



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Desarrollo de un modelo *in vitro* de
deficiencia constitutiva de la enzima
GALNS en células estromales
mesenquimales humanas mediante
el uso de CRISPR-Cas9**

Valérie Dorsant Ardón

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Morfología
Bogotá, Colombia
2021-2

Desarrollo de un modelo *in vitro* de deficiencia constitutiva de la enzima GALNS en células estromales mesenquimales humanas mediante el uso de CRISPR-Cas9

Valérie Dorsant Ardón

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Genética Humana

Director:

GUSTAVO ANDRES SALGUERO LOPEZ, MD. PhD

Codirectora:

ZULMA JANETH DUEÑAS GOMEZ Bs. MS. PhD

Línea de Investigación:

Ingeniería Molecular y Celular

Grupo de Investigación:

Unidad de Terapias Avanzadas – Instituto Distrital de Ciencia Biotecnología e Innovación
(IDCBIS)

Universidad Nacional de Colombia
Medicina, Departamento de Morfología
Bogotá, Colombia

2021

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

X

Valérie Dorsant Ardón

Agradecimientos

Agradezco a mis padres, quienes son mis héroes y mi motor.

Agradezco también a la Universidad Nacional de Colombia, Institución educativa en la que pude culminar mi educación de pregrado y continuar con el aprendizaje en el nivel de posgrado.

Al Instituto Nacional de Ciencia Biotecnología en Innovación en Salud (IDCBIS) Institución, en especial a la Unidad de Terapias Avanzadas en cabeza de mi director de tesis, el Doctor Gustavo Andrés Salguero, gracias a quien pude realizar los experimentos requeridos para la culminación de este trabajo y fue la Institución quien aportó los recursos para la realización de este. Al grupo de la Unidad de Terapias Avanzadas, en especial a Diana, July, Alejandro, Karl e Ingrid quienes fueron una gran fuente de entrenamiento y conocimiento.

A mi codirectora, La Dra. Zulma Janeth Dueñas, quien inculcó en mí la pasión por la investigación desde semilleros de Investigación en pregrado y sin quien no hubiese sido posible continuar hasta esta etapa de mi formación académica, profesional y personal.

Gracias a todos haber sido un gran apoyo durante esta etapa.

Resumen

Desarrollo de un modelo *in vitro* de deficiencia constitutiva de la enzima GALNS en células estromales mesenquimales humanas mediante el uso de CRISPR-Cas9

La mucopolisacaridosis Tipo IVA o síndrome de Morquio es una enfermedad autosómica recesiva causada por la deficiencia de la enzima N galactosamina -6- sulfatasa (GALNS), necesaria para descomponer los glucosaminoglicanos (GAG) queratán sulfato (KS) y condroitín sulfato (CS). La deficiencia enzimática conlleva a la disfunción lisosomal especialmente en tejidos conectivos ricos en KS y CS como cartílago, córnea y válvulas cardíacas. Existe evidencia acumulada *in vitro* e *in vivo* que aborda los mecanismos fisiopatológicos que determinan finalmente las manifestaciones clínicas en pacientes afectados, especialmente en tejidos osteocondrales. Sin embargo, la dificultad en la obtención de tejidos óseos y articulares de pacientes afectados ha limitado el estudio de los efectos deletéreos tempranos de la deficiencia de GALNS en el componente estromal mesenquimal. Específicamente es poco conocido el efecto de la pérdida de la de GALNS el potencial proliferativo y de diferenciación osteogénica de estas células.

Para este estudio se emplearon CEM de gelatina de Wharton (GW) de cordón umbilical, las cuales han sido ampliamente estudiadas en el grupo de investigación de la Unidad de Terapias Avanzadas del IDCBIS, estas fueron editadas mediante el uso de CRISPR-Cas9 para la generación de células *knock-out*, y se determinó compromiso en su capacidad proliferativa, y de diferenciación osteogénica asociada al porcentaje predicho de edición génica.

Palabras clave: células estromales mesenquimales, Proteína 9 asociada a CRISPR, edición génica, mucopolisacaridosis tipo IV A, enfermedad de Morquio.

Abstract

Development of an in vitro model of the GALNS enzyme deficiency in human mesenchymal stromal cells using the CRISPR/Cas9 system

Mucopolysaccharidoses type IVA or Morquio's disease is a pathology with a recessive inheritance pattern due to the deficiency of the N-galactosamine-6-sulfatase enzyme (GALNS), required for the metabolism of the glycosaminoglycans (GAG) Keratan sulfate (KS) and Chondroitin Sulfate (CS). The enzyme deficiency leads to lysosomal dysfunction that affects primarily CS and KS rich tissues like cartilage, cornea, and heart valves.

There is increasing in vivo and in vitro evidence that describes the physio pathological mechanisms that lead to the clinical presentation in these patients especially in osteochondral tissues. However, it is difficult to obtain biopsy samples of bone and articular cartilage from these patients, and this limits the study of the early pathological signs due to GALNS deficiency in mesenchymal stromal cells (MSC).

For this study MSCs from Wharton jelly were used, these cells have been broadly studied in the Advanced Therapies Unit Group at IDCBIS, these cells were edited using CRISPR-Cas9 to generate a knockout for the GALNS gene, and a negative effect in proliferation and differentiation was found in association of the predicted gene editing percentage of the cellular pool.

Keywords: mesenchymal stromal cells, CRISPR-Associated Protein 9, gene edition, mucopolysaccharidoses type VI A, Morquio's disease

Contenido

Lista de figuras	X
Lista de tablas	XI
Lista de Símbolos y abreviaturas	XII
Introducción	14
1. Marco teórico	16
1.1 Mucopolisacaridosis	16
1.1.1 Mucopolisacaridosis tipo IVA	16
1.1.2 Epidemiología	17
1.1.3 Glucosaminoglicanos	18
1.1.3.1 Condrotín Sulfato	19
1.1.3.2 Keratán Sulfato	19
1.1.4 GALNS	20
1.1.5 Fisiopatología	21
1.1.6 Modelos animales	21
1.2 Células estromales mesenquimales	22
1.2.1 Definición	22
1.2.2 Origen y obtención	22
1.2.3 Importancia clínica	22
1.3 CRISPR-Cas9	23
1.3.1 Historia	23
1.3.2 Función	23
2. Planteamiento del problema	25
2.1 Objetivo general	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. Justificación	27
4. Métodos	29
4.1 Vector plasmídico	29
4.2 Selección de gARN	29

4.3	Clonación	33
4.4	Transformación bacteriana	33
4.5	Confirmación de la clonación	34
4.6	Transfección celular	34
4.7	Curvas de selección con puromicina	35
4.8	Selección de células transfectadas	35
4.9	Extracción de DNA genómico	36
4.10	Ensayo de la endonucleasa T7	36
4.11	Inmuno Blot	37
4.12	Actividad enzimática	37
4.13	Ensayo de proliferación celular	38
4.14	Ensayo de diferenciación osteogénica	39
5.	Resultados	40
5.1	Programa de investigación I: Diseñar un mecanismo de edición génica para el <i>knock-out</i> del gen GALNS en células estromales mesenquimales mediante el uso de CRISPR-Cas9.	40
5.2	Programa de investigación II: Inducir mutagénesis en células estromales mesenquimales mediante el uso de CRISPR/Cas9	42
	<i>Selección de células transfectadas</i>	44
5.3	Programa de investigación III: Determinar la tasa de mutagénesis generada en células estromales mesenquimales y el impacto en la síntesis proteica y la actividad enzimática de GALNS.	45
5.4	Programa de investigación IV: Determinar el impacto de la deficiencia de la enzima GALNS en proliferación celular y diferenciación a linaje osteogénico en células estromales mesenquimales.	49
6.	Recursos de software y análisis estadístico	53
7.	Discusión	55
8.	Conclusiones	60
9.	Limitaciones y perspectivas	61
10.	Productos	62
11.	Aspectos éticos	63

Lista de figuras

	<i>Pág.</i>
Ilustración 1: Porcentaje de diagnósticos de MPS en el mundo	18
Ilustración 2: Vía de degradación de los glucosaminoglicanos.....	20
Ilustración 3: Estructura cuaternaria de la enzima GALNS homodimérica.....	21
Ilustración 4: Características de las células estromales mesenquimales.....	22
Ilustración 5: Sistema de defensa CRISPR/Cas9 en bacterias.....	24
Ilustración 6: Estructura del 4-Metil umbeliferil b-D-galactopiranosido-6-sulfato.....	38
Ilustración 7: Electroferogramas de secuenciación tipo Sanger confirmatoria de ligación	40
Ilustración 8: Citometría de flujo de CEM transfectadas con el constructo mostrando la expresión de Cas9. a) Células no transfectadas (control negativo), b) células nucleofectadas y marcadas con anticuerpo APC anti-FLAG sin selección de puromicina mostrando la eficiencia de transfección.....	42
Ilustración 9: : Curva de selección seriada con puromicina	43
Ilustración 10: Citometría de flujo. Transfección y selección de CEM 202 P2(P1) con puromicina. Imagen representativa de a) control negativo de la marcación, b) CEM 202-sgB P2(P1) c) CEM 202-sgNT P2(P1).	44
Ilustración 11: Resultados de células transfectadas pre y post selección con puromicina. *** $p < 0.001$ (t-test)	44
Ilustración 12: Ensayo de T7 endonucleasa de los fragmentos de PCR. Se muestran resultados de gel representativo. Este gel presenta un corte entre los pozos 2 y 3 con el fin de remover un pozo vacío	45
Ilustración 13: Imagen representativa de inmunoblots realizados.....	46
Ilustración 14: Análisis de ImageJ que muestra diferencias en la medición de GALNS en el inmunoblot. * = $p = 0.05$	46
Ilustración 15: Actividad enzimática relativa mediante el ensayo de sal sódica de 4-Metillumbelliferil β -D-Galactopyranoside-6-sulfato. El eje Y muestra el porcentaje normalizado sobre la línea celular WT del mismo donante.....	48
Ilustración 16: Actividad enzimática relativa.....	48
Ilustración 17: Curvas de crecimiento celular.....	50
Ilustración 18: Diferenciación osteogénica donante CEM148.....	51
Ilustración 19: Diferenciación osteogénica donante CEM154.....	52
Ilustración 20: Diferenciación osteogénica donante CEM202.....	52
Ilustración 21: Diferenciación osteogénica donante CEM206.....	52
Ilustración 22: Análisis de las diferenciaciones osteogénicas mediante el uso de rojo de Alizarina.....	53
Ilustración 23: Estructura de GALNS con aumento (cuadro naranja) de sitio catalítico. ..	55
Ilustración 25: Porcentaje de reporte de NHEJ comparando el ensayo de T7 con NGS. Tomado de ⁵¹	57

Lista de tablas

	<i>Pág.</i>
Tabla 1: gARN preseleccionados	32
Tabla 2: Primers PX459 para secuenciación	34
Tabla 3: Porcentajes de expresión de Ca9-FLAG en CEM pre selección y post selección.	44
Tabla 4: Eficiencia del clivaje del ensayo de T7 endonucleasa.....	45
Tabla 5: Tabla de resumen parcial de resultados	49
Tabla 6: Tiempo de doblaje poblacional	50

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
<i>M</i>	<i>Molar</i>	$6,0221 \times 10^{23}$ unidades elementales	
<i>mM</i>	Milimolar	10^{-3} moles	
<i>nM</i>	NanoMolar	10^{-9} moles	

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI
μg	Microgramos	10^{-6} g
μl	Microlitro	10^{-6} L

Subíndices

Subíndice	Término
-----------	---------

Superíndices

Superíndice	Término
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados

Abreviaturas

Abreviatura	Término
CEM	Células estromales mesenquimales
Cas9	Proteína 9 asociada a CRISPR
C6S	Condroitín 6 sulfato
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, o Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas

GALNS	N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa
<i>gARN</i>	ARN guía
KS	Keratán sulfato
MPS	Mucopolisacaridosis
MPS IVA	Mucopolisacaridosis tipo IVA
MU-Gal-6S	4-Metil umbeliferil b-D-galactopiranosido-6-sulfato
Rpm	Revoluciones por minuto
<i>sgARN</i>	En español: Guía única de ARN

Introducción

La mucopolisacaridosis tipo IV A es una enfermedad de depósito lisosomal con un patrón de herencia autosómica recesiva, debida a variantes patogénicas en el gen de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) que cataliza la degradación sucesiva de los mucopolisacáridos condroitín-sulfato (CS) y Keratán sulfato (KS).¹

A nivel mundial, la prevalencia al nacer es de 1:250.000 recién nacidos vivos, pero en Colombia se estima en 1:68.000 recién nacidos vivos, siendo uno de los países con mayor incidencia de la enfermedad en comparación con las demás mucopolisacaridosis². Esta enfermedad se asocia a un fenotipo de displasia esquelética caracterizado por disostosis múltiple, baja talla desproporcionada, deformidades esqueléticas como *genu valgum*, cifoescoliosis, desviación cubital de la muñeca, *pectus carinatum*, hipermovilidad articular, opacidades corneales, insuficiencia valvular e hipoacusia, sin compromiso de la función cognitiva, dadas por la acumulación de KS y C6S.³

El diagnóstico se realiza mediante la sospecha clínica, el estudio preliminar bioquímico que evidencia la excreción aumentada de keratán sulfato en orina, el estudio de la actividad enzimática en cultivos de fibroblastos obtenidos de los pacientes afectados siendo este el *gold standard* y la confirmación molecular de variantes patogénicas bialélicas en el gen *GALNS*.

En la actualidad la terapia consiste en la administración de la terapia de reemplazo enzimático desarrollada por BioMarin y aprobada por la FDA para su uso en 2014, mediante la administración bisemanal de 2mg/kg/dosis de la enzima recombinante (rhGALNS) y el manejo de las complicaciones cardiovasculares, pulmonares y óseas de la enfermedad.⁴

Hoy en día se dispone de un modelo animal de enfermedad de Morquio A el cual no cuenta con las características óseas macroscópicas de la enfermedad por lo que se considera un modelo insuficiente a la hora de estudiar nuevas terapias en desarrollo con el fin de determinar el impacto a nivel musculoesquelético de nuevos compuestos⁵.

Según el contexto mostrado previamente, el objetivo de esta propuesta de investigación consiste en desarrollar un modelo *in vitro* de la enfermedad de Morquio tipo A con el fin de determinar el impacto que tiene la deficiencia constitutiva de la enzima GALNS en el fenotipo de las células estromales mesenquimales, y su capacidad de diferenciación hacia el linaje osteogénico.

Para el cumplimiento de los objetivos propuestos se realizará mutagénesis bialélica dirigida del gen GALNS mediante el uso del sistema CRISPR- Cas9, se verificará la adecuada mutagénesis mediante la realización de ensayo de doble híbrido, el impacto en la producción de la proteína, su función enzimática y se analizará el impacto en diferenciación hacia el linaje osteogénico.

1. Marco teórico

1.1 Mucopolisacaridosis

Las mucopolisacaridosis son un grupo de enfermedades de origen genético, clasificadas dentro de los errores innatos del metabolismo, que tienen en común la acumulación de productos intermedios de degradación de los glucosaminoglicanos. Dichos productos de desecho generan alteración en la función lisosomal, conllevando a las alteraciones fenotípicas propias de cada uno de los subtipos de la enfermedad.

