

Cultivo celular

El cultivo de tejidos se refiere al cultivo *in vitro* o directamente "cultivo" de un tejido completo, como el tejido epidérmico de la piel. Obviamente, debido a las características intrínsecas de las células, como sus capacidades de división, algunos tejidos son más fáciles de cultivar *in vitro* que otros.

El cultivo celular se refiere al cultivo *in vitro* de células dispersas derivadas de tejido primario (en cuyo caso se llama cultivo celular primario), de una línea celular o de una cepa celular (discutiremos la diferencia de estos dos últimos términos más adelante).

El cultivo de órganos se refiere al cultivo tridimensional de tejido no desintegrado (preservando así algunas de las características del órgano aunque está separado del cuerpo) como por ejemplo la glándula pineal.

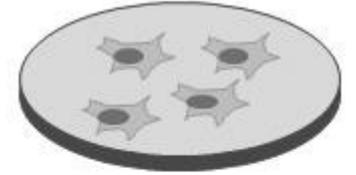
El cultivo organotípico, por otro lado, se refiere a la recombinación o cocultivo de células de diferentes linajes *in vitro*, para recrear algunas de las características del órgano. Y, por supuesto, todas las terminologías anteriores pueden referirse a células animales, células vegetales o células de insectos.

Con esto reseramos el término *in vivo* para el trabajo en animales.

Dependiendo del tipo de cultivo que uno desee usar en sus estudios, hay algunos asuntos importantes a considerar, como

- (a) fuente de células;
- (b) métodos de dispersión (no todos los tejidos pueden dispersarse de la misma manera, debido a diferencias en material matricial);
- (c) medios definidos (es decir, antibióticos, suplementos nutricionales, factores de crecimiento, hormonas, etc.);
- (d) temperatura;
- (e) pH;
- (f) incubadoras; y
- (g) método de propagación de células durante los pasajes

Las células pueden crecer como cultivos adherentes o en suspensión, dependiendo de la fuente u origen: por ejemplo, fibroblastos o células epidérmicas requieren estrecha adherencia a una matriz extracelular, y tienen que crecer como células adherentes. Por otro lado, los leucocitos (glóbulos blancos) son células que normalmente circulan en el torrente sanguíneo sin ninguna adherencia, y son altamente móviles, por lo tanto, se pueden cultivar como células en suspensión.



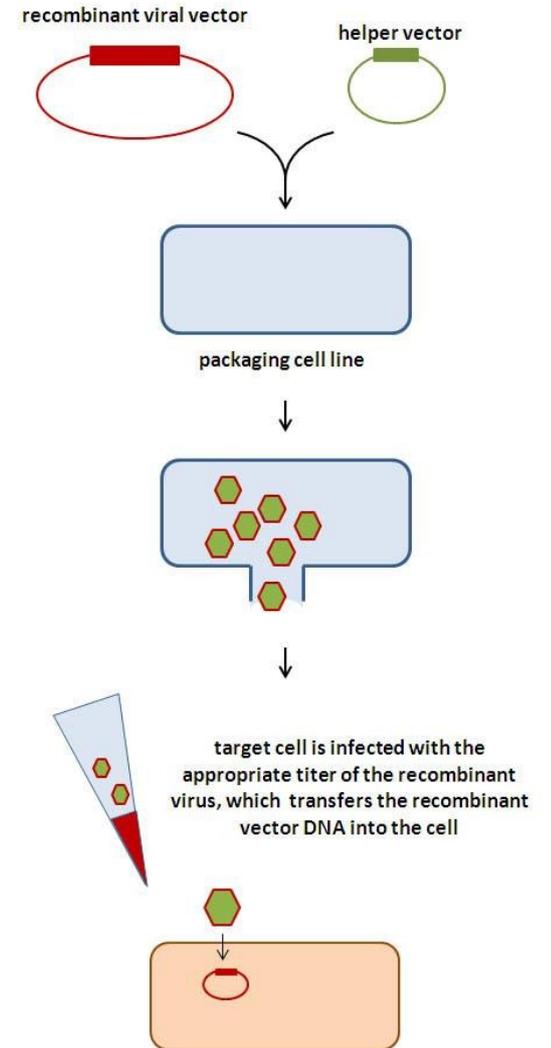
Manipulación genética de células

El método para la manipulación genética de las células depende en gran medida del tipo de célula en cuestión; sin embargo, uno puede subdividir estos métodos en 5 categorías principales:

- Eléctrico, como en electroporación;
- Mecánico, como en microinyección o pistola de genes;
- Químicos, como con liposomas o fosfato de calcio;
- Virales, como con los vectores baculovirales, retrovirales, lentivirales o adenovirales; y
- Láser, como en fototransfecciones.

