30% para SKBr-3. Aunque

no se alcanzaron esas eficacias, nuestros resultados indican que los reactivos y condiciones seleccionadas tras este análisis sistemático serían suficientes para realizar los experimentos de análisis confocal en células vivas de manera eficiente con un buen número de células transfectadas, lo que nos posibilitará capturar suficientes células únicas vivas por experimento.

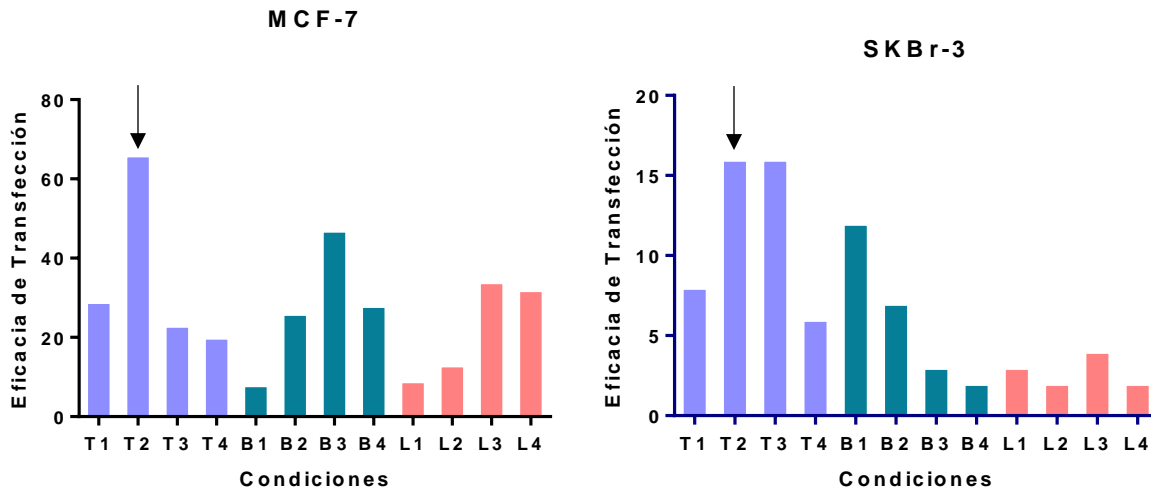


Figura R17. **Eficacia de transfección estimada para cada línea celular utilizando tres reactivos de transfección en distintas concentraciones.** Izquierda. Línea celular MCF-7. Derecha línea celular SKBr-3. Con flechas se indica la condición de cada reactivo que fue utilizada en la microscopía confocal. Para cada campo se (T: TransIT-2020, condición 1,2, 3 y 4; B: Bio-T, condición 1, 2, 3 y 4; L: Lipofectamina LTX, condición 1, 2, 3 y 4). Las células fueron contadas en Image J separando los canales Rojo y Verde, además el campo claro. En cada ensayo se analizaron dos campos de cada ensayo.

7.4. El sistema CRISPR Multicolor es capaz de detectar la ubicación de *HER2* en líneas celulares con y sin amplificación.

Tras la estandarización que nos permite seleccionar las condiciones óptimas de transfección para nuestro modelo celular y sistema CRISPR-dCas9, se procedió a repetir el experimento en las líneas celulares MCF7 y SKBr3 en dichas condiciones, para proceder con el análisis confocal. Nuestros resultados muestran que la línea celular MCF-7, la dCas9 marcada con proteína verde fluorescente (GFP) fue preferiblemente reclutada al nucléolo, probablemente porque en ausencia de un sgRNA, la proteína dCas9 tiene afinidad por los RNAs pequeños de localización nucleolar. Esta consideración técnica ya ha sido previamente reportada por otros autores (Maass *et al.* 2018), pero no parece tener mayores consecuencias sobre estudios subyacentes de localización específicos de *loci*. Por tanto, en las células MCF7, además de los nucléolos, pudimos observar como la dCas9

fluorescente fue específicamente dirigida a dos loci que indican la localización del gen *HER2* (Figura R18 y R19). Aunque la mayoría de estas señales son imperceptibles mediante observación en el microscopio de fluorescencia, la proyección en máxima intensidad del eje z junto con la reconstrucción tridimensional de los núcleos que permite la microscopía confocal, reveló la localización específica de Cas9-GFP, permitiendo distinguirla de la señal fluorescente inespecífica.

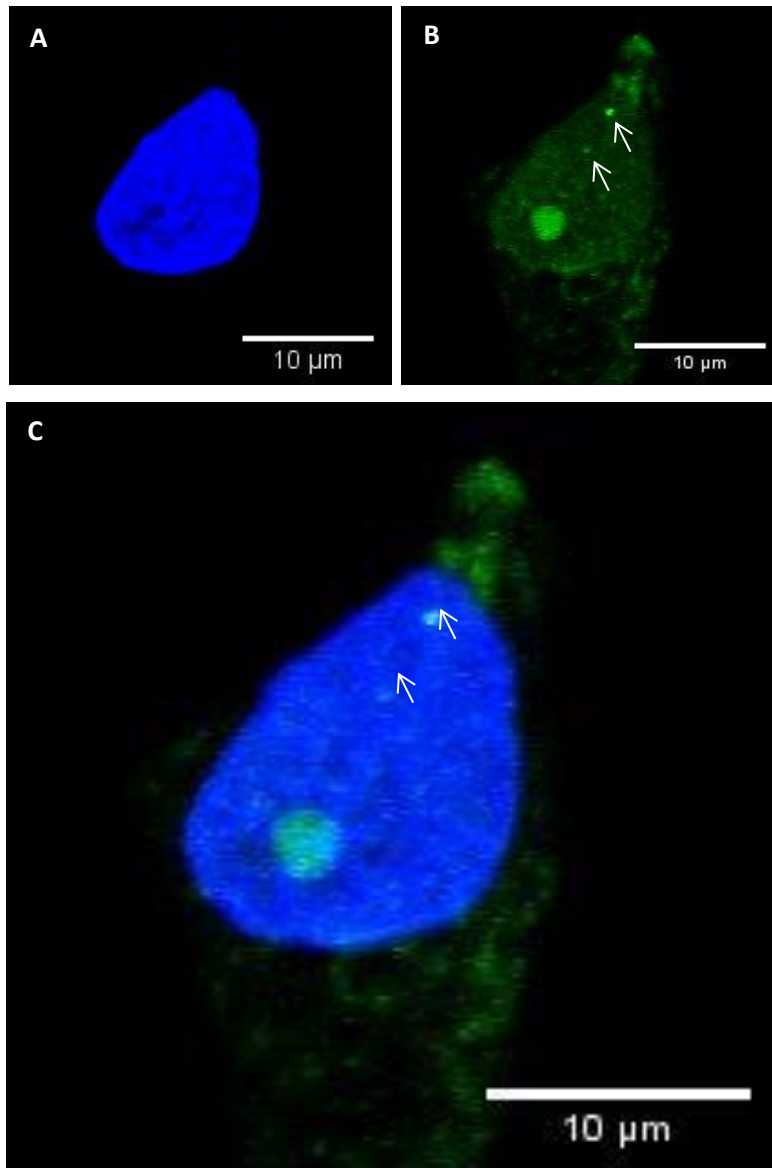


Figura R18. Célula MCF-7 transfectada con el sistema CRISPR Multicolor con 3 sgRNAs dirigidos contra el **primero exón de *HER2***. La imagen muestra dos puntos señalados con flechas que podrían indicar la ubicación de los alelos de *HER2*. Además, se muestra la tinción del nucléolo por la afinidad del sgRNA con los RNAs del nucléolo.

Proyección en máxima intensidad 45 planos z tomados cada 0.225 μm . A. Tinción de núcleo. B. Detección de GFP. C. Fusión de imágenes. Aumento 60X.

