

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



***Puesta a punto de un sistema de nanopartículas
de sílice mesoporosa para edición génica basado
en la tecnología CRISPR/Cas9***

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNA: Gema Vivo Llorca

TUTOR: Dr. José Ramón Murguía Ibáñez

TUTORA EXTERNA: Dra. María del Mar Orzáez Calatayud

TUTORA EXPERIMENTAL: Alba García Fernández

Curso Académico: 2016-2017

VALENCIA, 7 de septiembre de 2017

ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	5
1. TECNOLOGÍA CRISPR/Cas9	5
1.1 1) Sistema CRISPR/Cas en su estado natural.....	5
1.1 2) Sistema CRISPR/Cas9	7
1.1. 3) Aplicaciones del sistema CRISPR/CAS9	9
1.2 NANOMEDICINA.....	11
1.3 NANOPARTICULAS DE SÍLICE MESOPOROSAS (MCM-41).....	13
1.4 CONCEPTO DE PUERTA MOLECULAR	14
1.5 NANOPARTÍCULAS COMO SISTEMAS DE ENTREGA DE GENES	14
HIÓTESIS Y OBJETIVOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1 OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS CRISPR/Cas9 Y GFP	19
3.1 1) Reactivos.....	19
3.1 2) Diseño del RNA guía o sgRNA.....	19
3.1 3) Digestión y desfosforilación de pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9.....	19
3.1. 4) Anillamiento y fosforilación de sgRNA149 y crRNA.....	19
3.1 5) Optimización de la ligación de pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 con sgRNA149 y crRNA.....	20
3.1 6) Amplificación y purificación de los plásmidos CRISPR/Cas9	20
3.1 7) Determinación de la conformación de los plásmidos	21
3.1 8) Secuenciación.....	21
3.1 9) Amplificación y purificación de los plásmidos CRISPR/Cas9 y GFP para los ensayos celulares.....	21
3.2 SÍNTESIS DEL MATERIAL MCM-41	22
3.2 1) Reactivos.....	22
3.2 2) Síntesis del soporte de sílice mesoporoso MCM-41.....	22
3.2 3) Puesta a punto de la funcionalización del material MCM-41	23
3.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL SÓLIDO	24
3.3 1) Difracción de rayos X	24
3.3 2) Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	24
3.3 3) Tamaño de nanopartículas y potencial ζ	24

3.4 ENSAYOS CELULARES	24
3.4 1) Reactivos y equipo de trabajo	24
3.4 2) Cultivo celular. Condiciones de cultivo y mantenimiento	25
3.4 3) Ensayo de viabilidad celular	25
3.4 4) Análisis estadístico.....	25
3.4 5) Puesta a punto de las condiciones de transfección celular	25
3.4 6) Ensayo de edición génica	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1 DISEÑO Y OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS CRISPR/CAS9 PARA LA EDICIÓN DE GFP	28
4.1 1) Diseño del RNA guía o sgRNA.....	28
4.1 2) Optimización del proceso de ligación de pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 con sgRNA149 y crRNA	29
4.2 SÍNTESIS DEL MATERIAL MCM-41	32
4.2. 1) Puesta a punto de la funcionalización del material.....	33
4.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL SÓLIDO	33
4.3 1) Difracción de rayos X	34
4.3 2) Microscopía electrónica de transmisión	34
4.3 3) Tamaño de las nanopartículas y potencial ζ	35
4.4 INTERNALIZACIÓN DE S1-CRISPR/Cas9 EN MODELOS CELULARES	36
4.4 1) Caracterización de la toxicidad de las nanopartículas S1-CRISPR/Cas9 en la línea celular U2-OS.	36
4.4 2) Optimización de las condiciones de internalización de S1-GFP en la línea celular U2-OS	37
4.4 3) Ensayo de edición génica de GFP	39
CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA	42
BIBLIOGRAFÍA	43

ABREVIATURAS

Cas9d	Cas9 deficiente
Cas9n	Cas9 Nickasa
CASCADE	<i>CRISPR-associated complex for antiviral defense</i>
CRISPR	<i>Clustered, Regularly, Interspaced, Short, Palindromic, Repeats</i>
DRX	Difracción de rayos X
DSBs	Doble strand breaks
GFP	Green Fluorescent Protein
HDR	Homology direct repair
InDels	Inserciones y deleciones
MCM-41	Mobil composition of matter 41
NHEJ	Non-homologous end joining
NPs	Nanopartículas
NPSMs	Nanopartículas de sílice mesoporosas
p/p	Peso/peso
PAM	Protospacer adjacent Motive
PEI	Polietilenimina
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SSBs	Single strand breaks
TALENs	Nucleasas efectoras tipo activador de transcripción
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
ZFNs	Nucleasas con dedos de zinc

INTRODUCCIÓN

1. TECNOLOGÍA CRISPR/Cas9

1.1 1) Sistema CRISPR/Cas en su estado natural

CRISPR/Cas9 puede definirse como un sistema de defensa adaptativo frente a entes portadores de material genético presente en el genoma de bacterias y arqueas. El sistema consta de dos componentes: CRISPR y las proteínas Cas (Horvath & Barrangou 2010; Ran et al. 2013)

El acrónimo CRISPR corresponde a *Clustered, Regularly, Interspaced, Short, Palindromic, Repeats* o repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas. El *loci* CRISPR consiste en varias repeticiones directas separadas por secuencias de longitud similar hipervariables adquiridas a partir de virus y vectores detectados como perjudiciales para el microorganismo (Horvath & Barrangou 2010; Jansen et al. 2002; Mojica et al. 2005).

Los genes Cas codifican para una familia amplia y heterogénea de proteínas asociadas a CRISPR; comprenden nucleasas, helicasas, polimerasas y proteínas de unión a polinucleótidos, (Horvath & Barrangou 2010). La combinación de CRISPR con las proteínas Cas da lugar al sistema CRISPR/Cas.

La función inmune de defensa del sistema CRISPR/Cas se desarrolla en tres pasos (**figura 1**):

1. Adaptación/Inmunización
2. Expresión
3. Interferencia/Inmunidad

En el proceso de adquisición se incorporan nuevos espaciadores procedentes de ácidos nucleicos exógenos invasores entre dos repeticiones adyacentes del *locus* CRISPR. La secuencia nucleotídica exógena se conoce como protoespaciador, el cual tras ser incorporado en la secuencia CRISPR pasa a denominarse espaciador. El protoespaciador aparece flanqueado por una región altamente conservada en los sistemas CRISPR, llamada motivo adyacente al protoespaciador o PAM (Mojica et al. 2009). Su función en el sistema CRISPR es facilitar el reconocimiento y el posterior corte del protoespaciador. Tras esto, se produce la expresión del transcrito primario del RNA CRISPR (pre-crDNA) y, a continuación, es procesado en fragmentos más pequeños interferentes, denominados crDNA. El paso final es la interferencia; cuando el microorganismo sufre un ataque invasivo, el crDNA guía a las endonucleasas para cortar la secuencia de DNA exógena complementaria al espaciador previamente incorporado. Estos acontecimientos, permiten a los microorganismos identificar elementos extraños portadores de material genético y neutralizarlos (Barrangou & Marraffini 2014; Bhaya et al. 2011).

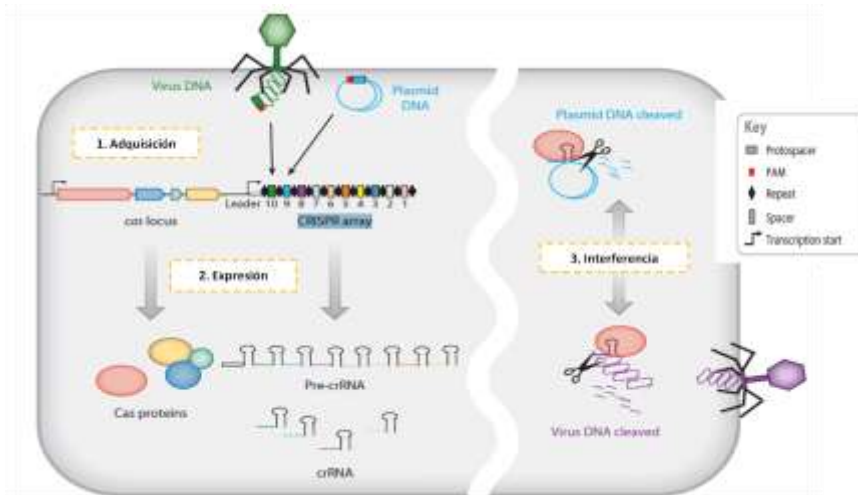


Figura 1. Mecanismo de defensa de microorganismos mediante el sistema CRISPR/Cas. Fase 1: adquisición. Se adquiere un protoespaciador situado aguas arriba de un PAM (barra roja) procedente de virus o plásmido, pasando a formar parte del conjunto de espaciadores (cajas de colores) del sistema CRISPR/Cas. **Fase 2: expresión.** El pre-crRNA es transcrito por la polimerasa y procesado a crRNA (horquilla con espaciadores de colores) por las proteínas Cas. **Fase 3: interferencia.** El crRNA complementario a la secuencia de DNA invasora comienza la degradación de la misma (representado como tijeras). Las proteínas Cas son necesarias para el proceso (círculo rosa). *Modificado a partir de CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation.*

Los sistemas CRISPR/Cas se clasifican en función de las proteínas Cas. Hasta la fecha se han identificado hasta 10 de estas. Las combinaciones complejas y variables en las que aparecen las proteínas Cas y otras asociadas al sistema CRISPR dificultan su clasificación. Según una de las últimas clasificaciones reportadas, basada en filogenia, secuencia, organización y contenido de *locus*, existen 3 tipos de sistemas CRISPR/Cas. Los genes Cas1 y Cas2 están universalmente distribuidos en todos los tipos. Además de estas, cada uno de los tipos CRISPR/Cas posee una secuencia Cas específica que permite diferenciarlos (Bhaya et al. 2011):

- Tipo I → Cas3
- Tipo II → Cas9
- Tipo III → Cas10

Mientras que los sistemas de tipo I y III requieren un sistema complejo de ribonucleoproteínas crDNA-Cas para conseguir su actividad nucleasa, el sistema tipo II, también conocido como sistema CRISPR/Cas9, solamente depende de la secuencia Cas9 para degradar el DNA del microorganismo invasor (**figura 2**). Por ello es este último el sistema que, recientemente, ha ganado más importancia y el más explotado para las aplicaciones ingeniería/edición genómica, así como la tecnología de elección para el presente trabajo.

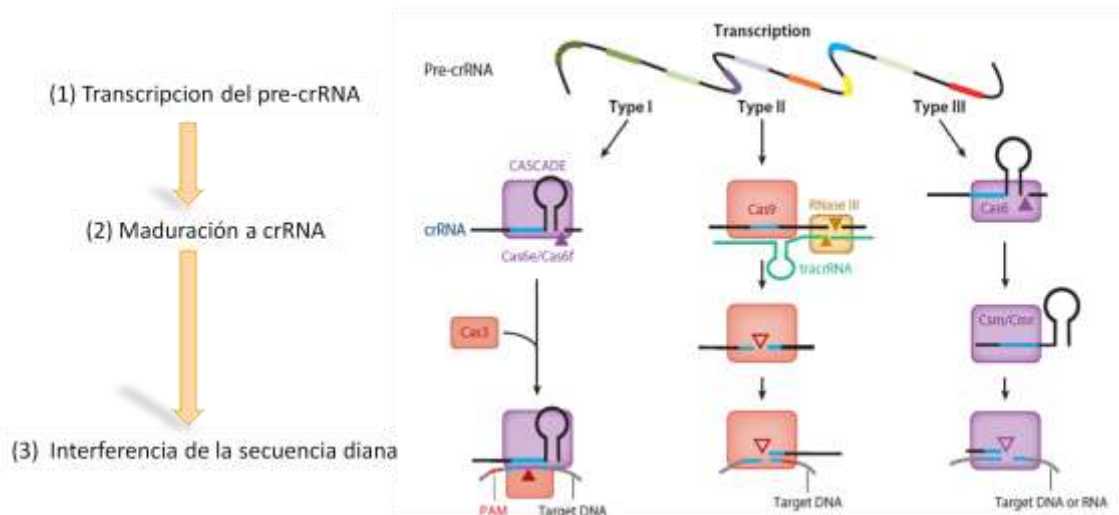


Figura 2. Representación del mecanismo de actuación de cada uno de los tipos de sistemas CRISPR/Cas. (1) La transcripción del pre-crRNA es común en todos los tipos. Tipo I: (2) la maduración del pre-crRNA cursa con la intervención de las proteínas CASCADE (*CRISPR-associated complex for antiviral defense*). El crRNA maduro está compuesto por el espaciador (azul) y un fragmento de la región repetida que forma una estructura en forma de horquilla. (3). En el proceso de interferencia, el crRNA junto con las proteínas CASCADE y Cas3 se encargan de degradar la secuencia diana, vía reconocimiento de PAM (rojo). Tipo II: (2) la RNasa III y el tracrRNA son necesarios para la maduración del crRNA. (3) Para la interferencia de la secuencia diana solamente es necesaria las Cas9 guiada por el crRNA. Tipo III: (2) la maduración del crRNA requiere a Cas6 y, probablemente, la presencia de un complejo Cas. (3) El crRNA junto con el complejo Cas procede a la interferencia del DNA invasor. *Modificado a partir de CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation* (Bhaya et al. 2011).

1.1 2) Sistema CRISPR/Cas9

Entre los tres tipos de sistemas CRISPR/Cas, el tipo II es el mejor estudiado y caracterizado. Su estructura genómica se muestra en la **figura 3A** (Hsu et al. 2014). Recientemente, se ha establecido que el sistema CRISPR/Cas9 requiere de un RNA auxiliar transactivador (tracrRNA), además de las endonucleasas y el *locus* CRISPR. El tracrRNA está involucrado en el procesamiento del pre-crRNA a crRNA, a través de la formación de un heterodúplex con las secuencias repetidas CRISPR (Bhaya et al. 2011). Tras la hibridación del crRNA con el tracrRNA, la endonucleasa Cas9 se dirige al protoespaciador situado aguas arriba de un PAM 5'-NGG-3' complementario a lo largo de 20 nucleótidos al espaciador codificado por el crRNA (**figura 3B**) (Hsu et al. 2014).

El sistema CRISPR/Cas9 fue el primero en ser adaptado para facilitar la edición genómica en células eucariotas. Para este fin el crRNA:tracrRNA puede constituirse en forma de heterodúplex igual que en la naturaleza o bien el dúplex se puede fusionar para crear un sgRNA (*single guideRNA*) quimérico, formado por una cadena con un lazo de unión entre sus elementos constituyentes (**figura 3B y 3C**). De esta forma el sistema puede ser programado para cortar virtualmente cualquier secuencia precedente a un PAM tipo 5'-NNG-3' en células animales (Cong et al. 2013; Nishimasu et al. 2015).