1.1.1 Mucopolisacaridosis tipo IVA

- **Historia**

También denominada Enfermedad de Morquio tipo A, fue descrita de forma simultánea e independiente por el pediatra uruguayo Luis Morquio ⁶ y el radiólogo británico James Brailsford en 1929 ⁷ quienes realizaron la descripción de dos familias afectadas por una enfermedad con patrón de herencia autosómica recesiva. Posteriormente en 1962 Pedrini y colaboradores reportaron la excreción de Keratán Sulfato (KS) en orina de 3 pacientes afectados por la entonces denominada enfermedad de Morquio-Ullrich (hoy síndrome de Morquio) diferenciándola bioquímicamente de la enfermedad de Hurler⁸. En 1971 y 1982 se reportan los primeros fenotipos intermedios mostrando la variabilidad fenotípica de la enfermedad. ⁹ Estos hallazgos llevaron en al grupo de Matalón et al. a la descripción de la actividad enzimática deficiente usando cultivos de fibroblastos de pacientes afectados con la enfermedad en 1974¹⁰ y subsecuente purificación en 1987 y clonación en 1991. Para el año 2003 la estructura de la proteína, y más de 30 variantes patogénicas ya se encontraban identificadas, lo que lleva a que en 2003 Tomatsu et al. generen el primer modelo de la enfermedad el cual es un ratón transgénico homocigoto para una delección del exón 2, que lleva a la excreción elevada de glucosaminoglicanos con acumulación de estos en tejidos, pero sin compromiso esquelético macroscópico evidente.

- **Presentación Clínica**

Esta enfermedad se describe como una displasia espondilo-epifisiaria. Los pacientes se encuentran en un espectro fenotípico desde leve (Enfermedad de Perthes aislada)¹¹ hasta el más severo que se caracteriza por disostosis múltiple, talla baja desproporcionada, deformidades esqueléticas como *genu valgum*, cifoescoliosis, desviación cubital de la muñeca, *pectus carinatum*, hipermovilidad articular, opacidades corneales, insuficiencia valvular, compromiso pulmonar, hepatomegalia, facies infiltrativas (leve, comparada con otras MPS) e hipoacusia, sin compromiso de la función cognitiva³. La mayoría de los pacientes afectados presentan un fenotipo usual al nacer con talla baja posnatal y las alteraciones previamente descritas.

- **Diagnósticos diferenciales**

La enfermedad de Morquio tipo B, causada por variantes patogénicas bialélicas en el gen *GLB1* es el diagnóstico diferencial más importante de MPSIVA al ser una fenocopia del mismo. De los pacientes con características clínicas de MPSIV, se estima que el 95% corresponden al tipo A y 5%, al B. Otros trastornos a ser considerados son: MPSI, MPSII, MPS III, MPSVI, Síndrome de Dyggve-Melchior-Clausen, entre otros.

La importancia del adecuado diagnóstico radica en el pronóstico cognitivo, la capacidad de acceder a terapia específica y el asesoramiento genético a los padres.

- **Tratamiento**

En la actualidad la terapia consiste en la administración de la terapia de reemplazo enzimático desarrollada por BioMarin y aprobada por la FDA para su uso en 2014, mediante la administración bisemanal de 2mg/kg/dosis de la enzima recombinante (rhGALNS) y el manejo de las complicaciones cardiovasculares, pulmonares y óseas de la enfermedad.

1.1.2 Epidemiología

A nivel mundial se estima que las mucopolisacaridosis afecta a 1:250000 nacidos vivos (NV), con prevalencias al nacer tan bajas como en Taiwán que registra 0.33 por cada 100000 NV¹² o tan alta como la reportada en Países Bajos con 4.5:100000 NV¹³. En Colombia hay pocos estudios que revelen la distribución de esta patología en el país, pero según un reporte de 2014, se estima la prevalencia en 0.68:100.000 NV para la enfermedad de Morquio tipo A lo que la haría la más prevalente de este grupo de enfermedades.² Adicionalmente en el

contexto colombiano hay descripciones de esculturas precolombinas con alteraciones fenotípicas similares a la patología, lo que sugiere la presencia de individuos afectados por MPSIV desde la época prehispánica¹⁴. Actualmente hay descritas más de 378 variantes patogénicas asociadas al desarrollo de la enfermedad,¹⁵ siendo la variante p.Gly301Cys la de mayor prevalencia reportada en el país.¹⁶

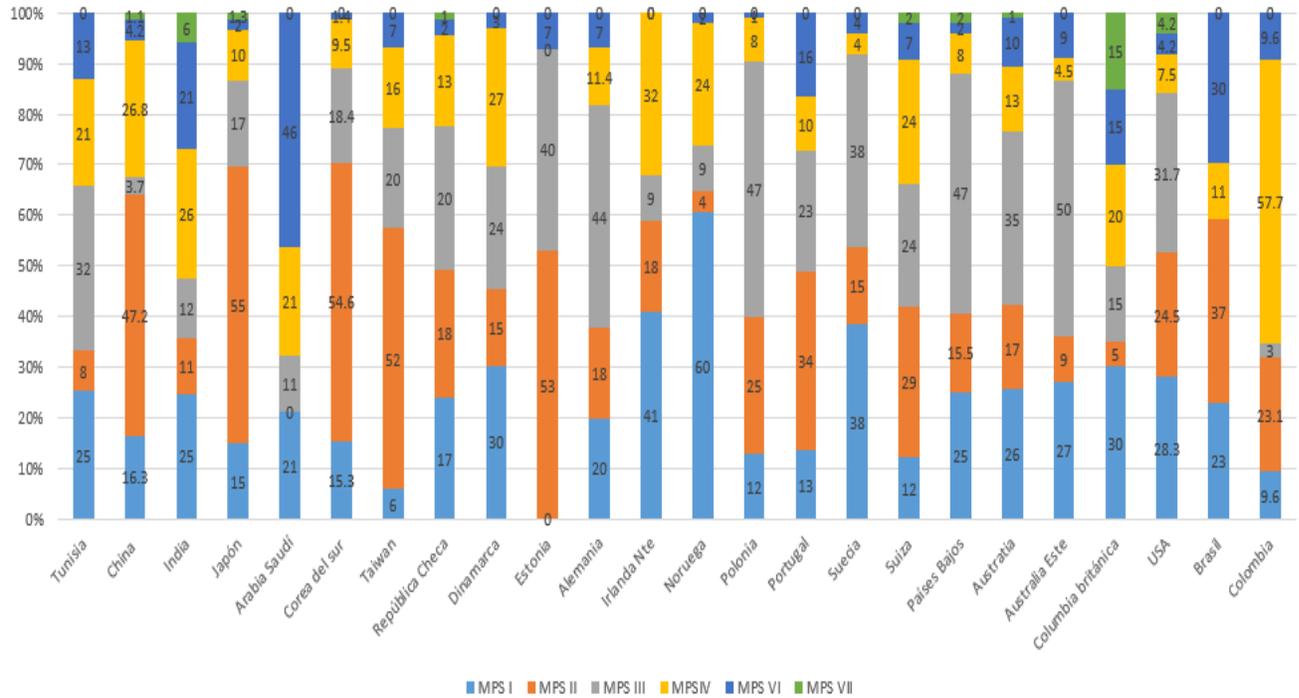


Ilustración 1: Porcentaje de diagnósticos de MPS en el mundo

Modificado de S.A. Khan, et al., Epidemiology of mucopolysaccharidoses^{17,18}

1.1.3 Glucosaminoglicanos

Los glucosaminoglicanos son polímeros lineales de disacáridos únicos a animales y bacterias. Su base contiene N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina y otro grupo sacárido que les confiere características funcionales propias del tejido donde se encuentran. Los grupos que los componen les confieren una carga neta negativa, lo que las lleva a adquirir una disposición lineal con el fin de minimizar la repulsión de los grupos con carga.¹⁹

1.1.3.1 Condroitín Sulfato

Es un polímero compuesto por ácido glucurónico y N-acetilgalactosamina con una adición de grupos sulfato a la estructura química del azúcar.

Se clasifica en 4 tipos: A, C, D y E

- Tipo A: sulfatado en t O-4 de GalNAc,
- Tipo B: Nombre previo al ahora denominado Dermatán sulfato
- Tipo C: sulfatado en O-6 del grupo GalNAc
- Tipo D: sulfatado en la posición 6 del grupo GalNAc y en el carbono 2 del grupo GlcA
- Tipo E: Sulfatado en carbonos 4 y 6 de GalNAc.
-

Este polisacárido se encuentra ligado a proteínas en la membrana y matriz extracelular, en su mayoría en forma de Agreccan y su función es la de conferir elasticidad y resistencia a la tensión a cartílago y tendón.²⁰

1.1.3.2 Keratán Sulfato

Es un polímero de disacáridos lineales cuya unidad básica es lactosamina (unión de galactosa y N-acetilgalactosamina - 3Gal β 1-4GlcNAc β 1), este glucosaminoglicano se encuentra habitualmente sulfatado en posición C6 y en forma de proteoglicano en la matriz extracelular y en la membrana basal y celular. Se clasifica en 3 tipos^{21,22}:

- a) Tipo I: Se encuentra principalmente en córnea contiene la unión de N-acetilgalactosamina N-ligado a residuos asparagina
- b) Tipo II: Aislado de cartílago: contiene la unión de N-acetilgalactosamina O-ligado a residuos serina/treonina.
- c) Tipo III: O denominado KS cerebral: contiene la unión de manosa O-ligada a residuos serina/ treonina.

Su función biológica se ha asociado a la hidratación celular por aumento de la presión oncótica que genera y actúa como buffer al encontrarse parcialmente hidratado, lo que permite un control hídrico dinámico en este tejido, y su acumulación se asocia a la aparición de opacidades corneales en pacientes con Enfermedad de Morquio tipo A.²³ También está presente en cartílago y hueso.

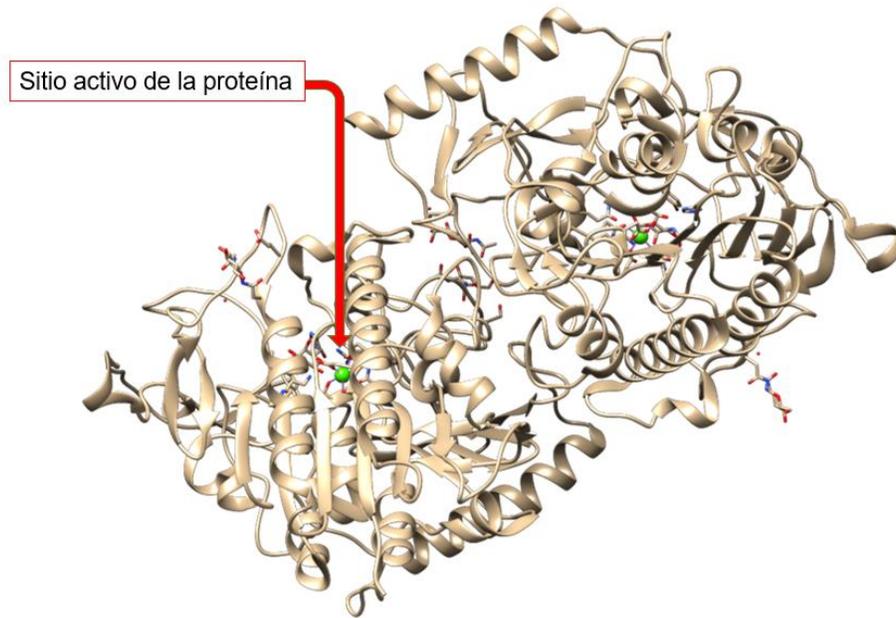


Ilustración 3: Estructura cuaternaria de la enzima GALNS homodimérica.

Realizada con UCSF Chimera.²⁷ en base a la secuencia depositada en PDB ID: 4FDJ

1.1.5 Fisiopatología

La acumulación de CS y KS en cartílago epifisiario y articular genera las manifestaciones esqueléticas clásicas de la patología, la mayoría de estas son irreversibles. Histológicamente se observa vacuolación y apoptosis de los condrocitos, descritas tan temprano como las 20 semanas de gestación ²⁸. Adicionalmente en la histología se puede apreciar pobre organización de las capas superficial y profunda del cartílago articular, aumento del tamaño de los condrocitos en relación a la acumulación intracelular de proteoglicanos, disminución en la cantidad de colágeno tipo II ²⁹ y disminución de la elasticidad de las paredes de las cámaras cardíacas y engrosamiento valvular por depósito de CS, el cual está abundantemente expresado en estos tejidos.²⁰

1.1.6 Modelos animales

En 2003 Tomatsu *et al.* Desarrollaron un modelo animal de la enfermedad de Morquio a partir de rayones C57BL transgénicos, los cuales presentaron mínima actividad enzimática de GALNS por delección de parte del intrón 1 y del exón 2, evidenciando hallazgos histológicos similares a los encontrados en pacientes afectados por MPS IVa pero sin el compromiso esquelético característico de la patología ⁵

1.2 Células estromales mesenquimales

1.2.1 Definición

Las células estromales mesenquimales (CEM) son un grupo heterogéneo de células multipotenciales que se caracterizan por sus propiedades de: 1. Adherencia al plástico, capacidad de diferenciación a linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico y 3. Su positividad para marcadores de superficie: CD105, CD73 y CD90, en más del 95% de las células y negativas para marcadores hematopoyéticos: CD11b/CD14, CD34, CD45, CD79a/CD19 y HLA clase II.³⁰

1.2.2 Origen y obtención

Las CEM se pueden obtener de varios tejidos como tejido adiposo, médula ósea, pulpa dental, amnios, placenta y cordón umbilical, estos últimos poseen la ventaja de no requerir procedimientos invasivos para su obtención, fácil manipulación y potencial de autorrenovación.

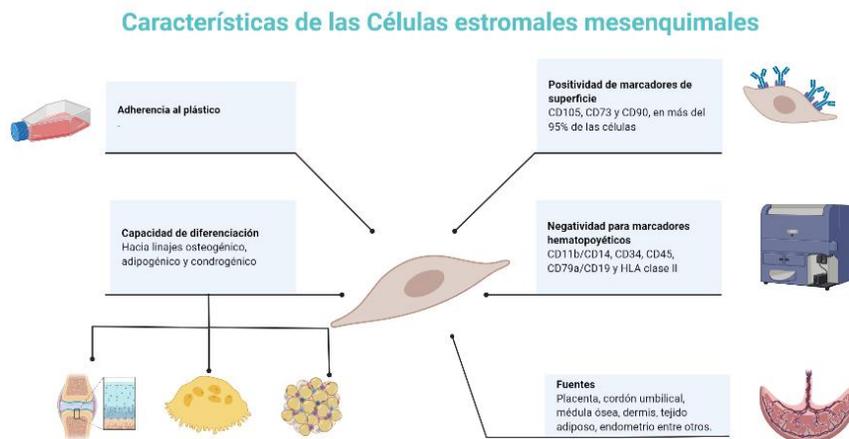


Ilustración 4: Características de las células estromales mesenquimales

Realizado con Biorender

1.2.3 Importancia clínica

Una de las características principales de las CEM es que no expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, por lo que no son reconocidas por células T CD4+³¹, y presentan bajas cantidades de MCH clase I lo que podría hacerlas vulnerables a la acción de las células *Natural killer* (NK),³² esto les confiere características de hipo inmunogenicidad.

Se disponen más de 1048 registros de ensayos clínicos ³³ que emplean CEM como terapia para el tratamiento de patologías como la enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, fibrosis pulmonar entre otras.

