



Facultad de Medicina
Escuela de Medicina

“Regulación de la expresión de Rnf19a mediada por microRNAs en células somáticas y germinales de ratón”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Karina Pino

Director de Tesis: Mario Párraga

Octubre de 2021



Facultad de Medicina
Escuela de Medicina

“Regulación de la expresión de Rnf19a mediada por microRNAs en células somáticas y germinales de ratón”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Karina Pino

Director de Tesis: Mario Párraga

Octubre de 2021



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Regulación de la expresión de Rnf19a mediada por microRNAs en células somáticas y germinales de ratón”

Karina Pino

Este trabajo se realizó bajo la supervisión del Dr. Mario Párraga en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB) de la Universidad de Valparaíso y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. Álvaro Ardiles
Presidente Comisión

Dr. Rodolfo Farlora
Profesor Informante

Dr. Ricardo Moreno
Profesor Informante

Dr. Mario Párraga
Director de Tesis

**Viña del Mar, Chile
2021**

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas las personas que de una y otra forma me acompañaron en este largo proceso. En primer lugar agradecer a mi profesor guía, Mario Párraga, por el conocimiento entregado, la paciencia y estar siempre receptivo a mis dudas. A Camila Escobar, asistente de investigación, por su ayuda y buena disposición para realizar el trabajo en el laboratorio. A Carlos Jara por su ayuda con el análisis de datos y a todos los profesores del CIB por su buena disposición. A mis compañeros de laboratorio y compañeras del magíster por la buena onda, este proceso no hubiese sido tan ameno sin su compañía. Finalmente, a mi familia por su constante apoyo.

ABREVIATURAS

3' UTR: Región no traducida tres prima

ago: Proteínas argonauta

Apr: Espermatogonia apareada

cDNA: DNA complementario

ceRNA: RNA endógenos competitivos

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas

DMEM: Medio basal modificado de Eagle

DNA: Ácido desoxiribonucleico

EGFP: Proteína verde fluorescente (enhanced green fluorescent protein)

HDR: Reparación dirigida por homología

lncRNA: RNA largo no codificante

miRNA: microRNA

gRNA: RNA guía

MREs: Elemento de reconocimiento de miRNAs

Indel: Inserción o deleción

kb: kilobase

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

ncRNA: RNA no codificante

NHEJ: Reparación de extremos no homólogos

PAM: Dominio adyacente de protoespaciador

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

piRNA: RNAs pequeños asociados a Piwi

pn: Postnatal

pre-miRNA: microRNA precursor

pri-miRNA: microRNA primario

RISC: Complejo silenciador inducido por RNA

Rnf19a: Gen de la proteína Ring Finger 19a

Rnf19aP1: Pseudogen 1 de Rnf19a

Rnf19aP2: Pseudogen 2 de Rnf19a

Rnf19aP3: Pseudogen 3 de Rnf19a

Rt-qPCR: Transcripción reversa- Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SBF: Suero bovino fetal

siRNA: RNA pequeños de interferencia

sncRNA: RNA pequeños no codificantes

tsRNA: RNA pequeño derivado del ARN de transferencia

WT: Wild type

INDICE

1. RESUMEN	10
2. INTRODUCCIÓN.....	11
2.1. Espermatogénesis	11
2.2. Regulación génica en la espermatogénesis	12
2.3. Regulación post-transcripcional mediada por RNAs no codificantes en espermatogénesis	12
2.4. Regulación génica mediada por microRNAs en espermatogénesis	14
2.5. Rnf19a.....	17
2.6. Antecedentes.....	19
2.7. Edición genómica	21
2.8. Formulación del problema.....	22
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVO GENERAL	23
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
6. METODOLOGÍA.....	24
6.1. OE 1 Determinar la expresión de la proteína Rnf19a en células somáticas (NIH-3T3) y germinales (GC-1 y GC-2) de ratón tras la eliminación de los MRE en <i>Rnf19a</i>	24
6.1.1. Modelo experimental.....	24
6.1.2. Edición genómica mediante CRISPR	24
6.1.3. Comprobación de la edición genómica	28
6.1.4. RT-PCR.....	30
6.2. OE2 Analizar entre sí las variaciones de los niveles de Rnf19a obtenidas en cada uno de los OE anteriores.....	32
7. RESULTADOS	33
7.1. OE1 Determinar la expresión de la proteína Rnf19a en células somáticas (NIH-3T3) y germinales (GC-1 y GC-2) de ratón tras la eliminación del MRE en <i>Rnf19a</i>	33
7.1.1. Edición genómica	33
7.1.2. Expresión relativa de <i>Rnf19a</i> en líneas celulares NIH-3T3, GC-1 y GC-2	38
7.2. OE2: Analizar entre sí las variaciones de los niveles de Rnf19a obtenidas en cada uno de los OE anteriores.....	41
8. DISCUSIÓN	42
9. CONCLUSIONES	50
10. PROYECCIONES	51
11. BIBLIOGRAFÍA.....	52
12. ANEXOS.....	59

11.1.	ANEXO 1: Aislamiento de colonias mononucleares por dilución límite	59
11.2.	ANEXO 2: Comprobación de la edición genómica.....	60

1. RESUMEN

La espermatogénesis implica una serie de etapas cuya correcta progresión requiere de una regulación precisa de la expresión génica, destacando a nivel post-transcripcional la regulación mediada por microRNAs. *Rnf19a*, localizado en el cromosoma 15 de ratón, codifica para una ligasa de ubiquitina, y tiene tres secuencias homólogas (pseudogenes). Este gen se expresa en células somáticas y, de forma diferencial, en células germinales masculinas de ratón. Tanto el mRNA de *Rnf19a* como el de los pseudogenes presentan sitios de unión a miRNAs (MREs) en sus regiones 3' UTR, siendo comunes los de miR-7013-5p, miR-7116-5p y miR-6373, los que ejercerían un rol regulador en la expresión del gen y sus pseudogenes. En el presente trabajo se estudió el efecto de la eliminación de los sitios de unión a los miRNAs en la expresión de *Rnf19a*. Por CRISPR-Cas9 se suprimió una región de 1.2 kb de la 3'-UTR de *Rnf19a* que contenía los MRE de interés. Tras la selección clonal de las células editadas se obtuvieron colonias no mutadas, heterocigotas y con ambas copias del gen editadas. Por qPCR se observó una disminución estadísticamente significativa de *Rnf19a* en las colonias con la región 3'-UTR mutada en comparación al control no editado. La edición de la región 3'-UTR tuvo un efecto en la expresión de *Rnf19a* en las tres líneas celulares. Estos resultados muestran una disparidad respecto a los resultados obtenidos con el gen reportero.

Palabras clave: Espermatogénesis, regulación génica, miRNAs, *Rnf19a*, CRISPR.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso por el cual se forman los gametos masculinos o espermatozoides. Se lleva a cabo en los testículos, específicamente en los túbulos seminíferos que contienen un epitelio formado por células somáticas (células de Sertoli) y células germinales (espermatogonias, espermatocitos y espermátidas), rodeadas de una delgada capa de células peritubulares (1).

Este proceso involucra la diferenciación de una célula diploide (espermatogonia) a una célula haploide (espermátida redonda), y su posterior transformación a una espermátida alargada. Se puede dividir en tres fases:

- Fase mitótica: Las células madre espermatogonias, ubicadas en el compartimiento basal de los túbulos seminíferos, se dividen por mitosis para renovarse a sí mismas y diferenciarse. Las células madre espermatogonias dan origen a nuevas células madre o a espermatogonias pareadas (Apr). Las últimas darán origen a varias generaciones de células hasta las espermatogonias tipo B que, a su vez, se dividirán por mitosis convirtiéndose en espermatocitos primarios (2).

- Fase meiótica: Los espermatocitos primarios se dividen por meiosis dando origen primero a espermatocitos secundarios y, finalmente, a espermátidas redondas que son ya haploides. La finalidad de este proceso es realizar la recombinación genética y reducir el número de cromosomas y el contenido de DNA al estado haploide en las espermátidas (2).

- Espermiogénesis: Las espermátidas redondas experimentan cambios morfológicos y moleculares como la formación del flagelo y acrosoma, reordenamiento y reducción del número de sus organelos, eliminación de gran parte del citoplasma, la remodelación del núcleo y compactación de la cromatina, para diferenciarse a espermátidas alargadas y finalmente a espermatozoides (2). Los espermatozoides son células largas, compuestas de una cabeza, que contienen el núcleo, y una cola, que constituye la mayor parte de su longitud (3).

2.2. Regulación génica en la espermatogénesis

Para la correcta progresión de sus distintas fases, la espermatogénesis requiere de una regulación estricta y coordinada de la expresión génica, que ocurre a nivel transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional.

Resulta esencial la regulación post-transcripcional ya que en la fase de espermiogénesis ocurre un cese de la transcripción para permitir la condensación de la cromatina. Entonces las células deben transcribir el RNA mensajero (mRNA) antes, en dos olas de transcripción: una previa a la meiosis, y otra que se solapa con ella y el inicio de la espermiogénesis. Estos transcritos deben ser estabilizados para permitir su traducción en estadios posteriores, quedando almacenados en partículas ribonucleoproteicas y sujetas a una traducción tardía (4). En este sentido se ha identificado que las regiones no codificantes del mRNA, en particular la 3'-UTR, tienen roles irremplazables en la regulación génica a nivel post-transcripcional. Las regiones no codificantes regulan no sólo la estabilidad del mRNA sino también su exportación al citoplasma, localización subcelular y la eficiencia de la traducción. Para ello, estas regiones tienen una variedad de secuencias regulatorias que son reconocidas, de forma específica, por proteínas de unión a RNA o por RNAs no codificantes. La interacción entre estos elementos es fundamental para la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional. Por tanto, cualquier alteración en estas secuencias afectará la expresión génica y, por ello, la viabilidad, crecimiento y desarrollo celular (5). Dentro de estos mecanismos de regulación post-transcripcional destaca la regulación mediada por RNAs no codificantes.

2.3. Regulación post-transcripcional mediada por RNAs no codificantes en espermatogénesis

A partir de la secuenciación del genoma se determinó que solo una pequeña porción de genes (alrededor del 2%) codifica para proteínas, siendo el resto no codificantes, aunque sí se transcriben. Esos transcritos se denominan RNAs no codificantes y son los actores de uno de los mecanismos de regulación más importantes a nivel post-transcripcional.

Los RNAs no codificantes (ncRNA) se pueden clasificar en base a su tamaño en dos grupos: 1) los mayores de 200 nucleótidos que son llamados RNAs largos no codificantes

(lncRNA) y 2) los menores de 200 nucleótidos, denominados RNAs pequeños no codificantes (sncRNA) (6).

Los RNAs largos no codificantes (lncRNA) son el grupo más grande de RNAs no codificantes en humanos. Son transcritos por la RNA polimerasa II. Estos lncRNAs tienen un tamaño mayor a 200 nucleótidos y carecen de marco de lectura abierto. Se les ha asociado roles en la regulación transcripcional, post transcripcional y epigenética (7). Un lncRNA importante es *Xist* que tiene un rol en la inactivación del cromosoma X (8). Otro ejemplo de lncRNAs son los transcritos de pseudogenes. Se ha reportado que los transcritos de pseudogenes participarían de la regulación de la traducción de los transcritos de sus genes parentales con los que comparten sitios de unión de miRNAs. Al competir por la unión del miRNA común, los mRNA de los pseudogenes y genes parentales, actuarían como RNAs endógenos competitivos (ceRNAs) formando redes de regulación denominadas redes ceRNA (9,10) (Figura 1).

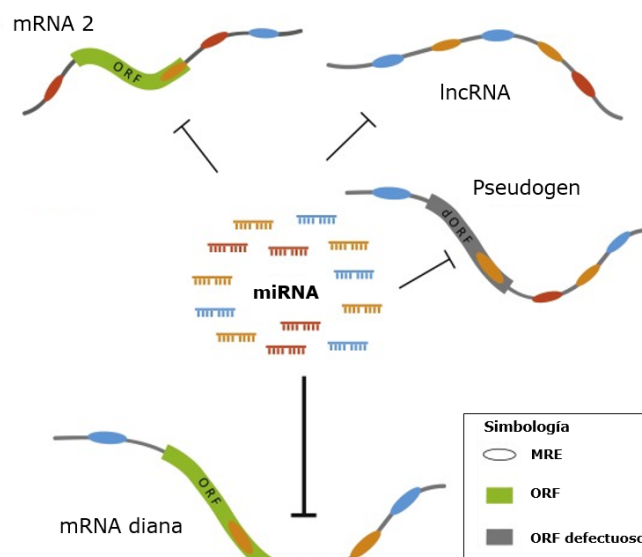


Figura 1: Interacciones entre distintos tipos de ncRNAs, miRNAs y mRNA. Modificado de (6).

Hasta la fecha los RNAs pequeños no codificantes (sncRNA) se clasifican según su biogénesis, asociación con proteínas Argonautas, mecanismos de acción y función en 4 tipos principales: microRNA (miRNA), RNAs pequeños de interferencia (siRNA), RNAs

asociados a PIWI (piRNA) y RNAs pequeños derivados de RNA de transferencia (tsRNA) (11,12).

Una de las características de los sncRNAs es su asociación a proteínas de la familia Argonauta. Los miRNAs y siRNAs se unen exclusivamente a las proteínas Ago de la familia argonauta, mientras que los piRNAs lo hacen exclusivamente con las proteínas PIWI (13) y los tsRNAs lo harían a las proteínas Ago y PIWI (14). Respecto a su función, los miRNAs actúan reprimiendo la traducción o degradando el mRNA, los siRNAs actúan regulando la expresión de genes endógenos, transposones o RNA viral y los piRNAs silencian transposones y participan de la regulación post-transcripcional en células germinales (15). Sobre los tsRNAs se ha reportado que se asociarían a proteínas Ago, por ello se cree que participarían del silenciamiento génico (16) y, además, tendrían una función en la transmisión epigenética de patrones (17). De ellos, los miRNAs constituyen los principales reguladores de la expresión génica a nivel post-transcripcional.

2.4. Regulación génica mediada por microRNAs en espermatogénesis

Los microRNAs (miRNA) tienen un tamaño de 19-23 nucleótidos, se asocian a proteínas AGO y regulan la expresión génica afectando la estabilidad o traducción del mRNA (13,18). Se ha descrito que los miRNAs participan en la regulación de importantes procesos biológicos como el desarrollo, proliferación, diferenciación celular, apoptosis, metabolismo de las grasas y mantenimiento de células madre (6,19). También, se ha asociado al desarrollo del cáncer (20).

