



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE PLK4
MEDIANTE EL SISTEMA FOTOACTIVABLE CRISPR/dCAS9**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

L. en C. Eduardo Brito Alarcón

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Susana López Charretón
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Febrero, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Financiamiento

El presente trabajo fue realizado bajo la tutoría del Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, ubicado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

El financiamiento fue obtenido gracias a los siguientes apoyos:

- “Determinación de los mecanismos moleculares del ensamblaje de los centriolos” con clave 252213 por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
- “Análisis cuantitativo de los niveles endógenos de la Cinasa PLK4, implicaciones en la regulación de la génesis de los centriolos” con clave IA202417 por parte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por el apoyo brindado para asistir a congresos nacionales.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca para estudios a nivel posgrado, con el número de becario 482737.

Miembros del jurado

Presidente: Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay

Secretario: Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera

Vocal: Dr. Fatuel Tecuapetla

Vocal: Dr. Rafael Peña Miller

Vocal: Dra. Hilda María Lomelí Buyoli

Agradecimientos técnicos

Al Dr. Adán Guerrero por fungir como el asesor de este proyecto.

Al Dr. Chris Wood, por su retroalimentación con respecto a la elección de fluoróforos y el análisis de datos.

Al Dr. Jaime Arturo Pimentel Cabrera, por la adquisición de imágenes en el microscopio confocal Olympus FV1000 upright.

Al M. en C. Andrés Martín Saralegui Amaro, por la recolección de imágenes en el Amnis ImageStream Mark II.

A la Q.F.B. Xóchitl del Carmen Alvarado Affantranger, por la adquisición de imágenes en el microscopio confocal Olympus FV1000 invertido.

Al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada por el uso de sus equipos.

A la Biól. Erika Isabel Melchy Pérez, por la selección y aislamiento de células mediante el uso del citómetro de flujo.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por sus servicios de síntesis de oligonucleótidos y secuenciación de muestras de ADN.

Al Dr. Sabino Pacheco Guillen, por proporcionar enzima que él mismo purificó y fue utilizada para este trabajo.

A los miembros del comité tutor: Dra. Susana López Chatterón y Dr. Mario Enrique Zurita Ortega por sus ideas en la construcción de este proyecto.

A los miembros del jurado: Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay, Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera, Dr. Fatuel Tecuapetla, Dr. Rafael Peña Miller y Dra. Hilda Lomelí Buyolí por formar parte de mi comité y la retroalimentación en la escritura de este trabajo.

Índice

Resumen	7
Abstract	7
1. Introducción.....	8
1.1 Centrosomas.....	8
1.1.1 Centrosomas y su ciclo de replicación.....	8
1.1.2 PLK4 es el regulador maestro de los centrosomas.....	11
1.1.3 La fosforilación de la Thr170 regula el umbral de activación de PLK4	12
1.2 CRISPR/Cas9 e inducción de genes endógenos	14
1.2.1 CRISPR/Cas9.....	14
1.2.2 Sistema CRISPR/dCas9 optogenético para la inducción de genes por luz azul	16
2. Justificación	17
3. Hipótesis	17
4. Objetivos	17
5. Materiales y métodos	18
5.1 Medios y soluciones	18
5.1.1 Buffer TE 10X.....	18
5.1.2 Medio LB	18
5.1.3 Medio LB-agar.....	18
5.1.4 Medio D10.....	18
5.1.5 Medio de congelamiento.....	19
5.1.6 Solución FACSFlow 5X	19
5.2 Protocolos	20
5.2.1 Preparación de bacterias electrocompetentes	20
5.2.2 Transformación bacteriana	20
5.2.3 Preparación de crioviales bacterianos.....	20
5.2.4 Recepción de plásmidos provenientes de Addgene	20
5.2.5 Síntesis de oligonucleótidos	21
5.2.6 PCR de punto final.....	21
5.2.7 Síntesis del DNA donador PLK4-mRuby3	22
5.2.8 Ensayos de restricción.....	22
5.2.9 Subcultivo de células eucariontes	22
5.2.10 Criopreservación y descongelamiento células eucariontes.....	22
5.2.11 Transfección células eucariontes	23
5.2.12 Extracción de DNA genómico	23

5.2.13 Cambio de sgRNAs	24
5.2.14 Transfección del sistema CRISPR/nCas9	25
5.2.15 Diseño e impresión en 3D	26
5.2.16 Regulación de genes por CRISPR/Cas9 optogenético	26
5.2.17 Inducción de la transcripción de <i>plk4</i> por el sistema optogenético	27
6. Resultados y discusión	28
6.1 Obtención de la línea celular <i>plk4-mRuby3</i>^{+/+}	28
6.2 Recombinación homóloga entre <i>plk4</i> y <i>mRuby3</i>	30
6.4 CRISPR/dCas9 optogenético	35
6.5 Iluminador de luz azul para células en cultivo	35
6.6 Evaluación del sistema optogenético e iluminador JoGio	37
6.7 Control optogenético de los niveles de <i>plk4</i>	42
7. Conclusiones	44
8. Perspectivas	44
9. Referencias	45
10. Material Suplementario	48
10.1 Construcción del plásmido PLK4-mRuby3	48
10.1.1 Síntesis de amplicones A, B, C y D	48
10.1.2 Síntesis de fragmentos AB, CD y ABCD	50
10.1.3 Clonación de PLK4-mRuby3 por CPEC	52
10.2 Construcción de OPT-PLK4	55
10.2.1 Elección de sgRNAs y clonación en vector AIO-GFP.....	55
10.2.2 Amplificación de sgRNAs, origen de replicación y gen de resistencia contra ampicilina (2,883 pb).....	55
10.3 Plásmidos	57
10.3.1 AIO-GFP (Addgene #74119).....	57
10.3.2 AIO-PLK4 (Sintetizado para este trabajo)	61
10.3.3 PLK4-HDR (Sintetizado para este trabajo)	65
10.3.4 NLS-dCas9-trCIB1 (Addgene # 64119).....	68
10.3.5 NLSx3-CRY2PHR-p65 (Addgene #64124)	73
10.3.6 sgRNA1_Tet-inducible Luciferase reporter (Addgene # 64161)	77
10.3.7 Tet-inducible mCherry reporter (Addgene # 64128)	79
10.3.8 pEGFP Centrin2 (Nigg UK185) (Addgene # 41147).....	82
10.3.9 OPT-PLK4 (Sintetizado para este trabajo).....	85

Índice de figuras

Número de figura	Nombre de figura	Página
Figura 1	Centrosomas y su papel en la mitosis	8
Figura 2	Ciclo de los centrosomas	10
Figura 3	Estructura de PLK4	11
Figura 4	PLK4 es el regulador maestro de los centrosomas	12
Figura 5	<i>trans</i> -autoactivación de PLK4	13
Figura 6	Sistemas CRISPR/Cas9	15
Figura 7	Sistema optogenético CRISPR/dCas9	16
Figura 8	Estrategia de edición con CRISPR/Cas9 nickasa	29
Figura 9	Síntesis de PLK4-mRuby3	31
Figura 10	Aislamiento y cofirmación de clonas editadas	34
Figura 11	Sistema de iluminación JoGio	36
Figura 12	Evaluación de JoGio y el sistema optogenético	37
Figura 13	Efecto del tipo del LED sobre la inducción transcripcional	40
Figura 14	Inducción de plk4 con el sistema optogenético	43

Resumen

Los centrosomas son organelos que se encargan de nuclear a los microtúbulos y durante la mitosis participan activamente en la segregación equitativa de los cromosomas. El regulador maestro de los centrosomas es PLK4, en ausencia, no ocurre la génesis de nuevos centrosomas, pero cuando hay una sobreexpresión de PLK4, se formarán nuevos centrosomas. PLK4 es una proteína difícil de estudiar en células vivas a niveles endógenos, es por eso que proponemos una metodología para generar una versión roja fluorescente de PLK4 endógena e inducirla por luz azul, con el uso de un sistema optogenético, en conjunto con el desarrollo de un iluminador de luz azul. En este trabajo, se indujo a *plk4* endógena y se estudió su impacto en la génesis de centrosomas.

Abstract

The centrosomes are organelles that are responsible of microtubule nucleation and during mitosis they actively participate in the equal chromosome segregation. The master regulator of the centrosome is PLK4, in its absence, the centrosome biogenesis does not occur, but when there is an overexpression of PLK4, new centrosomes form. PLK4 is difficult protein to study in living cells at endogenous levels, that is why we propose a methodology to generate a red fluorescent version of endogenous PLK4 and induce it by blue light with the use of an optogenetic system, in conjunction with the development of a blue light illuminator. In this work, *plk4* was induced and its impact on the centrosome genesis was studied.

1. Introducción

1.1 Centrosomas

1.1.1 Centrosomas y su ciclo de replicación

En casi todas las células animales, los centrosomas son el centro organizador de microtúbulos (“*mTOC*”, por su abreviación en inglés), poseen dos centriolos (madre e hijo), cada uno compuesto por nueve triplete de γ -tubulina en estructura 9 + 0 (**Fig. 1A**). Los centrosomas son organelos sin membrana. Cada centrosoma consta de un par de centriolos, los cuales están compuestos por γ -tubulina y se encuentran rodeados por otras proteínas que conforman la matriz pericentriolar (Buchwalter et al., 2016). Los centrosomas participan en diversos procesos, tales como la segregación de los cromosomas durante la mitosis y la formación de cilios en células quiescentes (Conduit, Wainman and Raff, 2015).

Siendo que el número y localización de los centrosomas varía conforme a la etapa del ciclo celular, el mantener la homeostasis de los centrosomas es crucial para la fisiología celular. Diversas patologías se relacionan con alteraciones en la función de los centrosomas como son la microcefalia, el enanismo y ciliopatías (Klingseisen and Jackson, 2011; Marthiens *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 2014). Los centrosomas también tienen un papel importante en cáncer, debido a que los centriolos se alargan en las células cancerosas y este fenotipo está relacionado con la capacidad de las células cancerosas a generar metástasis (Marteil, Guerrero, Vieira, de Almeida, *et al.*, 2018). Cuando existe un mayor número de centrosomas (fenotipo multipolar) se generan aneuploidías que pueden inducir apoptosis (**Fig. 1B**) (Conduit, Wainman and Raff, 2015).

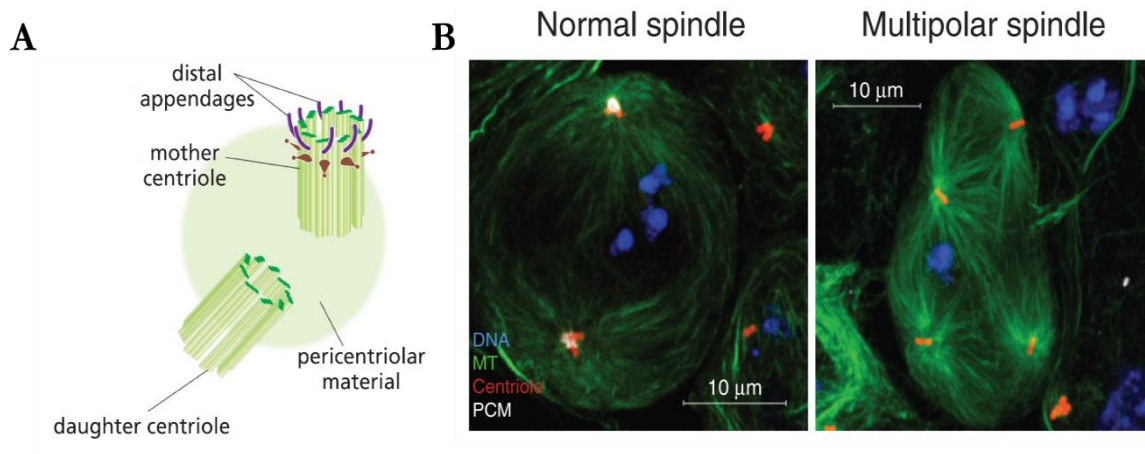


Figura 1 Centrosomas y su papel en la mitosis. (A) Los centriolos están rodeados por un conjunto de proteínas que contribuyen a la arquitectura y función del centrosoma llamada matriz pericentriolar. (B) Una célula con múltiples centrosomas generará múltiples polos a los cuales migrarán los cromosomas generando células hijas que tendrán aneuploidías, que, en algunos casos, inducen apoptosis y en otros se relacionan con cancer. DNA (azul), microtúbulos (verde), centriolo (rojo) y matriz pericentriolar (blanco). Imagen adaptada de (Alberts *et al.*, 2015; Buchwalter *et al.*, 2016).

En una célula quiescente (G_0) el centrosoma participa en la formación de cilios y/o flagelos. Cuando se prepara la célula para su duplicación (G_1), los cilios se desensamblan y se inicia la amplificación de cada centriolo de manera perpendicular con respecto a los centriolos pre-existentes (S_{inicio}). Antes de finalizar la fase S, el par de centriolos se ha duplicado por única vez, dando lugar a dos centrosomas. En la fase G_2 , los centrosomas se separan, y durante la mitosis, cada centrosoma genera los polos del uso mitótico, los cuales coordinan la segregación de los cromosomas (**Fig. 2A & 2B**) (Buchwalter *et al.*, 2016). El mecanismo de iniciación de la duplicación de los centriolos no está completamente caracterizado. Actualmente se considera que PLK4 (*Polo-Like Kinase 4*) es la primera proteína involucrada en este proceso y su localización en el centrosoma favorece la homodimerización, lo que resulta en su activación, así como el reclutamiento de proteínas río abajo en este proceso (**Fig. 2C**) (Bettencourt-Dias *et al.*, 2005; Habedanck *et al.*, 2005; Kleylein-Sohn *et al.*, 2007; Rodrigues-Martins *et al.*, 2007; Ohta *et al.*, 2018).

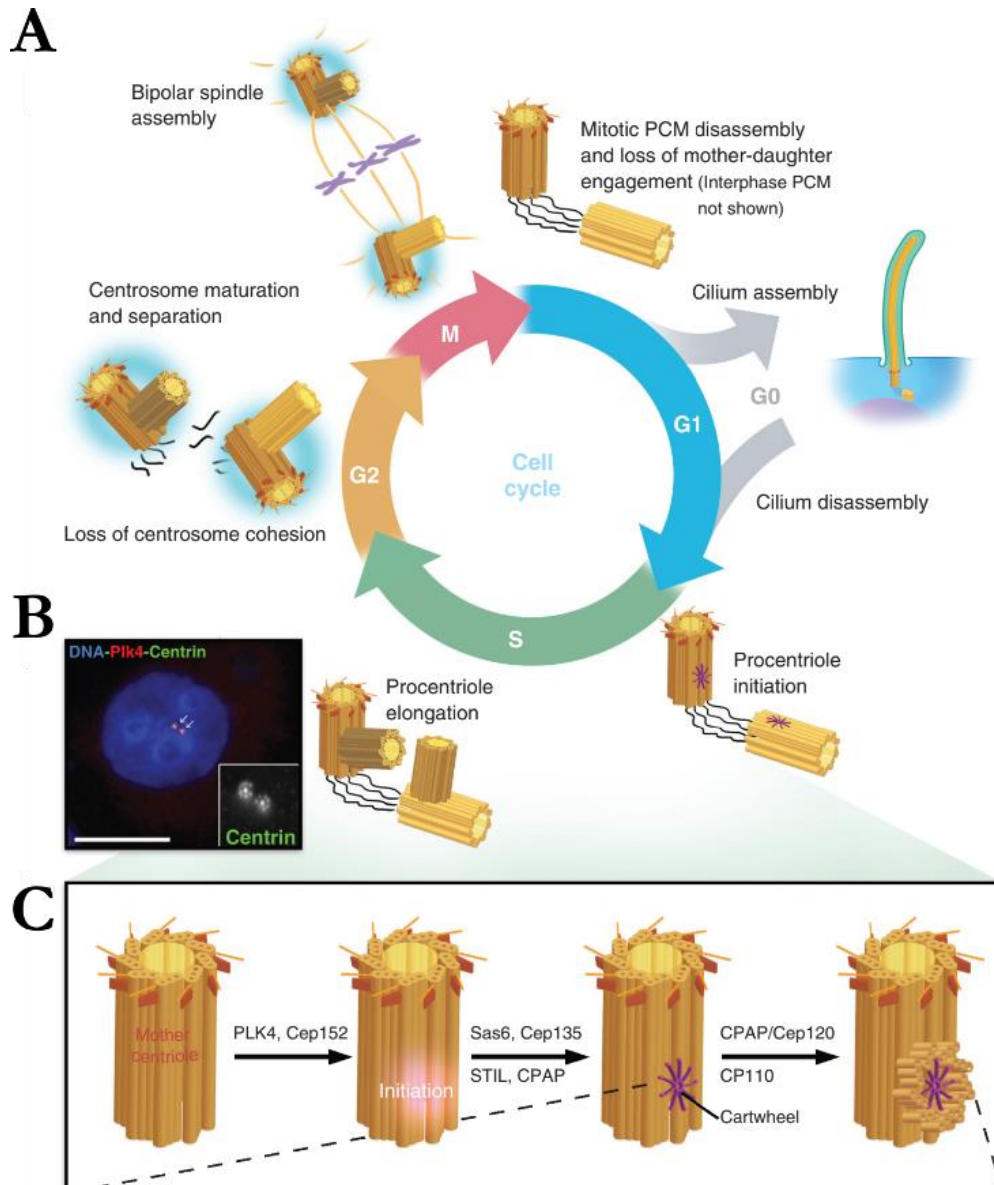


Figura 2 Ciclo de los centrosomas **(A)** Los centrosomas se duplican acorde al ciclo celular. Una célula en fase G₀ tendrá un centrosoma formando cilios. Cuando la célula entra en G₁ el centrosoma se desensambla. Durante la fase S ocurre la génesis de centriolos de manera perpendicular a cada centriolo preexistente, dando lugar a dos centrosomas unidos. En la fase G₂ los centrosomas maduran y se separan. Para la mitosis, los centrosomas migran a cada polo y unen a cada cromosoma para que cada uno herede un juego completo de cromosomas. **(B)** Inmunofluorescencias mostrando los centrosomas y PLK4 de una célula en G₂. El DNA está marcado con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, color azul), los centrosomas están marcados con Centrina (verde) y también se observa la localización de PLK4 (rojo). Barra de escala: 10 μm **(C)** Génesis de centrosomas. La llegada de PLK4 al centrosoma desencadena una cascada de señalización que resulta en la formación de la estructura de rueda de carro (“Cartwheel”, por su nombre en inglés) la cual servirá para anclar a los nueve tripletes de γ -tubulina que nuclearán a los microtúbulos. Imagen adaptada de (Buchwalter *et al.*, 2016).

1.1.2 PLK4 es el regulador maestro de los centrosomas

PLK4 es una proteína de 970 aminoácidos y su peso molecular es de 109 kDa. En el N-terminal posee el dominio cinasa, seguido de los dominios *Polo-Box 1* y *Polo-Box 2* (PB1 y PB2, respectivamente), que en conjunto forman la región *Cryptic Polo-Box* (CPB, por sus siglas en inglés) el cual es responsable de la homodimerización de PLK4 (Park *et al.*, 2014), y a través del cual interactúan las proteínas centrosomales que se encargan de reclutar a PLK4 al centriolo (Sonnen *et al.*, 2013). En el C-terminal se encuentra el dominio *Polo Box 3* (PB3) que es el sitio blanco de STIL, el regulador negativo de PLK4 (Zitouni *et al.*, 2014; Arquint *et al.*, 2015) (**Fig. 3**). PLK4 es el regulador maestro de los centrosomas. Al eliminar al centrosoma por láser e inhibir la traducción de *plk4* mediante iRNAs, no ocurre la síntesis de nuevos centrosomas. Un aumento sutil en el número de moléculas de PLK4 (como puede ser la transcripción de fuga de un promotor inducible), resulta en la aparición de múltiples centriolos adosados al centriolo madre, un fenómeno conocido como amplificación canónica. Si los niveles de PLK4 aumentan drásticamente, ocurrirá la síntesis *de novo* de centrosomas (**Fig. 4**) (Lopes *et al.*, 2015).

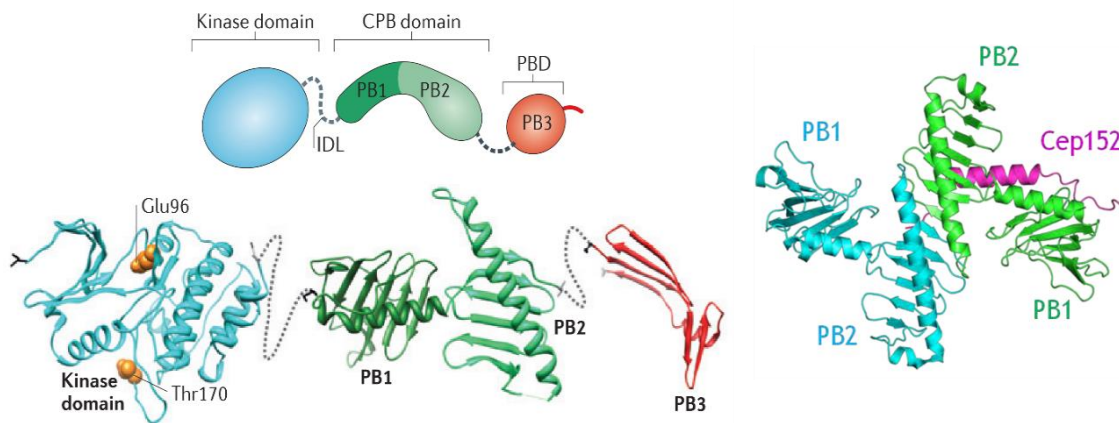


Figura 3 Estructura de PLK4 En el N-terminal se encuentra el dominio cinasa, en él se destacan los aminoácidos Thr170 y Glu96 que participan en la activación por fosforilación de PLK4 y el funcionamiento de la actividad cinasa, respectivamente. Entre la CPB y el dominio cinasa se encuentra un interdominio que sirve de linker (“IDL”, por su abreviación en inglés). PB1 y PB2 son los dominios que más interacciones tienen con otras proteínas que favorecen el reclutamiento de PLK4 al centrosoma o la dimerización con otra PLK4. El dominio PB3 es el sitio de unión de STIL, el regulador negativo de PLK4 en el centrosoma. Imagen obtenida de (Zitouni *et al.*, 2014 y Migueles-R, tesis maestría, 2018).

Los niveles de PLK4 aumentan conforme avanza el ciclo celular, siendo la mitosis la etapa en la que existe la mayor cantidad de su transcrito (Winkles and Alberts, 2005), sin embargo, es difícil detectar la proteína a partir de lisados celulares, por esta razón, se utilizan centrosomas concentrados obtenidos por ultracentrifugación para su detección (Habedanck *et al.*, 2005), por consiguiente, resulta difícil estudiar a PLK4 a niveles endógenos.

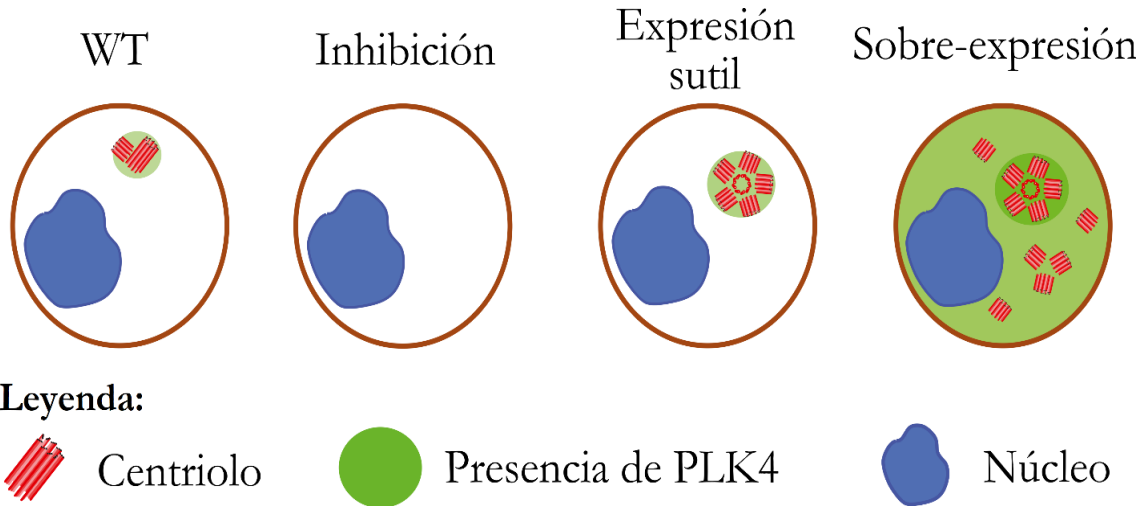


Figura 4 PLK4 es el regulador maestro de los centrosomas. En el estado WT, PLK4 se concentra en el centrosoma, generando la duplicación de cada centriolo (biogénesis canónica). En células cuyo centrosoma ha sido eliminado y se inhibe a PLK4, no ocurre la biogénesis de nuevos centriolos. Una expresión sutil de PLK4 generará múltiples centriolos en un mismo centrosoma (Amplificación canónica), y una sobre-expresión resulta en la síntesis *de novo* de centriolos. Imagen adaptada de (Lopes *et al.*, 2015)

1.1.3 La fosforilación de la Thr170 regula el umbral de activación de PLK4

Para demostrar la *trans*-fosforilación de PLK4, se inhibió la traducción de *plk4* por iRNAs, y se expresó heterológamente de la versión silvestre y la versión catalíticamente inactiva de PLK4 (PLK4-WT y PLK4-KD, respectivamente), a la vez que evaluaron por anticuerpos fosfoespecíficos, el estado de fosforilación de la Thr172 (el equivalente a Thr170 humana en moscas). En la condición que sólo expresó PLK4-WT, se detectó la fosforilación de la Thr172, en cambio, en cultivos que expresaron a PLK4-KD, no se detectó la fosforilación de Thr172. En los cultivos que expresaron ambas condiciones, ocurre la fosforilación de PLK4-WT y PLK4-KD, lo que indica que una PLK4 es capaz de fosforilar a otra PLK4 (**Fig. 5 A, B**). La cinética de la *trans*-autoactivación de PLK4 sugiere la presencia de un umbral crítico de activación; por debajo de ese umbral, son pocas las moléculas de PLK4 activas, mientras que por encima del umbral, aumenta drásticamente el número de PLK4s activadas (Lopes *et al.*, 2015).

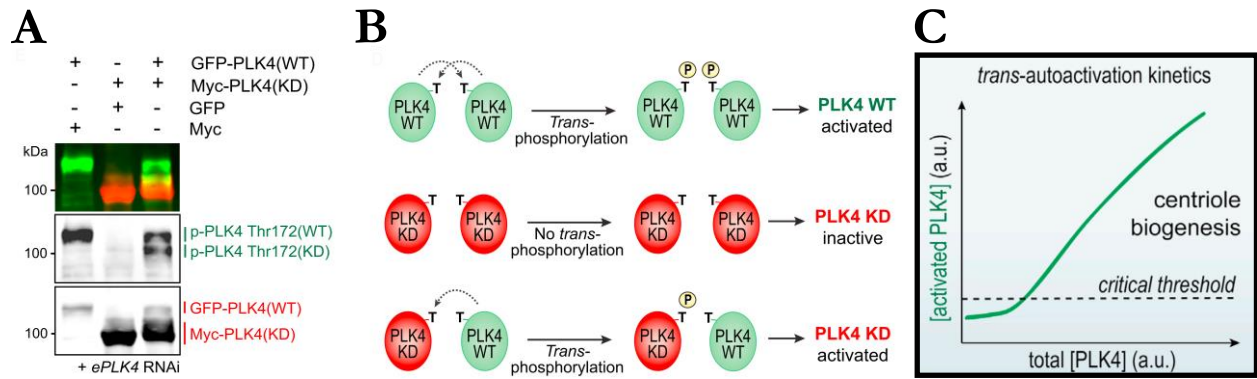


Figura 5 *trans*-autoactivación de PLK4 (**A**, **B**) PLK4 se auto-fosforila en *trans*. La expresión únicamente de PLK4-WT (GFP-PLK4) resulta en ocurre la fosforilación de la Thr172, cuando sólo se expresa PLK4-KD (Myc-PLK4), la Thr172 no se fosforila. La co-expresión de las versiones WT y KD de PLK4, lleva a la fosforilación de la Thr172 todas las isoformas, lo que indica que una PLK4 fosforiló a otra PLK4. La activación de PLK4 depende de su concentración, una vez que se rebasa el umbral de activación, se generará un mayor número de moléculas de PLK4 activas. Imagen adaptada de (Lopes *et al.*, 2015).