1.3 CRISPR-Cas9

1.3.1 Historia

El sistema CRISPR/Cas9 fue descrito inicialmente como un sistema de defensa bacteriano ante la infección por bacteriófagos, sus primeros componentes fueron observados por Ishino y colaboradores, quienes en 1987 describieron la función de la secuencia *iap* en la formación de isoenzimas de fosfatasa alcalina ³⁴, durante este estudio presentaron dificultades metodológicas en la caracterización de secciones corriente arriba del gen debidas a secuencias palindrómicas que generaban auto complementariedad de estas, dificultando su análisis. Posteriormente en el 2000, Mojica *et al.* reconocen nuevamente la secuencia de CRISPR en varios grupos bacterianos bajo la hipótesis de su rol como reguladores de expresión génica en arqueobacterias ³⁵. En 2002 Jansen y colaboradores acuñan el término CRISPR para definir el locus asociado a las repeticiones palindrómicas y nuevamente Mojica y colaboradores en 2005 realizan aportes en la descripción del sistema encontrando secuencias similares en virus bacteriófagos, determinando así su rol en sistemas de defensas bacterianos contra infecciones virales.

En 2007 Barrangou *et al.* realizaron la confirmación *in vitro* de la función del *locus* de CRISPR en las bacterias *S. thermophilus* mediante la inducción de resistencia utilizando retos virales con bacteriófagos. ³⁶ y en 2012 de forma simultánea los grupos de Jennifer Doudna, Michelle Carpentier y Virginijus Siksnys confirmaron *in vitro* la función endonucleasa de la proteína 9 asociada a CRISPR (Cas9) en bacterias ^{37,38} haciendo merecedoras a Doudna y Carpentier del premio nobel Química en el año 2020.

1.3.2 Función

En bacterias, CRISPR/Cas9 funciona como un sistema de defensa adaptativo, que, tras una primoinfección por virus bacteriófagos, genera secuencias espaciadoras en el *locus* de CRISPR, estas secuencias son específicas del virus y se transcriben de forma policistronica tras nuevas infecciones por los virus, con lo cual las secuencias de ARN se ensamblan junto con la proteína Cas9 en un complejo ribonucleoprotéico, que genera la escisión del ADN

extraño complementario. Esta proteína tiene actividad endonucleasa conferida por dominio HNH y RuvC que le permiten realizar cortes de doble hebra en regiones de homología con el sgARN que cuente con una secuencia de nucleótidos específica llamada secuencia PAM (Motivo adyacente al proto espaciador), lo que le permite a la endonucleasa cortar el ADN viral y no el *locus* de CRISPR que se encuentra en el genoma bacteriano.³⁹

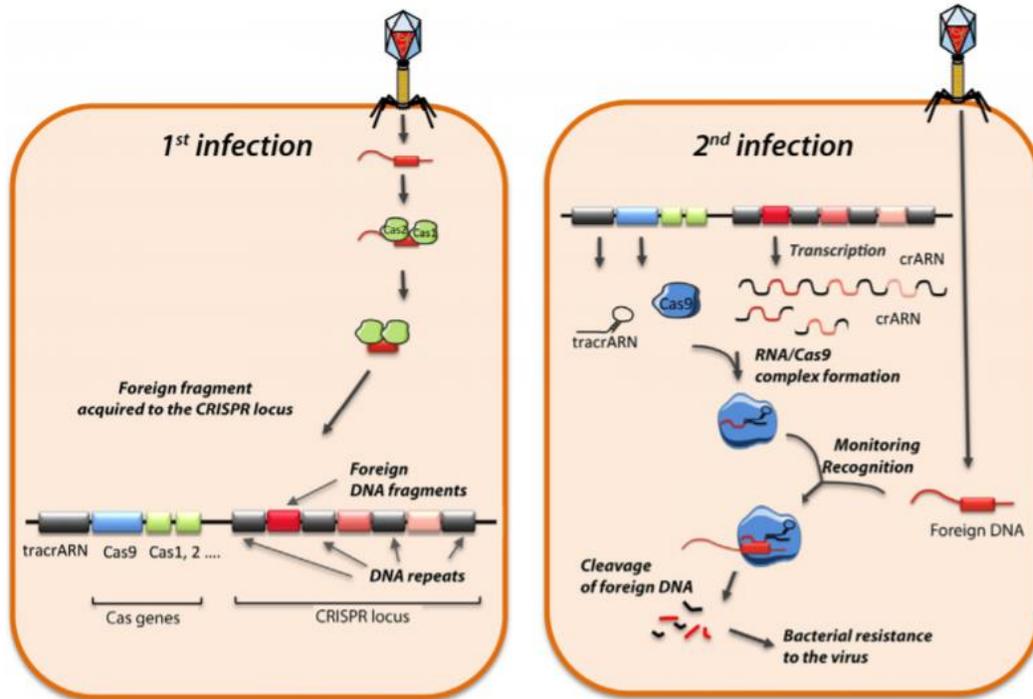


Ilustración 5: Sistema de defensa CRISPR/Cas9 en bacterias
Tomado de: ⁴⁰

2. Planteamiento del problema

En estudio y desarrollo de potenciales tratamientos en el contexto de enfermedades de muy baja frecuencia, o enfermedades huérfanas como es el caso del Síndrome de Morquio ha dependido del estudio del genotipo y su impacto en el fenotipo y el desarrollo de la enfermedad en individuos afectados. Con suerte, se han desarrollado además modelos in vitro basados en el uso de componentes celulares aislados de los mismos individuos, con las implicaciones éticas y dificultades para el acceso a estos recursos de investigación. Alternativamente, como se mencionó anteriormente, se han desarrollado modelos murinos de la mutación, con poco éxito al reproducir la fisiopatología de la enfermedad. La generación de modelos experimentales de la enfermedad de Morquio, más reproducibles, homogéneos y técnicamente factibles son críticos no solo para entender el componente celular y molecular subyacente al fenómeno patológico, sino además porque representan una oportunidad para la investigación y el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas para ofrecer a los pacientes y familias afectadas.

En este estudio se pretende aprovechar dos tecnologías biotecnológicas que actualmente desarrolla la Unidad de Terapias Avanzadas del Instituto Distrital de Ciencia Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS): la generación de estrategias terapéuticas basadas en la producción farmacéutica de Células Estromales Mesenquimales y la implementación de técnicas de mutagénesis basadas en el uso del sistema CRISPR-Cas9. Basados en la combinación de estas dos metodologías, se quiere implementar un modelo experimental altamente reproducible de deficiencia constitutiva del gen GALNS, en un tipo celular estromal que al estar derivado de la línea mesenquimal, puede recapitular la fisiología celular y molecular de la diferenciación osteogénica y que se encuentra severamente afectada en el fenotipo observado en la Síndrome de Morquio.

Implementar un modelo experimental con componentes humanos, altamente reproducible y costo-efectivo de deficiencia constitutiva de GALNS en células mesenquimales, permitirá generar una herramienta de investigación y desarrollo orientada no solo a entender mejor los cambios fisiológicos y patológicos de la mucopolisacaridosis, sino adicionalmente permitirá estudiar nuevas opciones terapéuticas para reducir el impacto de la enfermedad.

2.1 Objetivo general

Generar un modelo in vitro de deficiencia constitutiva de la enzima GALNS en células estromales mesenquimales humanas mediada por CRISPR-Cas9

2.2 Objetivos específicos

- Diseñar un mecanismo de edición génica para el *knock-out* del gen GALNS en células estromales mesenquimales mediante el uso de CRISPR-Cas9
- Inducir mutagénesis en células estromales mesenquimales mediante el uso de CRISPR/Cas9
- Determinar la tasa de mutagénesis generada en células estromales mesenquimales y el impacto en la síntesis proteica y la actividad enzimática de GALNS.
- Determinar el impacto de la deficiencia de la enzima GALNS en proliferación celular y diferenciación a linaje osteogénico en células estromales mesenquimales.

3. Justificación

La mucopolisacaridosis tipo IV A es una enfermedad de depósito lisosomal con un patrón de herencia autosómica recesiva, debida a mutaciones en el gen de la N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (GALNS) que cataliza la degradación sucesiva de los mucopolisacáridos condroitín-6-sulfato (C6S) y keratán sulfato (KS).¹

A nivel mundial afecta a 1:25.000 nacidos vivos, pero en Colombia la incidencia se estima en 1:68.000 recién nacidos vivos, siendo uno de los países con mayor incidencia de la enfermedad en comparación con las demás mucopolisacaridosis². Esta enfermedad se asocia a un fenotipo de displasia esquelética caracterizado por disostosis múltiple, baja talla desproporcionada, deformidades esqueléticas como *genu valgum*, cifoescoliosis, desviación cubital de la muñeca, *pectus carinatum*, hipermovilidad articular, opacidades corneales, insuficiencia valvular e hipoacusia, sin compromiso de la función cognitiva, dadas por la acumulación de KS y C6S.³

El diagnóstico se realiza mediante la sospecha clínica, el estudio preliminar bioquímico que evidencia la excreción aumentada de KS en orina, el estudio de la actividad enzimática en cultivos de fibroblastos obtenidos de los pacientes afectados siendo este el *gold standard* y la confirmación molecular de variantes patogénicas bialélicas en el gen GALNS.

En la actualidad la terapia consiste en la administración de la terapia de reemplazo enzimático desarrollada por BioMarin y aprobada por la FDA para su uso en 2014, mediante la administración bisemanal de 2mg/kg/dosis de la enzima recombinante (rhGALNS) y el manejo de las complicaciones cardiovasculares, pulmonares y óseas de la enfermedad.⁴

Hoy en día solo se dispone de un modelo animal de enfermedad de Morquio A el cual no cuenta con las características óseas macroscópicas de la enfermedad por lo que no es un modelo confiable a la hora de estudiar nuevas terapias en desarrollo con el fin de determinar el impacto a nivel musculoesquelético de nuevos compuestos⁵.

Según el contexto mostrado previamente, el objetivo de esta propuesta de investigación consiste en desarrollar un modelo *in vitro* de la enfermedad de Morquio tipo A con el fin de

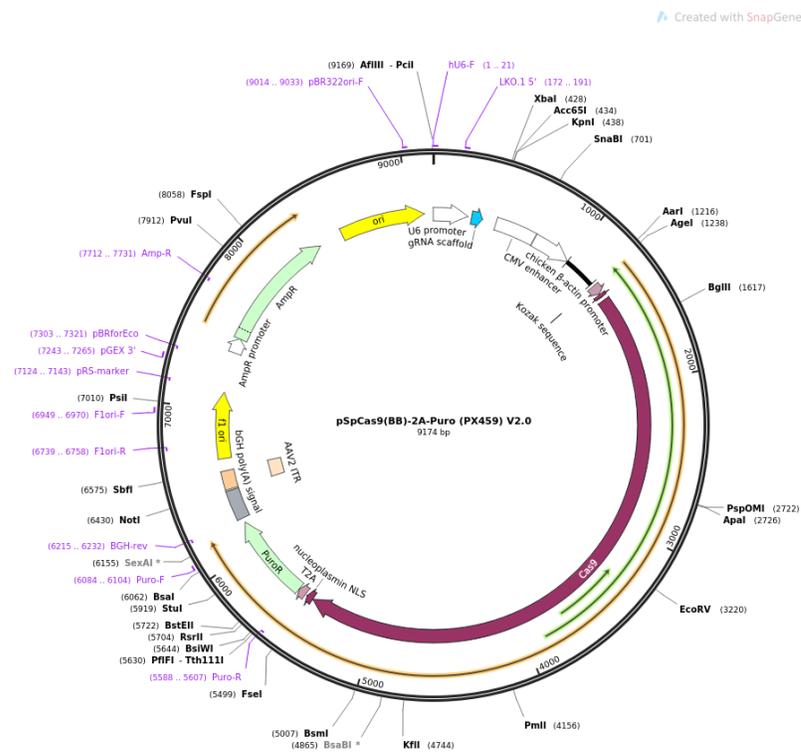
determinar el impacto que tiene la deficiencia constitutiva de la enzima GALNS en el fenotipo de las células estromales mesenquimales, y su capacidad de diferenciación hacia los linajes condrogénico y osteogénico.

Para el cumplimiento de los objetivos propuestos se realizará mutagénesis bialélica dirigida del gen GALNS mediante el uso del sistema CRISPR- Cas9, se verificará la adecuada mutagénesis mediante la realización de ensayo de doble híbrido, el impacto en la producción de la enzima mediante inmunoblot y se analizará el impacto en diferenciación hacia linajes condrogénicos y osteogénicos de estas células.

4. Métodos

4.1 Vector plasmídico

Se seleccionó el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 de Addgene desarrollado por Feng Zhang (Addgene plasmid # 62988; <http://n2t.net/addgene:62988> ; RRID:Addgene_62988).⁴¹ Este vector está compuesto por 9174 pares de bases, contiene el promotor U6 de expresión para el sgARN y de CAG para el gen de la proteína Cas9 que se transcribe de forma policistónica con el gen de resistencia a Puromicina para selección de células de origen mamífero. Adicionalmente (no mostrado en la imagen) Cas9 contiene una señal 3XFLAG que permitirá evaluar la expresión de la proteína mediante citometría de flujo.



4.2 Selección de gARN

Se realizó la búsqueda de las guías de ARN (gARN) en la base de datos CHOPCHOP (versión 3) disponible en <https://chopchop.cbu.uib.no/about>⁴² la cual permite la selección de objetivos para la realización de mutagénesis dirigida, seleccionando inicialmente 5

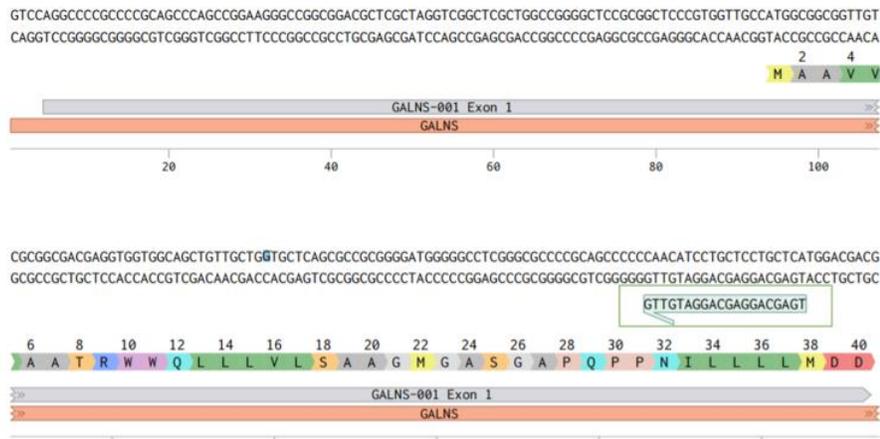
guías contra 5 exones diferentes con la mayor eficiencia, selectividad y menor reporte de *off target*, estos se muestran en la Tabla 1 y se denominaron gRNA-A a gRNA-E para su posterior diferenciación y un gARN control el cual no presenta sitios de homología en el genoma humano. Los resultados de eficiencia fueron confirmados en la base de datos del software *Benchling* al igual que la probabilidad de unión a *off-targets*.

Cabe resaltar que, aunque se encuentran en el repositorio guías con mayores eficiencias, estas fueron seleccionadas de acuerdo a su posición en la proteína, como fue expuesto previamente, GALNS contiene 11 aminoácidos críticos para la formación de un bolsillo catalítico en su región N-terminal (“Asp 39, Asp 40, Arg 83, Tyr 108, Lys 140, His 142, His 236, Asp 288, Asn 289, Lys 310, y DHA 79”²⁶) este proceso de pre-selección se realizó con el fin de incrementar la probabilidad de generar variantes patogénicas que indujeran un alteraciones críticas en el funcionamiento de la enzima.