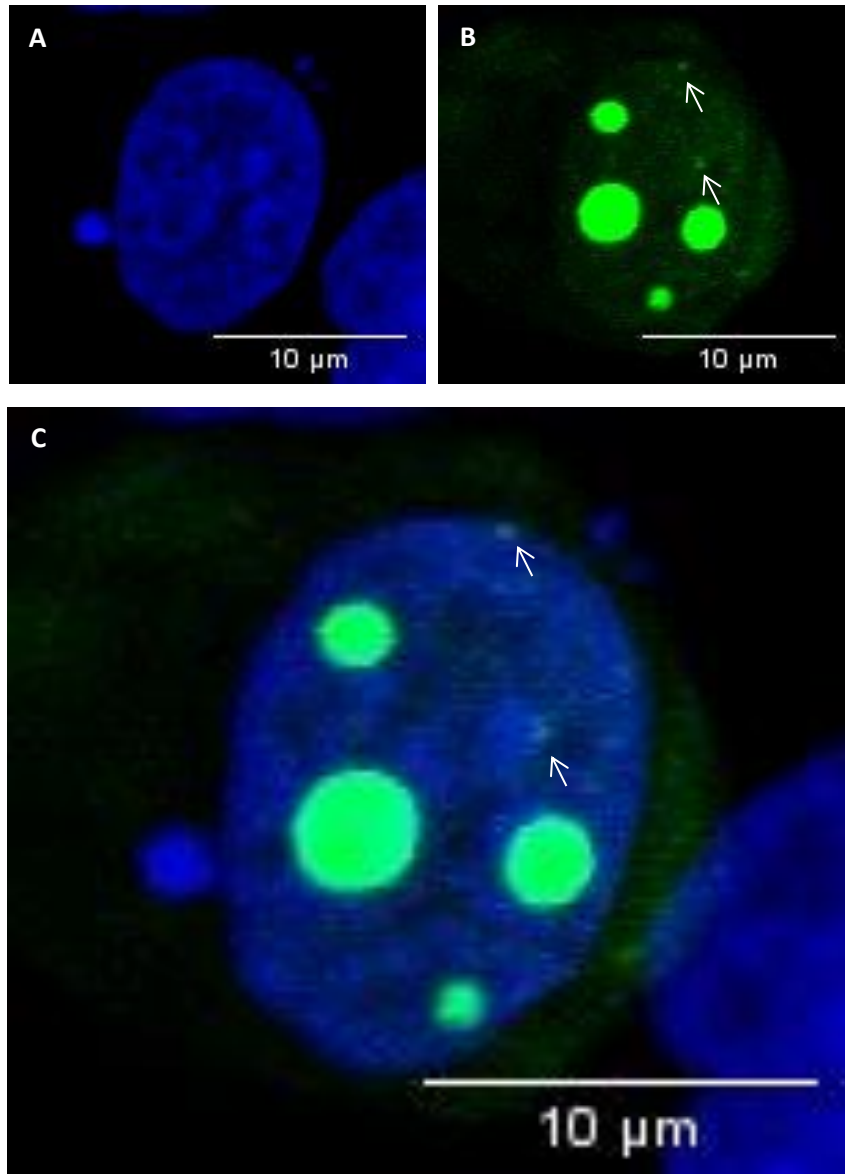


Figura R19. **Célula MCF-7 transfectada con el sistema CRISPR Multicolor con 3 sgRNAs dirigidos contra el primero exón de HER2.** La imagen muestra dos puntos señalados con flechas que podrían indicar la ubicación de los alelos de *HER2*. Además, se muestra la tinción de los nucléolos por la afinidad del sgRNA con los RNAs del nucléolo. Proyección en máxima intensidad 50 planos z tomados cada 0.225 μm . A. Tinción de núcleo. B. Detección de GFP. C. Fusión de imágenes. Aumento 60X

En el caso de la línea celular SKBr-3, positiva para la amplificación de *HER2*, se observaron varios puntos de localización de dCas9-GFP, lo cual es indicativo de una amplificación y aumento del número de copias del gen *HER2* en esta línea celular (Rondón-Lagos M *et al*, 2014) (Figura R20

y R21). Las diferencias que se observaron entre el tamaño de las distintas señales en el interior nuclear se podrían deber a la amplificación en tándem y dobles minutos del gen *HER2*. Ambos eventos coexisten en un mismo núcleo en esta línea celular (Vicario R *et al.* 2015).

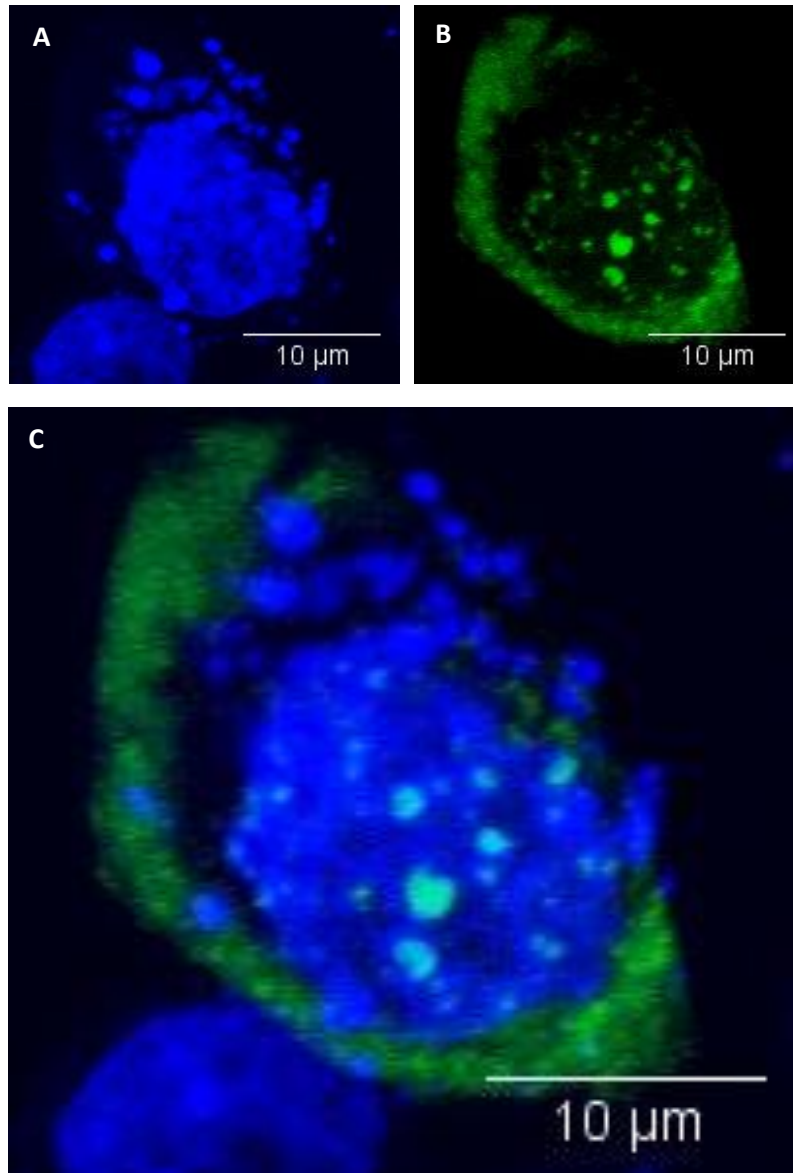


Figura R20. Célula SKBr-3 transfectada con el sistema CRISPR Multicolor con 3 sgRNAs dirigidos contra el **primero exón de *HER2***. La imagen muestra varios puntos de concentración de la proteína GFP que podrían indicar la amplificación de *HER2*. Además, se muestra la tinción de los nucléolos por la afinidad del sgRNA con los RNAs del nucléolo. Proyección en máxima intensidad 63 planos z tomados cada 0.225 µm. A. Tinción de núcleo. B. Detección de GFP. C. Fusión de imágenes. Aumento 60X