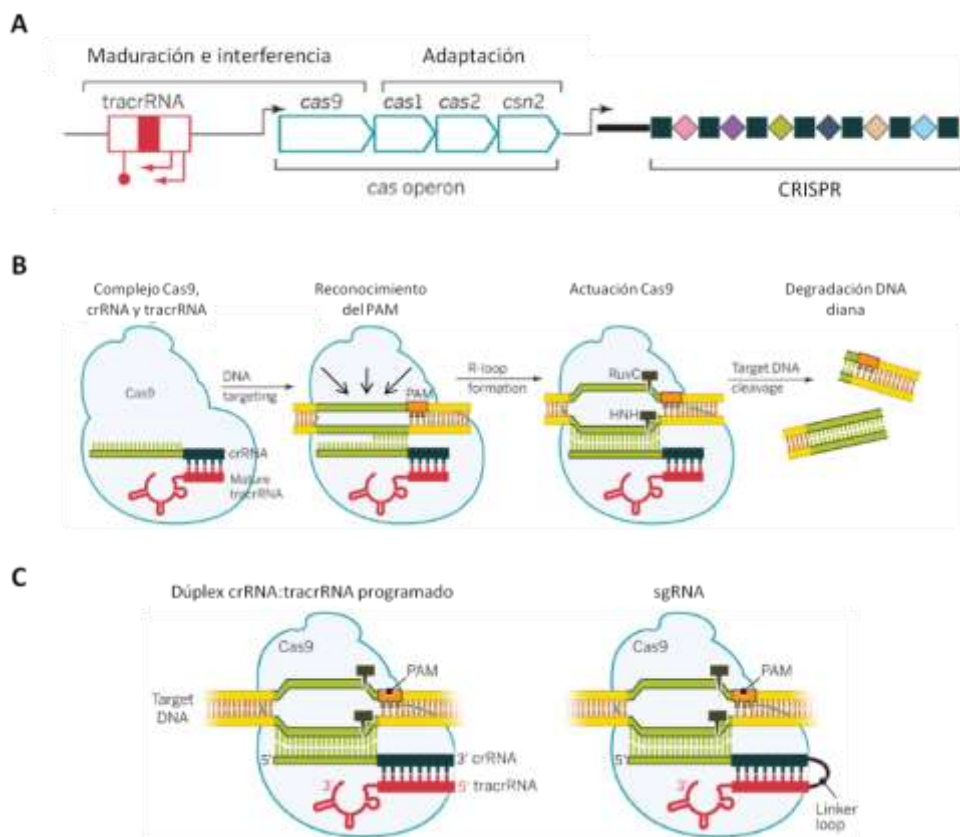


Figura 3. Representación del sistema CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. (A) De izquierda a derecha: *tracrRNA* implicado en la maduración del *crRNA* y en el proceso de interferencia, operón de genes Cas y conjunto de espaciadores incorporados tras varios ciclos de adaptación. (B) Vía natural de defensa antiviral. El reconocimiento del PAM (naranja) situado aguas abajo del protoespaciador (flechas negras) requiere la asociación previa de Cas9 con el dúplex *crRNA*:*tracrRNA*. Los dominios nucleasa de Cas9 (RuvC y HNH) generan DSBs en el DNA diana. (C) Heterodúplex *crRNA*:*tracrRNA* y *sgRNA* quimérico programados mediante ingeniería genética. *Modificado a partir de The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9* (Doudna & Charpentier 2014).

El otro componente del sistema, la endonucleasa Cas9, se caracteriza por su estructura bilobular, estando constituida por el dominio de reconocimiento (REC) y el dominio nucleasa (NUC). El primero de ellos a su vez se divide en tres subdominios, que son una α -hélice rica en arginina, REC1 y REC2. El lóbulo NUC consta de dos dominios nucleasa, RuvC y HNH, además de un dominio de interacción con PAM (PI). El dominio RuvC se ensambla a partir de los motivos RuvC I-III, entre los cuales descansa el dominio HNH. Ambos dominios, HNH y RuvC, cortan la cadena complementaria y no complementaria al RNA guía, respectivamente, generando roturas de doble cadena (DSBs). Por último, el dominio RuvC interactúa con el dominio PI para formar una superficie cargada positivamente que interactúa con el extremo 3' del *sgRNA* (figura 4)(Nishimasu et al. 2015).

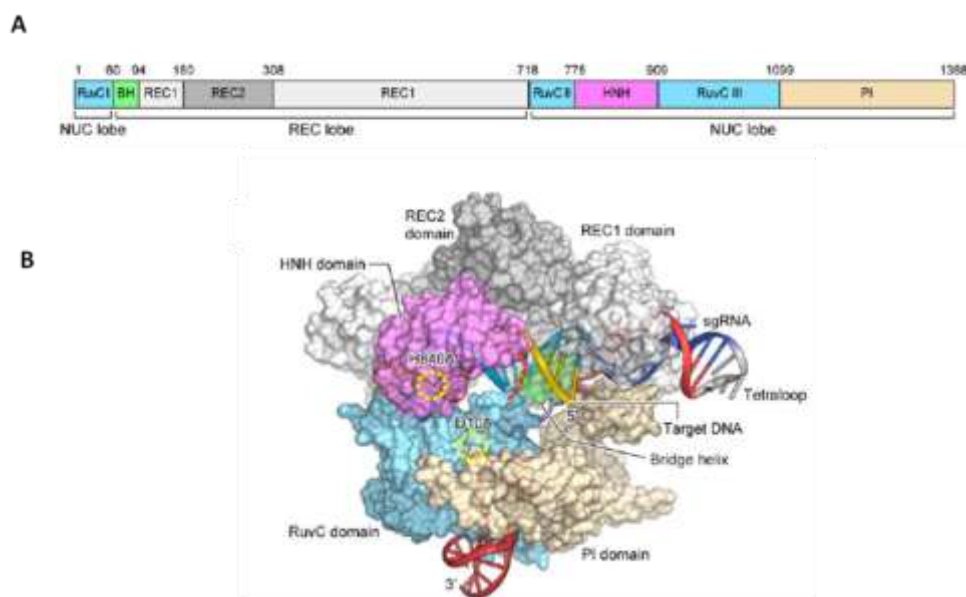


Figura 4. Organización de los dominios de Cas9 de *S. pyogenes*. (A) Representación del complejo Cas9-sgRNA-DNA. (B) Los sitios activos de los dominios RuvC (D10) y HNH (H400) se indican con círculos punteados amarillos. *Modificado a partir de Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA* (Nishimasu et al. 2015).

Teniendo en cuenta sendos componentes, el crRNA:tracrRNA y la Cas9, el sistema es capaz de cortar el protoespaciador cuando se produce el ataque de un ente genético llevando a las células invasoras hasta la muerte. Este fenómeno es posible gracias al mecanismo de reparación del DNA de los microorganismos. El corte con la endonucleasa induce lesiones cromosómicas que solo pueden ser reparadas con alta fidelidad, de esta manera queda reintroducida la secuencia diana, volviéndose imposible para el microorganismo escapar del sistema CRISPR/Cas9, lo que lo lleva, finalmente, a la muerte. Este fenómeno ha permitido la explotación de Cas9 como herramienta poderosa y eficiente en procesos de mutagénesis dirigida en bacterias (Barrangou & Marraffini 2014).

La presencia o ausencia de distintas Cas en el locus CRISPR lleva a la subclasificación del sistema tipo II (Chylinski et al. 2014):

- Tipo II-A: Cas1, Cas2, Cas9 y Csn2.
- Tipo II-B: Cas1, Cas2, Cas9 y Cas4.
- Tipo II-C: Cas1, Cas2 y Cas9.

El sistema CRISPR/Cas9 más utilizado en biotecnología corresponde al tipo II-B de *Streptococcus pyogenes* también conocido como SpCas9 (Cong et al. 2013; Hsu et al. 2014; Ran et al. 2013).

1.1. 3) Aplicaciones del sistema CRISPR/CAS9

De manera similar a las nucleasas con dedos de zinc (ZFNs) o a las nucleasas efectoras tipo activador de transcripción (TALENs), como se ha visto anteriormente, la nucleasa Cas9 también genera DSBs en el *locus* diana (Ran et al. 2013).

Las células animales siguen dos posibles vías para la reparación de una región genómica cortada: reparación directa por homología (HDR) o unión de los extremos no homólogos

(NHEJ), según se encuentre presente o no un molde de reparación. Ambas vías pueden explotarse para fines de ingeniería genética, utilizando como herramienta el sistema CRISPR/Cas9 (Barrangou & Marraffini 2014; Ran et al. 2013).

Cuando se introduce un molde de reparación exógeno con las alteraciones deseadas, se activa la vía de alta fidelidad HDR y se inicia un proceso de recombinación homóloga entre la secuencia diana y el molde de reparación (**figura 5**). Con este mecanismo se podría editar, potencialmente, cualquier posición en el genoma, mediante la sustitución de la secuencia diana por la secuencia del molde sintetizado en el laboratorio (Barrangou & Marraffini 2014; Ran et al. 2013).

Mediante la vía propensa a errores NHEJ, en la que no se encuentra presente el molde de reparación, se lleva a cabo el proceso de reparación religando los extremos de DNA resultantes de las DSBs, dando lugar, con ello, a modificaciones en forma de inserciones y deleciones (InDel)(**figura 5**). Esto permite la modificación de exones diana, generando cambios en la pauta de lectura o la aparición de codones de parada prematuros (Barrangou & Marraffini 2014; Ran et al. 2013).

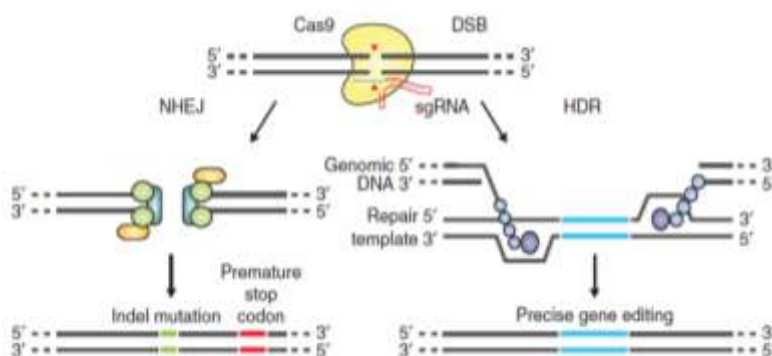


Figura 5. Vías de reparación de las roturas de doble cadena (DSB) en células animales. Los DSBs producidos por el sistema CRISPR/Cas9 permite la edición génica por dos posibles vías: NHEJ (izquierda) y HDR (derecha). Las InDels producidas por la vía NHEJ desemboca en genes knockout, debido a cambios en la pauta de lectura o aparición de codones de parada prematuros. Alternativamente, el molde de reparación usado en la vía HDR da lugar a una edición precisa en el sitio de corte (Rann Ann F. *et al*).

Así pues, mientras que la versión silvestre de Cas9 induce DSBs, existen versiones con los dominios nucleasa mutados que abren el abanico de posibles aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9. Mutaciones en la región catalítica del dominio RuvC, permiten a la enzima nickasa Cas9 (Cas9n) inducir cortes en una sola hebra de DNA (*Single Strand Breaks* o *SSBs*). Para su aplicación, se introduce un par de sgRNA – Cas9n para simultáneamente introducir SSBs en ambas hebras de DNA (**Figura 6A**). De esta manera se dobla el número de nucleótidos necesarios para reconocer la secuencia diana y se reduce el número de cortes indeseados (*off-target*)(Ran et al. 2013). Dando un paso más, ambos dominios catalíticos mutados generan una Cas9 deficiente sin actividad nucleasa (Cas9d) capaz de actuar como regulador transcripcional. Para implementar el sistema se fusiona la Cas9d con activadores/represores de la transcripción, que llevan a una regulación de la expresión de la secuencia diana del sgRNA (Perez-Pinera et al. 2013; Qi et al. 2013)(**Figura 6B**). Todo ello demuestra la versatilidad de la funcionalización de la enzima Cas9, de la cual derivan potenciales aplicaciones, tales como

reclutamiento de proteínas fluorescentes, enzimas modificadoras de la cromatina o motivos modificadores de epigenética (Ran et al. 2013; Perez-Pinera et al. 2013)

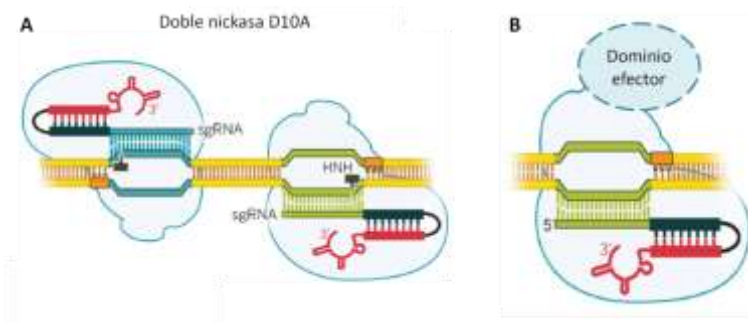


Figura 6. Variaciones de la endonucleasa Cas9 obtenidas mediante ingeniería genética. (A) Doble nickasa D10A Cas9n. Endonucleasa Cas9 mutada en el residuo 10 del dominio catalítico RuvC de aspártico a alanina (D10A) con la que se consiguen SSBs en la hebra complementaria al sgRNA. **(B)** Proteína de unión a DNA Cas9d. Mutaciones en residuos 10 de aspártico a alanina (D10A) y 840 de histidina a alanina (H840A) de los dominios RuvC y HNH, respectivamente, dan lugar a una Cas9 defectiva para la actividad nucleasa, que unida a dominios efectores (activadores o represores), llevan a la Cas9 a actuar como una proteína de unión de DNA guiada por el sgRNA. *Modificado de The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9* (Doudna & Charpentier 2014)

1.2 NANOMEDICINA

La nanotecnología es el área de la ciencia dedicada a la manipulación de la materia a escala nanométrica (100 nm o menos) para obtener sistemas con nuevas propiedades físicas y químicas, a menudo superiores a la materia inicial (Moghimi et al. 2016). Las aplicaciones de la nanotecnología se han expandido en los últimos años, incluyendo desde aplicaciones químicas, físicas y energéticas hasta aplicaciones químicas y biológicas (Jena et al. 2013)

La aplicación médica de las nanotecnologías dio lugar a la aparición del campo de la nanomedicina, que busca la aplicación de los nanomateriales para el tratamiento, diagnóstico, monitorización y control de sistemas biológicos (Lehner et al. 2013; Moghimi et al. 2016). Entre las aplicaciones biomédicas destacan los biosensores para el diagnóstico, nanopartículas magnéticas para técnicas de imagen y biomateriales para implantes e ingeniería de tejidos (Doyle 2013). No obstante, el mercado de la nanomedicina está dominado por los sistemas de liberación controlada de fármacos (Wagner et al. 2006).

Dichos nanomateriales usualmente están compuestos por: 1) una plataforma transportadora, 2) una carga con función específica y, opcionalmente, 3) por moléculas que dirigen el sistema a alguna región específica de interés (órganos, tejidos u orgánulos)(figura 7). Desde la aparición de la nanomedicina, diversos materiales han sido utilizados como sistemas transportadores: liposomas, nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas y orgánicas, cuántum dots, nanogeles y partículas peptídicas, entre otros (Lehner et al. 2013).

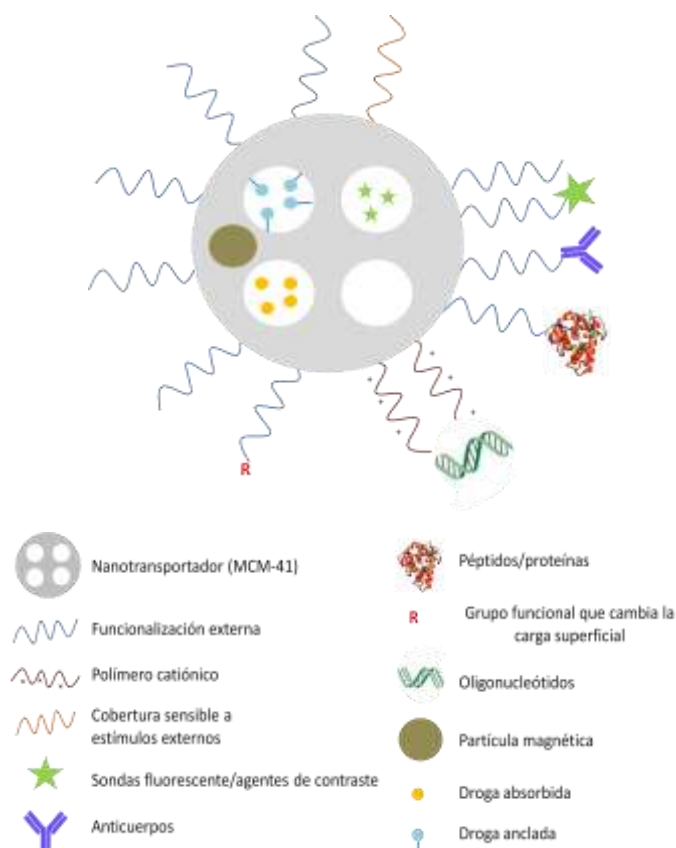


Figura 7. Representación de un sistema nanotransportador. 1) Plataforma transportadora representada como una nanopartícula de sílice mesoporosa (MCM-41) funcionalizada en su superficie con diferentes (bio)moléculas. **2)** Cargo con función específica. Las moléculas pequeñas, como drogas y prodrogas, se cargan en el interior de los poros de las nanopartículas mediante técnicas de absorción o anclaje. Las biomoléculas como péptidos/proteínas, oligonucleótidos o anticuerpos pueden absorberse o anclarse en la superficie externa del sistema transportador. En el interior de la matriz mesoporosa pueden incorporarse nanopartículas magnéticas apropiadas para tratamientos de hipertermia, técnicas de resonancia magnética o guía magnética. Las moléculas para técnicas de imagen, fluoróforos o agentes de contraste, pueden adsorberse en la superficie interna o externa del sistema. **3)** Moléculas para *targeting* específico: ciertas biomoléculas ancladas en superficie, como proteínas y anticuerpos, pueden utilizarse para dirigir el sistema hasta la región específica donde se requiere que la nanopartícula ejerza su función. *Modificado a partir de Mesoporous silicananoparticles for the design of smart delivery nanodevices* (Colilla et al. 2013)

La nanomedicina aporta numerosas ventajas sobre los sistemas de diagnóstico y terapia convencionales. Los nanotransportadores consiguen incrementar considerablemente la sensibilidad de las técnicas de imagen. Además, los sistemas de liberación controlada mejoran el efecto terapéutico de fármacos respecto a su formulación libre; aumenta su solubilidad, biocompatibilidad y especificidad, mejora las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, a la par que reduce los efectos adversos indeseados (Lehner et al. 2013; Bawarski et al. 2008).