Para demostrar el mecanismo de activación de PLK4, fue necesario sobre-expresar las isoformas silvestre y mutante en las células. Sin embargo, un estudio más detallado de las funciones de PLK4 requiere de seguir a esta cinasa a concentraciones endógenas y a nivel de célula única. Para resolver este problema, nosotros planteamos generar por CRISPR/nCas9, una línea celular que exprese en locus endógeno una versión roja fluorescente de PLK4 e inducir su transcripción con luz azul mediante el uso de un sistema optogenético basado en CRISPR/dCas9. En conjunto, ambas herramientas nos permitirán tener una estrategia para estudiar a PLK4 a niveles endógenos.

1.2 CRISPR/Cas9 e inducción de genes endógenos

1.2.1 CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR/Cas9 es una herramienta utilizada para la edición de genomas, aunque su uso también se extiende a modificaciones epigenéticas, visualización de genes, etc. (Doudna and Charpentier, 2014). El sistema CRISPR/Cas9 emplea a la endonucleasa Cas9 que se asocia a un RNA guía (“*single guide RNA*” (*sgRNA*), por su nombre en inglés) que le indica el sitio de corte del DNA. Los primeros 20 nucleótidos en el extremo 5’ del sgRNA le dan la especificidad a Cas9, a esa región se le conoce como espaciador. El complejo Cas9:sgRNA requiere que esté presente la secuencia PAM (“*protospacer adjacent motif*”, por su nombre en inglés) en el sitio de corte. Cas9 hace un corte romo entre en el 3^{er} y 4^{to} nucleótido localizado río arriba a la secuencia PAM (**Fig. 6A**). Una vez que se realiza el corte de doble cadena en el genoma, en eucariontes, es posible reparar el corte por dos mecanismos, unión de extremos no homólogos (“*Non-Homologous End Joining*” (NHEJ), por su nombre en inglés) y/o reparación mediada por homología (“*Homology directed repair*” (HDR), por su nombre en inglés) (F Ann Ran *et al.*, 2013; Doudna and Charpentier, 2014). NHEJ es utilizado para knock-out y consiste en dejar que la célula repare ese corte a costa de generar *inserciones* y *deleciones* de manera azarosa (“*INDEL*”, por sus siglas en inglés), que, cuando ocurren en el marco abierto de lectura de un gen, resultan en la aparición de codones de paro prematuros o en un cambio en el ORF, generando el knock-out (**Fig. 6B**). HDR se utiliza para hacer mutaciones puntuales o el knock-in de una secuencia de interés; este mecanismo requiere de un DNA donador que brinde la secuencia a integrar (**Fig. 6B**).

Cuando se usa Cas9 silvestre, existe la posibilidad de que el sgRNA hibride en sitios inespecíficos, conocidos como “*off-target*”, dando como resultado la generación de INDELS en locus (loci) no deseados en el genoma. La versión Cas9 nickasa (nCas9) no presenta la generación de INDELS a causa de un off-target, esto se debe a que esta enzima genera un nick en el DNA blanco, el cual será reparado por la célula sin añadir o remover nucleótidos. Para utilizar CRISPR/nCas9 como herramienta de edición de genomas, es necesario utilizar dobles nickasas cuya posición sea lo más cercano entre ellas, simulando un corte de doble romo de doble cadena para proceder con los mecanismos de reparación (NHEJ o HDR) según lo requiera el experimento (**Fig. 6C**) (F. Ann Ran *et al.*, 2013; Chiang *et al.*, 2016).

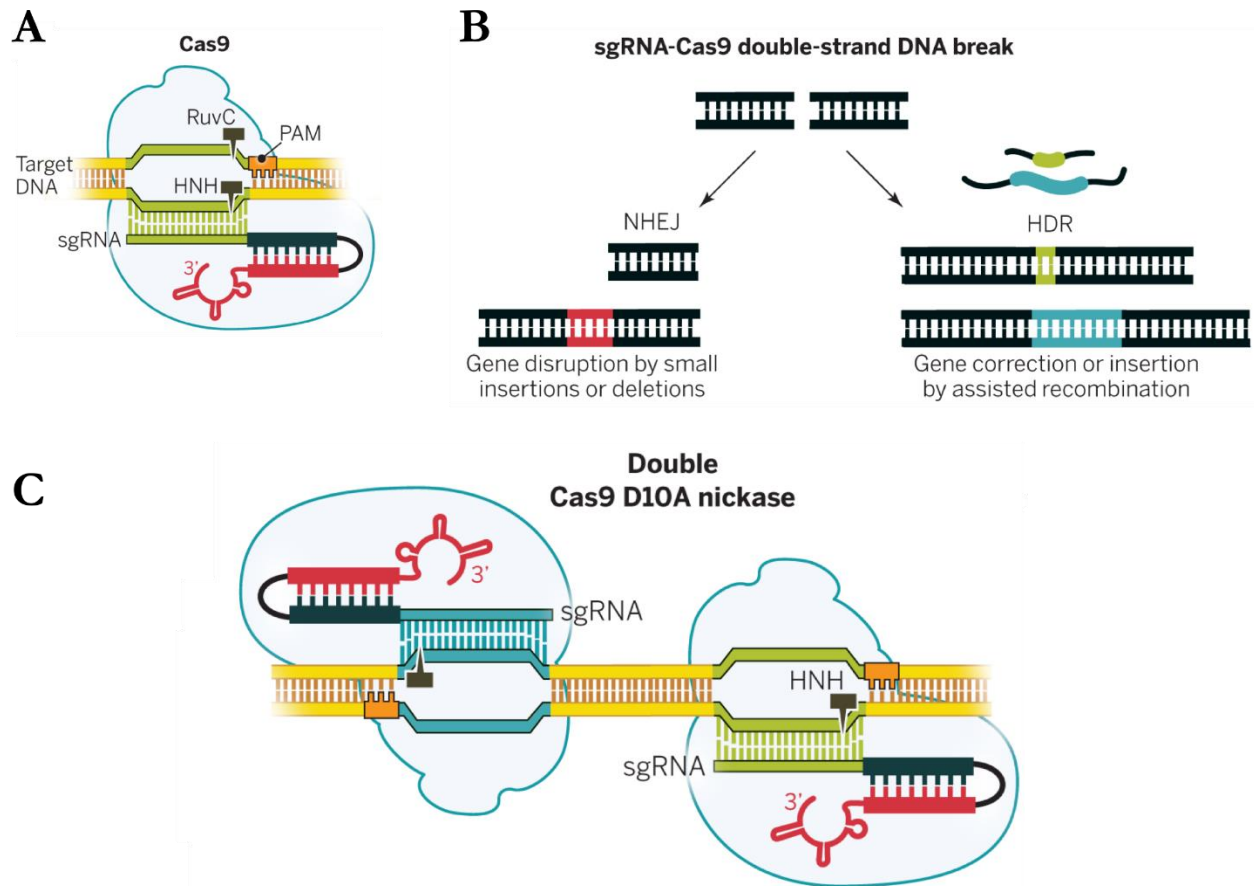


Figura 6 Sistemas CRISPR/Cas9 **(A)** Sistema CRISPR/Cas9 tradicional. El sistema CRISPR/Cas9 requiere de realizar un corte de doble cadena en el locus a editar, para lograr esto, Cas9 es una endonucleasa programable por sgRNAs. Para que ocurra un corte, es necesaria la presencia de la secuencia PAM (5' – NGG – 3') en la hebra complementaria a la hebra que hibrida con el sgRNA en el locus a editar. Los dominios RuvC y HNH de Cas9 son los encargados de realizar un corte como en el locus de interés **(B)** Reparación de cortes de doble cadena en el DNA. Si no existe una molécula que recombine con el DNA, la reparación ocurrirá vía NHEJ. Esto genera inserciones y deleciones de nucleótidos que, en caso de ocurrir en un marco abierto de lectura, resultará en el knock-out del gen. Si existe un DNA exógeno con secuencias homólogas (DNA donador), la reparación ocurrirá vía HDR. **(C)** Sistema CRISPR/nCas9. Este sistema simula un corte como de doble cadena en el locus a editar, y una vez hecho el corte en el DNA blanco, se puede generar el knock-out o un knock-in.

1.2.2 Sistema CRISPR/dCas9 optogenético para la inducción de genes por luz azul

La optogenética es una herramienta interdisciplinaria que combina la óptica con la genética para controlar, a través de la luz, procesos celulares definidos (Deisseroth, 2018). El sistema optogenético basado en CRISPR/dCas9 para la activación de la transcripción de genes consiste en dos componentes, un ancla (dCas9-CIB1) y un activador (p65-CRY2). El ancla está formada por la versión catalíticamente inactiva de Cas9 (dCas9) fusionada a CIB1, y su función es posicionarse mediante el sgRNA río arriba del gen a regular y ser el sitio de dimerización con el activador en presencia de luz azul. El activador está compuesto por el factor de transcripción de p65 fusionado a CRY2; esta proteína de fusión carece de un dominio de unión al DNA, por lo que no es capaz de inducir la transcripción por sí sola. En presencia de luz azul, CIB1 y CRY2 heterodimerizan, lo que conlleva al activador a ser reclutado en el locus en el que se posiciona el ancla y, por consiguiente, a que se transcriba el gen de interés (Fig. 7)

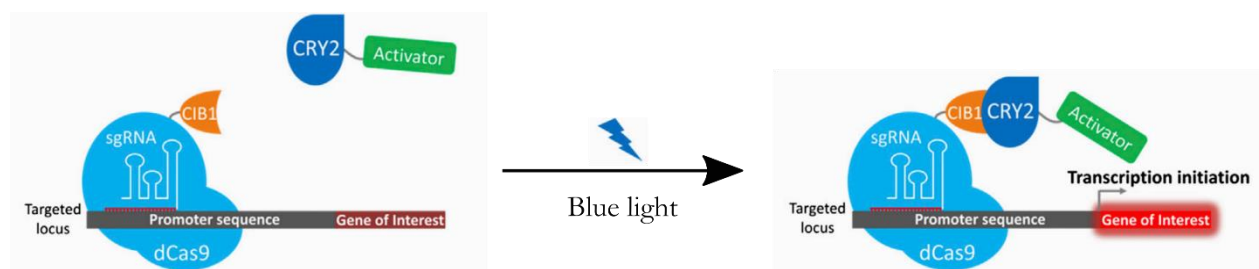


Figura 7 Sistema optogenético CRISPR/dCas9. El sistema optogenético induce la transcripción del gen de interés en presencia de luz azul. El ancla (dCas9-CIB1) permite que el activador (p65-CRY2) sea reclutado río arriba del gen de interés cuando son expuestos a luz azul, lo que permite que se induzca la transcripción.

2. Justificación

Si bien se sabe que PLK4 participa de manera importante en la formación de centriolos, para entender mejor su función es necesario determinar el número de moléculas de PLK4 necesarias para la formación de estos organelos. Esto requiere desarrollar nuevas metodologías para inducir y rastrear a PLK4 endógena.

3. Hipótesis

Se puede estudiar la función de PLK4 endógena en células vivas, sin utilizar expresión heteróloga.

4. Objetivos

General

Cuantificar los niveles endógenos de PLK4 en el centrosoma mediante la expresión regulada de *plk4* endógena y evaluar sus implicaciones en la génesis de centriolos.

Específicos

1. Generar mediante CRISPR/nCas9 una línea celular AD293 que exprese PLK4-mRuby3 en el locus endógeno de *plk4*.
2. Construir un sistema de iluminación de luz azul para células en cultivo y emplearlo en conjunto con el sistema optogenético CRISPR/dCas9 para la inducción transcripcional de *plk4* endógena y evaluar la formación de nuevos centriolos.

5. Materiales y métodos

5.1 Medios y soluciones

5.1.1 Buffer TE 10X

- 100 mM Tris-Cl
- 10 mM EDTA (pH 8.0)

Esterilizar mediante autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

5.1.2 Medio LB

Pesar los siguientes reactivos

- NaCl 4 g
- Triptona 4 g
- Extracto de levadura 2 g

Mezclar los reactivos en un vaso de precipitado y aforar a 400 ml con agua destilada. Esterilizar por autoclave 121 °C durante 20 minutos.

5.1.3 Medio LB-agar

A partir de medio LB líquido no estéril, añadir 2% de agar en polvo. Autoclavear a 121 °C durante 20 minutos. El medio LB-agar se puede guardar hasta por cuatro meses. Cuando sea necesario utilizarlo, se funde en el microondas y se deja enfriar hasta que sea tolerable al tacto, en ese momento se le añade el antibiótico de interés (en caso de ser necesario) y se vierte en las cajas de Petri.

5.1.4 Medio D10

- DMEM 1X
- Antibiótico y antimicótico
- Suero Fetal Bovino 10 %

Preparar en campana de flujo laminar.

5.1.5 Medio de congelamiento

- Suero Fetal Bovino 90%
- DMSO 10%

Preparar en campana de flujo laminar.

5.1.6 Solución FACSFlow 5X

- | | |
|---------------------------------|----------|
| • Cloruro de sodio | 203.00 g |
| • Cloruro de potasio | 007.00 g |
| • Cloruro de litio | 010.75 g |
| • Fosfato de potasio monobásico | 006.50 g |
| • Fosfato de sodio dibásico | 058.75 g |
| • EDTA disódico | 009.00 g |

Aforar a 5 litros. Para su uso, llevar a 1X y esterilizar por filtración.

5.2 Protocolos

5.2.1 Preparación de bacterias electrocompetentes

A partir de un cultivo de *Escherichia coli* DH5 α crecido toda la noche a 37 °C/200 rpm, se re-sembró en microtubos de 1.5 ml (100 μ l de inóculo y 900 μ l de medio LB). Los cultivos fueron crecidos en un baño seco con agitación (Digital Heating Shaking Drybath, Thermo Scientific) a 37 °C/900 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica de \sim 0.6, fueron centrifugados a 9000 rpm durante 1 minuto. Se desechó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en 1 μ l de agua destilada estéril, se repitió el lavado. Las bacterias fueron resuspendidas en 50 μ l de glicerol al 10% estéril y guardadas a -80 °C hasta su uso. (Protocolo adaptado de Tu *et al.*, 2016).

5.2.2 Transformación bacteriana

Al tubo con las bacterias electrocompetentes, se les añadió 100 – 300 ng del plásmido de interés y se homogeneizó por pipeteo. La solución fue transferida a una cubeta de electroporación (Gene Pulser 0.2 cm, Bio-Rad), procurando no generar burbujas, y las bacterias fueron electroporadas a 2500 V (Eppendorf electroporator 2510). A la cubeta de electroporación se le añadió 1 ml de medio LB para recuperar a las bacterias y posteriormente fueron transferidas a un tubo de ensayo de 100 x 13 mm. El cultivo fue incubado durante 1 hora a 37 °C/300 rpm. Pasado ese tiempo, las células fueron sembradas en cajas de LB-sólido con antibiótico y crecidas a 37 °C toda la noche. Las colonias aisladas se sembraron en 3 ml de medio LB con antibiótico e incubadas a 37 °C/200 rpm durante 16 h. Se purificó el plásmido por miniprep (ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit, Zymo research) y se corroboró el plásmido por ensayos de restricción.

5.2.3 Preparación de crioviales bacterianos

El cultivo a criopreservar se incubó a 37 °C/200 rpm durante toda la noche. A la mañana siguiente, en un criovial, se añadieron 800 μ l de glicerol al 80% estéril y 800 μ l del cultivo de interés. Se mezcló por inversión y se guardó el criovial a -80 °C para su preservación.

5.2.4 Recepción de plásmidos provenientes de Addgene

Addgene envió los plásmidos desecados en papel filtro. La región en la que se encontraban fue cortada con un cutter y resuspendidos en 30 μ l de buffer TE. Se dejó reposar durante al menos 10 minutos y se procedió a realizar la transformación bacteriana.

5.2.5 Síntesis de oligonucleótidos

Todos los primers reportados en este trabajo, fueron sintetizados en la *Unidad de Síntesis y Secuenciación* (USS) del *Instituto de Biotecnología* de la UNAM. A partir del stock que entrega la USS, los primers fueron diluidos a una concentración de 10 μM (10 pmol/ μl). Para detalles de secuencias, revisar el material suplementario.

5.2.6 PCR de punto final

Todas las PCRs, fueron realizadas con la enzima Phusion DNA polimerasa (Thermo Scientific). Las condiciones generales para la preparación de la PCR se describen más adelante (Tabla 1). La T_m de cada oligonucleótido se calculó con el software provisto por el fabricante:

- <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>.

Todas las PCRs se realizaron en un volumen final de 50 μl , tal y como indica la siguiente tabla:

Reactivo	Volumen (μl)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (s)	Ciclos
Buffer HF 5X	10.0	98.0	120	1
ddH₂O	32.5	98.0	10	15
dNTPs 10 mM	1.0	T_m	30	
Primer fw 10 μM	2.5	72.0	30 s/(1 kb + 30 s)	
Primer rv 10 μM	2.5	72.0	600	1
DNA molde	1.0	4.0	10	1
Phusion DNA pol	0.5	4.0	∞	1

Tabla 1 Condiciones generales de PCR de punto final.

5.2.7 Síntesis del DNA donador PLK4-mRuby3

PLK4-mRuby3 fue sintetizada a partir de cuatro fragmentos (nombrados A, B, C y D). Los amplicones fueron purificados de gel (GeneJet Gel Extraction kit, Thermo Scientific) y luego unidos covalentemente por OE-PCR (Wäneskog and Bjerling, 2014). Cada amplicon fue utilizado de manera equimolar (0.1 pmol) y se unieron en parejas: es decir ($A + B \rightarrow AB$), ($C + D \rightarrow CD$) y ($AB + CD \rightarrow ABCD$). PLK4-mRuby3 fue clonado mediante CPEC en el backbone del vector sgRNA1_Tet-inducible luciferase reporter (Addgene #3226) (Quan and Tian, 2014) y la construcción se corroboró por secuenciación. Al plásmido que contiene a PLK4-mRuby3 se le llamó **PLK4-HDR**. Las condiciones de cada OE-PCR se desglosan en la sección 10.1 del material suplementario.

5.2.8 Ensayos de restricción

Todos los ensayos de restricción de DNA se realizaron de la siguiente manera: 0.5 μ l de enzima (Thermo Scientific), 2 μ l de DNA purificado, 2 μ l de buffer de restricción y 15.5 μ l de agua destilada. La reacción se dejó incubando durante 2-4 h a temperatura óptima de cada enzima según indica el fabricante y se inactivó la digestión a 80 °C durante 20 minutos.

5.2.9 Subcultivo de células eucariontes

Se utilizaron células AD293, crecidas en cajas de 35 mm en medio D10. Cuando las células alcanzaron el 80-90 % de confluencia se le hizo el subcultivo. Se les aspiró el medio y se realizó un lavado con PBS 1X y se volvió a retirar el medio, al cultivo se le añadió 1 ml de tripsina 1X, se dejó incubar durante 5 minutos a 37 °C. Para inactivar la tripsina se le añadió 1 ml de medio D10 y las células que seguían en monocapa fueron disgregadas mecánicamente. El cultivo fue sembrado en una caja de 35 mm nueva con una dilución 1:10.

5.2.10 Criopreservación y descongelamiento células eucariontes

Las células a criopreservar se sembraron en una caja de 100 mm. Una vez que alcanzaron el 80-90 % de confluencia, se disgregaron según indica el protocolo del subcultivo. Las células individuales se centrifugaron a 400 G durante 5 minutos, se les aspiró el medio y se resuspendieron en 8 ml de medio de congelamiento, se alicuotó 1 ml del cultivo a cada criovial y se rotuló con el nombre de la línea celular, el número de pase, fecha (mes/año) e iniciales de la persona que los preparó. Se llevaron a -80 °C para su preservación.

Para descongelar un cultivo, se preparó una caja de 100 mm con 10 ml de medio D10, las células se descongelaron en baño maría sin sumergir la tapa. Justo cuando se ha descongelado el último hielo, se depositó el cultivo en la caja de 100 mm. Se incubaron las células a 37 °C y 5% de CO₂ hasta que el cultivo alcanzó a una confluencia de 70-80 %, en ese momento se le realizó el subcultivo.

5.2.11 Transfección células eucariontes

En campana, se rotularon dos tubos eppendorf estériles (D y L). En el tubo L, se mezclaron 125 µl de Opti-MEM y 3.75 µl de Lipofectamina 3000, la mezcla se agitó por Vortex durante tres segundos. En el tubo D, se añadió 125 µl de Opti-MEM, 2.5 µg del DNA a transfectar y 5 µl del reactivo P3000. Se mezclaron ambos tubos y se dejó reposar durante 15 minutos. Durante la incubación, se le hizo un cambio de medio a las células, al terminar los 15 minutos se le añadió la mezcla de lipofectamina::DNA al cultivo.

5.2.12 Extracción de DNA genómico

El DNA genómico fue extraído con kit según las instrucciones del fabricante (Quick-DNA Miniprep Plus, Zymo Research). Para los estudios de genotipificación, las células disgregadas fueron alicuotadas en 20 µl de agua mili-Q, se calentaron a 98 °C durante 10 minutos, se enfriaron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 13,000 RPM durante 10 s. Se tomó 1 µl del sobrenadante para la PCR.

5.2.13 Cambio de sgRNAs

Se digirieron 2 µg del plásmido AIO-GFP (Addgene #74119) con la enzima BbsI y se purificó la reacción con DNA Clean and Concentrator (Zymo research). El plásmido digerido y purificado fue fosfatado, se tomaron de 0.2 a 1 µg (según la concentración obtenida de la purificación) del vector linealizado, 2 µl de Anza 10X buffer, 1 µl de Anza fosfatasa alcalina (Thermo Scientific) y se aforó a 20 µl con agua destilada. La reacción de fosfatación fue incubada a 37 °C durante 15 minutos e inactivada a 80 °C durante 5 minutos.

Por otro lado, el espaciador del sgRNA se sintetizó a partir de un par oligonucleótidos de 24 bases en donde las primeras cuatro bases del extremo 5' son los extremos compatibles al sitio de restricción de BbsI y los 20 nucleótidos remanentes le confieren especificidad al sgRNA. Los oligonucleótidos fueron fosforilados con Anza T4 PNK (Thermo Scientific) en tubos independientes, cada reacción utilizó 50 pmol de cada oligonucleótido, 1 µl de Anza T4 PNK, 2 µl de Anza 10X PNK buffer y se aforaron a 20 µl con agua destilada. La fosforilación se llevó a cabo a 20 °C durante 15 minutos y se inactivó a 80 °C durante 5 minutos. Al terminar la reacción de fosforilación, los oligonucleótidos de cada tubo fueron mezclados y calentados a 98 °C durante 2 minutos y enfriados lentamente a 4 °C con una rampa de enfriamiento de 0.1 °C/s en el termociclador.

La ligación del espaciador con el vector linealizado se realizó con Anza T4 DNA Ligase Master Mix (Thermo Scientific), se pusieron 5 µl del espaciador, 5 µl del vector fosfatado, 5 µl de agua destilada y 5 µl de Anza T4 DNA Ligase Master Mix. Se toman 2.4 µl de la reacción de ligación para la transformación bacteriana. Los plásmidos con el sgRNA de interés fueron comprobados por digestión, el vector parental posee un sitio BamHI, mientras que los modificados pierden ese sitio. Para modificar el segundo sgRNA del vector AIO-GFP, el protocolo es el mismo excepto que en vez de utilizar BbsI, se usa BsaI y para corroborar la clonación se utiliza ClaI. Los plásmidos fueron mandados a secuenciar para su confirmación. Al plásmido que contiene los sgRNAs específicos para PLK4 se le llamó **AIO-PLK4**.

5.2.14 Transfección del sistema CRISPR/nCas9

En un cultivo de células AD293 crecido a 70-80 % de confluencia, se transfectó con 1 µg de cada plásmido PLK4-HDR y AIO-PLK4, y se dejó incubando durante 48 h y se le hizo sub-cultivo según el tipo de selección de interés:

Para las células crecidas por dilución seriada, se sembraron 4000 células en el primer pozo de una placa de 96 pozos. La dilución fue de 1:2, primero se diluyeron de manera horizontal (A1 - H1) y posteriormente de manera vertical (A1 – A12, B1 – B12, ..., H1 – H12). Cada pozo contenía 100 µl de medio D10, a excepción del pozo A1 donde se partió de 200 µl. Se dejó crecer a las células y se sub-cultivaron en una placa de 35 mm a 37 °C y 5% CO₂ hasta alcanzar una confluencia de 70-90 %, en ese momento se les extrajo el DNA para corroborar la edición, por genotipificación.

Para obtener una placa de 96 pozos a una concentración de 0.5 célula por pozo, se preparó un stock de 60 células en 12 ml de medio D10. La placa de 96 contenía 100 µl de medio D10 y se les añadió 100 µl del stock de células. La placa se incubó a 37 °C, 5% CO₂ hasta alcanzar una confluencia de 70-90 %. Las células se observaron por microscopía confocal (FV1000 Olympus) en busca de células con fluorescencia roja.

Las células analizadas y separadas por citometría de flujo se prepararon a una concentración de 1×10^6 células/ml, en un tubo Falcon de 15 ml estéril al citómetro de flujo FACS Aria Fusion (BD Biosciences). El uso del equipo estuvo a cargo de la Biol. Erika Isabel Melchy Perez. Se prepararon ocho placas de 96 pozos en donde cada pozo fue preparado con 100 µl de medio D10 + 10% SFB + 1X antibiótico/antimicótico y se sembró una célula positiva para fluorescencia verde (marcador del vector AIO-PLK4), las células se incubaron durante un mes con cambio de medio cada semana a partir de la segunda semana del día de sembrado.

5.2.15 Diseño e impresión en 3D

El modelo en 3D del iluminador de luz azul fue diseñado en Fusion 360 (Autodesk Inc). Dicho modelo se exportó como .stl y cargado en Ultimaker Cura 4.0 (Ultimaker) en donde se generó el archivo de coordenadas para la impresión en 3D. Todas las partes fueron impresas a una resolución de 0.1 mm, con un “infill” de 5%. Cuando fue necesario, se imprimieron con material de soporte, el cual fue removido al terminar la impresión.

5.2.16 Regulación de genes por CRISPR/Cas9 optogenético

Las células AD293 fueron sembradas en una placa de 35 mm a una densidad celular de 500,000 células por placa. A las 24 horas de la siembra, se transfectó el cultivo con los plásmidos NLS-dCas9-trCIB1 (addgene #64119), NLSx3-CRY2PHR-p65 (addgene #64124), sgRNA1_Tet-inducible Luciferase reporter (addgene #64161), Tet-inducible mCherry reporter (addgene #64128). El cultivo transfectado fue incubado a 37 °C y 5% de CO₂ durante 20 h y posterior a ese tiempo, se expuso a luz azul con el iluminador JoGio (descrito más adelante en este trabajo). A las 24 h de iluminación, las células fueron observadas por microscopía confocal (FV1000 Olympus upright), o por citometría acoplada a microscopía (Amnis ImagesStreamx MK II). En ambos casos, se utilizaron los filtros para detectar fluorescencia roja. Las imágenes recolectadas por microscopía confocal se analizaron con FIJI (Rueden *et al.*, 2017) y las imágenes provenientes del citómetro de flujo fueron analizadas con IDEAS (Luminex Corp).