Particularmente:

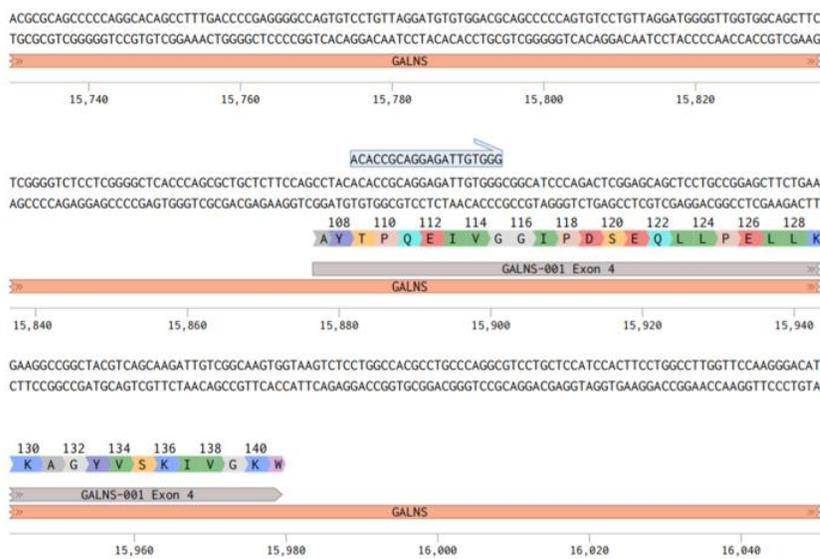
- gARN-A

Tiene una eficiencia del 50% y su sitio de corte se encuentra en la porción final del primer exón, por lo cual es una guía con un objetivo en los primeros aminoácidos de la proteína.



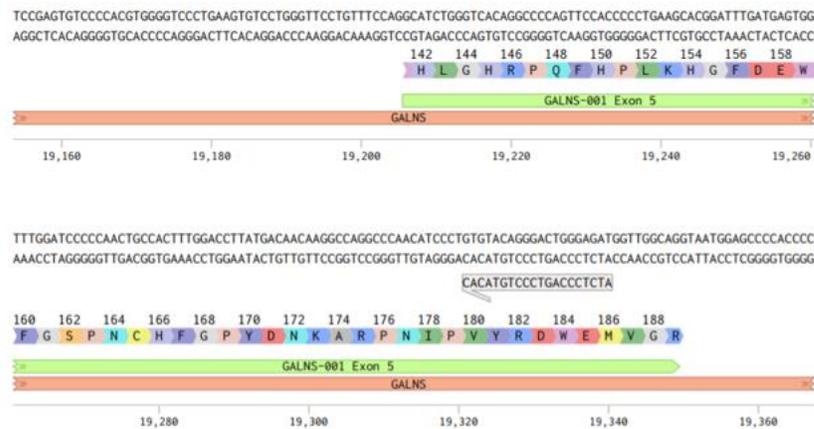
- gARN-B

Tiene una eficiencia del 75%, se une 6pb posterior al inicio del exón 4 y es la guía de mayor eficiencia cercana al codón que codifica para Tyr108, que es un aminoácido importante en la generación del bolsillo catalítico.



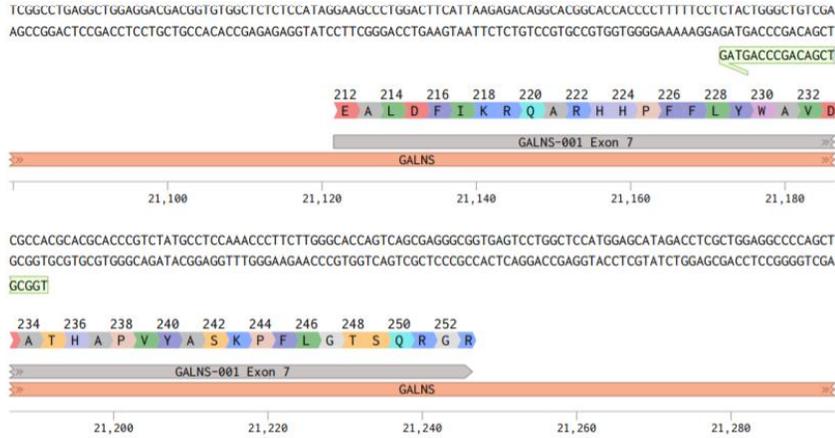
- gARN-C

Tiene una eficiencia del 62%, Se une a la región final del exón 5.



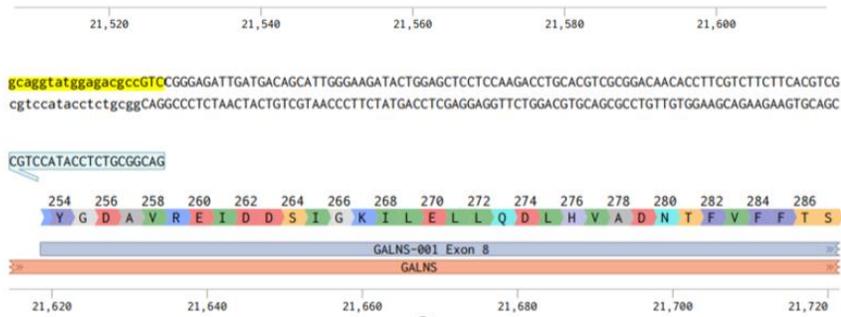
- gARN-D

Eficiencia del 63%, y la de mayor eficiencia con unión flanqueante a His236 en el exón 7.



- gARN-E

Eficiencia del 68% y sitio predicho de corte en el sitio donador de *splicing* en el exón 8.



Después de su selección se realizó la adición de la secuencia 5´CACCG corriente arriba de la secuencia del gARN sentido y de la secuencia 5´AAAC corriente arriba de la secuencia anti sentido, las cuales son necesarias para la clonación en el plásmido PX459.

Tabla 1: gARN preseleccionados

Nombre	Características del sgRNA						
	Secuencia sentido	Exón	Hebra	Off-targets			Eficiencia (%)
GALNS gA	TGAGCAGGAGCAGGATGTTG	1	-	0	0	0	50
GALNS gB	ACACCGCAGGAGATTGTGGG	4	+	0	0	0	74.9
GALNS gC	ATCTCCAGTCCCTGTACAC	5	+	0	0	0	17
GALNS gD	TGGCGTGCACAGCCCAGTAG	7	+	0	0	0	1
GALNS gE	GACGGCGTCTCCATACCTGC	8	+	0	0	0	2
<i>Non Targeting(NT)</i>	GCATATATTGCACACAATTAG	No aplica	No aplica	0	0	0	0

4.3 Clonación

Brevemente, se hibridaron las hebras sentido y anti-sentido de los gARN a 90°C por 3 minutos enfriando la reacción en una rampa de temperatura hasta los 65°C, se mantuvo la temperatura por 30 minutos y se enfrió progresivamente hasta temperatura ambiente, este inserto no requiere del paso de fosforilación. La hibridación de las guías fue confirmada mediante una corrida electroforética en geles de agarosa al 4% y almacenados a -20°C hasta su uso.

Para su clonación se digirió 1ug del plásmido PX459 con 1ul de la enzima BbsI-HF de *New England Biolabs* (NEB), 1 µl del buffer *CutSmart* (NEB), completando la reacción con agua libre de nucleasas hasta 50µl, se realizó la digestión a 37°C por 15 minutos y la enzima fue inactivada a 65°C por 5 minutos. Dado que la enzima BbsI-HF digiere por fuera de la secuencia de reconocimiento, no se requiere paso de desfosforilación, los extremos no son cohesivos, lo que limita la auto ligación del vector.⁴³ Posteriormente se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa al 0,8% a 70V por una hora y posterior purificación del producto digerido siguiendo las indicaciones del kit *Wizard® SV Genomic DNA Purification System* de Promega.

Se ligó el vector con el inserto en una relación de 1:5 de sgARN: plásmido con la enzima T4 ligasa a 8°C por 24 horas. El producto de ligación fue utilizado para el siguiente procedimiento de transformación bacteriana.

4.4 Transformación bacteriana

Los productos de ligación se emplearon para transformación bacteriana, para esto se utilizaron 5uL de este mezclándolos con 25uL de stock de bacterias quimiocompetentes Stbl3, se incubaron durante 30 minutos en hielo, se realizó shock térmico a 42°C por 45 segundos, se mantuvieron en hielo por 5 minutos tras lo cual se adicionaron 125uL de medio SOC y se agitaron de forma constante a 225rpm durante 1 hora a 37°C, se sirvieron 65uL en cajas de Petri con agar LB con 100ug/ml de Ampicilina para la selección de las colonias transformadas. Se incubaron las cajas a 37°C durante 16 horas tras lo cual se realizaron minicultivos, stocks de glicerol y extracción de DNA plasmídico mediante el kit MiniPrep de Zymo® de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Muestras de DNA de cada uno de los plásmidos fueron sometidas a PCR convencional del segmento flanqueante al sitio de clonación de los sgARN utilizando los *primers* PX459 enunciados en Tabla 2: Primers PX459 para secuenciación

Tabla 2: Primers PX459 para secuenciación

Primer FW	AGGGCCTATTTCCCATGATTCCT
Primer RV	GGTCATGTACTGGGCACAATGC

4.5 Confirmación de la clonación

El producto de PCR fue enviado al servicio de secuenciación tipo Sanger del laboratorio Genética Molecular de Colombia S.A.S para la confirmación de su adecuada inserción.

Los stocks de glicerol de los plásmidos confirmados por secuenciación fueron marcados como tal y almacenados a -80°C y serán denominados de ahora en adelante PX459-sg[n], n correspondiendo a la codificación del gran presentada en la Tabla 1. Después de su obtención, los ensayos posteriormente enunciados se realizarán con los plásmidos PX459-sgARN-B, PX459-sgARN-NT.

4.6 Transfección celular

Se utilizaron CEM obtenidas de 4 donantes diferentes provenientes del Banco de Células estromales Mesenquimales del grupo de la Unidad de Terapias Avanzadas del IDCBIS, estas fueron obtenidas de cordones umbilicales donados de forma altruista bajo consentimiento informado. Estas células fueron descongeladas, expandidas en Medio DMEM bajo en glucosa con 10% de Lisado plaquetario y 1x de antibiótico Ampicilina/estreptomicina (de aquí en adelante denominado "Medio completo". Al alcanzar 80% de confluencia se descartó el medio de cultivo, se lavaron dos veces con PBS 1x (GIBCO®), se recolectaron las células y se dividieron en grupos experimentales compuestos por 500.000 células, tras lo cual se centrifugaron a 90g por 5 minutos, se resuspendieron en la solución de transfección del kit P1 de Lonza®, y se adicionaron 5ug de DNA por grupo experimental. Se nucleofectaron con el pulso FF104 que es el de mayor eficiencia disponible para las CEM, se resuspendieron en medio completo a 37°C y se cultivaron en placas de 24 pozos a una densidad de 10964 células/cm² con cambio de medio a las 24 horas post siembra.

Tras 48 horas de cultivo, las células de 2 pozos de la placa sembrada post transfección fueron fijadas y permeabilizadas con el kit de fijación: eBioscience™ de acuerdo con las indicaciones del fabricante y marcadas con el Anticuerpo APC anti-DYKDDDDK Tag (anti-Flag) de Biolegend®

4.7 Curvas de selección con puromicina

El siguiente paso fue la realización de una curva de selección con puromicina para encontrar 3 concentraciones necesarias para la selección de las células que expresaran Cas9. De esta forma, se sembraron CEM a una densidad de 3450 células/cm² en una placa de 24 pozos, todos los pozos fueron utilizados y por triplicados (3 réplicas técnicas por cada donante) las células fueron expuestas a diluciones seriadas de puromicina con el fin de identificar 4 concentraciones del antibiótico en el medio de cultivo de acuerdo con las indicaciones del fabricante⁴⁴:

4.8 Selección de células transfectadas

La eficiencia de la nucleofección en las CEM se determinó mediante cuantificación de células que positivas para FLAG, estas células fueron sometidas a selección por 48 horas con puromicina en DMEM completo, con cambio de medio cada 24 horas. Después de este procedimiento, la eficiencia de la selección fue calculada con la medición de anti FLAG. De las células resultantes de la selección, se realizaron cultivos y expansión hasta obtener la cantidad suficiente para la realización de extracción de proteínas, DNA genómico, siembra de curvas de crecimiento y congelamiento de las líneas.

Estas se denominarán mediante la siguiente estructura:

CEM XXX –Y PN₁(PN₂)

Siendo el primer número de 3 cifras el número del donante, Y corresponderá a la guía (B o NT), PN₁ es el pase de las CEM empleadas y PN₂ es el pase post transfección. Esta nomenclatura se utilizará en los pasos siguientes del trabajo y permitirá comparar células de este y así ayudar en la correcta interpretación de los datos.

4.9 Extracción de DNA genómico

Se extrajo el DNA genómico de cajas T75 de CEM en confluencia del 90% empleando el kit Wizard Plus SV Genomic DNA Purification System de Promega® de acuerdo con instrucciones del fabricante. Se cuantificó el DNA obtenido mediante Nanodrop y se analizó su calidad y pureza empleando las relaciones 260/280 y 230/280.

4.10 Ensayo de la endonucleasa T7

Se realizó PCR de los segmentos de interés usando los *primers* enunciados en la tabla 2. En 50uL de reacción usando 100ng de DNA genómico comparaciones realizadas con células WT y transfectadas con los plásmidos PX459-B y PX459-NT.

Se hibridaron 200 ng de los productos de amplificación, se digirieron mediante el uso de la Endonucleasa T7 I (NEB, M0302L) por 30 minutos a 37°C, el resultante se corrió en un gel de agarosa al 2% de acuerdo con instrucciones del fabricante. Y se analizaron los resultados mediante la fórmula: % modificación génica= $100 \times (1 - (1 - \text{fracción digerida})^{1/2})^{45}$

La obtención de la intensidad de los picos resultado del clivaje enzimático se obtuvo mediante el uso del Software ImageJ de acuerdo con protocolos previamente descritos.

⁴⁵. Extracción y cuantificación de proteínas

Se realizó extracción de proteínas mediante el método de RIPA (R0278-50ML – Sigma Aldrich®) . Brevemente, se lavaron las cajas T75 con CEM en crecimiento hasta el 90% de confluencia, se retiró el medio y se realizaron 2 lavados con PBS 1x frío (Gibco®), se retiró el PBS y se agregaron 300uL de buffer de RIPA con inhibidor de proteasas 1x (Sigmafast) manteniendo la caja T75 10 minutos en hielo, se retiró mediante micropipeta y se transfirió el lisado a un tubo de 1.5mL, se pasó el lisado 3 veces a través de una jeringa de insulina, se centrifugó a 14000g por 15 minutos, el sobrenadante fue colocado en un nuevo tubo, se almacenó separará una alícuota de 10ul para su posterior cuantificación mediante la técnica de Bradford. Los extractos proteicos fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

4.11 Inmuno Blot

Se tomó el equivalente a 30ng de proteína y se adicionó buffer de Laemli (Biorad®) a una concentración final de 1x en presencia de 350mM de DTT y 8M de urea, se calentaron las muestras a 95°C por 10 minutos, posteriormente se corrieron en un gel de poliacrilamida (gel concentrador 5% y gel separador 8%) a 70V por una hora y 45 minutos, se realizó transferencia a membranas de PVDF a 200mA por 2 horas, se bloquearon las membranas en una solución de leche descremada al 5% en solución salina tamponada con tris al 0.1% (TBST) durante 1 hora, posteriormente se incubó con anti-GALNS (PA5-35061 de ThermoFisher) en la solución de bloqueo descrita por 16 horas (este anticuerpo se une a un epítipo generado por la porción final del exón 7 e inicial del exón 8), se realizaron lavados con TBST y se incubaron durante una hora con *Goat anti rabbit* ligado a HRP (ab97051 Abcam®), se realizaron lavados con TBST y se revelarán las membranas mediante el uso de solución de revelado (BIORAD), las membranas serán vistas en un foto documentador y las imágenes serán analizadas mediante el software ImageJ (NIH).

