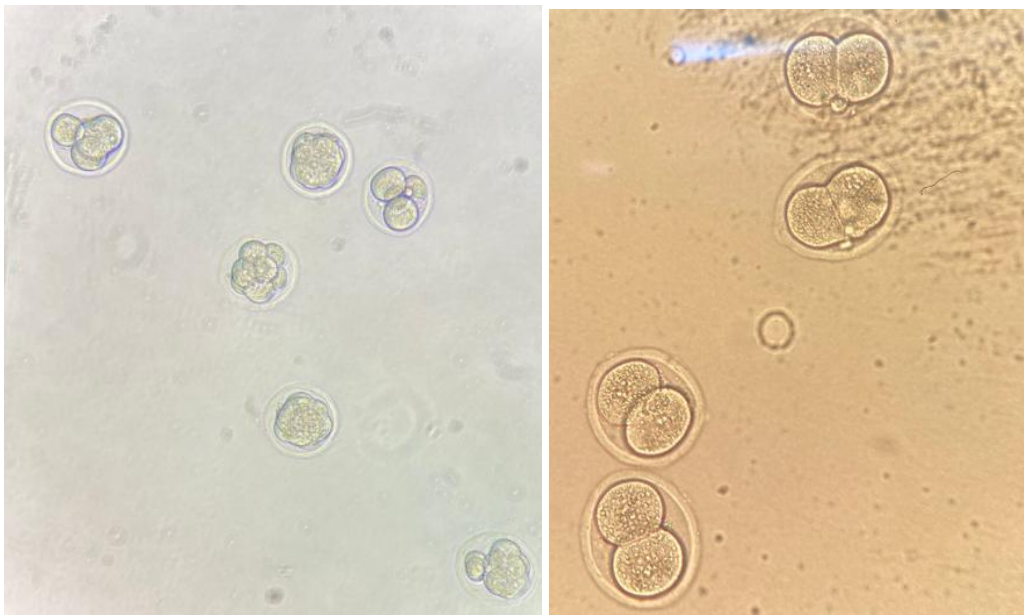


**Optimización de la edición de embriones de ratón
mediante CRISPR/Cas9**

Optimizing mouse embryo editing using CRISPR/Cas9



Trabajo de Fin de Grado

Noelia Rodríguez Herrera

Tutorizado por David Bartolomé Martín y Belinda Rivero Pérez

Grado en Biología. Julio 2022

Índice

1. Resumen	2
1.1 Abstract	2
2. Introducción.	3
2.1. El sistema CRISPR/Cas9	3
2.2. Modificación de embriones de ratón utilizando el sistema CRISPR/Cas9	6
3. Objetivos	8
4. Material y Métodos	8
4.1. Animales de experimentación	8
4.2. Extracción de cigotos	9
4.3. Preparación del material para la edición genética	10
4.3.1. Obtención de plásmidos	10
4.3.2. Obtención de RNPs	10
4.4. Estrategias de ediciones genéticas	11
4.4.1. Knock out del gen Clpp	11
4.4.2. Inserción en el gen Kcnma1	11
4.4.3. Inserción en el gen rosa26	12
4.5. Electroporación e incubación de los embriones	14
4.6. Extracción de ADN y amplificación por PCR	15
4.7. Ensayo de T7 endonucleasa	17
4.8. Secuenciación	18
5. Resultados.	18
5.1. Crecimiento de los embriones hasta el estadio de blastocisto	18
5.2. Knock out del gen Clpp	19
5.3. Inserción en el gen Kcnma1	20
5.4. Inserción de Sgk1 en el locus rosa26	21
6. Discusión.	24
7. Conclusiones.	29
8. Bibliografía.	30
9. Agradecimientos	32

1. Resumen

Los ratones modificados genéticamente cada vez cobran mayor importancia en investigación. Una técnica novedosa y relativamente sencilla para obtenerlos, es la utilización del sistema CRISPR/Cas9, introduciendo los reactivos necesarios en el embrión mediante electroporación. Este trabajo se centra en la optimización de las condiciones para electroporar los embriones en estadio 0,5 e incubarlos hasta la fase de blastocisto. Se probaron dos opciones de edición genética: NHEJ (del inglés *Non-Homologous End Joining*) para conseguir la delección de un gen y HDR (del inglés *Homology-Directed Repair*) para introducir un fragmento de ADN de interés en un sitio específico del genoma. Además, también se probó la eficiencia de las ediciones genéticas cuando se introdujo el sistema CRISPR/Cas9 en el embrión en forma de ribonucleoproteína o como plásmidos. El porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto fue de aproximadamente un 23%, que no es un valor muy alto, por lo que se debe seguir optimizándolas condiciones para conseguir una mayor viabilidad y supervivencia. Por otro lado, se logró editar genéticamente en los embriones y detectar dicha edición en fase de blastocisto tanto por PCR como por el ensayo de la T7 endonucleasa. Por lo que se demuestra, que realizando la estrategia adecuada se puede determinar en estadio de blastocisto, si esa modificación genética se produce con una elevada frecuencia y es viable; permitiendo esto pasar a la obtención del ratón genéticamente modificado con seguridad.

Palabras clave: embriones, edición genética, electroporación.

1.1 Abstract

Genetically modified mice are becoming increasingly important in research. A novel and relatively simple technique to obtain them is the use of the CRISPR/Cas9 system, introducing the necessary reagents into the embryo by electroporation. This work focuses on optimizing the conditions for electroporating stage 0.5 embryos and incubating them until the blastocyst stage. Two gene editing options were tested: NHEJ (Non-Homologous End Joining) to achieve gene deletion and HDR (Homology-Directed Repair) to introduce a DNA fragment of interest in a specific site of the genome. In addition, the efficiency of gene editing was also tested when the CRISPR/Cas9 system was introduced into the embryo in the form of ribonucleoprotein or as plasmids. The percentage of embryos that reached the blastocyst stage was approximately 23%, which is not a very high value, so conditions should be further optimized to achieve greater viability and survival. On the other hand, it was possible to

genetically edit the embryos and to detect such editing in the blastocyst stage both by PCR and by the T7 endonuclease assay. Thus, it is demonstrated that by carrying out the appropriate strategy it is possible to determine at the blastocyst stage, if this genetic modification occurs with a high frequency and is viable; allowing this to go on to obtain the genetically modified mouse with certainty.

Keywords: embryos, gene editing, electroporation.

2. Introducción.

En la actualidad, los ratones modificados genéticamente son de vital importancia para estudiar, entre otras cosas, la función de múltiples genes, así como enfermedades humanas (Hashimoto *et al.*, 2016). La forma clásica de crear estos modelos animales es mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias, que posteriormente se inyectan en un blastocisto receptor, generando así animales quiméricos (Wang *et al.*, 2013), que deben cruzarse en sucesivas generaciones para dar lugar a líneas de ratones mutantes para el gen deseado, por lo que se trata de un método que lleva mucho tiempo, además de ser costoso (Chen *et al.*, 2016; Sakurai *et al.*, 2014). Por otro lado, las tecnologías modernas para edición del genoma se basan en endonucleasas programables que crean roturas de doble cadena en *loci* específicos del genoma, y cuya reparación puede ser principalmente de dos tipos: mediante la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ), dando lugar a mutaciones de inserción o delección (*indel*); o bien mediante la reparación dirigida por homología (HDR), donde se emplea una secuencia donante incluida en un plásmido para incorporar la secuencia deseada (Chen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2013).

2.1. El sistema CRISPR/Cas9

Este sistema CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, en español repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, y donde Cas significa *CRISPR associated protein*, que es una proteína asociada al sistema CRISPR) fue descubierto por el Dr. Francisco Mojica, quien observó repeticiones cortas en el ADN de la arqueobacteria *Haloférx mediterranei*. Estas repeticiones ya habían sido descritas en otras especies bacterianas. Estas secuencias están formadas por motivos recurrentes, de entre 24 y 40 pares de bases, espaciados regularmente por secuencias intermedias de tamaño similar al de la unidad repetitiva, conocidas como espaciadores (Mojica *et al.*, 1993). En el año 2002, se acuñó el término CRISPR en el mismo artículo en el que se identificaron un conjunto de genes

Cas, que codifican para proteínas relacionadas con las secuencias repetidas (Jansen *et al.*, 2002).

Posteriormente, al estudiar los espaciadores, observaron que tenían grandes similitudes con secuencias presentes en bacteriófagos y plásmidos conjugativos, por lo que propusieron CRISPR como un sistema de inmunidad específica adquirida contra ADN foráneo (Mojica *et al.*, 2005). Este sistema adaptativo inmune presenta concretamente tres etapas diferenciadas (**figura 1**). La primera fase, o fase de adquisición, se caracteriza porque fragmentos cortos de material genético foráneo se incorporan al extremo líder del *locus* CRISPR, convirtiéndose en los espaciadores (Wiedenheft, Sternberg y Doudna, 2012). Esto tiene lugar principalmente por las proteínas Cas1 y Cas2, que son las más conservadas en la naturaleza (Barrangou & Oost, 2012, p. 16). En la segunda fase o fase de expresión, el *locus* CRISPR se transcribe en forma de pre-ARNcr (ARN CRISPR), que mediante actividad endonucleasa sufre un proceso de maduración a moléculas más pequeñas, “*small crRNAs*”, que contienen un extremo 5’ con secuencias cortas complementarias al material genético del virus (espaciadores), y un extremo 3’ con una secuencia repetida, que se une a la proteína Cas efectora (Brouns *et al.*, 2008; Jiang y Doudna, 2017). En la etapa de interferencia, los ARNcr guían a las enzimas Cas hacia las secuencias diana. Las proteínas efectoras deben reconocer una secuencia denominada PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), que se localiza corriente abajo a la región complementaria del ADN diana (Jinek *et al.*, 2012; Barrangou, 2015). Esta secuencia PAM permite al sistema diferenciar entre la secuencia invasora y la que se encuentra en el propio genoma de la bacteria o arquea (Mojica *et al.*, 2009). Cuando la proteína Cas efectora encuentra la secuencia PAM, el ARNcr se une por complementariedad de bases al genoma invasor y se activa la actividad nucleasa de la proteína Cas, que realiza un corte de doble cadena del ADN, deteniendo la infección.

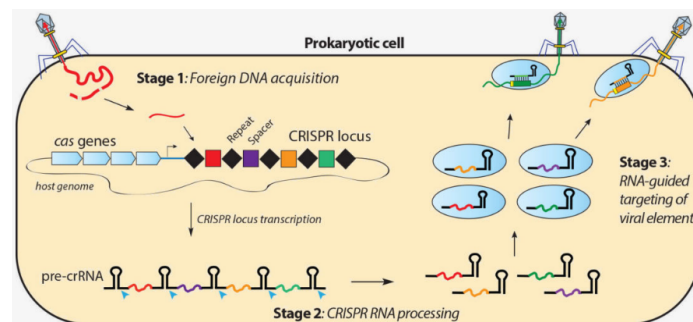


Figura 1. Esquema mostrando las tres fases del sistema inmune adaptativo CRISPR/Cas que tiene lugar de forma natural en bacterias y arqueobacterias (CRISPR Systems, 2018).