5.2.17 Inducción de la transcripción de *plk4* por el sistema optogenético

Las células AD293 fueron transfectadas con los plásmidos NLS-dCas9-trCIB1, NLSx3-CRY2PHR-p65 y pEGFP-Centrin2 (Nigg UK185) (Addgene #41147). La elección de los espaciadores para la inducción de *plk4* fue a través de la página web: <http://crispr-era.stanford.edu/>. El vector que expresa el sgRNA apto para los experimentos de optogenética fue llamado OPT-PLK4. Los cultivos transfectados se dejaron incubar durante 20 horas a 37 °C y 5 % CO₂. Pasado ese tiempo, se montaron en el iluminador JoGio con su respectivo LED (alta y baja potencia) y se indujo la transcripción durante 24 horas. Como control negativo se usó un cultivo transfectado con los mismos plásmidos, pero aislado de la luz. Al terminar la inducción, las células se llevaron al microscopio confocal (Olympus FV1000 upright), para su visualización se usó el objetivo 60X de inmersión en agua, NA 1.1 y los filtros para detectar la fluorescencia verde, emitida por Centrina-EGFP. El análisis de imágenes y la medición del área de los centrosomas se realizó en FIJI (Rueden *et al.*, 2017). A los datos recolectados, se le hizo una prueba de ANOVA para detectar diferencias significativas entre las diferentes condiciones con el software PRISM 8 (Graphpad).

Nota: Al momento de diseñar el experimento esa era la única herramienta que contaba con algoritmos para esta estrategia. Durante la escritura de este manuscrito, nuevas plataformas han incorporado algoritmos capaces de predecir espaciadores útiles para esta aplicación. En caso de que el lector esté interesado en activar la transcripción con CRISPR, se recomienda revisar otras las opciones disponibles, tales como:

- <https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design-crisprai?mechanism=CRISPRa>
- <http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html>

6. Resultados y discusión

La estrategia experimental consistió en dos etapas, la primera fue generar una línea celular que exprese en locus endógeno una versión roja fluorescente de PLK4 mediante CRISPR/nCas9. La segunda fue inducir la transcripción de PLK4 con el uso de luz azul por medio un sistema optogenético basado en CRISPR/dCas9.

6.1 Obtención de la línea celular *plk4-mRuby3*^{+/+}

Para generar la línea celular por CRISPR/nCas9 se requiere de seleccionar y sintetizar dos sgRNAs para realizar el corte en el locus de interés y el DNA que va a recombinar (de ahora en adelante, llamado como “DNA donador”). Se escogió un par de sgRNAs específicos para el gen de *plk4* humana (Gene ID: 10733). Los algoritmos sugirieron utilizar el extremo 5' del gen, pero PLK4 posee tres isoformas, en donde todas las variaciones ocurren en el extremo N-Terminal. Las isoformas son conocidas como isoforma 1 (Sillibourne *et al.*, 2010), 2 y 3 (Ota *et al.*, 2004), siendo la isoforma 1 la más estudiada, ya que las isoformas 2 y 3 sólo han sido reportadas en un estudio de transcriptómica y se desconoce su papel fisiológico de las isoformas 2 y 3 de PLK4. La isoforma 2 carece de 31 aminoácidos que corresponde al tercer exón de la isoforma 1, mientras que la isoforma 3 carece de los primeros 41 aminoácidos que sí poseen las isoformas 1 y 2 (**Fig. 8A**). Para evitar que exista una mezcla entre isoformas fluorescentes y no fluorescentes de PLK4, se optó por realizar la integración en el extremo 3' debido a que, en todas las isoformas, se encuentra presente el último exón. A diferencia del extremo 5', los algoritmos no encontraron secuencias de alta especificidad en el extremo 3'; se seleccionó al mejor sitio blanco de esa región que está posicionado en el último exón. Los espaciadores escogidos fueron 5'-ATTAACCACCGCGCCTGTCC-3' y 5'-GCACTTTGGGAGGCCAAGGG-3', y se clonaron en el vector AIO-GFP, este vector expresa de manera constitutiva a Cas9 nickasa y ambos sgRNAs (Chiang *et al.*, 2016) (**Fig. 8B**).

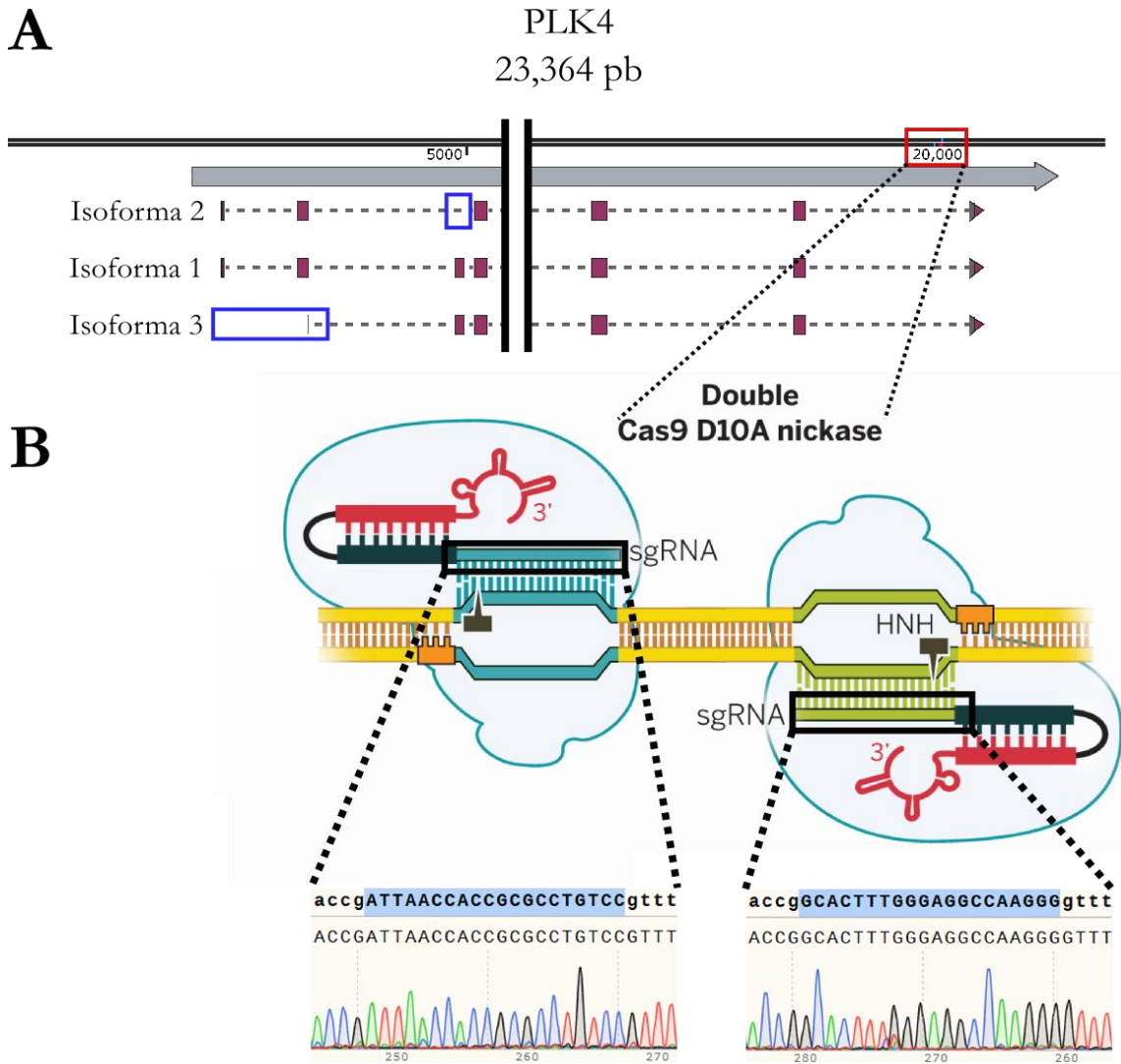


Figura 8 Estrategia de edición con CRISPR/Cas9 nickasa (A) Isoformas 1, 2 y 3 de *plk4* destacadas en un recuadro azul. (B) Secuencias de sgRNAs elegidas para realizar el corte en el gen endógeno de *plk4* por el sistema de dobles nickasas.

6.2 Recombinación homóloga entre *plk4* y *mRuby3*

Para contener contra la poca abundancia de PLK4 a nivel de célula única, escogimos a mRuby3 como la proteína fluorescente a introducir en fase con el gen de *plk4* en su extremo 3'. Las propiedades fotofísicas de mRuby3 la hacen una proteína altamente brillante y foto-estable ($EC = 128,000 M^{-1} cm^{-1}$, $QY = 0.45$, $t_{1/2} = 349$ s y brillo = 57.6) (Bajar *et al.*, 2016), lo que nos permitirá rastrear a PLK4 con una mayor confianza que con las proteínas fluorescentes tradicionales (e.g. EGFP).

Para la recombinación homóloga, se sintetizó un DNA quimérico, que contiene la secuencia del extremo 3' de *plk4* unida covalentemente al gen de *mRuby3*. Esta construcción es el DNA donador. Para evitar que el complejo CRISPR/nCas9 corte al donador, removimos las secuencias blanco, así mismo, se le añadió un linker flexible para evitar un posible impedimento estérico entre PLK4 y mRuby3, y se le agregó la secuencia *myc* para facilitar su detección por ensayos de inmunolocalización.

El DNA donador fue sintetizado a partir de cuatro fragmentos (**Fig. 9A**):

- Fragmento A: Río arriba del sitio de corte (896 pb).
- Fragmento B: Río abajo del sitio de corte, hasta el penúltimo codón de *plk4* (381 pb).
- Fragmento C: En este amplicón se encuentra *mRuby3*, pero se le añadió un linker flexible de GGGSGGGC y *myc* (823 pb en conjunto).
- Fragmento D: Incluye al 3'-UTR y 577 pb río abajo del gen de *plk4* (1298 pb en conjunto).

La unión covalente de los fragmentos A, B, C y D se utilizó OE-PCR (*overlap extension PCR*, por nombre en inglés) (Wäneskog and Bjerling, 2014). Esta técnica se basa en la unión de cada fragmento mediante micro-homologías de 15 - 30 pb que actuarán como cebador de la PCR, y a su vez hacer que la DNA polimerasa sintetice un amplicón correspondiente a la unión de ambos fragmentos. En este caso, el extremo 3' del fragmento A tiene micro-homología con el 5' del fragmento B, el fragmento B en su extremo 3' tiene homología con el 5' de fragmento C y así subsecuentemente. Primero, se ensamblaron los fragmentos A con B para generar AB. Por otro lado, se unió C con D para obtener CD. Los fragmentos AB y CD se unieron para generar el fragmento ABCD, formando así el DNA donador (**Fig. 9B**). Los resultados de la secuenciación indicaron que no ocurrieron rearrreglos en las microhomologías de unión en los fragmentos A con B, B con C y C con D (**Fig. S1A**), y que por lo tanto la construcción tiene la secuencia esperada.

En la literatura está reportado que la eficiencia de integración depende de la longitud de los brazos homólogos y que a partir de ~900 pb se alcanza el límite de integración dependiente de las homologías (Zhang *et al.*, 2017). Nuestro DNA donador posee 1,223 y 1,266 pb de homología izquierda y derecha respectivamente, por lo que nuestra construcción no está limitada por el tamaño de las secuencias homólogas. En conclusión, se sintetizó el DNA donador que no parece tener restricciones para recombinar con el gen endógeno de *plk4*.

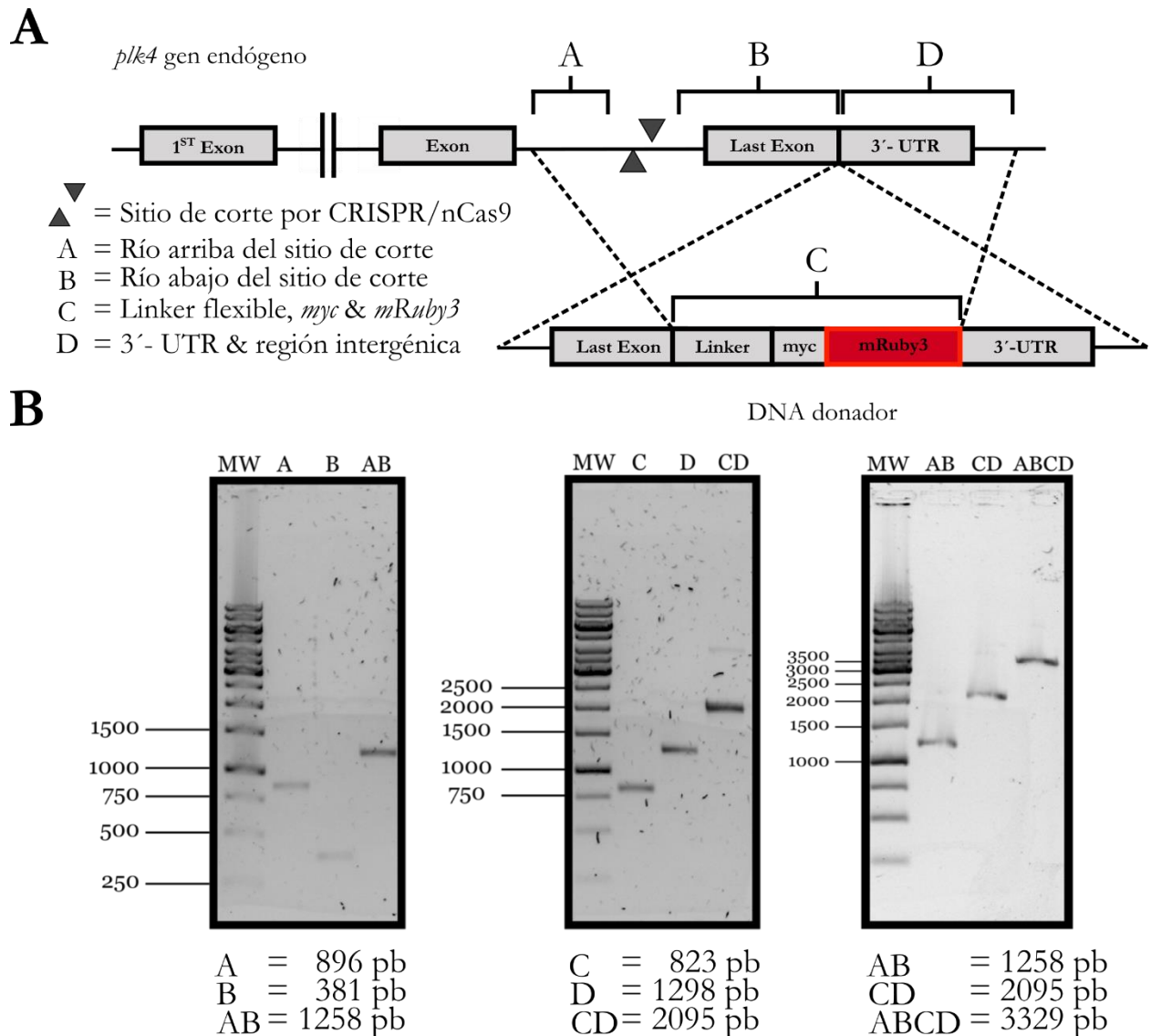


Figura 9 Síntesis de PLK4-mRuby3 (A) Diagrama esquemático de secuencias amplificadas para la síntesis del DNA donador. (B) Fragmentos sintetizados y unidos utilizados para la síntesis del DNA donador.

6.3 Selección de *plk4-mRuby3*^{+/+} en experimentos de dilución clonal, genotipificación y detección por fluorescencia.

Para detectar si ocurrió la integración de *mRuby3*, se realizó una PCR usando oligonucleótidos que hibridasen en secuencias externas que no forman parte del DNA donador. Para las células con el genotipo silvestre, el amplicón tendría un tamaño de 3,123 pb, mientras que para las clonas editadas se espera un amplicón de 3,733 pb (**Fig. 10A**). Para cultivar clonas independientes, se hicieron diluciones seriadas 1:2 y una vez que las células tuvieron una confluencia de 80 – 90 % fueron sembradas en una caja de 35 mm y a estas células se les extrajo el DNA para la genotipificación. En la mayoría de los casos, no se detectó la banda que corresponde al genotipo silvestre y a estos cultivos se les volvía a genotipificar, y no se detectó la clona editada (**Fig. 10B**).

Para no partir de cultivos heterogéneos, decidimos sembrar cultivos isogénicos. Para lograr esto, se preparó una placa de 96 pozos con células sembradas a una densidad de 0.5 células por pozo y cuando las células alcanzaron una confluencia de 80 – 90 % fueron observadas en un microscopio confocal (Olympus FV1000 invertido) con filtros para detectar la presencia de fluorescencia roja proveniente de *mRuby3*. Se encontró un pozo con señal roja (**Fig. 10C**) pero no correspondía al patrón característico de PLK4 en el centrosoma (**Fig. 2B**). Se descartó que la señal sea autofluorescencia ya que no todas las células lo presentaban. Se infiere que la señal roja podría ser PLK4-*mRuby3*, debido a que las células que presentaron la fluorescencia roja estaban redondas y despegadas, un fenotipo característico de estrés y que, en bajo esas condiciones, PLK4 es sobreexpresada (Chae *et al.*, 2005; Morettin *et al.*, 2009). Una segunda evidencia que sugiere que nuestras células estaban expresando a PLK4-*mRuby3* es el patrón visualizado. PLK4 puede formar agregados funcionales *in vitro* como *in vivo*, y su patrón de fluorescencia es similar al observado (Montenegro Gouveia *et al.*, 2019; Yamamoto and Kitagawa, 2019).

Es necesario hacer más experimentos para estar seguros que lo visto fue PLK4-*mRuby3*. Si PLK4 se está agrupando, formaría nuevos centriolos, por lo que un marcador de centrosomas nos mostraría que PLK4 está co-localizando en la misma posición que el marcador. En caso de que PLK4 estuviese formando un agregado funcional, el marcador de centrosomas no mostraría una co-localización, en ese situación se pueden expresar microtúbulos fluorescentes para corroborar que PLK4 sigue desempeñando su función es nucleador de microtúbulos. El cultivo que expresó la fluorescencia roja se le hizo pase, no obstante, no fue viable, por lo que no se logró aislar la clona editada.

Los experimentos previos contenían una mezcla de células transfectadas y no transfectadas; para trabajar únicamente con las células transfectadas, se seleccionó por citometría de flujo a las células que expresaron al marcador de transfección EGFP, PF cuyo gen se encuentra en el mismo plásmido que expresa a nCas9 y se sembró 1 célula por pozo en 8 cajas de 96 pozos y no se encontraron células viables en ninguno pozo. El hecho de no encontrar ninguna célula viable puede ser a causa del estrés que implica a las células pasar por el citómetro y/o que el realizar una edición en el gen de *plk4* bajo nuestras condiciones resulte letal.

A la fecha, sólo existen tres trabajos que lograron generar una edición genómica en el locus de *plk4* usando CRISPR/Cas9. El primero fue en 2014 en donde se cambió un nucleótido a *plk4*, los autores utilizaron Cas9 WT, ssDNA como DNA donador y una presión de selección a una droga para eliminar a la población no transfectada (Levine and Holland, 2014). En el segundo trabajo se reporta la creación de una línea celular *plk4*^{-/-} con el uso de lentivirus (Sredni and Tomita, 2017) la información de este trabajo es contradictoria ya que al ser *plk4* un gen esencial, su remoción es letal (Ko *et al.*, 2005). Por último, durante la escritura de este manuscrito, se reportó la generación de una línea celular que expresa PLK4-mClover^{+/-} (una versión verde fluorescente de PLK4), los autores, al igual que nosotros, escogieron el extremo 3' de *plk4* para hacer la edición y no lograron obtener la línea celular homocigota. Los autores no proporcionaron información detallada sobre generación de su línea celular (Takao, Yamamoto and Kitagawa, 2019).

En conclusión, no se logró obtener a la línea celular PLK4-mRuby3^{+/+} a través de las metodologías descritas en este trabajo. Se propone utilizar a Cas9 silvestre en conjunto con una presión de selección ante un fármaco para disminuir la población de células no transfectadas.

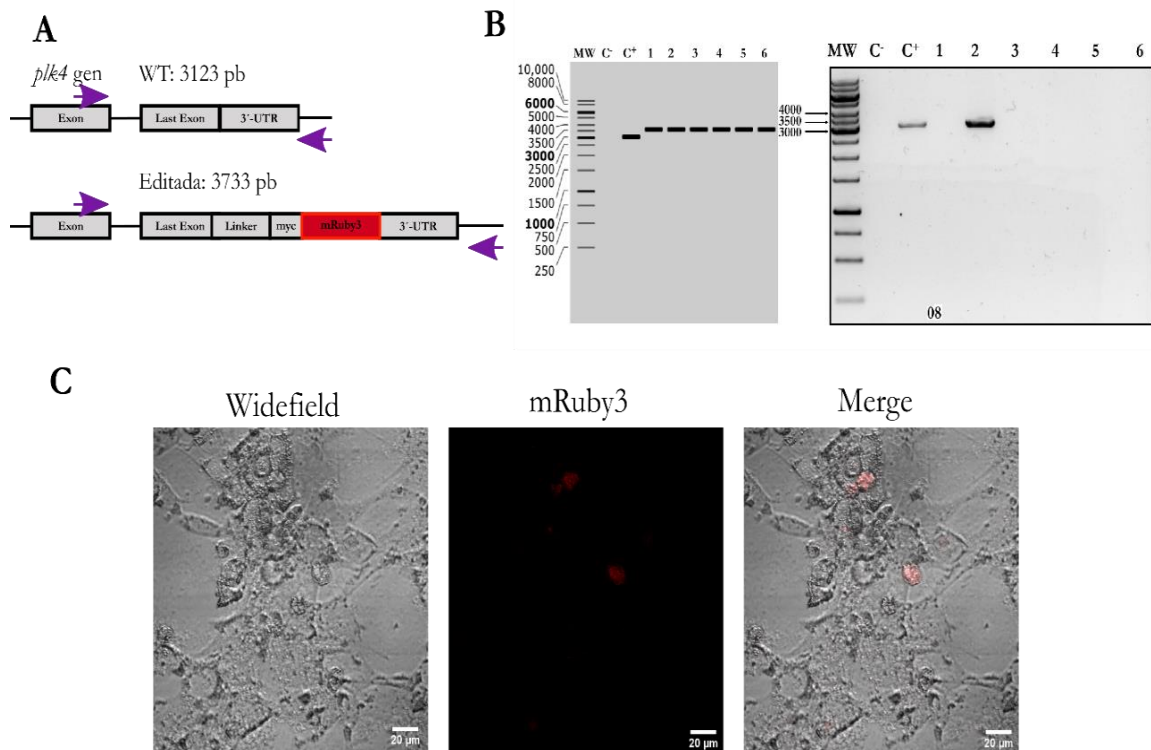


Figura 10 Aislamiento y confirmación de clonas editadas (A) Mapa del gen de *plk4* silvestre y con la edición genómica. Se indica el tamaño y posiciones de primers de confirmación (flechas moradas). (B). Simulación digital (panel izquierdo) y resultado experimental de genotipificación (panel derecho) (MW: Peso molecular (molecular weight por su nombre en inglés), C: Control negativo, C⁺: Control positivo, 1-6: células genotipificadas) (C) Detección por fluorescencia de PLK4-mRuby3 en células transfectadas con el sistema CRISPR/nCas9 en células AD293.

6.4 CRISPR/dCas9 optogenético

Uno de los objetivos de este trabajo es regular la expresión de *plk4* endógena y evaluar sus implicaciones en la génesis de centriolos. Para lograr esto, utilizamos un sistema optogenético basado en CRISPR/dCas9 para activar la transcripción de genes usando luz azul como inductor (Nihongaki *et al.*, 2015). Nosotros ideamos un sistema de iluminación para exponer a los cultivos a luz azul, este sistema fue diseñado para ser impreso en 3D y mantener condiciones reproducibles de iluminación en los cultivos.

6.5 Iluminador de luz azul para células en cultivo

A nuestro iluminador se le llamó **JoGio** (“*Just One Gorgeous Illuminator*”, por su nombre en inglés). Está diseñado para ser utilizado con cajas de 35 mm y proporciona una iluminación selectiva, es decir, la luz azul no se filtra a otros cultivos y no permite la entrada de luz externa al cultivo. Otra ventaja de JoGio es la capacidad de funcionar dentro de la incubadora de CO₂ y que no requiere ser conectado a luz para su funcionamiento ya que sólo depende de un par de pilas AA. JoGio es modular, lo que le permite intercambiar piezas de manera rápida y sencilla, acorde a la necesidad experimental, aunque en este trabajo sólo se usó iluminación por luz azul, es capaz de utilizar LEDs de diferente longitud de onda. JoGio, al ser un dispositivo que se puede imprimir en 3D, se vuelve una herramienta para experimentos de optogenética de bajo costo y accesible para otros laboratorios a nivel mundial.

El sistema de iluminación JoGio es modular, es decir, se pueden cambiar las secciones según el uso que se requiera. Se compone de dos módulos: el superior y el inferior. En el módulo superior se coloca el cultivo y se aísla de la luz externa por medio de una tapa; a pesar de que las células no reciben luz exterior, no son privadas del aire presente en la incubadora debido a una trampa de luz, que bloquea la luz exterior a la vez que permite que el cultivo intercambie gases con la incubadora (**Fig. 11 A, C**). En el módulo inferior, se encuentra la fuente de luz que consiste en un LED, colocado sobre un disipador de calor y conectado a un par de pilas alcalinas AA. El LED se posiciona en un tubo óptico y es el primer impedimento para evitar que la luz del LED se filtre fuera del iluminador. En el módulo inferior también posee una tapa y ambos módulos se unen a través de un riel (**Fig. 11B, C**). El plástico más común utilizado para impresión 3D es PLA, sin embargo, tiende a hidratarse con el tiempo, lo que no lo hace un buen material para su uso prolongado en la incubadora de CO₂, para solucionar esto, escogimos PETG como materia prima de JoGio ya que presenta una mayor resistencia

ante la hidratación (Kivelä, 2019). En conclusión, se diseñó e imprimió en 3D una herramienta modular para iluminar cultivos de células eucariontes en incubadoras de CO₂.

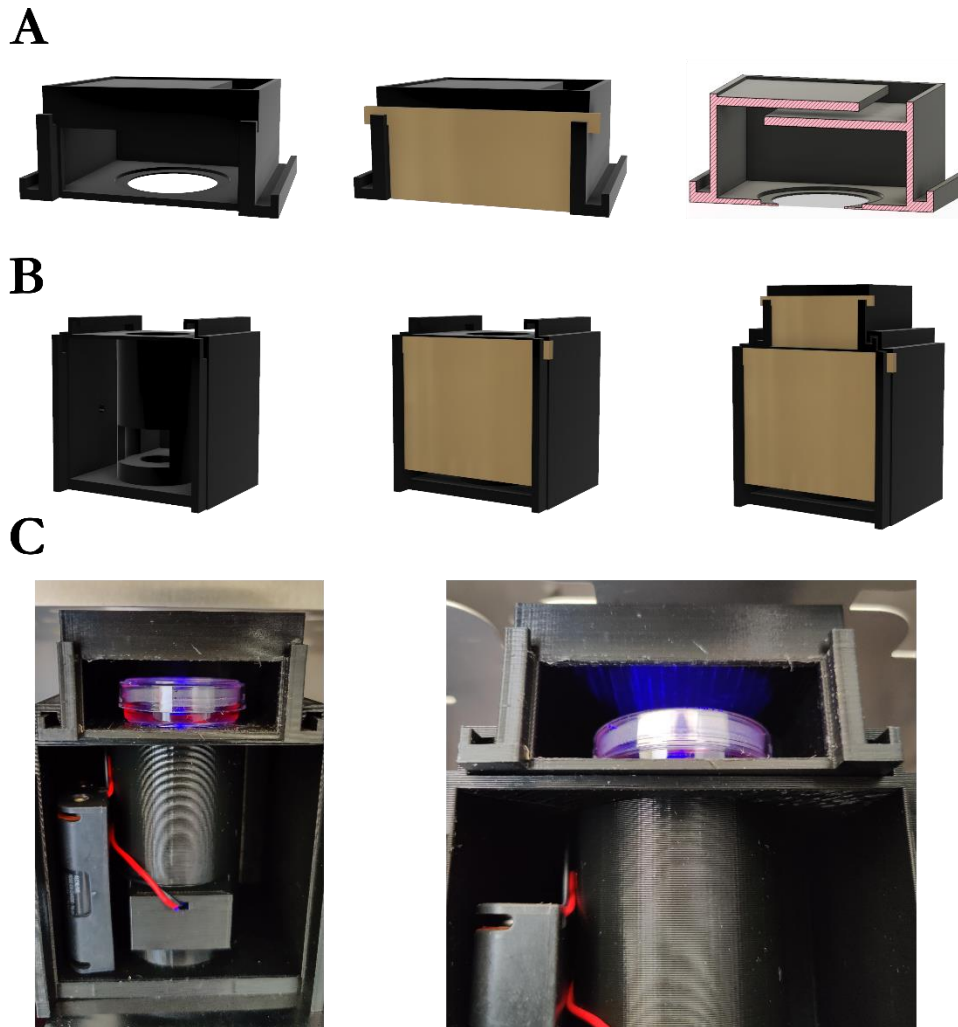


Figura 11 Sistema de iluminación JoGio (A) Módulo superior de JoGio. El cultivo a iluminar se coloca en la sección superior. Posee un sistema de rieles para deslizar la pared y aislar el cultivo de la luz. Las células no están privadas del intercambio de gases, ya que el módulo superior posee una trampa de luz que evita la incidencia de luz externa. (B) Módulo inferior de JoGio. En el módulo inferior se coloca el sistema de iluminación, en este caso es un LED montado en su disipador de calor y encendido mediante pilas. (C) Imágenes de JoGio iluminando una caja de 35 mm.