La proteína seleccionada como control de carga fue actina, para el cual se empleó el anticuerpo mouse/human/b actin (Catalog # MAB8929 R&D) con una incubación de 1 hora para el anticuerpo primario y de 2 horas del anticuerpo secundario (Rabbit anti-mouse)

4.12 Actividad enzimática

La medición de la actividad enzimática se realizó mediante el ensayo de sal sódica de 4-Metillumbelliferil β -D-Galactopyranoside-6-sulfato, el cual es un sustrato fluorogénico de la enzima GALNS que mediante conversión de 4-MU-Gal-6S a 4-MU emite fluorescencia a 320nm a pH ácido y a 360nm en pH básico según lo descrito previamente por Van Diggelen ⁴⁶

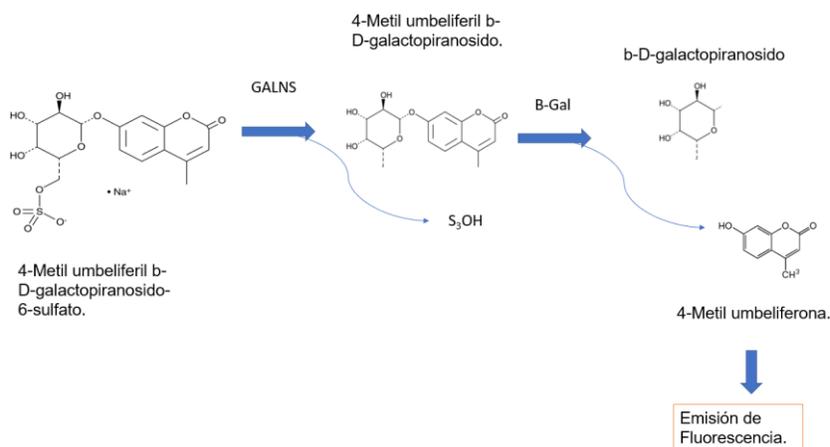


Ilustración 6: Estructura del 4-Metil umbeliferil b-D-galactopiranosido-6-sulfato.

Modificado a partir de: <https://www.caymanchem.com/pdfs/20907.pdf>

Este ensayo se realizó como modificación de forma previamente descrita:⁴⁶

Se tomaron células nucleofectadas con los plásmidos PC459-sgARN seleccionadas, fueron cultivadas hasta 80% de confluencia en cajas T75. Se extrajeron proteínas mediante métodos físicos, se realizó la cuantificación de las mismas y se adicionaron 50ug de proteínas y 30ul de 1nM de MU-Gal-6S en 0.1M de NaCl, 0,1M Acetato de sodio a pH 4.3, Se realizó incubación por 17 horas a 37°C y se terminó la reacción con 200uL de 10.5M de Na₂CO₃/NaHCO₃ pH 10.7, se realizó medición de la fluorescencia emitida por los extractos proteicos usando como blanco los reactivos utilizados sin presencia de proteínas, y otro con presencia de albúmina y como controles positivos se empleó la actividad basal de los mismos donantes sin nucleofección con los sgARN específicos. La medición de la fluorescencia se realizó por triplicados para cada uno de los grupos experimentales. Se cuantificó de la fluorescencia relativa respecto a los controles positivos y la normalización de los valores y máxima generación de 4-MU en presencia de β-Galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (Sigma Aldrich ®) con el fin de disminuir variabilidades atribuibles a función de β-Galactosidasa de los extractos.

4.13 Ensayo de proliferación celular

Posteriormente se realizaron ensayos para determinar los efectos de la sobreexpresión de Cas9 e inactivación de GALNS en la viabilidad y proliferación de las células. En este

caso, se sembraron los diferentes grupos en placas de 12 pozos a una densidad de 3500 células por cm². Se realizó cultivo y conteo de las células durante el tiempo requerido previo a su no crecimiento por confluencia, los datos fueron recolectados y analizados

4.14 Ensayo de diferenciación osteogénica

Se sembraron las células en placas de 24 pozos a una densidad de 5000 células/cm², se dejaron en condiciones estándar de cultivo por 2 días, se reemplazó el medio de crecimiento por Medio de diferenciación osteogénica (ThermoFisher®), se realizó cambio de este cada tercer día, después de 21 días se realizó tinción con rojo de Alizarina para determinar el depósito de calcio ⁴⁷ y se realizó análisis de imagen mediante el uso del Software ImageJ, se compararon las intensidades de los depósitos de calcio.

5. Resultados

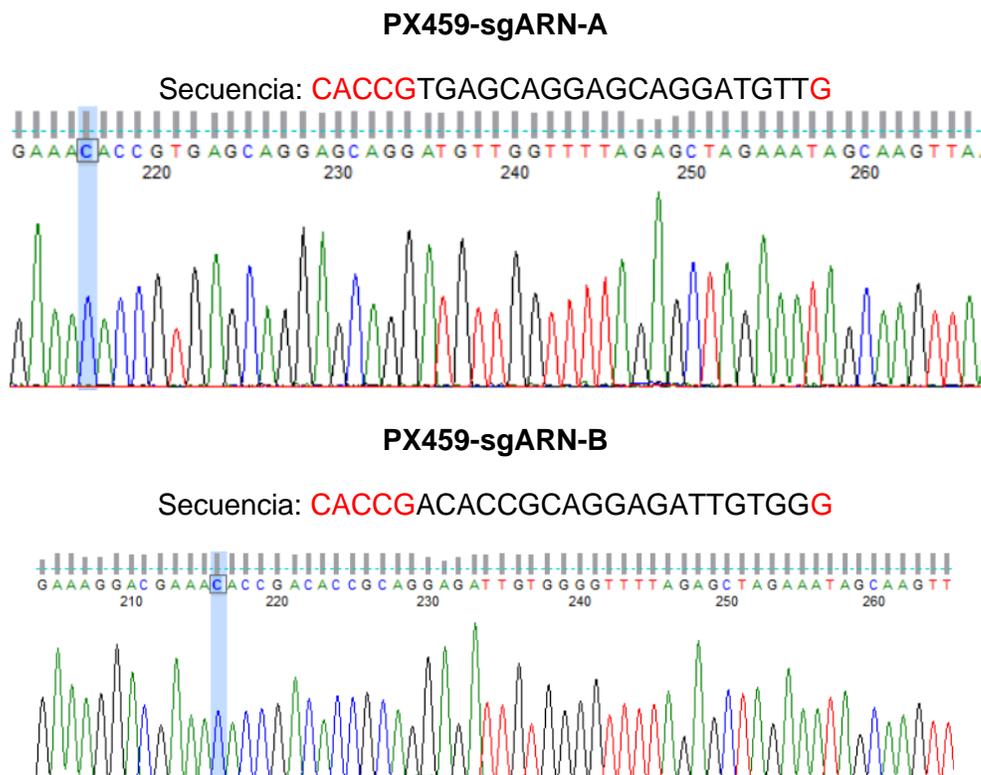
Los resultados del presente estudio se presentarán de acuerdo con los programas de investigación de los objetivos específicos.

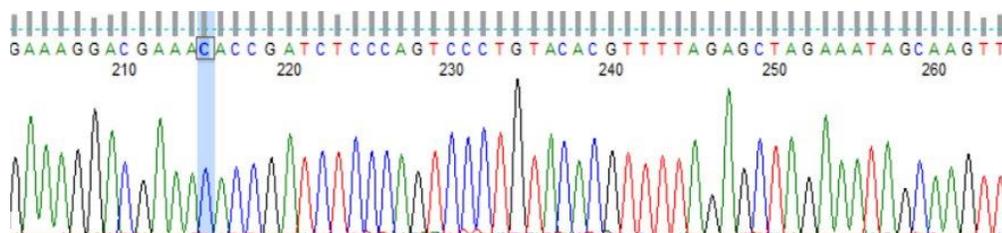
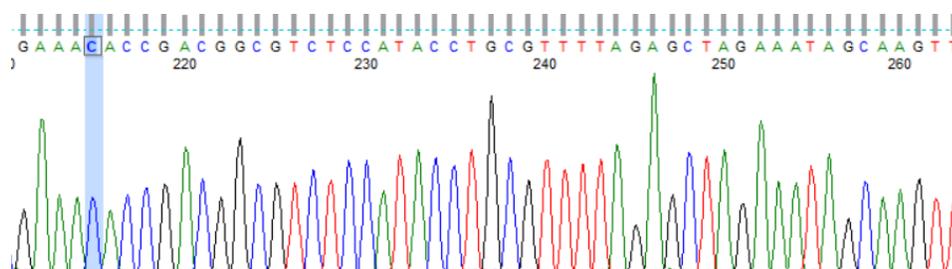
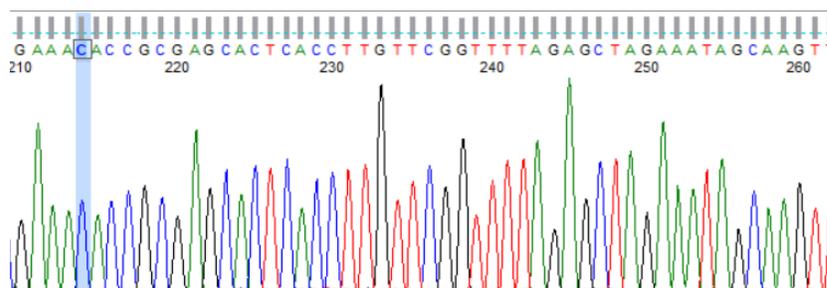
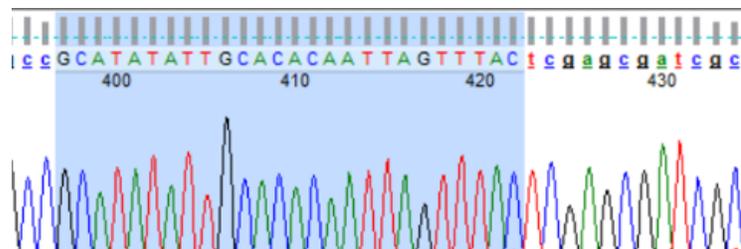
5.1 Programa de investigación I: Diseñar un mecanismo de edición génica para el *knock-out* del gen GALNS en células estromales mesenquimales mediante el uso de CRISPR-Cas9.

Confirmación del vector

Tras la selección y clonación de los gARN en el plásmido PX459, los productos de PCR de la región flanqueante al sitio de inserción fueron enviados a secuenciación tipo Sanger. Los archivos en formato .ab1 fueron analizados mediante el uso del software FinchTV; a continuación se muestran los resultados de secuenciación para cada una de las guías (en rojo se muestran los adaptadores de las secuencias):

Ilustración 7: Electroferogramas de secuenciación tipo Sanger confirmatoria de ligación



PX459-sgARN-CSecuencia: **CACCG**ATCTCCAGTCCCTGTACAC**PX459-sgARN-D**Secuencia: **CACCG**ACGGCGTCTCCATACCTGC**PX459-sgARN-E**Secuencia: **CACCG**GAGCACTCACCTTGTTCG**PX459-sgARN-non targeting**Secuencia: **CACCG**CATATATTGCACACAATTAGTTTACTCG

5.2 Programa de investigación II: Inducir mutagénesis en células estromales mesenquimales mediante el uso de CRISPR/Cas9

Transfección y establecimiento de líneas celulares

Se realizó inicialmente transfección de CEM con el plásmido PX459-sg-NT con eficiencias entre el 21% y el 32.3% lo cual era esperado para la transfección de plásmidos de este tamaño en CEM, ejemplo en Ilustración 8.

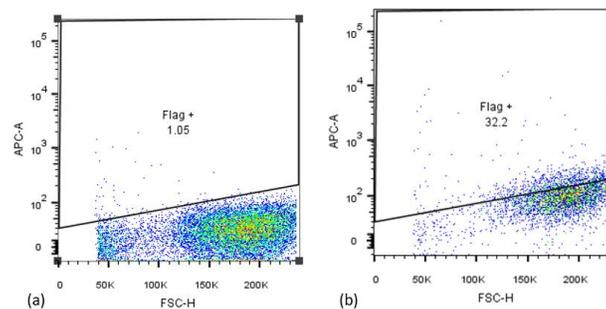


Ilustración 8: Citometría de flujo de CEM transfectadas con el constructo mostrando la expresión de Cas9. a) Células no transfectadas (control negativo), b) células nucleofectadas y marcadas con anticuerpo APC anti-FLAG sin selección de puromicina mostrando la eficiencia de transfección.

En concordancia a este resultado, el siguiente paso fue la realización de una curva de selección con puromicina para encontrar 3 concentraciones necesarias para la selección de las células que expresaran Cas9. De esta forma, se sembraron CEM a una densidad de 3450 células/cm² en una placa de 24 pozos, todos los pozos fueron utilizados y por triplicados las células fueron expuestas a diluciones seriadas de puromicina con el fin de identificar 4 concentraciones del antibiótico en el medio de cultivo de acuerdo con las indicaciones del fabricante⁴⁴, ver Ilustración 9.

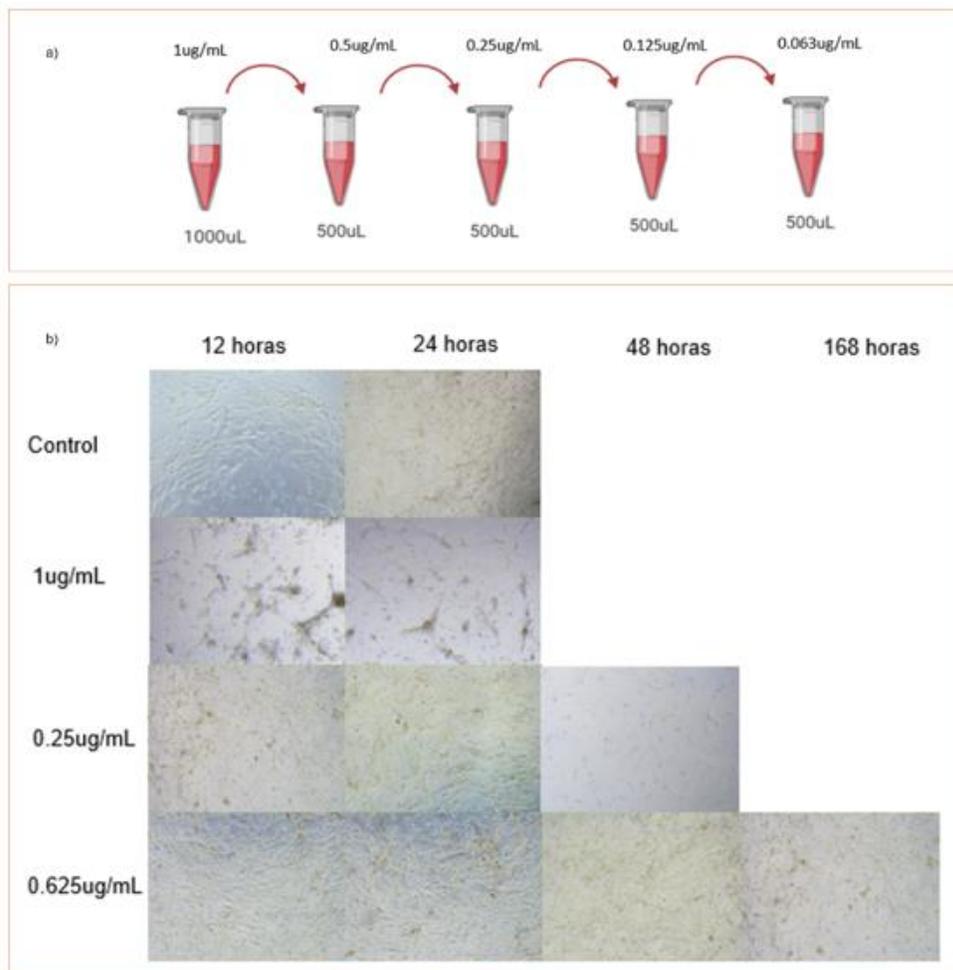


Ilustración 9: : Curva de selección seriada con puromicina

- Esquema de realización de diluciones seriadas de Puromicina en DMEM completo.
- Morfología celular de las células tras exposición a puromicina. Línea negra muestra escala. 500nm. Estas curvas fueron realizadas en 2 donantes celulares (148 P2 y 202 P3) Control visualizado hasta las 24 horas de cultivo, tras 30 horas alcanza confluencia por lo que no se realizan más registros fotográficos. Grupo 1ug: No hay presencia de células viables tras 24horas. 0.25ug: concentración mínima a la que se encuentran células viables a las 24 horas. 0.0625ug/ml concentración citostática.