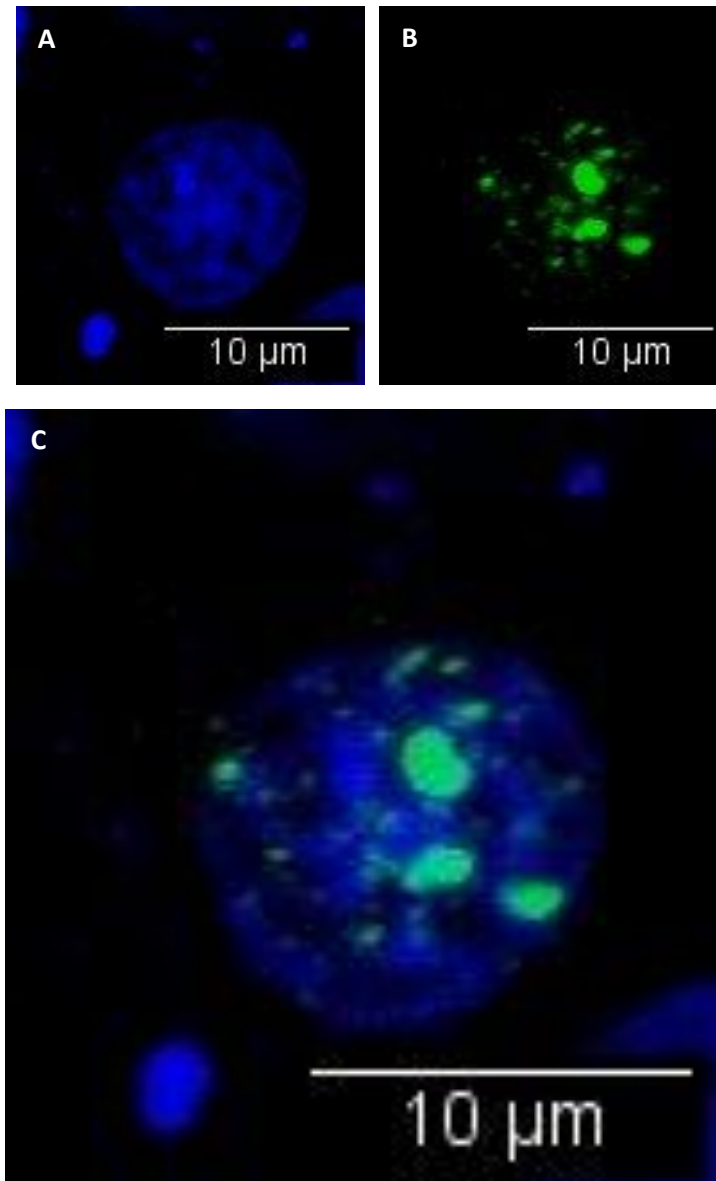


Figura R21. Célula SKBr-3 transfectada con el sistema CRISPR Multicolor con 3 sgRNAs dirigidos contra el **primero exón de HER2**. La imagen muestra varios puntos de concentración de la proteína GFP que podrían indicar la amplificación de *HER2*. Además, se muestra la tinción de los nucléolos por la afinidad del sgRNA con los RNAs del nucléolo. Proyección en máxima intensidad 67 planos z tomados cada 0.225 µm. A. Tinción de núcleo. B. Detección de GFP. C. Fusión de imágenes. Aumento 60X

Debido a que las señales intranucleares obtenidas con este sistema CRISPR-dCas9 en la línea celular SKBr3 eran complejas y dispersas, se estableció el criterio de considerar amplificaciones en tándem de HER2 a aquellas señales que tuviesen menos de 1 µm de diámetro, para diferenciarlas de la señal nucleolar que tendría un tamaño de 2 a 3 µm.

Como control negativo de nuestro protocolo experimental, se utilizaron células MCF-7 (Figura R22) y SKBr-3 (Figura R23) transfectadas con el plásmido vector pLH-stsgRNA 3.1 vacío, es decir, sin la clonación de los sgRNA, y el plásmido pHAGE-TO-nls-st1dCas9-3nls-3XGFP-2nls para evaluar el efecto que tenía la GFP en las células y comprobar la ausencia de señales extranucleolares.

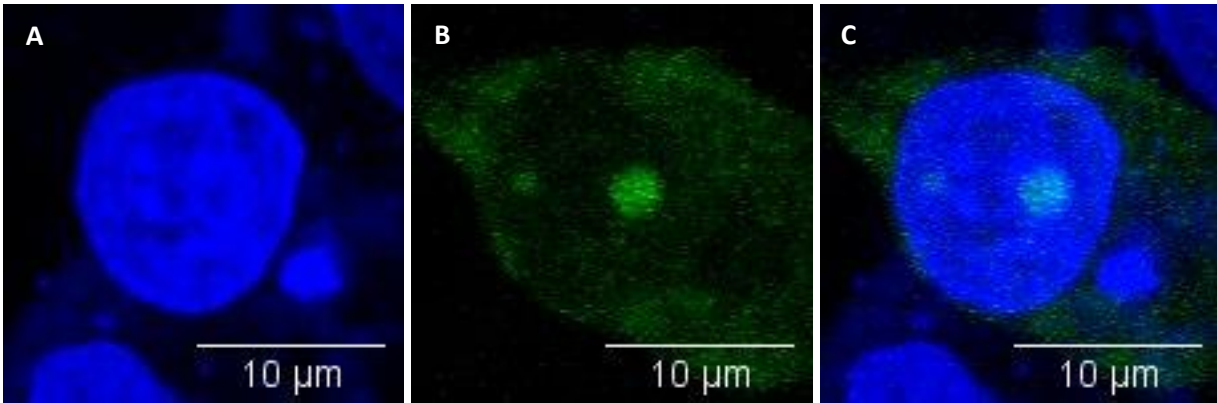


Figura R22. **Célula MCF-7 transfectada con el sistema CRISPR Multicolor sin sgRNAs dirigidos.** La imagen muestra la tinción del núcleo y la agregación de GFP en dos nucléolos de distinto tamaño, pero al no tener la presencia de sgRNAs contra algún gen no se encuentra otro punto localizado de acumulación de GFP. Proyección en máxima intensidad 59 planos z tomados cada 0.225 μm . A. Tinción de núcleo. B. Detección de GFP. C. Fusión de imágenes. Aumento 60X.

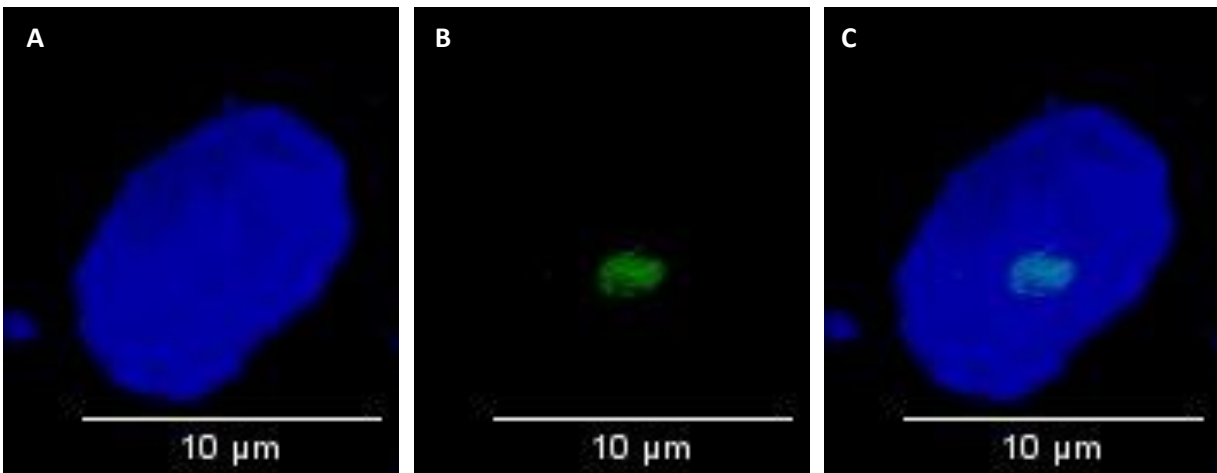
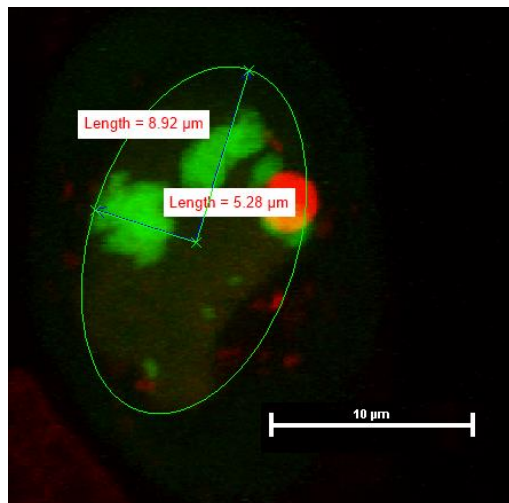


Figura R23. **Célula SKBr-3 transfectada con el sistema CRISPR Multicolor con 3 sgRNAs dirigidos contra el primero exón de HER2.** La imagen muestra varios puntos de concentración de la proteína GFP que podrían indicar la amplificación de *HER2*. Además, se muestra la tinción de los nucléolos por la afinidad del sgRNA con los RNAs del nucléolo. Proyección en máxima intensidad 67 planos z tomados cada 0.225 μm . A. Tinción de núcleo. B. Detección de GFP. C. Fusión de imágenes. Aumento 60X.