Los miRNAs están codificados en el genoma, en regiones intergénicas o intrónicas, y son transcritos por la RNA polimerasa II en un miRNA primario (pri-miRNA), de 70 nucleótidos con forma de horquilla. El pri-miRNA es procesado en el núcleo, por la endonucleasa Drosha, en un precursor de miRNA (pre-miRNA). Luego, el pre-miRNA es exportado al citoplasma a través de un canal de membrana nuclear denominado exportina-5. Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es procesado por la enzima Dicer en un miRNA maduro de doble hebra de 22 nucleótidos. El miRNA maduro se asocia a

proteínas, entre ellas la proteína Ago, formando un complejo silenciador inducido por RNA (RISC). Una vez cargado en este complejo una de las hebras del miRNA, la hebra pasajera, es degradada mientras que la otra, la hebra guía permanece unida al complejo. Entonces, el miRNA guía al complejo RISC a un mRNA diana de secuencia complementaria e induce su degradación o la represión de la traducción (Figura 2) (11,13,15,21).

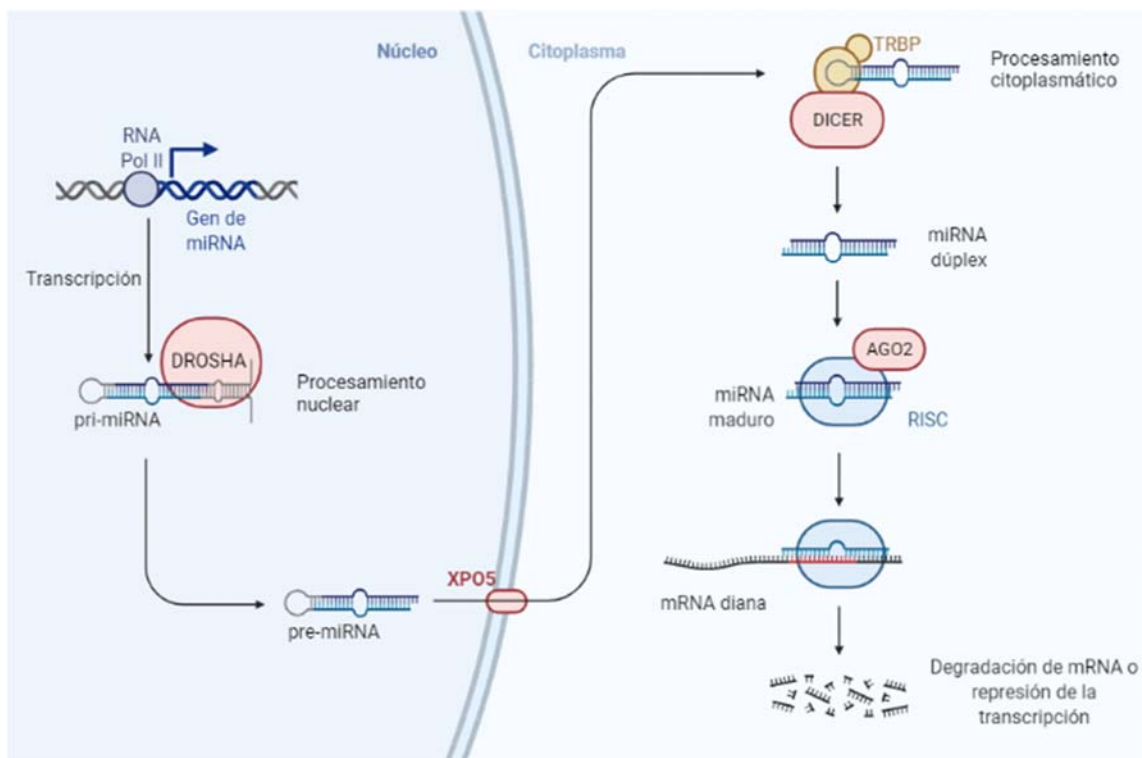


Figura 2: Biogénesis de microRNAs

La unión del miRNA a un mRNA está determinada por la complementariedad de bases entre dos secuencias: 1) la región semilla del miRNA, que abarca los nucleótidos 2-8 en su extremo 5', y 2) el elemento de reconocimiento de miRNA (MRE) en la región 3' UTR del mRNA (Figura 3). Esas secuencias deben ser totalmente complementarias para que el miRNA se una al mRNA. El grado de complementariedad del resto de la secuencia del miRNA es variable, y de ello depende el mecanismo de acción del complejo RISC. Cuando la complementariedad entre el miRNA y el mRNA es extensa, se produce la degradación

del mRNA mediada por la actividad endonucleasa de la proteína Ago. Cuando la complementariedad es menos extensa ocurre la represión de la traducción, mecanismo predominante en mamíferos (11,13,22). Un miRNA puede unirse y regular a varios mRNA si estos tienen una región semilla en común. De la misma forma, un mRNA puede tener varios MRE y ser regulado por distintos miRNAs (18).

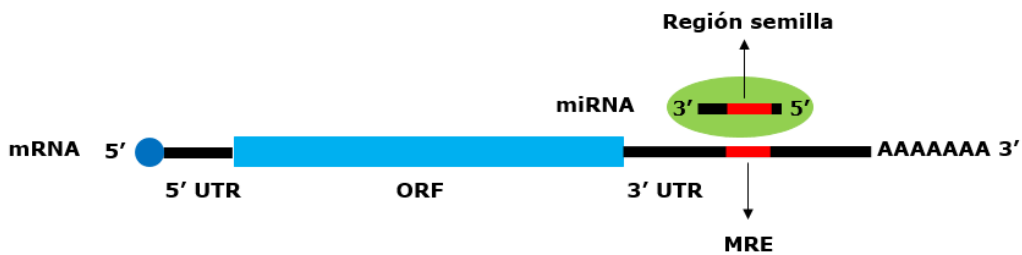


Figura 3: Unión de miRNA a la región 3' UTR del mRNA.

Hay una alta expresión de miRNAs durante la espermatogénesis (23), donde algunos miRNAs se expresan de forma célula y estadio específicos, mientras que otros lo hacen universalmente (24). Diversos trabajos demuestran que los miRNAs son esenciales para la espermatogénesis y jugarían un rol importante durante la fase mitótica, meiótica y espermiogénesis regulando la expresión de distintos genes (25–27). Una prueba de ello es que ratones knockout para la enzima de procesamiento Dicer en células germinales son infértiles y presentan alteraciones en la progresión de la meiosis, aumento de la apoptosis en espermatocitos en paquiteno, disminución del número de espermátidas y defectos morfológicos en los espermatozoides (28,29). Un fenotipo similar se presenta en ratones knockout de Drosha, otra enzima necesaria para el procesamiento de los miRNAs (30). Estas evidencias respaldan la importancia de los miRNAs en la regulación de la espermatogénesis.

También, se ha reportado que la expresión de ciertas familias de miRNAs aumenta en determinadas fases y son clave para la correcta progresión de la espermatogénesis (13,26,31). Por ejemplo, la familia miR-17-92 está aumentada en espermatogonias. Los ratones knock out de miR-17-92 presentan menor número de espermatogonias y detención de la espermatogénesis sugiriendo un rol en la diferenciación de

espermatogonias (13,24,32). Otro ejemplo es la familia miR-34 cuya expresión aumenta al inicio de la meiosis. Los ratones knock out de esta familia son infértiles y producen menos espermatozoides maduros que, además, son anormales (26,33). La expresión de miRNAs también sería esencial en células de Sertoli. En estas células, la depleción de Dicer resulta en la interrupción de la espermatogénesis y la degeneración progresiva de los testículos (24,34,35), indicando que los miRNAs expresados en las células de Sertoli juegan un papel importante en la espermatogénesis.

Entonces, en la espermatogénesis la expresión de miRNAs es estadio-específica, algunos miRNAs se expresan en ciertas células germinales, mientras que otros se expresan en todos los tipos. Modelos knockout han demostrado que los miRNAs son esenciales en la correcta progresión de la espermatogénesis y participan en sus diversas fases incluyendo la proliferación de espermatogonias, meiosis y diferenciación de espermátidas.

2.5. Rnf19a

Rnf19a es un gen aislado inicialmente en testículo, localizado en el cromosoma 15 de ratón que codifica para una ligasa de ubiquitina del tipo RBR. La proteína se localiza en el centrosoma, de todas las células y el cuerpo XY de espermatoцитos en paquiteno. Este gen se expresa en células somáticas y germinales, y tiene una expresión diferencial en testículo, específicamente en las células germinales (36). *Rnf19a* está altamente conservado en la evolución, expresándose en otras especies como humanos, ratas, chimpancés, entre otros (37–39). En relación al ratón, en nuestro grupo se han identificado tres secuencias homólogas a este gen en el cromosoma 9, que corresponden a pseudogenes procesados denominados *Rnf19aP1* (TPPG-1), *Rnf19aP2* (TPPG-2) y *Rnf19aP3* (TPPG-3) (Gráfico 1).

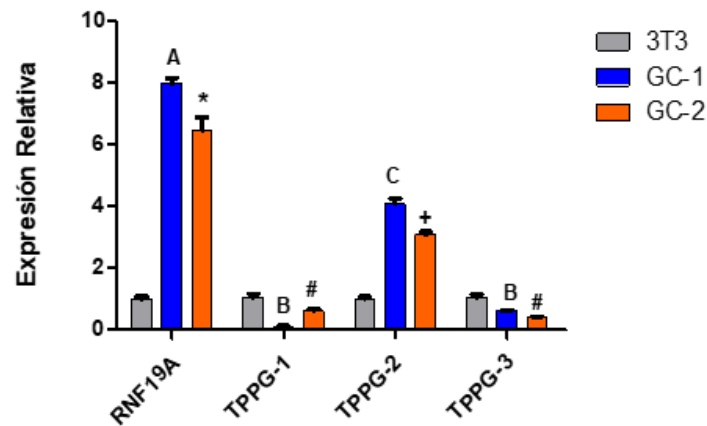


Gráfico 1: Expresión relativa de *Rnf19a* y pseudogenes (TPPG-1, TPPG2 y TTPG-3) en líneas celulares germinales (GC-1 y GC-2) versus somáticas (NIH-3T3) de ratón. Los datos se expresan como promedio \pm DE. A, B, C significan diferencias significativas en GC-1 y *, #, + en GC-2. $p < 0.05$.

A partir de *Rnf19a* de ratón, se generan dos transcritos: 1) uno largo de 4.2 kilobases (kb) de expresión ubicua y 2) uno corto de 2.8 kb, exclusivo de testículo, procesado por un mecanismo de poliadenilación alternativa, que se expresa a partir de la aparición de los primeros espermatoцитos en paquiteno, alrededor del día 14 postnatal (pn). El mRNA de 4.2 kb tiene una baja expresión en células germinales masculinas hasta el día 14 pn. A partir de ese día, sus niveles aumentan hasta 30 veces coincidiendo con la expresión del mRNA de 2.8 kb en espermatoцитos en paquiteno (36). La proteína *Rnf19a* se localiza en el centrosoma de células somáticas y células germinales, en todas las fases del ciclo celular. Adicionalmente, en células germinales masculinas, *Rnf19a* aparece también en una estructura meiótica especializada denominada cuerpo XY (36). Si bien se desconoce la función exacta de *Rnf19a* en espermatogénesis, se ha descrito que en ratas, *Rnf19a* interactuaría con un componente del proteosoma, apuntando a la participación del sistema ubiquitina-proteosoma en la biogénesis del acromosoma, la formación de la cabeza y el desarrollo de la cola del espermatozoide (38). Aun así, no se han identificado los sustratos de esta ligasa de ubiquitina en línea germinal murina. En cambio, en

humano, se identificó y caracterizó su ortólogo, llamado DORFIN. En este caso, se reportó que DORFIN ubiquitina a la enzima SOD-1 alterada y que se relaciona con ciertas enfermedades neurodegenerativas (37,40–42).

Cada uno de los dos transcritos de *Rnf19a* posee una región 3'UTR que difieren en longitud. La del transcrito largo tiene un tamaño de 1.4 kb y la del transcrito corto tiene un tamaño de 300 pares de bases (pb) (36). En una tesis anterior de nuestro laboratorio, mediante análisis *in silico*, se identificaron posibles sitios de unión de miRNAs en la región 3'UTR de los transcritos de *Rnf19a* y de los potenciales transcritos de los pseudogenes. De ellos hay tres miRNAs, miR-7013-5p, miR-7116-5p y miR-6373, que son comunes al transcrito largo del gen y a los transcritos de los tres pseudogenes (43).

2.6. Antecedentes

En trabajos anteriores hemos visto que *Rnf19a* estaría regulado por miRNAs (43). Es interesante que en la espermatogénesis se ha descrito el papel esencial de los miRNAs e incluso se ha descrito que la pérdida de su función está asociada a infertilidad masculina y patologías reproductivas (44), lo que hace importante conocer los miRNAs asociados a la regulación de *Rnf19a* en línea germinal.

Resulta también interesante que en ratón *Rnf19a* tenga tres pseudogenes con los que comparte elementos de reconocimiento de miRNAs (MRE). En trabajos anteriores se demostró que los pseudogenes *Rnf19aP1* y *Rnf19aP3* se transcriben, siendo pseudogenes procesados transcritos (43,45). Trabajos no publicados del laboratorio muestran la expresión de los pseudogenes en las líneas germinales GC-1 y GC-2 y en la línea somática NIH-3T3.

Todo lo anterior hace pensar que el transcrito de *Rnf19a*, los transcritos de los pseudogenes y los posibles miRNAs que se unirían a sus regiones 3' UTR formarían parte de una red compleja de regulación o red ceRNA. Hay reportes de este tipo de interacciones y se ha visto que su alteración está asociada a procesos patológicos como el cáncer (9,31,46–48). Cabría por tanto pensar que fallas de este tipo de redes pudieran relacionarse con patologías de línea germinal que incluyan la infertilidad. Debido a esto

último, es importante aclarar los mecanismos de regulación de genes con expresión en la gametogénesis masculina, como *Rnf19a*, mediados por miRNAs. Entender la función de algunos de ellos y su patogénesis permitirá entender los procesos normales y patológicos, como la esterilidad o infertilidad (siendo un buen indicador de la salud reproductiva masculina cuando están alterados).

Como primer enfoque para estudiar si la expresión de *Rnf19a* es regulada por miRNAs, se evaluó el efecto que tenía la presencia de las regiones 3' UTR del gen y del pseudogen *Rnf19aP3* en la expresión del gen reportero EGFP en células NIH-3T3. Se observó que la presencia de estas regiones 3' UTR disminuían los niveles de expresión de la proteína EGFP, efecto que se revertía al agregar inhibidores de miRNAs (antimiRs), específicamente para miR-7013-5p, miR-7116-5p y miR-6373. Esos resultados muestran que estos miRNAs se unen a las regiones 3'UTR de *Rnf19a* y del pseudogen *Rnf19aP3* (43).