Por lo anterior, se toman las siguientes concentraciones para los próximos experimentos.

- Dosis óptima 0.25ug/mL
- Dosis alta 0.5ug/mL
- Dosis baja con visualización mínima de toxicidad: 0.16ug/mL
- Dosis que inhibe crecimiento sin toxicidad visible: 0.0625ug/mL

Selección de células transfectadas

Para la continuación de los experimentos se seleccionó el plásmido que contiene la guía sARN-B dados los que los resultados *in silico* mostraron las mejores probabilidades de edición *in target*.

Teniendo establecidas las concentraciones de puromicina, se decidió emplear la dosis óptima de 0.25ug/mL durante 48 horas para la selección de células que expresan la proteína Cas9, tras lo cual se realizó nueva marcación con Anti-Flag. Resultados representativos mostrados en Ilustración 10.

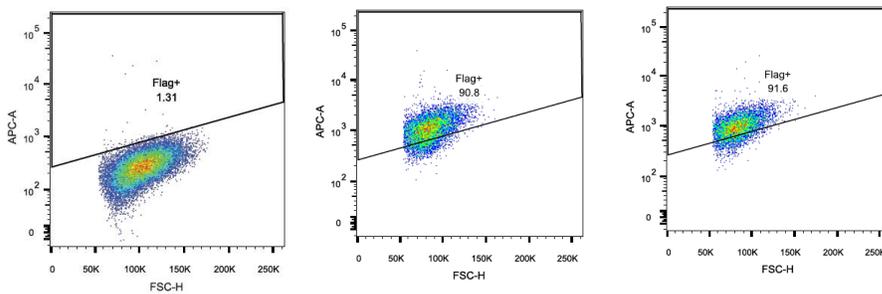


Ilustración 10: Citometría de flujo. Transfección y selección de CEM 202 P2(P1) con puromicina. Imagen representativa de a) control negativo de la marcación, b) CEM 202-sgB P2(P1) c) CEM 202-sgNT P2(P1).

Los donantes utilizados presentaron las siguientes eficiencias post selección

Tabla 3: Porcentajes de expresión de Ca9-FLAG en CEM pre selección y post selección.

	148 B	148 NT	154 B	154 NT	202 B	202 NT	206 B	206 NT
Pre	28	26.3	18.8	16.0	18.2	16.3	26.4	28.7
Post	98.7	96.3	76.5	88	90.8	91.6	94.8	94.6

Selección con puromicina

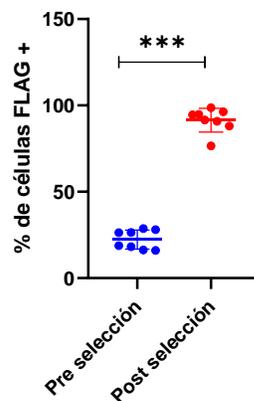


Ilustración 11: Resultados de células transfectadas pre y post selección con puromicina. *** $p < 0.001$ (t-test)

5.3 Programa de investigación III: Determinar la tasa de mutagénesis generada en células estromales mesenquimales y el impacto en la síntesis proteica y la actividad enzimática de GALNS.

Determinación de la tasa de mutagénesis

El método elegido para evaluar la eficiencia de clivaje in target fue el ensayo de T7 endonucleasa que permite estimar la presencia de edición *in target* usando doble híbridos de productos de PCR. En la Ilustración 12 se puede observar el gel de PCR con los productos de clivaje, el análisis se realizó mediante la comparación de la intensidad de los picos mediante el uso del Software ImageJ de acuerdo con protocolos previamente descritos⁴⁵.

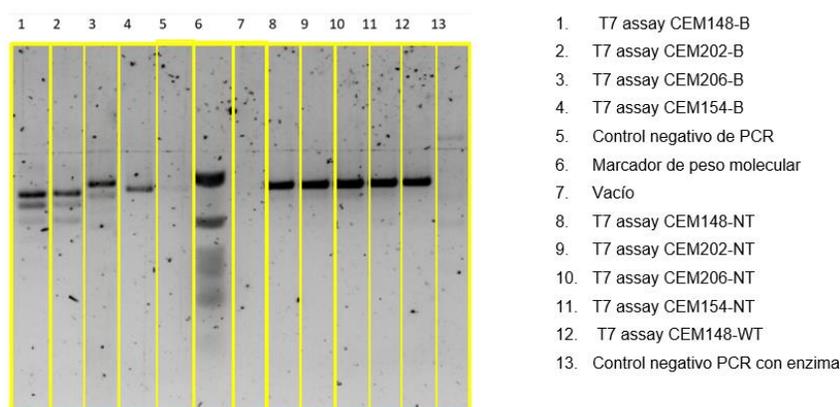


Ilustración 12: Ensayo de T7 endonucleasa de los fragmentos de PCR. Se muestran resultados de gel representativo. Este gel presenta un corte entre los pozos 2 y 3 con el fin de remover un pozo vacío

De acuerdo con lo anterior la eficiencia del clivaje fue la siguiente (ver Tabla 4)

Tabla 4: Eficiencia del clivaje del ensayo de T7 endonucleasa

Donante	Porcentaje de clivaje	Porcentaje de positividad para FLAG
CEM148-B	21.48	98.7
CEM202-B	18.62	90.8
CEM206-B	6.97	94.8
CEM154-B	0	76.5
CEM148-NT	0	96.3
CEM202-NT	0	91.6
CEM206-NT	0	94.6
CEM154-NT	0	88

Este resultado muestra la mayor tasa de clivaje en el donante CEM 148, lo cual se encuentra en concordancia con una mayor eficiencia de selección de células mediante el uso de puromicina. Seguido de CEM 202B Y CEM206B, mientras que CEM 154B no tuvo clivaje. Como era esperado para donantes homocigotos para el locus analizado, las líneas celulares transfectadas con el plásmido PX459-NT no presentaron clivaje.

Síntesis proteica de GALNS

Se realizaron inmunoblots para evaluar el impacto en la síntesis proteica de GALNS,

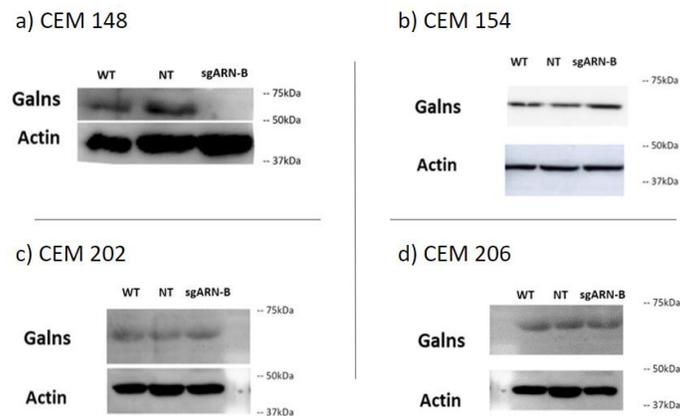


Ilustración 13: Imagen representativa de inmunoblots realizados.

Se realizan cortes para simplificación de la imagen, CEM 148 y CEM 154 realizados en membranas diferentes, CEM 202 y 206 se realizaron en la misma membrana a derecha e izquierda del marcador de peso molecular. a) CEM 148- WT P3, CEM 148-NT P5(P3) y CEM 148-B P5(P4). b) CEM 154-WT P3, CEM 154-NT P5(P2) y CEM 154-B P5(P4). c) CEM 202-WT P3, CEM 202-NT P5(P2) y CEM 202-B P6(P4). d) CEM 206-WT p4, CEM 206-NT P4(P2) y CEM 206-B P6(P4).

La densitometría se muestra a continuación.

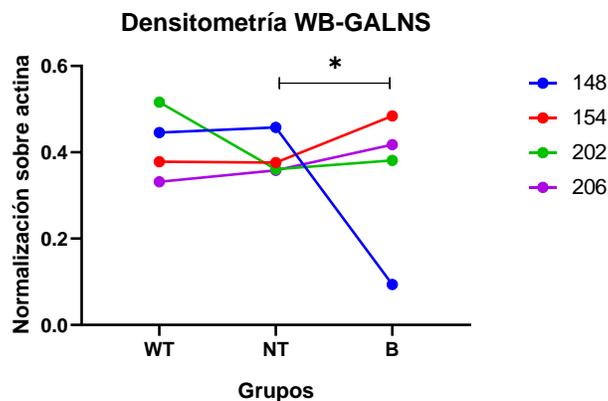


Ilustración 14: Análisis de ImageJ que muestra diferencias en la medición de GALNS en el inmunoblot. * = p = 0.05

Este ensayo mostró una reducción del 78% en la cantidad medida de GALNS en la banda de 57kDa, mediante el uso de inmunoblot sin diferencias estadísticamente significativas en los demás grupos, de igual forma, se observó un aumento en la medición de la proteína GALNS en el mismo peso molecular para los grupos CEM 206-B Y CEM-154-B.

Donante	Porcentaje de clivaje	Porcentaje de positividad para FLAG	% de reducción de proteína GALNS
CEM148-B	21.48	98.7	78
CEM202-B	18.62	90.8	26
CEM206-B	6.97	94.8	(25)
CEM154-B	0	76.5	(28)
CEM148-NT	0	96.3	0
CEM202-NT	0	91.6	0
CEM206-NT	0	94.6	0
CEM154-NT	0	88	0

Ensayo de actividad enzimática

Con el fin de establecer el impacto de los cambios observados en DNA y en cuantificación de proteína, se realizó el ensayo funcional basado en sal sódica de 4-Metillumbelliferil β -D-Galactopyranoside-6-sulfato como previamente descrito.

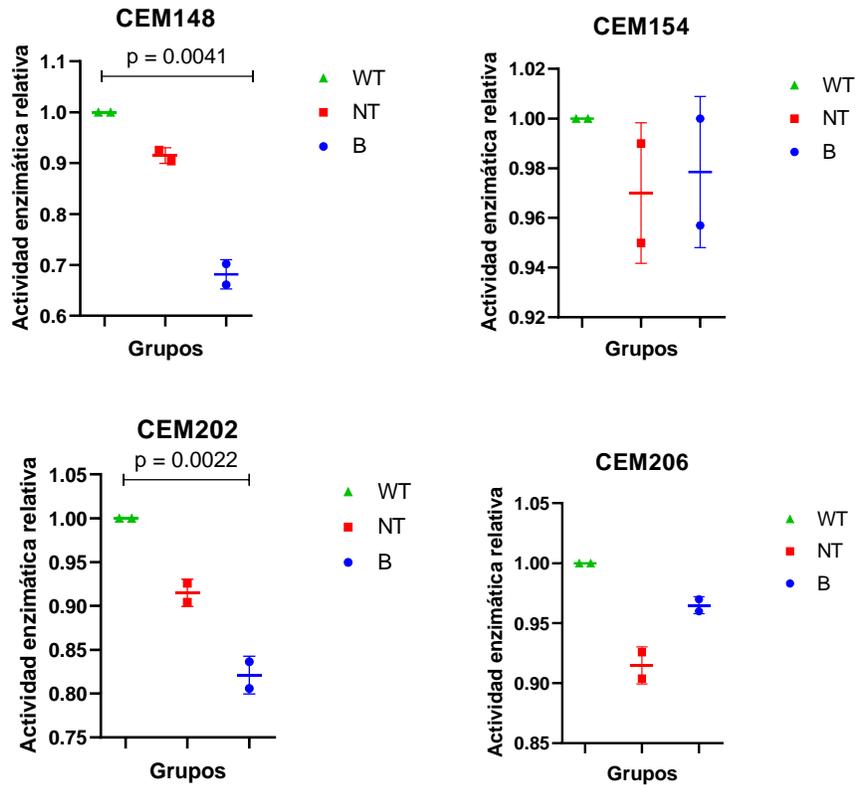


Ilustración 15: Actividad enzimática relativa mediante el ensayo de sal sódica de 4-Metillumbelliferil β-D-Galactopyranoside-6-sulfato. El eje Y muestra el porcentaje normalizado sobre la línea celular WT del mismo donante.

En resumen, la actividad enzimática relativa de los grupos muestra la distribución de la Ilustración 16, con significancia estadística encontrada solamente en CEM148-B Y CEM 202-B.

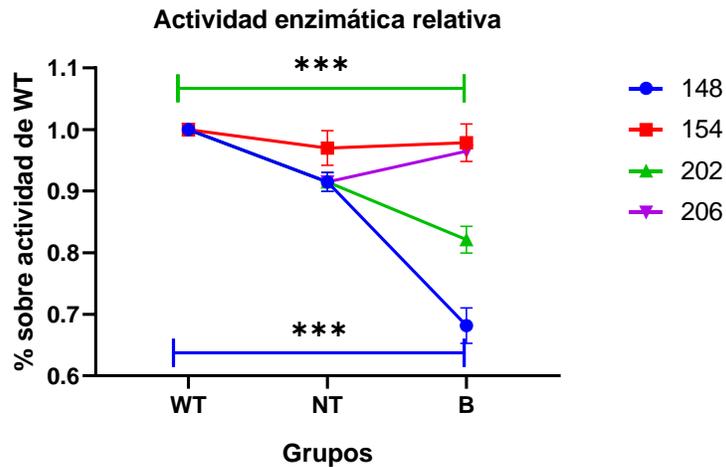


Ilustración 16: Actividad enzimática relativa.

5.4 Programa de investigación IV: Determinar el impacto de la deficiencia de la enzima GALNS en proliferación celular y diferenciación a linaje osteogénico en células estromales mesenquimales.

Ensayo de proliferación celular

Teniendo los resultados de los previos programas de investigación, cuyo resumen se encuentra en la Tabla 5, se realizó la cuantificación de la proliferación celular de las líneas celulares obtenidas.

Tabla 5: Tabla de resumen parcial de resultados

Donante	% de clivaje	% de positividad para FLAG	% de reducción de proteína GALNS	Media del % actividad enzimática
CEM148-B	21.48	98.7	78	68*
CEM202-B	18.62	90.8	26	82*
CEM206-B	6.97	94.8	(25)	96
CEM154-B	0	76.5	(28)	98
CEM148-NT	0	96.3	0	95
CEM202-NT	0	91.6	0	91
CEM206-NT	0	94.6	0	93
CEM154-NT	0	88	0	97

En este caso, se sembraron los diferentes grupos en placas de 12 pozos a una densidad de 3500 células/cm² y se realizó cultivo y conteo de las células durante el tiempo requerido previo a su no crecimiento por confluencia. Los datos fueron recolectados y analizados y se presentan a continuación.