Como era de esperarse, únicamente los nucléolos se teñían de verde al secuestrar las proteínas dCas9-GFP. Por lo que se puede concluir que el sistema sin sgRNAs no puede unirse a secuencias inespecíficas dentro del genoma de las células y que las señales que se encuentran dentro de las células que sí fueron transfectadas con sgRNAs, podrían ciertamente estar señalando la ubicación de copias del gen *HER2* de manera específica (Figura R22 y R23). Adicionalmente, otra evidencia de la eficiencia del sistema es la diferencia notoria que mostraron las localizaciones subcelulares de las señales extranucleares entre las líneas celulares MCF-7 y SKBr-3 durante los experimentos de la detección de *HER2* (Figura R20 y R21), que fueron de acorde a lo esperado para estas dos líneas de estudio modelo para la amplificación de *HER2*. Por todo ello, los resultados obtenidos pueden considerarse confiables.

7.5. A través del sistema CRISPR Multicolor puede evaluarse la dispersión espacial de *HER2*.

Para evaluar la distribución espacial de los alelos de *HER2* en la línea celular MCF-7 se implementó una técnica a partir de reconstrucciones tridimensionales que consisten en rotar cada núcleo (Ma *et al.* 2016; Maass *et al.* 2018). En la vista en la que se desplazaba mínimamente del eje de rotación y la señal se encontraba lo más alejada del centro del núcleo se consideró la fuente ortogonal óptima. Entonces se proyectaron los planos en z y el núcleo fue moldeado como un óvalo para medir la distancia de la señal con respecto al centro del núcleo y a la periferia nuclear, además de medir los diámetros mayor y menor del núcleo (Figura R24). Es importante destacar que la rotación y medición se hace independiente para cada señal, así el eje de rotación podría



considerarse libre para cada señal. La tabla R4 muestra los resultados del análisis para un total de 13 células de la línea MCF7.

Figura R24. **Dispersión de *HER2* dentro del núcleo de una célula MCF-7.** Después de reconstruir tridimensionalmente la célula, se rota la célula para encontrar la vista en la que la señal se encuentra a mayor distancia del centro del núcleo. Cada señal es medida individualmente en su propia vista ortogonal óptima. Las dimensiones de cada núcleo celular fueron medidas también para calcular el área de cada ovalo.

Al final de las mediciones, se normalizaron las distancias entre la dispersión de la señal con respecto al área del óvalo normalizado para poder generar un gráfico de dispersión como el que se muestra en la figura R26. Como se puede observar, cada señal tiene dos parámetros a considerar, 1) la distancia entre el centro del núcleo y la señal analizada (representado en el eje de las abscisas) y 2) la distancia hay desde la localización de la señal hasta la periferia nuclear (eje de las ordenadas).

Núcleo	Señal	Centro-señal	Periferia-señal	Diámetro largo	Diámetro ancho
1	1.1	1.72	2.18	13.1	7.5
	1.2	4.02	1.34		
2	2.1	2.86	2.9	17.84	10.56
	2.2	3.68	3.25		
3	3.1	2.06	3.35	16.44	10.82
	3.2	4.36	1.4		
4	4.1	2.54	3.09	16.26	11.7
	4.2	6.28	1.89		
5	5.1	2.1	3.4	12.7	8.4
	5.2	2.7	2.5		
6	6.1	1.64	4.17	13.6	7.2
	6.2	3.4	0.3		
7	7.1	3.1	2.16	14.1	9.8
	7.2	4.2	1.21		
8	8.1	2.01	1.87	13.8	10.1
	8.2	3.9	0.87		
9	9.1	5.48	0.4	12.4	7.9
	9.2	1.1	3.18		
10	10.1	2.5	1.4	11.1	8.1
	10.2	1.1	3.4		
11	11.1	1.27	1.46	8.24	5.41
	11.2	1.2	2.1		
12	12.1	3.1	2.16	11.4	7.9
	12.2	3.2	1.7		
13	13.1	2.9	2.3	13.1	10.1
	13.2	3	0.87		

Tabla R4. Distancias entre el centro del núcleo y la periferia nuclear para cada señal. Cada distancia se expresa en μm .

Para visualizar este análisis, se agruparon las señales según su distribución subnuclear respecto a la periferia y al centro del núcleo en tres grupos principales, representados en el gráfico por tres colores. Dentro del ovalo color rojo, se localizaron aquellas señales cercanas al centro del núcleo y por lo tanto más alejadas de la periferia. En el ovalo amarillo cayeron las señales que se encontraban en una posición equidistante entre la periferia y el centro del núcleo, y por último en el ovalo verde se incluyeron las señales que se encontraban en una localización más periférica. Únicamente se tiene un caso de una señal que estaba prácticamente en la periferia nuclear y que no se engloba dentro de los óvalos (figura R26).

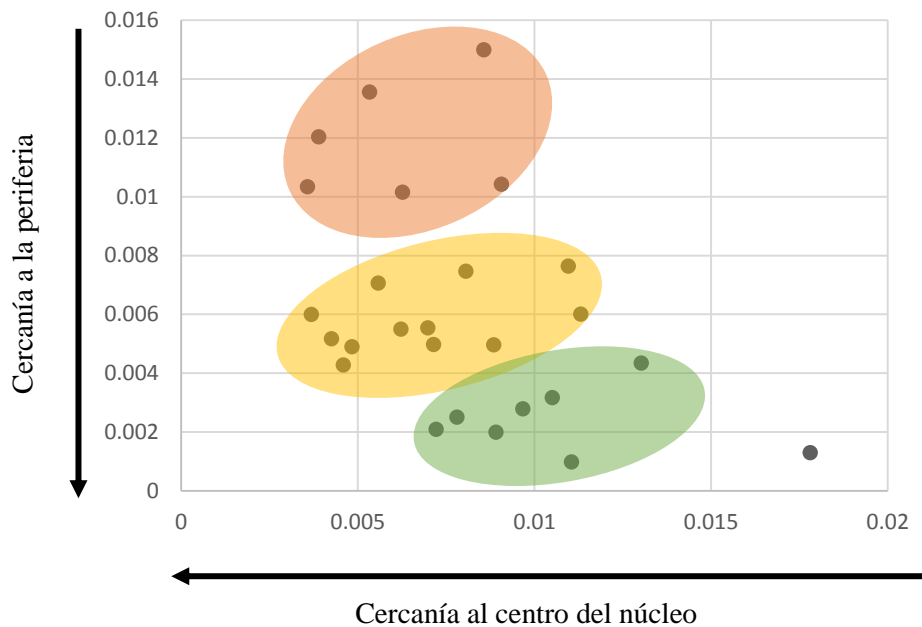


Figura R25. Gráfico de dispersión de la ubicación de *HER2* dentro del núcleo celular.