6.6 Evaluación del sistema optogenético e iluminador JoGio

Dado que JoGio está pensado para ser “budget-friendly” y sin requerir de un proveedor especializado de piezas, decidimos evaluar dos tipos de LEDs, uno de alta (SMD 3528, 0.03W) y otro de baja potencia (generic royal blue, 3W). El LED de alta potencia consta de una sólo pieza y se puede conseguir en cualquier tienda de electrónica, el LED de baja potencia fue extraído de una tira de LEDs comprada en Amazon. Para demostrar que el sistema optogenético funciona en nuestras manos, replicamos el experimento de Nihongaki y colaboradores (Nihongaki *et al.*, 2015) en donde se activa la transcripción por luz azul de mCherry inducible. En condiciones de obscuridad, mCherry no se expresa y si el cultivo es expuesto a luz azul, se inducirá la transcripción de mCherry, lo que nos indicaría que el sistema optogenético y el iluminador JoGio son funcionales. Los resultados demostraron que la inducción de la transcripción ocurre independientemente del tipo de LED utilizado. Como control negativo, se utilizó un cultivo que también fue transfectado con los mismos plásmidos, pero estuvo aislado de cualquier tipo de luz externa (**Fig. 12**).

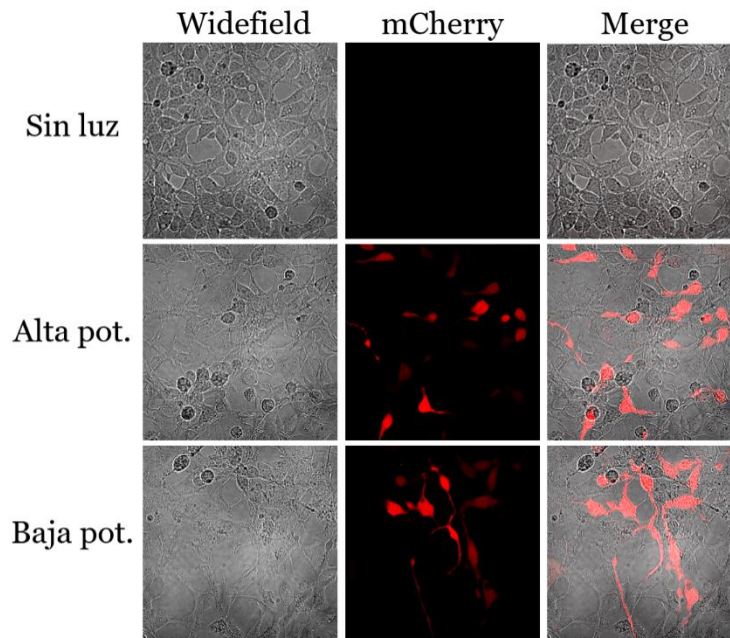
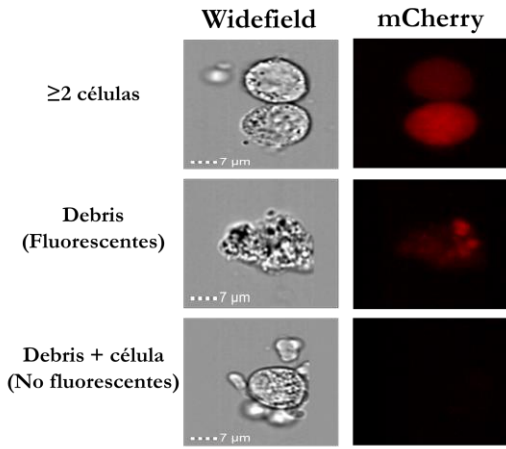


Figura 12 Evaluación de JoGio y el sistema optogenético Todas las condiciones fueron transfectadas con el sistema optogenético e iluminadas con JoGio con diferentes LEDs, el control negativo fue un cultivo transfectado con todos los plásmidos pero aislado de la luz.

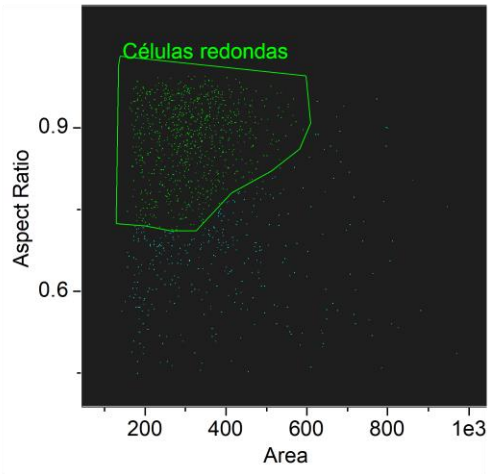
Para evaluar el efecto de la potencia del LED sobre la inducción del gen reportero, se realizó un estudio a nivel poblacional con un citómetro de flujo que genera una micrografía a cada evento registrado (Amnis ImageStream Mark II). Analizamos la cantidad de células que expresaron al gen reportero mCherry en cuatro condiciones diferentes: (i) autofluorescencia, (ii) sistema optogenético sin luz, (iii) sistema optogenético con LED de alta potencia y (iv) sistema optogenético con LED de baja potencia. Cada evento detectado por el citómetro puede ser una célula viva, agregados celulares o debris celular (**Fig. 13 A**).

Primero filtramos la población para evaluar únicamente células vivas únicas por evento, por lo que se descartaron eventos con 2 o más células y/o que se encuentre debris celular, esto independientemente de la fluorescencia, a la sub-población resultante se le denominó “Células vivas” y esta fue la analizamos en todas las condiciones experimentales mencionadas (**Fig. 13 A y B**). Al analizar las micrografías del control de autofluorescencia, se detectaron valores de $\sim 10^{-3}$ a $\sim 10^3$ de fluorescencia lo que corresponde a los niveles basales (**Fig. 13 C**). El cultivo transfectado con todos los plásmidos pero aislado de la luz, presentó un desplazamiento de la fluorescencia hacia $\sim 10^4$ aun así las micrografías no indican la presencia de fluorescencia roja, sin embargo, en una pequeña población si presentó una fluorescencia roja muy tenue en $\sim 10^5$ a la cual denominamos transcripción de fuga debido a que no es una causa de una transcripción robusta y se sabe que ese promotor tiene ese comportamiento (Bender *et al.*, 2006), (**Fig. 13 D**). Al analizar el sistema optogenético inducido por el LED de alta potencia, se observó la aparición de una nueva sub-población cuyos valores de fluorescencia se encuentran entre $\sim 10^5$ y $\sim 10^6$ que son positivas a una fluorescencia de mCherry robusta, esta misma sub-población se encontró en el LED de baja potencia y en ambos casos también se mantuvieron las células no fluorescentes y con transcripción de fuga (**Fig. 13 D y E**).

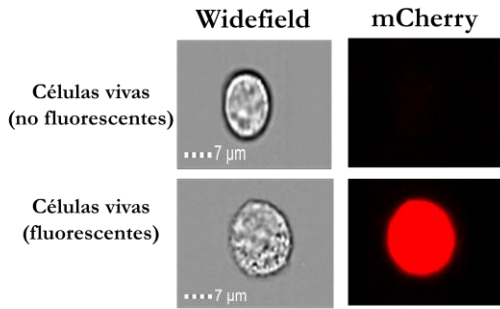
A Eventos descartados



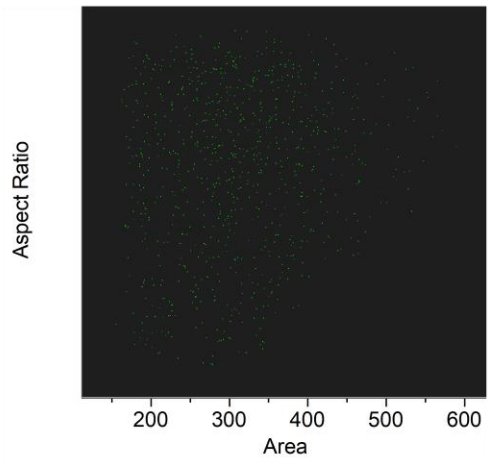
Eventos totales



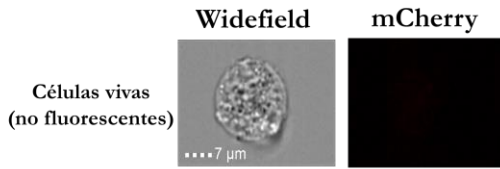
B Eventos analizados



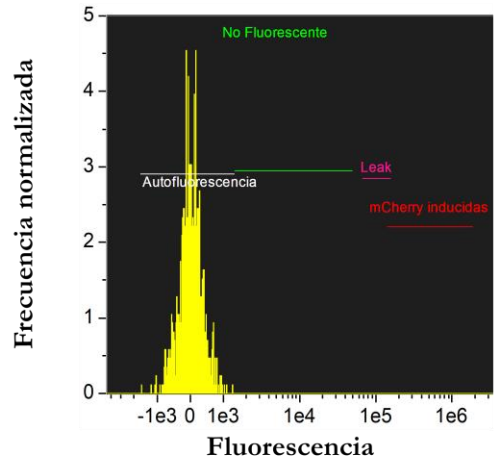
Células vivas



C Eventos analizados



Autofluorescencia



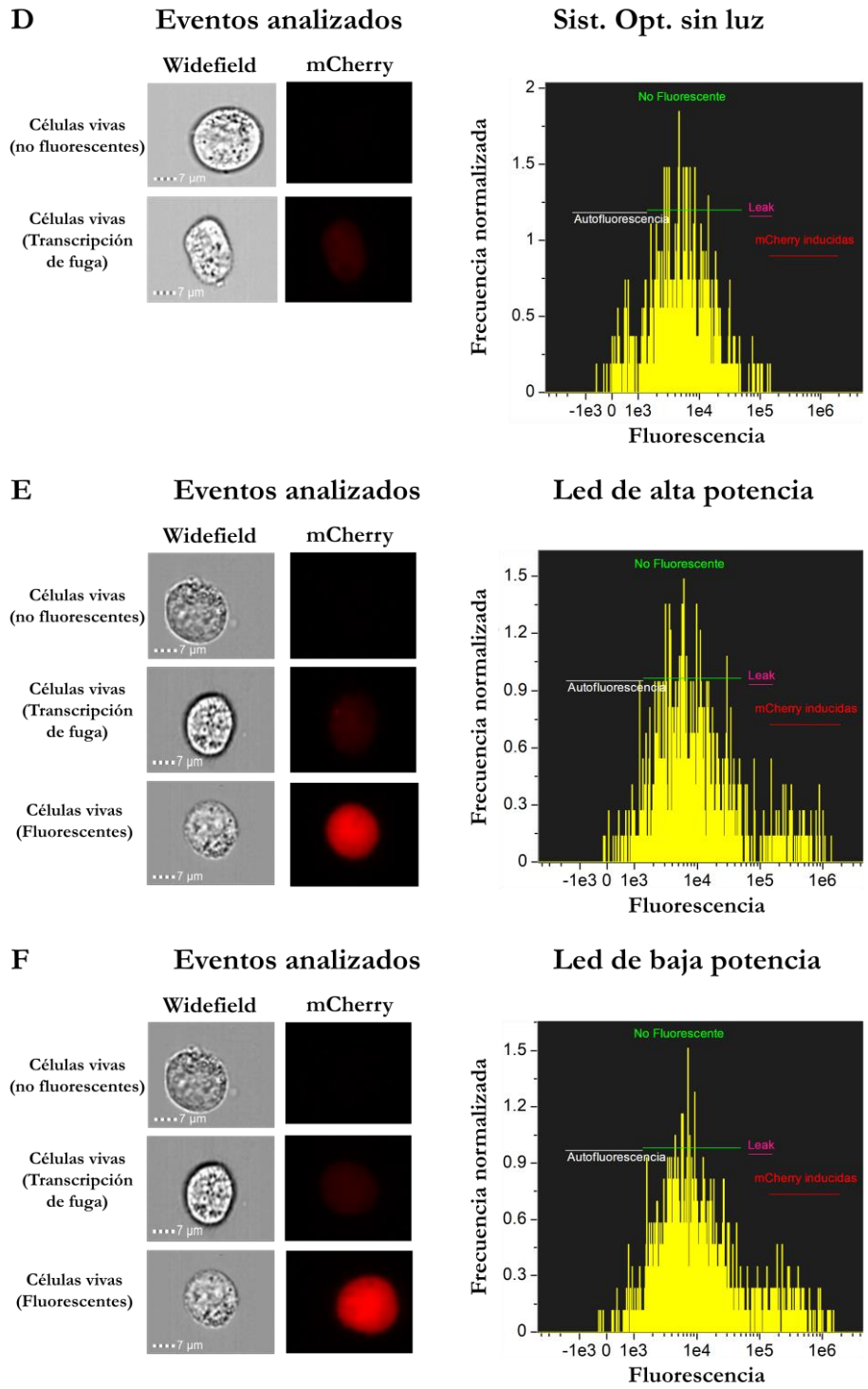


Figura 13 Efecto del tipo del LED sobre la inducción transcripcional (A) Histograma de los eventos totales registrados, la población analizada (Células redondas) y las micrografías representativas de los eventos descartados. (B) Sub-población de células redondas y micrografías representativas del tipo de células presentes. (C, D, E y F) Condiciones de autofluorescencia, cultivo aislado de la luz e inducción de mCherry por el sistema optogenético con LEDs de alta y baja potencia.

Al analizar las proporciones de cada una de las sub-poblaciones presentes en las diferentes condiciones, se encontró que en el control de autofluorescencia, el 100% de los eventos no son fluorescentes, cuando el sistema optogenético aislado de la luz, el 1.8% de las células presentaron transcripción de fuga y sólo el 0.1% logró tener una fluorescencia roja robusta. El cultivo inducido por el LED de alta potencia presentó un 2.8% de células con transcripción de fuga y las células que se les indujo a mCherry fue el 9.4%. En el cultivo inducido por el LED de baja potencia, el porcentaje de las células con transcripción de fuga y con mCherry inducidas fue de 5.1% y 10.7%, respectivamente (**Tabla 1**). Se concluye que no existen diferencias entre el uso del LED de baja o alta potencia, cuando se induce la transcripción de genes mediante el sistema optogenético basado en CRISPR/dCas9 y el iluminador JoGio.

Condición	Células analizadas	Negativas	Transc. de fuga	mCherry inducidas
Autofluorescencia	858	858 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Sin luz	541	530 (97.9 %)	10 (1.8 %)	1 (0.1 %)
LED alta potencia	739	642 (86.8 %)	21 (2.8 %)	70 (9.4 %)
LED baja potencia	859	713 (83.0 %)	44 (5.1 %)	92 (10.7 %)

Tabla 2 Cantidad y porcentaje de células inducidas por el sistema optogenético

6.7 Control optogenético de los niveles de *plk4*

Disponiendo de las herramientas para activar la expresión de genes por luz, nos planteamos inducir a *plk4* endógena, medir la presencia de centrosomas en la célula con el marcador EGFP-Centrina y determinar el área ocupada por los mismos.

Se evaluó si los cultivos autofluorescen bajo las condiciones de detección de centriolos, a lo cual no se detectó una fluorescencia verde robusta. Se determinaron los niveles basales de los centrosomas al transfectar el cultivo sólo con el plásmido EGFP-Centrina, se encontró la formación de microsátélites, un fenómeno que ocurre cuando los cultivos expresan esta construcción de manera constitutiva por largos periodos de tiempo (Marteil, Guerrero, Vieira, De Almeida, *et al.*, 2018), no obstante, refleja los niveles basales de los centrosomas bajo nuestras condiciones experimentales. Procedimos a evaluar el efecto de inducir a *plk4* endógena con luz azul, como control negativo, se utilizó un cultivo que expresaba el sistema optogenético que fue aislado de cualquier fuente de luz. La inducción fue llevada a cabo por los LEDs de alta y baja potencia, en ambas condiciones se encontraron centrosomas de mayor tamaño (**Fig. 14A**).

Se hizo una medición del área que ocupaban los centrosomas. En la expresión basal y en ausencia de luz, el área de los centrosomas resultó ser muy similar (1.30 y 1.27 px², respectivamente). El cultivo que fue inducido con el LED de alta potencia generó centrosomas que ocupaban una mayor área (2.5 px²), seguido de LED de baja potencia (1.97 px²), ambos fueron mayores a los controles, pero sólo el LED de alta potencia indujo un cambio significativo ($p < 0.05$, $n = 9$) con respecto a la expresión basal y en ausencia de luz (**Fig. 17B**). Se concluye que el sistema optogenético indujo la transcripción del gen de *plk4* lo que resultó en la amplificación de los centrosomas

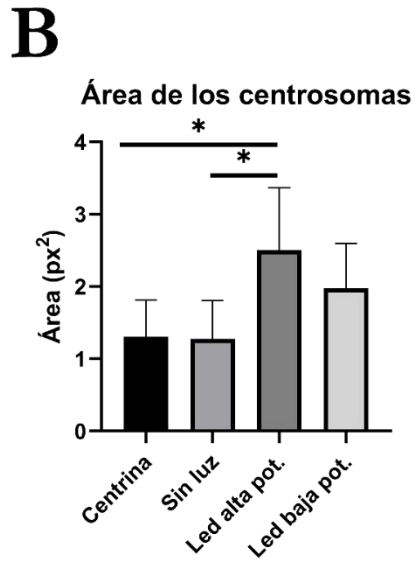
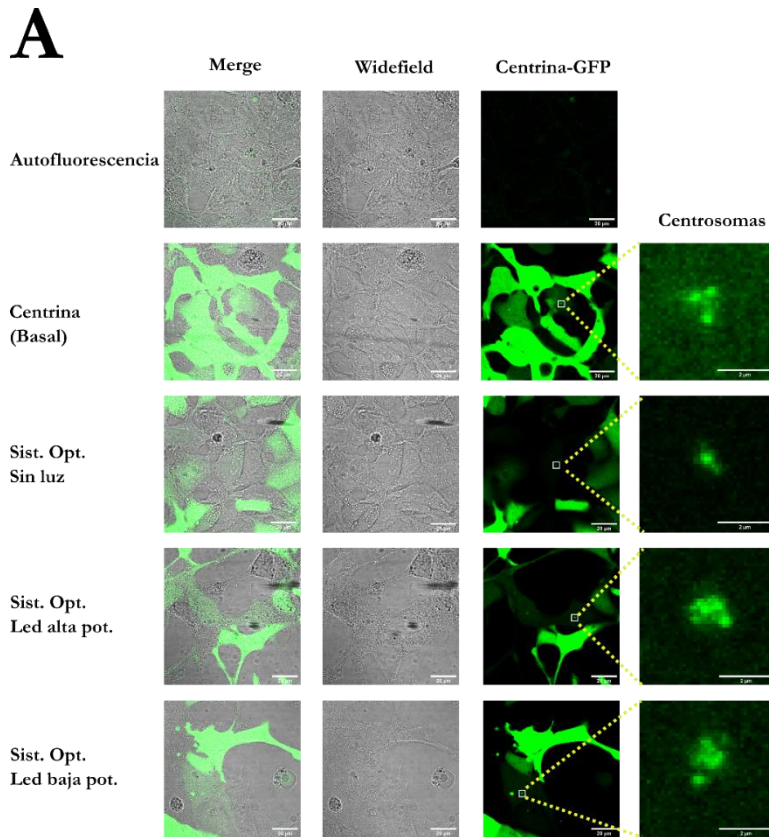


Figura 14 Inducción de *plk4* con el sistema optogenético (A) Visualización de centrosomas con el marcador Centrina-EGFP en cultivos inducidos por el sistema optogenético y controles de autofluorescencia y expresión basal. Barra de escala: 20 μm y en centrosomas 2 μm . (B) Área de los centrosomas en las condiciones descritas en (A). Análisis estadístico ANOVA ($p < 0.05$).

7. Conclusiones

- Se construyó el DNA donador para el knock-in de *mRuby3* en el 3' de *plk4*.
- No se logró obtener la línea celular *plk4-mRuby3*^{+/+}
- El sistema optogenético basado en CRISPR/dCas9 (Nihongaki *et al.*, 2015) fue estandarizado en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada.
- El iluminador JoGio fue diseñado, impreso en 3D y evaluado.
- En conjunto con los plásmidos del sistema optogenético, se logró inducir la transcripción por luz azul.
- JoGio en conjunto con el sistema optogenético, es funcional con LEDs de alta y baja potencia.
- La activación de la transcripción de *plk4* endógena por el sistema optogenético generó centrosomas de mayor tamaño.

8. Perspectivas

- Obtener la línea celular *plk4-mRuby3* por CRISPR/Cas9 y bajo una presión de selección para eliminar a las células no transfectadas.
- Generar una línea celular que exprese a nivel genómico el ancla y el activador del sistema optogenético.
- Implementar circuitos electrónicos a JoGio (*e.g.* Arduino/Raspberry) para generar patrones de iluminación y/o activarlo remotamente.
- Medir los niveles de mRNA de *plk4* cuando se induce la transcripción por el sistema optogenético.
- Regular la expresión de proteínas centrosomales, y evaluar su impacto en la fisiología de los centriolos.

9. Referencias

- Arquint, C. *et al.* (2015) 'STIL binding to Polo-box 3 of PLK4 regulates centriole duplication', *eLife*, 4(JULY2015), pp. 1–22. doi: 10.7554/eLife.07888.
- Bajar, B. T. *et al.* (2016) 'Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(October 2015), pp. 1–12. doi: 10.1038/srep20889.
- Bender, G. *et al.* (2006) 'Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells', *Science*, 268(5218), pp. 1766–1769. doi: 10.1126/science.7792603.
- Bettencourt-Dias, M. *et al.* (2005) 'SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development', *Current Biology*, 15(24), pp. 2199–2207. doi: 10.1016/j.cub.2005.11.042.
- Buchwalter, R. A. *et al.* (2016) 'Centrosome in Cell Division, Development and Disease', *eLS*, pp. 1–12. doi: 10.1002/9780470015902.a0020872.
- Chae, S. *et al.* (2005) 'Centrosome amplification and multinuclear phenotypes are induced by hydrogen peroxide', *Experimental and Molecular Medicine*. Korean Society of Med. Biochemistry and Mol. Biology, 37(5), pp. 482–487. doi: 10.1038/emmm.2005.59.
- Chiang, T. W. W. *et al.* (2016) 'CRISPR-Cas9D10A nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(March), pp. 1–17. doi: 10.1038/srep24356.
- Conduit, P. T., Wainman, A. and Raff, J. W. (2015) 'Centrosome function and assembly in animal cells', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 16(10), pp. 611–624. doi: 10.1038/nrm4062.
- Doudna, J. A. and Charpentier, E. (2014) 'The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9', *Science*. doi: 10.1126/science.1258096.
- Habedanck, R. *et al.* (2005) 'The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication', *Nature Cell Biology*, 7(11), pp. 1140–1146. doi: 10.1038/ncb1320.
- Kleylein-Sohn, J. *et al.* (2007) 'Plk4-Induced Centriole Biogenesis in Human Cells', *Developmental Cell*, 13(2), pp. 190–202. doi: 10.1016/j.devcel.2007.07.002.
- Klingseisen, A. and Jackson, A. P. (2011) 'Mechanisms and pathways of growth failure in primordial dwarfism', *Genes and Development*, 25(19), pp. 2011–2024. doi: 10.1101/gad.169037.
- Ko, M. A. *et al.* (2005) 'Plk4 haploinsufficiency causes mitotic infidelity and carcinogenesis', *Nature Genetics*, 37(8), pp. 883–888. doi: 10.1038/ng1605.
- Levine, M. S. and Holland, A. J. (2014) 'Polo-like kinase 4 shapes Up', *Structure*. Elsevier Ltd, 22(8), pp. 1071–1073. doi: 10.1016/j.str.2014.07.004.
- Lopes, C. A. M. *et al.* (2015) 'PLK4 trans-Autoactivation Controls Centriole Biogenesis in Space', *Developmental Cell*, 35(2), pp. 222–235. doi: 10.1016/j.devcel.2015.09.020.
- Marteil, G., Guerrero, A., Vieira, A. F., de Almeida, B. P., *et al.* (2018) 'Over-elongation of centrioles in cancer promotes centriole amplification and chromosome missegregation', *Nature Communications*, 9(1), p. 1258. doi: 10.1038/s41467-018-03641-x.
- Marteil, G., Guerrero, A., Vieira, A. F., De Almeida, B. P., *et al.* (2018) 'Over-elongation of centrioles in cancer promotes centriole amplification and chromosome missegregation', *Nature Communications*, 9(1). doi: 10.1038/s41467-018-03641-x.
- Marthiens, V. *et al.* (2013) 'Centrosome amplification causes microcephaly', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 15(7), pp. 731–740. doi: 10.1038/ncb2746.