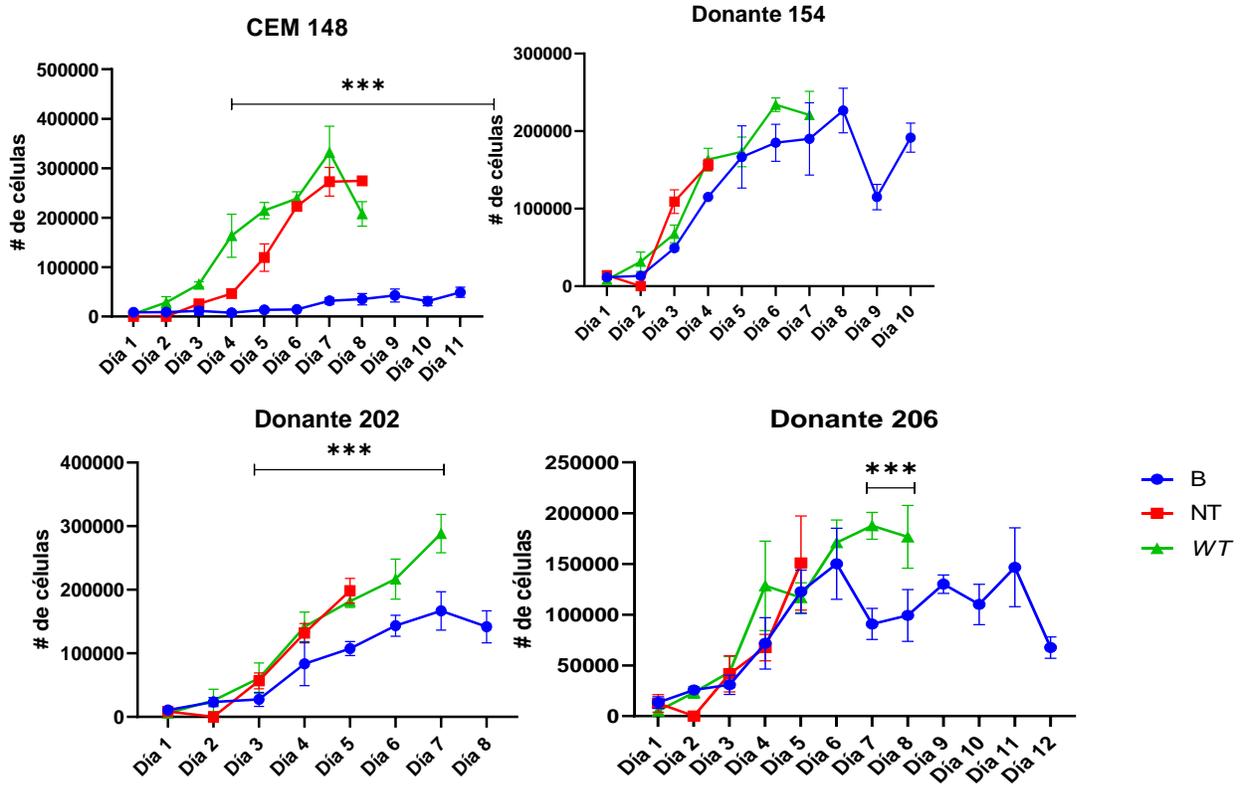


Ilustración 17: Curvas de crecimiento celular.

Análisis estadístico realizado mediante ANOVA de 2 vías con corrección mediante test de Dunnet. Se presentan resultados estadísticamente significativos marcados por *** equivalentes a <0.001 p

Adicionalmente se calculó el tiempo de doblaje poblacional como previamente descrito usando la fórmula $TDP = \left(\text{Días de } \frac{\text{pase}}{\text{Doblaje poblacional}} \right) \times 24$ con un resultado esperado de 35 ± 6 horas^{47,48}.

Tabla 6: Tiempo de doblaje poblacional

	Grupo	TDP
148	B	87.23
	WT	27.76
	NT	29.08
154	B	29.08
	WT	22.36
	NT	27.69
202	B	92.02
	WT	41.62
	NT	39.84
206	B	37.50
	WT	26.41
	NT	33.40

De acuerdo con lo anterior, el tiempo de doblaje poblacional aumentó considerablemente en los grupos CEM 148-PX459-sgB y CEM 202-PX459-sgB, mientras que en CEM 206-PX459-sgB la tasa global de proliferación no se redujo, aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas durante los días 7 y 8 de cultivo.

Ensayo de diferenciación osteogénica

De acuerdo con el protocolo enunciado previamente, se realizó la marcación de depósitos de calcio con rojo de Alizarina, fotos representativas de los mismos se muestran en la Ilustración 18. El análisis se realizó con el software ImageJ midiendo el porcentaje de depósito de calcio en cada uno de los cuadros de imágenes tomados distribuidos de forma homogénea en los pozos ($n = 6$) y la prueba estadística empleada fue una ANOVA de 1 vía con corrección de Tukey's para comparaciones múltiples por cada donante.

Diferenciación osteogénica donante 148

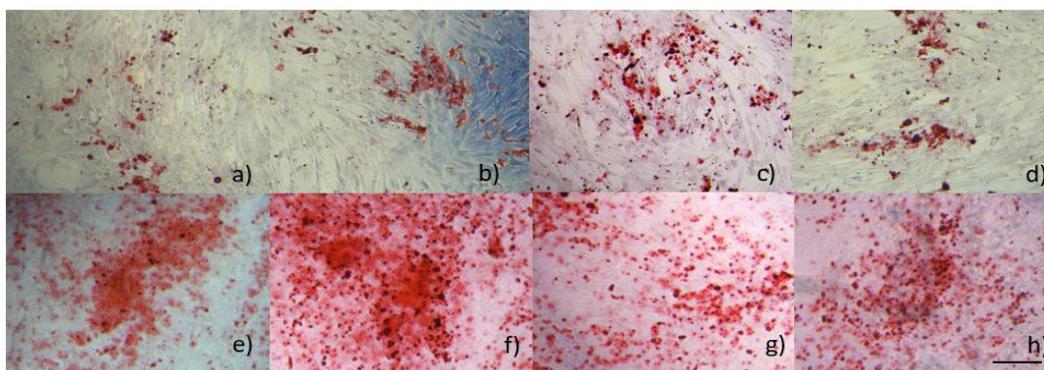


Ilustración 18: Diferenciación osteogénica donante CEM148

a, b c y d) CEM148-sgB-P6(P5), imágenes e y f) corresponden a CEM148-WT(P6) g y h) CEM148-NT P5(P4).

Diferenciación osteogénica donante 154

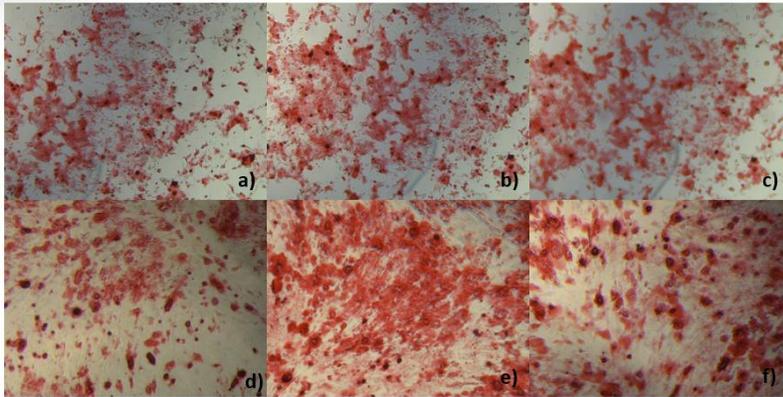


Ilustración 19: Diferenciación osteogénica donante CEM154

a, b c y d) CEM154-sgB-P4(P3), imágenes e y f) corresponden a CEM154-WT(P5) g y h) CEM154-NT P5(P4).

Diferenciación osteogénica donante 202

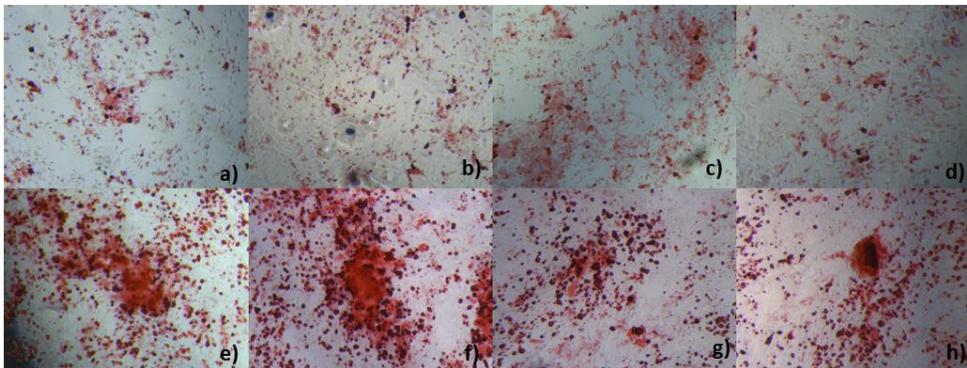


Ilustración 20: Diferenciación osteogénica donante CEM202

a, b c y d) CEM202-sgB-P6(P5), imágenes e y f) corresponden a CEM202-WT(P5) g y h) CEM202-NT P5(P4).

Diferenciación osteogénica donante 206

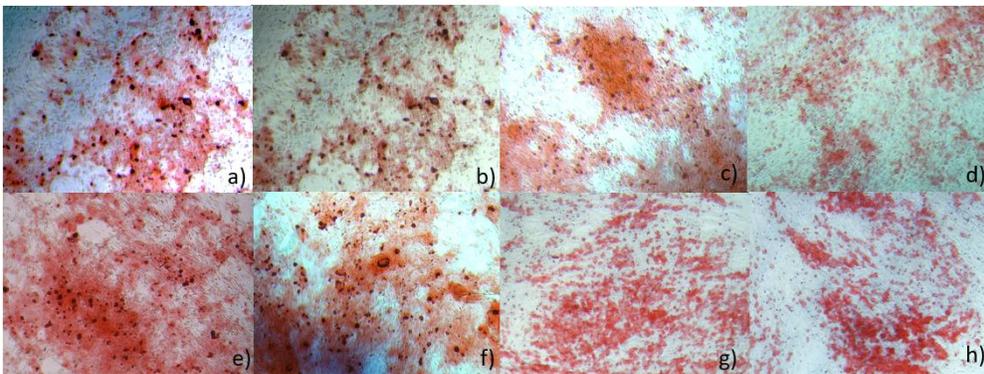


Ilustración 21: Diferenciación osteogénica donante CEM206

a, b y c) CEM206-sgB-P6(P5), imágenes e y f) corresponden a CEM202-WT(P5) g y h) CEM202-NT P5(P4).

Análisis mediante el uso de ImageJ

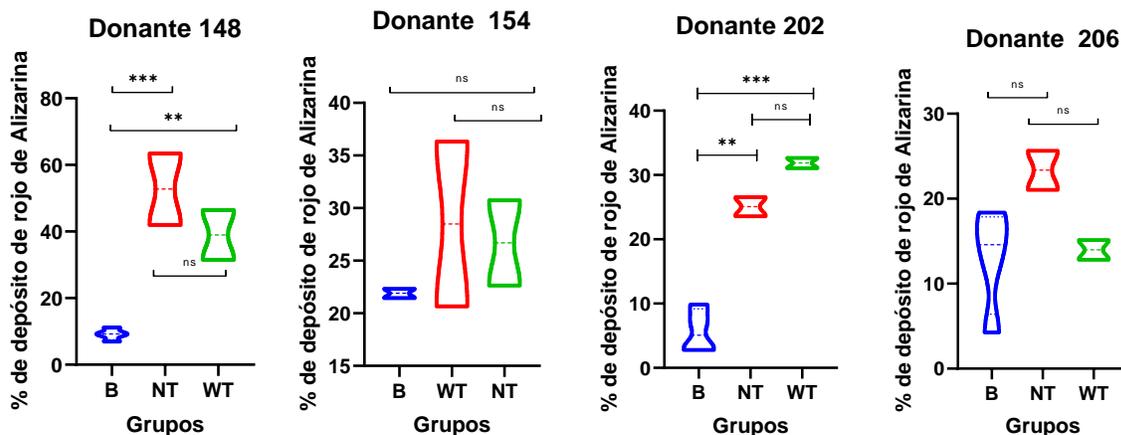


Ilustración 22: Análisis de las diferenciaciones osteogénicas mediante el uso de rojo de Alizarina.

Convenciones: * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, ns no estadísticamente significativo.

6. Recursos de software y análisis estadístico

- La recolección de los datos y el registro cronológico de la fase experimental quedó registrada en Excel y en bitácora física.
- La selección de las guías se realizó con el apoyo del software CHOPCHOP desarrollado por investigadores de la Universidad de Harvard^{42,49} y en la plataforma Benchling [Biology Software]. (2018) disponible en <https://benchling.com>. El cálculo de la eficiencia de las guías diseñadas sin apoyo de software fue calculada a su vez en Benchling,
- Las ilustraciones fueron realizadas en Biorender disponible en BioRender.com (2022)
- Las imágenes *in silico* se diseñaron con UCSF *chimera* en base a las secuencias depositadas en PDB.
- Los datos de citometría fueron visualizados y analizados con el Software FlowJo versión X.1.07
- Las densitometrías de las inmunohistoquímicas fueron tomadas usando el software ImageJ.
- El análisis estadístico y las gráficas fueron realizadas mediante el uso de GraphPad Software, Inc. (Acceso:2020) y R Studio (R version 4.0.3 - 2020-10-10)

7. Discusión

Sobre el diseño experimental y selección de los sgARN

En este proyecto se buscó desarrollar un modelo *in vitro* de deficiencia constitutiva de la enzima GALNS en células estromales mesenquimales humanas mediante el uso de CRISPR-Cas9. Para esto, se seleccionaron gARN con una alta probabilidad de edición *in target* y con menor posibilidad de presentar efectos *off target*. La guía denominada gARN-B tiene la particularidad de haber sido rastreada manualmente con el objetivo de generar una disrupción en regiones asociadas al bolsillo catalítico de la enzima GALNS. Cabe resaltar que gran parte de las variantes patogénicas asociadas a defectos severos en la función enzimática se asocian a la disrupción de aminoácidos en el bolsillo catalítico hidrofóbico de la proteína lo que explicaría la tasa de éxito alcanzado con la guía sgARN-B, como se observa en el residuo objetivo de la edición encuentra en una posición crítica funcional y estructural.