Método viral

Figura 7.1. Un esquema simplificado de cómo se usan típicamente los vectores virales. El vector viral que se construye para transportar el inserto de ADN es co-transfectado a una línea celular de empaquetamiento junto con un vector auxiliar. El ADN recombinante se empaqueta en partículas virales; después del cálculo del título viral (Fig. 7.2), las células en estudio se infectan con el virus recombinante, lo que permite la transferencia de ADN recombinante.



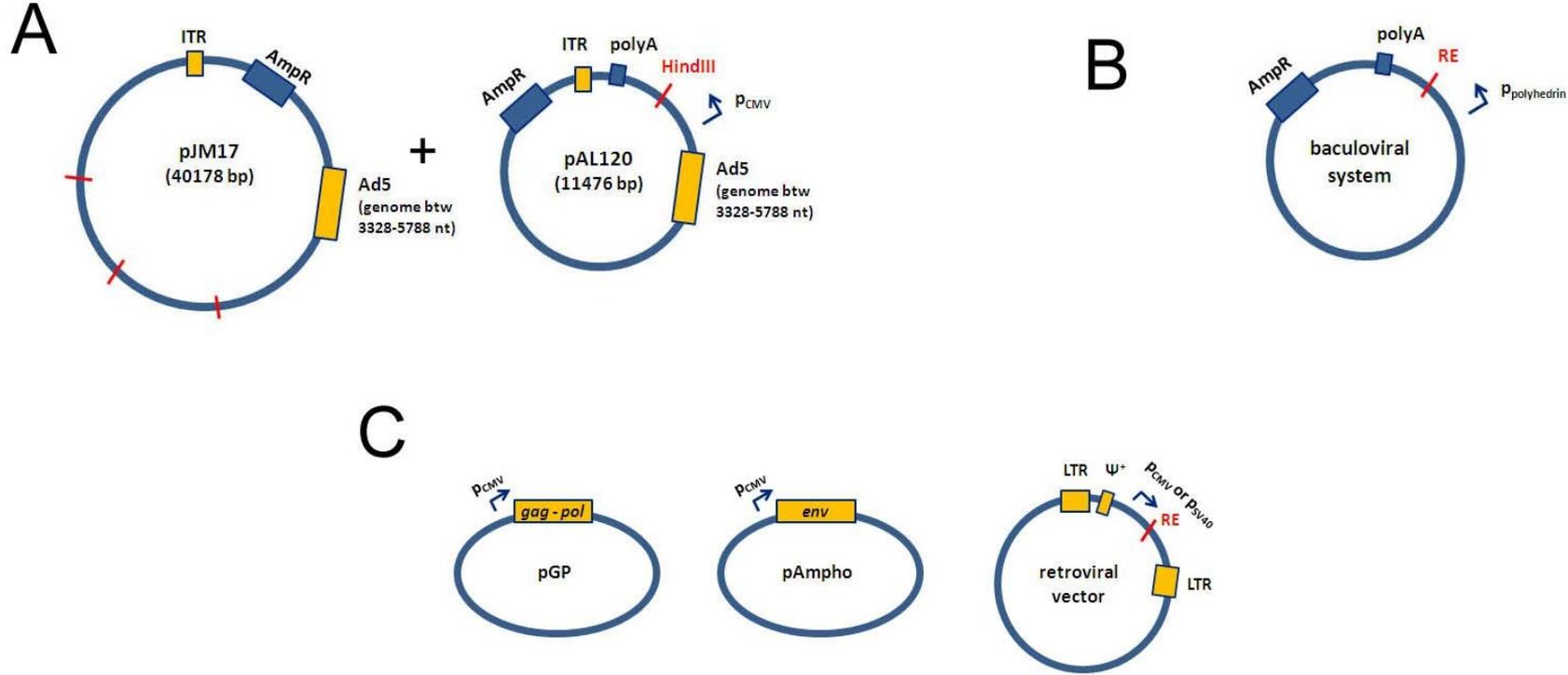


Figura 7.3. Representaciones esquemáticas de algunos vectores virales comunes. (a) vector adenoviral pAL120 y vector auxiliar pJM17, basado en adenovirus tipo 5 (actualmente la compañía Invitrogen generó vectores adenovirales de 1 plásmidos y el sistema Gateway de clonado). Las ITR son repeticiones terminales invertidas. El vector pJM17 contiene la porción defectuosa de replicación del genoma Ad5 (tenga en cuenta que hay varios sitios *HindIII* dentro del plásmido, que se muestran con líneas rojas). El vector pAL120 se usa para clonar el gen de interés en el sitio *HindIII*, bajo el promotor pCMV. Tras la coinfección, la expresión de ambos plásmidos permitirá la producción de partículas adenovirales. (b) Los vectores baculovirales se usan típicamente para expresar genes bajo el promotor de la poliedrina de baculovirus. (c) Los vectores retrovirales generalmente se usan para clonar genes bajo los promotores constitutivos de CMV o SV40, e incluyen los elementos de empaquetamiento psi (Ψ^+), sin embargo requieren la presencia de otros vectores auxiliares que expresan proteínas gag, pol y env que por bioseguridad están en plásmidos separados. Actualmente los retrovirus de última generación están divididos en 5 plásmidos al igual que los lentivirus (derivados del virus del HIV de gatos).