Actualmente, los sistemas CRISPR se dividen en dos clases y 6 grupos principales (I-VI), dependiendo del número de efectores que participen (Barman *et al.*, 2019). El más sencillo es el tipo II (Chylinski *et al.*, 2014), donde la actividad endonucleasa la tiene la única proteína multidominio, Cas9. Al tratarse de un sistema sencillo, y que se puede dirigir fácilmente a la diana deseada, es el mejor candidato para ser empleado en ingeniería genética. Debido a su sencillez, en el año 2012, J. Doudna y E. Charpentier propusieron extraer el sistema CRISPR/Cas9 de la naturaleza y trasladarlo al laboratorio; identificando, además, cuáles son los elementos necesarios para realizar el corte del ADN *in vitro*, con el sistema CRISPR/Cas9 (Jinek *et al.*, 2012). Cas9 presenta dos dominios catalíticos con actividad nucleasa, denominados RuvC y HNH, donde el dominio HNH corta la hebra complementaria, y RuvC corta la hebra no complementaria (Barrangou & Oost, 2012, p. 279) y un dominio de reconocimiento PAM C-terminal (Marraffini, 2016). En este sistema es esencial la participación de un ARNtracr (del inglés *trans-activating* CRISPR RNA), una molécula de ARN pequeño no codificante que permite la maduración del pre-ARNcr (Deltcheva *et al.*, 2011), y que presenta función estructural (Haurwitz *et al.*, 2010). Cada unidad de ARNcr está formado por una guía de 20 nucleótidos, que son los que dirigen a la proteína Cas9 a la diana (Ran *et al.*, 2013). El extremo 5' del ARNtracr se une por complementariedad de bases al extremo 3' de ARNcr, formando el complejo ARNtracr:ARNcr, también denominado ARN guía (ARNg), que se une a la proteína Cas9 para formar un complejo ribonucleoproteico (Marraffini, 2016). De esta forma queda libre el extremo 5' del ARNcr para reconocer al ADN diana. Para dicho reconocimiento, es imprescindible la existencia de la secuencia PAM, que en este caso es NGG, donde N es cualquier nucleótido, adyacente a la región de unión del ARNcr (Jinek *et al.*, 2012). Por este trabajo, ambas investigadoras recibieron el Premio Nobel en Química en el año 2020 (figura 2).

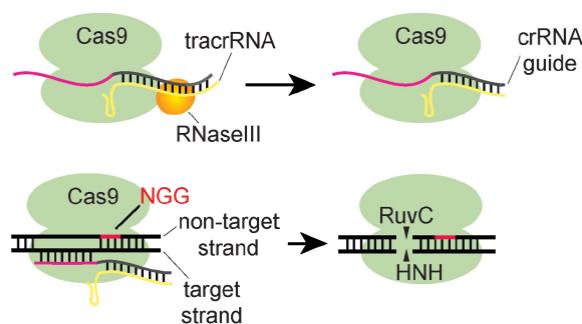


Figura 2. Inmunidad mediante el sistema CRISPR/Cas en *S. pyogenes*. La síntesis de ARNcr comienza con la transcripción del precursor ARNcr; que contiene secuencias complementarias con el ARNtracr; que se encuentra unido a Cas9, formando un ARNd (ARN de doble cadena). La escisión de la ARNasaIII de este ARNd separa las

secuencias espaciadoras del precursor; generando así el complejo Cas9-ARNtracr-ARNcr. Este complejo escanea moléculas de ADN para detectar la presencia de la secuencia PAM. Tras la unión a PAM, hay un intento de emparejar el ARNcr con la hebra del ADN diana. Si esto ocurre, se forma una estructura en bucle, y Cas9 escinde las dos hebras del ADN diana, empleando RuvC (hebra que contiene PAM) y HNH (hebra complementaria; Marraffini, 2016, p. 6).

En el laboratorio, siempre que se encuentre una secuencia PAM, se puede diseñar el ARNcr de 20 nucleótidos para dirigir a Cas9 al sitio específico donde queramos realizar el corte de doble cadena (Jinek *et al.*, 2012). Estas roturas pueden repararse principalmente de dos maneras: mediante el método NHEJ (del inglés *Non-Homologous End Joining*) o vía HDR (del inglés *Homology-Directed Repair*). Mediante NHEJ pueden generarse mutaciones de tipo inserción o deleción (*indels*) que, introducen con alta probabilidad un codón de parada prematuro, interrumpiendo la pauta de lectura del gen. Por otro lado, mediante HDR es posible insertar mutaciones puntuales específicas o insertar secuencias más largas, mediante recombinación homóloga, aportando un molde exógeno de ADN, por ejemplo, un plásmido (Sander y Joung, 2014) (**figura 3**). Por tanto, combinando CRISPR/Cas9 con los mecanismos de reparación celular, se puede diseñar una estrategia para alterar la expresión de un gen.

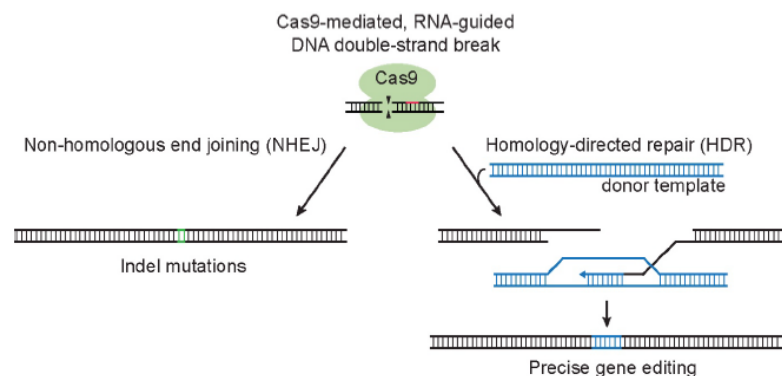


Figura 3. Edición del genoma mediado por Cas9. Tras la rotura de doble cadena (DSB, del inglés *Double Strand DNA Break*), pueden darse dos posibles reparaciones: NHEJ o HDR Marraffini, 2016, p. 9).

2.2. Modificación de embriones de ratón utilizando el sistema CRISPR/Cas9

Como ya se ha comentado anteriormente, los ratones son un modelo fundamental en investigación, por lo que la capacidad de obtener estos animales modificados genéticamente es de vital importancia para el conocimiento de genes, y tratamiento de enfermedades. Para ello, el sistema CRISPR/Cas9 es la opción más sencilla y versátil (Hashimoto & Takemoto, 2015). Cabe destacar que, para generar un ratón mutante con bajo o nulo mosaicismo, la modificación por parte de CRISPR/Cas9 debe realizarse antes de la primera replicación del genoma, es decir, cuando aún no se han unido los dos pronúcleos (Hashimoto *et al.*, 2016). En la mayor parte de los experimentos de este tipo, toda la maquinaria del sistema se introduce en el cigoto

mediante microinyección, y aunque el sistema CRISPR/Cas9 simplifica el procedimiento para obtener los ratones modificados genéticamente, este tipo de técnica requiere una habilidad especial y un largo tiempo para obtener ratones en altas cantidades (Hashimoto & Takemoto, 2015). Por ello, Hashimoto y Takemoto (2015), decidieron probar si era posible utilizar la técnica de electroporación para introducir la maquinaria del sistema en el interior de los cigotos de ratón. Hasta ese momento, para realizarla era necesario eliminar la zona pelúcida con una solución de Tyrode ácida, que es tóxica para los embriones, y solamente podía introducirse ARN de pequeño tamaño (menos de 1 kb) (Grabarek *et al.*, 2002). En 2014, Kaneko *et al.*, lograron producir una rata mutante mediante electroporación del sistema CRISPR/Cas9 sin necesidad de eliminar la zona pelúcida, aunque fueron necesarias altas cantidades de ARN, y la eficiencia fue muy baja. Por ello, Hashimoto y Takemoto, en 2015, optimizaron la técnica, variando el voltaje y el número de pulsos de electroporación, logrando una supervivencia de hasta el 95% de los cigotos. Por lo tanto, demostraron que la electroporación en el cigoto antes de la primera replicación del ADN es una técnica sencilla, más rápida (pues se pueden electroporar varios embriones a la vez), y que da lugar *a priori* a embriones que no son un mosaico genético.

Con esta información, y sabiendo la importancia que está adquiriendo en la actualidad la obtención de modelos animales, en especial los modelos de ratón, la aplicación del sistema CRISPR/Cas9 en embriones en estadio 0.5 (alrededor de 12 h después de la cópula) mediante electroporación es una buena opción debido a todas las ventajas que este sistema ofrece. Además, el hecho de vivir en las islas Canarias, que se encuentran alejadas del resto de Europa, dificulta la importación de estos modelos de ratón para investigación, por lo que una posible solución sería poder obtener estos modelos de ratones en las islas, creando así un servicio de ratones modificados genéticamente a demanda, facilitando la labor de los investigadores canarios.

3. Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado es la optimización de la técnica de edición genética de embriones de ratón mediante el sistema CRISPR/Cas9 utilizando el método de electroporación. Dentro de él, a su vez, tenemos diferentes objetivos específicos:

1. Extracción de embriones de hembras de ratón en estadio 0.5, y su posterior incubación hasta fase de blastocisto.

2. Optimización de las condiciones de electroporación de los embriones. Utilización de la técnica CRISPR/Cas aportando los componentes en distintos formatos para realizar tanto *knock outs* (desactivación de genes) como *knock ins* (inserción de ADNc).
3. Estudiar, mediante técnicas de Biología Molecular, la eficiencia de las diferentes modificaciones genéticas.

4. Material y Métodos

4.1. Animales de experimentación

Los ratones empleados pertenecen a la cepa CD1, que es una cepa no consanguínea, obtenida de animales provenientes de Laboratorios Charles River, Massachusetts. Se caracterizan por tener pelo albino, con camadas de tamaño promedio entre 11 y 12 crías. Además, son muy dóciles, y la propiedad que los hace ideales para este tipo de estudios es que presentan características reproductivas y maternales excelentes (Laboratorio de ensayos biológicos, Universidad de Costa Rica).

