

KNOCKOUT DEL GEN BCY84_00258 EN EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi* DM28C EMPLEANDO LA TÉCNICA DE EDICIÓN GÉNICA CRISPR-CAS9

Nombres y apellidos

Camilo Andrés Barrios Sánchez
Código estudiantil: 202112231789
Indira Vanessa Cantillo Castilla
Código estudiantil: 202112230313

Trabajo de Investigación del Programa Microbiología

Tutor(es):

PhD. Lisandro Alfonso Pacheco Lugo
PhD. Leidy Vanessa Hurtado Gómez

RESUMEN

En el marco de la problemática de la enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* y el incremento en la incidencia de casos en América Latina en conjunto con el hecho de que únicamente existen dos tratamientos para el control de la enfermedad (Nifurtimox y Benznidazol), motivó la realización de un estudio de edición genética en genes constitutivos de *Trypanosoma cruzi* que al evaluarse su función y las consecuencias de su silenciamiento o knockout como forma de sentar las bases para estudios posteriores en los que se investiguen formas de inhibir el metabolismo parasitario y por consiguiente, la muerte del agente etiológico de la enfermedad de Chagas.

Es por esto por lo que como un primer acercamiento a determinar el efecto del knockout del gen BCY84_00258 en el parásito, se planteó como objetivo principal de este proyecto llevar a cabo el cleavage in vitro del gen BCY84_00258 en

epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* utilizando la técnica de edición génica CRISPR-Cas9.

Esta investigación se enfocó en comprender el papel de este gen en la biología del parásito y evaluar su potencial como blanco para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra la enfermedad de Chagas. La metodología empleada consistió en generación de un vector plasmídico el cual contuviese la información genética necesaria para la síntesis de las moléculas involucradas en el sistema CRISPR-Cas, para esto se alinearon oligonucleótidos correspondientes a secuencias de DNA de aproximadamente 20pb las cuales hacen parte de la secuencia del gen de interés de forma que al ser transcritos permitan la formación de crRNA, a su vez, aguas abajo de este se introduce una secuencia que codifique para el tracrRNA, estos dos últimos forman el sgRNA necesario para dirigir la Cas9 al sitio específico de corte. La extracción de ADN genómico de *T. cruzi* cepa DM28C para la amplificación e identificación del gen BCY84_00258, el cual funcionó como el DNA template para la reacción de cleavage in vitro del gen en cuestión, seguido del diseño y la producción de Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9) recombinante a partir de la clonación de bacterias *E. coli* Rosetta de un plásmido que contenga la secuencia de dicha endonucleasa, su sobreexpresión, extracción y purificación, garantizando la actividad de la enzima posterior al proceso.

Se logró generar un sgRNA para el gen BCY84_00258. Se amplificó un fragmento de 292pb del gen BCY84_00258 con primers específicos para generar una secuencia complementaria al sgRNA generado permitiendo el corte de dsDNA por parte de la Cas9. La extracción y purificación de la Cas9 se realizó mediante FPLC, seleccionando fracciones con un valor pico >50mAU como criterio de calidad. Se llevó a cabo el cleavaje in vitro obteniéndose un corte parcial del DNA. Estos datos resaltan el potencial del gen BCY_84_00258 como gen de interés biotecnológico prometedor para el desarrollo de nuevas estrategias para la enfermedad de Chagas como la búsqueda y evaluación de moléculas que inhiban la actividad del producto proteico del gen que permitan su uso como terapia contra la enfermedad, abriendo nuevas posibilidades en la lucha contra esta enfermedad endémica de la zona tropical del continente americano.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, CRISPR-Cas9, Cleavage, BCY84_00258, Edición génica.

ABSTRACT

In the context of the problem of Chagas disease, caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* parasite and the increase in the incidence of cases in Latin America in conjunction with the fact that there are only two treatments to control the disease (Nifurtimox and Benznidazole), motivated the carrying out of a genetic editing study on constituent genes of *Trypanosoma cruzi* that evaluated its function and the consequences of its silencing or knockout as a way of laying the foundations

for subsequent studies in which ways to inhibit parasitic metabolism are investigated. and consequently, the death of the etiological agent of Chagas disease.