Considerando estos antecedentes, surge la interrogante de si miR-7013-5p, miR-7116-5p y miR-6373 regulan la expresión del gen *Rnf19a*. Para estudiar la función biológica de los miRNAs se pueden utilizar estrategias que involucran bloquear su función o eliminar su sitio de unión (MRE) en el gen de interés. Como los miRNAs se unen a más de una diana, la gran limitación de bloquear su función, mediante antimiRs o knockout, es que altera la regulación de otros mRNA. Lo anterior dificulta determinar si el efecto observado se debe a la ausencia de la unión del miRNA a la diana de interés o a sus otras dianas. Por ello, algunos autores recomiendan que para probar que un mRNA es regulado por un miRNA específico es necesario alterar el MRE sólo en la secuencia del gen de interés, en este caso *Rnf19a*, mediante edición genómica. De esta forma, el efecto observado será por la alteración de la unión del miRNA a la diana de estudio y no a otras dianas (13,19). Algunos investigadores ya han empleado la edición genómica de MREs para estudiar la función de algunos miRNAs en el contexto celular (49–51). Chen y colaboradores reportaron que deleciones en la región 3' UTR del gen *FIH1* en células tumorales de pulmón, realizadas mediante la herramienta CRISPR, aumentaban la expresión de la proteína *FIH1* (51).

2.7. Edición genómica

La edición genómica consiste en la modificación de una secuencia específica de nucleótidos de DNA en el genoma de una célula. Para ello se usan enzimas endonucleasas que cortan las dos hebras del DNA, gatillando la reparación por dos mecanismos diferentes: a) Unión de extremos no homólogos, proceso que repara la rotura añadiendo o eliminando nucleótidos ("indel") y modificando por tanto la secuencia original; b) Reparación dirigida por homología, la cual inserta un fragmento nuevo en el punto de corte modificando así la secuencia. Una de las herramientas que permite editar el genoma así es CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) (52).

CRISPR tiene dos componentes:

- RNA guía (gRNA): Un RNA sintético de 19-20 pb que define, por complementariedad de bases, la secuencia de DNA a modificar.
- Endonucleasa Cas9.

Cuando el gRNA y la enzima Cas9 son expresados en la célula forman un complejo y el gRNA dirige a Cas9 a una diana que tiene una secuencia de bases complementarias. La diana debe ubicarse adyacente a una secuencia de tres nucleótidos (NGG), denominada PAM, para ser reconocida por la enzima Cas9 (Figura 4). Entonces, Cas9 producirá un corte de doble hebra en la secuencia de interés, que puede ser reparado por los mecanismos propios de la célula: la reparación de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación dirigida por homología (HDR), dando lugar a modificaciones en el genoma (53).

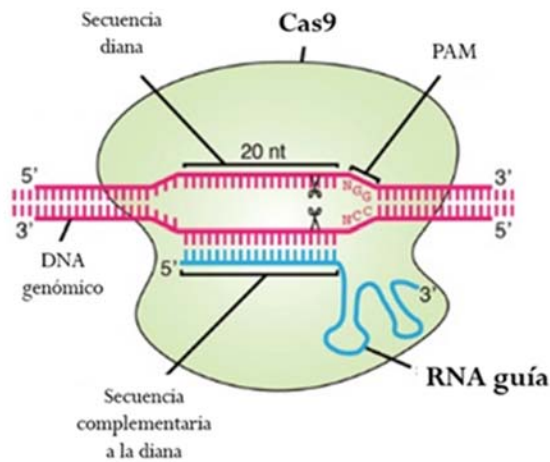


Figura 4: Componentes de CRISPR. Modificado de (54).

2.8. Formulación del problema

Rnf19a es un gen localizado en el cromosoma 15 de ratón, que está conservado evolutivamente. Este gen se expresa en células somáticas y de forma diferencial en células germinales masculinas. Se han identificado 3 pseudogenes en el cromosoma 9. Tanto los transcritos de *Rnf19a* y los de los posibles transcritos de los pseudogenes presentan sitios de unión a miRNAs en sus regiones 3' UTR. Se estudiará la regulación de *Rnf19a* en espermatogénesis porque este proceso representa un modelo ideal para el estudio de la regulación génica post-transcripcional *in vivo*.

Los resultados de un estudio con estas regiones 3' UTR unidas a un gen reportero, sugieren que los miRNAs miR-7013-5p, miR-7116-5p y miR-6373 se unen a ellas regulando la expresión del reportero. En base a estos antecedentes la pregunta de investigación que nos formulamos es:

¿los niveles de expresión de *Rnf19a* de células somáticas y germinales se verán alterados al eliminar los elementos de reconocimiento de miRNAs (MRE) contenidos en la región 3'-UTR de *Rnf19a*?

3. HIPÓTESIS

Para responder la pregunta de investigación que quedó planteada en el apartado anterior, proponemos como hipótesis:

La eliminación de elementos de reconocimiento de miRNAs (MRE) en la secuencia de *Rnf19a* genera un aumento en los niveles expresión de *Rnf19a* en células somáticas y germinales de ratón.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar los niveles de expresión de *Rnf19a* tras la eliminación de elementos de reconocimiento de miRNAs (MRE) en la secuencia de *Rnf19a*, en células somáticas (NIH-3T3) y germinales (GC-1 y GC-2) de ratón.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la expresión de *Rnf19a* en células somáticas (NIH-3T3) y germinales (GC-1 y GC-2) de ratón tras la eliminación de los MRE en *Rnf19a*.
- 2) Comparar la expresión de *Rnf19a* en células somáticas (NIH-3T3) y germinales (GC-1 y GC-2) de ratón tras la eliminación de los MRE en *Rnf19a*

6. METODOLOGÍA

6.1. OE 1 Determinar la expresión de la proteína Rnf19a en células somáticas (NIH-3T3) y germinales (GC-1 y GC-2) de ratón tras la eliminación de los MRE en *Rnf19a*.

6.1.1. Modelo experimental

Como modelo experimental se utilizaron líneas celulares establecidas, somáticas y germinales de ratón: GC1 (ATCC N°. CRL-2053, USA) que deriva de espermatogonias tipo B, GC2 (ATCC N°. CRL-2196, USA) que deriva de espermatoцитos pre-meióticos y NIH-3T3 (ATCC N°. CRL-1658, USA) que corresponde a fibroblastos de ratón. Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM High Glucose (Gibco, USA), suplementado con suero bovino fetal (Biological Industries, Israel) al 10% y antibióticos penicilina/estreptomina a 100 IU y 100 µg/mL (Mediatech Inc., USA). Las células fueron incubadas en estufa a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Los experimentos se realizaron en triplicado (49). No se realizó aleatorización ni enmascaramiento del investigador.

6.1.2. Edición genómica mediante CRISPR

- *Análisis in silico*

Para expresar el RNA guía, se diseñaron parejas de oligonucleótidos complementarias a la región de corte en el gen *Rnf19a* (Tabla 1). Para este propósito se utilizaron los sitios web *CHOP-CHOP* (<http://chopchop.cbu.uib.no>) (55), *miRCRISPR* (<http://mir-crispr.molbiol.ox.ac.uk/fulga/miR-CRISPR.cgi>) (56) y *CRISPOR* (<http://crispor.tefor.net/>) (57) que predicen los posibles sitios de corte en el gen y los cortes fuera de diana (off-target). De estos sitios web se seleccionaron dos parejas de oligonucleótidos, para eliminar una secuencia de DNA que abarcara ambos MRE (para miR-7013-5p y miR-7116-5p) (Figura 5). De la literatura se seleccionó una secuencia que actuará como control negativo, dirigida a una secuencia que no está presente en el genoma del ratón (58), y otra secuencia que actuará como control positivo, un gRNA previamente validado (59). Para comprobar la edición genómica, se diseñaron dos

parejas de primers que flanquearan el sitio teórico de corte utilizando el sitio web primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) (Figura 5). Los oligonucleótidos utilizados tanto del gRNA como de la PCR convencional se encuentran indicados en la Tabla 1.

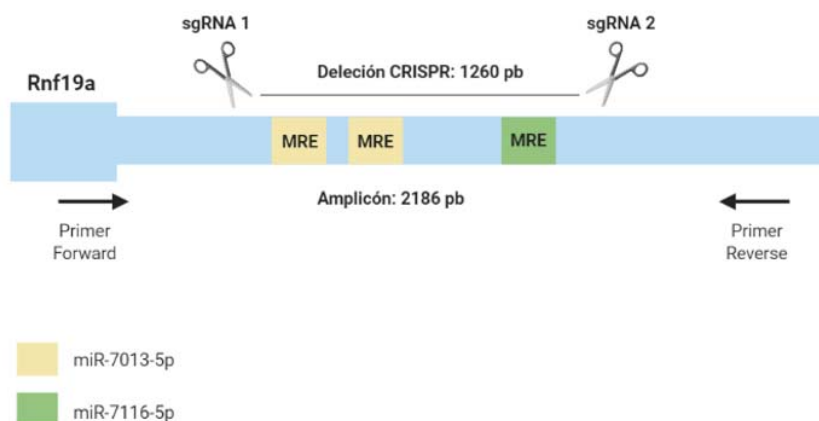


Figura 5: Esquema del diseño de los RNA guías (gRNA) y los oligonucleótidos para comprobar la edición genómica.

	Oligonucleótido Forward	Oligonucleótido Reverse
A) sgRNA 1 – Rnf19a	CACCGAACCACTGAACAACCGTGT	AAACACACGGTTGTTTCAGTGGTTC
B) sgRNA 2 – Rnf19a	CACCGGAAAACGACGGACGGCACA	AAACTGTGCCGTCCGTCGTTTTCC
C) sgRNA – Control positivo (pten)	CACCGCTGTAGTAATATCTGCTAT	AAACCGACATCATTATAGACGATA
D) sgRNA – Control negativo	CACCGCGAGGTATTCGGCTCCGCG	AAACCGCGGAGCCGAATACCTCGC
E) Oligonucleótido	GCTTGCCCGAAGGTAAATCC	CTTGGAGTGTTACTGGTAGAC

s Rnf19a		
F) Oligonucleótido s pten (Control positivo)	GTGATAGAACGGAAGTCTTGCT	TTGGTCCACAAAGAGGGAGG

Tabla 1: Tabla de oligonucleótidos. A y B son los oligonucleótidos usados para eliminar los sitios de unión a miRNA en la 3' UTR de Rnf91a, C y D son los oligonucleótidos usados como controles negativo y positivo, E y F son los oligonucleótidos usados para comprobar la edición genómica.

- Clonación

Las parejas de oligonucleótidos fueron hibridadas y clonadas en el plásmido eSpCas9 (1.1)-T2A-Puro (Addgene no. 101039) (Figura 6) (60) usando la enzima DNA ligasa T4 (New England Biolabs, USA), según indicaciones del proveedor.

El vector clonado fue transformado en bacterias *E. coli* XL1-Blue competentes, las que se hicieron crecer toda la noche a 37°C en placas de medio LB sólido suplementado con 50 µg/mL de ampicilina. Las bacterias transformantes se hicieron crecer en medio LB líquido, suplementado con 50 µg/ml de ampicilina, por toda la noche con agitación constante (250 r.p.m.). A partir del cultivo líquido se comprobó la presencia del inserto en el vector, mediante una PCR convencional utilizando la enzima *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (0,02 U/µL) (Promega, USA), su buffer correspondiente (1x), dNTPs (0,2 mM) y MgCl₂ (1,5 mM) (Promega, USA). Además, se usó un oligonucleótido reverse dirigido al promotor U6 del vector y el oligonucleótido forward contra uno de los oligonucleótidos usados para la clonación. El producto PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 0,5X. Comprobada la clonación, se extrajo el DNA plasmídico de las bacterias transformantes con el kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, USA). El plásmido fue cuantificado por espectrofotometría y almacenado a -20°C.

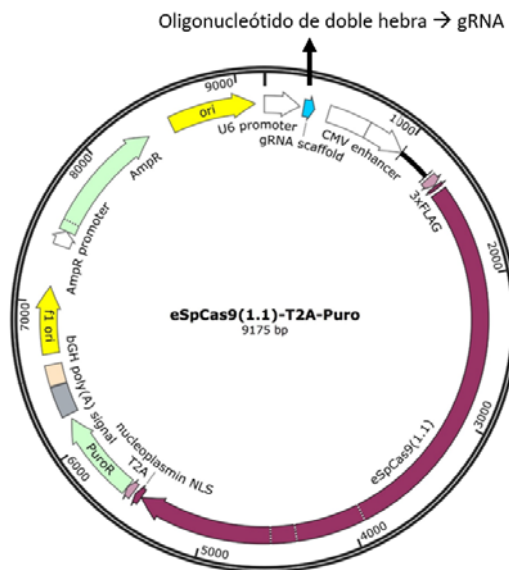


Figura 6: Plásmido eSpCas9 (1.1)-T2A-Puro. Se indica el sitio donde se clonaron los oligonucleótidos de doble hebra

- Transfección de líneas celulares

Las líneas celulares GC1 (ATCC N°. CRL-2053, USA), GC2 (ATCC N°. CRL-2196, USA) y NIH-3T3 (ATCC N°. CRL-1658, USA) se cultivaron en medio DMEM High Glucose (Gibco, USA), suplementado con suero bovino fetal (Biological Industries, USA) al 10% y antibióticos penicilina/estreptomicina (Mediatech Inc., USA) a 100 IU y 100 µg/mL, respectivamente. Las células fueron incubadas en estufa a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Los experimentos se realizaron en triplicado (49).

Cuando las células en cultivo alcanzaron un 70% de confluencia fueron transfectadas con el vector eSpCas9 (1.1)-T2A-Puro (Addgene no. 101039, USA), previamente clonado, utilizando Lipofectamine® 3000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA), según indicaciones del fabricante. Cada línea celular fue transfectada con: 1) dos plásmidos con las construcciones que buscan eliminar una secuencia que incluye los dos MRE (CRISPR doble), 2) un plásmido con la construcción que actúa de control negativo y 3) un plásmido con la construcción que actúa de control positivo.

Además, se incluyó un control negativo no transfectado. A las 48 horas post-transfección, el medio de cultivo fue reemplazado por medio DMEM High Glucose (Gibco, USA) con puromicina (Sigma-Aldrich, USA) para seleccionar las células transfectadas, a concentración de 3 µg/ml para la línea celular NIH-3T3 y de 4 µg/ml para las líneas celulares GC-1 y GC-2. La selección se realizó durante una semana cambiando el medio de cultivo (con antibiótico) día por medio. Transcurrido el tiempo de selección, se aislaron las células resistentes a la puromicina y se expandieron en placas de cultivo de 100 mm con DMEM High Glucose, para la posterior selección de las poblaciones monoclonales.