1.3 NANOPARTICULAS DE SÍLICE MESOPOROSAS (MCM-41)

Numerosas investigaciones recientes se centran en el diseño sistemas de liberación controlada específicos de diana, es decir, sistemas biocompatibles y estables capaces de transportar una dosis efectiva de fármaco sin liberación a tiempo cero y que únicamente entregan su contenido en la específica diana interés; ya sea ésta un tejido, un órgano o incluso un orgánulo (Slowing et al. 2008).

Entre los distintos materiales utilizados para la liberación controlada, los materiales de sílice son frecuentemente el material inorgánico de elección para usos biológicos, debido a su biocompatibilidad. Por citar algunos ejemplos, los materiales de sílice se han utilizado en la formulación de implantes artificiales, como sistemas de liberación de antibióticos y quimioterápicos, así como para incrementar la biocompatibilidad de nanopartículas magnéticas, polímeros o micelas (Slowing et al. 2008; Wang et al. 2015).

Las nanopartículas mesoporosas de sílice (NPMS) de tipo MCM-41 son materiales sólidos compuestos por una estructura porosa similar a un panal de abejas con cientos de poros uniformes hexagonales (mesoporos), que son capaces de absorber/encapsular grandes cantidades de sustancias bioactivas (Slowing et al. 2008).

En comparación con otros nanotransportadores porosos de sílice, las MCM-41 reúnen una serie de propiedades que las hacen ideales para su uso en aplicaciones biomédicas (Slowing et al. 2008; Aznar et al. 2016)

- **Tamaño de partícula controlable:** se pueden obtener partículas entre 50 y 300 nm, lo cual facilita la endocitosis por parte de células animales y vegetales.
- **Tamaño de poro uniforme y controlable:** estos materiales poseen una estrecha distribución del tamaño de poro, que pueden ser regulados entre los 2 nm y los 10 nm. Ello permite un controlar con gran precisión la carga y la cinética de liberación.
- **Estructura estable:** las nanopartículas de sílice son resistentes al calor, al pH, al estrés mecánico y a la degradación por hidrólisis.
- **Elevada área superficial y gran volumen de poro:** gracias a su elevada área superficial ($>900 \text{ m}^2/\text{g}$) y a su gran volumen de poro ($>0.9 \text{ cm}^3/\text{g}$), las MCM-41 poseen una elevada capacidad de carga/absorción de moléculas pequeñas (drogas) y otras más grandes (proteínas u oligonucleótidos).
- **Estructura única de poro:** los poros hexagonales de las MCM-41 no están interconectados, de manera que cada uno de los poros es un compartimento independiente. Esto ayuda a evitar el escape indeseado de la molécula cargada a tiempo cero; aunque no todos los poros hayan sido bloqueados tras la funcionalización, los poros cilíndricos individuales tapados por ambos lados todavía pueden servir de reservorios individuales.
- **Dos superficies funcionalizables (interna y externa):** se puede cargar el interior de los poros hexagonales con diversas moléculas: fármacos, fluoróforos, agentes de contraste, etc. Por otro lado, este tipo de materiales presentan numerosos grupos silanoles (Si-OH) sin reaccionar en su superficie; la funcionalización del soporte inorgánico mediante sustitución del grupo OH por(bio)moléculas da lugar a los materiales híbridos orgánico – inorgánico

1.4 CONCEPTO DE PUERTA MOLECULAR

Uno de los aspectos más atractivos de las NPSMs es la posibilidad de funcionalización de la superficie externa. Las NPSMs permiten su funcionalización con moléculas orgánicas de diversas naturalezas, tamaños y formas (oligonucleótidos, péptidos, enzimas, azúcares, etc.), que actúan como “puertas moleculares”. Así surgen nanodispositivos híbridos orgánicos - inorgánicos capaces de liberar la carga en respuesta estímulos predefinidos (Aznar et al. 2016).

El funcionamiento de las puertas moleculares es el siguiente: las puertas moleculares de los nanomateriales híbridos son capaces de cambiar entre dos estados: cerrado y abierto, de manera controlada en respuesta a estímulos externos: luz, temperatura, pH, reacciones redox, etc. Con ello, se consigue liberar sustancias químicas o biomoléculas desde el interior/superficie de la nanopartícula hasta el medio externo de manera finamente controlada en respuesta a un estímulo predefinido en función de nuestras necesidades (Slowing et al. 2008; Aznar et al. 2016). La **figura 8** muestra una NPSM de tipo MCM-41 funcionalizada con una puerta molecular y su mecanismo de funcionamiento.

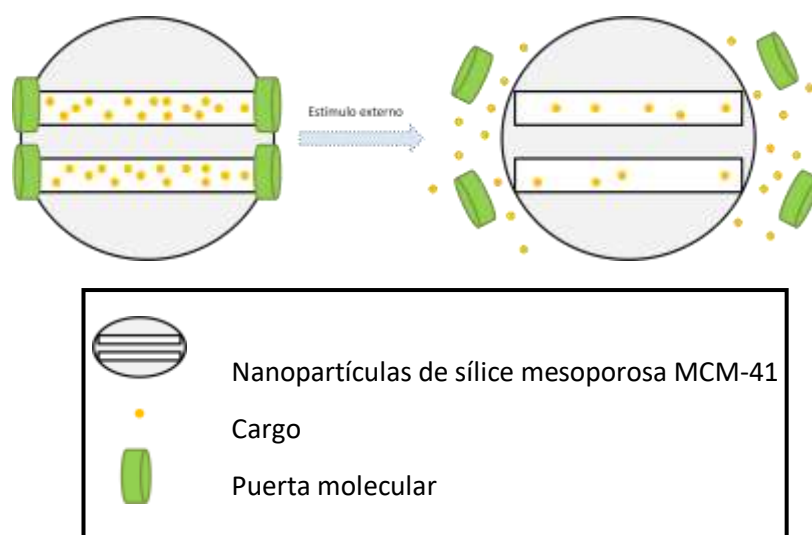


Figura 8. Esquema de una nanopartículas mesoporosa de sílice de tipo MCM-41 y su mecanismo de funcionamiento. El esquema representa un soporte inorgánico cargado con una molécula de interés y funcionalizada con una molécula orgánica que actúa como puerta molecular. La aplicación de un estímulo externo favorece la liberación del cargo debido a cambios (hidrólisis, cambio en conformación, liberación, etc.) en la puerta molecular. *Modificado a partir de Mesoporous silicananoparticles for the design of smart delivery nanodevices* (Wang et al. 2015)

1.5 NANOPARTÍCULAS COMO SISTEMAS DE ENTREGA DE GENES

Una ventaja adicional que se ha atribuido a los nanotransportadores es la capacidad de actuar como agentes eficientes de entrega de ácidos nucleicos (DNA, miRNA, siRNA). Tradicionalmente, para este fin se han utilizado vectores virales, incluso algunos de ellos se encuentran aprobados para su uso clínico. Sin embargo, la preocupación derivada de su inmunogenicidad y riesgo de mutación, ha llevado a plantearse el uso de sistemas de

transfección sintéticos, que son más seguros y más fáciles de producir a gran escala (Saraiva et al. 2017).

El diseño de nanotransportadores sintéticos no virales de polinucleótidos ha evolucionado a lo largo del tiempo, desde simples nanocomplejos de polímeros catiónicos, como la polietilenimina (PEI)(**figura 9A**), hasta nanopartículas más sofisticadas. Para esta última aplicación se pueden utilizar diversos materiales: poliésteres, liposomas, dendrímeros, etc. (Saraiva et al. 2017; Slowing et al. 2008)

Los oligonucleótidos pueden cargarse en el interior de los poros de la nanopartículas de sílice o bien pueden anclarse a la superficie mesoporosa de manera covalente o por interacción electrostática. La estrategia más sencilla y, por consiguiente, la más utilizada consiste en la modificación catiónica superficial de la nanopartícula inorgánica. Para ello se utilizan moléculas orgánicas catiónicas (poliamidoamina, PEI o poli-L-lisina), que establecen una interacción electrostática con los oligonucleótidos cargados negativamente (**figura 9B**)(Vivo et al. 2012; Mamaeva et al. 2013).

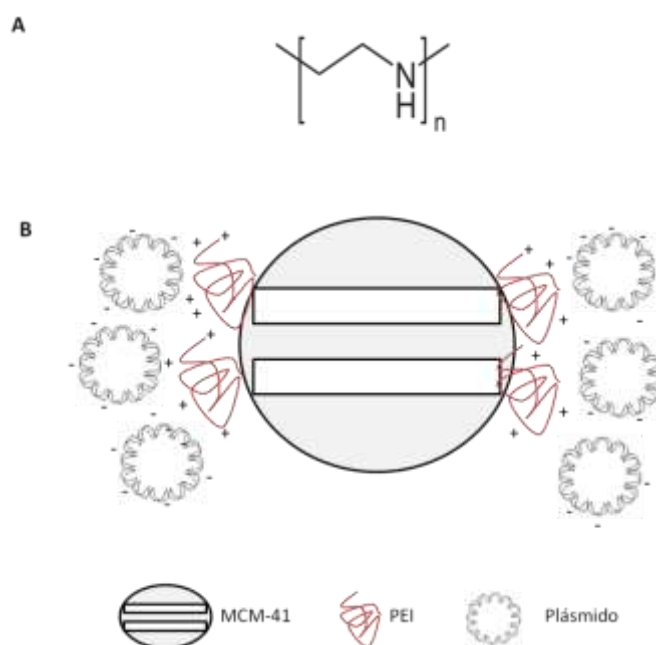


Figura 9. (A) Fórmula molecular del PEI y (B) representación esquemática de nanosistema transportador. NPSM funcionalizada con PEI y los plásmidos CRISPR/Cas9 o GFP.

Como se ha comentado, el PEI (**figura 9A**) se ha utilizado tradicionalmente como agente de transfección sintético. Se trata de un polímero sintético catiónico capaz de acomplejarse electrostáticamente con los ácidos nucleicos, formando pequeñas partículas que resultan eficientes para la transfección (Xia et al. 2009). De la funcionalización de las NPSM con dicho polímero se deriva un doble beneficio: la transfección eficiente que aporta PEI y las ventajas asociadas al uso de NPSM comentadas previamente, como son la liberación controlada de fármacos o la posibilidad de realizar un *targeting* específico.

Está demostrado que la mayoría de las nanopartículas son internalizadas mediante endocitosis (Ma 2014). Este es un proceso complejo mediante el que las células utilizan parte de su membrana celular para crear vesículas (endosomas) dentro de las cuales quedan las nanopartículas. El endosoma posteriormente se fusiona con los lisosomas, que son orgánulos

celulares con pH ácido que contienen numerosas enzimas digestivas, por lo que la fusión endosoma-lisosoma podría provocar la degradación de las biomoléculas ancladas a los nanodispositivos. Es por ello que un paso fundamental para que el proceso de transfección sea eficiente es facilitar el *escape endosomal* para asegurar los plásmidos son liberados al citoplasma y alcanzan el núcleo en última instancia (Ma 2014; Du et al. 2014).

Para lograr el *escape de la vía endosomal* la funcionalización con PEI es muy utilizada. Se trata de una molécula con numerosos grupos amino protonables que ejerce un efecto tampón de pH (efecto esponja de protones). Aunque no se conoce exactamente, el mecanismo de actuación propuesto por el cual facilita el escape endosomal es el siguiente: durante el trayecto de la nanopartícula hacia los endosomas tardíos o lisosomas, los endosomas se acidifican desde el pH fisiológico hasta pH 5,5, lo que provoca un gran incremento del grado de protonación del PEI. La acumulación de cargas positivas en el interior de las vesículas se contrarresta con una entrada pasiva de iones cloro para mantener la neutralidad. Este gran aumento de la concentración de iones va acompañado de la entrada de moléculas de agua que provocan el hinchamiento del orgánulo y la ruptura de su membrana, y por consiguiente la liberación al citoplasma de las nanopartículas y de los plásmidos, que finalmente logran transformar el núcleo celular (**figura 10**)(Ma 2014; Du et al. 2014).

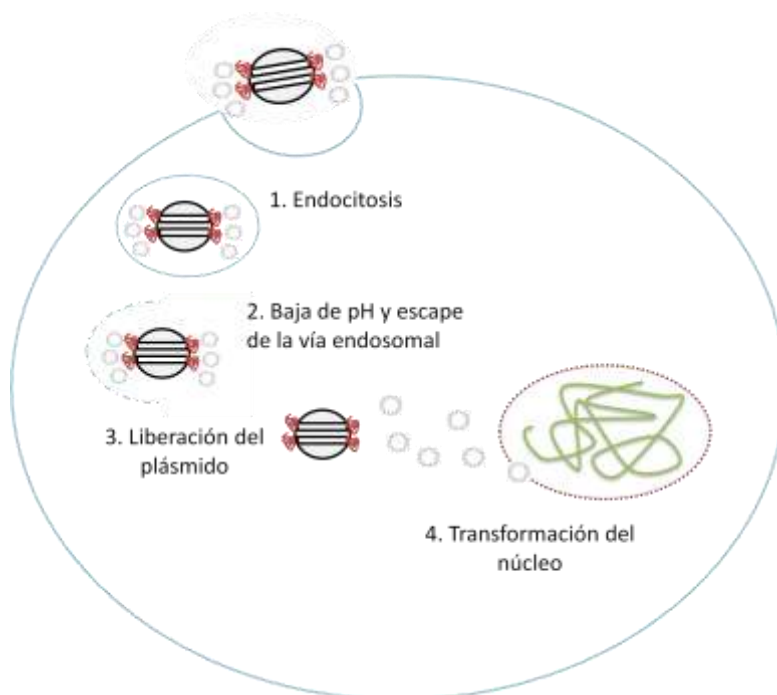


Figura 10. Representación esquemática del funcionamiento del nanodispositivo. 1) Las NPSM son internalizadas en la célula vía endocitosis. **2)** Las partículas atrapadas en el interior de los endosomas son sometidas a una bajada de pH, provocando la protonación del PEI y como consecuencia el escape endosomal: hinchamiento osmótico y rotura de la membrana del endosoma. **3)** Las nanopartículas liberan el plásmido en el citoplasma, **4)** el cual llega finalmente al núcleo celular y produce la transformación o la edición génica requerida.

En la bibliografía se encuentran numerosos ejemplos que se centran en el desarrollo de nanodispositivos como sistemas transportadores de oligonucleótidos. Concretamente, se han desarrollado NPSMs capaces de llevar a cabo un silenciamiento génico efectivo a base de siRNA, dirigido, por ejemplo, contra los oncogenes c-myc y glicoproteína P, o contra la proteína

fluorescente verde (GFP) (Du et al. 2014; Meng et al. 2013; Xia et al. 2009). Asimismo, existen NPSMs capaces de actuar como sistemas de entrega de plásmidos de DNA; la mayoría de ejemplos encontrados en la bibliografía son pruebas preliminares de transfección de GFP, que demuestran la efectividad del sistema como sistemas de transporte y entrega de genes (Xia et al. 2009; Torney et al. 2007).