A pesar de la distribución observada en el gráfico de dispersión, no se pudieron establecer dos grupos de señales que representen diferencias entre los dos alelos dentro de cada núcleo. Por ello, para evaluar cambios en la posición espacial de *HER2* sería necesario utilizar un gen de referencia ubicado dentro del mismo cromosoma 17, como podrían ser los genes *P53* o *RORA*.

8. Discusión.

Este trabajo estuvo enfocado en utilizar la tecnología CRISPR-*dCas9* para poder detectar en tiempo real y en células vivas, con alta resolución, la localización subcelular y el nivel de amplificación del gen *HER2* en dos líneas celulares de cáncer de mama, una que no amplifica el gen y cuya biología es principalmente impulsada por estrógeno, MCF-7; y otra con un alto nivel de amplificación, SKBr-3. Estas líneas celulares han sido ampliamente utilizadas en el campo de la biología celular del cáncer de mama, y son modelo de estudio para la expresión y función de *HER2* y otros genes con relevancia clínica en el cáncer de mama.

Actualmente, el cáncer de mama es la neoplasia maligna invasora más común en la mujer mexicana, superando apenas en el 2016 al cáncer cervicouterino. Se sabe que el cáncer de mama tiene una constelación de causas y que el desarrollo de la enfermedad y respuestas a tratamiento puede variar ampliamente entre una mujer y otra, incluso entre mujeres con diagnósticos similares. Aunque es un cáncer muy frecuente, hay que tomar en cuenta varios factores para poder estimar la sobrevida de pacientes. En primer lugar, el diagnóstico de la enfermedad en estadios tempranos, (aunque incluye muchas otras características y no son objeto de este trabajo discutirlos), se puede considerar de manera general, cuando el tumor es menor a 5 años y no tiene ganglios de axilas afectados. La organización FUCAM A. C. reporta una supervivencia a 5 años del 97% de las mujeres que en las que el cáncer se detecta a tiempo y 93% de ellas sin recurrencia, mientras que, en etapas localmente avanzadas, con tumores mayores a 5 cm y con ganglios axilares afectados la supervivencia a 5 años disminuye a 72% y una recurrencia del 60%.

A pesar de que el cáncer de mama tiene una biología muy variada, incluso para ser considerada como un conjunto de enfermedades, hoy en día se conocen muchos factores de riesgos asociados al desarrollo del cáncer de mama, factores tanto biológicos como endógenos e incluso factores hereditarios. La naturaleza y el carácter distintivo del cáncer de mama se pueden distinguir a través del examen patológico tradicional (es decir, en términos de morfología de la enfermedad), en los que se evalúa el tamaño del tumor, la ubicación dentro de la mama, la afectación de ganglios linfáticos axilares, eventos de metástasis, etc. Pero la real diversidad entre los cánceres de mama solo se puede apreciar a través de análisis moleculares de un conjunto de genes cuya actividad impulsa fuertemente el desarrollo de la enfermedad

Desafortunadamente, la clasificación molecular del cáncer de mama aún no ha alcanzado una implementación rutinaria en los centros de diagnóstico. En cambio, métodos histológicos basados en la expresión de al menos 3 receptores membranales: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), están ampliamente estandarizados en el diagnóstico. Según la expresión de estos receptores, el cáncer de mama puede ser dividido en 4 subtipos distintos: Luminal A (ER⁺/PR⁺/HER2⁻), Luminal B (ER⁺/PR⁺/HER2⁺), HER2 (ER⁻/PR⁻/HER2⁺) y triples negativos (ER⁻/PR⁻/HER2⁻) (Zeitzi *et al.* 2013).

Detectar tempranamente la enfermedad es tan importante como dar un diagnóstico correcto, en la que los pacientes puedan acceder a terapias dirigidas contra el subtipo histopatológico de la enfermedad. Por ejemplo, cánceres de tipo Luminal A son tratados con terapia antiestrogénica como el Tamoxifeno, por otro lado, cánceres de tipo HER2 son tratados con un anticuerpo monoclonal que inhibe al receptor en la membrana de las células.

Entonces, el diagnóstico del cáncer de mama actualmente está rutinariamente representado por la clasificación TNM (tamaño, ganglios y metástasis) y la clasificación inmunohistoquímica principalmente. Sin embargo, varios trabajos han demostrado que esta metodología de diagnóstico no es completamente confiable y señalan que **«la clasificación molecular del cáncer de mama no se puede inferir de manera confiable a partir de un sustituto de tinción inmunohistoquímica»** (Rivenbark *et al.* 2013).

Dado que en el caso específico de los tumores de tipo HER2, la mayor parte de las veces, la sobreexpresión de esta proteína está impulsada por la amplificación del gen, el método más indicado para evaluar a este tipo de tumores sería el conteo directo de las copias del gen que tienen las células tumorales. La prueba más confiable para explorar la amplificación de *HER2* y de casi cualquier otro gen es la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), de hecho, esta prueba está indicada obligatoriamente para casos en los que la inmunohistoquímica no tuvo un diagnóstico confiable. Desafortunadamente, FISH es una técnica muy costosa y que no todos los centros de diagnóstico pueden implementar., incluso cuando en la ficha de diagnóstico de todas las mujeres con la enfermedad está indicado conocer el nivel de amplificación de este y otros genes.

Análisis recientes han demostrado que el cambio en el número de copias de un gen puede estar relacionados con cánceres más agresivos y que tienden a recurrencia (Smith JC, Sheltzer JM,

2018). Con base en esa información, conocer el número de copias de genes relacionados con el cáncer resulta de vital importancia para el diagnóstico y pronóstico de los pacientes.

Un enorme trabajo realizado en el 2012 demostró que la clasificación inmunohistoquímica no corresponde completamente con la expresión molecular de 381 tumores. Sólo para el caso de la expresión de *HER2*, hubo una tasa de error del 11% en tipos Luminal A, 10% para el Luminal B y 39% para el HER2 y este tipo de errores aparecen en incluso otros trabajos (Rivenbark *et al.* 2013).

Es por esto, por lo que este trabajo implemento la tecnología CRISPR para detectar el nivel de amplificación de *HER2* teniendo como perspectivas las ventajas prácticas y económicas sobre tecnologías como FISH o la inmunohistoquímica. Primero que nada, al estar basado en un sistema de plásmidos es bastante económico frente a FISH, el cual que está basado en sondas marcadas fluorescentemente y/o anticuerpos. Al ser un enfoque basado en un perfil molecular y no en tinción, el resultado puede ser complementario a la inmunohistoquímica para describir la expresión de *HER2*, además de que al ser un método *in vivo*, se evita la formación de artefacto típicos de los métodos de montaje y preservación de las muestras. En este sentido, el avance de los métodos de diagnóstico y tratamiento del cáncer hacia una medicina más personalizada para cada paciente, permiten intuir que la obtención de cultivos primarios de tumores tenderá a generalizarse más y más, pues permitirá un análisis molecular más fino de cada tipo de tumor en cada paciente. Es en esta posibilidad donde nuestra propuesta tiene cabida, es decir, utilizar la tecnología implementada en nuestro estudio para determinar la localización subcelular y niveles de amplificación en genes de relevancia diagnóstica.