La selección de las poblaciones monoclonales se realizó por el método de dilución límite (Anexo 1). El cultivo celular en placa de 100 mm fue tripsinizado y el homogeneizado celular fue diluido en 10 ml de medio DMEM High Glucose condicionado para preparar una solución celular a una concentración de 5 células/ml. Luego se transfirieron 100 µl de esta solución a cada pocillo de una placa de 96-pocillos, de modo que cada pocillo fue sembrado a una densidad promedio de 0.5 células/pocillo. Las células fueron dejadas en el incubador por 7 días, a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, periodo tras el cual fueron observadas en el microscopio para evaluar el crecimiento de colonias. Cuando las colonias estuvieron lo suficientemente confluentes, se tripsinizaron y expandieron a una placa de cultivo de mayor tamaño para la extracción de DNA, proteínas y RNA.

6.1.3. Comprobación de la edición genómica

Se extrajo DNA genómico de las células GC-1, GC-2 y NIH-3T3 usando el kit E.Z.N.A. Tissue DNA Kit (Omega BIO-TEK Inc, USA). El DNA total purificado fue resuspendido en 30 µL de buffer de elución, cuantificado por espectrofotometría y almacenado a -20°C.

Para las colonias transfectadas con el CRISPR doble y control negativo, el método de comprobación de la edición genómica fue una PCR convencional. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 µl usando 500 µg de DNA genómico como molde. Para esto se utilizó la enzima *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (0,02 U/µL) (Promega, USA), su buffer correspondiente (1x), dNTPs (0,2 mM) y MgCl₂ (1,5 mM) (Promega,

USA) y H₂O-MQ. Además, se utilizaron oligonucleótidos forward y reverse (0,4 μM) que flanquean el sitio teórico de corte del CRISPR en la región 3'UTR del gen Rnf19a. Los tubos con las reacciones fueron colocados en un termociclador T100 (Biorad, USA) donde se programó el siguiente perfil térmico: 1) Desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, 2) desnaturalización a 95°C por 30 segundos, 3) Annealing a 51° para Rnf19a y 55°C para pten (control positivo) por 30 segundos, 4) Extensión a 72°C por 2 minutos y 5) Extensión final a 72°C por 5 minutos. Finalmente, el producto PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para las colonias no editadas se espera un amplicón de 2186 pb, mientras que en las colonias editadas se espera que este sea de aproximadamente 926 pb (Figura 7).

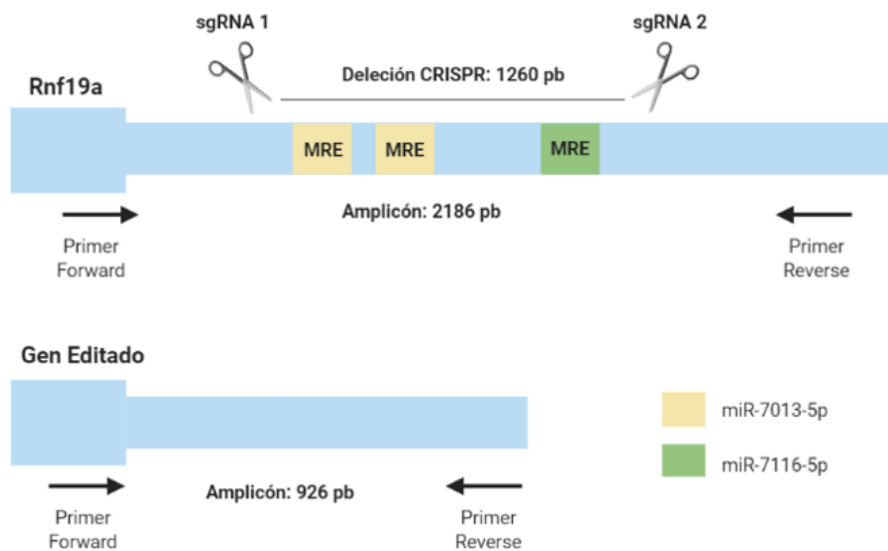


Figura 7: Esquema de la comprobación de la edición genómica.

En el caso de la construcción con control positivo, se realizó un ensayo de detección de corte con la enzima Endonucleasa 1 T7 (New England Biolabs, USA) (Anexo 2). Primero se realizó una PCR convencional con una pareja de oligonucleótidos dirigidos a la zona teórica de corte. El producto PCR fue desnaturalizado y re-hibridado para luego ser digerido con la enzima endonucleasa 1 T7 (New England Biolabs, USA). Esta enzima corta secuencias de nucleótidos que contienen regiones no complementarias (heterodúplex) producidas por la hibridación de regiones con mutaciones "indel" y

regiones intactas (Wild Type) (Figura 8). El producto digerido fue visualizado en un gel de agarosa al 2%. Los resultados fueron analizados con el programa ImageJ y expresados como % de indels. Para cada réplica se calculó la fracción de producto PCR digerido (F_{cut}) usando la siguiente fórmula: $F_{cut} = (b+c)/(a+b+c)$, donde a es el producto PCR no digerido y, b y c son la las intensidades de cada producto de digestión. El porcentaje de indels se estimó con la siguiente fórmula (61):

$$indel(\%) = 100 \times (1 - \sqrt{1 - F_{cut}})$$

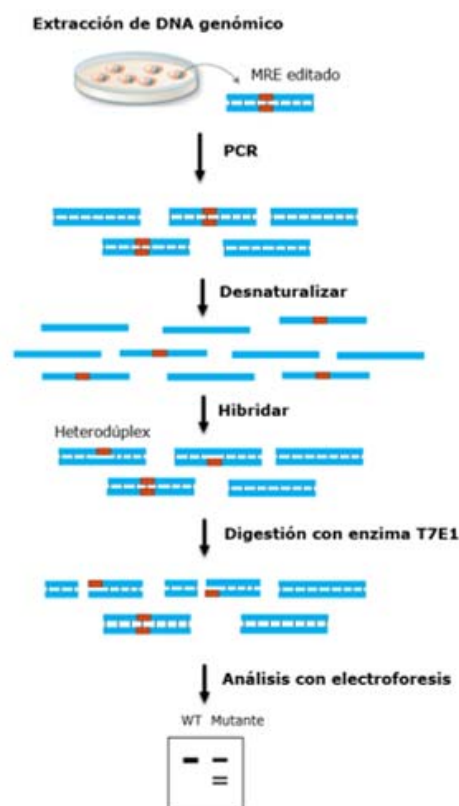


Figura 8: Ensayo de detección de corte con endonucleasa T7E1

6.1.4. RT-PCR

El RNA total de las muestras se obtuvo por extracción con 1 mL del reactivo TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, US) según las indicaciones del fabricante. El RNA purificado, fue resuspendido en 30 μ L de H₂O-DEPC estéril. Finalmente se cuantificó por fluorimetría

con el kit QuantiFluor® RNA System (Promega, USA) y se almacenó a -80°C.

Para eliminar trazas de gDNA presentes en la muestra, se trató el RNA con la enzima RQ1-DNA (0.2 U/ul) (Promega, USA), según indicaciones del fabricante. El producto final fue utilizado para la síntesis de cDNA. Para la retrotranscripción se utilizó la enzima transcriptasa reversa M-MLV (8 U/ul) y su buffer correspondiente (1X), random primers, RNAsin RNase Inhibitor (1,6 U/ul) y dNTP (2Mm) (Promega, USA) según el protocolo sugerido por el fabricante. En paralelo se realizó un control negativo de la transcripción reversa (RT-). El cDNA fue almacenado a -80°C hasta su análisis por PCR en tiempo real.

Para evaluar cambios en la expresión del mRNA de *Rnf19a*, el cDNA fue analizado por PCR en tiempo real. Los ensayos de qPCR se realizaron con el kit Takyon™ Low ROX Probe Master Mix dTTP blue (Eurogentec S.A., Bélgica. Se utilizaron sondas Taqman (5 µM) y oligonucleótidos (10 µM) específicos para *Rnf19a* (Tabla 2), en un volumen final de 30 ul. Como genes normalizadores se utilizaron *S16*. Se incluyeron un control negativo del qPCR (NTC), el control negativo de la retrotranscripción (RT(-)) y un control positivo (cDNA de testículo). Las reacciones fueron colocadas en el sistema de detección CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad, USA). El perfil térmico de la reacción incluyó 40 ciclos con tres pasos: 1) Activación a 95°C por 3 minutos, 2) Desnaturalización a 95°C por 15 segundos y 3) Annealing/Extensión a 60°C por 60 segundos.

Para el cálculo de la expresión relativa de *Rnf19a* se utilizó el método del Livak K & Schmittgen ($\Delta\Delta Ct$) (62), considerando la normalización con *S16*. Para ello se aplicó la siguiente fórmula:

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde,

R=Expresión relativa

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ Tratamiento - ΔCt Control

$\Delta Ct = Ct$ Gen estudio - Ct gen de referencia

	Secuencia
Oligonucleótido Forward (<i>Rnf19a</i>)	GCAAGTGGATATTGAGTCAA

Oligonucleótido Reverse (Rnf19a)	GATGACAGTGGTGCTACC
Oligonucleótido Forward (S16)	GCCCTGGTAGCTTATTAC
Oligonucleótido Reverse (S16)	GATCGTATTGGATGAGGATA
Sonda Taqman (Rnf19a)	ACAACAGTGGAAGCAGCAGT
Sonda Taqman (S16)	TCCTTCTTGGAGGCTTCATCC

Tabla 2: Tabla de oligonucleótidos y sonda Taqman para el qPCR de Rnf19a.

6.2. OE2 Analizar entre sí las variaciones de los niveles de Rnf19a obtenidas en cada uno de los OE anteriores.

Análisis estadístico

Para comparar los datos obtenidos del qPCR se realizó un análisis estadístico con el programa Statistica. Al no cumplirse el supuesto de normalidad, se utilizó la prueba de U Mann-Whitney, prueba de contraste no paramétrica para dos muestras independientes, estableciendo una probabilidad p menor o igual a 0.05 ($p < 0.05$) como criterio de significancia estadística. Los datos fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar (DE).

7. RESULTADOS

7.1. OE1 Determinar la expresión de la proteína Rnf19a en células somáticas (NIH-3T3) y germinales (GC-1 y GC-2) de ratón tras la eliminación del MRE en *Rnf19a*.

7.1.1. Edición genómica

Las líneas celulares fueron co-transfectadas con dos construcciones CRISPR con el fin de cortar un segmento de DNA que incluyera los sitios de unión a los miRNAs en estudio (miR-7013-5p y miR-7116-5p). También se transfectó un control negativo (NEG) y un control positivo (POST). Para comprobar la edición genómica, se extrajo DNA de las colonias monoclonales y se realizó una PCR convencional con oligonucleótidos que flanquean el sitio teórico de corte. Luego, el producto PCR fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

En el caso de la línea celular NIH-3T3, la PCR de las células no transfectadas (WT) dio una banda de amplificación del tamaño esperado de 2 kb. Por su parte en las células co-transfectadas con la construcción CRISPR, se observaron bandas de 2 kb (colonias 2-4, 2-6, 3-1, 3-4 y 3-6) y en otros casos había dos bandas de 2 y 1 kb, respectivamente (colonias 2-1 y 2-5). Finalmente, se observaron bandas de aproximadamente 1 kb (colonias 1-1, 1-5, 2-3, 3-3, 3-5 y 3-7) (Figura 9). Las primeras bandas (2 kb) corresponden a colonias que no fueron editadas. Las colonias que presentan doble banda son aquellas en las que un solo cromosoma fue editado, y finalmente, las que presentan una sola banda de 1 kb corresponden a colonias en que ambos cromosomas fueron editados con el vector CRISPR-Cas9.

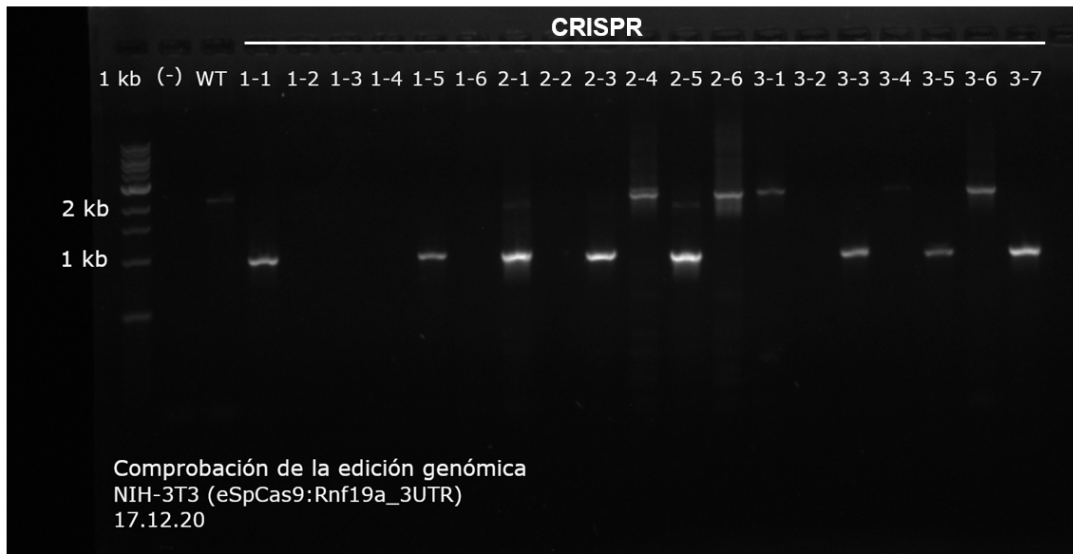


Figura 9: Comprobación de la edición genómica en línea celular NIH-3T3. (-): Control negativo PCR, WT: Wild type, NEG: Control negativo, CRISPR: Transfección contra sitios de unión a miRNA en Rnf19a

Para la línea celular GC-1 la visualización de la PCR de las células WT mostró un amplicón de 2 kb. Por su parte en las células co-transfectadas con las construcciones CRISPR, se visualizaron bandas de 2 kb (colonias 1-4 y 2-7), otras colonias presentaron dos bandas de 2 y 1 kb (colonias 1-6 y 2-1) y, finalmente, se observaron bandas de aproximadamente 1 kb (colonias 1-1, 1-5, 2-4 y 2-6) que corresponden a colonias editadas (Figura 10).