HIÓTESIS Y OBJETIVOS

La **hipótesis** de este trabajo sostiene que las nanopartículas de sílice mesoporosas (NPSMs) son capaces de actuar como vehículos de transfección eficientes de ácidos nucleicos para la edición génica. Concretamente, la transfección eficiente con el sistema CRISPR/Cas9 de líneas celulares humanas permitirá la edición génica de GFP como prueba de concepto. Una vez optimizadas las condiciones de transfección utilizando este nanodispositivo se planteará su utilización como vehículo de transporte multifuncional. Así las nanopartículas se utilizarán como sistemas de liberación controlada de fármacos/agentes de contraste con fines terapéuticos, al mismo tiempo que se realizará una edición génica de genes de interés terapéutico.

- **Objetivo 1:** obtención del plásmido CRISPR/Cas9 dirigido a la edición de GFP en líneas celulares humanas.
 - **Objetivo 1.1:** Optimización del proceso de ligación del plásmido pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 con los insertos dirigidos a la edición de GFP.
- **Objetivo 2:** obtención de las nanopartículas dirigidas a la edición de GFP.
 - **Objetivo 2.1:** síntesis de las nanopartículas de sílice mesoporosas.
 - **Objetivo 2.2:** caracterización de las nanopartículas de sílice mesoporosas mediante técnicas habituales del campo de la química de los materiales (difracción de rayos X de polvo, TEM y potencial ζ).
 - **Objetivo 2.3:** optimización de la relación de funcionalización nanopartículas-CRISPR/Cas9.
- **Objetivo 3:** evaluación de la toxicidad de las nanopartículas funcionalizadas con el plásmido CRISPR/Cas9 en líneas celulares humanas.
- **Objetivo 4:** optimización y evaluación del proceso de transporte y liberación de plásmidos en líneas celulares humanas.
 - **Objetivo 4.1:** puesta a punto del proceso de transfección utilizando las nanopartículas como sistemas de transporte del plásmido codificante de GFP en líneas celulares humanas negativas para la expresión de GFP.
 - **Objetivo 4.2:** puesta a punto del proceso de edición génica de GFP utilizando las nanopartículas como agente de transfección del plásmido CRISPR/Cas9 en líneas celulares humanas positivas para la expresión de GFP.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS CRISPR/Cas9 Y GFP

3.1 1) Reactivos

El plásmido codificante de la enzima endonucleasa Cas9 de nombre comercial pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 fue proporcionado por Feng Zhang (Addgene plasmid # 42230). El plásmido codificante de GFP pGFP-N1 se obtuvo de Addgene. Los oligonucleótidos codificantes los sgRNA fueron adquiridos de la casa comercial Fisher Scientific. El kit de digestión enzimática con la enzima BbsI fue proporcionado con Thermo Scientific. La polinucleótido kinasa T4 se obtuvo de Thermo Fisher y la fosfatasa alcalina y la ligasa rápida fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Las cepas bacterianas Stbl4 y DH5 α fueron adquiridas de Invitrogen. El kit de purificación de DNA fue obtenido de la casa comercial Machinery-Nagel. La agarosa se obtuvo de Sigma Aldrich y el agente de tinción de ácidos nucleicos REALSAFE se adquirió de Durviz S.L.

3.1 2) Diseño del RNA guía o sgRNA

Los oligonucleótidos codificantes del sgRNA se diseñaron en base a la secuencia genómica que se deseaba silenciar (GFP) y siguiendo las recomendaciones de la bibliografía; esto es una longitud de 20 nucleótidos complementarios a 20 nucleótidos de la secuencia GFP seguidos por un PAM: 5'-(N₂₀)-NGG-3'.

Para ello se utilizó la herramienta de acceso libre RGEN CRISPR Tools (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>). Esta herramienta devuelve una lista de sgRNA, además de diferentes parámetros para cada uno de ellos, siendo el más importante la probabilidad de *off-target* (*out-of frame score*). Además, se diseñó un oligonucleótido aleatorio (crRNA) como control negativo de edición génica para los sucesivos ensayos celulares.

3.1 3) Digestión y desfosforilación de pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9

Para el clonaje de los insertos sgRNA149 dirigido a la edición de GFP y crRNA en el plásmido pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 es necesaria la previa digestión de este último utilizando la enzima BpiI (BbsI). Para ello se utilizaron 6 μ L del plásmido a 1 μ g/mL, 3 μ L del buffer G 10X, 3 μ L de enzima (30U) y 18 μ L de agua libre de DNAsa, incubando la mezcla de reacción a 37°C durante toda la noche.

Tras la digestión, el plásmido fue desfosforilado mediante la fosfatasa alcalina rápida. Para ello se utilizaron 10 μ L del vector digerido, 2 μ L de la enzima, 2 μ L de buffer 10X y 6 μ L de agua libre de DNAsa. La enzima se dejó actuar a 37°C durante 45 minutos y después se inactivó a 65°C durante 15 minutos.

3.1. 4) Anillamiento y fosforilación de sgRNA149 y crRNA

Con el objetivo de poder introducir los oligonucleótidos sgRNA149 y crRNA en el plásmido pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 ya digerido, se procedió al anillamiento (*annealing*) y fosforilación de los mismos en una sola reacción.

Para la reacción se incubaron 2 μL de los oligonucleótidos directos y reversos sgRNA149 y crRNA (100 μM), 1 μL de polinucleótido kinasa T4, 1 μL de ATP (100 mM), 2 μL de buffer A y 13 μL de H_2O libre de DNasa a 37°C durante 45 minutos. Para la desactivación enzimática la reacción se llevó a 95°C, manteniéndola a esta temperatura durante 5 minutos. Finalmente, se dejó descender la temperatura progresivamente para permitir el anillado de los insertos.

3.1 5) Optimización de la ligación de pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 con sgRNA149 y crRNA

El último paso en la obtención del plásmido CRISPR/Cas9 fue la ligación del plásmido vacío pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 con el sgRNA149 y el crRNA.

Fue necesaria la puesta a punto previa de la relación plásmido/inserto que se debía hacer reaccionar. Partiendo de una concentración de plásmido de 15 $\text{ng}/\mu\text{L}$, se probaron dos condiciones plásmido/inserto 1:2 y 1:10, utilizando 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y 150 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de los insertos, respectivamente.

Para llevar a cabo el proceso de ligación se incubó la mezcla plásmido/inserto junto con 1 μL de ligasa y los buffers de reacción proporcionados por el fabricante a 20°C durante 5 minutos, obteniéndose los plásmidos finales CRISPR/Cas9 sgRNA149 y CRISPR/Cas9 crRNA.

En la **figura 11** se muestra un esquema a modo de resumen de los pasos seguidos para conseguir la ligación exitosa del plásmido y los insertos.

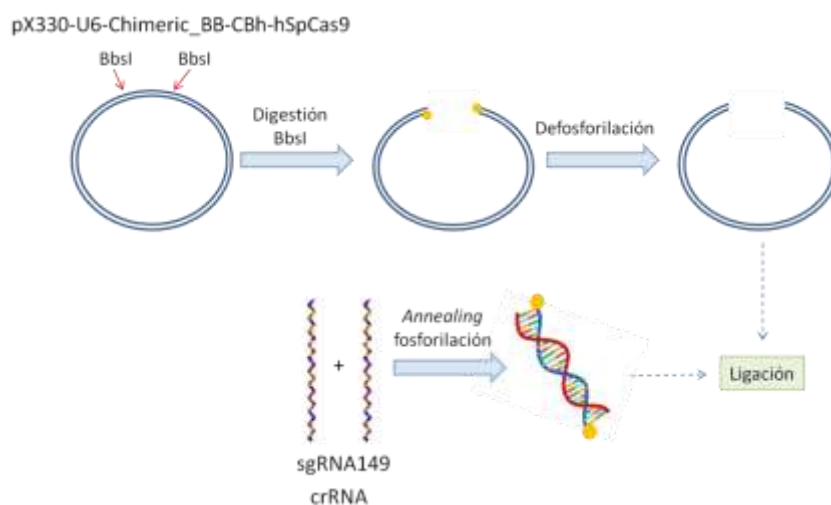


Figura 11. Esquema del proceso seguido para la ligación pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 – sgRNA149 o crRNA.

3.1 6) Amplificación y purificación de los plásmidos CRISPR/Cas9

Los plásmidos finales: CRISPR/Cas9 sgRNA149 y CRISPR/Cas9 crRNA se amplificaron mediante técnicas de transformación bacteriana. En la **figura 12** se muestra en forma de esquema un resumen del proceso.

La amplificación de los plásmidos CRISPR/Cas9 se llevó a cabo en la cepa bacteriana St1b4 adecuada para plásmidos inestables. Los 50 μL de bacterias fueron transformadas con 3 μL del

producto de la ligación mediante electroporación (*Micropulser Biorad*): 1 pulso de 180 kV durante 5 segundos, y crecidas a 37°C durante toda la noche en placas de LB ampicilina 0.1 µL/mL.

A partir de una de las colonias aisladas crecidas en las placas de LB, se establecieron cultivos líquidos de sendas cepas bacterianas para, posteriormente, purificar los plásmidos que estas contenían. La composición de los cultivos líquidos fue la siguiente: 10 mL LB, ampicilina 0.1 µL/mL y una colonia obtenida de las placas. Tras incubar dichos cultivos durante toda la noche a 37°C se continuó con la purificación del DNA plasmídico siguiendo el protocolo y el material proporcionado por la casa comercial Machinery-Nagel. La cuantificación y la evaluación de la pureza de las muestras finales se llevaron a cabo mediante técnicas espectrofotométricas (*nanodropND-1000 spectrophotometer*).

El proceso se hizo por duplicado para las dos condiciones (plásmido/inserto 1:2 y 1:10) de cada uno de los plásmidos CRISPR/Cas9, obteniéndose así un total 8 muestras finales.

3.1 7) Determinación de la conformación de los plásmidos

La conformación de los plásmidos obtenidos se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/p).

Para la preparación de las muestras se disolvieron 200 ng en H₂O libre de DNAsa y se añadieron 4 µL de tampón de carga 6X.

El gel de agarosa al 1% se elaboró disolviendo 1g de agarosa en 100 mL de tampón TAE 1X. Una vez bien disuelta la agarosa se añadieron 5 µL de REALSAFE. El gel se dejó polimerizar durante 30 minutos aproximadamente y a continuación se cargaron las muestras que se deseaban visualizar. La electroforesis se llevó a cabo a 100V durante aproximadamente 30 minutos y, finalmente, se tomó la imagen utilizando el sistema de obtención de imágenes Biorad (*Gel Doc XR+*).

3.1 8) Secuenciación

Los plásmidos finales CRISPR/Cas9 sgRNA149 y CRISPR/Cas9 crRNA se secuenciaron en el servicio de secuenciación del Centro de Investigación del Príncipe Felipe, con el objetivo de determinar que la ligación había sido exitosa y se había obtenido la secuencia correcta para ambos plásmidos.

Las muestras se prepararon en H₂O libre de DNAsa a una concentración de 200 ng/µL. El primer U6 utilizado (5'-TGGACTATCATATGCTTACC-3') se preparó a una concentración de 10 µM.

3.1 9) Amplificación y purificación de los plásmidos CRISPR/Cas9 y GFP para los ensayos celulares

Los plásmidos finales de secuencia correcta se volvieron a amplificar mediante electroporación (*Micropulser Biorad*): 1 pulso de 180 kV durante 5 segundos, en la cepa bacteriana StbI4 para así obtener una cantidad suficiente para realizar los ensayos celulares.

Por otro lado, el plásmido codificante de la GFP fue amplificado en la cepa DH5α. Se transformó 1 µL de plásmido (100 ng/µL) mediante choque térmico (*Termomixer Confort*

Eppendorf): 42°C durante 90 segundos, y tras 1 h de recuperación en LB, las bacterias fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en placas de LB kanamicina 0.1 µL/mL.

A partir de las colonias aisladas en las placas de LB se elaboraron cultivos líquidos: 100 mL LB, antibiótico 0.1 µL/mL (ampicilina para los plásmidos CRISPR/Cas9 y kanamicina para el plásmido GFP) y una colonia obtenida de las placas. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación toda la noche. Al día siguiente se purificaron los plásmidos bacterianos siguiendo el protocolo y el material proporcionado por la casa comercial Machinery-Nagel. La cuantificación y la evaluación de la pureza de las muestras finales se llevaron a cabo mediante técnicas espectrofotométricas (*nanodrop ND-1000 spectrophotometer*).

Por último, todos los plásmidos se alicuotaron para su conservación congelados a -20°C.

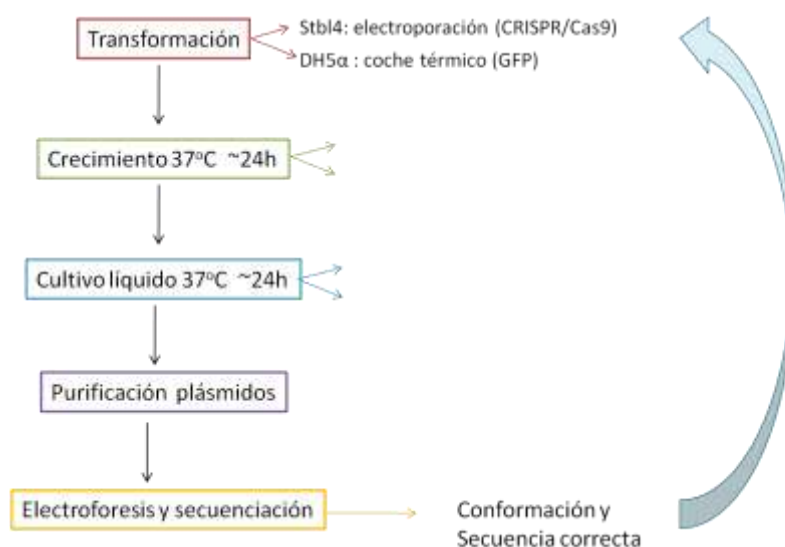


Figura 12. Esquema del proceso de amplificación y purificación de los plásmidos CRISPR/Cas9 sgRNA149, CRISPR/Cas9 crRNA y GFP.

3.2 SÍNTESIS DEL MATERIAL MCM-41

3.2 1) Reactivos

Los reactivos tetraetilortosilicato (TEOS) (98%), bromuro n-cetiltrimetilamonio (CTAB) (≥99 %), el hidróxido de sodio (NaOH) (≥98 %) y el PEI 10000 MW fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

3.2 2) Síntesis del soporte de sílice mesoporoso MCM-41

La síntesis del soporte mesoporoso de tipo MCM-41 se llevó a cabo mediante un proceso basado en el uso de tetraetilortosilicato (TEOS) como fuente inorgánica de silicio y el tenso activo bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como surfactante director de la estructura o *template* (Mas Font 2014; Gibson 2014; Raji & Pakizeh 2017). El proceso completo de síntesis de la estructura de la MCM-41 se muestra en la **figura 13**.

Para ello se disolvió 1g de CTAB (2,74 mmol) en 480 mL de agua (H₂O) desionizada. Dicha disolución se dejó agitando a 1000 rpm en una placa calefactora a 28°C. A continuación, se añadieron rápidamente 3,5 mL de NaOH (2 M), se ajustó la temperatura de la disolución hasta 80°C y se añadieron gota a gota 5 mL de TEOS (2,57x10⁻² mol). La disolución se dejó incubar en

agitación durante 2 horas, hasta observarse la formación de un precipitado blanco. Posteriormente, el producto sólido obtenido se centrifugó a 9500 rpm durante 20 minutos y se sometió a sucesivos procesos de lavado con H₂O desionizada hasta neutralizar el pH de la reacción. Una vez alcanzado el pH deseado, el material se dejó secando en la estufa a 60°C durante 24h para eliminar la humedad. Finalmente, se procedió a la extracción del CTAB utilizado como molde, mediante calcinación en la mufla (*Mufla Furnace*), utilizando un programa basado en el calentamiento a 500°C en una atmosfera oxidante durante 5 horas. Al eliminar el agente director de la estructura, los poros quedan libres y vacíos para continuar con la síntesis del material.