Las hembras se mantienen en camadas con la misma fecha de nacimiento, mientras que los machos deben estar individualizados, al menos una semana antes de cruzarlos con las hembras. El ciclo estral de las hembras dura entre cuatro y seis días, con un estro o celo de entre ocho y doce horas. Es en este periodo de tiempo cuando la hembra es receptiva al macho. Una forma de asegurarnos de que hay un alto número de hembras en celo es ponerlas en contacto con el serrín de la jaula del macho que contiene restos de orina, lo que permite que se sincronice el ciclo estral, la mayoría entrarán en estro y serán receptivas al tercer día. Esto se conoce como efecto macho o efecto Whitten (Benavides & Guénet, 2003).

4.2. Extracción de cigotos

El día anterior a la extracción de los cigotos, ponemos entre tres y cuatro hembras en la jaula de cada macho individualizado. La cópula se realiza sobre las 12 de la noche anterior al día de la extracción, que se debe realizar en las siguientes doce horas, para que los cigotos se encuentren en el oviducto, que es el lugar del que los extraemos. La monta solamente se lleva a cabo si la hembra está en estro, que nos ayuda a seleccionar aquellas hembras que han copulado, y que, por lo tanto, serán las candidatas a tener los embriones (Nagy *et al.*, 2003).

Antes de extraer los embriones, preparamos el medio M2 (M7167-50ML, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos), con hialuronidasa a una concentración de 0,3

$\mu\text{g/ml}$, la cual se encarga de liberar los embriones de los complejos cúmulos-ooocitos (COCs, del inglés *Cumulus-Oocyte Complexes*) (García & Sánchez, 2016). Se puso una gota de 500 μl de esta dilución en una placa de Petri de 35 mm, cubierta con aceite mineral (M8410-500 ml, Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos), unos 3 ml, aproximadamente, y dejamos en el incubador para que se caliente. Dependiendo del número de hembras con tapón se prepararon más placas de estas características, poniendo hasta un máximo de 3 hembras/placa. También preparamos una placa con solamente medio M2, a la que pasaremos los embriones posteriormente, y un tubo de 1.5 ml con 500 μl de este mismo medio para transportarlos.

Las hembras son sacrificadas por medio de dislocación cervical, ya que no es posible la extracción de los embriones con la hembra viva. Para ello, seguimos un protocolo similar al de extracción de óvulos, de Nakagata, N. (2015). Tras sacrificarla, se abre la piel y la cavidad abdominal, apartando el tracto digestivo para exponer el útero, que presenta forma de V, en cuyos extremos se encuentran los oviductos y los ovarios. A continuación, se extraen los dos oviductos cortando en ambos extremos, y los colocamos en la parte del aceite de la placa que contiene el medio M2 junto con hialuronidasa. Bajo la lupa, debemos buscar el ámpula, que es el lugar donde se encuentran los embriones en ese momento. Sujetando con las pinzas, realizamos un corte transversal en esta zona, y extraemos los COCs, que conducimos por medio de una varilla metálica, a la gota de medio. Los dejamos máximo cuatro minutos en el incubador para que la hialuronidasa disgregue los COCs. Pasado este tiempo, debajo de la lupa, cogemos los embriones aspirándolos con un sistema de succión bucal conectado a capilares de vidrio estirados a mano bajo la llama, con una abertura de entre 100 y 150 μm , y los pasamos a la placa que solamente contiene M2 para lavarlos. Una vez hemos obtenido todos los embriones, los pasamos al tubo de 1.5 ml preparado previamente para llevarlos al laboratorio.

4.3. Preparación del material para la edición genética

4.3.1. Obtención de plásmidos

Todos los plásmidos empleados en los distintos experimentos CRISPR/Cas9 se encontraban disponibles en el laboratorio. Se recuperaron de una biblioteca de plásmidos, por lo que inoculamos 5 μl en 100 ml de medio LB (medio Luria-Bertani: NaCl 10 g/l; triptona 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l), al que previamente añadimos

ampicilina (0,05 mg/ml). Este cultivo lo dejamos incubando en agitación a 200 r.p.m. y 37 °C durante 12 horas.

Para la purificación de los plásmidos a partir de los cultivos anteriores, empleamos el kit Nucleobond Xtra Midi Plus EF (MN740422.50, Macherey-Nagel, Dueren, Alemania), que es un kit libre de endotoxinas, adecuado para el posterior uso en embriones. La concentración obtenida de cada plásmido se determinó mediante el NanoDrop™ 2000/2000c (ND-2000, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

4.3.2. Obtención de RNPs

En nuestro caso, los ARNg son dúplex formados por ARNcr y ARNtracr. Los ARNcr son la parte variable de este dúplex, siendo secuencias de 20 nt diseñadas para dirigir Cas9 a un sitio específico del genoma donde ejercerá su actividad nucleasa. Los ARNcr se encontraban ya disponibles en el laboratorio y su eficiencia había sido testada previamente *in vitro*. Los ARNcr, una vez diseñados, son encargados a la empresa IDT (Iowa, Estados Unidos). Por otro lado, la secuencia del ARNtracr (#226671851, IDT, Iowa, Estados Unidos) es constante pues es responsable de la unión del dúplex a la proteína Cas9. La proteína Cas usada es la nucleasa comercial Alt-R Cas9 S. p. HiFi Cas9 Nuclease V3 100 µg (#1081060, IDT, Iowa, Estados Unidos), que procede de *S. pyogenes*, con modificaciones químicas para aumentar su especificidad y a la que se le han añadido señales de localización nuclear para dirigirla al núcleo.

La unión del ARNcr con el ARNtracr se consigue mezclando cantidades equimolares de cada uno (2 µl de ARNcr y 2 µl de ARNtracr) y calentando a 95°C durante cinco minutos. Se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, obteniendo al final el dúplex a una concentración de 100 µM. A continuación, se forma la RNP mezclando el producto obtenido en el paso anterior junto con 1,2 µM de Cas9 y llevando la mezcla a un volumen final de 50 µl en OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.

4.4. Estrategias de ediciones genéticas

4.4.1. Knock out del gen *Clpp*

El gen *Clpp* (del inglés *Caseinolytic Mitochondrial Matrix Peptidase Proteolytic Subunit*, subunidad proteolítica de la peptidasa de la matriz mitocondrial caseinolítica) codifica para la proteína Clpp, que es una peptidasa que hidroliza proteínas en presencia

de ATP y magnesio, y que se encuentra en la membrana mitocondrial interna (GeneCards Human Gene Database, 2017). Para deletar *Clpp* se emplearon dos ARNcr diseñados para cortar de forma simultánea en el exón 1 y 2 del gen *Clpp* (**figura 4**). Se preparó el complejo RNP siguiendo las indicaciones del fabricante, según se explicó en el punto 4.3.2. Al tratarse de dos ARNcr diferentes, se mantuvo la concentración final del dúplex, añadiendo la mitad de cada uno de ellos.

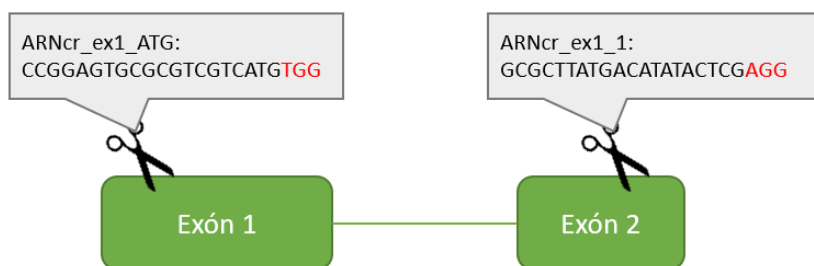


Figura 4. Esquema de los lugares de corte por parte de CRISPR en el gen *Clpp*, con sus correspondientes ARNcr, marcado en rojo la secuencia PAM.

4.4.2. Inserción en el gen *Kcnma1*

El gen *Kcnma1* codifica para el canal iónico BK (del inglés *Big potassium*). Estos canales son canales de potasio de alta conductancia, activados por voltaje (despolarización), y por aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , cuya función principal es el control del tono del músculo liso, así como el control de la excitabilidad neuronal. Los canales BK son homotetrámeros, formados por cuatro subunidades alfa, que es el producto de este gen (National Center for Biotechnology Information, 2022). La modificación que se buscó en este caso fue la inserción de la proteína SNAP-tag, para etiquetar BK en el extremo N-terminal. Para ello se utilizó un único ARNcr y se aportó un molde de reparación, para incorporar SNAP-tag mediante HDR. Este molde es el pBlueScript en el cual se clonó previamente la proteína SNAP-tag flanqueada por brazos de homología del gen *Kcnma1* adyacentes al sitio de corte (**figura 5**).

Al complejo RNP, obtenido como se indica en el apartado 4.3.2, se le añadieron 400 ng del molde pBlueScript-BK-SNAP, alcanzando nuevamente 50 μ l con OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, Lyon, Francia).

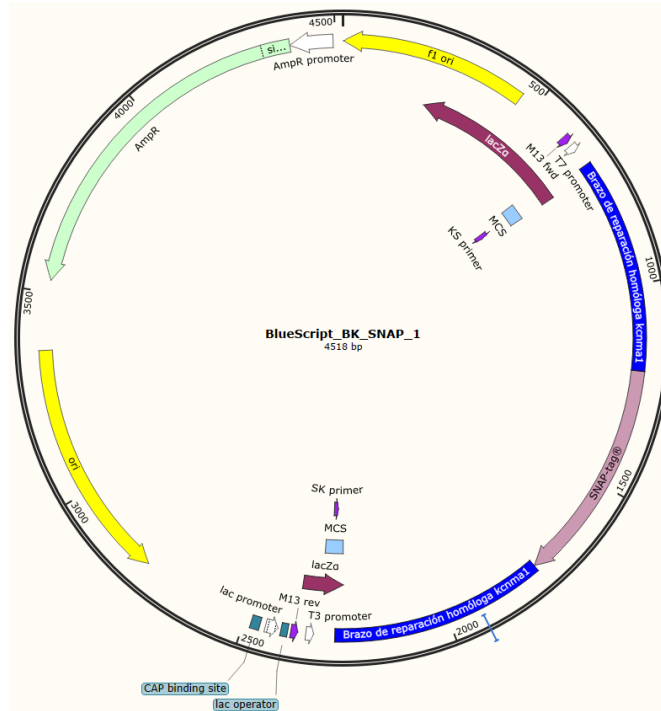


Figura 5. Plásmido BlueScript-BK-SNAP (Bacteria stock #880), utilizado como molde para reparación por HDR.

4.4.3. Inserción en el gen *rosa26*

El gen *rosa26* (del inglés *Reverse Orientation Splice Acceptor*) es un locus del genoma del ratón que ha sido usado ampliamente para la inserción de diferentes genes, ya que se ha visto que esta inserción no afecta a la viabilidad celular, y la expresión del gen insertado en él va a ser constitutiva y ubicua (Friedrich & Soriano, 1991).