Los resultados observados por microscopia confocal permiten, al menos, identificar diferencias entre el número de señales de la línea celular MCF-7, con solo dos, y la línea celular SKBr-3 con múltiples señales dispersas por todo el núcleo. Si bien, no se examina todavía otro gen del cromosoma 17 que no se amplifique en ningún caso como *P53* o *RORA* o al centrómero del cromosoma 17 y que evidencie que el sistema se está dirigiendo específicamente a *HER2*, la diferencia entre el número de señales entre las células estudiadas y la comparación con las células control podrían darnos certeza sobre la eficacia del sistema. Además, se debe mejorar la técnica para reducir al máximo el reclutamiento de dCas9-GFP al nucléolo. Ello se podría lograr posiblemente mediante la ingeniería de los plásmidos, por ejemplo, cambiando el promotor de

dCas9-GFP por otro más atenuado que generar un menor número de copias, las cuales mejorarán la estequiometría con los sgRNAs exógenos, fomentando la formación de complejos sin que quedase dCas9-GFP libre para dirigirse al nucléolo. Es importante resaltar que el sistema CRISPR Multicolor utilizado en nuestro protocolo muestra similitudes en cuanto al número de señales observadas y su localización y distribución subnuclear con otros trabajos que utilizan la tecnología FISH (Figura D1) (Ceran C, *et al.* 2012; Rondón-Lagos M *et al.* 2014)

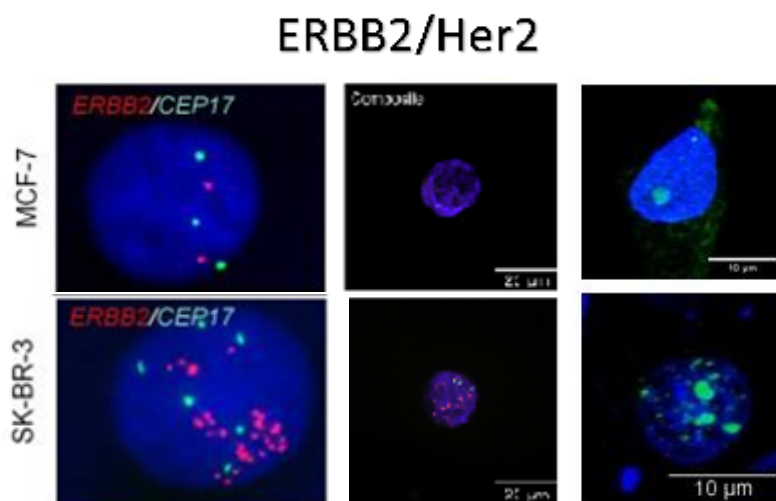


Figura D1. **Comparación entre imágenes obtenidas por FISH en dos estudios distintos y el sistema CRISPR Multicolor.** Se muestra una comparación cualitativa entre los resultados obtenidos en un localización de HER2 mediante FISH (a la izquierda Ceran C, *et al.* 2012 y el centro Rondón-Lagos M *et al.* 2014)) y los resultados obtenidos en nuestro análisis en células vivas (a la derecha). Se propone que los resultados cualitativos son comparables.

En comparación con otros estudios como los de Meaburn and Misteli, que han demostrado una relocalización específica de genes con importancia en el cáncer de mama, hasta el momento no hemos sido capaces de demostrar que *HER2* se relocalice de alguna manera específica en algún punto del núcleo celular de las células MCF-7. Para poder abordar esa pregunta sería necesario evaluar la localización de otros genes de referencia dentro del mismo cromosoma. Sin embargo, la amplificación de genes observada en líneas celulares como SKBr-3 es evidente utilizando el sistema CRISPR-dCas9 y se podría utilizar para poder rastrear más genes dentro del mismo núcleo celular y establecer patrones de amplificación que se dan junto con otros genes.

9. Perspectivas.

Para poder complementar este trabajo y comprobar la eficacia del sistema CRISPR-*dCas9* como un método más eficiente que las metodologías actuales se proponen varias perspectivas de corto y largo plazo.

- Rastrear otros genes del cromosoma 17 que se conoce que son negativos para amplificación como *p53* o *RORA* y que servirían para cuantificar el nivel de amplificación de *HER2*.
- Utilizar el sistema CRISPR para estudiar otros genes que se conoce amplifican durante la evolución del cáncer de mama y que son importantes para el diagnóstico molecular como *ESR1*, *PR* y *EGFR1*.
- Ampliar el número de líneas celulares de cáncer de mama para estudiar la amplificación de *HER2* en ellas.
- Utilizar modelos de xenoinjertos en ratón basados en líneas celulares de cáncer de mama para comprobar la viabilidad del uso de la técnica en tumores.

10. Apéndice

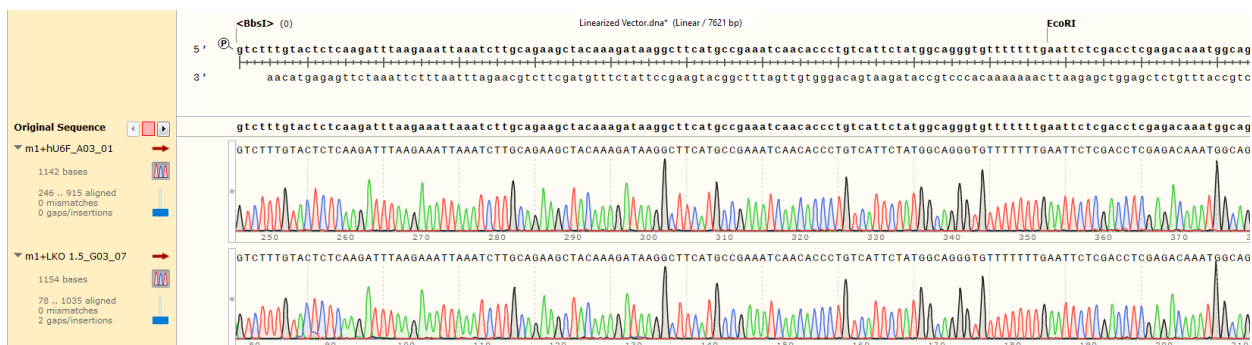
10.1. Secuencia de 2 kb del primer exón del gen Her2

AAGTTCCTGTGTTCTTTATTCTACTCTCCGCTGAAGTCCACACAGTTTAAATTAAGTTCCCGGATTTTTTGTGGGCG
 CCTGCCCGCCCCCTCGTCCCCCTGCTGTGTCCATATATCGAGGCGATAGGGTTAAGGGAAGGCGGACGCCTGATGGG
 TTAATGAGCAAACCTGAAGTGTTCATGATCTTTTTTTGAGGTAGGGCTGTTTACTGTACCACCCCTGTGCGATTT
 TACTTCTAAACGTACCTGTAACATCCACTTCTCTCCATCTCTTCTGGCACCACCCTGGTTAAAGACACCATCATG
 TGTCGCCAAGACAGCCGAGTAGCTTCTTAATGGCTCTCCCTGCCTCTACTTTTGCCTCTTCCAACCTGCGCTCCAT
 TTTGAAAAATTAATAATTTGCCCATATCACTTTTTTTTTTCTTAAAATTTACTGGCTCCCAATTACCTTGGGTAAA
 ATACAGTCTCCACAAACCCTGCCTGATTTGGCCCCTGTCCACTGGTCTCCCTCACTCCCTTGCTCCAGACCCGCTTC
 AGAGGGCTATGTCCCTCAAGCTTCCCTGACTGCCTGGCCTGGTCTGAATCACTCACTCTTCTTTTTTCTTCTAGTCGC
 AATTGAAGTACCACCTCCCGAGGGTGATTGCTTCCCCATGCGGGGTAGAACCCTTTGCTGTCCTGTTACCACCTCTAC
 CTCCAGCACAGAATTTGGCTTATGGTAGGCGCTAACTGCGTTTGTGTTTCTTCTGTTAATGAATGAACAGCATAAC
 ATCAACATAAGAACCTTGACAAATCCAGGGCTGTAATAATCATCAGTATGGTTCTGCACTGAGATCGGAGAGAAGTAAT
 ATTTCTAGGAAAATTAGGAACCCTGGGAACAGGACGCTTGCTTTAGTATCCTCTCCCTGCTCACCTCCCCTGCACTC
 CCATCAGCACCGACCCACACCCAATCTCATAGAAGCCTTGAGCTAAGGATCACCTTTTCTCCTCCCCACTCTCCT
 CACCCCTTGTCAACTTTTTCTTTTTCTGTCCTGGGGTTGGAATGAGTAAGAAGTAGCCTGGGATTCCATTCACCTCACT
 TAACAAACATTTCTGAGTCTTAGCTCTAGCACCTTGCTAAGCAAGGCAAAATCTCCAGGAGGCACCATTACATTG
 CATTCTGTGAATGGTGTCTGTTGGGAGCAGCATTACATTGCCTTTTCTGTGAATGGCAAATTTCTCCAGTTAAAT
 ATAACATGAATAGTGTCCCTGGAGTTGACCACCCAACCTGATACTGACTGAGAAGCTGAAATGAACAAAACAACCC
 TTAGCCCTCCAGGAGCTGACCGGAAATCCAGTGCTAATACTACTTTGCATCTTACAGATTAGTTCTTTTACAATACT
 GTTTTTTTTTCTTTTTTCAATTCATTTTGTCTTTTCTGTGACTCTGGGATGAGTCTTTTTATGAGGATCCTCATATA
 AAGATGGACATTTAGGATTAAGAGGATGAAATCCTGACAAAATAGGGAGTCTCCCCTTTAGAAAATTCCTAAGTAA
 GGCTGGGGGTGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACCTTGGGAGGCCGAGGCGGACGGATCACCTGAGGTTAGGAG
 TTTGAGACCAGCCTGACCAACATGGAGAAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAATTAGTTGGGTGTGGTGGTGCAT
 GCCTGTAATCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCCAGGGAGGCAGAGGTTGTGGTGGCC
 AAGATTGCGCCATCGCACTCCAGCCTGGGCAACAAGAGCGAAACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAGAAATTC
 CAATTTGAAGGCCTCATCTATATTATGTCAAACATACTGAAATGCAGTAACGCCCCACATTAATAAGATTTATA
 AATAACTATACATATATAAATTAATTAATGCTGTTAATAGTTGACATATTGCTACATTTATATACATTTAG