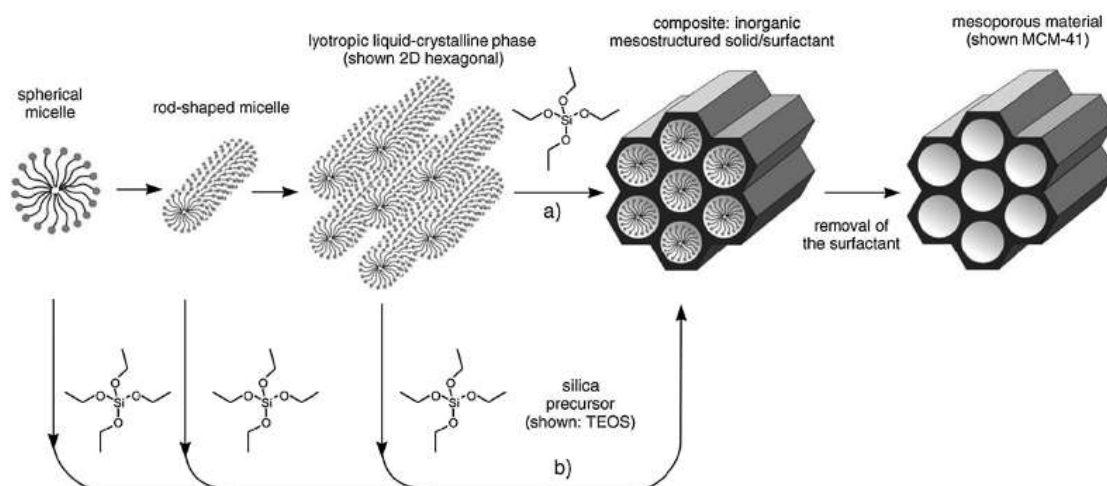


Figura 13. Proceso de síntesis de las NPSM tipo MCM-41. Las micelas del agente tensoactivo CTAB forma agregados micelares cilíndricos, que a su vez organizan en estructuras hexagonales. A continuación, se produce la condensación del precursor inorgánico TEOS alrededor del CTAB y por último se extrae el surfactante mediante calcinación, dejando libre la estructura porosa hexagonal característica de las MCM-41. *Extraída de Mesosilica materials and organic pollutant adsorption: part A removal from air (Gibson 2014).*

3.2 3) Puesta a punto de la funcionalización del material MCM-41

En primer lugar, la MCM-41 se funcionalizó con el polímero catiónico PEI. Para ello se resuspendieron 15 mg del sólido procedentes de la calcinación en 4 mL de EtOH y se añadieron 7,5 mg de PEI 10000 MW, obteniendo una relación sólido/PEI (p/p) 2:1. La suspensión se dejó agitando a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, se centrifugó a 9500 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante. El sólido resultante, abreviado como S1, se dejó secar a 37°C.

Para la adsorción del plásmido CRISPR/Cas9 sobre el nanomaterial S1, se pesaron 0,5 mg de S1 y se resuspendieron en 1 mL de PBS. A continuación, se añadieron diferentes proporciones del plásmido CRISPR/Cas9 sgRNA 149 para obtener las relaciones S1/plásmido (p/p): 10:1, 50:1, 200:1 y 500:1. El sólido junto con los plásmidos se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación a 1000 rpm. Los sólidos resultantes funcionalizados se sometieron a un proceso de lavado mediante centrifugación a 9500 rpm durante 2 minutos. Las aguas de lavado se sometieron a electroforesis para poder determinar la relación S1/plásmido óptima. En este caso las muestras se prepararon a partir de 10 µL de la mezcla de incubación o de las aguas de lavado a los que se añadió 2 µL de tampón 6X. Como control se utilizó el plásmido en su forma libre

(200 ng).

3.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL SÓLIDO

Con el objetivo de determinar si el proceso de síntesis había tenido lugar con éxito, se llevó a cabo la caracterización de los sólidos MCM-41, S1 y S1-CRISPR/Cas9.

3.3 1) Difracción de rayos X

Los patrones de difracción de rayos X determinan la ordenación y la periodicidad interna de las NPSMs. Las medidas de difracción de rayos X se realizaron en el difractómetro *Philips D8 Advance/Bruker D8 Advance*, utilizando radiación Cu K α . Para ello se preparó una pastilla, molturando aproximadamente 200 mg de cada uno de los sólidos. El programa utilizado aplica ventanas de ángulo bajo durante 11 minutos sin giro de la muestra.

3.3 2) Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La morfología y dimensión de los materiales se estudió mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM, *transmission electron microscopy*), utilizando el microscopio *100 kV Jeol JEM-1010*, operando a 100 kV para examinar la muestra a una magnificación óptica de entre 2500X y 40000X. Para preparación de las muestras se sonicó una alícuota de cada sólido en 250 μ L de 1,2-dicloroetano durante 5 minutos. Seguidamente, se dejó caer una gota de la suspensión sobre una rejilla de TEM y se dejó secar al aire.

3.3 3) Tamaño de nanopartículas y potencial ζ

La caracterización del tamaño de nanopartícula y del potencial ζ se realizó utilizando el *Zetasizer Nano ZS equipment (Malvern Instruments, Malvern, UK)*, que utiliza la técnica de dispersión de luz. Para las cuantificaciones de estas medidas se utilizó un software de análisis multimodal y se tuvo en cuenta la viscosidad de los medios de dispersión de las NPs y el índice de refracción de las mismas. El tamaño se obtiene en base a la luz dispersada por las nanopartículas. Para llevar a cabo esta determinación de tamaño, se emplea una función de autocorrelación mediante un algoritmo que separa las diferentes poblaciones de NPs. Para medir el potencial ζ , se aplica un campo eléctrico a la dispersión de partículas. Como consecuencia las nanopartículas se mueven con una velocidad relacionada con su potencial ζ . Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.4 ENSAYOS CELULARES

3.4 1) Reactivos y equipo de trabajo

La línea celular U2OS utilizada en este trabajo se obtuvo de la ATCC. La línea celular U2OS-GFP fue cedida por del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

El medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), el suero fetal bovino (SFB) y el PEI se obtuvieron de Sigma-Aldrich, la tripsina-EDTA 0.05% (1X) y la lipofectamina 2000 fueron proporcionadas por Thermo Fisher. El PBS se adquirió de Biowest y el reactivo WST-1 fue proporcionado por Roche.

3.4 2) Cultivo celular. Condiciones de cultivo y mantenimiento

Las células con las que se trabajó para la puesta a punto de las condiciones de transfección con el plásmido GFP fueron células de osteosarcoma humano (U2-OS). Por otro lado, se utilizó la misma línea celular positiva para la expresión de GFP para la optimización del editado génico de GFP utilizando el plásmido CRISPR/cas9 sgRNA149. Así mismo, se caracterizó en esta línea celular la toxicidad de las nanopartículas S1-CRISPR/Cas9 sgRNA149.

Las células crecieron y se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% de suero incubadas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂, tripsinizándose periódicamente (2 veces por semana). La manipulación de los cultivos celulares se realizó en condiciones estériles en una cabina de flujo laminar (*Telstar Life Science Solutions*).

3.4 3) Ensayo de viabilidad celular

Con el objetivo de comprobar que el sólido S1-CRISPR/Cas9 no resultaba tóxico para las células se realizaron ensayos de viabilidad celular, reproduciendo las condiciones en las que luego se llevarían a cabo los ensayos de transfección celular con GFP y CRISPR/Cas9. Las células utilizadas fueron las U2-OS-GFP.

Las células U2-OS-GFP se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de siembra de 1·10⁴ células/pocillo. Tras 24 horas de incubación en DMEM 10% SFB se trataron con el sólido S1 funcionalizado previamente con distintas relaciones (p/p) de plásmido CRISPR/Cas9. Como controles se utilizaron células no tratadas y células tratadas con PEI. Transcurridas 24 y 48 horas desde el tratamiento las placas se revelaron añadiendo a cada pocillo 7 µL de WST-1. El WST-1 es una sal de tetrazolio que es reducida por las deshidrogenasas mitocondriales a un producto coloreado conocido como formazán. La cantidad de formazán producido se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas en el cultivo y, por tanto, con la viabilidad celular. La cantidad de formazán producido se cuantificó midiendo la absorbancia a 440 nm en el espectrofotómetro (*Victor 1420 MultilabelCounterWallac*).

3.4 4) Análisis estadístico

Los resultados se representan como la media ± desviación estándar. Las diferencias entre el control y los tratamientos se compararon mediante métodos no paramétricos, realizando un análisis ANOVA de un factor (one-way ANOVA) y el test de Tukey. Todos los análisis estadísticos y las representaciones gráficas se realizaron empleando el software GraphPadPrism 5 (GraphPad, San Diego, CA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ indican diferencias estadísticamente significativas.

3.4 5) Puesta a punto de las condiciones de transfección celular

Antes de realizar los ensayos de edición génica con el plásmido CRISPR/Cas9 sgRNA149 obtenido en este trabajo, fue necesaria la puesta a punto de las condiciones de transfección utilizando NPSMs como sistema de transporte y liberación de plásmidos. Para ello se utilizó el sólido S1 funcionalizado con el plásmido codificante de GFP.

Se sembró la línea celular U2-OS en placa de 24 pocillos a una densidad de siembra a 5·10⁴ células/pocillo. Tras 24 horas de incubación en DMEM 10% SFB se sustituyó el medio por DMEM 5% SFB y se añadieron los tratamientos.

La preparación del tratamiento consistió en la incubación de las PEI (utilizado como control) con diferentes proporciones del plásmido GFP en 50 μ L Opti-MEM durante 30 minutos a temperatura ambiente. El Opti-MEM es un medio reducido en suero utilizado comúnmente en los ensayos de transfección celular. Las cantidades de nanopartículas/PEI y plásmido GFP se muestran en la siguiente tabla:

	Agente de transfección	Plásmido GFP	Relación agente de transfección/plásmido (p/p)
Tratamiento 1	PEI: 3 μ g	1 μ g	3:1
Tratamiento 2	PEI: 1 μ g	1 μ g	1:1
Tratamiento 3	PEI: 3 μ g	200 ng	15:1
Tratamiento 4	S1: 12,5 μ g	1 μ g	12,5:1
Tratamiento 5	S1: 12,5 μ g	500 ng	25:1
Tratamiento 6	S1: 12,5 μ g	200 ng	63:1

Tabla 1. Tratamientos utilizados para la puesta a punto de las condiciones de transfección. El PEI se utilizó como control positivo de transfección. El sólido S1 se probó a la concentración 25 μ g/mL. La última columna muestra la relación (p/p) agente de transfección/plásmido utilizada en cada uno de los tratamientos.

Transcurridas 4 horas se eliminó el tratamiento, reemplazando el medio por DMEM 5% SFB fresco. La evaluación de la transfección se realizó en el microscopio de fluorescencia (*Leica CTR 6000*) a las 24 y 48 horas post-tratamiento.

3.4 6) Ensayo de edición génica

Una vez puesta a punto las condiciones de transfección se realizaron los ensayos de edición génica utilizando el sólido S1 como vehículo transportador del plásmido CRISPR/Cas9 sgRNA149. Para ello se utilizó la línea celular U2-OS-GFP, en la cual se esperaba ver un descenso de la expresión de GFP tras el tratamiento con el sólido mencionado. El procedimiento seguido fue el mismo que para el ensayo de transfección con S1-GFP. Se sembraron $5 \cdot 10^4$ células/pocillo en placa de 24 pocillos, tras ser incubadas en DMEM 10% SFB durante 24 horas, se sustituyó el medio por DMEM 5% SFB y se añadieron los tratamientos mostrados en la **tabla 2**. De la misma manera que en el ensayo anterior los tratamientos se prepararon incubando el agente de transfección junto con el plásmido en Opti-MEM a temperatura ambiente antes de añadirlos al cultivo celular. Para ello se mezclaron los agentes de transfección PEI y lipofectamina (utilizados como controles positivos) o el sólido S1 con 1 μ g de CRISPR/Cas9 sgRNA149 y se incubaron en 50 μ L de Opti-MEM durante 30 minutos.

El tratamiento se mantuvo durante 4 horas, tiempo tras el cual el medio fue reemplazado por DMEM 5% SFB fresco. El seguimiento del editado génico se realizó en el microscopio de fluorescencia a las 24, 48 y 72 post-tratamiento.

	Agente de transfección	CRISPR/Cas9 sgRNA149	Relación agente de transfección/plásmido (p/p)
Tratamiento 1	PEI: 3 μ g	1 μ g	3:1
Tratamiento 2	Lipofectamina : 1 μ g	1 μ g	1:1
Tratamiento 3	S1:12,5 μ g	1 μ g	12,5:1

Tabla 2. Tratamientos celulares utilizados en el ensayo de edición génica de GFP. El PEI y la lipofectamina se utilizaron como control positivo de transfección. El sólido S1 funcionalizado con el plásmido se probó a 25 μ g/mL. La última columna muestra la relación agente de transfección/plásmido utilizada en cada uno de los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DISEÑO Y OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS CRISPR/CAS9 PARA LA EDICIÓN DE GFP

4.1 1) Diseño del RNA guía o sgRNA

Los sgRNA necesarios para dirigir a la endonucleasa Cas9 específicamente a la edición génica de GFP se diseñaron utilizando la herramienta informática RGEN CRISPR Tools (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>). Ésta devuelve una serie de parámetros para la secuencia génica diana, en este caso la secuencia codificante de GFP (**figura 14A**). Entre todos los parámetros devueltos cabe destacar el *out-of frame score* (**figura 14B**) que refleja la posibilidad de editar regiones del genoma distintas a la secuencia GFP, es decir, la probabilidad de *off-target*. De acuerdo a la bibliografía, lo óptimo es seleccionar sgRNA con valores *out-of frame score* > 66 y contenido de CG entre el 20% y el 80%.

Teniendo en cuenta estos parámetros, se seleccionó el sgRNA dirigido contra la posición 149 del gen codificante de la GFP. En el extremo 5' del sgRNA se añadieron 4 bases nitrogenadas necesarias para hibridar con el plásmido pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 tras la digestión de este último. Por otro lado, se diseñó un sgRNA aleatorio (crRNA) como control de no edición génica en los ensayos celulares (**tabla 3**).

A

>pEGFP-N1

```

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGC
GACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAG
CTGACCCCTGAAGTTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACC
ACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTC
TTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGC
AACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG
AAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAAC
AGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATC
CGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATC
GGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAA
GACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACT
CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG
  
```

B

POSICIÓN	CONTENIDO CG (%)	OFF-TARGET (%)
149	80.00	48.40

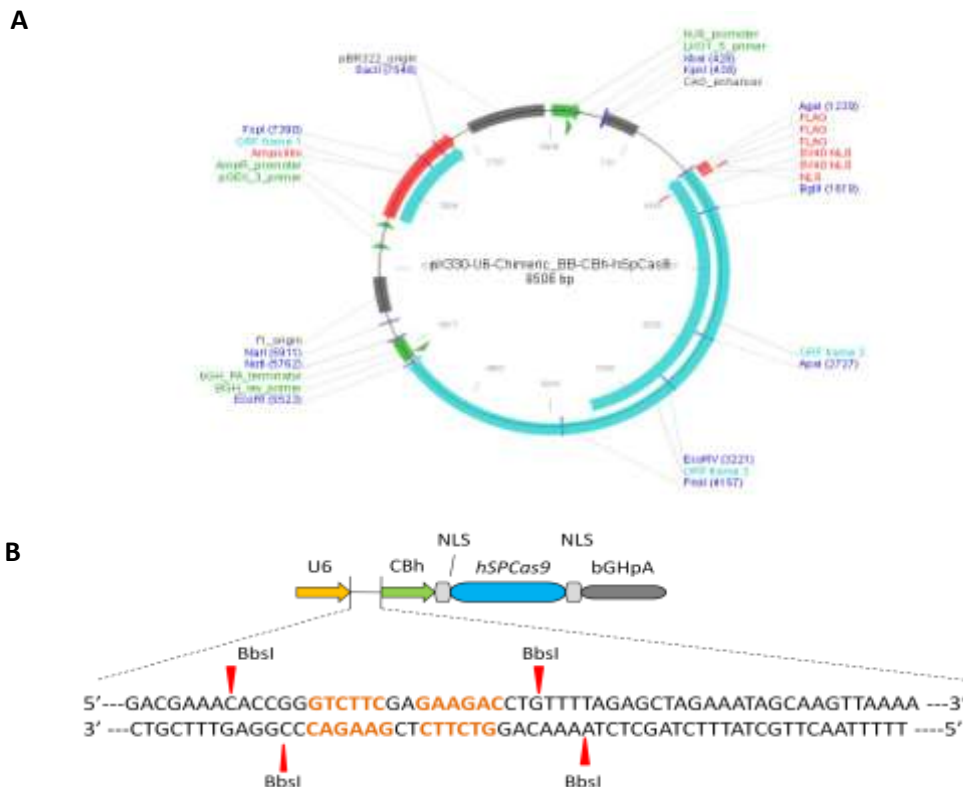
Figura 14. (A) Secuencia codificante de GFP en el plásmido pEGFP-N1. La secuencia diana se resalta en negra. **(B) Resultado de diseño del sgRNA utilizando la aplicación RGEN Tools.**

RNA guía o sgRNA	Secuencia (5'→3')
sgRNA 149 directo	CACCCCAGGGCACGGGCAGCTTGC
sgRNA 149 reverso	AAACCCGGCAAGCTGCCCCGTGCC
crRNA directo	CACC ^{CGTACGACCGCACGGTTACCC}
crRNA reverso	AAAC ^{GGGTAACCGTGC GGTCGTACG}

Tabla 3. Secuencia de los insertos de sgRNA149 y crRNA. La secuencia marcada en gris corresponde a los 4 nucleótidos complementarios a los extremos romos del plásmido pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 tras la digestión con BbsI. La secuencia subrayada corresponde a los 20 nucleótidos complementarios a la secuencia del gen GFP en su posición 149 (sgRNA149 directo y reverso) y al crRNA (crRNA directo y reverso).