Por otro lado, el gen *Sgk1* (del inglés *Serum/Glucocorticoid regulated Kinase 1*) codifica para una proteína quinasa de serina/treonina, que juega un papel importante en la respuesta al estrés celular, activando ciertos canales de potasio, sodio y cloruro, por lo que tiene importancia en la regulación de procesos como la supervivencia celular, la excitabilidad neuronal y la excreción renal de sodio (National Center for Biotechnology Information, 2009).

En este diseño se ha planteado insertar la isoforma neuronal de *Sgk1*, *Sgk1.1* unida a la proteína fluorescente cian (CFP) en el sitio *rosa26*, empleando una estrategia con plásmidos, en lugar de con RNP. Para ello, empleamos dos plásmidos disponibles en el laboratorio:

- pX330 (Addgene #42230), que contiene la secuencia que codifica para la proteína Cas9 y la ARNg para cortar en el locus *rosa26* (**figura 6**).
- pRosa26-SGK1.1-CFP, disponible en el laboratorio, que fue aportada como ADN molde para la reparación del corte mediante HDR (**figura 7**).

Ambos plásmidos fueron obtenidos según se indica en el apartado 4.3.1, y se preparó una dilución de ambos poniendo 400 ng totales (200 ng de cada uno) en un volumen final de 50 μ l en OptiMEM.

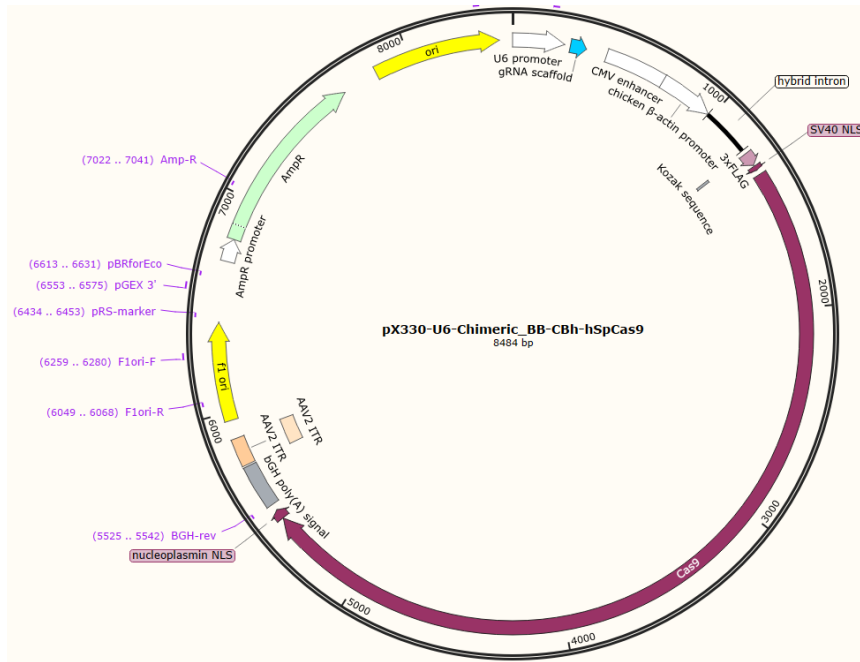


Figura 6. Plásmido pX330 (Bacteria stock #535), que contiene la maquinaria necesaria del sistema CRISPR/Cas9.

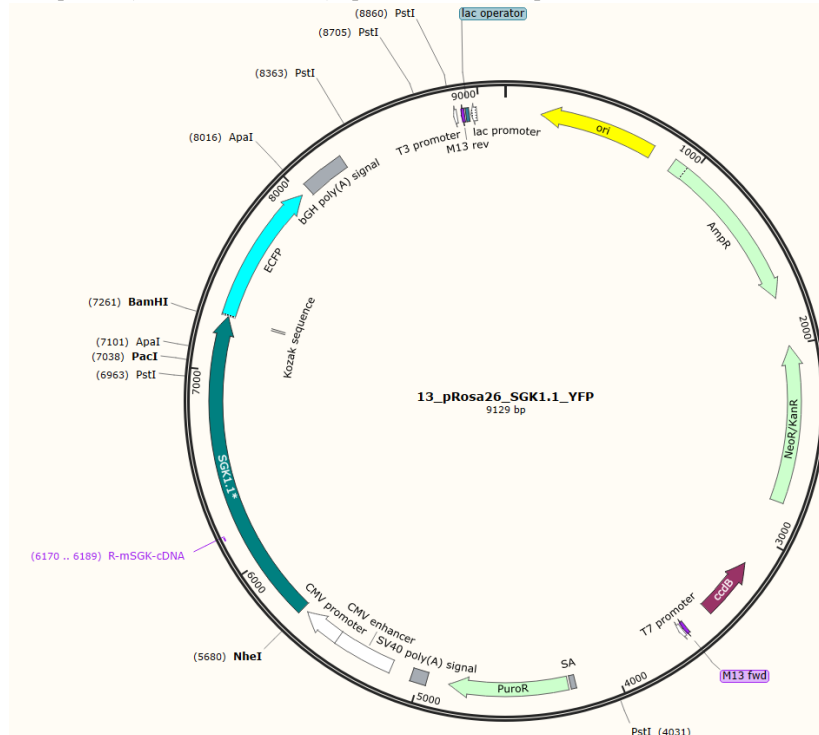


Figura 7. Plásmido pRosa-SGK1.1 (Bacteria stock #856).

4.5. Electroporación e incubación de los embriones

En nuestro caso, utilizamos el electroporador NEPA21 Electroporator (Nepagene, Japón), con la placa CUY501P1-1.5, que permite electroporar hasta

cincuenta embriones, con un poro de 1 mm, y con 5 microlitros de muestra. Para las condiciones, seguimos las recomendaciones de Integrated DNA Technologies.

En primer lugar, ajustamos las condiciones del electroporador. Para ello, programamos con las características indicadas en el manual (**tabla 1**), en nuestro caso es para el electrodo CUY501.1-1.5:

Electrodo Nepagene CUY501P1-1.5	
Pulso de creación del poro (voltaje)	
Voltaje	40V
Duración del pulso	2.5-3.5 mseg
Intervalo de pulso	50 mseg
Número de pulsos	4
Tasa de decadencia	10%
Polaridad	+
Pulso de transferencia	
Voltaje	7V
Duración del pulso	50 mseg
Intervalo de pulso	50 mseg
Número de pulsos	5
Tasa de decadencia	40%
Polaridad	±

Tabla 1. Condiciones del electroporador para electroporar embriones. En nuestro caso, utilizamos el electrodo Nepa Gene CUY501P1-1.5.

Posteriormente, pipeteamos 5 μ l del complejo RNP o de los plásmidos que vamos a transfectar en el canal del electrodo, y medimos la impedancia, que debe estar entre 0,2 y 0,24 k Ω . Dependiendo de si la impedancia es superior o inferior a esos valores, quitamos pequeñas cantidades de la solución o añadimos Opti-MEM, respectivamente. Una vez alcanzada la impedancia correcta, se trasladan a la cubeta entre 5 y 50 embriones, previamente lavados en Opti-MEM para realizar la electroporación. Se comprueba de nuevo la impedancia, ajustándose entre 0,18 y 0,22 k Ω , siguiendo el mismo procedimiento que al comienzo. Una vez electroporados, los pasamos al medio KSOM (MR-121-D, EMD Millipore Corp., Massachusetts, Estados Unidos), que es el medio en el que se incubaron a 37 °C, y con un 5% de CO₂ en condiciones de humedad al 85-90%, hasta que lleguen al estadio de blastocisto, lo que conlleva aproximadamente cinco días (Benavides & Guénet, 2003).

4.6. Extracción de ADN y amplificación por PCR

Una vez los embriones llegaron a fase de blastocisto, se procedió a su lisis en el siguiente tampón (Scavizzi *et al.*, 2015):

- 50 mM KCl

- 10 mM Tris-HCl (pH 8.3)
- 0.45% v/v Nonidet P40
- 0.45% v/v Tween 20
- (+ 0.1 mg/ml Proteínasa K) se añade siempre justo antes de utilizarlo

En un tubo de 0,2 ml, a 9 µl de este tampón, le añadimos un blastocisto, en un volumen de aproximadamente 1 µl, alcanzando un volumen final de 10 µl. En ocasiones, se mezclaron de 3-5 embriones cuando no alcanzaron la fase de blastocisto. Esto lo colocamos en un termociclador, donde lo dejamos 30 min a 56 °C, y luego aumentamos la temperatura hasta 95°C durante 10 minutos para inactivar la Proteínasa K (Scavizzi *et al.*, 2015). El resultado de las extracciones de ADN fue medido en el NanoDrop™ 2000/2000c.

Posteriormente, se realizaron diferentes PCRs diseñadas para comprobar si había habido edición genética. Para la PCR se mezclaron los siguientes reactivos:

- RedTaq 2X Master Mix 1.5 mM 1X (12,5 µl)
- MgCl₂ (#733-2546, VWR, Pensilvania, Estados Unidos)
- Forward primer (20 µM) 0,4 µM (0,5 µl)
- Reverse primer (20 µM) 0,4 µM (0,5 µl)
- DNA 5 µl (120-180 ng)
- H₂O 6,5 µl
- Volumen total 25 µl

Respecto a los *primers* o cebadores, utilizamos los siguientes (**tabla 2**):

Gen	Nombre	Secuencia 5'→3'	Amplicón
<i>Clpp</i>	F-Clpp	CGAACGCCTACCTCTAACGA	724 pb
	R-Clpp	CGATGGAAAGGTAGGGGCTA	
<i>Kcnma1</i>	F-SNAP	ATGGACAAAGACTGCGAAATG	546 pb
	R-SNAP	ACCCAGCCCAGGCTTGCCC	
	F-SNAP	ATGGACAAAGACTGCGAAATG	1048 pb
	R-NT-BK	CGCAAGGTTCTTCTCCTC	
<i>Sgk1</i>	F-CMV	GGGCGGTAGGCGTGTACGGT	575 pb
	R-mSGK_cDNA	ATGAACGCTAACCCCTCTCC	
	F-mSGK_ex12	TTACAAACTCGGCAAGGCAC	607 pb

	R_GFP_aa84	CACATGAAGCAGCACGACTT	
--	------------	----------------------	--

Tabla 2. Cebadores empleados para realizar las distintas PCR, con el fin de amplificar el gen *diana*.