10.2. Primers de secuenciación

Primer	Mer	Secuencias	TM
hU6-F Human U6 promoter, forward primer	21 -mer	GAGGGCCTATTTCCCATGATT 48% GC / 6412.2 Da	56 °C
LKO.1 5' Human U6 promoter, forward primer	20 -mer	GACTATCATATGCTTACCGT 40% GC / 6067.0 Da	51 °C

10.3. Secuenciación de vectores clonados.



11. Bibliografía

1. Allis, Marie-Laure Caparros, Thomas Jenuwein, Monika Lachner, and Danny Reinberg, “Overview and concepts,” in *Epigenetics*, Second edition, C. D. Allis, M-L. Caparros, T. Jenuwein, and D. Reinberg, Eds., chapter 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2015.
2. Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* *447*, 407-412.
3. Bernstein, B.E., Meissner, A., and Lander, E.S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell* *128*, 669-681.
4. Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J.K., and Carroll, D. (2003). Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* *300*, 764.
5. Bibikova, M., Golic, M., Golic, K.G., and Carroll, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* *161*, 1169-1175.
6. Bird, A. (2002). *DNA* methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* *16*, 6-21.
7. Boberi, T. (1909). Die Blastomerenkerne von *Ascaris megalocephala* und die Theorie der Chromosomenindividualität. *Arch Zellforsch* *3*, 181–268.
8. Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U. (2009). Breaking the code of *DNA* binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* *326*, 1509-1512.
9. Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., and Ehrlich, S.D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* *151*, 2551-2561.
10. Borden, J., and Manuelidis, L. (1988). Movement of the X chromosome in epilepsy. *Science* *242*, 1687-1691.
11. Brodsky, A.S., Meyer, C.A., Swinburne, I.A., Hall, G., Keenan, B.J., Liu, X.S., Fox, E.A., and Silver, P.A. (2005). Genomic mapping of RNA polymerase II reveals sites of co-transcriptional regulation in human cells. *Genome biology* *6*, R64.
12. Butt, A.J., Martin, J.L., Dickson, K.A., McDougall, F., Firth, S.M., and Baxter, R.C. (2004). Insulin-like growth factor binding protein-3 expression is associated with growth stimulation of T47D human breast cancer cells: the role of altered epidermal growth factor signaling. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *89*, 1950-1956.
13. Ceran C, Cokol M, Cingoz S, Tasan I, Ozturk M, Yagci T. Nuevos anticuerpos monoclonales anti-HER2: sinergia y antagonismo con factor de necrosis tumoral- α . *Cáncer BMC* . 2012; 12: 450. Publicado en 2012 el 4 de octubre. Doi: 10.1186 / 1471-2407-12-450
14. Cremer, M., Grasser, F., Lanctot, C., Muller, S., Neusser, M., Zinner, R., Solovei, I., and Cremer, T. (2008). Multicolor 3D fluorescence in situ hybridization for imaging interphase chromosomes. *Methods in molecular biology* *463*, 205-239.
15. Croft, J.A., Bridger, J.M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P., and Bickmore, W.A. (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *The Journal of cell biology* *145*, 1119-1131.
16. Chari, R., Mali, P., Moosburner, M., and Church, G.M. (2015). Unraveling CRISPR-Cas9 genome engineering parameters via a library-on-library approach. *Nature methods* *12*, 823-826.
17. Chen, B., Gilbert, L.A., Cimini, B.A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G.W., Park, J., Blackburn, E.H., Weissman, J.S., Qi, L.S., *et al.* (2013). Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* *155*, 1479-1491.
18. Chen, X., Iliopoulos, D., Zhang, Q., Tang, Q., Greenblatt, M.B., Hatzia Apostolou, M., Lim, E., Tam, W.L., Ni, M., Chen, Y., *et al.* (2014). XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature* *508*, 103-107.

19. Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2010). Targeting *DNA* double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* *186*, 757-761.
20. Doench, J.G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E.W., Donovan, K.F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., *et al.* (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature biotechnology* *34*, 184-191.
21. Felsenfeld, G., Boyes, J., Chung, J., Clark, D., and Studitsky, V. (1996). Chromatin structure and gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 9384-9388.
22. Firth, S.M., and Baxter, R.C. (2002). Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrine reviews* *23*, 824-854.
23. Fraser, J., Williamson, I., Bickmore, W.A., and Dostie, J. (2015). An Overview of Genome Organization and How We Got There: from FISH to Hi-C. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* *79*, 347-372.
24. Fussner, E., Strauss, M., Djuric, U., Li, R., Ahmed, K., Hart, M., Ellis, J., and Bazett-Jones, D.P. (2012). Open and closed domains in the mouse genome are configured as 10-nm chromatin fibres. *EMBO reports* *13*, 992-996.
25. Hall, M.J., Obeid, E.I., Schwartz, S.C., Mantia-Smaldone, G., Forman, A.D., and Daly, M.B. (2016). Genetic testing for hereditary cancer predisposition: BRCA1/2, Lynch syndrome, and beyond. *Gynecologic oncology* *140*, 565-574.
26. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
27. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
28. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., DouDNA, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided *DNA* endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* *337*, 816-821.
29. Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* *128*, 683-692.
30. Joti, Y., Hikima, T., Nishino, Y., Kamada, F., Hihara, S., Takata, H., Ishikawa, T., and Maeshima, K. (2012). Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber. *Nucleus* *3*, 404-410.
31. Jungmann, R., Avendano, M.S., Woehrstein, J.B., Dai, M., Shih, W.M., and Yin, P. (2014). Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with *DNA*-PAINT and Exchange-PAINT. *Nature methods* *11*, 313-318.
32. Kalari KR, Necela BM, Tang X, Thompson KJ, Lau M, et al. (2013) An Integrated Model of the Transcriptome of HER2-Positive Breast Cancer. *PLoS ONE* *8*(11): e79298.
33. Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic *DNA* methylation: the mark and its mediators. *Trends in biochemical sciences* *31*, 89-97.
34. Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and *DNA*. *Science* *184*, 868-871.
35. Kornberg, R.D., and Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* *98*, 285-294.
36. Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* *128*, 693-705.
37. Krull, S., Dorries, J., Boysen, B., Reidenbach, S., Magnus, L., Norder, H., Thyberg, J., and Cordes, V.C. (2010). Protein Tpr is required for establishing nuclear pore-associated zones of heterochromatin exclusion. *The EMBO journal* *29*, 1659-1673.
38. Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* *358*, 15-16.
39. Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* *128*, 707-719.
40. Li, C., Shi, Z., Zhang, L., Huang, Y., Liu, A., Jin, Y., Yu, Y., Bai, J., Chen, D., Gendron, C., *et al.* (2010). Dynamic changes of territories 17 and 18 during EBV-infection of human lymphocytes. *Molecular biology reports* *37*, 2347-2354.
41. Li, E., and Zhang, Y. (2014). *DNA* methylation in mammals. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *6*, a019133.