This is why, as a first approach to determining the effect of the knockout of the BCY84_00258 gene in the parasite, the main objective of this project was to carry out the in vitro cleavage of the BCY84_00258 gene in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* using the CRISPR-Cas9 technique of gene editing.

This research focused on understanding the role of this gene in the biology of the parasite and evaluating its potential as a target for the development of new therapeutic strategies against Chagas disease. The methodology used consisted of generating a plasmid vector which contained the genetic information necessary for the synthesis of the molecules involved in the CRISPR-Cas system. For this, oligonucleotides corresponding to DNA sequences of approximately 20bp were aligned using the ramp alignment technique, which are part of the sequence of the gene of interest so that when transcribed they allow the formation of crRNA, in turn, downstream of this a sequence is introduced that codes for the tracrRNA, the latter two form the sgRNA necessary to direct Cas9 to the specific site of court. The extraction of genomic DNA from *T. cruzi* strain DM28C for the amplification and identification of the gene BCY84_00258, which functioned as the DNA template for the in vitro cleavage reaction of the gene in question, followed by the design and production of Cas9 from *Staphylococcus aureus* (SaCas9) recombinant from the cloning of *E. coli* Rosetta bacteria of a plasmid that contains the sequence of said endonuclease, its overexpression, extraction and purification, guaranteeing the activity of the enzyme after the process.

It was possible to generate an sgRNA for the BYC84_00258 gene. A 292bp fragment of the BCY84_00258 gene was amplified with specific primers to generate a sequence complementary to the generated sgRNA allowing the cutting of dsDNA by Cas9. The extraction and purification of Cas9 was carried out by FPLC, selecting fractions with a peak value >50mAU as a quality criterion. Cleavage was carried out in vitro, obtaining a partial cut of the DNA. These data highlight the potential of the BCY_84_00258 gene as a gene of promising biotechnological interest for the development of new strategies for Chagas disease, such as the search and evaluation of molecules that inhibit the activity of the gene's protein product, allowing its use as therapy against the disease, opening new possibilities in the fight against this disease endemic to the tropical zone of the American continent.

KeyWords: *Trypanosoma cruzi*, CRISPR-Cas9, Cleavage, BCY84_00258, genetic editing.

REFERENCIAS

1. Alkhnabashi, O. S., Meier, T., Mitrofanov, A., Backofen, R., & Voß, B. (2020). CRISPR-Cas bioinformatics. *Methods*, 172(July 2019), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.07.013>
2. Amitai, G., & Sorek, R. (2016). CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature Publishing Group*, 1-10. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.14>
3. Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519), 569-573. <https://doi.org/10.1038/nature13579>
4. Apt B, W., & Zulantay A, I. (2011). Update on the treatment of Chagas' disease. *Revista Medica de Chile*, 139(2), 247-257.
5. Beckert, B., & Masquida, B. (2011). Synthesis of RNA by In Vitro Transcription. *Methods in Molecular Biology*, 703, 29-41. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-248-9>
6. Carrada-Bravo, T. (2004). Trypanosoma cruzi: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev Mex Patol Clin*, 51(4), 205-219.
7. Chin, C. L., Goh, J. B., Srinivasan, H., Liu, K. I., Gowher, A., Shanmugam, R., Lim, H. L., Choo, M., Tang, W. Q., Tan, A. H. M., Nguyen-Khuong, T., Tan, M. H., & Ng, S. K. (2019). A human expression system based on HEK293 for the stable production of recombinant erythropoietin. *Scientific Reports*, 9(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53391-z>
8. Creutzburg, S. C. A., Swartjes, T., & van der Oost, J. (2020). Medium-throughput in vitro detection of DNA cleavage by CRISPR-Cas12a. *Methods*, 172(October 2019), 27-31. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.11.005>
9. Cromwell, C. R., & Hubbard, B. P. (2021). In Vitro Assays for Comparing the Specificity of First- and Next-Generation CRISPR/Cas9 Systems. *Methods Mol Biol*, 21(62), 215-232. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0687-2_12
10. De Souza, W., De Carvalho, T. M. U., & Barrias, E. S. (2010). Review on Trypanosoma cruzi: Host cell interaction. *International Journal of Cell Biology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/295394>
11. Díaz Palmezano, M. J., Plazas Rey, K. L., Rivera Castillo, E. K., & Rojas Rueda, V. P. (2014). Enfermedad de chagas: realidad de una patología frecuente en Santander, Colombia Revisión de Tema Infectología Chagas disease: reality of a frequent pathology in Santander, Colombia. *Carrera Ed. Monviso. Portón Del Tejar. Bucaramanga. Santander*, 33(1), 91-52.