Luego realizamos la PCR según las condiciones del siguiente programa:

1. 95°C x 2'00"
2. 95°C x 0'20"
3. 58°C x 0'20"
4. 72°C x 1'00"
5. Repetición de los pasos 2 al 4 durante cuarenta ciclos.
6. 72°C x 10'00"
7. 4°C x 10'00"

Posteriormente, los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1%, utilizando como tampón de electroforesis TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 10 mM y EDTA 1 mM) con el agente intercalante GelRed 1X (Biotium, California, Estados Unidos) y como marcador de peso molecular el PeqGold, (#25-2040, VWR, Pensilvania, Estados Unidos). La visualización del gel se realizó con el equipo Gel Logic 440 Imaging System (Kodak, Nueva York, Estados Unidos).

4.7. Ensayo de T7 endonucleasa

A aquellos embriones que fueron electroporados con los reactivos CRISPR para deletar el gen *Clpp*, y que mediante PCR se observó una única banda, se les realizó el ensayo de la T7 endonucleasa, ya que, según Sakurai *et al.* (2014), es una técnica efectiva para comprobar si existen mutaciones *indel* a partir de dos o más nucleótidos diferentes. La endonucleasa I T7 es una enzima que reconoce las zonas de *mismatches*, cortando el ADN en dichas zonas. En nuestro caso, utilizamos el kit Alt-R™ Genome Editing Detection Kit (#1075932, IDT, Nueva Jersey, Estados Unidos). El primer paso fue mezclar 10 µl del producto de PCR con el tampón de reacción de la enzima T7EI 1X y agua hasta completar un volumen final de 18 µl, y aplicamos el programa de temperaturas indicado en la **tabla 3**. Posteriormente, se añadieron 2 U de la enzima, incubando a 37°C durante 60 minutos.

Paso	Temperatura (°C)	Duración
Desnaturalización	95	10 minutos
Rampa 1	95-85	-2°C/seg
Rampa 2	85-25	-0,3°C/seg

Tabla 3. Programa de rampas de temperatura para la generación de heterodúplex.

Durante las rampas de temperatura, las hebras se desnaturalizan y se vuelven a unir formando heterodúplex en el caso de que se hayan introducido mutaciones tipo indel provocadas por el método NHEJ. Los heterodúplex son reconocidos por esta enzima, que corta en estas dianas, por lo que, al realizar una electroforesis, se observará más de una banda, de menor tamaño que la banda original (**figura 8**).

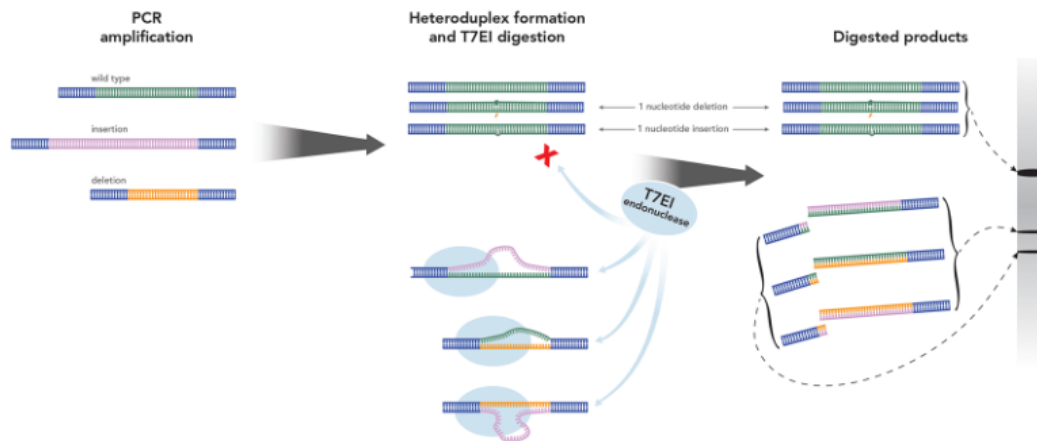


Figura 8. Funcionamiento del kit de detección de edición genética mediante la endonucleasa T7 (IDT, 2022).

4.8. Secuenciación

En el caso de la inserción en el gen *Kcnma1*, donde se pretendía insertar la proteína SNAP-tag, algunos de los amplicones obtenidos fueron purificados empleando el kit *NucleoSpin Gel and PCR Cleanup* (#740609, Macherey-Nagel, Dueren, Alemania). Los productos purificados fueron enviados a secuenciar a la empresa Macrogen SPAIN (Madrid, España), por duplicado con los cebadores F-BK_NT y SNAP y R-NT-BK (**tabla 2**).

Las secuencias obtenidas fueron leídas con el programa *SnapGene viewer* (*SnapGene software* de Insightful Sciences) y comparadas con la secuencia esperada empleando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology*), para comprobar que se ha insertado correctamente.

5. Resultados.

5.1. Crecimiento de los embriones hasta el estadio de blastocisto

Se realizó la extracción de los embriones a partir de hembras CD1 que presentaron tapón vaginal, obteniendo siempre entre 10-12 embriones/hembra. Inicialmente los embriones extraídos se cultivaron en una gota de 200 μ l de medio

KSOM cubierto con aceite mineral e incubándolos a 37 °C y 5% CO₂ en el animalario. Sin embargo, los embriones no llegaban hasta el estadio de blastocisto, sino que se quedaban en estadios de una o dos células, o algunos entraban en partenogénesis (**figura 9**).

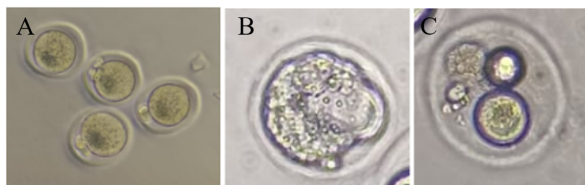


Figura 9. (A) Cigotos, formados por una única célula. (B) Blastocisto tras cinco días de incubación. (C) Embrión que se encuentra en partenogénesis.

A continuación, una vez extraídos los embriones se transportaron en un tubo de 1.5 ml con 500 µl de medio M2 hasta la Sección de Medicina, donde fueron incubados con las mismas condiciones, pero en un incubador diferente, en 3 ml de medio KSOM, sin añadir aceite mineral. De esta forma, los embriones evolucionaron hasta fase de blastocisto con una eficiencia del 23%. Estas condiciones de cultivo se mantuvieron para todos los posteriores experimentos.

Tanto las extracciones de ADN a partir de un único blastocisto, como aquellas en las que se unieron de 3-5 embriones no llegados a término, se realizaron con éxito según el protocolo empleado, obteniendo concentraciones de ADN genómico de entre 30-40 ng/µl. El volumen final de la lisis fue de 10 µl, por lo que cada extracción realizada pudo utilizarse para dos reacciones de PCR.

5.2. Knock out del gen *Clpp*

En total se electroporaron 94 embriones con los reactivos CRISPR para deletar *Clpp*.

Tras hacer la extracción de ADN y amplificación por PCR del gen *Clpp*, se obtuvieron diferentes patrones de bandas (**figura 10**). Se determinó edición génica, directamente por el producto de PCR, en aquellas muestras de las que se obtuvieron dos o más bandas (embriones 2, 4, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 19, 22, 23 y 24 de la **figura 10**), en las que no hubo amplicón (embriones 12 y 30), así como en la que hubo una banda de un tamaño diferente al *wildtype* (embriones 7 y 31). En el primer caso, se trata de embriones heterocigóticos, y se puede afirmar que hubo edición, ya que el *wildtype* para el gen *Clpp* es homocigoto. En el segundo caso, no hay amplificación del gen debido a que el proceso de edición genética ha alterado el sitio de unión de, al menos, uno de los

dos cebadores. Y en el último caso, la edición ha tenido como consecuencia la pérdida de un fragmento del gen, obteniendo un producto de PCR más pequeño (**figura 10**).

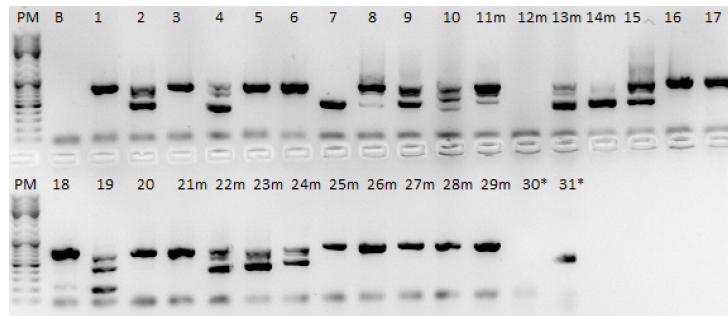


Figura 10. Imagen que muestra los productos de PCR del gen Clpp de algunos de los embriones. PM= marcador de peso molecular; B= blanco; m= mórula (estadio inferior a blastocisto); *=mezcla de 3-5 embriones en estadios previos a mórula.

En cambio, en aquellas muestras de las que solamente se obtuvo una banda, realizamos el ensayo de la T7 endonucleasa, donde si, a partir de una banda de PCR, se obtiene más de una banda tras la digestión, es que hubo edición genética (**figura 11**).

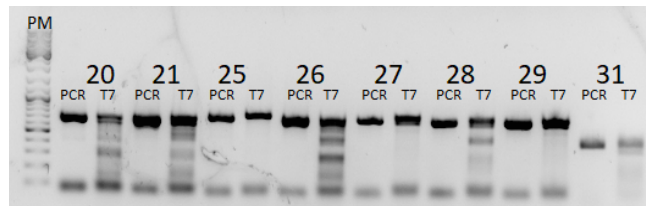


Figura 11. Imagen que muestra los productos de PCR y al lado el producto de la digestión con la enzima T7 endonucleasa I de alguno de los embriones de la figura 12. PM= marcador de peso molecular; PCR= producto de PCR; T7= producto de la digestión del amplicón con la enzima T7 endonucleasa I.

Los resultados obtenidos podemos visualizarlos en la siguiente tabla (**tabla 4**):

Sesión	Nº de embriones electroporados	Nº de embriones en estadio blastocisto	de en de edición genética	Nº de embriones con edición genética	Nº de blastocistos con edición genética
1	15	3		14	2
2	12	0		12	0
3	7	0		7	0
4	60	16		23	12
Total	94	19		56	14

Tabla 4. Tabla resumen con los datos obtenidos tras las diferentes sesiones de electroporación de embriones. En ella se observa el número de embriones electroporados, el número de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto, el número de embriones con edición genética, y el número de blastocistos con edición genética.

Con estos datos, se observa que 59,6% de los embriones obtenidos han sido editados genéticamente, pero de estos, solamente el 20% alcanzaron el estadio de blastocisto. Por lo tanto, del total de embriones de los que se partió inicialmente, aproximadamente el 15% llega al estadio de blastocisto con edición genética.