4.1 2) Optimización del proceso de ligación depX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 con sgRNA149 y crRNA

La **figura 15A** muestra un esquema del plásmido codificante de la enzima nucleasa Cas9 pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 utilizado en este trabajo. El plásmido presenta dos sitios de corte para la enzima BbsI (**figura 15B**). Esto permite, tras la digestión, introducir los insertos de sgRNA prediseñados para hibridar en el sitio de restricción (**figura 15C**).



C

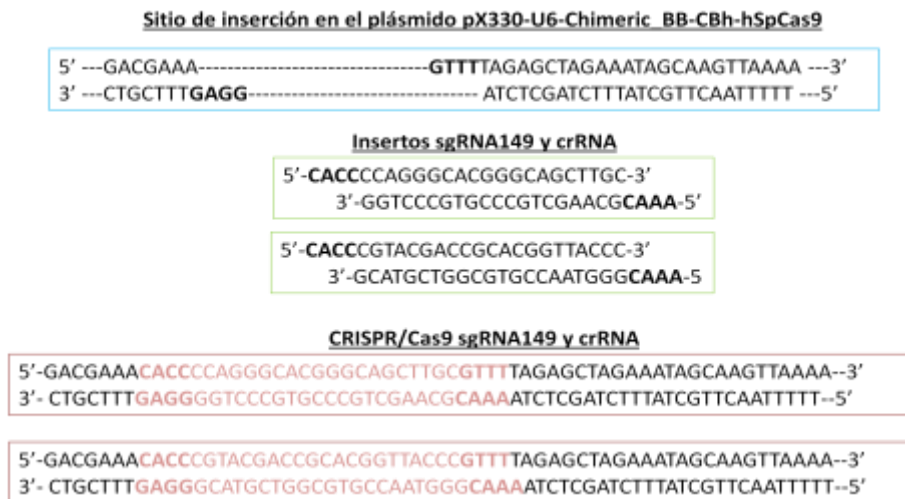


Figura 15. Representación esquemática del plásmido pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 y de la obtención de los plásmidos CRISPR/Cas9 sgRNA149 y CRISPR/Cas9 crDNA. (A) Plásmido pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9. Imagen extraída de www.addgene.org. **(B)** Sitio de inserción del sgRNA en el plásmido pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9. En naranja se muestra la secuencia que reconoce BbsI: 5'-GAAGAC(N)₂-3'/5'(N)₆GTCTTC-3'. Imagen modificada de www.addgene.org. **(C)** Secuencia del sitio de inserción del sgRNA tras la digestión con BbsI. Se observa que los extremos cohesivos (resaltados en negrita) en el plásmido son complementarios a los extremos cohesivos (resaltados en negrita) de los insertos sgRNA149 y crRNA. Los plásmidos finales CRISPR/Cas9 sgRNA149 y CRISPR/Cas9 crRNA muestran los insertos de sgRNA (resaltados en rojo) introducidos en el sitio de restricción del plásmido codificante de Cas9.

Debido al elevado tamaño del plásmido codificante del sistema CRISPR/Cas9 (8,5 Kb) y a la pequeña longitud de los insertos dirigidos a la edición génica (25 pb) fue necesaria la optimización de las condiciones de ligación de los mismos, ya que los protocolos habituales de clonación no dieron buenos resultados.

Los productos de ligación se electroporaron en la cepa bacteriana Stbl4. Se establecieron colonias aisladas para cada una de las condiciones de ligación: relación (p/p) plásmido/inserto 1:2 y 1:10, obteniéndose un número de colonias similar en ambos casos. A partir de éstas, se establecieron cultivos líquidos duplicados de cada condición para finalmente purificar los plásmidos de interés. Se analizaron un total de 8 colonias, determinando su pureza y concentración (**tabla 4**), conformación y secuencia.

La conformación de los plásmidos purificados se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. La conformación mayoritaria corresponde a DNA superenrollado, si bien en algunas de las muestras aparece DNA en conformación nickeado y lineal (**figura 16**). La importancia de determinar la conformación de los plásmidos purificados reside en que diversos estudios han demostrado una mayor eficiencia de transfección en cultivos celulares cuando los plásmidos se encuentran en su conformación superenrollada (Dhanoya et al. 2012; Cherng et al. 1999; Valente et al. 2014).

	Plásmido	Concentración (ng/ μ L)	A _{260/280}	A _{230/260}
CRISPR/Cas9 sgRNA149	1	360	1,80	2,16
	2	181	1,83	2,25
	3	294	1,85	2,28
	4	262	1,94	2,31
CRISPR/Cas9 crDNA	5	243	1,83	2,27
	6	171	1,85	2,29
	7	248	1,83	2,24
	8	164	1,82	2,03

Tabla 4. Concentración y pureza del plásmido CRISPR/Cas9 sgRNA149 y CRISPR/Cas9 crRNA. Muestras 1-4: plásmidos codificantes del plásmido CRISPR/Cas9 sgRNA 149 (Muestras 1 y 2: relación plásmido/inserto 1:2. Muestras 3 y 4: relación plásmido/inserto 1:10). **Muestras 5-8:** plásmidos codificantes del plásmido CRISPR/Cas9 crRNA (Muestras 5 y 6: relación plásmido/inserto 1:2. Muestras 7 y 8: relación plásmido/inserto 1:10). Los coeficientes $A_{260/280} > 1,8$ y $A_{230/280} > 2,0$ reflejan buena calidad de la muestra.

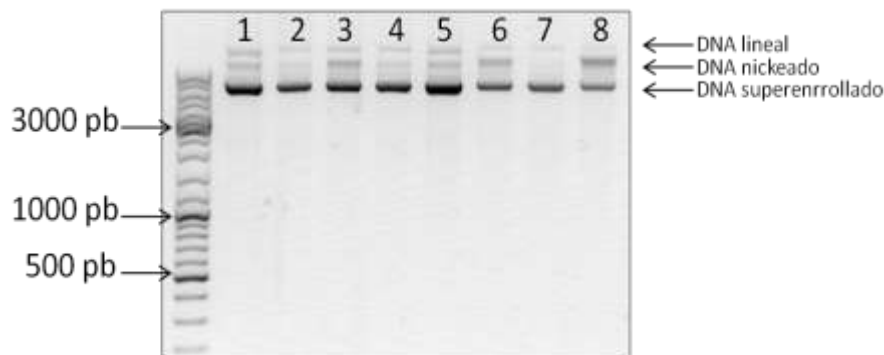


Figura 16. Conformación de los plásmidos CRISPR/Cas9 purificados. Muestras 1-4: plásmidos codificantes del plásmido CRISPR/Cas9 sgRNA 149 (Muestras 1 y 2: relación plásmido/inserto 1:2. Muestras 3 y 4: relación plásmido/inserto 1:10). **Muestras 5-8:** plásmidos codificantes del plásmido CRISPR/Cas9 crRNA (Muestras 5 y 6: relación plásmido/inserto 1:2. Muestras 7 y 8: relación plásmido/inserto 1:10).

Del total de 8 colonias aisladas se obtuvo la secuencia CRISPR/Cas9 correcta para la relación 1:10 en ambos tipos de plásmido, CRISPR/Cas9 sgRNA y CRISPR/Cas9 crRNA (**figura 17**). Por ello, se seleccionaron estas condiciones para los sucesivos ensayos de obtención de plásmidos codificantes del sistema CRISPR/Cas9. Debido al gran tamaño del plásmido (8,5 Kb) y el pequeño tamaño de los insertos (25pb) es necesaria una elevada proporción de estos últimos para poder conseguir su inserción en el sitio de restricción, de acuerdo a los protocolos de Feng Zhang (Ran et al. 2013). De lo contrario la probabilidad de religación del plásmido digerido es mucho mayor que la probabilidad de encontrarse con los sgRNA en disolución, obteniendo como resultado el plásmido vacío.

A

CRISPR/Cas9 sgRNA 149

BbsI



```

NNNNNNNNNNNNNNNNNNCTTGGNCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCCCGAGGGCA
CGGGCAGCTTGCSTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTA
TCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
TTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTTTAGCGCGTGGCCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAG
AGGTACCGTTACATAACTTAAGGTAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC
GCCCATTGACGTCAATAGTAAAGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGT
ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC
CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTGTGCCAGTACATGACCTTAT
GGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCCGAGG
TGAGCCCAAGTTCGCTTCACTCTCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGT
ATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGNN

```

B

CRISPR/Cas9 crRNA

BbsI



```

NNNNNNNNNNNNNNNNNNCTTGGNCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCCGTACGACC
GCACGGTTACCCSTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCA
ACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA
AAATAAGGCTAGTCCGTTTTTAGCGCGTGGCCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGG
TACCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCC
CATTGACGTCAATAGTAAAGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATT
TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTA
TTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTGTGCCAGTACATGACCTTATGGG
ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCCGAGGTGA
GCCCCACGTTTCGCTTCACTCTCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATT
TATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGNN

```

Figura 17. (A) Secuencia de los plásmidos CRISPR/Cas9 sgRNA149 y (B) CRISPR/Cas9 crRNA. La flecha roja indica el sitio de corte por la enzima BbsI en el plásmido pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9. En gris se resalta la secuencia presente en los insertos complementaria al extremo romo resultante de la digestión del plásmido con BbsI y subrayado/negrita se muestra la secuencia de los insertos sgRNA149 y crRNA.

Los plásmidos de secuencia correcta, muestras 4 y 7, se volvieron a transformar en la cepa bacteriana Stbl4 para obtener cantidades suficientes para los ensayos celulares. Se repitió el procedimiento de cuantificación y comprobación de la conformación.

4.2 SÍNTESIS DEL MATERIAL MCM-41

Como se ha comentado en la introducción el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar y optimizar un nanodispositivo innovador como vehículo transportador plásmidos al interior celular. El dispositivo propuesto consiste en NPSMs funcionalizadas con PEI que bloquea los poros y facilita el escape endosomal (Ma 2014; Yan et al. 2017; Shahbazi et al. 2017). Este nanodispositivo recubierto con distintos plásmidos actuaría como sistema eficiente de transfección. Los sistemas obtenidos: S1-GFP, S1-sgRNA149 y S1-crRNA, son capaces de mantener su interacción con los plásmidos hasta que se produce una bajada en el pH como consecuencia de la internalización celular de la nanopartícula por la vía endosomal. Una vez en

el interior de la célula los plásmidos serían capaces de translocarse al núcleo para la consiguiente edición génica con el plásmido CRISPR/Cas9.

4.2. 1) Puesta a punto de la funcionalización del material

Siguiendo el planteamiento expuesto se sintetizó el material S1 compuesto por la MCM-41 calcinada y funcionalizada con el PEI, de acuerdo a la sección 3.2 3) de materiales y métodos.

Fue necesaria la optimización del paso de adsorción del plásmido CRISPR/Cas9 a el material S1, puesto que se carecía de experiencia previa en este campo. De esta manera, se probaron varias relaciones S1/plásmido (p/p):10:1, 50:1, 200:1 y 500:1, con el objetivo de conocer cuál era la cantidad de nanomaterial necesario para adsorber todo el plásmido en disolución. La evaluación de la relación óptima S1/plásmido se realizó mediante electroforesis, analizando plásmido libre (**figura 18**). Para ello, se cargaron, por un lado, los medios de reacción para las diferentes relaciones S1/plásmido y, por otro lado, las aguas de lavado para cada una de las relaciones p/p. La relación 500:1 consiguió una adsorción completa del plásmido, ya que no se detectó DNA ni en el medio de reacción, ni en las aguas de lavado. Las demás relaciones S1/plásmido mostraron un exceso de plásmido en disolución, dejando como consecuencia plásmido libre sin reaccionar. De esta manera, se concluye que entre la relación 200:1 y 500:1 se encuentra la cantidad de nanopartículas mínima necesaria para acomplejar todo el plásmido en disolución.

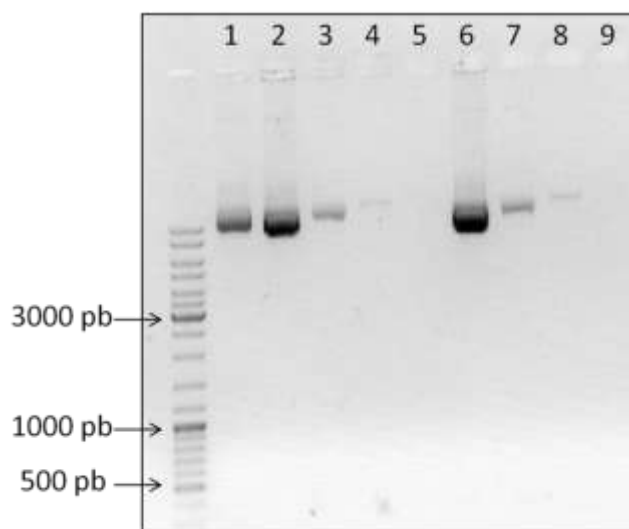


Figura 18. Adsorción del plásmido CRISPR/Cas9 sgRNA149 a las nanopartículas S1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del medio de reacción y las aguas de lavado de la reacción de adsorción de S1 con el plásmido CRISPR/Cas9 sgRNA149. Muestra 1: plásmido CRISPR/Cas9 sgRNA149. **Medio de reacción (muestras 2-5).** Muestra 2: S1/plásmido 10:1. Muestra 3: S1/plásmido 50:1. Muestra 4: S1/plásmido 200:1. Muestra 5: S1/plásmido 500:1. **Aguas de lavado (muestras 6-9).** Muestra 6: S1/plásmido 10:1. Muestra 7: S1/plásmido 50:1. Muestra 8: S1/plásmido 200:1. Muestra 9: S1/plásmido 500:1.

4.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL SÓLIDO

Los materiales MCM-41 y S1-CRISPR/Cas9 se sintetizaron de acuerdo al apartado 3.2 Materiales y Métodos. El proceso de síntesis se resume brevemente en tres pasos generales:

síntesis del esqueleto MCM-41, funcionalización con PEI y adsorción de los plásmidos CRISPR/Cas9 o GFP.

4.3 1) Difracción de rayos X

Los estudios de difracción de rayos X en polvo (DRX) permitieron determinar la correcta estructura mesoporosa de los materiales sintetizados. Como se puede observar en la **figura 19**, en todos los difractogramas se preserva el pico (100) aproximadamente a 2 grados Theta, lo cual confirma la naturaleza de la fase mesoporosa MCM-41 (Mas Font 2014). Observándolos con más en detalle, la MCM-41 sin calcinar (**figura 19A**) muestra los cuatro picos de Bragg característicos de una matriz hexagonal, los cuales se pueden indexar como (100), (110), (200) y (210) y corresponden con ángulos 2θ que aparecen a 2, 3.5, 4.2 y 5.7 grados, respectivamente. Cabe destacar que como resultado de la calcinación el difractograma de la MCM-41 calcinada (**figura 19B**) se observa un ensanchamiento y desplazamiento del pico (100), así como una desaparición de los picos (110), (200) y (210). Estos cambios se deben a la condensación de los grupos silanoles durante la calcinación, que provocan una reducción del tamaño de celda y un refuerzo de la estructura de las nanopartículas. Por último, el material S1 (MCM-41 funcionalizada con PEI) (**figura 19C**) muestra el pico principal (100) más ensanchado. Esto puede ser debido al proceso de funcionalización, que en ocasiones puede ocasionar la pérdida de las reflexiones. El sólido final S1-CRISPR/Cas9 presenta un difractograma más irregular, así como una disminución en la intensidad del pico principal (100), respecto a la MCM-41 y S1, puesto que las cantidades de sólido final son reducidas y la pastilla usada para la determinación estructural es más pequeña.