12. Gonzalez, J. M., Cuéllar, A., & J. Puerta, C. (2018). La respuesta inmunitaria adaptativa en la infección crónica por *Trypanosoma cruzi*. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 41(161), 456. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.506>
13. Grainger, S., Lonquich, B., Oon, C. H., Nguyen, N., Willert, K., & Traver, D. (2017). CRISPR Guide RNA Validation in Vitro. *Zebrafish*, 14(4), 383-386. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1358>
14. Gross, M. M., Strezoska, Ž., & Kelley, M. L. (2015). A CRISPR-Cas9 gene engineering workflow : generating functional knockouts using Edit-R™ Cas9 and synthetic crRNA and tracrRNA. *Application Note Dharmacon™*, 2.
15. Guhl, F. (2000). PROGRAMAS EN LA ELIMINACION DE LA TRANSMISION DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN COLOMBIA. *Revista Medicina*, 2(2), 96-101.
16. Gupta, B. B., Jain, M., Bhingare, P., Dakhore, S., Gupta, S., Bansod, P., Deshmukh, K., Jadhav, G., & Kodape, A. (2022). Silent and silenced disease: a rare presentation of Chagas disease. *International Surgery Journal*, 10(1), 148. <https://doi.org/10.18203/2349-2902.isj20223608>
17. Harrington, L. B., Doxzen, K. W., Ma, E., Liu, J. J., Knott, G. J., Edraki, A., Garcia, B., Amrani, N., Chen, J. S., Cofsky, J. C., Kranzusch, P. J., Sontheimer, E. J., Davidson, A. R., Maxwell, K. L., & Doudna, J. A. (2017). A Broad-Spectrum Inhibitor of CRISPR-Cas9. *Cell*, 170(6), 1224-1233.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.037>
18. Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of Bacteria and Archaea. *Science*, 327(5962), 167-170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>
19. Instituto Nacional de Salud. (2022). *Chagas*. <https://doi.org/10.33610/infoeventos.58>
20. Izzo, V., Costa, M. A., Di Fiore, R., Duro, G., Bellavia, D., Cascone, E., Colombo, P., Gioviale, M. C., & Barbieri, R. (2006). Electrophoresis of proteins and DNA on horizontal sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Immunity and Ageing*, 3, 1-5. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-3-7>
21. Janik, E., Niemcewicz, M., Ceremuga, M., Krzowski, L., Saluk-Bijak, J., & Bijak, M. (2020). Various aspects of a gene editing system—crispr-cas9. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1-20. <https://doi.org/10.3390/ijms21249604>
22. Jaramillo-Jaramillo, I. L., Ruíz, C., Martínez Sánchez, L. M., & Vera-Henao, S. (2017). Enfermedad de Chagas: una mirada alternativa al tratamiento Chagas disease: an alternative look to treatment. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(2), 1-17.

23. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *ScienceMag*, 337(August), 816-821.
<https://doi.org/10.1126/science.1225829>
24. Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., Iavarone, A. T., Charpentier, E., & Nogales, E. (2014). Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation. *Science*, 343(6176), 1-28. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1247997>
25. Kolesnik, M. V., Fedorova, I., Karneyeva, K. A., Artamonova, D. N., & Severinov, K. V. (2021). Type III CRISPR-Cas Systems: Deciphering the Most Complex Prokaryotic Immune System. *Biochemistry (Moscow)*, 86(10), 1301-1314.
<https://doi.org/10.1134/S0006297921100114>
26. Liu, W., Yu, H., Zhou, X., & Xing, D. (2016). In Vitro Evaluation of CRISPR/Cas9 Function by an Electrochemiluminescent Assay. *Analytical Chemistry*, 88(17), 8369-8374. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02338>
27. Liu, Y. (2011). BioMEMS and Lab-on-a-Chip Course Education at West Virginia University. *Biosensors*, 1(1), 4-12. <https://doi.org/10.3390/bios1010004>
28. López, D. C. (2017). 2.4 Estudios de enfermedades con la herramienta CRISPR. *CRISPR-Cas9 : Técnicas y Aplicaciones*, 29-36.
29. Maguirre, J. H. (1996). Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). In *Global HIV/AIDS Medicine* (Vol. 26, pp. 747-753).
30. Martínez-Oliva, B. G. (2020). Crispr, a tool for editing genomes. *Gaceta Médica Boliviana*, 43(2), 179-183. <https://doi.org/10.47993/gmb.v43i2.66>
31. Mingot, J. M., Bohnsack, M. T., Jäkle, U., & Görlich, D. (2004). Exportin 7 defines a novel general nuclear export pathway. *EMBO Journal*, 23(16), 3227-3236.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600338>
32. NHI. (2024). *GENETIC ENGINEERING*. National Human Genome Research Institute.
<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Genetic-Engineering>
33. Palomo Martínez, A. (1996). *Ciencia, salud y desarrollo*. El Colegio Nacional.
34. Parra-Henao, G., & Vera, M. (2022). Enfermedad de Chagas, logros y perspectivas en Colombia. *Biomédica*, 42(2), 213-217.
35. Peña-Callejas, G., González, J., Jiménez-Cortés, J. G., De Fuentes-Vicente, J. A., Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., & Flores-Villegas, A. L. (2022). Enfermedad de Chagas: biología y transmisión de *Trypanosoma cruzi*. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 25, 1-19.
<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.449>

36. Pickar-Oliver, A., & Gersbach, C. A. (2019). The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(8), 490-507. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0131-5>
37. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281-2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
38. Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., de Alba-Alvarado, M. C., Castillo-Saldaña, D. R., Zenteno-Galindo, E. A., Rojo-Medima, J., Fernandez-Santos, N. A., & Perera-Salazar, M. G. (2016). Enfermedad de Chagas en Mexico. *Revista de La Facultad de Medicina de La UNAM*, 45(2), 84-92.
39. Sigma-Aldrich. (2014). *Custom DNA Oligos Protocol for Annealing Oligonucleotides*.
40. Toso M, A., Vial U, F., & Galanti, N. (2012). Oral transmission of chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, 54(6), 845-852. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>
41. Yarbrough, K. B., Neuhaus, K. J., & Simpson, E. L. (2013). The effects of treatment on itch in atopic dermatitis. *Dermatologic Therapy*, 26(2), 110-119. <https://doi.org/10.1111/dth.12032>
42. Zheng, Y., Li, J., Wang, B., Han, J., Hao, Y., Wang, S., Ma, X., Yang, S., Ma, L., Yi, L., & Peng, W. (2020). Endogenous Type I CRISPR-Cas: From Foreign DNA Defense to Prokaryotic Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(March), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00062>
43. Zhou, X., Fu, Q., Yang, T., & Sun, M. (2023). CRISPR/Cas9-mediated knockin of IRES- tdTomato at Ins2 locus reveals no RFP-positive cells in mouse islets. *Functional and Integrative Genomics*, 23(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10142-023-960-1>
44. Zhu, Y. (2022). Advances in CRISPR/Cas9. *BioMed Research International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9978571>