5.3. Inserción en el gen *Kcnma1*

Para esta edición genética se realizó la purificación del plásmido pBlueScript-BK-SNAP que sirviera como molde de reparación, obteniendo una concentración de 99,6 ng/μl, con un cociente 260/280 de 1,88.

En total se electroporaron 25 embriones con los reactivos CRISPR para incorporar la proteína SNAP-tag al extremo N-terminal de BK, de los que un 64% alcanzó la fase de blastocisto.

En este caso se realizaron dos PCRs dirigidas a la secuencia insertada, por lo que solo se esperaba amplicón cuando la reparación había incorporado el ADN molde. Al revelar los resultados de la PCR (**figura 12**), podemos observar que en todos los embriones que alcanzaron la fase de blastocisto portaban el inserto, siendo comprobado con las dos parejas de cebadores indicadas en el apartado de materiales y métodos.

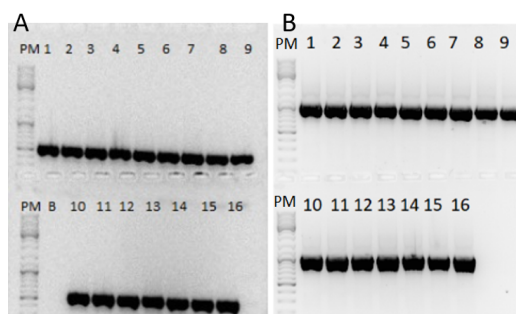


Figura 12. Imagen que muestra los productos de PCR del gen *Kcnma1* de algunos de los embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto. (A) PCR utilizando cebadores F-SNAP y R-NT-BK. (B) PCR utilizando cebadores F-SNAP y R-SNAP.

Se procedió a secuenciar algunos de los fragmentos de PCR obtenidos, para confirmar que, efectivamente, se trata de la proteína SNAP-tag. En concreto, se secuenciaron las muestras 1, 2, 4, 8, 11, 12, 14 y 16 desde las dos direcciones empleando los mismos cebadores usados en la PCR. Al comparar estas secuencias con las del plásmido usado como molde, se comprobó que en todos los casos SNAP-tag se insertó correctamente en la zona del genoma elegida. Con estos datos, se observa que en este caso, el 64% de los embriones alcanzaron el estadio de blastocisto y, además, el 100% de estos contienen la inserción en el gen *Kcnma1* (**tabla 5**).

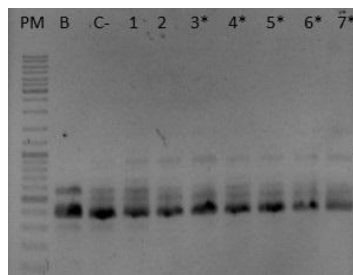
Sesión	Nº de embriones electroporados	Nº de embriones en estadio de blastocisto	Nº de embriones con edición genética	Nº de blastocistos con edición genética
1	25	16	16	16
Total	25	16	16	16

Tabla 5. Tabla resumen con los datos obtenidos tras la sesión de electroporación de embriones. En ella se observa el número de embriones electroporados, el número de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto, el número de embriones con edición genética, y el número de blastocistos con edición genética.

5.4. Inserción de *Sgk1* en el locus *rosa26*

Para la realización de esta modificación genética se emplearon dos plásmidos, el pX330 portador del sistema CRISPR/Cas9 y el pRosa26-SGK1.1 como molde para la reparación mediante HDR. Ambos plásmidos fueron purificados obteniendo concentraciones de 802,9 ng/μl y 422,1 ng/μl, con 260/280 de 1,87 y 1,86, respectivamente. En este caso se realizaron tres sesiones de extracción de embriones, obteniendo un total de 150 embriones. De todos ellos, solo 2 embriones de la primera extracción, de un total de 22, alcanzaron la fase de blastocisto.

No obstante, igual que anteriormente, se extrajo el ADN de cada blastocisto por separado, y también de embriones que se detuvieron en estadios anteriores en grupos de 3-5. Al realizar la amplificación por PCR de los 22 embriones de la primera sesión, y de una muestra de diez embriones en estadio de 1 o 2 células de la segunda sesión (de un total de 114 embriones), repartidos entre dos tubos, y con los cebadores F-mSGK1.1_cDNA y R-mSGK1_cDNA (**tabla 2**) y su posterior revelado, se comprobó que había contaminación, ya que aparecían varias bandas en el blanco, donde no se había incluido ningún embrión (**figura 13**). Se repitió la PCR, pero nuevamente hubo contaminación, por lo que el resultado no fue concluyente. La cantidad de ADN extraído no permitió repetir la PCR con cebadores diferentes.



*Figura 13. Gel con el producto de PCR de algunos embriones electroporados en las sesiones 1 y 2 para comprobar la inserción deSGK1.1-CFP. PM= marcador de peso molecular; B= blanco; C-= control negativo (no se llevó a cabo electroporación); *=mezcla de embriones en estadios inferiores a mórula.*

En la tercera sesión, de los 14 embriones electroporados, ninguno llegó a estadio de blastocisto. Realizamos dos PCR con las parejas de cebadores indicadas en la tabla 2 para SGK1.1, tomando cinco embriones de entre una y dos células en cada tubo, según se indica en el apartado de materiales y métodos. Al revelar el resultado de la PCR (**figura 14**), podemos comprobar que nuevamente existe contaminación en los blancos, pero en este caso obtenemos dos bandas de diferentes tamaños, en el blanco 1 hay una banda de aproximadamente 400 pb, que no se repite en el resto de PCRs, mientras que en el blanco 2 aparece una banda de unas 600 pb, que coincide con el tamaño del fragmento amplificado de 607 pb.

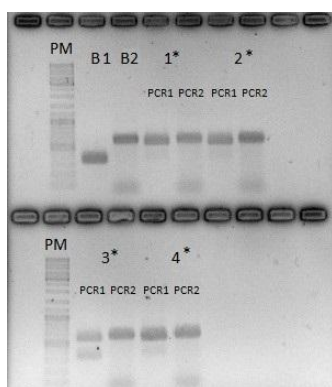


Figura 14. Gel con el producto de PCR de los embriones electroporados en la sesión 3 para comprobar la inserción de SGK1.1-CFP. PM= marcador de peso molecular; B= blanco; C-= control negativo (no se llevó a cabo electroporación); *=mezcla; PCR1= amplificado con los primers F-mSGK1.1_cDNA y R-mSGK1_cDNA; PCR2= amplificado con los primers F-mSGK_ex12 y R-GFP_aa84.

Por otro lado, podemos fijarnos en la PCR 1 de la **figura 14**, donde la contaminación del blanco no aparece en las muestras, a excepción de una banda de menor densidad en la muestra 3, por lo que la banda obtenida podría indicar edición en los embriones electroporados. En la **tabla 6** se muestran los resultados finales. En este caso, solamente dos embriones de los 150 llegaron al estadio de blastocisto, solamente un 1,3%. Por otro lado, al existir contaminación en las dos PCR realizadas con los embriones de las sesiones 1 y 2, no se puede afirmar que exista edición, ya que una de las bandas presentes en el blanco coincide con el tamaño del amplicón.

Sesión	Nº de embriones electroporados	Nº de embriones en estadio de blastocisto	Nº de embriones con edición genética	Nº de blastocistos con edición genética
1	22	2	No se puede saber por contaminación.	No se puede saber por contaminación.

2	114	0	No se puede saber por contaminación.	No se puede saber por contaminación.
3	14	0	14	0
Total	150	2	-	-

Tabla 6. Tabla resumen con los datos obtenidos tras la sesión de electroporación de embriones. En ella se observa el número de embriones electroporados y el número de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto. El número de embriones con edición genética solamente lo tenemos de la tercera sesión, debido a que en las dos primeras hubo contaminación en la PCR, por lo que no se pudo determinar si existía edición o no.

6. Discusión.

Como se ha comentado anteriormente, inicialmente se incubaron los embriones en un incubador presente en el Animalario, pero no se logró que llegaran a estadio de blastocisto. Aunque en ese momento no se conocía la causa exacta, se pensó que podía tratarse de que el aceite con el que se cubría la gota estuviera en mal estado. El aceite mineral contiene hidrocarburos aromáticos e insaturados que son susceptibles a la peroxidación y la formación de radicales libres. Estos radicales son tóxicos para el embrión y su presencia hace que el desarrollo del mismo se interrumpa (Otsuki *et al.*, 2009). La presencia de estos peróxidos puede darse incluso en botellas de aceite mineral sin abrir, dependiendo de los lotes, por lo que, a pesar de que se utilizó una botella nueva y de un lote diferente, los embriones nuevamente no progresaron. Por ese motivo, se decidió cultivar los embriones en el incubador disponible en el Departamento de Ciencias Médicas Básicas, en el Área de Fisiología, Sección de Medicina. Cuando la incubación se realizó en este incubador cubriendo el medio con aceite mineral, los embriones tampoco evolucionaron. Sin embargo, cuando se cultivaron los embriones en el mismo incubador pero llenando toda la placa de medio KSOM y sin cubrir con aceite, se consiguió que algunos embriones alcanzaran la fase de blastocisto. Posteriormente, se supo que en el animalario había problemas con la electricidad que provocaban que el incubador dejara de funcionar, y no se mantenían las condiciones indicadas para el desarrollo de los embriones. En resumen, si tenemos en cuenta los posibles desajustes del incubador inicial, junto con los problemas con la toxicidad del aceite mineral, sabiendo que la evolución de los embriones en placas de cultivo es un proceso muy delicado que debe ser monitorizado y mantenido con un alto estándar de calidad.

Si comparamos nuestro porcentaje de blastocistos con otros estudios en los que se cultiva el embrión hasta el estadio de blastocisto (Dai *et al.*, 2012; Men *et al.*, 2020), con un porcentaje de blastocistos de en torno al 70%, vemos que nuestro porcentaje de

blastocistos es bastante inferior, de solamente un 23%. Esto puede deberse a varias causas. Una de ellas es la manipulación, cuanto más experiencia tenga el investigador y más rápido ejecute el protocolo de extracción desde el sacrificio de la hembra hasta que introduce los embriones en el medio de cultivo, mayor será la supervivencia de los embriones y menor el número de embriones partenogénicos. Otra posibilidad es que, dado que el electroporador y el incubador no se encuentran en el mismo laboratorio ni en el mismo edificio, los embriones salen en varias ocasiones al exterior, y podría ocurrir que la luz solar les afecte de forma negativa, haciéndoles perder capacidad para desarrollarse. Otro factor, relacionado con el anterior, es el tiempo que pasan los embriones fuera del incubador. El único medio que les permite mantenerse a temperatura ambiente es el M2, por lo que al extraerlos de este medio para lavarlos con OptiMEM puede verse afectada su viabilidad. Hemos observado que esto es especialmente importante cuando existe una cantidad de embriones elevada que electroporar, pues pasan más tiempo en el OptiMEM. Una posible solución para este caso es electroporar un menor número de embriones cada vez, porque en la sesión 2 de la inserción de SGK1.1-CFP, donde se extrajeron 114 embriones, al tratar de electroporarlos todos a la vez, muchos estuvieron demasiado tiempo en el OptiMEM y, en este caso, ninguno llegó a fase de blastocisto. Muchas de estas posibles causas están relacionadas con el hecho de tener que transportar los embriones entre 3 edificios diferentes debido a que no se dispone de incubador en la habitación donde se encuentra el electroporador, y a su vez, este no se encuentra en el animalario donde se realiza la extracción, por lo que cuando este se instale y el animalario del ITB entre en funcionamiento, los embriones pasarán menos tiempo fuera del incubador, recibirán menor cantidad de luz solar, y esperamos que la viabilidad de estos aumente considerablemente.