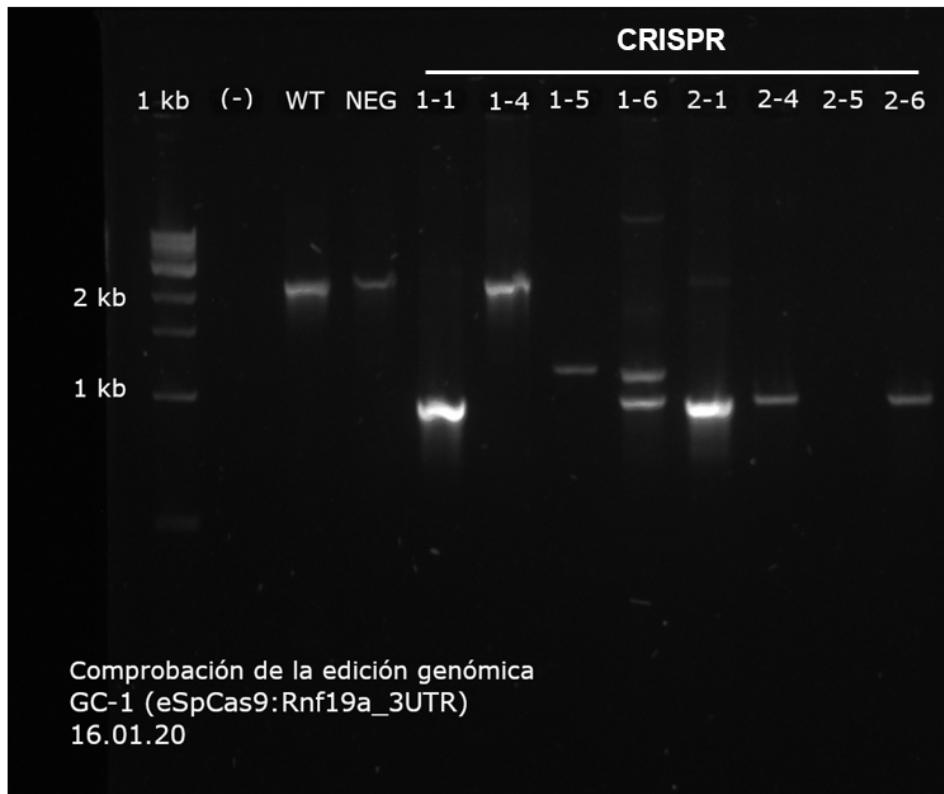


Figura 10: Comprobación de la edición genómica en línea celular GC-1. (-): Control negativo PCR, WT: Wild type, NEG: Control negativo Crispr, CRISPR: Transfección contra sitios de unión a miRNA en Rnf19a

En el caso de la línea celular GC-2, de la visualización del producto PCR en el gel de agarosa se observó que las células WT muestran un amplicón de 2 kb. Por su parte, en las colonias transfectadas con el vector CRISPR, se obtuvieron bandas de 2 kb (colonias 2-7, 2-8, 2-14, 2-19, 2-20 y 2-22) y otras bandas de 1 kb (colonias 1-2, 1-5 y 1-6) (Figura 11). Estas bandas corresponden a colonias que fueron editadas.

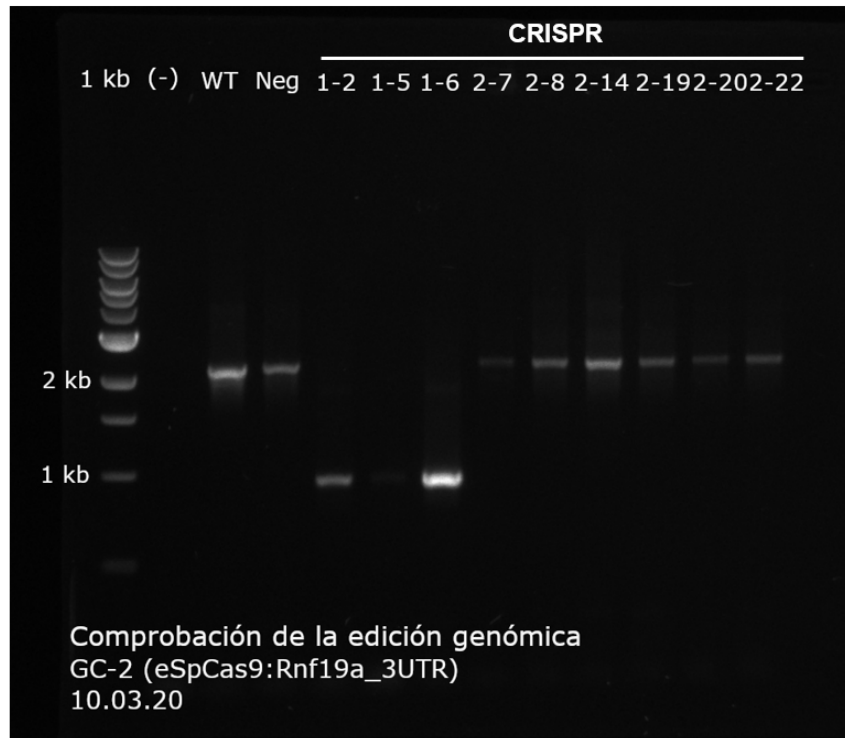


Figura 11: Comprobación de la edición genómica en línea celular GC-2. (-): Control negativo PCR, WT: Wild type, NEG: Control negativo Crispr, CRISPR: Transfección contra sitios de unión a miRNA en Rnf19a

Las tres líneas celulares fueron transfectadas con un control negativo, contra una secuencia que no está presente en el genoma del ratón. La visualización del producto PCR de las células transfectadas con el control negativo muestra un amplicón de 2 kb, mismo tamaño de banda que presentan las células WT, demostrando que no hubo edición genómica con esta construcción (Figura 12).

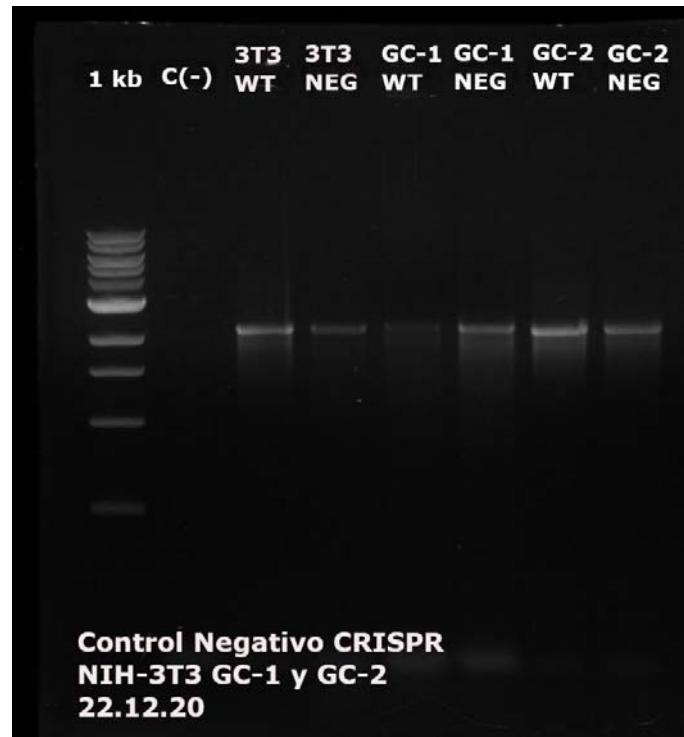


Figura 12: Comprobación de la edición genómica en líneas celulares NIH-3T3, GC-1 y GC-2 transfectadas con el control negativo.

Además de las construcciones contra los sitios de unión a miRNA, las tres líneas celulares fueron transfectadas con una construcción contra *Pten*, previamente validada, que se utilizó como control positivo para validar la técnica CRISPR. Esta construcción que se encontró en la literatura, se esperaba que se presentara edición genómica. Para comprobar la edición de los controles positivos, se realizó una PCR convencional con primers que flanquean el sitio teórico de corte en la secuencia de *pten* y, luego, el producto PCR purificado fue digerido con la enzima Endonucleasa I T7 (T7E1). Esta enzima corta secuencias de nucleótidos que contienen regiones no complementarias (heterodúplex) producidas por la hibridación de regiones con mutaciones "indel" y regiones intactas (Wild Type). Finalmente, el producto de la digestión enzimática fue visualizado en un gel de agarosa al 2%. Para las tres líneas celulares, en las células WT se obtuvo un solo amplicón del tamaño esperado. Mientras que en las células transfectadas con el control positivo se obtuvo la banda WT y, a su vez, dos bandas de menor tamaño que corresponden a los fragmentos digeridos con la enzima T7E1 (Figura

13). Además, se calculó el porcentaje de indels utilizando la fórmula $\% \text{indel} = 100 \times (1 - \sqrt{1 - F_{\text{cut}}})$, donde F_{cut} corresponde a una razón entre la intensidad de banda del producto digerido con la intensidad total de las bandas (producto digerido y no digerido). El producto digerido corresponde a alelos mutados, mientras que el producto no digerido corresponde al alelo wild type. Para NIH-3T3 se obtuvo un valor de 32,18%, para GC-1 de 52,96% y para GC-2 de 24,96% (Tabla 3).

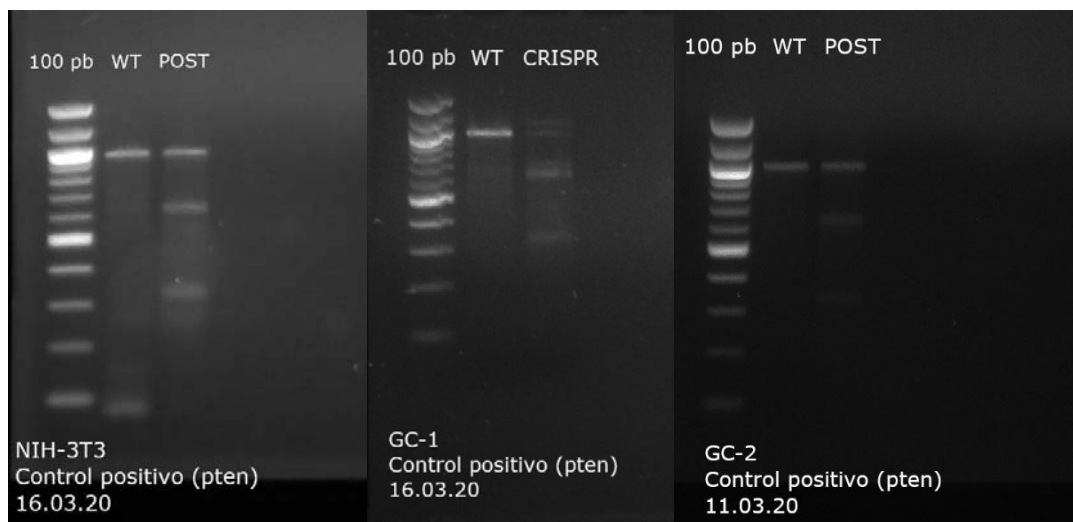


Figura 13: Comprobación de la edición genómica en líneas celulares NIH- 3T3, GC-1 y GC-2 transfectadas con el control positivo.

	NIH-3T3	GC-1	GC-2
F_{cut}	0,54	0,78	0,49
% indel	32,18	52,96	24,96

Tabla 3: Porcentaje de indels de células transfectadas con el control positivo.

7.1.2. Expresión relativa de *Rnf19a* en líneas celulares NIH-3T3, GC-1 y GC-2

Se analizó mediante RT-qPCR la expresión relativa del *Rnf19a* en las tres líneas celulares

wild type (controles WT) y en las colonias editadas.

Para NIH-3T3 se observó una disminución en los niveles de transcrito de las colonias con la región 3'-UTR mutada (Mut) respecto de las células con la 3'-UTR wild type (WT) (Figura 14). En el caso de la línea celular GC-1, se observó una diferencia en la expresión de *Rnf19a* entre las colonias editadas (Mut) y el control WT (Figura 15). Finalmente, para GC-2 se observaron diferencias en la expresión de *Rnf19a* entre el control (WT) y las colonias editadas (Mut) (Figura 16).

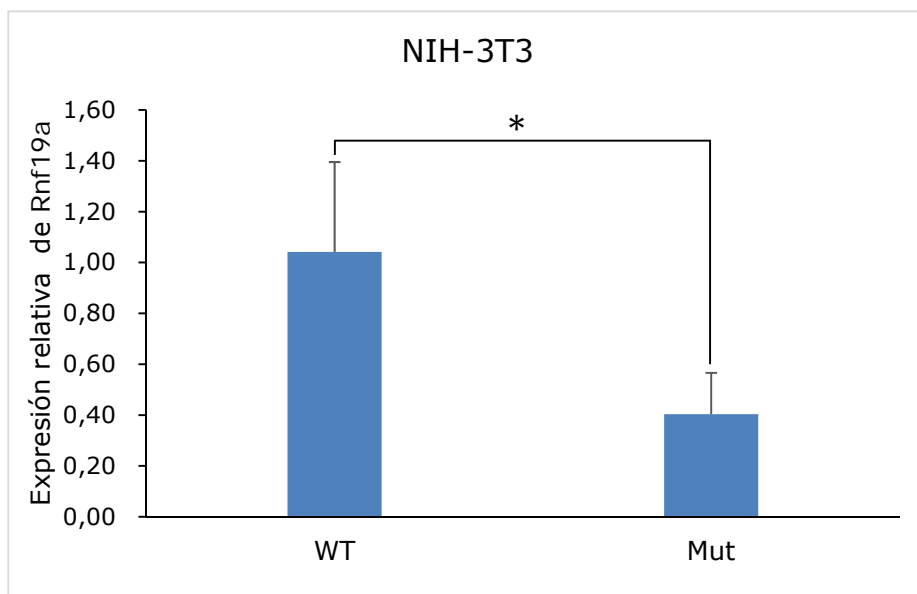


Figura 14: Expresión relativa de *Rnf19a* en línea celular NIH-3T3 wild type y editada por CRISPR-Cas9 (n=5). WT: 3'-UTR Wild Type, Mut: 3'-UTR mutada. Los resultados se expresaron como el promedio \pm DE. (*) indica un valor $p < 0.05$.