- Martin, C. A. *et al.* (2014) 'Mutations in PLK4, encoding a master regulator of centriole biogenesis, cause microcephaly, growth failure and retinopathy', *Nature Genetics*, 46(12), pp. 1283–1292. doi: 10.1038/ng.3122.
- Montenegro Gouveia, S. *et al.* (2019) 'PLK4 is a microtubule-associated protein that self-assembles promoting de novo MTOC formation', *Journal of Cell Science*, 132(4), p. jcs219501. doi: 10.1242/jcs.219501.
- Morettin, A. *et al.* (2009) 'Gene expression patterns in heterozygous Plk4 murine embryonic fibroblasts', *BMC Genomics*, 10. doi: 10.1186/1471-2164-10-319.
- Nihongaki, Y. *et al.* (2015) 'CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system', *Chemistry and Biology*. Elsevier Ltd, 22(2), pp. 169–174. doi: 10.1016/j.chembiol.2014.12.011.
- Ohta, M. *et al.* (2018) 'Bimodal Binding of STIL to Plk4 Controls Proper Centriole Copy Number', *Cell Reports*. Elsevier Company., 23(11), pp. 3160-3169.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.030.
- Ota, T. *et al.* (2004) 'Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs', *Nature Genetics*, 36(1), pp. 40–45. doi: 10.1038/ng1285.
- Park, S. Y. *et al.* (2014) 'Molecular basis for unidirectional scaffold switching of human Plk4 in centriole biogenesis', *Nature Structural and Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 21(8), pp. 696–703. doi: 10.1038/nsmb.2846.
- Quan, J. and Tian, J. (2014) 'Circular polymerase extension cloning', *Methods in Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 1116(2), pp. 103–117. doi: 10.1007/978-1-62703-764-8_8.
- Ran, F. Ann *et al.* (2013) 'Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity', *Cell*. Elsevier, 154(6), pp. 1380–1389. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.021.
- Ran, F Ann *et al.* (2013) 'Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system', *Nature Protocols*, 8(11), pp. 2281–2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143.
- Rodrigues-Martins, A. *et al.* (2007) 'Revisiting the role of the mother centriole in centriole biogenesis', *Science*, 316(5827), pp. 1046–1050. doi: 10.1126/science.1142950.
- Rueden, C. T. *et al.* (2017) 'ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data', *BMC Bioinformatics*. BioMed Central Ltd., 18(1). doi: 10.1186/s12859-017-1934-z.
- Sillibourne, J. E. *et al.* (2010) 'Autophosphorylation of polo-like kinase 4 and its role in centriole duplication', *Molecular Biology of the Cell*, 21(4), pp. 547–561. doi: 10.1091/mbc.E09-06-0505.
- Sonnen, K. F. *et al.* (2013) 'Human cep192 and cep152 cooperate in plk4 recruitment and centriole duplication', *Journal of Cell Science*, 126(14), pp. 3223–3233. doi: 10.1242/jcs.129502.
- Sredni, S. T. and Tomita, T. (2017) 'The polo-like kinase 4 gene (PLK4) is overexpressed in pediatric medulloblastoma', *Child's Nervous System*. Child's Nervous System, 33(7), p. 1031. doi: 10.1007/s00381-017-3452-8.
- Takao, D., Yamamoto, S. and Kitagawa, D. (2019) 'A theory of centriole duplication based on self-organized spatial pattern formation', *The Journal of Cell Biology*, p. jcb.201904156. doi: 10.1083/jcb.201904156.
- Tu, Q. *et al.* (2016) 'Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombineering efficiency', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(April), pp. 1–8. doi: 10.1038/srep24648.
- Wäneskog, M. and Bjerling, P. (2014) 'Multi-fragment site-directed mutagenic overlap extension polymerase chain reaction as a competitive alternative to the enzymatic assembly method', *Analytical Biochemistry*, 444(1), pp. 32–37. doi: 10.1016/j.ab.2013.09.021.
- Winkles, J. A. and Alberts, G. F. (2005) 'Differential regulation of polo-like kinase 1, 2, 3, and 4 gene expression in mammalian cells and tissues', *Oncogene*, 24(2), pp. 260–266. doi: 10.1038/sj.onc.1208219.
- Yamamoto, S. and Kitagawa, D. (2019) 'Self-organization of Plk4 regulates symmetry breaking in centriole duplication',

Nature Communications. Nature Publishing Group, 10(1), p. 1810. doi: 10.1038/s41467-019-09847-x.

Zhang, J. P. *et al.* (2017) 'Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage', *Genome Biology*. Genome Biology, 18(1), pp. 1–18. doi: 10.1186/s13059-017-1164-8.

Zitouni, S. *et al.* (2014) 'Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 15(7), pp. 433–452. doi: 10.1038/nrm3819.

10. Material Suplementario

10.1 Construcción del plásmido PLK4-mRuby3

10.1.1 Síntesis de amplicones A, B, C y D

Fragmento A (896 pb)

Primer	Secuencia (5' - 3')
Tia1Out/F	CGTGTGTTGTATTTCGCCGTGGAAGAGGTGGGGTTCCTTGTAGC
AR	CAGGTGTGGTGGCGTATG

Reactivo	Volumen (μ l)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (s)	Ciclos
Buffer HF 5X	10.0	98.0	120	1
ddH ₂ O	32.5	98.0	10	24
dNTPs 10 mM	1.0	63.4	30	
Primer fw 10 μ M	2.5	72.0	28	
Primer rv 10 μ M	2.5	72.0	600	1
DNA molde	1.0	4.0	10	1
Phusion DNA pol	0.5	4.0	∞	-

Fragmento B (350 pb)

Primer	Secuencia (5' - 3')
NewB/F	GCATACGCCACCACACCTGACGAAGCCAGTTCAAGTTTATC
NewB/R	GCTACCACCACCATGAAAATTAGGAGTCGGATTAGA

Reactivo	Volumen (μl)	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Buffer HF 5X	10.0	98.0	120	1
ddH ₂ O	32.5	98.0	10	30
dNTPs 10 mM	1.0	60.6	30	
Primer fw 10 μM	2.5	72.0	30	
Primer rv 10 μM	2.5	72.0	600	1
DNA molde	1.0	4.0	10	1
Phusion DNA pol	0.5	4.0	∞	-

Fragmento C (823 pb)

Primer	Secuencia (5' - 3')
NewC/F	CCTAATTTTCATGGTGGTGGTAGCGGCGGTGGCAGCGAACAACAAAACTCATCTCAGAAG
NewC/R	GGAGTTTAAATCAATGCTTGTACAGCTCGTCCATGC

Reactivo	Volumen (μl)	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Buffer HF 5X	10.0	98.0	120	1
ddH ₂ O	32.5	98.0	10	24
dNTPs 10 mM	1.0	60.9	30	
Primer fw 10 μM	2.5	72.0	14	
Primer rv 10 μM	2.5	72.0	600	1
DNA molde	1.0	4.0	10	1
Phusion DNA pol	0.5	4.0	∞	-

Fragmento D (1298 pb)

Primer	Secuencia (5' - 3')
NewD/F	GCTGTACAAGCATTGATTA AAAACTCCTTTCAGACA
Tial1Out/R	GTATGTCGGGAACCTCTCCAGGCGCATGTTCTCATT CATAAGTGG

Reactivo	Volumen (µl)	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Buffer HF 5X	10.0	98.0	120	1
ddH ₂ O	32.5	98.0	10	30
dNTPs 10 mM	1.0	65.0	30	
Primer fw 10 µM	2.5	72.0	60	
Primer rv 10 µM	2.5	72.0	600	1
DNA molde	1.0	4.0	10	1
Phusion DNA pol	0.5	4.0	∞	-

10.1.2 Síntesis de fragmentos AB, CD y ABCD

Para realizar la unión de los fragmentos, primero se hace una PCR sin primers para que los fragmentos, al tener secuencias complementarias entre ellos, funcionen como cebadores de la PCR. Esto da como resultado la síntesis de los fragmentos de interés, pero no una amplificación exponencial. Para poder aumentar la concentración del amplicón de interés, se añaden los primers más externos al mismo tubo de PCR, de esa manera ocurre una PCR de punto final. Para más detalle de la técnica, revisar (Wäneskog and Bjerling, 2014).

Fragmento AB (1258 pb)

Primer	Secuencia (5' - 3')
Tial1Out/F	CGTGTGTTGTATT CGCCGTGGAAGAGGTTGGGTT CCTTGTAGC
NewB/R	GCTACCACCACCATGAAAATTAGGAGTCGGATTAGA

Reacción		PCR sin primers			PCR con primers		
Reactivo	Volumen (µl)	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Buffer HF 5X	10.0	98.0	30	1	98.0	30	1
ddH ₂ O	Aforado a 45	98.0	10	10	98.0	10	15
dNTPs 10mM	1.0	66.4	30		60.6	30	
Frag. A	0.1 pmol	72.0	68		72.0	68	
Frag. B	0.1 pmol	72.0	600	1	72.0	600	1
Phusion DNA pol	0.5	4.0	10	1	4.0	10	1
		4.0	∞	-	4.0	∞	∞

Fragmento CD (2095 pb)

Primer	Secuencia (5' - 3')
NewC/F	CCTAATTTTCATGGTGGTGGTAGCGGCGGTGGCAGCGAACAAAACTCATCTCAGAAG
Tial1Out/R	GTATGTCGGGAACCTCTCCAGGCGCATGTTCTCATTTCATAAGTGG

Reacción		PCR sin primers			PCR con primers		
Reactivo	Volumen (µl)	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Buffer HF 5X	10.0	98.0	30	1	98.0	30	1
ddH₂O	Aforado a 45	98.0	10	10	98.0	10	10
dNTPs 10mM	1.0	64.0	30		60.9	30	
Frag. A	0.1 pmol	72.0	92		72.0	92	
Frag. B	0.1 pmol	72.0	600	1	72.0	600	1
Phusion DNA pol	0.5	4.0	10	1	4.0	10	1
			4.0	∞	-	4.0	∞

Fragmento ABCD (3329 pb)

Primer	Secuencia (5' - 3')
Tial1Out/F	CGTGTGTTGTATTCCGCCGTGGAAGAGGTTGGGTTTCCTTGTAGC
Tial1Out/R	GTATGTCCGGAACTCTCCAGGCGCATGTTCTCATTTCATAAGTGG

Reacción		PCR sin primers			PCR con primers		
Reactivo	Volumen (µl)	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Buffer HF 5X	10.0	98.0	30	1	98.0	30	1
ddH₂O	Aforado a 45	98.0	10	10	98.0	10	15
dNTPs 10mM	1.0	64.5	30		64.5	30	
Frag. A	0.1 pmol	72.0	130		72.0	130	
Frag. B	0.1 pmol	72.0	600	1	72.0	600	1
Phusion DNA pol	0.5	4.0	10	1	4.0	10	1
			4.0	∞	-	4.0	∞

10.1.3 Clonación de PLK4-mRuby3 por CPEC

CPEC es una técnica para clonación independiente de ligasa (Quan and Tian, 2014). Se basa en el principio de OE-PCR en donde secuencias complementarias funcionan como primers, en este caso es el inserto que tiene secuencias complementarias a un vector previamente linealizado. Para este plásmido se linealizó el vector “sgRNA1_Tet-inducible Luciferase reporter” que funcionará como backbone. El vector fue purificado de gel y utilizado para la reacción de CPEC para la clonación del fragmento ABCD.

Linealización de “sgRNA1_Tet-inducible Luciferase reporter” (Addgene #64161) (2424 pb)

Primer	Secuencia (5' - 3')
Tial1BB/F	CCACGGCGAATACAACACACGTACAGCACATCCCCCTTTCG
Tial1BB/R	CCTGGAGAGGTTCCCGACATACCGGGATAACGCAGGAAAGAAC

Reactivo	Volumen (µl)	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Buffer	10.0	98.0	120	1
ddH₂O	32.5	98.0	10	24
dNTPs	1.0	65.0	30	
Primer fwd	2.5	72.0	105	
Primer rvs	2.5	72.0	600	1
DNA molde	1.0	4.0	10	1
Phusion DNA pol.	0.5	4.0	∞	-

Ligación mediante CPEC de pDTA-TK con PLK4-mRuby3

Para la ligación por CPEC, no se requieren primers, sólo el vector linealizado y el inserto.

Reactivo	Volumen (μ l)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (s)	Ciclos
Buffer	10.0	98.0	30	1
ddH₂O	Aforado a 50	98.0	10	10
dNTPs	1.0	64.5**	30	
pDTA-TK	0.1 pmol	72.0	144	
Frag. ABCD	0.1 pmol	72.0	600	1
Phusion DNA pol.	0.5	4.0	10	1
		4.0	∞	-

**Rampa de enfriamiento de 0.1 $^{\circ}$ C/s

Al terminar la reacción, se tomaron 2.4 μ l de la reacción de CPEC y se llevó a cabo la transformación bacteriana

10.1.4 Secuenciación de PLK4-mRuby3

Se mandó a secuenciar el fragmento de PLK4-mRuby3 con los siguientes primers:

Primer	Secuencia (5' - 3')
PLK4-mMR3 Sq1/R	GCAAATAAAAATGTCAACATGTATCC
PLK4-mMR3 Sq2/F	TGGGTAAAACCCCTTGTTC
PLK4-mMR3 Sq2/R	ATGTCAGTGTATCCTCTCAGACC
PLK4-mMR3 Sq3/F	CAGGACACCAGCCTTGAG
PLK4-mMR3 Sq3/R	CCCACAAAAACACATGGAC
PLK4-mMR3 Sq4/F	AGTTCTGGGTTACATGTGCAG

Se muestran las regiones utilizadas para el OE-PCR entre los fragmentos AB, BC y CD (**Fig. S1A**). En las regiones de solapamiento no se presentaron mutaciones. En el resto de los resultados de secuenciación no se encontraron mutaciones a excepción de una isla de poly(T) que carece nuestro amplicón carece con respecto al genoma de referencia de *Homo Sapiens* (**Fig. S1B**) (GRCh38,p13). Debido a que falta un fragmento de gran tamaño, es poco probable que la mutación haya sido causada por la DNA polimerasa, más bien es una secuencia isogénica de la línea celular utilizada en este trabajo.

10.2 Construcción de OPT-PLK4

10.2.1 Elección de sgRNAs y clonación en vector AIO-GFP

Los espaciadores se escogieron en <http://crispr-era.stanford.edu/> y corresponden a las siguientes secuencias:

- 5' – GAGAGTTTAGTTCGGGCGGG – 3'
- 5' – ATCCTGTACTAGATCTATAC – 3'

Estos se clonaron según la sección *Cambio de sgRNA* descrita en materiales y métodos de este trabajo. Dado que las secuencias de los sgRNAs en el plásmido AIO-GFP se encuentran adyacentes al origen replicación y al gen de resistencia contra ampicilina, se optó por amplificar esas secuencias en un mismo amplicón. Para generar un plásmido a partir de DNA lineal, se usó un fragmento del vector sgRNA1_Tet-inducible Luciferase reporter (Addgene #64161) que funcionó como “puente” entre los extremos del amplicón que contiene a los sgRNAs. La ligación del amplicón con los sgRNAs y la secuencia puente se hizo por CPEC (Quan and Tian, 2014). Los sgRNAs se mandaron a secuenciar (Fig. S2)

10.2.2 Amplificación de sgRNAs, origen de replicación y gen de resistencia contra ampicilina (2,883 pb)

Primer	Secuencia (5'-3')
sgOUT/F	CCATTCAGGCTGTCAGGTGGCACTTTTCG
sgOUT/R	GTCCACGGCATATGATACACTTGATGTACTG

Reactivo	Volumen (μl)	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Buffer	10.0	98.0	120	1
ddH ₂ O	32.5	98.0	10	15
dNTPs	1.0	61.6	30	
Primer fwd	2.5	72.0	120	
Primer rvs	2.5	72.0	600	1
DNA molde	1.0	4.0	10	1
Phusion DNA pol.	0.5	4.0	∞	-

Amplificación de secuencia puente para generar al plásmido (329 pb)

Primer	Secuencia (5' - 3')
sgIN/F	AAGTGTATCATATGCCGTGGACTCCAACGTCAAAGG
sgIN/R	CACCTGACAGCCTGAATGGCGAATGG

Reactivo	Volumen (μl)	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Buffer	10.0	98.0	30	1
ddH ₂ O	Aforado a 50	98.0	10	10
dNTPs	1.0	63.3**	30	
pDTA-TK	0.1 pmol	72.0	50	
Frag. ABCD	0.1 pmol	72.0	600	1
Phusion DNA pol.	0.5	4.0	10	1
		4.0	∞	-

**Rampa de enfriamiento de 0.1 °C/s

Al terminar la reacción, se tomaron 2.4 μl de la reacción de CPEC y se llevó a cabo la transformación bacteriana.

Se

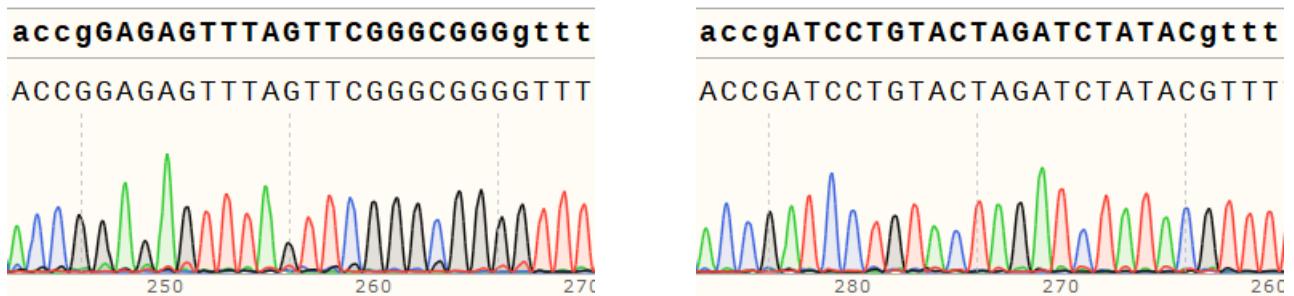
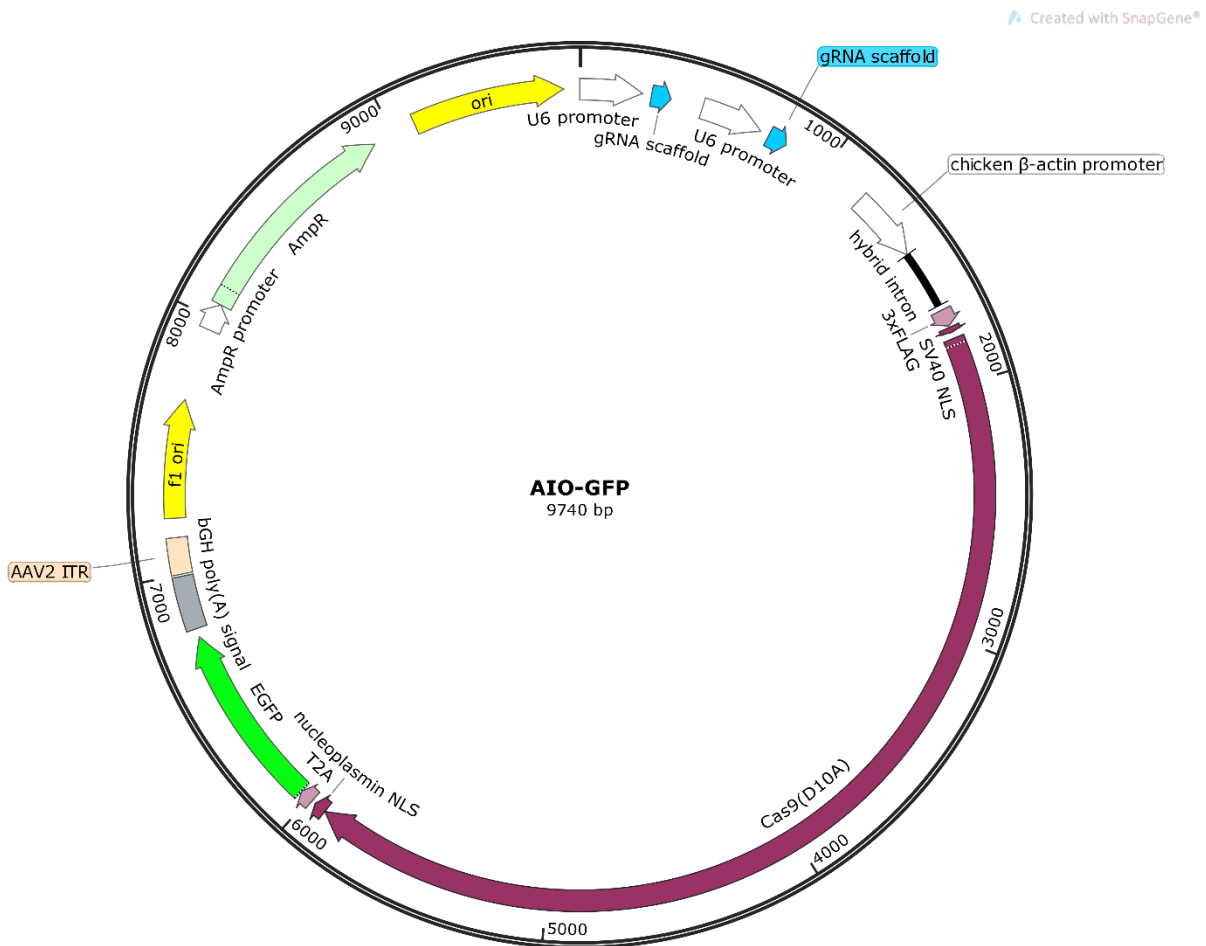


Figura S2 Secuenciación de sgRNAs usados para la inducción de *plk4*. Se muestran los cromatogramas de los sgRNAs que dirigirán al sistema optogenético para la estimulación transcripcional de *plk4*.

10.3 Plásmidos

10.3.1 AIO-GFP (Addgene #74119)



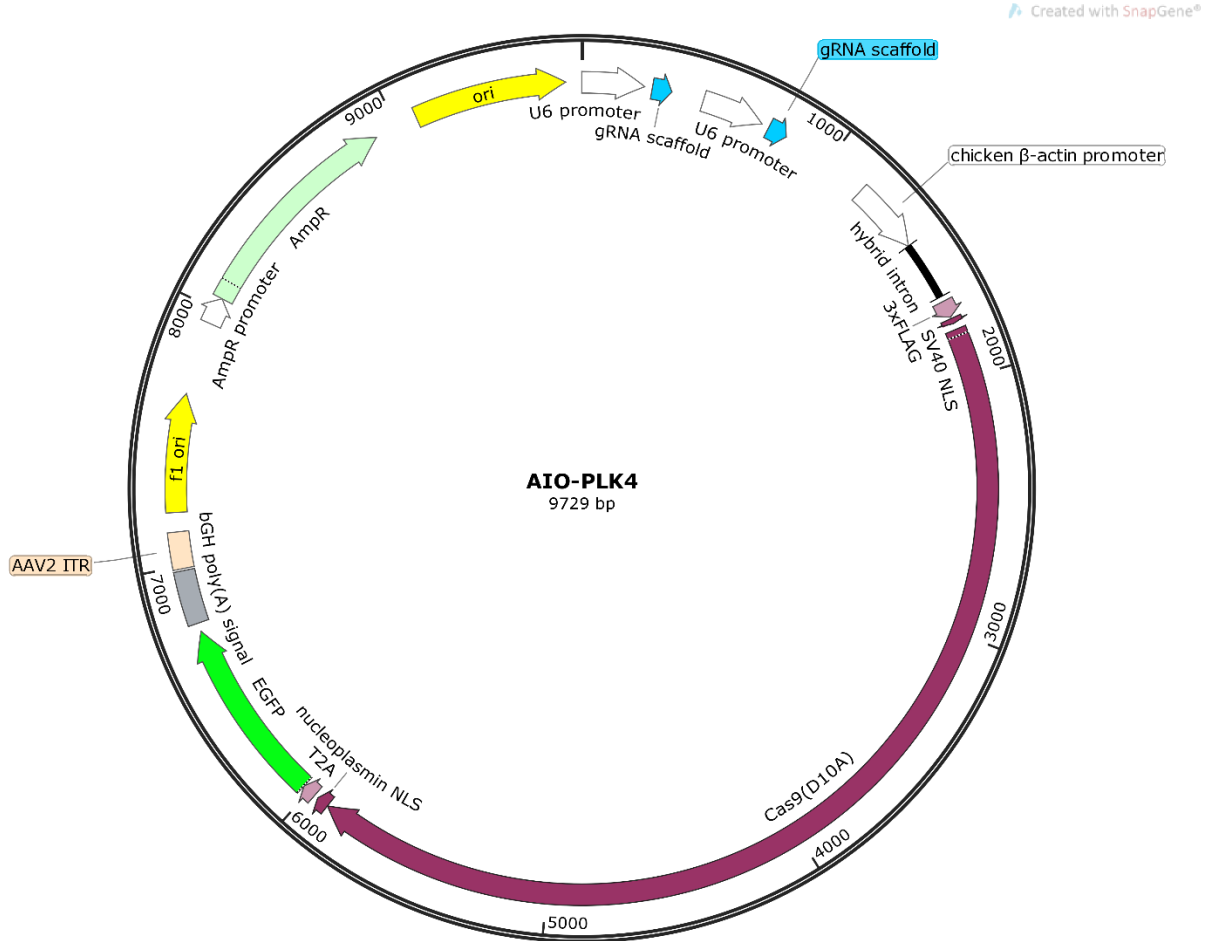
gagggcctatttcccatgattccttcattttgcatatacgatacaaggctgttagagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagta
caaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttgagttttaaattatgttttaaattggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtattt
cgatttcttggctttatatacttgtggaaaggacgaaacaccggggtcttcggatccatgcgaagacctgttttagagctagaaatagcaagttaaata
aggctagtcggttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgctttttgtagagctagaaatagcaagttaaataaggctagtcggttttagcg
cgtgcgccaattctgcagacaaatggctctagattaaccctcactaaagggaaggcgggcaggaagagggcctatttccatgattccttcattttg
catatacgatacaaggctgttagagagataattagaattaattgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttctt
gggtagtttgagttttaaattatgttttaaattggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttgcatttcttggctttatatacttgtggaaagga
cgaaacaccgggagaccatcgatgagagggctcagtttagagctagaaatagcaagttaaataaggctagtcggttatcaactgaaaaagtggc
accgagtcggtgcttttttctatagtgacctaattgcagctctggcccgtgtctcaaaatctctggtaccggttacataacttacggtaaatggcc
cgctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaatagtaacgccaatagggactttcattgacgtcaatgggtggagatttacggtaa

actgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgcccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattgtgcccagtac
atgacctatgggacttctacttggcagtacatctacgtatttagcatcgctattaccatggctgaggtgagccccagcttctgcttactctccccatc
tccccccctccccaccccccaatttgtattttatttttaattttttgtgcagcgatggggggcggggggggggggggggcgcgcgccaggcggg
gcgggggcggggcgaggggcgggcgggcgaggcggagaggtgcgggcgagccaatcagagcggcgcgctccgaaagtctctttatggcg
aggcggcgggcgggcgggcctataaaaaagcgaagcgcgcgggcgggcgggagtcgctgacgctgccttcgccccgtgccccgctccggcg
cgcttcgccccggctctgactgaccgcttactccccacaggtgagcggcgggacggccttctctccgggctgtaattagctgag
caagaggttaagggttaaggatggttgggtgggtattaatgtttaattaccctggagcactgcctgaaatcacttttttcaggtggaccgggtgc
caccatggactataaggaccagcagggagactacaaggatcatgatattgattacaagacgatgacgataagatggcccaagaagaagcggaa
ggtcggatccacggagtcccagcagccgacaagaagtacagcatcggcctggccatcggcaccactctgtgggctgggcccgtgatcaccgacga
gtacaagtgcccagcaagaattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagcctgctgttcgacagcgg
cgaaacagccgaggccaccggctgaagagaaccgcagaagaataccagacggaagaaccggatctgctatctgcaagagatcttcagca
acgagatggccaaggtggacgacagcttctccacagactggaagagtccttctggtggaagaggataagaagcagcagcggcaccatcttcg
gcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtacccaccatctaccactgagaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctg
cggctgatctatctggcctggccacatgatcaagttccggggccacttctgatcagggcgacctgaaccccacaacagcagcgtggacaag
ctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaacccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccatctgtctgcccagac
tgagcaagagcagcagcggctggaaaatctgatgccagctgcccggcgagaagaagaatggcctgttcggcaacctgattgcctgagcctgggccc
tgaccccaacttcaaggaacttcgacctggcggaggtgccaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacacctggacaacctgctgg
cccagatcggcgaccagtacggcagctgttctggccgcaagaacctgtccgacgccatctgctgagcgacatctgagagtgaacaccgagat
caccaaggccccctgagcgcctctatgatcaagagatagcagcagcaccaccaggacctgacctgctgaaagctctcgtgcccagcagcgtgcc
tgagaagtacaaagattttcttgaccagagcaagaacggctacgcccggctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaagttcatc
aagccatctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgaggaaagcagcggaccttcgacaacgg
cagcatccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgcccggcgaggaagattttaccattctgaaggacaaccgggaaaagatc
gagaagatcctgacctccgcatcccactactacgtgggccccttgccaggggaaacagcagattcgctggatgaccagaaagagcaggaaac
atccccctggaacttcgaggaagtggggacaagggcgttccgccagagcttcatcgagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccacg
agaaggtgctgccaagcagcctgctgtacgagtacttaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaatacgtgaccgaggggaatgagaaagcc
cgcttctgagcggcgagcagaaaaaggccatctggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgacctgaagcagctgaaagaggactactt
caagaaaatcgagtcttcgactccgtggaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccctgggcacataccagatctgctgaaaattatca
aggacaaggacttctggacaatgaggaaaaacgaggacattctggaagatctcgtgctgacctgacactgtttgaggacagagatgatcgagga
acggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaagtgatgaagcagctgaagcggcgagatacaccggctggggcaggctgagccggaagc
tgatcaacggcatccgggacaagcagctccggcaagaatctggatttctgaaagtcgacggcttcgccaacagaaacttcatgacgtgatcca
cgacgacagcctgacctttaaaggagcatccgaaagccaggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacattgccaatctggccggcag
ccccccattaagaaggcatcctgcagacagtgaaaggtggggacgagctcgtgaaagtgatgggcccggcacaagcccgagaacatcgtgatcga

aatggccagagagaaccagaccaccagaaggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagaggcatcaaagagctgggcag
ccagatctgaaagaacccccgtggaaaaacccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggcgggatatgtacctgga
ccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggaccatatctgcctcagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaagtgctga
ccagaagcgcacaagaaccggggcaagagcgcacaactgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagctgctgaacgc
caagctgattaccagagaaagtgcacaatctgaccaaggccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggcggcttcatcaagagacagct
ggtggaaacccggcagatcacaagcacgtggcacagatcctggactcccggatgaacactaagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagt
gaaagtgatcacctgaagtccaagctggtgtccgatttccggaaggatttccagtttacaagtgcgcgagatcaacaactaccaccagcccacg
acgctacctgaacgcccgtggtggaaaccctgatcaaaaagtacctaagctggaagcgcagttcgtgtacggcactacaaggtgtacgact
gcggaagatgatcgcaagagcgcaggaatcggcaaggctaccgcaagctacttctctacagcaacatcatgaacttttcaagaccgagatta
ccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctgatcgagacaacggcgaacccggggagatcgtgtgggataaggcgggattttgccacc
gtcgggaaagtgtgagcatgccccaaagtgaatatctgaaaaagaccgaggtgcagacaggcggcttcagcaaagagtctatctgcccaagagg
aacagcgataagctgatcgccagaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagcccaccgtggcctattctgtgctggtggtg
ccaaagtggaaaaggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaaagagctgctggggatcaccatcatggaagaagcagcttcgagaagaatcca
tcgactttctggaagccaagggtacaaagaagtgaaaaaggacctgatcaagctgcctaagtactcctgttcgagctggaaaacggccggaa
gagaatgtcggcctctgcccggcgaactgcagaagggaacgaactggcctgccctccaaatatgtgaacttctgtacctggccagcactatgag
aagctgaagggtccccgaggataatgagcagaacagctgtttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgag
ttctccaagagagtgatcctggcgcagctaatctggacaaagtgtgtccgcctacaacaagcaccgggataagcccatcagagagcaggccgag
aatatcatccactgtttacctgaccaatctgggagcccctgccgccttaagtactttgacaccaccatcgaccggaagaggtacaccagcaccia
agaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacacggatcgactgtctcagctgggaggcgacaaaaggccgg
cggccacgaaaaaggccggccaggcaaaaaagaaaaggaaattcggcagtgagaggcagaggaaagtctgtaacatgagggtgacgtcgagga
gaatcctggcccagtgagcaaggcgcaggagctgttaccggggtggtgccatcctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcag
cgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctcggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgccctggcccacct
cgtgaccacctgacctacggcgtgcagtgttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcagcacttctcaagtcggccatgcccgaaggctac
gtccaggagcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcggcaggtgaagttcgagggcgacacctggtgaaccgcatcga
gctgaaggcgcactcaaggaggcggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaa
gcagaagaacggcatcaagtgaaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcggcaccactaccagcagaacacccca
tcggcgacggccccgtgctgctgccgacaaccactacctgagcaccagtcggcctgagcaaaagaccccaacgagaagcgcgatcatggtc
ctgctggagttcgtgaccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaaggaattctaactagagctcgtgatcagcctcactgtgcct
tctagttgccagccatctgttgtttgcccctccccgtgccttcttgacctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgc
atcgattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagagaatagcaggcatgctggg
gagcggccgcaggaaccctagtgtgaggtggccactcctctctgcgcgctcgtcactgaggcggggcaccaaaggtcggccgacg
cccgggctttgcccggcggcctcagtgagcgcagcgcgcagctgcctgcaggggcgcctgatgcggtattttctcttacgcatctgtgcggt

atftacaccgcatacgtcaagcaaccatagtagcgcacctgtagcggcgcatfaagcgcggcgggtggtggtttacgcgcagcgtgaccgctac
acttgccagcgccttagcgcctcctttcgtttcttcccttcttctgccagcttcgcccgttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctt
tagggttccgatttagtctttacggcacctcgacccccaaaaaacttgattgggtgatgggtcacgtagtgggcatcgccctgatagacggttttcgc
cctttgacgttggagtcacgcttcttaatagtgactctgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcgggctattcttttgattataagggtttt
ggcgtttcggcctattggtaaaaaatgagctgatttaaaaaatfaacgcgaatttaacaaaaatattaacgtttacaattttatgggtgactctcagt
acaatctgctctgatgccgatagttaagccagccccgaccccccaacaccgctgacgcgcctgacgggcttctgctccccggcatccgctt
acagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgcct
atttttataggttaatgcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctattgtttattttctaatac
attcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgctgcctta
ttccctttttgcggcattttgccttctgttttctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttaca
tcgaaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcccccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgggta
ttatcccgtattgacgccgggcaaggaactcggctcgcgcatacactattctcagaatgacttgggtgagtactcaccagtcacagaaaagcatctt
acggatggcatgacagtaagagaattatgacgtgctgcataacctagtgataacactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaa
ggagctaacgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtg
acaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatgg
aggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggccttccggctggctggttattgtctgataaatctggagccgggtgagcgtggaagccgcggt
atcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagat
cgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgattaaaaactcatttttaattaaagga
tctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgtccactgagcgtcagacccccgtagaaaagatcaaaggatct
tcttgagatcctttttctgcgcgtaactgtctgttgcacaacaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgcccggatcaagagctaccaactctt
ttccgaaggttaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagttagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtgaccg
cctacatacctcgtctgctaatcctgttaccagtggtgctgcccagtgagcagataagtcgtcttaccgggtggactcaagacgatagttaccggata
aggcgcagcggctcgggctgaacggggggttctgtcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctat
gagaaagcgcacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggttaagcggcagggtcggaaacaggagagcgcacgagggagcttccag
ggggaacgcctggtatctttatagctctgtcgggttccaccctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatggaa
aaacgcagcaacgcggccttttacggttctggccttttctggccttttctcactgt

10.3.2 AIO-PLK4 (Sintetizado para este trabajo)



gaggcctatttccatgattccttcatattgcatatacgatacaaggctgtagagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagta
caaaatacgtgacgtagaaagtaataattcttgggtagttgcagttttaaattatgttttaaaggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtattt
cgatttcttggctttatatacttcttggaaaggacgaaacaccgATTAACCACCGCGCCTGTCCgtttagagctagaatagcaag
ttaaataaggctagtcggtatcaactgaaaaagtgccaccgagtcggtgctttttgttttagagctagaatagcaagtaaaaaggctagtcggt
tttagcgcgtgccaattctgcagacaatggctctagattaaccctcactaaagggaaaggcgggcaggaagagggcctatttccatgattcct
tcatatttgcatacagatacaaggctgtagagagataattagaattaattgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatcgtgacgtagaaagtaa
taatttctgggtagttgcagttttaaattatgttttaaaggactatcatatgcttaccgtaactgaaagtatttcgatttcttggctttatatacttgg
gaaaggacgaaacaccgGCACTTTGGGAGGCCAAGGGgtttagagctagaatagcaagtaaaaaggctagtcggttat
caactgaaaaagtgccaccgagtcggtgcttttttctatagtgacctaattgcagctctggcccgtgtcctcaaaatctctggtagccgttaca
acttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatggg
tggagtatttacggtaaaactgcccacttggcagtagatcaagtgtatcatatgccaagtagcccccattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctg
gcatttggcccagtagatgaccttattgggacttctacttggcagtagatctacgtattagtcacgtattaccatgggtcgaggtgagccccacgttct

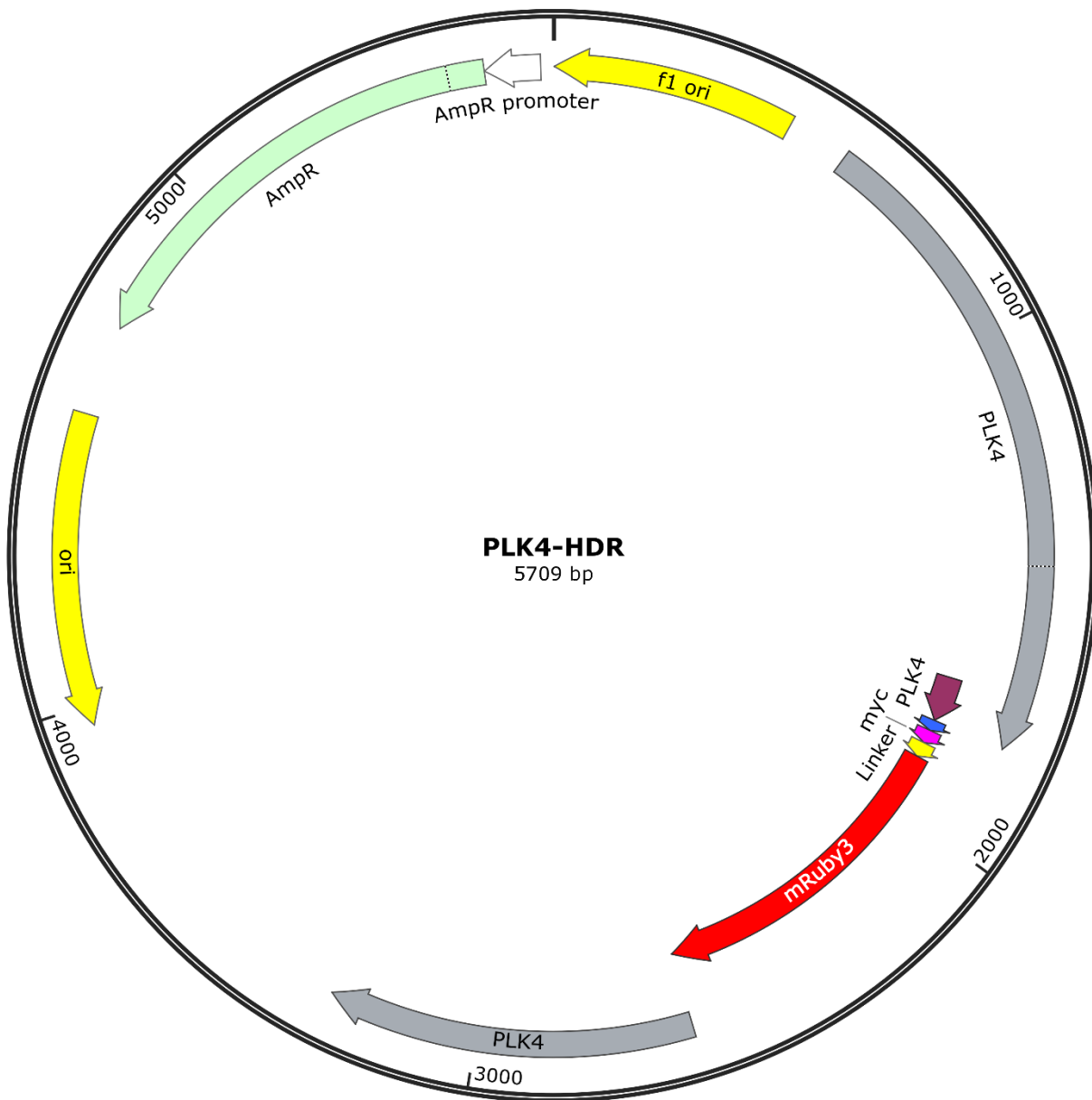
gcttactctccccatctccccccctccccacccaattttgtatttttttaattttttgtgcagcgcgatggggcgggggggggggggggg
cgcgcgccaggcgggggcgggcgggggcgagggggcgggggcgaggcgagaggtgcggcgagcgaatcagagcgggcgctccgaa
agtttctttatggcgaggcgggcgggcgggccctataaaaagcgaagcgcggcgggcgggagtcgctgcgacgctgccttcgccccgt
gccccgctccgcgccgctcgcgccgcccggcctgactgaccgcttactcccacaggtgagcgggcgggacggcccttctctccgg
gctgtaattagctgagcaagaggttaagggttaaggatggttgggtgggggtattaatgttaattacctggagcacctgcctgaaatcacttttttc
aggtggaccggtgccaccatggactataaggaccagcagggagactacaaggatcatgatattgattacaagacgatgacgataagatggccca
aagaagaagcgggaaggtcggtatccacggagtcacagcagccgacaagaagtacagcatcgccctggccatcggcaccaactctgtgggctgggc
cgtgatcaccgacgagtacaaggtgccagcaagaattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccct
gctgttcgacagcggcgaaacagccgaggccacccggctgaagagaaccgccaagaagaatataccagacggaagaaccggatctgctatctgc
aagagatcttcagcaacgagatggcgaaggtggacgacagcttctccacagactggaagagtccttctggtggaagaggataagaagcagcagc
ggcacccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccagagaagtacccaccatctaccacctgagaagaactggtggacagcaccg
acaaggccgacctgcggctgatctatctggccctggccacatgatcaagttccggggccacttctgatcggggcgacctgaaccccgacaacag
cgactggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgaggaaaacccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccat
cctgtctgccagactgagcaagagcagcggctggaaaatctgatcgccagctgcccggcgagaagaagaatggcctgttcggcaacctgattgc
cctgagcctgggctgacccccacttcaagagcaacttcgacctggcggaggatgccaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacacct
ggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtacggcaccctgtttctggccgcaagaacctgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgag
agtgaacaccgagataccaaggccccctgagcgcctctatgatcaagagatacagcagcaccaccaggacctgacctgctgaaagctctcgt
gcggcagcagctgcctgagaagtacaagagattttcttcgaccagagcaagaacggctacgccggctacattgacggcgaggccagccaggaag
agttctacaagttcatcaagccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagc
ggaccttcgacaacggcagcatccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgcggcggcaggaagattttaccattctgaagga
caaccgggaaaagatcgagaagatcctgacctccgcaccccactactcgtggcccttggccagggggaaaacagcagattcgctggatgaccag
aaagagcaggaaccatcacccccctggaacttcgaggaagtgtggacaaggcgcttccgccagagcttcatcgagcggatgaccaacttca
taagaacctgcccaacgagaaggtgctgccaagcacagcctgctgtacgagtacttaccctgtataacgagctgaccaaagtgaatacgtgacc
gaggaatgagaaagcccgccttctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtggacctgctgttaagaccaaccggaagtgacctgaaagca
gctgaaagaggactacttcaagaaaatcgagtgttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccctgggcaataccag
atctgctgaaaattatcaaggacaaggacttctggacaatgaggaacagaggacattctggaagatatcgtgctgacctgacctgtttaggaca
gagagatgatcgaggaacggctgaaaaactatgccacctgttcgacgacaaaagtgatgaagcagctgaagcggcgagataaccggctggggc
aggctgagccggaagctgatcaacggcatccgggacaagcagtcgggcaagacaatcctggatttctgaagtccgacggcttcccaacagaac
ttcatgcagctgatccacgacgacgctgacctttaaaggagatccagaaagcccaggtgtccggcaggcgatagcctgcacgagcattg
ccaatctggccggcagccccgcattaaagaaggcactctgcagacagtgaaaggtgtggacgagctcgtgaaagtgatggccggcacaagccc
gagaacatcgtgatcgaatggccagagagaaccagaccaccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagagggca
tcaagagctgggacgccaagatcctgaaagaacccccgtggaaaacaccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggc

gggatatgtactgtgaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggaccatactgtgctcagagctttctgaaggacgactccatc
gacaacaaggctgaccagaagcgacaagaaccggggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggc
ggcagctgctgaacgccaagctgattaccagagaaagtctgacaatctgaccaaggccgagagagggcctgagcgaactggataaggccggc
ttcatcaagagacagctggtgaaaccggcagatcacaagcacgtggcacagatcctggactcccggatgaactaactaagtagcagcagaatgac
aagctgatccgggagtgaaagtgatcacctgaagtccaagctggtgtccgatttccgggaaggatttccagttttacaaagtgcgagatcaacaac
taccaccagcccacgacgctactgaacgccgtctggaaccgcccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaaagcagttctgttacggcgac
tacaagggtgtacgacgtgcggaagatgatcccaagagcgagcaggaatcggaaggctaccgccaagtacttcttctacagcaacatcatgaact
tttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctgatcagacaaaacggcgaaccggggagatcgtgtgggataagg
gcccggattttgccaccgtgcggaagtgtgagcatgccccaaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacagggcggcttcagcaaaagat
ctatctgcccaagaggaacagcgataagctgatccagaaagaaggactgggacctaagaagtacggcggcttcgacagccccaccgtggcct
attctgtgctggtggtggcacaagtggaaaaaggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaaagagctgctggggatcacatcatggaagaagcag
cttcgagaagaatcccatcgactttctggaagccaagggctacaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttcgagct
ggaaaacggccggaagagaatgctggcctctgcccggcaactgcagaagggaacgaactggcctgccctccaaatatgtgaacttctgtacct
ggccagccactatgagaagctgaagggtcccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcat
cgagcagatcagcaggttctcaagagagtgatcctggccgacgtaactctggacaaaagtgtctccgctacaacaagcaccgggataagcccatc
agagagcaggccgagaatatcatccactgtttaccctgaccaatctgggagcccctgccgcttcaagtactttgacaccaccatcgaccggaagag
gtacaccagcacaagagggtgctggacgccaccctgatccaccagagatcaccggcctgtacgagacacggatgcactgtctcagctgggagg
cgacaaaaggccggcgccacgaaaaaggccggccaggcaaaaagaaaaaggaaattcggcagtgagagggcagaggaagtctgtaacatgc
ggtgacgtcagggagaatcctggcccagtgagcaaggcgaggagctgttaccgggggtggtgccatcctggtcagctggacggcgacgtaaa
cggccacaagttcagcgtgtccggcgaggcgaggcgatgccacctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgccctg
gccctggcccaccctctgaccacctgacctacggcgtgagctgtctcagccgtaccccaccacatgaagcagcagacttcttcaagtcggc
atgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagaccgcccaggtgaagttcgagggcgacaccctg
gtgaaccgcatcagctgaagggtcagcttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacgccacaacgtctat
atcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaactcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcggcaccactacca
gcagaacacccccatcggcgacggccccgtgtgtgctgcccgacaaccactacctgagcaccagtcgccctgagcaaaagaccccaacgagaag
cgcgatcacatggtcctgctggagtctgtgaccgccgcccggatcactctggcatggacgagctgtacaaggaatttaactagagctcgtgatca
gcctcagctgtccttctagtccagccatctgtgtttgccctccccctgaccttcttaccctggaaggtgccactcccactgtcctttcttaata
aaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagagaat
agcaggcatgctggggagcggccgaggaaccctagtgatggagtggcactccctctctgcgctcgtcgtcactgaggccggggcgacca
aaggtcggccgacgcccgggctttgccggggcggcctcagtgagcagcagcgcgagctgctcagggggcgctgatcggtatcttctctt
acgcatctgtcggtatcttcaaccgcatacgtcaaagcaacctagtagcgcctgtagcggcgattaagcgcggcggtgtggtggttacgcg
cagcgtgaccgtacacttggcagcgcctagcggcctcttctcttcttcttcttctccttctcggcagttcggcgtttccccgtcaagctta

aatcgggggctcccttaggggtccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgatttgggtgatggttcacgtagtgggccatcgcct
gatagacgggttttcgccctttgacgttggagtccacgttcttaatagtgactcttgttccaaactggaacaactcaaccctatctcgggctattctt
tgattataagggattttgccgatttcggcctattgggtaaaaaatgagctgatatacaaaaatataacgcgaatttaacaaaaatattaacgtttacaat
atgggtgactctcagtacaatctgctctgatgccgatagttaagccagccccgaccccccaacaccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgc
tcccgcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggtttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaaggg
cctcgtgatacgcctatTTTTataggttaatgcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctattgt
ttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagatgagattcaacatt
ccgtgtgcccttattccctttttgcccattttgcttctctgttttctcaccagaaacgctgggtaaagtaaaagatgtgaagatcagttgggtgc
acgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcggccgaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagtctg
ctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggctgccgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtc
acagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccataaccatgagtgataaactgcggccaacttacttctgacaacg
atcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacc
aaacgacgagcgtgacaccagatgcctgtagcaatggcaacaacgttgccgaaactattaactggcgaacttacttctagcttccggcaacaat
taatagactggatggaggcggataaaagtgcaggaccacttctgcgctcggccctccggctggctggttattgtctgataaaactggagccggtgagc
gtggaagccgcggtatctgacgactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtatctacacgacggggagttaggcaactatggatga
acgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgattaaaaactca
tttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaa
aagatcaaaggatcttctgagatcctttttctgcgcgtaactgctgcttgcaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgttgcggatca
agagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaataactgtccttctagtgtagccgtagtaggcccaccacttcaag
aactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgctaactcgttaccagtggtgctgcccagtgccgataaagtcgtgtcttaccgggtggactcaagac
gatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacggggggttctgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaaactgagatacc
tacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttcccgaaggagaaagggcagacaggtatccggttaagcggcagggctgggaacaggagagcgcac
gagggagcttccaggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcggcacctctgactgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggg
cggagcctatggaaaaacgcgcaacgcggcctttttacggttctcggccttttctggccttttctcacatgt

10.3.3 PLK4-HDR (Sintetizado para este trabajo)

Created with SnapGene®



ctaaattgtaagcgtaataatTTTTGTTAAAATTCGCGTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCTTATAAATC
 aaaagaatagaccgagataggggtgagtgttGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCG
 tctatcagggcgatggccactactgtaacatcacctaatacaagTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGC
 CCCGATTAGAGCTTGACGGGAAAGCGGCgaacgtggcgagaaaggaaggaagaaagcgaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtg
 tagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacaccgCGCGCTTAATGCGCCGTACAGGGCGCTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGA

aggcgatcggcgccctcttcgctattacgccagctggcgaaaggggatgtgctgTACGTGTGT*GTATTGCGCCGTG
Gaagaggttgggtcctttagccttactgttccatagtgtaactcgatggccttttcagaagtaagggactcctaattctaggtcaataataacca
aacctatttactaaaagaacagaaaaaagaatcttaagataaacctgcttattttccaaatgaaaggctataccccaatctaatactgtaacgtgatta
atgtttgaaagactttttgaatgtgtatattcattctatatgaaaaatgtgtcaggcaccagccaaaaataagaatctggcaatatgaaaaacaagga
gttatttgcttctcatttaaatcagaacttactaaaagtaggtactgacgatgccaatgcaggcgttctctttatgagaagtgttattgtaatggag
tactgggacaaataatctgtagatacctaccaactgcattttgtgttaaattagataatgcagtgccatcacttaataactatgtttcaagtgagag
gctttgtaaaagctctttaggtgctccagaagtggaaggatgcagatgcaaagtggttaaaccctgttccaggatacatgttgacattttattg
ctatggctattggaaaatgttaacatttaatagaaatataattcataatgtgttagcttggatttttctgtagaattagggcttttttttttttttttt
ttttttgagacagagtctcgctctgtgccaggctcgagtagtggtgcgactggctcactgcaacttctgcctcctgggtcaagcagttctcctgc
ctcagcctcctgagtagctgagattacagGCATACGCCACCACACTGacgaagccagttcaagttatctaatttctcctctgttac
ttaatgtgtttagaaaatggctgttttaaaagaaaagaactgtatgcttcacttgatttaggtatctaataaataattgttataattttctgaggtgctct
tgttattgaagaattactgaaaaataatgtgctttttgggactctcatgagaaccaagtaattcagttacgattttgtctttttctttgcttacttaggt
atggagaaaatgaaaaattaccagactacatcaaacagaaattacagtgtctgtctccatcctttgatgtttctaaccgactcctaatttcatgggtgg
tgtagcggcgggtggcagcgaacaaaactcatctcagaagAGGATCTGGGCGAAGATCCGATGGTAgcaaaagc
gaagaagtgtctaagggcgaagagctgatcaaggaaaatagcgtatgaaggtggtcatggaaggtcgggtcaacggccaccaattcaaatgcacag
gtgaaggagaagcagaccgtacgaggagtgcaaacatgaggatcaaagtcacgaggaggaccctgccatttgctttgacattcttggcac
gtcgttcatgtatggcagccgtacctttatcaagtaccggcgcacatccctgatttttaaacagtccttctgagggttttacttgggaaagagttac
gagatacgaagatgggtggagctgcaccgtcacgcaggacaccagccttgaggatggcagctcgtctacaacgtcaaggtcagaggggtaacttt
ccctcaatgggtcccgtgatgcagaagaagaccaaggggtgggagcctaatacagagatgatgtatccagcagatgggtgctgagaggatacactg
acatcgcactgaaagttgatgggtggccatctgcactgcaacttctgtgacaacttacagggtcaaaaaagaccgtcgggaacatcaagatgccgggt
gtccatgccgttatcaccgctggaaggatcgaggagagtgacaatgaaacctacgtagtgcgaagagaagtggcagttgccaaatacagcaacc
ttgggtggcatggcagcgtgtacaagcattgattaaaactccttcagacataataagtttaataaataactttttgtgacttcaagtaaagtgtttt
tttaatttaacataaagtcttcagaaagcctttctatgaaagaatttaacctataatgtaaaggatgtattctgagagaacaaagcagaatgaaacttga
gtcacttactaataatagtgatataaaatagaacacctgactttgctcttagaccataacccccgaacttactatgttcatatattgtattgaaacaattt
taaaagcaaaaatgtaaatgatgtgtagtttattgtgctttattgttttccctgcgtctcagacatgttgagaatcatggacaaaacctgctggaattttgg
aattttgaaagttaataatgtgtatttattgtataagtaacatagtaaacatgtatattgttttatattttttgtaacaccagtgctgatgaaacatt
ttgcaaatgcattttataaaaaataaataatagtgataagttacattatcttttgattcatttaataaataacttatttttaataacttaccagtaaactcactt
ttaaattttgtgcctgttggaggaccaattaaatttaaatataattttgcaaatgttaaacatgttttctctattatctgaaaacttgggtatatttaatga
attttttaattatacattaagttctgggttacatgtgcagaacatgcagttttgttacataggtatacatgtccatggtagtttctgcaccatcaaccg
gtcacctacattaggtatttctgtaatgttatccccctaacctccatccccacagggccagtggtgtgattccccctccctaggtccatgtgttt
ttgtgggtttgtttttttttttgagacagagtctcactctgctgccaggctggagtgcgaatggcagcatctcgggtcactgcaacctctgcctccagg
ttcaagcattctcctgcctcagcctccaagtagctgggattacaggtgcagccaccataaccagctaatttttgtatttttagtagagatggggtttcg

ccatgttggccaggctggtcttgaaccctgacctcaggtgatctgcccgccttggcctcccaaagtacttggattacagggcatgaggcaccacacc
agccccatgtgttcttattgttcagcttccacttatgaatgagaacatgcgCCTGGAGAGGTTCCCGACATACCgggataacgc
aggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttggctggcgtttttccataggctccgccccctgacga
gcatcacaanaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcgtttcccctggagctccctcgtgcgctc
cctgttccgacctgcccgttaccggatactgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgtttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgg
gtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagcgtgcgcttatccgtaactatcgtcttgagccaacccgg
taagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggctgctacagagttctgaagtggtggcct
aactacggctacactagaaggacagtatttggatctgcgctcgtcgaagccagttacctcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaaa
accaccgctggtagcgggtggtttttttgttgaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgatctttctacggggtcga
cgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggttttggatcatgagattatcaaaaaggatcttcactagatcctttaataaaaaatgaagtttaaatc
aatctaaagtatatagtaaaacttggctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcgtctgtctatttcgttcacatagttgcc
tgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccag
atztatcagcaataaacagccagccggaaggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgcgggaag
ctagagtaagtagttcggcagtaaatagtttgcgcaacgttggccattgctacaggcatcgtggtgacgctcgtcgtttggtaggttattcagct
ccggttccaacgatcaaggcaggtacatgatccccatggttgcaaaaaagcggtagctccttcggtcctccgatcgttgctcagaagtaagttgg
ccgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagt
cattctgagaatagtgatgcccgcgaccgagttgctcttgcggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcctca
ttggaaaacgttcttcggggcgaacttcaaggatcttaccgctggtgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatc
tttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaaggaataaggcgacacggaaatgttgaatactcact
cttccctttcaatattattgaagcatttatcagggtattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaatagggggtccgcgca
cattccccgaaaagtccac