Plásmidos y genes reporteros

Los plásmidos utilizados para la transfección y el análisis en células (animales) se dividen en general en 4 categorías diferentes según los promotores utilizados:

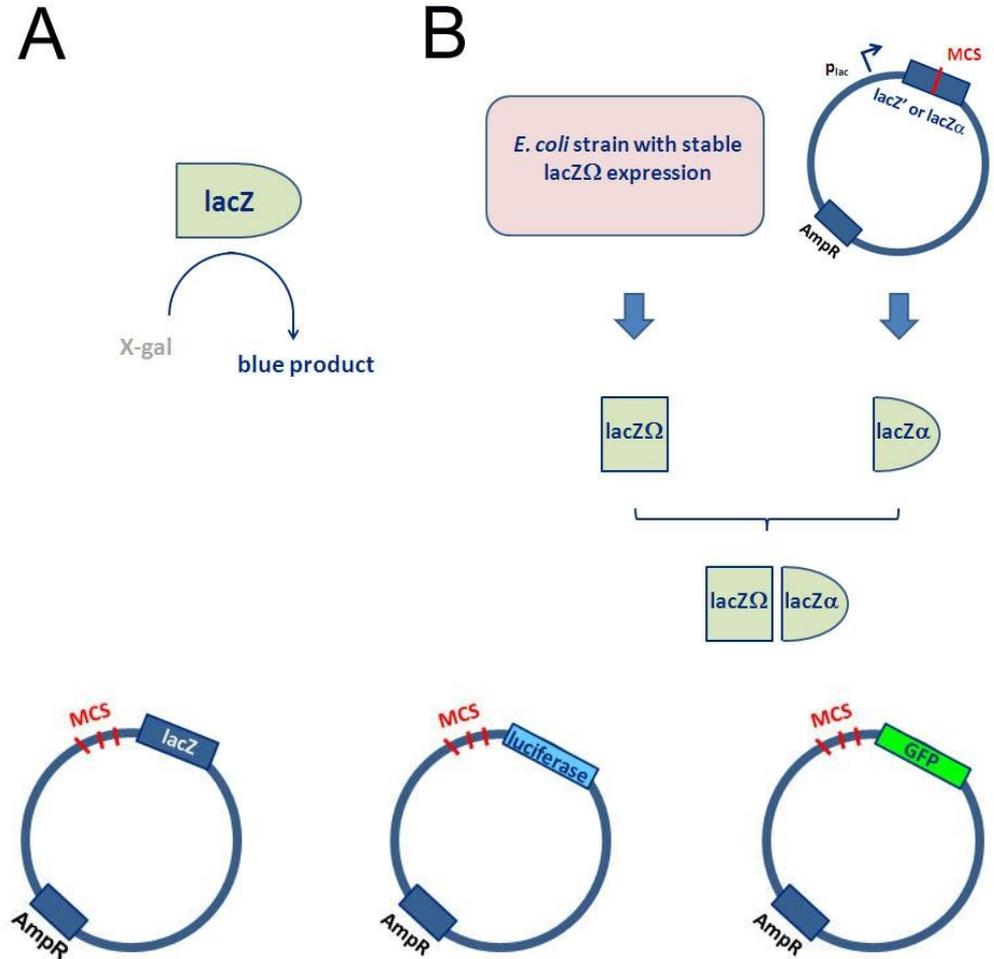
- Los plásmidos que contienen promotores mínimos, como el promotor *tv* de HSV (timidina quinasa del virus del herpes simple), se utilizan esencialmente para estudiar elementos potenciadores (enhancers) o activar motivos reguladores
- Plásmidos que contienen promotores constitutivos, tales como promotores CMV (citomegalovirus) o SV40 (virus simio 40);
- Plásmidos con promotores específicos de tipo celular;
- Plásmidos con promotores regulables (inducibles o reprimibles).

Los genes comúnmente utilizados para la actividad reportera incluyen

- lacZ
- luciferasa
- GFP u otras proteínas fluorescentes

Figura 7.4. Representación esquemática de cómo se usa lacZ como reportero. (a) un esquema simplificado de la actividad del indicador catalítico de lacZ, por el cual un sustrato incoloro X-gal se escinde para generar un producto de color azul. (b) La complementación de LacZ se basa en el principio de que la enzima se puede dividir en dos polipéptidos que individualmente no pueden funcionar, pero solo exhiben actividad catalítica cuando se expresan en la misma célula al mismo tiempo.