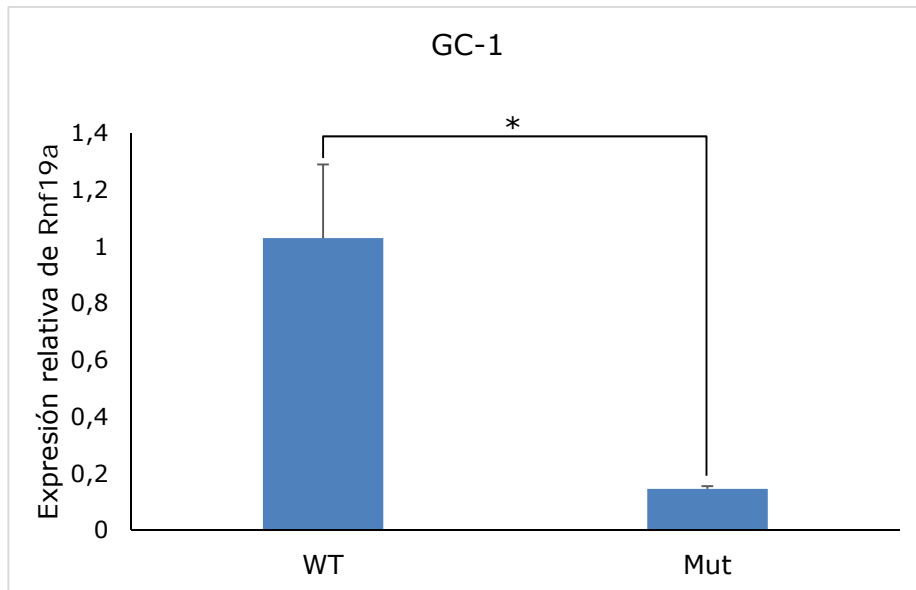


Figura 15: Expresión relativa de *Rnf19a* en la línea celular GC-1 wild type y editada por CRISPR-Cas9 (n=6). WT: 3'-UTR Wild Type, Mut: 3'-UTR mutada. Los resultados se expresaron como el promedio \pm DE. (*) indica una $p < 0.05$.

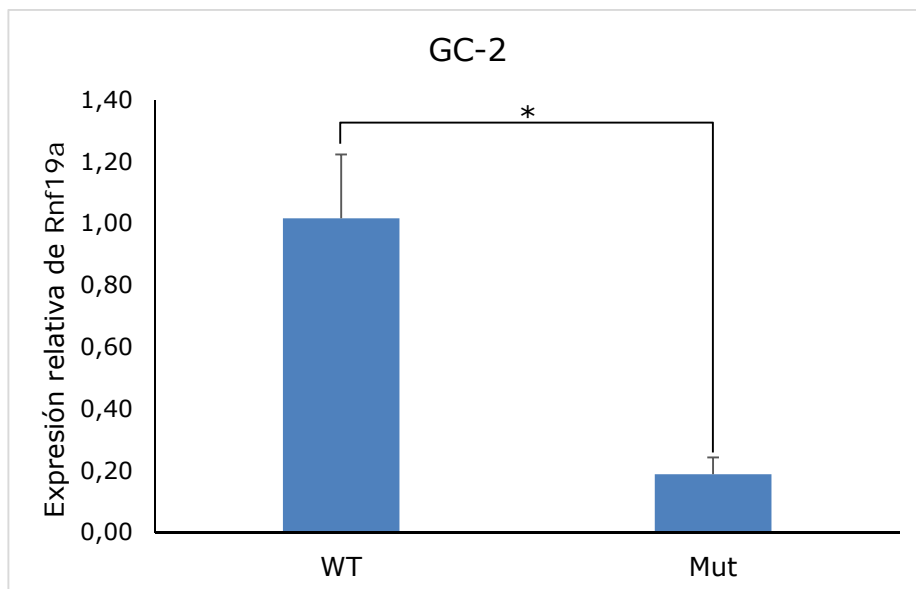


Figura 16: Expresión relativa de *Rnf19a* en la línea celular GC-2 wild type y editada por CRISPR-Cas9 (n=6). WT: 3'-UTR Wild Type, Mut: 3'-UTR mutada. Los resultados se expresaron como el promedio \pm DE. (*) indica una $p < 0.05$.

7.2. OE2: Analizar entre sí las variaciones de los niveles de Rnf19a obtenidas en cada uno de los OE anteriores.

En la línea celular NIH-3T3, se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de las colonias con la región 3'-UTR mutada respecto de las células con la 3'-UTR wild type (Figura 14). En la línea celular GC-1, se evidenció una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la expresión de *Rnf19a* entre las colonias editadas (Mut) y el control WT (Figura 15). Finalmente, en la línea celular GC-2 se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la expresión de Rnf19a en las colonias editadas (Mut) (Figura 16). Estos resultados muestran que la edición de la región 3'-UTR tuvo un efecto en la expresión de Rnf19a en las tres líneas celulares. Estos cambios en las células mutadas significan una disminución respecto de las WT de un 61,54% para NIH-3T3, de un 85,44% para GC-1 y de un 81,38% para GC-2 (Figura 14-16).

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió un posible mecanismo regulador de miR-7013-5p y miR-7116-5p en la expresión de *Rnf19a* en líneas celulares somáticas (NIH-3T3) y germinales (GC-1 y GC-2). Para ello, las líneas celulares fueron editadas mediante CRISPR eliminando un segmento de 1.2 kb del gen que contenía los sitios de unión a los miRNAs mencionados. Posteriormente, se comprobó la edición genómica por PCR convencional y se evaluaron cambios en la expresión de *Rnf19a* por RT-qPCR.

En estudios previos, se identificaron diversos MREs a los que podrían unirse miRNAs en las regiones 3' UTR de *Rnf19a* y sus tres pseudogenes. De ellos, los MRE para miR-7013-5p, miR-7116-5p y miR-6373 serían comunes a los cuatro transcritos. Con ensayos con un gen reportero EGFP, se observó que la presencia de las regiones 3'UTR de *Rnf19a* y *Rnf19aTTPg3* disminuyen los niveles de expresión del reportero en las líneas celulares NIH-3T3, GC-1 y GC-2, reestableciéndose los niveles al agregar/incluir anti-miRs sintéticos específicos al sistema. Estos resultados indican un posible mecanismo regulador ejercido por estos miRNAs (43). Sin embargo, al usar enfoques convencionales como este, que buscan bloquear la unión del miRNA al mRNA con el uso de anti-miR sintéticos, hay que tener ciertas consideraciones. Los miRNAs forman parte de complejas redes de regulación donde un miRNA puede tener varias dianas de mRNA y, a su vez, un mRNA puede tener múltiples sitios de unión a miRNAs. Como resultado, discriminar la funcionalidad de una miRNA sobre un mRNA específico se ha convertido en un desafío a la hora de estudiar la regulación génica mediada por miRNAs. Por tanto, con los enfoques convencionales puede ser difícil descifrar que red de regulación se verá alterada, si la que involucra al gen de interés u otra diana. Es por ello que estudios recientes se han enfocado en el uso de herramientas de edición genómica como los sistemas TALEN o CRISPR-Cas9. Ambas metodologías buscan mutar uno o varios MRE solo en la secuencia del gen de interés. De esta forma, el efecto observado sería solo por la alteración de la unión del miRNA a la diana de estudio y no a otras (13,19).

Es en base a estos antecedentes que en el presente trabajo se buscó estudiar una interacción directa entre el gen *Rnf19a* y los miRNAs mencionados en líneas celulares somáticas (NIH-3T3) y germinales (GC-1 y GC-2). Considerando que anteriormente se

usó un gen reportero y no el gen *Rnf19a*, con las limitaciones que tiene esta metodología. Para ello, las líneas celulares fueron co-transfectadas con dos plásmidos eSpCas9 dirigidos contra secuencias que flanquean los MRE para los miRNAs en estudio. De esta forma se logró eliminar un segmento de 1.2 kb de la región 3'UTR de *Rnf19a* que contenía los sitios de unión a miR-7013-5p y miR-7116-5p. Enfoques similares han sido utilizados por distintos investigadores para estudiar la función de los miRNAs en el contexto celular (49–51). Chen y colaboradores eliminaron una región de 3.77 kb de la región 3'-UTR de *FIH1* logrando eliminar la mayoría de los MRE predichos, en una línea celular derivada de NSCLC (Cáncer de pulmón de células no pequeñas) (51). Por su parte, Ecsedi y colaboradores utilizaron CRISPR-Cas9 para remover aproximadamente 450 pb de la 3'-UTR del gen *lin-41*, en el modelo *C. elegans*, que incluían dos MRE predichos para el miRNA *let-7* (50). Basset y colaboradores eliminaron, por medio de TALEN y CRISPR-Cas9, el MRE para el miRNA Bantam (*ban*) en el gen *enable (ena)* en un modelo de Zebrafish y *Drosophila*, respectivamente (49). En nuestro caso optamos por eliminar un segmento de 1.2 kb de la 3'-UTR que abarcara los miRNAs en estudio porque no se pudieron diseñar gRNAs dirigidos a los MRE específicos, que presentaran una alta eficiencia y cumplieran con los estrictos criterios de diseño necesarios para el vector eSpCas9 (1.1)-T2A-Puro (Addgene no. 101039, USA).

eSpCas9 es un enzima Cas9 modificada por ingeniería genética. Dicha modificación hace que su actividad endonucleasa sea más eficiente reduciendo el efecto off-target, es decir, el corte fuera de diana (60–63). Como se reduce el efecto off-target, el gRNA no debe presentar mismatches (bases no apareadas) con la región diana lo que sí es permitido con la SpCas9 wild type. A su vez, el gRNA debe comenzar con una guanina en el extremo 5' porque el vector eSpCas9 (1.1)-T2A-Puro tiene un promotor U6 que requiere este como primer nucleótido para la transcripción (63). Dichos criterios sumados a la necesidad de contener un 40-60% de CG en su secuencia dificulta (64) el diseño de gRNAs dirigidos específicamente a los MREs en estudio. Por ello, optamos por eliminar una secuencia más extensa que eliminara todos los MRE en estudio.

Se ha descrito que la tasa de edición con CRISPR es variable obteniéndose una mezcla de alelos WT, editados y heterocigotos, no siendo posible generar células genéticamente uniformes a menos que haya selección clonal (65). En el caso de las células transfectadas

con las construcciones contra la 3'-UTR de *Rnf19a* se optó por realizar selección clonal, mediante dilución límite, obteniéndose colonias con copias editadas del gen (3'-UTR mutada), colonias que no fueron editadas (3'-UTR WT) y colonias heterocigotas, con una copia mutada y otra WT para las tres líneas celulares editadas. Esta comprobación se realizó por PCR convencional ya que se esperaba que el corte generado por la enzima eSpCas9 fuese lo suficientemente extenso para observar una diferencia en el tamaño del amplicón entre las células WT y los clones editados. Para los controles sin editar (WT) se observó un amplicón de aproximadamente 2 kb, mientras que en las colonias editadas el tamaño del amplicón fue cercano a 1 kb. Al observar esta diferencia de 1 kb entre ambos amplicones, fuimos capaces de comprobar que hubo una eliminación en la región 3'-UTR de las células editadas. Por su parte, los controles negativos no presentaron diferencias en el tamaño de amplicón con el control wild type. Las muestras que presentan la banda de 2 kb corresponden a las células que fueron transfectadas con el plásmido eSpCas9, por tanto presentaron resistencia a la selección con puromicina, pero no fueron editadas en ambos sitios. Cabe mencionar que independiente de si las células internalizan el plásmido, la expresión de Cas9 puede variar de célula a célula y entre líneas celulares. Si bien en la mayoría de las células se puede lograr la edición genómica con CRISPR-Cas9, algunos tipos celulares presentan una baja o nula actividad de Cas9 incluso si esta enzima está altamente expresada (65). Esto explicaría porque a pesar de obtener un número importante de colonias resistentes a puromicina no todas presentaron copias editadas del gen. Por su parte las colonias heterocigotas o mutantes corresponden a células que fueron transfectadas con el plásmido, donde una o ambas copias del gen fueron editadas. Para algunas colonias no se obtuvo amplificación porque, como se comprobó posteriormente, el DNA se degradó durante la extracción (Figura 9-10).

En el caso de los controles positivos, la edición genómica se comprobó por digestión enzimática con la endonucleasa T7, obteniéndose fragmentos digeridos que corresponden a alelos editados. Al calcular la eficiencia de edición (frecuencia de edición) se obtuvieron valores en un rango de 24-53%. Estos valores entregan una evidencia semi cuantitativa del número de alelos mutados en las muestras (66), mientras mayor sea el porcentaje de indels mayor sería la tasa de edición. Este valor solo da una idea de la frecuencia de edición genómica, no tiene relación con el efecto que dicha edición

tenga en la expresión génica. Previamente se han reportado eficiencias máximas de edición entre 37-80% (67-69). Nuevamente, la variabilidad en la expresión de Cas9 explica porque varía el % de indels (frecuencia de edición) del control positivo en los distintos tipos celulares (65). Hay trabajos que corroboran que al usar un mismo gRNA en distintos tipos celulares se obtienen % indel variables, independiente del método de transfección utilizado (69,70). Yu y colaboradores observaron que utilizando el mismo gRNA y el mismo reactivo de transfección, el % de indels para la línea celular HEK293T era cercano al 50%, para A549 era cercano al 40% y para MCF-7 era de aproximadamente 20% (69), demostrando que la frecuencia de edición puede variar considerablemente entre distintos tipos celulares.

Se sabe que la región 3'-UTR tiene una función importante en la regulación post-transcripcional. Ya en 1995, Schwartz y colaboradores describieron que la eliminación de la región 3'-UTR causaba un cambio en la expresión del mRNA del neurofilamento de cadena ligera (NF-L) en la línea celular P-19 derivada de carcinoma embrional de ratón. Observaron una estabilización y aumento de los niveles de dicho mRNA (71). Por su parte, Chen y colaboradores eliminaron una secuencia de 3.2 kb de la región 3'-UTR de FIH1 que incluía todos MRE predichos, lo que causó un aumento en la expresión de la proteína FIH1 (51). Está descrito que hay diversos elementos contenidos en la regiones no codificantes, especialmente la 3'-UTR, que regulan la estabilidad del RNA. Por nuestra parte, los experimentos con el gen reportero EGFP mostraron que la presencia de la 3'-UTR de *Rnf19a*, que contiene los sitios de unión a miR-7013-50, miR-7116 y miR-6376, causa una disminución en la expresión de EGFP. Al inhibir la unión de miR-7013-5p y miR-7116-5p con antimicroRNAs se restituyeron los niveles de expresión de EGFP. Estos resultados apuntan a que son las secuencias reguladoras contenidas en la región 3'-UTR de *Rnf19a* las que causan una disminución en la expresión génica de EGFP (43). Basados en estos antecedentes, esperábamos que al eliminar la región 3'-UTR del gen *Rnf19a* se observará un aumento en los niveles de expresión de *Rnf19a*, a nivel de mRNA y proteína. Contrario a lo esperado, se observó una disminución en la expresión relativa del mRNA de *Rnf19a* en las colonias con la 3'-UTR en las tres líneas celulares en estudio. Estos resultados muestran una disparidad respecto de los datos obtenidos en los experimentos con el gen reportero EGFP. Se observó una aparente variación en la expresión relativa de *Rnf19a* en las colonias mutadas de las distintas líneas celulares, siendo los valores mayores en NIH-3T3 respecto de GC-1 y GC-2. Al

respecto podemos descartar que se trate de una diferencia en la eficiencia de edición en las diferentes líneas ya que para todas se realizó selección clonal y las muestras corresponden a células con ambas copias editadas del gen. Al comparar la expresión de *Rnf19a* en los mutantes de la línea somática versus las líneas germinales no se observaron diferencias significativas, por lo que podemos concluir que en todas las líneas celulares el efecto de eliminación de la región 3'-UTR se *Rnf91a* es similar (Figura 17). Las diferencias en la disminución de la expresión de *Rnf19a* en las distintas células se deben a las diferencias de expresión de *Rnf91a* en las células no editadas (condiciones basales) y no al mecanismo de edición como se ve en la figura 17.