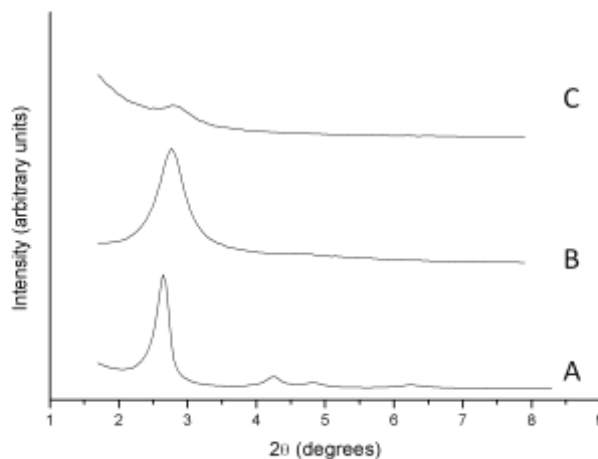


Figura 19. Patrones de difracción de rayos X de la **(A)** MCM-41 sin calcinar, **(B)** MCM-41 calcinada y **(C)** funcionalizada con PEI.

4.3 2) Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión también permitió confirmar la estructura mesoporosa de los materiales. En las imágenes se pueden observar los poros hexagonales de la MCM-41 tras la calcinación (**figura 20A**). Tras la funcionalización con PEI la estructura

hexagonal se vuelve difusa (**figura 20B**), lo que confirma el recubrimiento de la nanopartícula con el polímero. Los sólidos presentaban una geometría esférica con diámetros de entre 80 y 100 nm, que se corresponden con las dimensiones características de las nanopartículas mesoporosas de sílice.

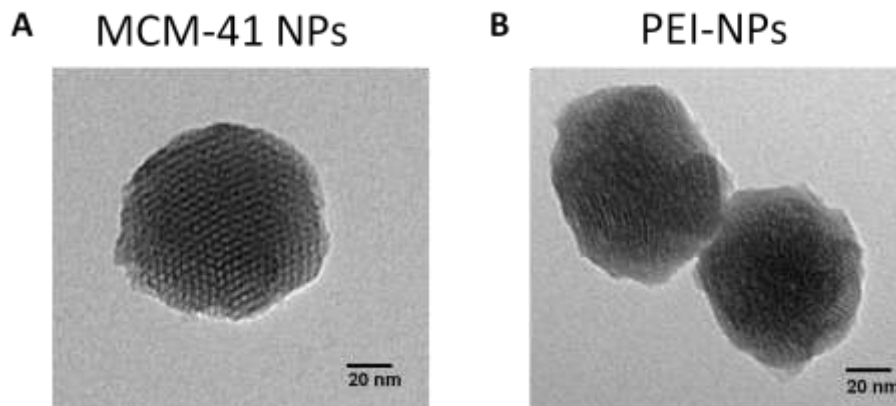


Figura 20. (A) Imágenes de TEM de la MCM-41 calcinada y (B) la MCM-41 funcionalizada con PEI.

4.3 3) Tamaño de la nanopartículas y potencial ζ

La **tabla 5** muestra el valor medio de la distribución de tamaño de nanopartículas: MCM-41, S1 y S1-CIRSPR/Cas9. Los tamaños de las nanopartículas coinciden con los tamaños obtenidos mediante TEM, es decir, las nanopartículas preparadas en este trabajo oscilan en torno a los 100 nm.

	Tamaño nanopartículas (nm)
MCM-41	91 ± 9
S1	122 ± 16
S1-CRISPR/Cas9 200:1	145 ± 21

Tabla 5. Tamaño nanopartículas (nm) MCM-41, S1 y S1-CRISPR/Cas9 medido en H₂O.

El potencial ζ refleja la carga superficial de las nanopartículas en suspensión. Diversos ejemplos en la bibliografía demuestran la necesidad de obtener nanopartículas cargadas positivamente en su superficie para aplicaciones de transfección celular, ya que ello facilita la interacción con la superficie celular cargada negativamente (Lungwitz et al. 2005; Mansouri et al. 2006; Son et al. 2000)

De acuerdo al apartado 3.3 3) de materiales y métodos, se midió el potencial ζ de las MCM-41, S1 y S1-CIRSPR (p/p) 200:1 y 500:1 en los disolventes H₂O, PBS y OPTI-MEM.

La **tabla 6** muestra los valores de potencial ζ para cada una de las nanopartículas. En general, se obtuvieron valores negativos de potencial zeta, excepto para el material S1 disuelto en H₂O y PBS. El medio utilizado para la transfección celular, el OPTI-MEM, fue el que mostró los valores más negativos entre los tres disolventes, seguido del PBS y el agua. Esto puede ser debido al estado de protonación o agregación del material que puede variar en función del pH

o la fuerza iónica del medio en el que esté disuelto (Santos 2010; Mari Carmen Navarro Plaza 2013).

Siendo importante el potencial ζ positivo para obtener una buena eficiencia de transfección celular, existen otros ejemplos en la bibliografía que consiguen la internalización celular de ácidos nucleicos (siRNA) utilizando nanopartículas con potencial ζ negativo (Zheng et al. 2017; Xia et al. 2009). Por ello, a pesar del potencial ζ negativo de las nanopartículas S1-CRISPR/Cas9, estas todavía podrían utilizarse como agentes de transfección celular. No obstante, no se descarta la optimización del proceso de funcionalización con PEI y adsorción del plásmido con el objetivo de obtener un potencial ζ positivo y de esta manera una mayor eficiencia de transfección y edición con el sistema CRISPR/Cas9.

	H ₂ O	PBS	OPTI-MEM
MCM-41	-24,20±0,70		
S1	7,48±0,55	2,30±0,55	-11,90±0,76
S1-CRISPR/Cas9 200:1	-11,53±2,14	-23,50±1,56	-25,67±3,19
S1-CRISPR/Cas9 500:1	-9,09±2,80	-26,60±1,65	-28,63±1,78

Tabla 6. Potencial ζ de MCM-41, S1 y S1-CRISPR/Cas9 200:1 y 500:1 en H₂O, PBS y OPTI-MEM. Resultados se muestran como la media± desviación estándar.

4.4 INTERNALIZACIÓN DE S1-CRISPR/Cas9 EN MODELOS CELULARES

4.4 1) Caracterización de la toxicidad de las nanopartículas S1-CRISPR/Cas9 en la línea celular U2-OS.

Previamente a los ensayos de transfección celular utilizando el sistema mesoporoso como agente de transfección fue necesario identificar la concentración de trabajo no tóxica para la línea celular bajo estudio. Para ello, y tal y como se ha descrito en el apartado 3.4 3) de Materiales y Métodos, se utilizó la línea U2-OS-GFP, en la que posteriormente se realizarán los estudios de edición génica. Las células se trataron con el sólido S1-CRISPR/Cas9, funcionalizado con diferentes cantidades de plásmido (relaciones plásmido/S1 (p/p): 50:1, 100:1 y 500:1) a las concentraciones 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La toxicidad de las nanopartículas se evaluó a las 24 y a las 48 horas.

Como se observa en la **figura 21**, los tratamientos a 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ redujeron la viabilidad celular de manera significativa, respecto al control no tratado, a las 24 (**A**) y 48 horas (**B**). De manera positiva, la concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no redujo la viabilidad celular significativamente respecto al control no tratado a las 24 horas, si bien a las 48 horas se experimentó una mayor toxicidad del tratamiento que redujo la viabilidad celular de manera significativa, excepto en el caso de la relación S1/plásmido 500:1.

La menor toxicidad del tratamiento a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hizo de esta la concentración de elección para los sucesivos ensayos celulares: optimización de la transformación y edición de GFP. Ello concuerda con los resultados obtenidos por otros autores, los cuales demuestran la menor

toxicidad de las NPSMs recubiertas de PEI a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, escogiendo de la misma manera dicha concentración para los ensayos celulares (Xia et al. 2009).

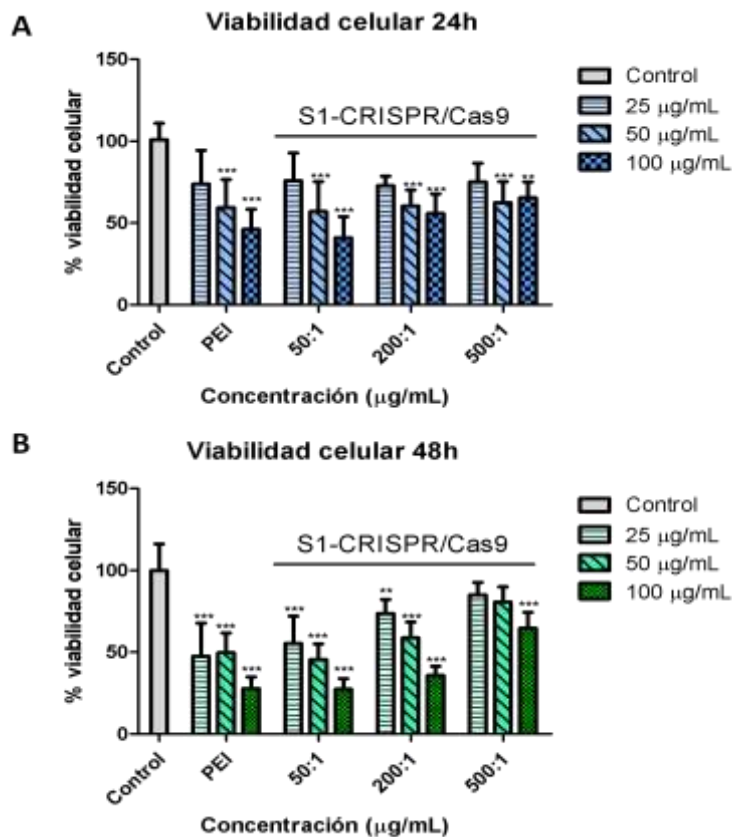


Figura 21. Viabilidad celular evaluada en la línea celular U2-OS-GFP a las 24 horas (A) y 48 horas (B). Se representa el porcentaje de celular vivas respecto al control no tratado (media \pm desviación estándar).

4.4 2) Optimización de las condiciones de internalización de S1-GFP en la línea celular U2-OS

Para la puesta a punto de la internalización de plásmidos vehiculizados con las nanopartículas S1 se realizaron ensayos de transfección celular utilizando el material S1 sobre el que adsorbió el plásmido GFP. Esto permitió caracterizar el proceso de transfección de manera sencilla, observando la expresión de GFP en células negativas para la expresión de dicha proteína.

Tal y como se describe en el apartado 3.4 5) de materiales y métodos, la línea celular U2-OS se trató con diferentes relaciones (p/p) PEI/GFP (3:1, 1:1 y 15:1) y S1/GFP (12,5:1, 25:1 y 63:1). El proceso de transfección celular se evaluó observando la expresión de la proteína GFP a las 24 y a las 48 horas, mediante microscopía de fluorescencia.

Las células U2-OS no tratadas se tomaron como control de ausencia de fluorescencia a las 24 y 48 horas. La transfección del plásmido con PEI se utilizó como control positivo, puesto que este polímero catiónico es utilizado habitualmente en procesos de transfección (Xia et al. 2009; Lungwitz et al. 2005). A las 24 horas un bajo número de células expresaron GFP y a niveles

bajos de intensidad de fluorescencia. Como ejemplo ilustrativo de los resultados observados a las 24 horas se muestra la fluorescencia de las células tratadas con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de S1/pGFP-C1 relación (p/p) 12,5:1 (**figura 22**). A las 48 horas la expresión de GFP resultó óptima. La relación (p/p) PEI/GFP 3:1 resultó ser la más eficiente para el proceso de transfección con el polímero catiónico, ya que fue el que consiguió la expresión de GFP en un mayor número de células (**figura 23**). Esto concuerda con las recomendaciones de la bibliografía que sugieren utilizar dicha relación PEI/DNA (3:1), debido a evidencias que demuestran que esta relación es la más adecuada para la expresión de la mayoría de genes utilizados en protocolos de transfección celular (Longo et al. 2014). Así pues, la relación PEI/plásmido 3:1 se utilizó para los siguientes ensayos celulares de edición de GFP con el plásmido CRISPR/Cas9sgRNA149. El tratamiento con el sólido S1/GFP también mostró una mayor expresión de GFP a las 48 horas (**figura 23**), respecto a las 24 horas (**figura 22**); se obtuvo una mayor fluorescencia con la relación S1/GFP (p/p) 12,5:1 > 25:1 > 63:1, debido a la mayor cantidad de plásmido adsorbido sobre el material S1/GFP (p/p) 12,5:1, respecto a las otras dos relaciones. De manera interesante las células tratadas con S1/GFP (p/p) 12,5:1 mostraron una mayor expresión de GFP que el control PEI/GFP (p/p) 3:1. Estos son resultados que hacen de las nanopartículas recubiertas con PEI un sistema prometedor como vehículo de transporte y liberación de plásmidos al interior celular, tal y como ya sugerían trabajos de otros autores (Du et al. 2014; Mamaeva et al. 2013; Meng et al. 2013).



Figura 22. Imagen de fluorescencia tomada a 200X a las 24 horas tras el tratamiento con S1/pGFP-N1 (p/p) 12,5:1. De izquierda a derecha de muestra: imagen de campo claro – imagen tomada con el filtro para la fluorescencia de GFP – ambos canales (campo claro y GFP) superpuestos utilizando el programa ImageJ.

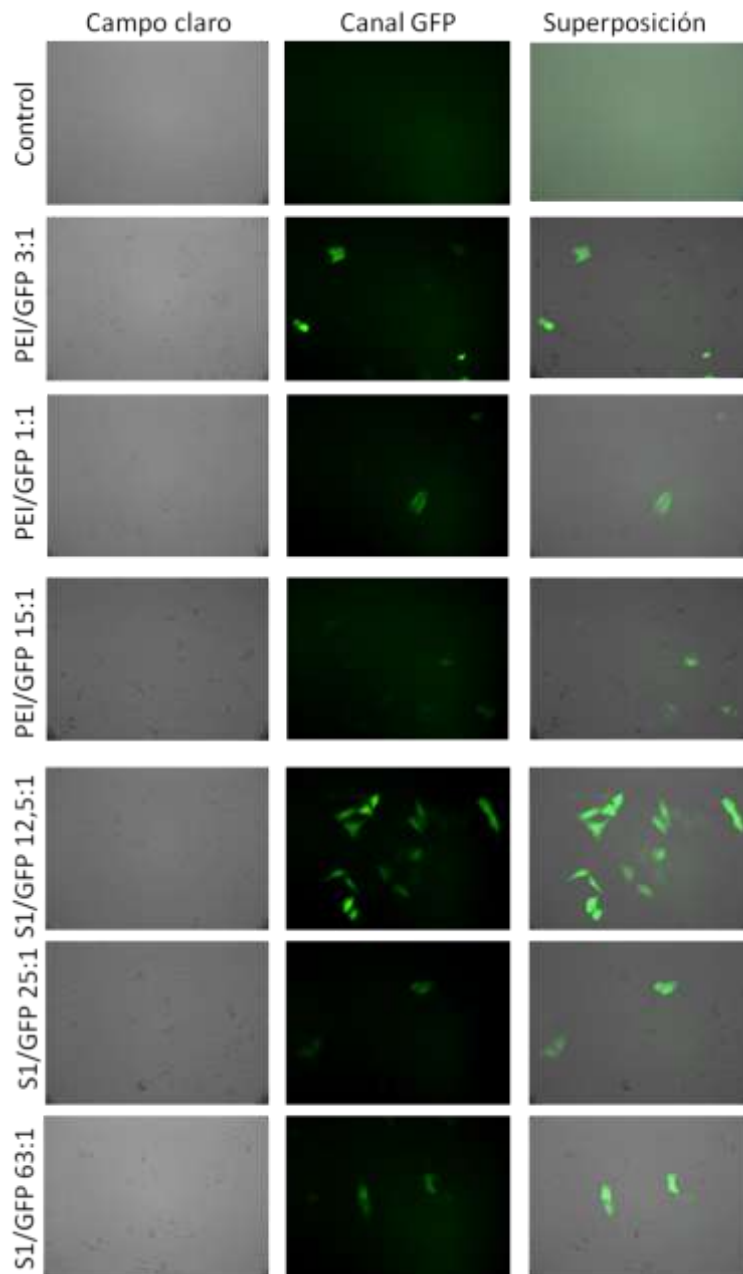


Figura 23. Imágenes de fluorescencia tomadas a 200X a las 48 horas tras el tratamiento. Los tratamientos se muestran a la izquierda de las imágenes. De izquierda a derecha de muestra: imagen de campo claro – imagen tomada con el filtro para la fluorescencia de GFP – ambos canales (campo claro y GFP) superpuestos utilizando el programa ImageJ.