Figura 7.5. Diagramas simplificados de vectores con genes reporteros. Reportero LacZ, luciferasa y GFP (de izquierda a derecha).



Tipos de transfección.

Transfección transitoria

- el gen transferido a la célula no está integrado en el genoma de la célula
- el gen transfectado se diluye en la células hija con cada división celular, en ausencia de presión de selección
- Por lo general, se usan vectores de alto número de copias que contienen promotores fuertes para la expresión de alto nivel de proteínas, marcadores o reporteros
- alto nivel de expresión del gen transfectado solo dura unos días después de la transfección,
 - el ADN plasmídico está presente en grandes cantidades por célula, y esto crea una discrepancia con el resto del genoma que es diploide

Transfección estable

- el ADN transfectado se integra en el genoma, aunque con probabilidad variable
 - La eficiencia de la integración depende del tipo de célula, método utilizado, o presión de selección aplicada
 - Los resultados de las transfecciones estables son más confiables ya que solo hay una copia del gen transfectado, en lugar de decenas o cientos, y es por lo tanto más fisiológico
 - La integración estable asegura la transmisión a las células hijas durante muchas generaciones
 - los vectores virales generalmente se prefieren para la generación de una línea celular estable, ya que tienen la capacidad de integrarse en el genoma de sus células diana.
- Al no ser la integración sitio específica como en el caso del CRISPR/Cas9 es necesario generar más de una línea para corroborar los resultados biológicos

Recombinación e integración en el genoma.

Recombinación homóloga

La recombinación homóloga es un proceso en el cual las moléculas de ADN con similitud general (no identidad!) intercambian partes correspondientes de su secuencias

Se estudia principalmente en el cruce durante la meiosis, y en la reparación de recombinación post-replicativa.

La recombinación homóloga puede ocurrir entre cualquiera de los dos puntos calientes de recombinación distribuidos casi al azar a lo largo de la secuencia en cada cromosoma.

Recombinación específica del sitio

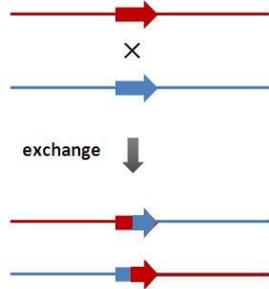
La recombinación sitio específica, en principio, se basa en mecanismos muy similares a la recombinación homóloga; sin embargo, la recombinación ocurre en un sitio específico de alrededor de 30 - 200 pb.

Estos sitios son típicamente de naturaleza asimétrica, permitiendo que la enzima recombinasa reconozca las "mitades" izquierda y derecha del motivo.

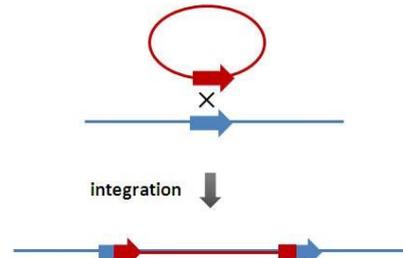
Las recombinasas que se usan principalmente en genética son las recombinasas Cre y F1p

I. Inter-chromosomal

1. Linear vs Linear

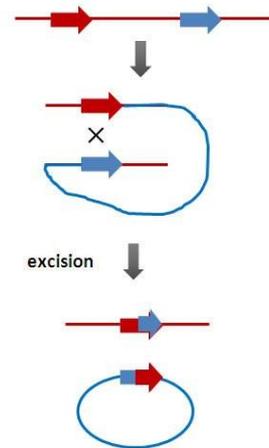


2. Linear vs Circular



II. Intra-chromosomal

1. Same orientation



2. Opposite orientation

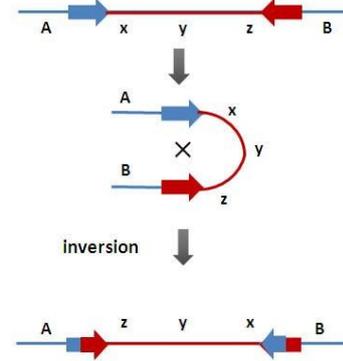


Figura 7.6. Resumen de posibles productos de la recombinación sitios específica.

I. El intercambio inter cromosómico (o intercambio intermolecular) puede ocurrir entre cualquiera (1) dos moléculas de ADN lineales, que resultan en intercambio de cadena desde un motivo de recombinación específico (mostrado con dos cajas y una cruz), o (2) una molécula de ADN lineal y otra circular, que da como resultado la integración del ADN circular al lineal. II El intercambio intracromosómico (o intramolecular) ocurre dentro de la misma molécula de ADN; sin embargo en este caso el motivo de recombinación puede (1) estar en la misma orientación, lo que resulta en la escisión de la región en el medio como ADN circular, o (2) en la orientación opuesta, lo que resulta simplemente en la inversión de la región media.