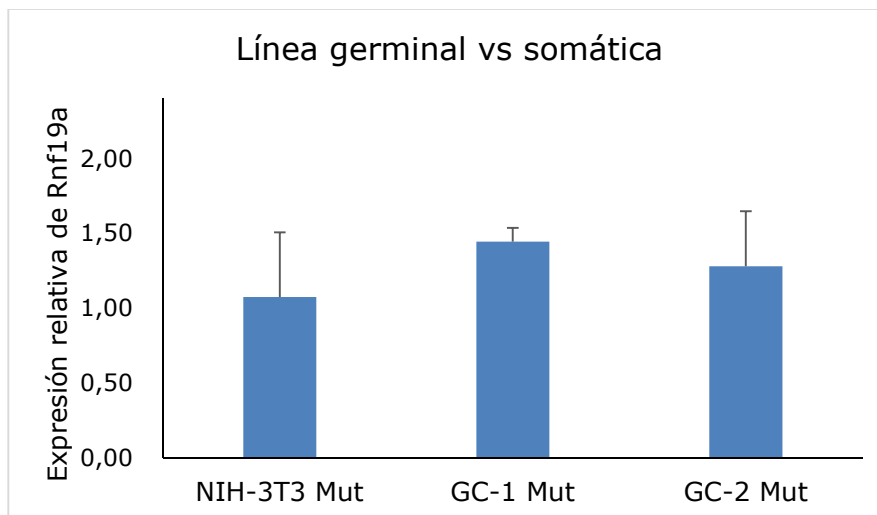


Figura 17: Expresión relativa de *Rnf19a* en la línea celular somática versus germinales editadas por CRISPR-Cas9. Mut: 3'-UTR mutada. Los resultados se expresaron como el promedio \pm DE.

Si bien los resultados obtenidos son distintos a los esperados, algunos autores ya han descrito una disminución en el mRNA tras la eliminación de la 3'-UTR. Zhao JP y colaboradores eliminaron la 3'-UTR de distintos genes en *Yersenia Pestis* observando que en algunos genes la eliminación de esta región causaba un aumento significativo en la expresión del mRNA, mientras que para otros genes (*y2237*, *y1288*, and *nadB*) la eliminación de la 3'-UTR generaba una leve disminución del transcrito. Los autores

asociaron esas diferencias al contenido de elementos ricos en adenilato-uridilato (AREs por su sigla en inglés) que están asociados a la estabilidad del mRNA. Una mayor cantidad de estos elementos desestabiliza el mRNA, por lo que al eliminarlos se revierte este efecto y se obtiene un aumento en los niveles del transcrito, caso contrario ese aumento no ocurre o no es tan evidente (72). Por su parte Zhao W y colaboradores estudiaron el rol de la región 3'-UTR en la expresión de nueve quimiocinas. Con ensayos reporteros observaron que la presencia de estas regiones causaba una disminución en la expresión del gen reportero EGFP, demostrando que todas tenían un efecto inhibitorio en la expresión génica en ese contexto, efecto asociado a la desestabilización del mRNA de EGFP. Posteriormente eliminaron, mediante CRISPR-Cas9, la región 3'-UTR de las nueve quimiocinas para evaluar el efecto que tenía esta secuencia en la expresión génica. Observaron que para seis quimiocinas aumentaba la expresión del mRNA cuando la 3'-UTR estaba mutada, pero para las quimiocinas CXCL1, CXCL6 y CXCL8 se observaba una disminución en la expresión del transcrito, un efecto opuesto al esperado según el ensayo reportero. Así demostraron que la disminución de los mRNA se relacionaba con una disminución de la transcripción de dichos genes, sugiriendo que la región 3'-UTR tendría roles simultáneos promoviendo la transcripción y la degradación del mRNA. Siendo esta dualidad beneficiosa como respuesta a cambios ambientales abruptos (73). En la literatura hay descrito al menos un elemento regulador que actuaría tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (74).

Si bien hay antecedentes en la literatura de una disminución de la expresión del mRNA cuando está alterada la 3'-UTR, sólo con los datos de la expresión relativa no podemos asegurar que nuestros resultados sean debido a una disminución de la transcripción o a que se vea afectada la estabilidad del mRNA (se transcribe igual pero se degrada más rápido). El diseño de los gRNAs se hizo de tal forma de no comprometer la señal de polyA. Uno de los gRNAs se uniría a 132 pb en dirección 5' de la señal del polyA (AATTAAA), por lo general las mutaciones de inserción/delección (indel) resultantes de la reparación por NHEJ son pequeñas (usualmente no superan las 50 pb) (75-78). Aun así no podemos descartar que se haya visto afectada la señal de polyA o algunas de las secuencias auxiliares de la poliadenilación durante la reparación y, por tanto, se haya comprometido el término de la transcripción de *Rnf19a*. Tampoco podemos descartar la presencia de algún "enhancer" presente en la región 3'-UTR cuya delección afecte la transcripción de

Rnf19a. Previamente, se ha descrito la presencia de este tipo de secuencias, que aumentan la transcripción del gen al que están asociados, en la región 3'-UTR de algunos genes (79,80). Para confirmar este último punto se necesitan otro tipo de experimentos como un ensayo reportero (enhacer reporter assay).

Estos antecedentes nos llevan a concluir que la mejor manera de estudiar la regulación por microRNAs es dirigirse específicamente a los MREs, evitando afectar regiones extensas de la 3'-UTR. De esta forma se lograría observar un efecto específico del miRNA sobre su sitio de unión en el mRNA, eliminando otras variables que enmascaran dicha interacción y los cambios imprevistos al eliminar la región 3'-UTR. En este contexto, Basset y colaboradores eliminaron específicamente el MRE para el microRNA Bantam (*ban*) en el gen *enable* (*ena*) en un modelo de *Drosophila*, mediante CRISPR-Cas9. A diferencia del control wild type, las moscas que tenían la 3'-UTR de *ena* mutada no presentaban una reducción en la expresión de la proteína Ena, demostrando que el miRNA Ban puede unirse al MRE predicho en la 3'-UTR de *ena*. A su vez, validaron este tipo de metodología en el estudio de la interacción miRNA-MRE y demostraron su utilidad para estudiar las consecuencias fenotípicas que resultan del bloqueo de la unión miRNA y su diana en un modelo *in vivo* (49). En nuestro caso no fue viable repetir los experimentos dirigiéndonos específicamente a los sitios de unión a miRNA en el gen *Rnf19a* ya que hacerlo implicaba adquirir un plásmido CRISPR distinto, gRNA y primers distintos y la repetición de toda metodología desde cero.

Si bien nuestro objetivo inicial era evaluar, mediante Western blot, el cambio en la expresión de la proteína Rnf19a en los mutantes, esto no fue posible por inconvenientes con el anticuerpo primario ajenos a nuestro grupo. Durante la estandarización de la técnica en nuestro laboratorio se utilizaron dos anticuerpos primarios anti-Rnf19a (Cat. N° PA5-39154, Invitrogen y Cat. N° SAB2102025, Sigma Aldrich), ambos recomendados por los fabricantes para su uso en Western Blot y con reactividad contra la especie utilizada (ratón). Se probaron distintas concentraciones de los anticuerpos primarios (1:100-1:000), bloqueos con BSA y leche al 5%, distintos porcentajes del gel de acrilamida (8 y 10%) pero en ningún caso se logró identificar la proteína Rnf19a con el peso molecular indicado por los fabricantes (90 kDa), aun cuando sí obtuvimos una señal específica con el normalizador (anticuerpo anti- β -actina, Thermo Fisher Scientific, #MA1-

744) en las mismas condiciones. Utilizamos membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45 μm que debería ser apropiada para los pesos moleculares que analizamos. De todas formas, se comprobó la transferencia de proteínas tiñendo la membrana con Rojo Ponceau confirmándose la presencia de proteínas de alto peso molecular. Cabe destacar que las pruebas se hicieron utilizando proteínas extraídas de líneas celulares GC-1, GC-2 y NIH-3T3 wild type, además de un control positivo que corresponde a cerebro de ratón, tejido en el que está descrita la expresión de la proteína Rnf19a (36). Además, se intentó evaluar el anticuerpo por inmunofluorescencia, pero tampoco se obtuvo señal por esta técnica. Si bien no podemos concluir por qué fallaron los anticuerpos contra Rnf19a, al menos podemos descartar que se haya degradado la muestra o problemas con la técnica en general, ya que con el normalizador si se obtuvo señal en las mismas muestras bajo las mismas condiciones.

9. CONCLUSIONES

La edición genómica de la 3'-UTR de *Rfn19a* en células somáticas y germinales causó una disminución estadísticamente significativa en la expresión del mRNA de *Rnf19a*.

El efecto de la eliminación de la región 3'-UTR es similar en las tres líneas celulares en estudio (NIH-3T3, GC-1 y GC-2). No hay diferencias de edición que se relacionen con el tipo de línea celular.

La mejor forma de estudiar el rol de los miRNAs es eliminar específicamente los sitios de unión a miRNA (MREs) en la región 3'-UTR del gen de interés.

10. PROYECCIONES

Estudiar las secuencias de la región 3'-UTR para ver qué papel tienen en regulación a nivel transcripcional y post-transcripcional.

Analizar si hay disminución de la transcripción o degradación tras la edición genómica mediante experimentos tipo "Nuclear Run-On" o marcaje metabólico con 4 tiouridina (4sU).

Desarrollo de un anticuerpo contra Rnf19a para evaluar expresión de la proteína Rnf19a en nuestras muestras.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Kierszenbaum AL. *Histología y biología celular*. Segunda Ed. Madrid: Elsevier Inc.; 2008.
2. Zini A, Agarwal A. *Sperm Chromatin*. 1st editio. Zini A, Agarwal A, editors. Cleveland: Springer; 2011.
3. Gartner L, Hiatt JB. *Texto Atlas de Histología*. Tercera ed. Gartner L, Hiatt JB, editors. Mexico: McGraw-Hill Interamericana; 2008. 573 p.
4. Mateo S De, Sassone-corsi P. Regulation of spermatogenesis by small non-coding RNAs: role of the Germ Granule. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;29:84–92.
5. Matoulkova E, Michalova E, Vojtesek B, Hrstka R. The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol*. 2012;9(5):563–75.
6. Wang Y, Hou J, He D, Sun M, Zhang P, Yu Y, et al. The Emerging Function and Mechanism of ceRNAs in Cancer. *Trends Genet*. 2016;32(4):211–24.
7. Kung JTY, Cognigni D, Lee JT. Long Noncoding RNAs: Past, Present, and Future. *Genetics*. 2013;193(3):651–69.
8. Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: New players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet*. 2014;15(1):7–21.
9. Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*. 2010;465(7301):1033–8.
10. An Y, Furber KL, Ji S. Pseudogenes regulate parental gene expression via ceRNA network. *J Cell Mol Med*. 2017;21(1):185–92.
11. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509–24.
12. Fu Y, Lee I, Lee YS, Bao X. Small Non-coding Transfer RNA-Derived RNA Fragments (tRFs): Their Biogenesis, Function and Implication in Human Diseases. *Genomics Inform*. 2015;13(4):94–101.
13. Hilz S, Modzelewski AJ, Cohen PE, Grimson A. The roles of microRNAs and siRNAs in mammalian spermatogenesis. *Development*. 2016;143(17):3061–73.
14. Balatti V, Pekarsky Y, Croce CM. Role of the tRNA-Derived Small RNAs in Cancer: New Potential Biomarkers and Target for Therapy. *Adv Cancer Res*. 1st

- ed. 2017;135:173–87.
15. He Z, Kokkinaki M, Pant D, Gallicano GI, Dym M. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction*. 2009;137(6):901–11.
 16. Haussecker D, Huang Y, Lau A, Parameswaran P, Fire AZ, Kay M a. Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *Spring*. 2010;16(4):673–95.
 17. Chen Q, Yan W, Duan E. Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. *Nat Rev Genet*. 2016;17(12):733–43.
 18. Kotaja N. MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertil Steril*. 2014;101(6):1552–62.
 19. Steinkraus BR, Toegel M, Fulga TA. Tiny giants of gene regulation: Experimental strategies for microRNA functional studies. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2016;5(3):311–62.
 20. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(6):321–33.
 21. Graves P, Zeng Y. Biogenesis of Mammalian MicroRNAs: A Global View. *Genomics, Proteomics Bioinforma*. 2012;10(5):239–45.
 22. MacFarlane L-A, R. Murphy P. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010;11(7):537–61.
 23. Hayashi K, Chuva de Sousa Lopes SM, Kaneda M, Tang F, Hajkova P, Lao K, et al. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One*. 2008;3(3):1–9.
 24. Chen X, Li X, Guo J, Zhang P, Zeng W. The roles of microRNAs in regulation of mammalian spermatogenesis. *J Anim Sci Biotechnol*. 2017;8(1):1–8.
 25. Chen J, Cai T, Zheng C, Lin X, Wang G, Liao S, et al. MicroRNA-202 maintains spermatogonial stem cells by inhibiting cell cycle regulators and RNA binding proteins. *Nucleic Acids Res*. 2016;45(7):4142–57.
 26. Comazzetto S, Di Giacomo M, Rasmussen KD, Much C, Azzi C, Perlas E, et al. Oligoasthenoteratozoospermia and Infertility in Mice Deficient for miR-34b/c and miR-449 Loci. *PLoS Genet*. 2014;10(10):e1004597.
 27. Niu Z, Goodyear SM, Rao S, Wu X, Tobias JW, Avarbock MR, et al. MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(31):12740–5.
 28. Maatouk DM, Loveland KL, McManus MT, Moore K, Harfe BD. Dicer1 is required

- for differentiation of the mouse male germline. *Biol Reprod.* 2008;79(4):696–703.
29. Korhonen HM, Meikar O, Yadav RP, Papaioannou MD, Romero Y, da Ros M, et al. Dicer is required for haploid male germ cell differentiation in mice. *PLoS One.* 2011;6(9):1–12.
 30. Wu Q, Song R, Ortogero N, Zheng H, Evanoff R, Small CL, et al. The RNase III enzyme DROSHA is essential for MicroRNA production and spermatogenesis. *J Biol Chem.* 2012;287(30):25173–90.
 31. Bao J, Li D, Wang L, Wu J, Hu Y, Wang Z, et al. MicroRNA-449 and MicroRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway. *J Biol Chem.* 2012;287(26):21686–98.
 32. Wang L, Xu C. Role of microRNAs in mammalian spermatogenesis and testicular germ cell tumors. *Reproduction.* 2015;149(3):R127–37.
 33. Wu J, Bao J, Kim M, Yuan S, Tang C, Zheng H, et al. Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(28):E2851–7.
 34. Papaioannou MD, Pitetti J, Ro S, Park C, Aubry F, Schaad O, et al. Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Dev Biol.* 2010;326(1):250–9.
 35. Kim G-J, Georg I, Scherthan H, Merckenschlager M, Guillou F, Scherer G, et al. Dicer is required for Sertoli cell function and survival. *Int J Dev Biol.* 2010;54(5):867–75.
 36. Párraga M, Del Mazo J. XYbp, a novel RING-finger protein, is a component of the XY body of spermatocytes and centrosomes. *Mech Dev.* 2000;90(1):95–101.
 37. Niwa J ichi, Ishigaki S, Doyu M, Suzuki T, Tanaka K, Sobue G. A novel centrosomal RING-finger protein, Dorfin, mediates ubiquitin ligase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281(3):706–13.
 38. Rivkin E, Kierszenbaum AL, Gil M, Tres LL. Rnf19a, a ubiquitin protein ligase, and Psmc3, a component of the 26S proteasome, tether to the acrosome membranes and the head-tail coupling apparatus during rat spermatid development. *Dev Dyn.* 2009;238(7):1851–61.
 39. Ncbi Gene. RNF19A ring finger protein 19A, RBR E3 ubiquitin protein ligase [Pan troglodytes (chimpanzee)]. *Ncbi Gene.* 2017.