4.4 3) Ensayo de edición génica de GFP

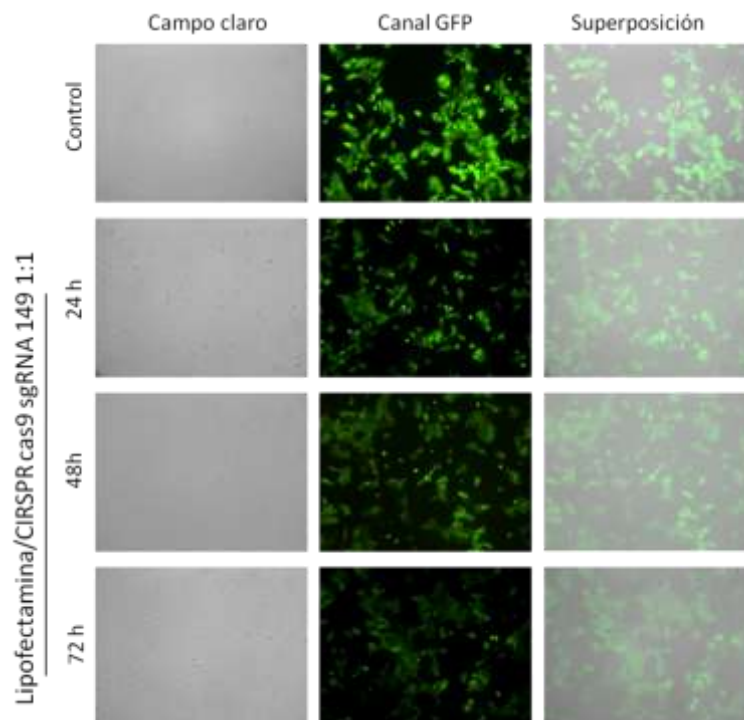
El trabajo concluyó con el ensayo de edición génica de GFP en la línea celular U2-OS-GFP, utilizando las nanopartículas S1 sobre las cuales se adsorbió el plásmido CRISPR/Cas9 sgRNA 149. Tomando como base los resultados obtenidos de la transfección con el plásmido GFP, la línea celular U2-OS-GFP internalizaría la nanopartícula S1-CRISPR/Cas9 hacia el interior celular. Una vez en el núcleo la endonucleasa Cas9 guiada por el sgRNA 149 se encargaría de generar roturas al azar en la doble hélice de DNA, concretamente en la posición 149 del gen codificante

de GFP, las cuales serían reparadas principalmente por la vía unión de extremos no homólogos (NHEJ)(Cong et al. 2013; Hsu et al. 2014). En última instancia esto produciría una disrupción en la síntesis de GFP, que se traduciría en una reducción de la fluorescencia de la línea celular U2-OS-GFP, que seríamos capaces de observar visualmente con microscopía de fluorescencia (Wang et al. 2016; Sun et al. 2015).

Tal y como se detalla en la sección 3.4 6) de materiales y métodos la lipofectamina y el PEI se utilizaron como controles positivos de la transfección celular. La transfección con el material S1 se caracterizó utilizando la relación S1/plásmido (p/p) 12,5:1, ya que previamente había dado los mejores resultados de transfección con el plásmido GFP.

Todos los agentes de transfección, incluido el sistema S1, redujeron notablemente la fluorescencia de GFP (**figura 24**). Debido a la estabilidad de la proteína GFP se hicieron estudios a diferentes tiempos para permitir la degradación de la proteína existente en la célula (Aoki et al. 2008; Huang et al. 2007). A las 24 horas se observó un descenso en la intensidad de la fluorescencia, que se incrementó a las 48 y a las 72 horas, respecto al control no tratado. El descenso en la fluorescencia podría tomar un tiempo desde que se produce la edición del gen codificante de GFP; en un primer lugar se produciría la edición del gen sin cambios notables a nivel visual, transcurrido un tiempo se degradaría la proteína GFP sintetizada previamente a la edición, siendo entonces cuando la reducción de la fluorescencia se hace notable mediante microscopía.

Con estos resultados se demostró que es posible llevar a cabo la edición génica de GFP en una línea celular humana, utilizando las NPSMs funcionalizadas con PEI como vehículo del plásmido CRISPR/Cas9 sgRNA 149 obtenido en este trabajo. Esto abre la posibilidad de desarrollar terapias combinadas de edición génica y liberación controlada de fármacos/sondas para diagnóstico.



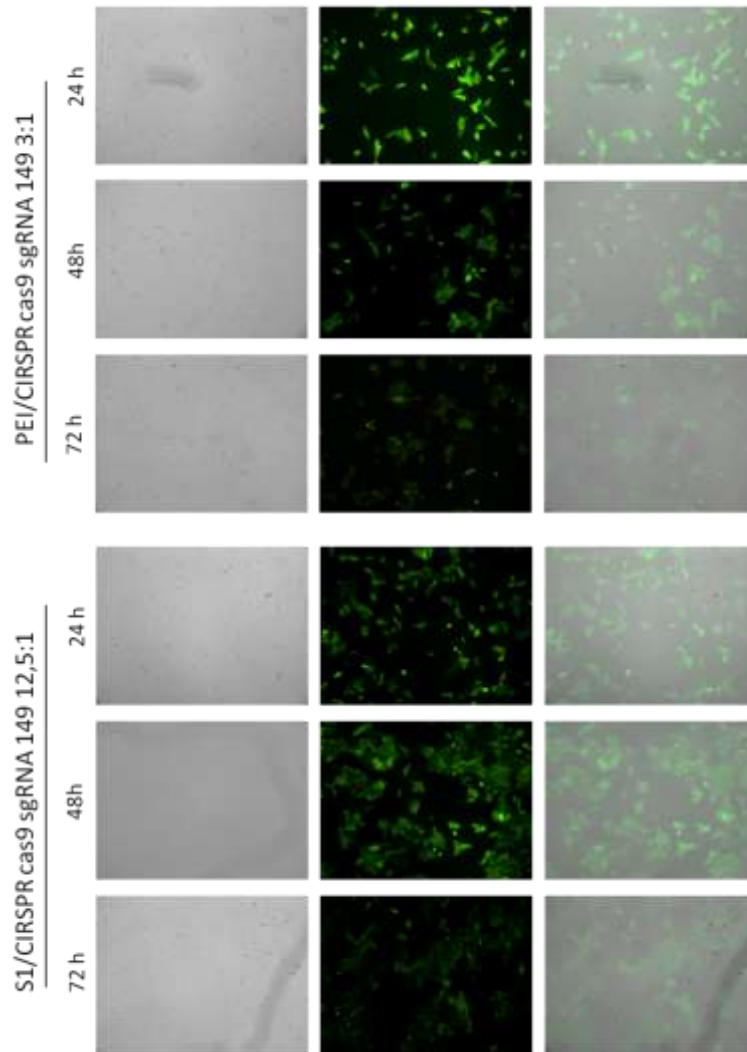


Figura 24. Ensayo de edición génica de la línea celular U2-OS-GFP con el plásmido CRISPR/Cas9 sgRNA 149. Se muestran las células transfectadas con lipofectamina, PEI y S1 a las 24, 48 y 72 horas. De izquierda a derecha se muestran: imágenes de campo claro – canal de fluorescencia para GFP –ambos canales (campo claro y GFP) superpuestos utilizando el software ImageJ.

CONCLUSIONES Y PROYECCIÓN FUTURA

En este trabajo se ha desarrollado un nanodispositivo basado en nanopartículas de sílice mesoporosa capaz de actuar como agente de transfección no viral. El recubrimiento con PEI no sólo permite la adsorción de plásmidos, GFP y CRISPR/Cas9, en la superficie de las nanopartículas sino que también facilita la internalización del nanosistema en la célula. Por otro lado, el sistema CRISPR/Cas9 sgRNA 149 desarrollado es capaz de llevar a cabo la edición génica de GFP en células positivas para la expresión de dicha proteína.

No obstante, los resultados mostrados en el trabajo son preliminares, por lo que se requiere de la realización de experimentos complementarios. A la vista de los resultados obtenidos se plantea la posibilidad de desarrollar un nanodispositivo más complejo multifuncional capaz de encapsular fármacos/sondas para diagnóstico al mismo tiempo que se realiza una edición génica de genes con interés terapéutico, como por ejemplo genes de resistencia al fármaco encapsulado mediante el sistema CRISPR/Cas9.

BIBLIOGRAFÍA

- Aoki, T. et al., 2008. Novel assays for proteases using green fluorescent protein-tagged substrate immobilized on a membrane disk. *Analytical Biochemistry*, 378, pp.132-137.
- Aznar, E. et al., 2016. Gated Materials for On-Command Release of Guest Molecules. *Chemical Reviews*, 116 (2), pp.561–718.
- Barrangou, R. & Marraffini, L.A., 2014. CRISPR-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell*, 54(2), pp.234-244.
- Bawarski, W.E. et al., 2008. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4, pp.273-282.
- Bhaya, D., Davison, M. & Barrangou, R., 2011. CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annual Review of Genetics*, 45(1), pp.273-297.
- Cherng, J. et al., 1999. Effect of DNA topology on the transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino) ethyl methacrylate)– plasmid complexes. *Journal of controlled release*, 60, pp.343-353.
- Chylinski, K. et al., 2014. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 42(10), pp.6091-6105.
- Colilla, M., González, B. & Vallet-Regí, M., 2013. Mesoporous silicananoparticles for the design of smart delivery nanodevices. *Biomater. Sci.*, 1(2), pp.114-134.
- Cong, L. et al., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas system. *Science*, 339(6121), pp.819-823.
- Dhanoya, A., Chain, B.M. & Keshavarz-moore, E., 2012. Role of DNA topology in uptake of polyplex molecules by dendritic cells. *Vaccine*, 30(9), pp.1675-1681.
- Doudna, J.A. & Charpentier, E., 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), pp.1258096-1258096.
- Doyle, D.J., 2013. Nanotechnology in Anesthesia and Medicine. *Advances in Anesthesia*, 31(1), pp.181-200.
- Du, X. et al., 2014. Intracellular microenvironment-responsive dendrimer-like mesoporous nanohybrids for traceable, effective, and safe gene delivery. *Advanced Functional Materials*, 24(48), pp.7627-7637.
- Gibson, L.T., 2014. Mesosilica materials and organic pollutant adsorption: part A removal from air. *Royal Society of Chemistry*.
- Horvath, P. & Barrangou, R., 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327(5962), pp.167-170.
- Hsu, P.D. et al., 2014. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(9), pp.827-832.
- Huang, J. et al., 2007. Stable Intermediate States and High Energy Barriers in the Unfolding of GFP. *Journal of Molecular Biology*, pp.356-371.
- Jansen, R. et al., 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), pp.1565-1575.
- Jena, M. et al., 2013. Nanotechnology- future prospect in recent medicine : a review. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology Review Article*, 2(4), pp.353-359.

- Lehner, R. et al., 2013. Intelligent nanomaterials for medicine : Carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(6), pp.742-757.
- Longo, P.A. et al., 2014. Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI). *Methods in Enzymology*, pp.227-240.
- Lungwitz, U. et al., 2005. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(2), pp.247-266.
- Ma, D., 2014. Enhancing endosomal escape for nanoparticle mediated siRNA delivery. *Nanoscale*, 6(12), pp.6415-25.
- Mamaeva, V., Sahlgren, C. & Lindén, M., 2013. Mesoporous silica nanoparticles in medicine — Recent advances. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(5), pp.689-702.
- Mansouri, S. et al., 2006. Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy. *Biomaterials*, 27, pp.2060-2065.
- Mari Carmen Navarro Plaza, 2013. *Desarrollo de nanopartículas dirigidas para el transporte de ADN de interés en terapia génica*.
- Mas Font, N., 2014. *Desing of new hybrid nanomaterials with molecular gates as nanodevices for therapeutic applications*.
- Meng, H. et al., 2013. Codelivery of an Optimal Drug / siRNA Combination Using Mesoporous Silica Nanoparticles To Overcome Drug Resistance in Breast Cancer in Vitro and in Vivo. *American Quimical Society*, (2), pp.994-1005.
- Moghimi, S.M., Hunter, A.C. & Murray, J.C., 2016. Nanomedicine : current status and future prospects. *The FASEB Journal*, 19(3), pp.311-330.
- Mojica, F.J.M. et al., 2005. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*, pp.174-182.
- Mojica, F.J.M. et al., 2009. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155(3), pp.733-740.
- Nishimasu, H. et al., 2015. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*, 156(5), pp.935-949.
- Perez-Pinera, P. et al., 2013. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nature methods*, 10(10), pp.973-6.
- Qi, L.S. et al., 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*, 152(5), pp.1173-1183.
- Raji, F. & Pakizeh, M., 2017. Study of Hg (II) species removal from aqueous solution using hybrid ZnCl₂-MCM-41 adsorbent. *Applied Surface Science*, 282(October 2012), pp.415-424. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.05.145>.
- Ran, F.A. et al., 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), pp.2281-2308.
- Santos, I.S., 2010. *Lipopoliplos y complejos monomoleculares de ADN como vectores de terapia génica*.
- Saraiva, S.M. et al., 2017. Synthetic nanocarriers for the delivery of polynucleotides to the eye. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Shahbazi, M. et al., 2017. Intracellular responsive dual delivery by endosomolytic polyplexes carrying DNA anchored porous silicon nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 249,

pp.111-122.

Slowing, I.I. et al., 2008. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, pp.1278-1288.

Son, K.K., Tkach, D. & Patel, D.H., 2000. Zeta potential of transfection complexes formed in serum-free medium can predict in vitro gene transfer efficiency of transfection reagent. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1468, pp.11-14.

Sun, W. et al., 2015. Self-Assembled DNA Nanoclews for the Efficient Delivery of CRISPR – Cas9 for Genome Editing Angewandte. *Angewandte Chemie*, 7905, pp.12029-12033.

Torney, F. et al., 2007. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nature Nanotechnology*, 2(5), pp.295-300.

Valente, J.F.A. et al., 2014. Selective purification of supercoiled p53-encoding pDNA with L - methionine – agarose matrix. *Analytical Biochemistry*, 459, pp.61-69.

Vivo, I. et al., 2012. Design of Multifunctional Gold Nanoparticles for In Vitro and In Vivo Gene Silencing. *ASC Nano*, 6 (9), pp.8316–8324.

Wagner, V. et al., 2006. The emerging nanomedicine landscape. , 24(10), pp.1211-1217.

Wang, M. et al., 2016. Efficient delivery of genome-editing proteins using bioreducible lipid nanoparticles. *PNAS*, pp.10-15.

Wang, Y. et al., 2015. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(2), pp.313-327.

Xia, T. et al., 2009. Polyethyleneimine Coating Enhances the Cellular Uptake of Mesoporous Silica Nanoparticles and Allows Safe Delivery of siRNA and DNA Constructs. *ACS Nano*, 3(10), pp.3273-3286.

Yan, J. et al., 2017. Multifunctional nanoparticles self-assembled from polyethylenimine-based graft polymers as efficient anticancer drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155, pp.118-127.

Zheng, G. et al., 2017. Dual-Targeting Multifunctional Mesoporous Silica Nanocarrier for Codelivery of siRNA and Ursolic Acid to Folate Receptor Overexpressing Cancer Cells. *Journal of agricultural and food chemistry*.