Niveles de expresión

Expresión constitutiva

La expresión constitutiva se refiere a los casos en los que el gen que se transfiere a las células se expresará en todo momento, en todas las condiciones. Muchos vectores de expresión de mamíferos, como la serie pCMV usan promotores fuertes que siempre están activos. Esto es particularmente interesante si se requieren altas cantidades de expresión de proteínas.

Expresión inducible

La expresión inducible en las células se logra seleccionando un promotor que está regulado por estímulos, que a su vez regulan la actividad de factores de transcripción. Algunos promotores se activan por estímulo térmico (por ejemplo, promotores de proteínas HSP); algunos están activados por productos químicos (p. ej., lactosa, análogo de lactosa IPTG o promotores inducibles por tetraciclina); algunos otros están regulados por la presencia o ausencia de oxígeno (como los promotores inducibles por hipoxia). La tetraciclina es quizás uno de los agentes inductores más comunes utilizados en los sistemas de expresión inducibles en mamíferos, por lo tanto, aquí elegimos explicar los principios básicos de los sistemas tet-ON y tet-OFF como ejemplos. Esencialmente, en los sistemas tet-ON se activa en presencia de tetraciclina, o su análogo doxiciclina, de una manera dependiente de la dosis (es decir, cuanto mayor es la tetraciclina, mayor es el nivel de expresión); mientras que en los sistemas tet-OFF el gen transfectado se desactiva en presencia de tetraciclina o doxiciclina.