42. Liang, Y., Franks, T.M., Marchetto, M.C., Gage, F.H., and Hetzer, M.W. (2013). Dynamic association of NUP98 with the human genome. *PLoS genetics* 9, e1003308.
43. Ma, H., Naseri, A., Reyes-Gutierrez, P., Wolfe, S.A., Zhang, S., and Pederson, T. (2015). Multicolor CRISPR labeling of chromosomal loci in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 3002-3007.
44. Ma, H., Tu, L.C., Naseri, A., Huisman, M., Zhang, S., Grunwald, D., and Pederson, T. (2016). Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow. *Nature biotechnology* 34, 528-530.
45. Makarova, K.S., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2013). Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic acids research* 41, 4360-4377.
46. Manuelidis, L. (1985). Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hybridization. *Human genetics* 71, 288-293.
47. Maass PG, Barutcu AR, Shechner DM, Weiner CL, Melé M, Rinn JL. Spatiotemporal allele organization by allele-specific CRISPR live-cell imaging (SNP-CLING). *Nat Struct Mol Biol.* 2018;25(2):176-184.
48. McCord, R.P., Nazario-Toole, A., Zhang, H., Chines, P.S., Zhan, Y., Erdos, M.R., Collins, F.S., Dekker, J., and Cao, K. (2013). Correlated alterations in genome organization, histone methylation, and DNA-lamin A/C interactions in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Genome research* 23, 260-269.
49. Meaburn, K.J. (2016). Spatial Genome Organization and Its Emerging Role as a Potential Diagnosis Tool. *Frontiers in genetics* 7, 134.
50. Meaburn, K.J., Gudla, P.R., Khan, S., Lockett, S.J., and Misteli, T. (2009). Disease-specific gene repositioning in breast cancer. *The Journal of cell biology* 187, 801-812.
51. Meaburn, K.J., and Misteli, T. (2008). Locus-specific and activity-independent gene repositioning during early tumorigenesis. *The Journal of cell biology* 180, 39-50.
52. Mohan, S., and Baylink, D.J. (2002). IGF-binding proteins are multifunctional and act via IGF-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of endocrinology* 175, 19-31.
53. Mojica, F.J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., and Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution* 60, 174-182.
54. Mojica, F.J.. et al. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends in Microbiology* , Volume 24 , Issue 10 , 811 – 820. 2016
55. Montague, T.G., Cruz, J.M., Gagnon, J.A., Church, G.M., and Valen, E. (2014). CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic acids research* 42, W401-407.
56. Moscou, M.J., and Bogdanove, A.J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326, 1501.
57. Nishino, Y., Eltsov, M., Joti, Y., Ito, K., Takata, H., Takahashi, Y., Hihara, S., Frangakis, A.S., Imamoto, N., Ishikawa, T., *et al.* (2012). Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *The EMBO journal* 31, 1644-1653.
58. Paz, N., Felipe-Blanco, I., Royo, F., Zabala, A., Guerra-Merino, I., Garcia-Orad, A., Zugaza, J.L., and Parada, L.A. (2015). Expression of the DYRK1A gene correlates with its 3D positioning in the interphase nucleus of Down syndrome cells. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 23, 285-298.
59. Qian, J., Zhu, W., Wang, K., Ma, L., Xu, J., Xu, T., Roe, O.D., Li, A., Zhou, J., and Shu, Y. (2016). JWA loss promotes cell migration and cytoskeletal rearrangement by affecting HER2 expression and identifies a high-risk subgroup of HER2-positive gastric carcinoma patients. *Oncotarget* 7, 36865-36884.
60. Rabl, C. (1885). Über Zelltheilung. *Morphologisches Jahrbuch* 10, 214-330.
61. Ratner, H.K., Sampson, T.R., and Weiss, D.S. (2016). Overview of CRISPR-Cas9 Biology. *Cold Spring Harbor protocols* 2016, pdb top088849.

62. Ricci, M.A., Manzo, C., Garcia-Parajo, M.F., Lakadamyali, M., and Cosma, M.P. (2015). Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo. *Cell* 160, 1145-1158.
63. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *Am J Pathol* 2013;183:1113-24.
64. Robinson, P.J., and Rhodes, D. (2006). Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Current opinion in structural biology* 16, 336-343.
65. Rondón-Lagos M, Verdun Di Cantogno L, Rangel N, et al. Unraveling the chromosome 17 patterns of FISH in interphase nuclei: an in-depth analysis of the HER2 amplicon and chromosome 17 centromere by karyotyping, FISH and M-FISH in breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2014;14:922. Published 2014 Dec 7. doi:10.1186/1471-2407-14-922
66. Schardin, M., Cremer, T., Hager, H.D., and Lang, M. (1985). Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. *Human genetics* 71, 281-287.
67. Schmid, V.J., Cremer, M., and Cremer, T. (2017). Quantitative analyses of the 3D nuclear landscape recorded with super-resolved fluorescence microscopy. *Methods*.
68. Sigal, A., and Rotter, V. (2000). Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer research* 60, 6788-6793.
69. Shaytan AK, Landsman D, et al. "Nucleosome adaptability conferred by sequence and structural variations in histone H2A-H2B dimers." *Curr Opin Struct Biol*, 2015. PMID: 25731851
70. Shaytan AK, Armeev GA, et al. "Coupling between histone conformations and DNA geometry in nucleosomes on a microsecond timescale: atomistic insights into nucleosome functions." *J Mol. Biol.*, 2015. PMID: 26699921
71. Smith JC, Sheltzer JM. Systematic identification of mutations and copy number alterations associated with cancer patient prognosis. *Elife*. 2018;7:e39217. Published 2018 Dec 11. doi:10.7554/eLife.39217
72. Stack, S.M., Brown, D.B., and Dewey, W.C. (1977). Visualization of interphase chromosomes. *Journal of cell science* 26, 281-299.
73. Taimen, P., Pflieger, K., Shimi, T., Moller, D., Ben-Harush, K., Erdos, M.R., Adam, S.A., Herrmann, H., Medalia, O., Collins, F.S., et al. (2009). A progeria mutation reveals functions for lamin A in nuclear assembly, architecture, and chromosome organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20788-20793.
74. Vicario R, Peg V, Morancho B, et al. Patterns of HER2 Gene Amplification and Response to Anti-HER2 Therapies. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129876. Published 2015 Jun 15. doi:10.1371/journal.pone.0129876
75. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:3688-3691. doi: 10.1093/nar/gkg526.
76. Wischnitzer, S. (1973). The submicroscopic morphology of the interphase nucleus. *International review of cytology* 34, 1-48.
77. Yu, H., Levesque, M.A., Khosravi, M.J., Papanastasiou-Diamandi, A., Clark, G.M., and Diamandis, E.P. (1998). Insulin-like growth factor-binding protein-3 and breast cancer survival. *International journal of cancer* 79, 624-628.
78. Yu, H.Z., and Mitchell, A.J. (2014). Genome Organization in Cancer Cells. In *Systems Analysis of Chromatin-Related Protein Complexes in Cancer*, J.G. Andrew Emili, Shoshana Wodak, ed. (Toronto, Canada: Springer), pp. 250-276.
79. Zack, T.I., Schumacher, S.E., Carter, S.L., Cherniack, A.D., Saksena, G., Tabak, B., Lawrence, M.S., Zhsng, C.Z., Wala, J., Mermel, C.H., et al. (2013). Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. *Nature genetics* 45, 1134-1140.
80. Zeitz, M.J., Ay, F., Heidmann, J.D., Lerner, P.L., Noble, W.S., Steelman, B.N., and Hoffman, A.R. (2013). Genomic interaction profiles in breast cancer reveal altered chromatin architecture. *PloS one* 8, e73974.
81. Zuleger, N., Robson, M.I., and Schirmer, E.C. (2011). The nuclear envelope as a chromatin organizer. *Nucleus* 2, 339-349.