40. Niwa JI, Ishigaki S, Hishikawa N, Yamamoto M, Doyu M, Murata S, et al. Dornin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J Biol Chem.* 2002;277(39):36793–8.
41. Hishikawa N, Niwa J, Doyu M. Dornin Localizes to the Ubiquitylated Inclusions in Parkinson ' s Disease , Dementia with Lewy Bodies , Multiple System Atrophy , and Amyotrophic Lateral Sclerosis. 2003;163(2):609–19.
42. Takeuchi H, Niwa J, Hishikawa N, Ishigaki S, Tanaka F, Doyu M, et al. Dornin prevents cell death by reducing mitochondrial localizing mutant superoxide dismutase 1 in a neuronal cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2004;89(1):64–72.
43. Smith D. Regulación de Rnf19a y su pseudogen Rnf19aTPPg3 por microRNAs en líneas celulares somáticas y germinales de murino. Universidad de Valparaíso; 2017.
44. Abu-Halima M, Hammadeh M, Backes C, Fischer U, Leidinger P, Lubbad AM, et al. Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertil Steril.* 2014;102(4):989-997.e1.
45. Rejas M. Estudio de la expresión de Rnf19a frente a choque térmico en células NIH-3T3, GC-1 y GC-2 de ratón in vitro y en testículo de ratón in vivo. Universidad de Valparaíso; 2016.
46. Li Y, Lv M, Song Z, Lou Z, Wang R, Zhuang M. Long non-coding RNA NNT-AS1 affects progression of breast cancer through miR-142-3p/ZEB1 axis. *Biomed Pharmacother.* 2018;103(April):939–46.
47. Liang L, Xu J, Wang M, Xu G, Zhang N, Wang G, et al. LncRNA HCP5 promotes follicular thyroid carcinoma progression via miRNAs sponge. *Cell Death Dis.* 2018;9(3):372.
48. Wang Y, Lu Z, Wang N, Feng J, Zhang J, Luan L, et al. Long noncoding RNA DANCR promotes colorectal cancer proliferation and metastasis via miR-577 sponging. *Exp Mol Med.* 2018; 50: 1-17.
49. Bassett AR, Azzam G, Wheatley L, Tibbit C, Rajakumar T, McGowan S, et al. Understanding functional miRNA-target interactions in vivo by site-specific genome engineering. *Nat Commun.* 2014;5(November):1–11.
50. Ecsedi M, Rausch M, Großhans H. The let-7 microRNA directs vulval development through a single target. *Dev Cell.* 2015;32(3):335–44.

51. Chen S, Xue Y, Wu X, Le C, Bhutkar A, Bell EL, et al. Global microRNA depletion suppresses tumor angiogenesis. *Genes Dev.* 2014;28(10):1054–67.
52. Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet.* 2014;15(5):321–34.
53. Tsai SQ, Joung JK. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet.* 2016;17(5):300–12.
54. Agrotis A, Ketteler R. A new age in functional genomics using CRISPR/Cas9 in arrayed library screening. *Front Genet.* 2015;6:1–15.
55. Labun K, Montague TG, Gagnon JA, Thyme SB, Valen E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W272–6.
56. Dalmay T. *MicroRNA Detection and Target Identification.* 1st Editio. Dalmay T, editor. New York: Humana Press; 2017.
57. Haeussler M, Schönig K, Eckert H, Eschstruth A, Mianné J, Renaud JB, et al. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol.* 2016;17(1):1–12.
58. Chiou SH, Winters IP, Wang J, Naranjo S, Dudgeon C, Tamburini FB, et al. Pancreatic cancer modeling using retrograde viral vector delivery and in vivo CRISPR/Cas9-mediated somatic genome editing. *Genes Dev.* 2015;29(14):1576–85.
59. Li Y, Park AI, Mou H, Colpan C, Bizhanova A, Akama-Garren E, et al. A versatile reporter system for CRISPR-mediated chromosomal rearrangements. *Genome Biol.* 2015;16(1):1–11.
60. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science (80-).* 2016;351(6268):84–8.
61. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281–308.
62. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
63. Wang D, Zhang C, Wang B, Li B, Wang Q, Liu D, et al. Optimized CRISPR guide RNA design for two high-fidelity Cas9 variants by deep learning. *Nat Commun.* 2019;10(1):1–14.

64. Schindele P, Wolter F, Puchta H. CRISPR guide RNA design guidelines for efficient genome editing. *Methods Mol Biol.* 2020;2166:331–42.
65. Graham DB, Root DE. Resources for the design of CRISPR gene editing experiments. *Genome Biol.* 2015;16(1).
66. Ehrke-Schulz E, Bergmann T, Schiwon M, Doerner J, Saydaminova K, Lieber A, et al. Quantification of designer nuclease induced mutation rates: a direct comparison of different methods. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* 2016;3(February):16047.
67. Sentmanat MF, Peters ST, Florian CP, Connelly JP, Pruett-Miller SM. A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–8.
68. Vouillot L, Th  lie A, Pollet N. Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 2015;5(3):407–15.
69. Yu X, Liang X, Xie H, Kumar S, Ravinder N, Potter J, et al. Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. *Biotechnol Lett.* 2016;38(6):919–29.
70. Jin J, Xu Y, Huo L, Ma L, Scott AW, Pizzi MP, et al. An improved strategy for CRISPR/Cas9 gene knockout and subsequent wildtype and mutant gene rescue. *PLoS One.* 2020;15(2):1–21.
71. Schwartz ML, Bruce J, Shneidman PS, Schlaepfer WW. Deletion of 3'-untranslated region alters the level of mRNA expression of a neurofilament light subunit transgene. *J Biol Chem.* 1995;270(44):26364–9.
72. Zhao JP, Zhu H, Guo XP, Sun YC. AU-rich long 3' untranslated region regulates gene expression in bacteria. *Front Microbiol.* 2018;9(DEC):1–10.
73. Zhao W, Siegel D, Biton A, Le Tonqueze O, Zaitlen N, Ahituv N, et al. CRISPR-Cas9-mediated functional dissection of 3'-UTRs. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(18):10800–10.
74. Patwardhan RP, Hiatt JB, Witten DM, Kim MJ, Smith RP, May D, et al. Massively parallel functional dissection of mammalian enhancers in vivo. *Nat Biotechnol.* 2012;30(3):265–70.
75. Kosicki M, Allen F, Bradley A. Cas9-induced large deletions and small indels are controlled in a convergent fashion. *bioRxiv.* 2020;1(1):2020.08.05.216739.
76. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end

joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(8):495–506.

77. Bloh K, Rivera-Torres N. A consensus model of homology-directed repair initiated by crispr/cas activity. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8).
78. Mullaney JM, Mills RE, Stephen Pittard W, Devine SE. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Hum Mol Genet.* 2010;19(R2):131–6.
79. Jash A, Yun K, Sahoo A, So JS, Im SH. Looping mediated interaction between the promoter and 3' UTR regulates type II collagen expression in Chondrocytes. *PLoS One.* 2012;7(7).
80. Mao J, Li C, Zhang Y, Li Y, Zhao Y. Human with-no-lysine kinase-4 3'-UTR acting as the enhancer and being targeted by miR-296. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(9):1536–43.

12. ANEXOS

11.1. ANEXO 1: Aislamiento de colonias mononucleares por dilución límite

Paso 1: Preparación del medio condicionado

- 1.- Sembrar las células de modo que al día siguiente alcancen un 50-60% de confluencia. Cada placa de 10 cm debe ser sembrada con 10 mL de DMEM completo, lo que generará suficiente medio condicionado para una placa de 96 pocillos.
- 2.- Dejar que las células crezcan toda la noche (lo ideal es recolectar el medio a las 24 horas, a lo máximo 48 horas).
- 3.- Cambiar el medio de las células y recolectar el medio condicionado.
- 4.- Eliminar las células del medio condicionado filtrando con un filtro de 0.45 μm o centrifugando a >500 g por 5 minutos.

PASO 2: Aislamiento de la población celular monoclonal por dilución límite

- 5.- Tripsinizar las células estables y romper cualquier cúmulo de células pipeteando varias veces. Estimar el número de células en la solución celular homogeneizada.
- 6.- Transferir la solución celular homogeneizada al medio condicionado para hacer una nueva solución celular a una concentración de 5 cél/mL. Preparar aproximadamente 10 mL de esta solución para cada placa de 96 pocillos a sembrar.
- 7.- Transferir 100 μl de la solución a 5 cél/mL a cada pocillo de la placa de 96. Al hacerlo se están sembrando los pocillos en una densidad promedio de 0.5 cél/pocillo. De esta forma se asegura que algunos pocillos reciban una sola célula, minimizando las probabilidades que un pocillo reciba más de una célula.
- 8.- Dejar las células en el incubador por 7-14 días. Después del día 7, escanear la placa.

Si no se observan colonias, continuar incubando las células.

9.- Escanear la placa y hacer notas de cada pocillo en el que se vea crecimiento. Las células aparecen como colonias en los pocillos. Los pocillos con más de una colonia no tienen una población monoclonal y deben ser eliminados.

10.- Una vez que las células se hayan expandido, pero antes de que estén muy confluentes, tripsinizar y expandir en una placa más grande, asegurándose que no haya contaminación con otras poblaciones monoclonales.

11.2. ANEXO 2: Comprobación de la edición genómica

Paso 1: PCR

1. Armar una reacción de PCR usando 500 ng de DNA genómico. Para cada amplicón usar 3 reacciones de PCR usando los siguientes moldes:

- gDNA de las células CRISPeadas

- gDNA de células WT

- H₂O MQ (control negativo)

2. Comprobar el amplicón por electroforesis en gel de agarosa 2%.

3. Purificar el producto PCR y eluir en 20 µl de H₂O.

4. Medir la concentración del producto PCR.

Paso 2: Digestión con la enzima T7E1

5. Armar la siguiente reacción

Reactivo	
DNA	400 ng
Buffer NEB 2 10X	2 µl
H ₂ O DEPC	Llevar a 19 µl

6. Desnaturalizar e hibridar el producto PCR en un termociclador bajo las siguientes condiciones:

PASO	TEMPERATURA	RAMP RATE	TIEMPO
Desnaturalización inicial	95°C		5 minutos
Annealing	95-85°C	-2°C/segundo	
	85-25°C	-0.1°C/segundo	
Hold	4°C		Hold

7. Añadir la enzima Endonucleasa I T7 al producto PCR hibridado. Mezclar bien.

Componente	
Producto PCR hibridado	19 µl
Enzima T7E1 (M0302)	1 µl
Tiempo de incubación	15 minutos
Temperatura de incubación	37°C

8. Detener la reacción con 1.5 µl de EDTA 0.25 M.

9. Purificar la reacción y eluir en 20 µl de agua.

Paso 3: Análisis

10. Analizar el producto de digestión en un gel de agarosa.

11. Determinar el porcentaje de producto digerido (fraction cleaved) de la siguiente manera (Ran et al. Nat Protoc, 2013.)

11.1 Para cada carril (pocillo), calcular la fracción de producto PCR digerido (F_{cut}) utilizando la siguiente fórmula: $F_{cut} = (b+c)/(a+b+c)$, donde a es la intensidad integrada del producto PCR sin digerir, y b y c son las intensidades integradas de cada producto de la digestión.

11.2 Calcular el porcentaje de indel con la siguiente fórmula:

$$indel (\%) = 100 \times (1 - \sqrt{1 - Fcut})$$

Correcciones

Evaluador: Álvaro Ardiles

Comentario	Respuesta / Corrección
Agregar detalles a Gráfico 1 de la Introducción	Se corrige leyenda del gráfico 1.
¿Que explicación hay para las líneas que no presentan ninguna banda?	Se comenta lo indicado en la discusión
Indicar % de cambio para cada línea celular.	Se acepta corrección, se añade % de cambio del qPCR en los resultados.
Los niveles de reducción de transcrito parecen ser diferentes entre líneas celulares. ¿Qué implicancias tiene esto?	Se acepta la corrección, se comenta lo indicado en la discusión.
Incorporar inconvenientes del WB en la discusión	Se acepta corrección, se incorporan más detalles en la discusión.

Evaluador: Rodolfo Farlora

Comentario	Respuesta / Corrección
Reformular objetivo específico 2 a "Comparar la expresión de <i>Rnf19a</i> en células somáticas (NIH-3T3) y germinales (GC-1 y GC-2) de ratón tras la eliminación de los MRE en <i>Rnf19a</i> "	Se acepta la corrección

Evaluador: Ricardo Moreno

Comentario	Respuesta / Corrección
Mejorar leyenda de Gráfico 1	Se corrige
Describir mejor Tabla 3. Describir valor F_{cut}	Se aceptan correcciones