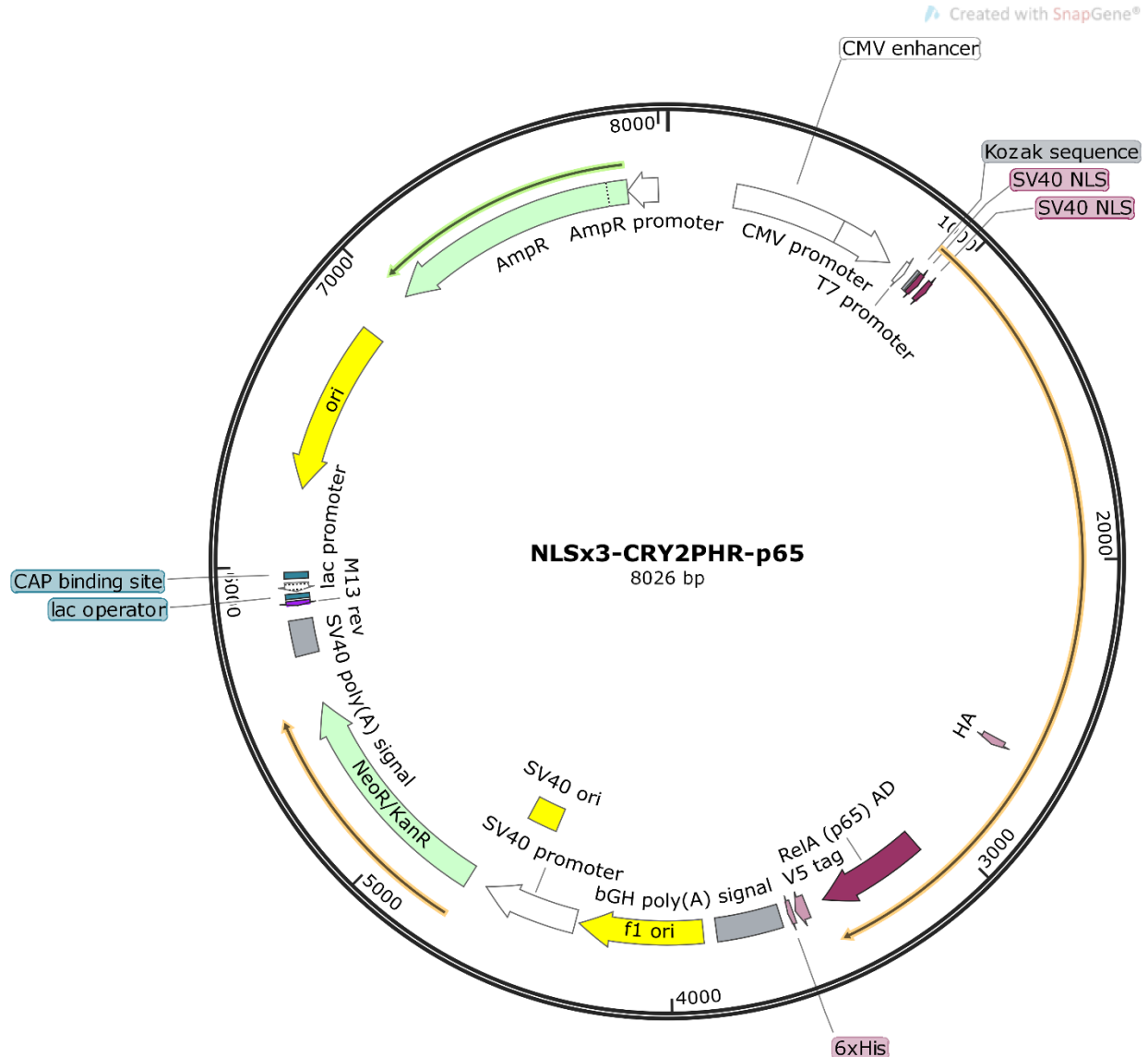
aggctatataagcagagctctctggctaactagagaaccactgcttactggcttatcgaaattaatacactactataggagacccaagctggcta
gctttaaacttaagcttaccggtgccaccatgtaccatacagatgtccagattacgcttcgccgaagaaaaagcgcaaggtcgaagcgtccgaca
gaagtacagcatcggcctggccatcggcaccaactctgtgggctgggctggtgatcaccgacgagtacaaggtgccagcaagaaattcaaggtgct
gggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaacagccgagccaccggctgaagaga
accgccagaagaagataaccagacggaagaaccggatctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttctcc
acagactggaagagtcttctggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgaga
agtaccccaccatctaccacctgagaagaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgctggctgatctatctggcctggcccacatgatcaa
gttccggggccacttctgatcggggcagctgaaccccgacaacagcagcgtggacaagctgttcacagctggtgacagctacaaccagct
gttcgaggaaaacccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgacagctgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgc
ccagctgccggcgagaagaagaatggcctgttcggcaacctgattgccctgagcctgggctgacccccactcaagagcaacttcgacctggcc
gaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctggacaacctgctggccagatcggcgaccagtacggcagctgttctg
gccccaagaacctgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggccccctgagcgcctctatgatcaag
agatacgcagcaccaccaggacctgacctgctgaaagctctcgtgcccagcagctgctgagaagtacaaagagatttcttcgaccagagca
agaacggctacgccgctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaagttcatcaagccatcctggaaaagatggacggcaccgagg
aactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgccaagcagcggaccttcgacaacggcagcatccccaccagatccacctgggagagctg
cacgccattctgcccggcaggaagattttaccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatctgaccttccgcatcccctactacgt
gggccccttggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcgggaaacctacccccctggaacttcgaggaagtggtggaca
agggcgttccgcccagagcttcatcgagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgccaagcacagcctgctgtacg
agtacttaccgtgtataacgagctgaccaagtgaatacgtgaccgagggaatgagaaagccccttctgagcggcgagcagaaaaaggcca
tctgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaaagtaccgtgaagcagctgaaagaggactactcaagaaaaatcgagtgttcgactccgtggaaatc
tccggcgtggaagatcgggtcaacgcctccctgggacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttctggacaatgaggaaaacg
aggacattctggaagatatcgtgctgacctgacactgtttgaggacagagagatgacgaggaacggctgaaaacctatgccacctgttcgacgac
aaagtgatgaagcagctgaagcggcggagataaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccgggacaagcagtcgggca
agacaatcctggatttctgaagtccgacggcttcgccaacagaaacttcatgacgctgatccacgacgacagcctgacctttaaagaggacatccag
aaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacattgccaatctggccggcagccccgccattaagaaggcatcctgcagacagt
gaaggtggaggacgagctcgtgaaagtgatggccggcacaagcccagaaacatcgtgatcgaatggccagagagaaccagaccaccagaag
ggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagaggcatcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacccccgtggaaaaa
cccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggaggatgtgtacgtggaccaggaactggacatcaaccggctgtccgacta
cgtgtggacgccatcgtgcctcagagcttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgaagaaccggggcaagagcga
caacgtgcccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagctgctgaacccaagctgattaccagagaaagttcgacaatctg
accaaggccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaagagacagctggtggaaaaccggcagatcacaagcacgtgg
cacagatcctggactcccggatgaacactaagtagcagcagagaatgacaagctgatccgggaagtgaagtgatcacctgaagtccaagctggtgctc

cgatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccgcccacgacgctacctaagcgcgtcgtgggaaccgcc
ctgatcaaaaagtaccctaagctggaagcaggtcgtgtacggcactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgcgaggaa
atcggcaaggctaccgccaagtacttcttacagcaacatcatgaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcc
tctgatcgagacaaacggcgaaccggggagatcgtgtgggataagggcgggattttgccaccgtgcggaagtgtgagcatgccccaaagtga
tatcgtgaaaaagaccgaggtgcagacaggcggcttcagcaaagagtctatctgcccaagaggaaacagcgataagctgatcgccagaaagaagg
ctgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccccaccgtggcctattctgtgctggtggccaaagtggaaaaggcaagtccaagaaactg
aagagtgtgaaagagctgctggggatcaccatcatggaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgactttctggaagccaagggtacaaagaag
tgaaaaggacctgatcatcaagctgctaagtactccctgttcgagctggaaaacggccggaagagaatgtggcctctgccggcgaactgcagaa
gggaaacgaactggcctgcccctcaaataatgtgaacttctgtacctggccagccactatgagaagctgaagggtcccccgaggataatgagcag
aaacagctgtttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctcaagagagtgatctggccgacgctaact
ggacaaagtgtgctcgccctacaacaagcaccgggataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatccactgtttaccctgaccaatctggga
gcccctgccccttaagtactttgacaccaccatcgaccggaagaggtacaccagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagc
atcaccggcctgtacgagacacggatcgacctgtctcagctgggagggcagcgtaccggagggaagtggcagctctggcggcagtgagggtctggt
ggcagcggaaatgaatggagctataggaggtgaccttttctcaatcttctgacatgtcggctctagagcgcgaagggtcacctcaagtacctcaat
cccacctttgattctcctcgcgggcttcttggcatttctcaatgattaccggcggcgagatggacagctatcttcgactgcccgtttgaaatctccg
atgatgtacgggtgagacgacggtggaaggtgattcaagactctcaatctcgggaaacgacgcttgggactggaaattcaagaaacggaagttgat
acagagactaaggattgtaatgagaagaagaagaagatgacgatgaacagagatgacctagtagaagaaggagaagaagaagagtcgaaaataaca
gagcaaaacaatgggagcacaanaagcatcaagaagatgaaacaaagccaagaagaagaacaatcttctaatgattcatcaaatgacga
aggaaatggagaaaacggattatattcatgttcgtgcacgacgaggccaagccactgatagtcacagcatagcagaacgagttagaagagaaaagat
cagtgagagaatgaagtttctacaagatttgggtcctggatgcgacaagatcacaggcaagcagggatgcttgatgaaatcattaactatgttcagtct
cttcagagacaaatcgagttctatcgatgaaactagcaattgtgaaatcaaggcggattttgatatggatgacattttgccaaagaggttgcctcaac
tccaatgactgtggtgccatctcctgaaatggttcttccggttattctcatgagatggtcactctggttattctagttagatggttaactccggttacctc
atgtcaatccaatgcagcaagtgaaatcaccagttctgggggttctggggggagcggcgggggatctggaagtggcagcggaggcctcgagttagag
ggcccgtttaaaccgctgatcagcctcagctgtgccttctagtgcagccatctgttttgcctccccctgccttcttgaccctggaaggtgc
cactcccactgtccttcttaataaaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaag
ggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggtctatggcttctgaggcggaaagaaccagctggggctctaggggtat
ccccacgcgcctgtagcggcgattaagcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccttagcggcctcct
ttcgcttcttcccttcttctcgccacgttcgccggcttccccgtcaagctcaaatcgggggctcccttagggttccgatttagtgctttacggcac
ctcgacccccaaaaacttgattaggggtgaggttcacgtagtggccatcgccctgatagacggttttcgcccttgacgttgaggtccacgttcttaa
tagtggactctgttccaaactggaacaacactcaacctatctcgtctattctttgattataagggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaat
gagctgatttaacaaaaatcaacgcgaattaattctgtggaatgtgtcagttagggttggaaagtcccaggctccccagcaggcagaagtatgc
aaagcatgcatctcaattagtcagcaaccaggtgtggaagtcccaggctccccagcaggcagaagtatgcaagcatgcatctcaattagtcagca

accatagtcgcccccctaactccgccatcccgccctaactccgccagttccgccattctccgccatggctgactaatttttttattatgcaga
ggccgaggccgctctgcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctaggcttttgcataaagctcccgggagcttgatatac
catttcggatctgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggcgcctgggtggagaggct
attcggctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgcgtgtccggctgtcagcgcagggggcggcgggtcttttgcataagaccg
acctgtccggtgcctgaatgaactgcaggacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacgacgggcgtccttgcgcagctgtgctgcacgtgt
cactgaagcgggaagggactggctgctattgggcgaagtgcggggcaggatctcctgtcatctcaccttgcctcctgcgagaaagtatccatcatgg
ctgatgcaatgcggcggctgcatacgttgatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaacaatcgcatcgagcagcactcggatgga
agccggctctgtgatcaggatgatctggacgaagacatcaggggctcgcgcagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgatcccgcagg
cgaggatctcgtcgtgacctatggcgtgctgcttgcgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtg
ggcggaccgctatcaggacatagcgttggctaccgctgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttctcgtgctttacggtatcg
ccgctcccgattcgcagcgcategccttctatcgccttcttgacgagttctctgagcgggactctggggctcgcgaaatgaccaccaagcgcagcc
caactgccatcacgagatttcgattccaccgccccttctatgaaaggttgggcttcggaatcgttttccgggacgcccggctggatgactccagcg
cggggatctcatgctggagttctcgcaccccaactgtttattgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcaaaattcacaataaag
cattttttcactgcattctagttgtggtttgcacaactcatcaatgtatcttatcatgtctgtataccgtcgacctctagctagagcttggcgtaatcatggt
catagctgttctcgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacagcgggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgag
ctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagag
gcggtttgcgtattggcgccttccgcttctcgtcactgactcgctcgcctcggctgttcggctgcggcgcagcggatcagctcactcaaaggcg
gtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgtg
ctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaccggacaggactataaagatacc
aggcgtttcccctggagctccctcgtgcgctcctcgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgcttttcccttccgggaagcgtggcgc
tttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccaccgctgcg
ccttatccggtaactatcgtcttgagccaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcaggtat
gtaggcgggtgctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaagaacagatatttggtatctgcgctcgtcgaagccagttaccttcg
gaaaaagagtggtagctcttgatccggcaaaaccaccgctggtagcgggtgggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggat
ctcaagaagatcctttgatctttctacgggctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggttttggatcatgagattatcaaaaaggatcttc
acctagatccttttaataaaaatgaagtttaataatctaaagtatatagagtaacttggctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcaccta
tctcagcgtatctctatttcgttcattcctatagttgctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggttaccatctggccccagtgctgca
atgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaacagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttat
ccgctccatccagtctattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttcgcagttaatagtttgcgcaacgttggcattgctacaggcatcgtg
gtgtcacgctcgtcgtttggatggcttattcagctccggttccaacgatcaaggcaggttacatgatccccatgttgcaaaaaagcgggttagct
ccttcggctcctccgatcgttgcagaagtaagtggccgcaggttatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgctatgccatccgtaa
gatgcttttctgactggtagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatcggcgcaccgagttgcttggccggcgtcaatacgggataatac

cgccacatagcagaactttaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactcctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatg
taaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcgttcttgggtgagcaaaaacaggaaggcaaatgccgcaaaaaggga
ataagggcgacacggaaatgtgaatactcactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaatg
tattgaaaaataaacaatataggggttccgcgcacatttcccgaaaagtccacctgac

10.3.5 NLSx3-CRY2PHR-p65 (Addgene #64124)



gacggatcgggagatctcccgatcccctatgggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatctgctccctgctgtgtgtt
ggaggtcgcctgagtagtgcgcgagcaaaatttaagctacaacaaggcaaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttagggtagggcgttttg
cgctgcttcgcgatgtacgggccagatatacgcgttgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacggggcattagttcatagcccatata
tggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatag
taacgccaatagggactttcattgacgtcaatgggtggagtattacggtaaaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgcc
ccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagttacatgaccttatgggactttcctacttggcagttacatctacgtattagca
tcgctattaccatgggtgatgcggttttggcagttacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccacccattgacgtcaa
tgggagttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtggg

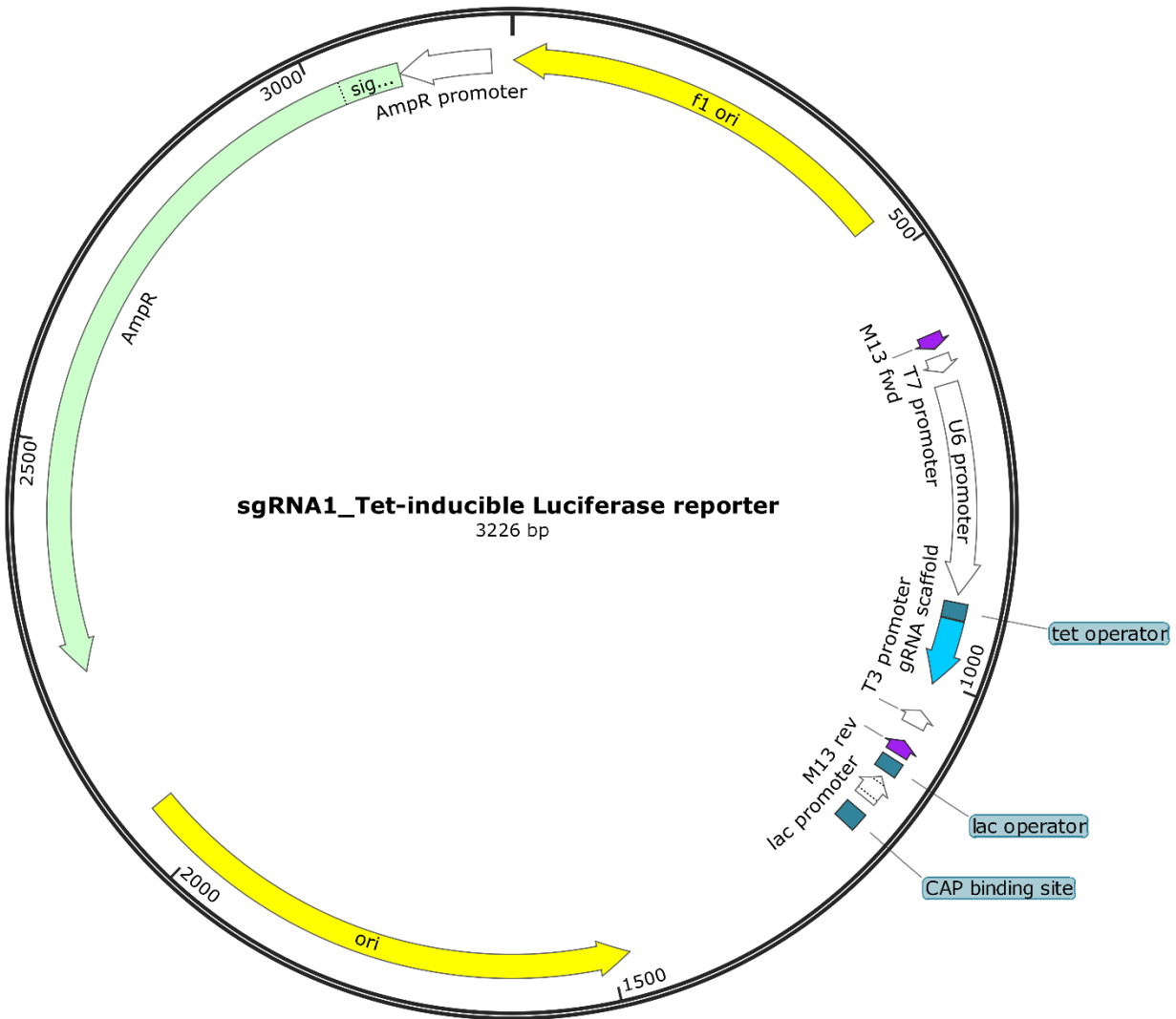
aggctatataagcagagctctctggctaactagagaaccactgcttactggcttatcgaaattaatacactactataggagacccaagctggcta
gtaagcttgcccatggccagcccaagaagaagcgcaaggtggaagctagcgcttcccgaagaaaagcggaaagtcgagcctccgcatct
ccaaaaaaaaaagcaaggtgaagcatctggatccggtaaccggaggaagtgccagctctggcggcagtgagggtctggtggcagcggatgaa
gatggacaaaagactatagtttggtttagaagagacctaaggattgaggataatcctgcattagcagcagctgctcacgaaggatctgttttctgtct
tcatttggctctgaagaagaaggacagtttatcctggagagctcaagatgggtggaacaacacttctcacttatctcaatccttgaaggct
cttggatctgacctcactttaatcaaaaccacaacacgatttcagcgatcttggattgtatccgcttaccggtgctacaaaagtcgtcttaaccact
ctatgatcctgtttcgttagttcgggaccataaccgtaaaggagaagctgggtggaacgtgggatctctgtgcaaagctacaatggagatctattgtatgaa
ccgtgggagatatactgcgaaaaggcaaaccttttacgagttcaattcttactggaagaaatgcttagatatgtcgattgaatccgttatgcttctct
ccttggcggttgatgccaataactgcagcggctgaagcgatttggcgtgttcgattgaagaactagggtggagaatgaggccgagaaaccgagca
atgcgtgttaactagagcttggctccaggatggagcaatgctgataagtactaaatgagttcatcgagaagcagttgatagattatgcaaagaacag
caagaagtgtgggaattctacttactacttttccgtatctccatttcgggaaataagcgtcagacacgtttccagtggtcccggatgaaacaaa
ttatatgggcaagagataagaacagtgaggagaagaagtgcagatcttttcttaggggaatcggtttaagagagtattctcggatataatgtttcaac
ttcccgttactcacgagcaatcgttggtagtcatctcggttttccctgggatgctgatgtgataagttcaaggcctggagacaaggcaggaccgg
ttatccgttgggtgatgccgaatgagagagcttgggctaccggatggatgcataacagaataagagtgattgtttcaagcttctgtgtaagttcttc
tcctccatggaaatggggaatgaagtatttctgggatacacttttggatgctgatttggaaatgtgacatccttggctggcagtatatctctgggagtacc
ccgatggccacgagcttgatcgttggacaatcccgcgttacaaggcgccaaatgacccagaaggtgagtacataaggcaatggcttccgagctt
gagagattgccaactgaatggatccatcatccatgggacgctcctttaaaccgtaactcaagcttctggtgtggaactcggaaacaaactatgcgaaacc
attgtagacatcgacacagctcgtgagctactagctaaagctatttcaagaaccctgaagcacagatcatgatcggagcagcaggggggttctggggg
gagcggcgggggatctggaagtggcagcggaggcctcgagcagtagccctacgacgtgcccgattacggcagttccagttacctgccaagatacag
acgatcgtcaccggattgaggagaacgtaaaaggacatatgagacctcaagagcatcatgaagaagagtcctttcagcggaccaccgacccccg
gcctccacctcgacgattgctgtccttcccgcagctcagcttctgtccccagccagcaccaccgacctatccctttacgtatccctgagcaccat
caactatgatgagttccaccatggtgttcttctgggcagatcagccaaggcctcggccttggccccggccccctcccaagtctgccccaggctc
cagcccctgcccctgctccagccatggtatcagctctggcccaggccccagcccctgtcccagtcctagcccaggcccctcctcaggctgtggccc
acctgcccccaagccaccaggctggggaaggaaacgctgtcagaggcctgctgcagctgcagttgatgatgaagacctgggggcttctgctgg
caacagcacagaccagctgtgttcacagacctggcatccgtcgacaactccgagtttcagcagctgctgaaccagggcatacctgtggccccccac
acaactgagccatgctgatggagtacctgaggctataactcgcctagtacaggggcccagaggccccccgaccagctcctgctccactggggg
gccccggggctcccaatggcctctttcaggagatgaagacttctctccattgaggacatggacttctcagccctgctgagtcagatcagctcctaa
gaattctgcagatatccagcacagtgccggccgctcagcttagagggccctcgaaggtaaagcctatccctaaccctctcctcggctcagattctacg
cgtaccggtcatcatcaccatcaccattgagtttaaacccgctgatcagcctcagctgtgcttctagtggcagccatctgttgttggccccccccgt
gccttcttaccctggaaggtgccactcccactgtccttctcaataaaatgaggaaatgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctggggg
gtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgctgggtgggctctatggcttctgaggcggaaaga
accagctggggctctaggggtatccccacgcgcctgtagcggcgcattaagcgcggcgggtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacactt

gccagcgcctagcgcggctcctttcgtttcttcccttcttctcgcacgttcgcccgtttccccgtcaagctcfaaatcgggggctccctttag
ggttccgatttagtgctttacggcacctcgacccccaaaaactgattagggtaggttcacgtagtggccatcgccctgatagacggttttcggcc
tttgacgttggagtcacgttcttaaatagtgactctgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggctctattctttgattataagggattttgc
cgatttcggcctattgggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaattaacgcgaattaattctgtggaatgtgtgtcagttaggggtgtgaaagtccccag
gctccccagcaggcagaagtatgcaagcatgcatctcaattagtcagcaaccagggtgtggaagtccccaggctccccagcaggcagaagtatgc
aaagcatgcatctcaattagtcagcaaccatagtcggcccctaactccgcccataccgcccctaactccgcccagttccgcccattctccgccc
ggctgactaatttttttattatgacagaggccgaggccgctctgcctctgagctattccagaagtagtggagggtttttggaggcctaggcttttgc
aaaaagctcccgggagctgtatccatcttccggatctgatcaagagacaggatgaggatcgttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcagggt
ctccggccgcttgggtggagaggctattcggctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgcccggttccggctgtcagcgcaggg
gcccgggttctttgtcaagaccgacctgtccggtgcccgaatgaactgcaggacgaggcagcggctatcgtggctggccacgacgggctt
ccttgcgacgtgtgctgcagctgtcactgaagcgggaaggactggctgctattggggaagtgcggggcaggatctcctgtcatctcaccttgc
tcttccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcccggctgcatacgttgatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaaacatcgca
tcgagcagcagctactcggatggaagccggtctgtcgtcaggtgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgca
ggctcaaggcgcgatgcccagggcaggatctcgtcgtgacctatggcgtgcttgcgcaatcatggtggaaaatggccgcttttctgg
attcatcactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctaccggtgatattgtgaagagcttggcggcgaatgggctg
accgcttctcgtgctttacggtatcggcgtcccgattcgcagcgcacgccttctatgccttcttgacgagttctctgagcgggactctggggtc
gcgaaatgaccgaccaagcgcgcccacactgccatcacgagatttcgattccaccgccccttctatgaaaggttgggcttgggaatcgtttccgg
gacggccggtggatgatctccagcgcgggatctcatgctggagttctgcccaccccaactgtttattgacgcttataatggttacaataaagca
atagcatcacaatttcacaataaagcatttttctactgcattctagtgtggtttgtccaaactcaatgatcttatcatgtctgtataaccgtcacct
ctagctagagcttggcgtaatcatggtcatagctgttctcgtgtgaaattgttatccgctcaaatccacacaacatacagcgggaagcataaagtgt
aaagcctggggtgcctaagtagtgagtaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgctgtccagctgcattaat
gaatcggccaacgcgcccgggagaggcggtttgcgtattggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcgctcggctcgttccgctcggcg
agcggatcagctcactcaaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggc
caggaaaccgtaaaaaggccgcttctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcagagggtggcga
aaccgacaggactataaagataaccaggcgtttcccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgc
ctttctccttcgggaagcgtggcgtttctcatagctcagctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttccgctccaagctgggctgtgtgcagaa
cccccgctcagcccaccgctgcgcttatccggtaactatcgtcttgagtcacaccggtaagacacgacttatccgactggcagcagccactgg
taacaggattagcagagcaggtatgtagggcgtgctacagagttcttgaagtggggcctaactacggctacactagaagaacagtatttggatctg
cgctctgtgaagccagttaccttcggaaaaagagtggtagctcttgatccggcaaaaccaccgctggtagcgggtggttttttgttgcaagcag
cagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttgg
tcatgagattatcaaaaaggatcttccctagatccttttaataaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaaactggctcagagttac
caatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgtctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgctgtagataactacgatacgggagg

cttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaagggccgag
cgcagaagtggctctgcaactttatccgcctccatccagcttattaattgttccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagttgcaactg
tggtgccattgctacagggcatcgtgggtgcacgctcgtcgtttgggtatggcttcattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatcccc
atgttgcaaaaaagcggtagctccttcggctcctccgatcgttgcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatgggtatggcagcactgcata
attcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctctt
gcccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaactcctcaaggatc
ttaccgctgttgagatccagttcagatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcgttctgggtgagcaaaaacagg
aaggcaaatgccgcaaaaaggaataagggcgacacggaaatgtgaatactcactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggttatt
gtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataacaaataggggttccgcgcacattccccgaaaagtgccacctgacgtc