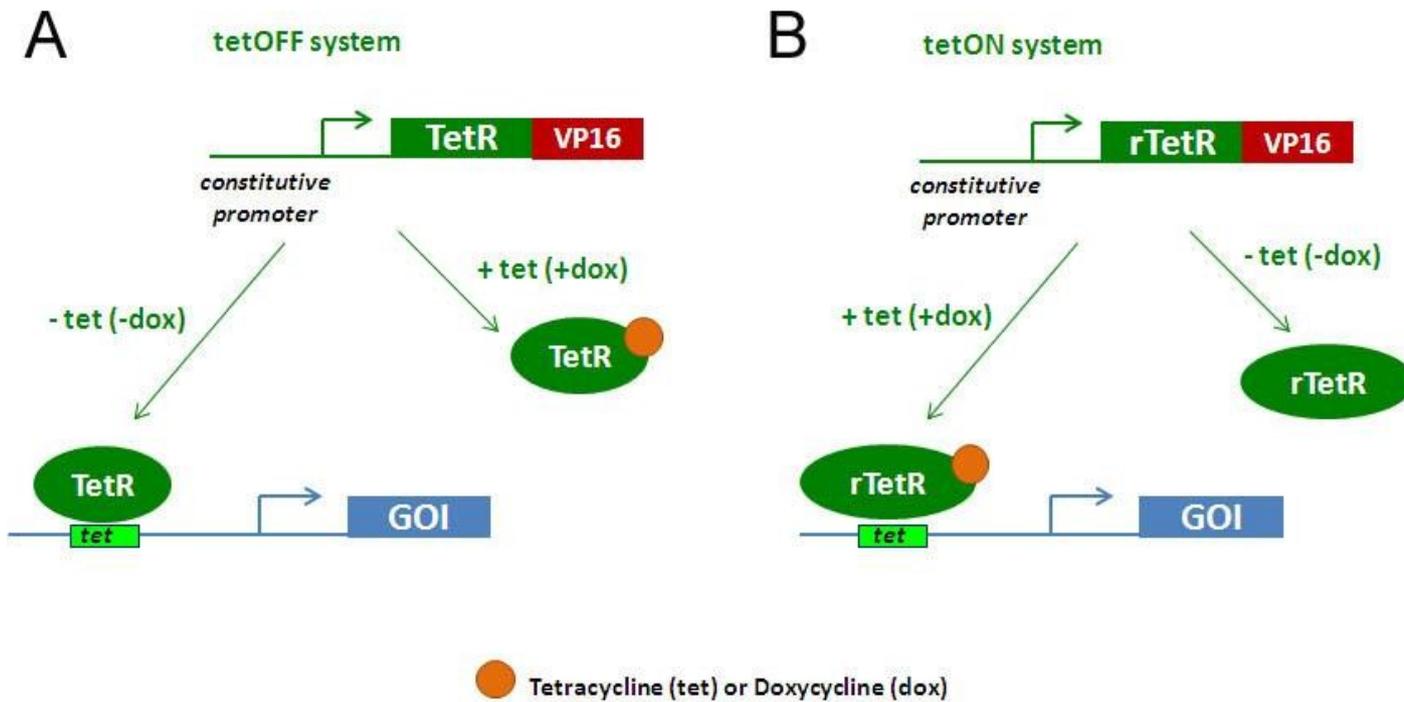


Figura 7.7. Diagrama esquemático del sistema inducible por tetraciclina. (a) El sistema Tet-OFF se basa en la unión del represor de tetraciclina (TetR) al motivo tet en los promotores. En este sistema, TetR se fusiona con el dominio de activación ácida del factor de transcripción VP16, y regula positivamente la transcripción del promotor en ausencia de inductor, regulando el aumento la expresión del gen de interés (GOI). El propio TetR se libera del motivo tet al unirse la tetraciclina (tet) o su doxiciclina análoga (dox) al TetR, por lo tanto liberando la fusión TetR-VP16 del promotor inducible. (b) En el sistema tet-ON, TetR está diseñado de tal manera que sus propiedades de unión al ADN se invierten: rTetR se une al promotor en presencia de tet (o dox), y se libera del promotor en ausencia del inductor. Por lo tanto, el GOI se "ENCIENDE" en presencia de tet (o dox)

Edición genómica

La edición del genoma es un método mediante el cual un fragmento de ADN es insertado, reemplazado o eliminado del genoma de un organismo, con la ayuda de nucleasas genéticamente modificadas y la propia maquinaria de reparación de cortes de doble cadena de la célula huésped. La recombinación homóloga tiene lugar entre dos moléculas ADN con una homología de secuencia significativa. Cortes de ambas cadenas de ADN estimulan la maquinaria de recombinación homóloga, que es la base para los enfoques de edición del genoma. Estos cortes se logran mediante nucleasas que fueron diseñadas para reconocer secuencias objetivo específicas.

Actualmente hay cuatro familias de nucleasas diseñadas utilizado para fines de edición del genoma:

1. Nucleasas de dedos de zinc (ZFN)
2. Transcripción activador-como efector nucleasas (TALENs)
3. El sistema CRISPR / Cas
4. Meganucleasas

1. Las nucleasas de dedos de zinc (ZFN)

Esta tecnología se basa en la enzima de restricción *Fok I* que se fusiona con una aleta de zinc. El dominio de unión al ADN diseñado para apuntar a una específica Secuencia de ADN

2. Transcripción activador-como efector nucleasas (TALENs)

Los TALEN son similares a los ZFN. Cada unión de ADN el dominio de TALEN puede reconocer una única base de ADN diferente, por lo tanto, una combinación de diferentes TALEN puede ser en la práctica usado para apuntar cualquier secuencia específica en el genoma. La actividad de endonucleasa nuevamente es a través de la restricción *Fok I* enzima. Los TALEN tienen grandes ventajas sobre los ZFN. Primero, las tasas de mutación fuera del objetivo son generalmente más bajas, y pueden ser diseñado para apuntar virtualmente a cualquier secuencia genómica.

3. El sistema CRISPR / Cas

Este sistema es el más utilizado y lo veremos en más detalles. El sistema CRISPR / Cas es relativamente fácil y barato. Consiste en un ARN guía específico de objetivo y una nucleasa no específica de objetivo. CRISPR es sinónimo de paleta corta agrupada regularmente entre espacios las repeticiones dromicas y los genes cas son genes asociados a CRISPR.