En la cubeta del electroporador, se añaden 5 μ l de la mezcla que se va a electroporar, y posteriormente se añaden los embriones. En nuestro caso, añadimos los embriones que previamente han sido lavados en OptiMEM, y se encuentran inmersos en este. Para pasarlos de la placa con OptiMEM a la cubeta de electroporación, utilizamos el sistema de succión bucal con capilares de vidrio hechos a mano, por lo que el diámetro varía entre capilares. Esto afecta a la hora de trasladar los embriones, puesto que, si el diámetro de la punta es mayor, succionaremos los embriones con más cantidad de OptiMEM que si la punta tiene el tamaño justo, que permita pasar al embrión sin dañarlo. Si añadimos mucho volumen de OptiMEM junto con los embriones, la

impedancia de la cubeta disminuirá, lo que obliga a retirar parte de la mezcla, pudiendo llevarse en este proceso algunos de los embriones que se encuentran en la misma, a la vez que nos obliga a electroporar en pequeños grupos. Por lo tanto, lo ideal sería emplear capilares con un diámetro lo más cercano a 100 μm , para dejar pasar los embriones y poca cantidad de OptiMEM, para así poder cargar más embriones cada vez, llegando a 50, que es la capacidad de la cubeta utilizada, sin introducir medio de más y alterar la impedancia. Esto permitiría agilizar el proceso de edición génica y el tiempo fuera del incubador y del medio M2, aumentando la supervivencia.

En el caso del *knock out* del gen *Clpp*, aproximadamente el 60% de los embriones obtenidos fueron editados genéticamente, aunque con las pruebas realizadas no es posible saber si la edición llevada a cabo ha conducido a una desactivación del gen. Los blastocistos obtenidos son lisados para extraer el ADN, por lo que de esos mismos blastocistos no se puede extraer proteínas, y, en cualquier caso, la cantidad de proteínas que se obtendría sería muy pequeña para analizarlas por *western blot*. Una posibilidad sería secuenciar un fragmento extenso de este gen en los embriones en los que se ha comprobado que ha habido edición, y buscar en su secuencia si, efectivamente, existe un codón de parada provocado por la maquinaria de reparación. En última instancia, una vez probada la eficiencia de la edición genética, se podría repetir el experimento implantando los embriones en una hembra nodriza CD1 y analizar los ratones obtenidos en la primera generación para detectar aquellos sin expresión de *Clpp*.

Por otro lado, el porcentaje de embriones que, estando editados, alcanzaron el estadio de blastocisto es muy bajo, solamente un 15%, por lo que podría ocurrir que este gen sea necesario para el desarrollo, y que en aquellos en los que se haya *knockeado* el gen en su totalidad, esto impida su desarrollo. Por ese motivo, también decidimos incluir en el análisis aquellos embriones que se quedaron en estadios previos al blastocisto. El inconveniente es la necesidad de juntar de 3-5 embriones para obtener una cantidad suficiente de ADN, pues se obtienen mezclas de genomas. Sin embargo, secuenciando los amplicones podríamos obtener las diferentes variantes y determinar si, aquellas secuencias en las que se identifique un codon STOP pertenecen exclusivamente a embriones que se quedaron en fases más tempranas del desarrollo, indicando que se trata de un gen vital; o si, por el contrario, aquellos que llegaron a blastocisto también están interrumpidos.

En el caso de la edición del gen *Clpp*, en el que buscamos el *knock out*, en los embriones en los que solamente obtuvimos una banda realizamos el ensayo de la enzima T7 endonucleasa I. Es importante destacar que la enzima T7 solo detecta si hay edición (debido a que esta enzima detecta zonas que no son totalmente complementarias entre sí), ya que la maquinaria de reparación de la célula lo hace al azar y puede ser que no se llegue a un codón de parada, obteniendo una proteína diferente porque se altera la pauta de lectura, por ejemplo, alterando así los aminoácidos a partir de la zona de corte. Una posible forma de ver si realmente se ha llegado a un *knock out* sería secuenciando el gen y buscando si existe un codón de parada que se haya originado debido a la maquinaria de reparación de la célula. También se debe tener en cuenta que con este ensayo se detectan cambios de dos nucleótidos o más, por lo que cambios de un único nucleótido no los estamos detectando. Sin embargo, perder o ganar un único nucleótido es muy importante, pues alteraría la pauta de lectura, produciendo con alta probabilidad la pérdida de la proteína.

En la **figura 10**, se puede observar que en los embriones números 4, 8, 10, 11, 13, 19 y 22 existen más de dos bandas al revelar los productos de la PCR. En un principio, podría pensarse que esto se debe a que podría tratarse de una mezcla de varios embriones que no han llegado al estadio de blastocisto, pero en todos los casos se trata o bien de un blastocisto, o de un embrión en estadio de mórula, por lo que todas las bandas pertenecen al mismo individuo. Esto indica que podría tratarse de embriones con mosaicismo. Este tema ya ha sido tratado por Mehravar *et al.*, que en 2019 determinaron las posibles causas de este mosaicismo: que la edición de genes tenga lugar después de que se hayan unido los dos pronúcleos y la posterior replicación del material genético, por resistencia del complejo Cas9:ARNcr provocando la edición de genes tras la primera división celular, y por diferencias en la respuesta de la reparación del ADN, las propiedades del *locus* diana y la concentración de CRISPR. Es por ello que Mehravar *et al.* enumeran una serie de soluciones, entre las que destacan la electroporación en cigotos que han sido preparados por fecundación *in vitro* (FIV), asegurándose así que no ha ocurrido la unión de los dos pronúcleos; que la edición genética se realice en las líneas germinales de los individuos, y no en los cigotos; o también la degradación de la proteína Cas9 mediante ubiquitinación. En nuestro caso, la electroporación se ha realizado siempre antes de la unión de los dos pronúcleos, los cuales son fácilmente observables por microscopía, por lo que, creemos puede deberse al mantenimiento de la actividad de Cas9 en las células hijas y distintas respuestas a la

reparación del corte del ADN. Por lo tanto, dos posibles soluciones que se podrían aplicar en este caso es, electroporar en pronúcleos de embriones fecundados *in vitro* o inmediatamente tras la fertilización, o bien, mediante microinyección, introduciendo el espermatozoide junto con la maquinaria de edición CRISPR/Cas9 (**figura 15**). Sin embargo, en el caso de los ratones, ese mosaicismos puede eliminarse si, una vez que se identifican los ratones que portan la mutación que se desea, se cruzan en la siguiente generación con los ratones *wildtype*, obteniendo la mutación deseada en heterocigosis y limpiando el fondo genético.

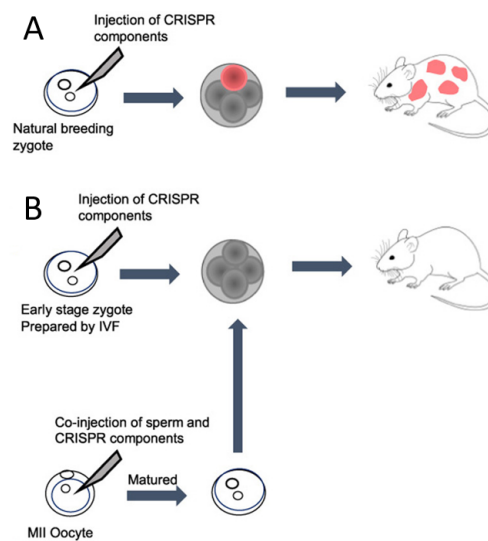


Figura 15. (A) Inyección de los componentes del sistema CRISPR/Cas9 en un cigoto concebido de manera natural, provocando mosaicismos. (B) Inyección de los componentes del sistema CRISPR/Cas9, o bien en estadios tempranos de cigotos preparados por FIV, o junto con el espermatozoide, dando lugar a un ratón que no presenta mosaicismos (Mehravar et al., 2019).

En el laboratorio, la inserción de la proteína SNAP en el extremo N-terminal de BK ya se había realizado en plásmidos y líneas celulares y se había comprobado la eficiencia de la edición genética, así como la funcionalidad del canal BK teniendo fusionada SNAP-tag en esa posición. Esta información concuerda con la alta eficiencia conseguida en este ensayo, siendo el experimento en el que hubo un mayor porcentaje de embriones que llegaron a estadio de blastocisto, un 64%, conteniendo además todos ellos la inserción de SNAP. Por lo tanto, se puede afirmar que este tipo de inserción tiene un alto porcentaje de supervivencia en los embriones, por lo que se podría proceder a repetir el experimento culminando con el nacimiento de ratones con esta modificación, que ayudarían en el estudio de la proteína BK en este modelo. No obstante, hay que tener en cuenta que estos ratones presentarán con alta probabilidad diferentes porcentajes de mosaicismos, por lo que deberán ser cruzados igualmente con los ratones *wildtype*.

Al contrario que en el caso de la inserción en el gen *Kcnma1*, en el caso de la inserción de *Sgkl*, el porcentaje de blastocistos fue muy bajo, solo un 1,3%. En este caso, debemos tener en cuenta que una de las sesiones se realizó con 114 embriones, que es un número demasiado elevado, y como ya se comentó en el apartado 6.1., estos embriones permanecieron demasiado tiempo en OptiMEM, por lo que se pudo ver afectada su viabilidad. Además, debido a la contaminación, que se cree que fue debida a los cebadores utilizados, en las dos primeras sesiones no se pudo comprobar si existía edición. En la tercera sesión, aunque había contaminación, en una de las dos PCR realizadas se puede ver que sí se detecta la banda del tamaño esperado, que a su vez no coincide con el tamaño de la banda que aparece en el blanco (400 pb). Por lo tanto, en este caso, lo ideal sería repetir el experimento con una muestra mayor, teniendo en cuenta que se deben electroporar poco a poco, y utilizando otros cebadores para evitar la contaminación. También se debería optimizar la cantidad de ADN plasmídico a electroporar, ya que un exceso de este, también puede resultar tóxico para el embrión.