10.3.6 sgRNA1 Tet-inducible Luciferase reporter (Addgene # 64161)

Created with SnapGene®



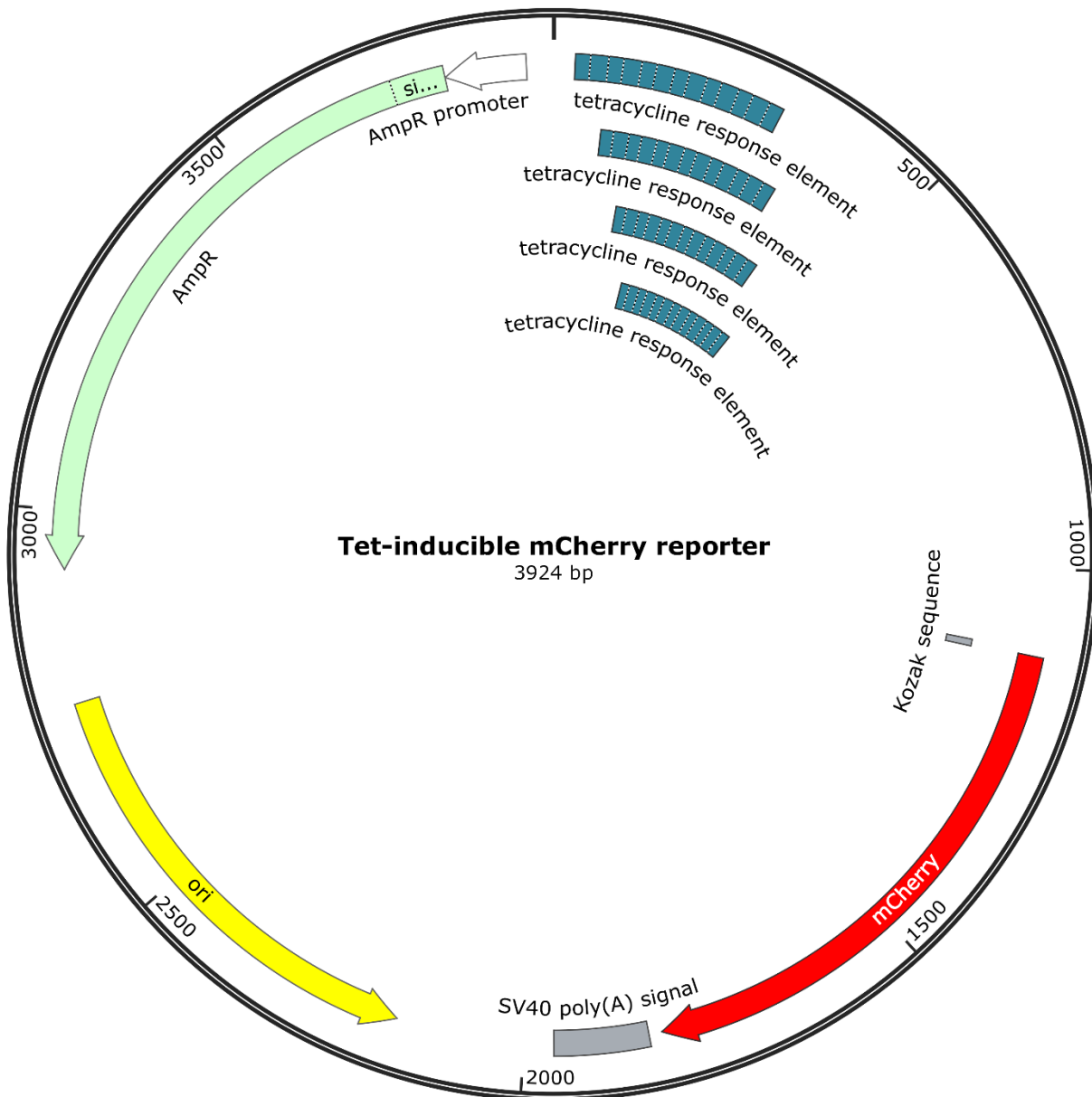
```

ctaaattgtaagcgttaatatTTTgttaaaattcgcgttaaattTTTgttaaatcagctcattTTTaaaccaataggccgaaatcggcaaaatccctataaatc
aaaagaatagaccgagatagggTtgagtTgtTccagTtTggaacaagagtcactattaaagaacgtggactccaacgtcaaagggcgaaaaccg
tctatcagggcgatggccactactgtaaccatcacctaatacaagTTTTTgggTcgaggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaggggagc
ccccgatttagagcttgacgggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaagggaaagcgaaggagcgggcgctagggcgctggcaagtg
tagcggtcacgctgcgctgaaccaccacaccgccgcttaatgcgccgtacagggcgctcccattcgccattcaggtgcgcaactgttggga
agggcgatcggTgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcgattaagtTgggtaacgccagggtttccag
tcacgacgttTgaaaacgacggccagtgagcgcgctaatacgactcactatagggcgaaattgggtaccgagggcctatttccatgattccttcatat
ttgcatatacgatacaaggctgtagagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagtagcaaaaatcgtgacgtagaaagtaataattt
ctgggtagttTgcagTttTaaaattatgTttTaaaatggactatcatatgcttatcgtaactgaaagtatttcgatttctTggctttatatactTgtggaaag
    
```

gacgaaacacgctctctatcactgatagggagggttttagagctagaaaatagcaagttaaaataaggctagtcggttatcaactgaaaaagtggcaccg
agtcgggtgctttttccgcggtggagctccagcttttgtcccttttagtgagggttaattgcgcgcttggcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtga
aattgttatccgctcacaattccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaataagtgagtgagctaaactcacattaattgcgt
tgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcg
ctctccgcttctcgtcactgactcgtcgtcgtcggctcgttcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacaga
atcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaaccgtaaaaaggccgcttgcgtggcgtttttccataggct
ccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaccggacaggactataaagataccaggcgtttccccctggaag
ctccctcgtcgtctcctgttccgacctgccgttaccggatacctgtccgcttttcccttcgggaagcgtggcgttttctcatagctcagctgt
aggatctcagttcgggtgaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagcctgcgccttatccgtaactatcgt
cttgagccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcaggtatgtaggcgggtctacagagt
tcttgaagtggggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggatctgcgctcgtggaagccagttacctcgaaaaagagttggtagctc
ttgaccggcaaaaaccaccgctggtagcgggtggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatc
tttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttggctagattatcaaaaaggatcttcacctagatcctttaaattaa
aatgaagttttaatacaatctaaagtatatatgagtaaaactggctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatctc
gttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacggggagggttaccatctggccccagtgctgcaatgataaccgcgagacca
cgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgcctccatccagtctat
taattgttccgggaagctagagtaagtagttcgcagttaatagtttgcgcaacgttggccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttg
gtatggcttattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcggtagctccttcggctcctccgatcgt
tgtcagaagtaagttggccgagctgttatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactgg
tgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcccggcaccgagttgctcttgcggcgctcaatacgggataataccgcgccacatagcagaa
ctttaaagtgtcatattggaaaacgttcttcggggcgaaaactcctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcacc
caactgatcttcagcatctttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataaggcgacacgga
aatgttgaatactcatactctccttttcaatattatgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaaatgtattgaaaaataaac
aaatagggttccgcgcacattccccgaaaagtgccac

10.3.7 Tet-inducible mCherry reporter (Addgene # 64128)

Created with SnapGene®



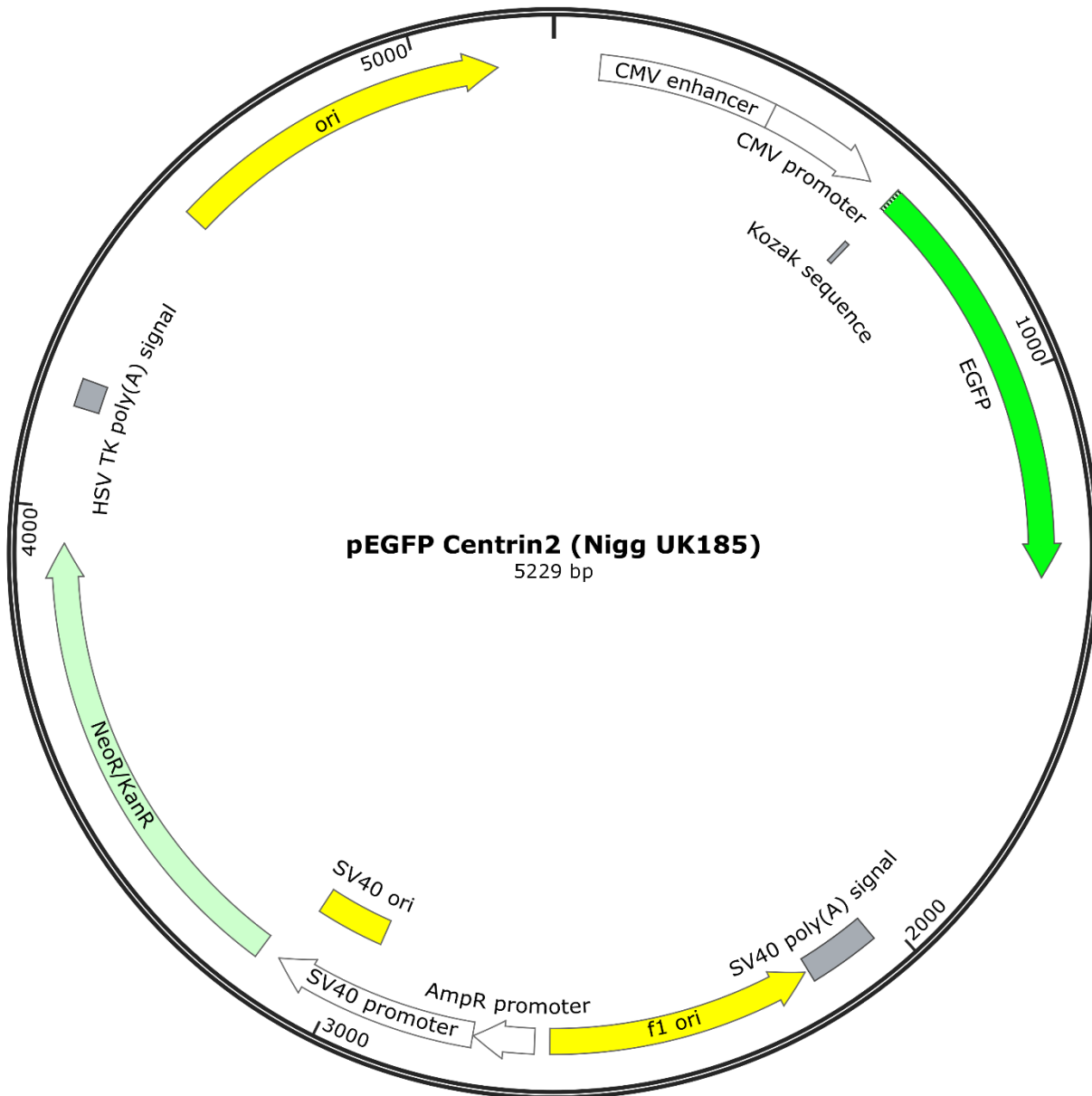
gacgatatccctcgatcgagttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagt
 cgagttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagttaccactccc
 tatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagttaccactccctatcagtgatagagaa
 aagtgaaagtcgagttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagtt
 taccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagttaccactccctatcag
 tgatagagaaaagtgaaagtcgagttaccactccctatcagtgatagagaaaagtgaaagtcgagctcggtacgctatggcatgcatgtgtcgcgac

ctgcaggccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgccctgcccggccaccctctgaccaccctgacctggggcgctgcagtgcttccc
gctaccccgaccacatgaagcagcagacttctcaagtccgcatgcccgaaggctacgtccaggagcgaccatcttctcaaggacgacggcaa
ctacaagaccgcgcccagggtgaagttcgagggcgacaccctgggtaaccgcatcgagctgaaggcgatcgacttcaaggaggacggcaacatcc
tggggcacaagctggagtacaacgcatcagcgacaacgtctatatcaccgccgacaagcagaagaacggcatcaaggccaactcaagagctagc
cctataataagcagagctcgttttagtaaccgtcagatcgctggagacgccatccacgctgttttgacctcatagaagacacggggaccgatccagc
ctccgcccgggtaccgaattcgccaccatggtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtgcac
atggagggctccgtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggccgcccctacgagggcaccagaccgccaagctgaagggtga
ccaagggggcccccctgcccttcgctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcaccggcgacatccccga
ctacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgctgatgaacttcgaggacggggcgctgggtgacctgaccaggactcctccctg
caggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcccaccaacttcccctccgacggcccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggaggc
ctcctccgagcggatgtaccccgaggacggcgcccgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcgccactacgacgctgag
gtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactac
accatcgtggaacagtacgaacgcgcccagggccgcccactccaccggcgcatggacgagctgtacaagtaaatcttattaaagcagaactgtt
tattgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcacaatctcacaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatca
atgtatcttatcatgtctggctgactctagaatcttccgcttccctcgtcactgactcgctcgctcggtcgttcggctgcccggcagcggatcagctcac
tcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaa
ggccgctgtgctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccggacaggacta
taaagataaccaggcgttcccctggaagctcccctcgtgcctctcctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgccttctcccctcgggaa
gctggcgcttttctatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgacgaacccccgttcagcccg
accgctgcgcttatccggtaactatcgtcttgagtcaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggttaacaggattagcaga
gcgaggtatgtaggcggctacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtatctgcgctctgctgaagcca
gttaccttcgaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaaccaccgctggtagcgggtgtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaa
aaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggttttgggtcatgagattatcaaaa
aggatcttacctagatccttttaataaaaaatgaagttttaaatacaatctaaagtatatatgagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaacagt
aggcacctatctcagcgatctgtctatcttctgtcatccatagttgcctgactccccgctgtgtagataactacgatacgggagggttaccatctggccc
cagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaacagccagccggaaggccgagcgcagaagtggtcc
tgcaactttatccgctccatccagcttattaattgttggcgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgtttgtccattgctac
aggcatcgtggtgtcacgctcgtctgttggatggcttattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaa
gcggttagctccttccgctccgatcgtgtcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatg
ccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcccggcagcagttgctcttccccggcgtcaatac
gggataataaccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaaaacgttctcggggcgaaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagat
ccagttcagatgaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttacttccaccagcgttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgc

aaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcttttcaatattattgaagcattatcagggttattgtctcatgagcggata
catattgaatgtatttagaaaaataaacaatataggggttccgcgcacattccccgaaaagtgccacctgacgctgc

10.3.8 pEGFP Centrin2 (Nigg UK185) (Addgene # 41147)

Created with SnapGene®



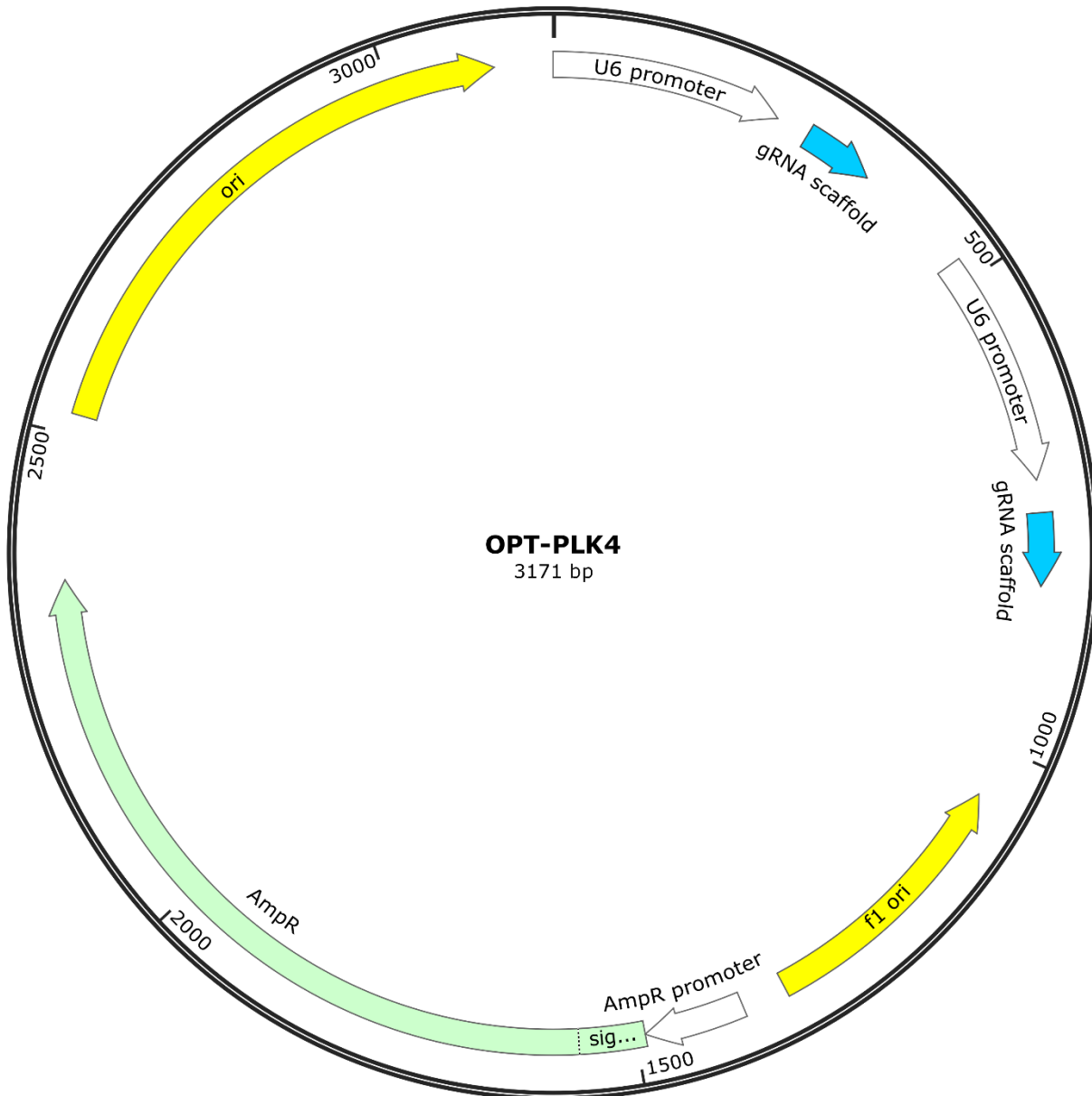
accgtattaccgcatgcattagttattaatagtaataattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaat
 ggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttcattgacgtca
 atgggtggagttttacggtaaaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccc
 gcctggcattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcacgtattaccatgggtgatgcggttttggcag
 tacatcaatgggcgtggatagcggttgactcacggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacggg
 actttccaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctggtttagtgacc

gtcagatccgctagcgtaccggtgccaccatggtagcaagggcgaggagctgttaccgggggtggcgccatcctggctgagctggacggcga
cgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgaggcgaggcgatgccacctaccggcaagctgacctgaagtcatctgaccaccggcaagct
gcccgtgccctggcccaccctcgtgaccacctgacctacggcgtgacgtgcttccagccgtaccccgaccacatgaagcagcagacttctcaag
tccgcatgccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccgcgccgaggtaggtgaaagttcaggggcgac
acctggtagaacgcacgagctgaagggcatgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaac
gtctatatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgacgtcggcaccac
taccagcagaacacccccatcggcgacggcccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccagtcggccctgagcaaaagacccaacga
gaagcgcgatcacatggctcgtggagttcgtgaccgccgggatcactctggcatggacgagctgtacaagtcggccggactcagatccc
catggcctccaacttaagaaggcaaacatggcatcaagttctcagcgaaaaagaatgagccctaagcctgagcttactgaagagcaaaagcaggag
atccgggaagctttgatctttcgtatggatggactggcaccatagatgttaagaactgaaggtggcaatgagggccctgggcttgaaccaag
aaagaagaaattaagaaatgataagtgaattgataaggaaggacaggaataaactttggtgacttttaactgtgatgaccagaaatgtctg
agaaagataactaaagaagaaatcctgaaagcttcaagctctttagatgatgataaactgggaagatttcgttcaaaaatctgaaacgctggccaagg
agttgggtgagaacctgactgatgaggagctgcaggaaatgattgatgaagctgatcgagatggagatggagaggtcagtgagcaagagttctgcg
catcatgaagaagaccagcctttacctgcagcgtaccgcccggggatccaccggatctagataactgatcataatcagccataccacattgtag
aggtttacttgcttataaaaacctcccacacctcccctgaacctgaaacataaaaatgaatgcaattgttgttgaactgtttattgacgttataatgg
tacaataaagcaatagcatcacaatttcacaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttaacgcgtaa
attgtaagcgttaataatgtttaaattcgcgttaaattttgttaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatcccttataatcaaaa
gaatagaccgagataggggtgagtggttccagtttgaacaagagtcaccattaaagaacgtggactccaacgtcaaaagggcgaaaaaccgtctat
cagggcgatggcccactacgtgaaccatcacctaatacagtttttggggcgcaggtgccgtaaagcactaaatcggaaacctaaagggagcccc
gatttagagcttgacggggaaagccggcgaacgtggcgagaaggaagggaagaaagcgaagggagcggcgctagggcgctggcaagtgtagc
ggtcacgctgcgctaacaccacacccgcgcgctaatgcgccctacagggcgctcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccc
tattgtttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataacctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagctctgaggcg
gaaagaaccagctgtggaatgtgtgtcagttagggtgtggaaagtccccaggctcccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtca
gcaaccaggtgtggaagtccccaggctcccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagttagcaaacatagctccgcccctaactc
cgcccatcccggcccctaactccgcccagttccgcccattctccgcccaggtgactaattttttattatgagaggccgaggccgctcggcctc
tgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctaggctttgcaaagatcgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgatgattgaaca
agatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctattccgctatgactgggcacaacagacaatcggctgctctgatgcccgctgt
tccggctgtcagcgcagggcgcccggctcttttgcgaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaaactgcaagacgaggcagcgcggctatcgtg
gctggccacgacggcgcttcttgcgacgtgtgctgacgttgcactgaagcgggaagggaactggctgctattggcgaaagtccggggcagga
tctctgtcatctcacctgtcctcgggagaagatccatcatggctgatgcaatcggcggtgcatacgtttagccgctacctgcccattcgac
accaagcgaaacatcgcatcgagcagcagctactcggatggaagccggtcttgcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcg
ccagccgaactgttcgacggctcaaggcgagcatgccgacggcgaggatctcgtcgtgacctatggcgatgcctgcttccgaatatcatggtgg

aaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttggctaccggtgatattgctgaagagc
ttggcggcgaatgggctgaccgcttctcgtgctttacggtatcgccgctcccattcgagcgcacgcttctatcgcttcttgacgagttcttctg
agcgggactctggggttcgaaatgaccgaccaagcgcgccaacctgccatcacgagattcgattccaccgccccttctatgaaaggttgggctt
cggaatcgttttccgggacgccggctggatgatcctccagcgcggggatctcatgctggagttcttcgccaccctagggggaggctaactgaaaca
cggaggagacaataccggaaggaaccgcgctatgacggcaataaaaagacagaataaaacgcacggtgttgggctgtttgttcataaacgcggg
gttcgggtcccagggtggcactctgtcgataccccaccgagacccattggggccaatacgcgccggttcttcttttcccccccccccccaag
ttcgggtgaaggccagggtcgcagccaacgtcggggcggcaggccctgccatagcctcaggttactcatatactttagattgatttaaaactca
ttttaattaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgttccactgagcgtcagacccgtagaa
aagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgctaactctgctgttgcgcaaaaaaacaccgctaccagcgggtgttgttggcggatca
agagctaccaactcttttccgaaggttaactggcttcagcagagcgcagatacacaactgttcttctagttagccgtagttagccaccactcaag
aactctgtagcaccgctacatacctcgtctgctaactctgttaccagtggtgctgcccagtgggcagataagtcgtgttaccgggtggactcaagac
gatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacc
tacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttcccgaaggagaaaaggcggacaggtatccggttaagcggcagggtcggaacaggagagcgcac
gaggagcttccaggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggg
cggagcctatggaaaaacgcagcaacgcggccttttacggttctcggccttttgcctggcctttgctcacatgttcttctgcgttatcccctgattct
gtggata

10.3.9 OPT-PLK4 (Sintetizado para este trabajo)

Created with SnapGene®



gagggcctatttcccatgattccttcattttgcatatacgatacaaggctgtagagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagta
 caaaatacgtgacgtagaaagtaataatttctgggtagttgcagtttaaaattatgtttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaagattt
 cgatttctggctttatatacttggaaaggacgaaacaccgggctctcgatccatgcgaagacctgttttagagctagaaatagcaagttaaaata
 aggctagtcggttatcaactgaaaaagtgccaccgagtcggtgctttttgtagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtcggttttagcg
 cgtgcgccaattctgcagacaaatggctctagattaaccctcactaaagggaaaggcgggcaggaagagggcctatttcccatgattccttcattttg
 catatacgatacaaggctgtagagagataattagaattaattgactgtaaacacaaagatattagtaaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttctt

gggtagttgacagttttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaagatatttcgatttcttggctttatatacttggtaaagga
cgaaacaccgggagaccatcgatgagagggtctcagtttagagctagaaaatgaagttaaaataaggctagccgttatcaactgaaaaagtggc
accgagtcgggtgctttttttctatagtgacctaattgcagctctggcccgtgtctcaaaatctctggtagccgttacataacttacggtaaatggcc
cgctggctgaccgccaacgacccccgcccattgacgtcaatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaa
actgccacttggcagtagatCAAGTGTATCATATGCCGTGGACtccaacgtcaaaggcgaaaaaccgtctatcagggcg
atggcccactacgtgaaccatcacctaatacaagtttttggggctgaggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaaggagccccgattaga
gcttgacggggaaaagccggcgaaacgtggcgagaaaggaagggaagaaagcgaaggagcggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacg
ctgcgcgtaaccaccacccgcccgttaatgcggctacagggcgctcccattcgCCATTCAGGCTGTCAGGTGgcac
tttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgctcaataat
attgaaaaggaagagtatgagtattcaacattccgtgtcgccttattccctttttgcccattttgcttctctgttttctcaccagaaacgtgggt
gaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttgcccccgaag
aacgtttccaatgatgagcacttttaagtctgctatgtggcggttattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggctgcgcccatacacta
ttctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttaccggatggcatgacagtaagagaattatgacgtgctgcataaccatgagt
gataaactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgat
cgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaacgacgagcgtgacaccacgatcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaacctattaactg
gcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggct
ggtttattgctgataaaactggagccgggtgagcgtggaagccggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatct
acacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgcgtgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgacagcaagtt
tactcatatactttagattgatttaaaacttatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatccctaacgtgag
tttctgtccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttctgagatcctttttctgcgcgtaactctgctgcttgcacaacaaaaaacca
ccgctaccagcgggtggtttgttgcggatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaactactgctctt
tagttagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtctgtaatcctgttaccagtggtgctgccaagtggcg
ataagtctgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctgggctgaacggggggtcgtgcacacagcccagctt
ggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcagcttcccgaaggagaaaaggcggacaggtatccgg
taagcggcagggctcgaacaggagagcgcacgaggagcttccaggggaaacgcctggtatctttatagctctgctgggtttcggccctctgact
tgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttctggcctttt
gctcacatgt