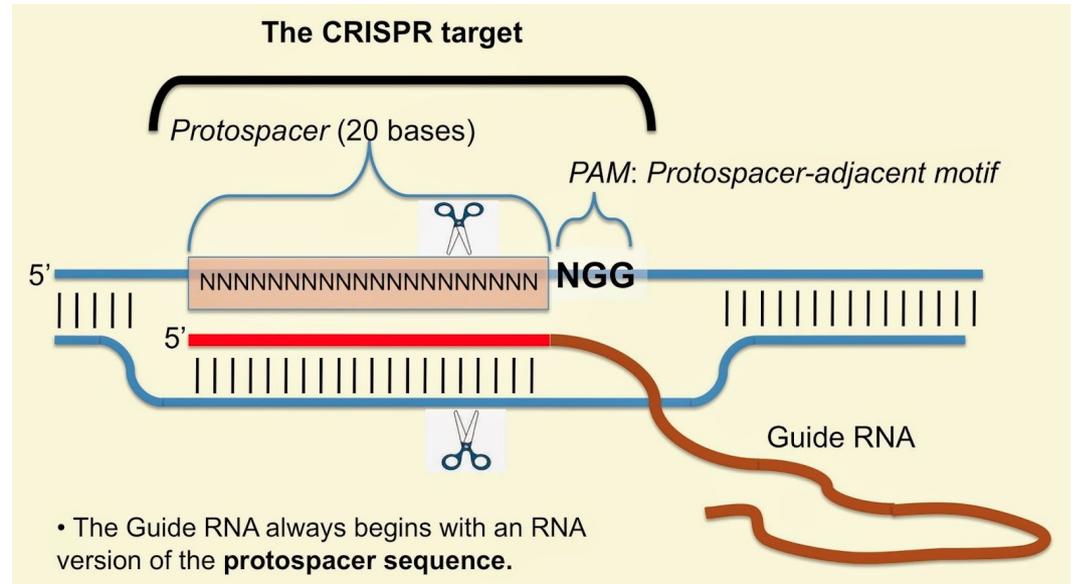
4. Meganucleasas

Las meganucleasas de microorganismos tienen naturalmente largo secuencias de reconocimiento (> 14 pb), y con ingeniería de proteínas, Se han generado varias variantes de meganucleasas para cubrir un gran cantidad de combinaciones de secuencias únicas. Adicionalmente, Se sabe que las meganucleasas causan menos toxicidad en las células en comparación con ZFN o TALEN.

CRISPR/Cas9

CRISPR significa repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas. Para llevarla a cabo dos componentes son importantes: una endonucleasa y un RNA sintético simple hebra específico llamado ARN guía (gRNA). Las endonucleasas más utilizadas son Cpf1 y Cas9 (de ahí que en muchos casos se nombre directamente CRISPR/Cas9, ya que ésta última es la más utilizada). Dado que el gRNA es quien dará la especificidad en el sitio del genoma que se va a editar, es de gran importancia su diseño para obtener una mayor eficiencia y una disminución de los eventos fuera del objetivo (lo que se conoce como off-target).

El complejo Cas9-gRNA escanea la región en busca del motivo adyacente al protoespacio (PAM, en la figura es 5' NGG 3' y el correspondiente a la Cas) formando un emparejamiento de bases de Watson-Crick con un fragmento de 20 nt en el ADN objetivo. Esta conformación permite a la endonucleasa cortar el sitio específicamente el ADN objetivo. Finalmente, la maquinaria de reparación de ADN endógeno de las células repara el corte doble cadena introduciendo los cambios deseados.



Tipos de nucleasas

Hay muchas nucleasas diferentes para usar en el sistema CRISPR. Se dividen en 2 clases, que se dividen en 6 tipos y 19 subtipos. Sin embargo, las endonucleasas más utilizadas son Cas9 y cpf1, ambas de la clase 2, que funcionan como una sola unidad para el reconocimiento del objetivo y el corte. Cas9 es una endonucleasa de ADN guiada por ARN de tipo II que corta ambas hebras del ADN, generando extremos romos cadena arriba de su PAM.

Se han desarrollado múltiples variantes de Cas9 inactivando uno de sus dominios nucleasa lo que reduce los off-targets.

Por otro lado, Cpf1 es una endonucleasa CRISPR tipo V que reconoce PAM 5' -TTN-3', que es más frecuente en el genoma humano que los requisitos del PAM de Cas9 y también mejora la edición de partes ricas en TA del genoma.

Esta endonucleasa corta en extremos cohesivos dejando 5 nucleótidos libres luego 18 a 23 bases luego del PAM. También es más una proteína más pequeña que la nucleasa Cas9, lo que permite un mejor empaque en virus (utilizados como vectores para introducir a la célula). Sin embargo, hay dos tipos relevantes de Cas9: Cas9 de *Streptococcus pyogenes* y de *Staphylococcus aureus* que son más pequeñas.

Table 1
Features of Cas9 and Cpf1

Type	Cas9 II	Cpf1 V
Cleavage	Double-stranded DNA	Double-stranded DNA
Protospacer-adjacent motif (PAM)	NGG/3	5'-TTN
Ends	Blunt end 3 nt upstream PAM	5 nucleotide 5' overhang 18–23 nt from PAM

Diseño del gRNA

Para diseñar un experimento de edición de genes CRISPR satisfactorio, hay algunos pasos importantes:

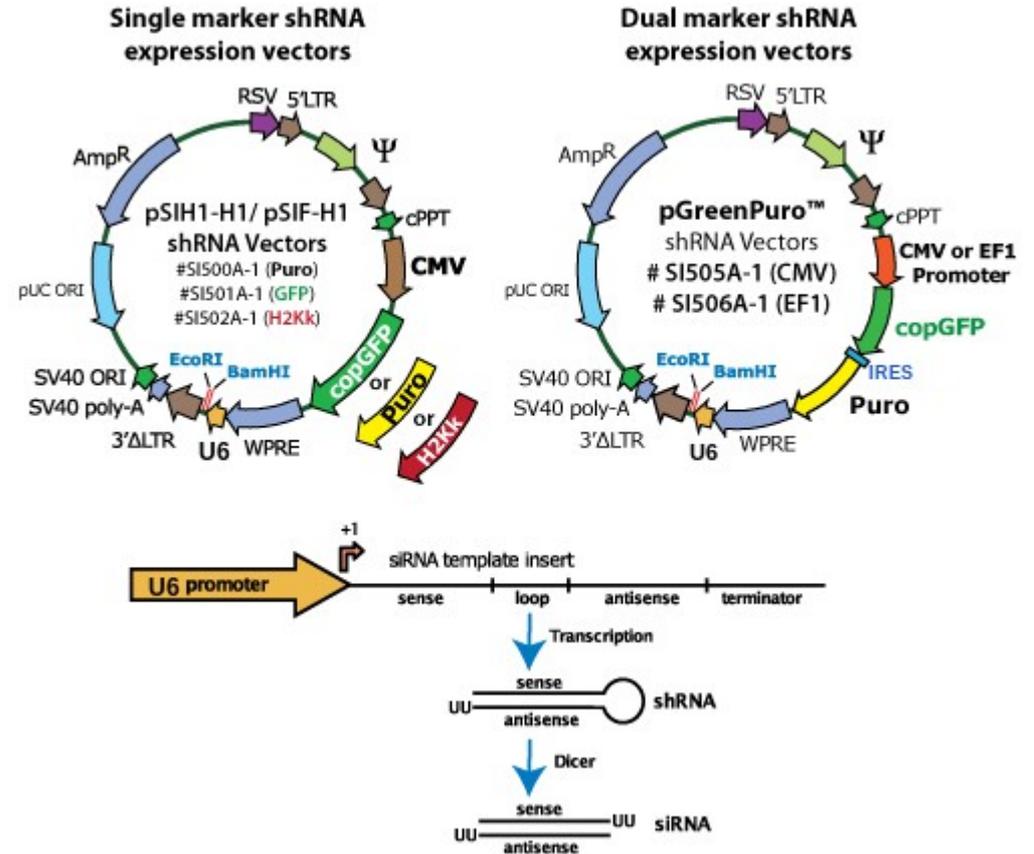
1. Selección de una endonucleasa adecuada. Describimos cas9 y cpf1 antes, las endonucleasas más utilizadas en experimentos CRISPR
2. Selección del objetivo del gRNA río arriba 5'NGG para cas9 o río abajo de TTN'3 para cpf1.
3. Seleccionar un ARNg eficiente con un objetivo reducido. Lo ideal es hacerlo bioinformaticamente mediante las herramientas como www.crispor.org
4. Expresión del gRNA bajo el promotor U6 que responde a la ARN polimerasa III

shRNA basados en mir30

No siempre CRISPR es la opción correcta para modular la expresión de una gen particular. Por ejemplo cultivos primarios de células madres humanas solo pueden crecer por 7 u 8 pasajes (lo veremos en clases posteriores), generar un cultivo homogéneo luego de un aislamiento donde todas las células hayan sido correctamente procesadas por CRISPR es muy difícil. Para estos casos y otros usar short hairpins ARN puede continuar siendo un alternativa.

Existen vectores con 0, 1 o 2 marcadores que coexpresan con el shRNA y permiten visualizar (1) o seleccionar (2) células positivamente transformadas o infectadas si se usó un virus.

Los shRNA puede transcribirse a partir del CMV (polIII9 pero lo hacen mejor y más eficientemente a partir del U6 (polIII) al igual que el gRNA en CRISPR.



shRNA basados en mir30

Por lo general los shRNA deben construirse a partir de una predicción bioinformática, ya que es necesario diseñarlos específicamente para un 3' UTR de un ARNm en particular, evitar los off-targets y que además sean eficientes. Los shRNA están basados en los micro RNAs (cuya acción es diferentes en plantas y en mamíferos) y necesitan identidad con el target (21nt) pero también 1 o 2 mismatches. Son tantas las variables que al igual que los gRNA es necesario que un software los diseñe (por ejemplo: DSIR o Biopred) para luego clonarlos directamente en un vector adecuado.

Morfolinos

Los morfolinos son análogos de oligonucleótidos de ARN antisentido sintetizados con un anillo de morfolina en lugar del anillo de ribosa. Esta construcción artificial tiene el doble propósito de mejorar la unión del morfolino a su secuencia de ARN complementaria al tiempo que resiste la digestión con endonucleasa. Típicamente, los morfolinos están diseñados para dirigirse a secuencias complementarias en el 5'UTR (mientras que los shRNA lo están al 3'UTR), evitando así la traducción del transcrito evitando la maduración del ARNm y su migración al citoplasma. Dado que no se pueden clonar (como CRISPR o los shRNA) su uso está limitado a organismos que permiten su entrada por difusión, por electroporación o microinyección (ej el gusano *C. elegans*, o embriones de pollo o del pez cebra)