En resumen, la obtención de embriones de ratón genéticamente modificados es un proceso muy delicado, ya que existen diversos factores que pueden afectar a la viabilidad de dichos embriones. Es necesario establecer protocolos estandarizados para cada uno de los pasos y controles de calidad en diferentes puntos. Con respecto a la eficacia de la modificación genética, es recomendable usar siempre RNP y haber testado previamente *in vitro* los ARNcr diseñados. Una buena eficiencia de edición detectada en blastocistos será indicativo de la viabilidad de dicha alteración genética y permitirá proceder al siguiente paso, que es la obtención del ratón.

7. Conclusiones.

Tras la discusión de los resultados, se han llegado a las siguientes conclusiones:

1. A pesar de que el proceso de extracción de embriones es sencillo, la dificultad recae en su susceptibilidad, ya que alteraciones en las condiciones de cultivo disminuyen drásticamente su supervivencia. Las condiciones de los medios de cultivo y el aceite mineral, la regulación de los incubadores, el tiempo que pasan fuera del incubador y el manejo en general, influyen directamente en la evolución de los embriones.
2. La electroporación debe realizarse en el tiempo más corto posible, disminuyendo el tiempo en el que los embriones permanecen en el medio OptiMEM y fuera del incubador, pues influye negativamente en la evolución del embrión.

3. Se deben utilizar capilares cuya punta tenga un diámetro de aproximadamente 100 μm para que pasen los embriones sin dañarlos, pero que no sean muy anchas para que no entre mucho líquido, alterando la impedancia de la cubeta de electroporación y prolongando el tiempo en el que los tenemos en la cubeta ajustando dicho valor.
4. En el caso del *knock out* de un gen, el ensayo de la T7 endonucleasa es eficiente para detectar el porcentaje de embriones editados, y decidir si es factible proceder a la obtención del ratón.
5. La edición genética en la que se persigue la inserción de un fragmento de ADN en un sitio en concreto, es más eficiente cuando los reactivos CRISPR/Cas9 son aportados en forma de RNP que como plásmidos.
6. En cualquier caso, la demostración *in vitro* de la eficiencia de los ARNcr diseñados, es un paso fundamental para asegurar el éxito de la edición genética deseada.

After discussion of the results, the following conclusions have been reached:

1. Although the embryo extraction process is simple, the difficulty lies in their susceptibility, since alterations in the culture conditions drastically decrease their survival. The conditions of the culture media and mineral oil, the regulation of the incubators, the time spent outside the incubator and the handling in general, directly influence the evolution of the embryos.
2. Electroporation should be performed in the shortest possible time, reducing the time that the embryos remain in the OptiMEM medium and outside the incubator, as this has a negative influence on embryo development.
3. Capillaries with a tip diameter of approximately 100 μm should be used to allow the embryos to pass without damaging them, but they should not be too wide so that not too much liquid enters, altering the impedance of the electroporation cuvette and prolonging the time in which we have them in the cuvette by adjusting this value.
4. In the case of gene knock out, the T7 endonuclease assay is efficient to detect the percentage of edited embryos, and to decide whether it is feasible to proceed to mouse procurement.
5. Gene editing, in which the insertion of a DNA fragment at a specific site is pursued, is more efficient when CRISPR/Cas9 reagents are delivered in the form of RNP than with plasmids.
6. In any case, *in vitro* demonstration of the efficiency of the designed crRNAs is a fundamental step to ensure the success of the desired gene editing.

8. Bibliografía.

- Barman, Deb, & Chakraborty. (2019). A glance at genome editing with CRISPR–Cas9 technology. *Current Genetics*, 66(3), 447–462. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01040-3>
- Barrangou, R. (2015). The roles of CRISPR–Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Current Opinion in Immunology*, 32, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.12.008>
- Barrangou, R., & Oost, J. van der. (2012). *CRISPR-Cas systems: RNA-mediated adaptive immunity in bacteria and archaea* (p. 267). Springer Science & Business Media.
- Benavides, F. J., & Guénet, J.-L. (2003). *Manual de genética de roedores de laboratorio: Principios básicos y aplicaciones* (p. 66).
- Brouns, S. J. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J. H., Snijders, A. P. L., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V., & van der Oost, J. (2008). Small CRISPR rnas guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 321(5891), 960–964. <https://doi.org/10.1126/science.1159689>
- Chen, S., Lee, B., Lee, A. Y.-F., Modzelewski, A. J., & He, L. (2016). Highly efficient mouse genome editing by CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes. *Journal of Biological Chemistry*, 291(28), 14457–14467. <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.733154>
- Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E., & Koonin, E. V. (2014). Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 42(10), 6091–6105. <https://doi.org/10.1093/nar/gku241>
- CRISPR Systems. (2018, February 6). Doudna Lab. https://doudnalab.org/research_areas/crispr-systems/
- Dai, S.-J., Xu, C.-L., Wang, J., Sun, Y.-P., & Chian, R.-C. (2012). Effect of culture medium volume and embryo density on early mouse embryonic development: Tracking the development of the individual embryo. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(7), 617–623. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9744-8>
- Deltcheva, Chylinski, Sharma, Gonzales, Chao, Pirzada, Eckert, Vogel, & Charpentier. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
- Dotmatics. (2016, March 22). *SnapGene*. GSL Biotech LLC. <https://www.snapgene.com>
- Friedrich, G., & Soriano, P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: A genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes & Development*, 5(9), 1513–1523. <https://doi.org/10.1101/gad.5.9.1513>
- García, M. Y., & Sánchez, M. A. (2016). Introducción en el manejo y obtención de embriones de ratón para su modificación genética. *FarmaJournal*, 1(2), 133–142.
- GeneCards Human Gene Database. (2017). *CLPP gene - GeneCards*. CLPP Antibody. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CLPP>
- Grabarek, J. B., Plusa, B., Glover, D. M., & Zernicka-Goetz, M. (2002). Efficient delivery of dsRNA into zona-enclosed mouse oocytes and preimplantation embryos by electroporation. *Genesis*, 32(4), 269–276. <https://doi.org/10.1002/gene.10076>
- Hashimoto, M., & Takemoto, T. (2015). Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep11315>
- Hashimoto, M., Yamashita, Y., & Takemoto, T. (2016). Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. *Developmental Biology*, 418(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.07.017>
- Haurwitz, R. E., Jinek, M., Wiedenheft, B., Zhou, K., & Doudna, J. A. (2010). Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science*, 329(5997), 1355–1358. <https://doi.org/10.1126/science.1192272>
- IDT. (2022). *Alt-R® Genome Editing Detection Kit*. IDT. <https://eu.idtdna.com/pages/products/crispr-genome-editing/alt-r-genome-editing-detection-kit>
- Integrated DNA Technologies. (n.d.). *Ribonucleoprotein delivery using the Alt-R CRISPR-Cas9 System and the NEPA21 Electroporator (CRS-10092-PR 04/19)*.
- Jansen, Ruud., Embden, Jan. D. A. van, Gaastra, Wim., & Schouls, Leo. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 46(1), 505–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-rna-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kaneko, T., Sakuma, T., Yamamoto, T., & Mashimo, T. (2014). Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Scientific Reports*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/srep06382>

- Laboratorio de ensayos biológicos, Universidad de Costa Rica. (n.d.). ICR. LEBI. Retrieved June 16, 2022, from <https://lebi.ucr.ac.cr/biomodelos/ratones/icr>
- Marraffini, L. A. (2016, April 7). *The CRISPR-Cas system of Streptococcus pyogenes: Function and applications*. NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK355562/>
- Mehrar, M., Shirazi, A., Nazari, M., & Banan, M. (2019). Mosaicism in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Developmental Biology*, *445*(2), 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.10.008>
- Men, H., Stone, B. J., & Bryda, E. C. (2020). Media optimization to promote rat embryonic development to the blastocyst stage in vitro. *Theriogenology*, *151*, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.007>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, *155*(3), 733–740. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023960-0>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, *60*(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Mojica, F. J. M., Juez, G., & Rodríguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular Microbiology*, *9*(3), 613–621. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x>
- Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., & Behringer, R. (2003). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nakagata, N. (2015). *Técnicas de Ingeniería Reproductiva del Ratón. Manual técnico*. (J. Sztein, Trans.; 3rd ed., pp. 10–11). Cosmo bio co., Ltd. (Original work published 2015)
- National Center for Biotechnology Information. (n.d.). *Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query*. Retrieved June 29, 2022, from https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
- National Center for Biotechnology Information. (2009). *Sgk1 serum/glucocorticoid regulated kinase 1 [Mus musculus (house mouse)] - Gene*. NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20393>
- National Center for Biotechnology Information. (2022). *Kcnma1 potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1 [Mus musculus (house mouse)] - Gene*. NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16531>
- Otsuki, J., Nagai, Y., & Chiba, K. (2009). Damage of embryo development caused by peroxidized mineral oil and its association with albumin in culture. *Fertility and Sterility*, *91*(5), 1745–1749. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.03.001>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, *8*(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Sakurai, T., Watanabe, S., Kamiyoshi, A., Sato, M., & Shindo, T. (2014). A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. *BMC Biotechnology*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-69>
- Sander, & Joung. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, *32*(4), 347–355. <https://doi.org/10.1038/nbt.2842>
- Scavizzi, F., Ryder, E., Newman, S., Raspa, M., Gleeson, D., Wardle-Jones, H., Montoliu, L., Fernandez, A., Dessain, M.-L., Larrigaldie, V., Khorshidi, Z., Vuolteenaho, R., Soininen, R., André, P., Jacquot, S., Hong, Y., de Angelis, M. H., Ramirez-Solis, R., & Doe, B. (2015). Blastocyst genotyping for quality control of mouse mutant archives: An ethical and economical approach. *Transgenic Research*, *24*(5), 921–927. <https://doi.org/10.1007/s11248-015-9897-1>
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-Step generation of mice carrying mutations in multiple genes by crispr/cas-mediated genome engineering. *Cell*, *153*(4), 910–918. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.025>
- Wiedenheft, B., Sternberg, S. H., & Doudna, J. A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, *482*(7385), 331–338. <https://doi.org/10.1038/nature10886>

9. Agradecimientos

Me gustaría agradecer al ITB, y en especial a David y a Belinda por toda la ayuda y apoyo prestado. Por otro lado, agradecerle a mi familia, amigos y pareja, por haberme animado y apoyado durante estos años en el Grado, y en especial a mi abuela Aurelia, que falleció recientemente, y a quien dedico este trabajo.