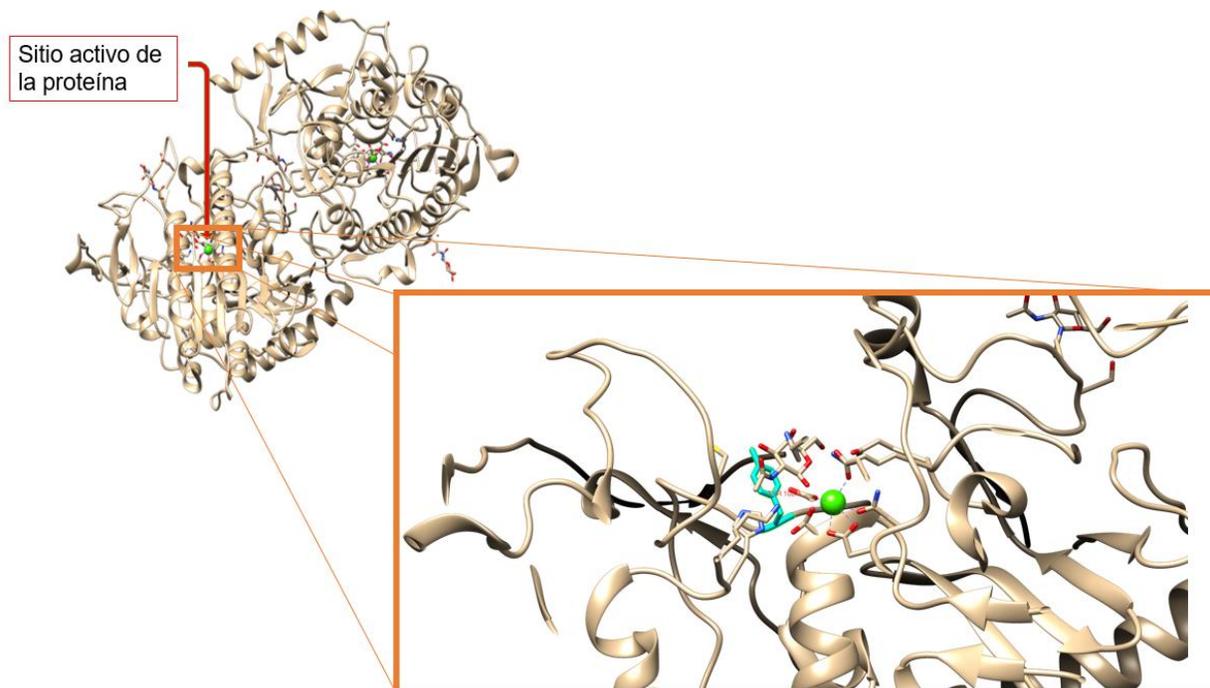


Ilustración 23: Estructura de GALNS con aumento (cuadro naranja) de sitio catalítico.

En cian se muestra el residuo Tyr108, y la esfera verde representa el ion calcio presente en esa posición en la estructura cuaternaria de la enzima.

Sobre la selección de células positivas para la expresión de Cas9-Flag

La generación de líneas celulares con *knockout* de genes específicos a partir de cultivos primarios es un reto experimental complejo. La necesidad de alcanzar cantidades celulares suficientes para el estudio, con la menor cantidad de pasajes, genera una limitante en el tiempo disponible para la realización de experimentos. Por esta razón, el método de selección con puromicina resulta adecuado en comparación a otros métodos como el *sorting* celular mediante el uso de proteínas fluoromarcadas. En este caso en particular, el uso de un plásmido no integrativo permite disminuir las interferencias atribuibles a la inserción de fragmentos de DNA recombinante de forma aleatoria en el genoma de las células y permite la expresión transitoria de Cas9 y sgARN que disminuye el riesgo de reedición en el locus target y de *off-targets*. En este estudio se realizó la comparación de 4 donantes diferentes de CEM, los cuales presentaron disímiles tasas de selección con puromicina, este resultado, a su vez se asocia a diferencias en el comportamiento celular observado en ensayos corriente abajo.

Sobre el inmunoblot

El inmunoblot para la proteína GALNS presentó una baja resolución asociada a las dificultades técnicas asociadas al estudio de proteínas que presentan homodimerización, fosforilación y glucosilación adicional a la expresión de transcritos más cortos de 40 y 19kDa descritos previamente en otros trabajos^{26,50}. Para este estudio se requirió el uso de condiciones altamente reductoras con DTT y urea con el fin de disminuir la presencia de dímeros proteicos y el análisis densitométrico se realizó sobre la isoforma presente en la banda de 57kDa la cual es la que constantemente se evidencia en diferentes tipos celulares. A pesar de la baja resolución, se pueden observar diferencias entre la cantidad de la proteína de GALNS en los grupos experimentales expuestos al plásmido PX459-sgARN-B con respecto a los controles el cual fue evidente en el grupo CEM 148-sgARN-B en asociación con la alta eficiencia de selección de clones positivos como fue descrito en el previo apartado.

Para el caso del grupo CEM 154-sgARN-B, CEM 202-PX459-sgB y CEM 206-PX459-sgB el enriquecimiento celular fue menor, y las diferencias en el inmunoblot no fueron evidentes, esto puede asociarse a tipos de edición celular *in target* que no afectan la expresión proteica o a la no edición, lo cual requiere de ensayos adicionales para su confirmación como los realizados en este ensayo como el análisis de DNA de las regiones de interés y de la estimación de la función enzimática de GALNS.

Sobre el ensayo de T7 endonucleasa

El ensayo de endonucleasa es una gran fuente de información sobre la presencia de edición *in locus* de los experimentos realizados. Este permite la detección de pequeñas inserciones o deleciones en fragmentos de PCR de la región genómica de interés, es necesario la presencia de un mal apareamiento de las hebras de DNA posterior al *melting* e hibridación de estas. Es de resaltar que el resultado no expresa el porcentaje de edición sino la tasa de *mismatch* posterior a la re-hibridación de las hebras, por lo que no debe ser confundida con tasas de *Indels* en el grupo celular. Por esta razón estudios previos han intentado asociar la tasa de clivaje al porcentaje de mutación con el fin de tener una idea global del espectro mutacional del grupo celular como se evidencia en la Ilustración 24.

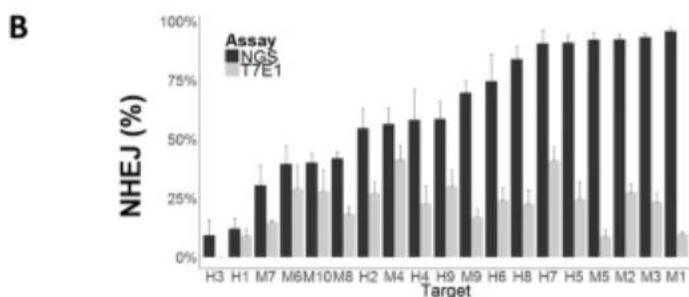


Ilustración 24: Porcentaje de reporte de NHEJ comparando el ensayo de T7 con NGS. Tomado de⁵¹

Para el caso del donante CEM 148-PX459-sgB la tasa de clivaje fue del 21% y del 0% en los controles mostrando que el hallazgo es asociado a edición y no a posible heterocigosidad del sitio de clivaje por variantes propias del donante. Esta fue la tasa más alta de los donantes evaluados en concordancia con los resultados explicados previamente. También sugiere que las variantes predominantes en el grupo celular producen una disminución de la expresión proteica que puede estar debida a generación de codones de parada tempranos, que no permiten la evaluación de la proteína por medio de inmunoblot ya que el anticuerpo se une a un epítotope generado por la porción final del exón 7 e inicial del exón 8 que se encuentra corriente abajo del sitio de edición de interés que está en el residuo Tyr108 ubicado 6pb posterior al inicio del exón 4.

CEM 206-PX459-sgB sgB tuvo una tasa de clivaje del 6.97% y CEM 202-PX459-sgB tuvo una tasa de clivaje del 18.2% a pesar de no tener diferencias en el inmunoblot lo cual podría estar

asociado a variantes con *Indels* que no generan disminución de la producción de la proteína como cambios missense que no se asocian a compromiso en la traducción del mRNA corriente abajo. El impacto de estas variantes debe ser evaluado mediante ensayos funcionales, uno de los cuales fue propuesto y realizado en este proyecto.

CEM 154-PX459-sgB sgB no tuvo clivaje y tampoco diferencias en el inmunoblot lo que genera la necesidad de ampliar los estudios al donante seleccionado, variantes en la región que corresponden a la PAM podrían explicar la no edición ya que la eficiencia de selección fue del 86.5% que se esperaba debieron generar algún tipo de cambio con el sistema seleccionado.

Sobre los ensayos funcionales

Este experimento permite determinar el impacto funcional de las diferencias observadas en el inmunoblot y el ensayo de T7 endonucleasa. Para el caso del donante CEM148-PX459-sgB la reducción de la actividad enzimática fue del 30% a pesar de no evidenciar bandas en el inmunoblot. Esto puede ser debido a la presencia de transcritos cortos que retengan capacidad enzimática y que no se hayan podido evidenciar en la membrana, o actividad residual de algunas células del *pool* celular que no presenten edición o pérdida de función. Estas hipótesis deben ser evaluadas y la adecuada interpretación de este hallazgo deberá ser realizada tras la generación de líneas isogénicas a partir de las muestras que fueron congeladas a partir de este estudio.

El donante CEM 154-PX459-sgB presentó la mayor variabilidad en el ensayo, y al igual que el donante CEM 206-PX459-sgB, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Esto se observa en relación a la nula y baja tasa de clivaje en el ensayo de la nucleasa de T7 respectivamente.

El donante CEM 202-PX459-sgB presentó reducción estadísticamente significativa con respecto a sus controles lo que muestra que cierto grupo del *pool* celular presenta variantes que tienen impacto en la función enzimática de GALNS.

Adicionalmente, este ensayo fue realizado por duplicado debido a la baja disponibilidad del reactivo 4- μ que es el sustrato de la enzima. Esto probablemente requerirá a futuro nuevos montajes con el fin de comprobar los valores obtenidos.

Sobre las curvas de proliferación

El donante CEM148 presentó el mayor compromiso en proliferación celular con un aumento de la tasa de doblaje poblacional de a 87 horas. Este resultado se asocia a la mejor tasa de selección con un enriquecimiento celular positivo para FLAG que pasó del 28% al 98.7% post selección, de la mayor reducción en la cantidad de proteína de GALNS medida en el inmunoblot y la mayor reducción de la actividad enzimática, lo cual podría eventualmente explicar el compromiso proliferativo observado, las diferencias encontradas no son debidas al efecto deletéreo a mediano plazo que tiene la puomicina en las células dado que el control transfectado con el plásmido que contiene la secuencia *non-targeting* tienen una tasa de expansión igual al control no transfectado.

Los donantes CEM 154-PX459-sgB y CEM 206-PX459-sgB no presentaron diferencias en la tasa de doblaje poblacional en concordancia con la no edición celular evidenciada en los experimentos de T7 e inmunoblot.

Por otro lado, el donante CEM 202-PX459-sgB presentó reducciones discretas de la función enzimática con compromiso de la proliferación celular en parte de la curva y un aumento estadísticamente significativo de la tasa de doblaje poblacional.

Sobre los ensayos de diferenciación osteogénica

La evaluación cualitativa del depósito de calcio mediante la tinción de Alizarina permite ver contrastes entre los grupos evaluados, la disminución de este indicador de diferenciación osteogénica fue ostensible en el grupo CEM 148-PX459-sgB lo cual es sugestivo de un compromiso en la función osteogénica de las células afectadas. Previamente se ha descrito la alteración de la organización de condrocitos en biopsias de pacientes con enfermedad de Morquio²⁹ y su aumentada vacuolación, pero poco se ha evaluado el impacto de esta deficiencia enzimática en procesos de diferenciación osteogénica.

Los grupos CEM 154-PX459-sgB y CEM 202-PX459-sgB no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de intensidad de marcación con rojo de Alizarina, y en el grupo CEM 206-PX459-sgB la reducción fue discreta, en concordancia con la reducción de la actividad enzimática relativa.

8. Conclusiones

En este trabajo se han generado líneas celulares de 4 donantes con diferentes tasas de compromiso asociado a la deficiencia de la enzima GALNS la cual tiene un impacto deletéreo en la proliferación celular de CEM de gelatina de Wharton y su potencial de diferenciación a linajes osteogénico, lo que se encuentra estrechamente relacionado con la reducción en la actividad enzimática.

El análisis del compromiso debe acompañarse de ensayos en DNA, proteína, función enzimática y fenotipo celular con el fin de establecer posibles explicaciones del compromiso.

La selección de las gARN para la generación de *knockout* celulares requiere de conocimiento de la función de la proteína blanco y del patrón mutacional que ha sido considerado de relevancia clínica.

El presente estudio valida el potencial de producir líneas celulares de origen mesenquimal (derivadas de células estromales mesenquimales humanas) con mutaciones constitutivas del gen GALNS. A pesar del desafío técnico ligado a la dificultad de modificación génica de este tipo de células primarias, el abordaje metodológico resultó en la generación exitosa de 2 de 4 donantes de células mesenquimales primarias con deficiencia funcional de GALNS. Esto abre la puerta para posterior generación de modelos celulares que permita realizar estudios futuros relacionados con la fisiopatología y respuesta terapéutica a nivel celular de la enfermedad de Morquio IIA.

9. Limitaciones y perspectivas

Es necesaria la generación de líneas celulares isogénicas para evaluar el impacto de variantes específicas en las variables estudiadas y se debe complementar la evaluación de la diferenciación osteogénica con marcadores por PCR de genes cruciales en este proceso.

Dada la fisiopatología de la enfermedad, se debe evaluar el compromiso funcional lisosomal, así como el tamaño y contenido de los mismos.

El estudio de cultivos en 2 dimensiones es limitado, por lo que la realización de ensayos en formato 3D permitirá describir el comportamiento celular en condiciones cercanas a las fisiológicas.

Completar diferenciación condrogénica permitirá conocer la interrelación de los procesos de diferenciación y ayudará a una mejor descripción patológica de la enfermedad.

10. Productos

Este proyecto fue realizado con el fin del entrenamiento de una estudiante de maestría.

Se realizó el proyecto de tesis de maestría como requisito de grado presentado en este trabajo.

Se realizó la presentación del póster “Development of an in vitro model of the GALNS enzyme deficiency in human mesenchymal stromal cells using the CRISPR/Cas9 system” Presentado en el Congreso Virtual “CRISPR and Beyond: Perturbations at Scale to Understand Genomes” Realizado del 1 al 3 de Septiembre de 2021 por Wellcome Genome Campus UK.

11. Aspectos éticos

De acuerdo con la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de salud “Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”, este proyecto se considera de riesgo mínimo ya que las células estromales mesenquimales fueron obtenidas como recolección de cordones umbilicales durante el parto de gestantes atendidas en la red distrital de Hospitales Públicos de Bogotá, posterior a la explicación del procedimiento y firma voluntaria del “Consentimiento informado para la donación voluntaria de muestra de tejido de cordón umbilical – Sección C - Código SDS-PSS-FT-354V.1”

Las muestras serán procesadas en los laboratorios de la Unidad de Terapias Avanzadas del Instituto Distrital de Ciencia, tecnología e innovación en salud (IDCBIS) manteniendo la confidencialidad sobre el origen de las muestras.

ANEXO

A.Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRA DE TEJIDO DE CORDON UMBILICAL SECCION C (Anexo al Formato de Consentimiento Informado para la Donación Altruista de Sangre de Cordón Umbilical, Código SDS-PSS-FT-354V.1)
CÓDIGO DEL DONANTE BSCU: _____
1. INFORMACION DE LA DONANTE Primer apellido: _____ Segundo Apellido: _____ Nombres: _____ Documento: CI: __ CE: __ TI: __ NUIP: __ Pasaporte: __ Número: _____ Edad: _____ Escolaridad: _____ Institución donde se atiende el parto: _____
2. INFORMACIÓN Algunos componentes del cordón umbilical, específicamente la membrana del cordón y la gelatina de Wharton contienen células estromales mesenquimales las cuales tienen capacidad de reemplazar y regenerar tejidos “enfermos” específicos. En investigaciones clínicas actuales, se ha demostrado que las células estromales mesenquimales tienen efectos terapéuticos muy importantes, reduciendo las complicaciones después de los trasplantes de progenitores hematopoyéticos o ayudando a la reconstrucción de hueso y articulaciones cuando hay daños importantes en estos tejidos. Sin embargo, las propiedades de las células estromales mesenquimales de cordón umbilical no se han esclarecido completamente y son objeto de intensa investigación en muchas partes del mundo.
3. PROPOSITO DEL PROYECTO El Grupo de Investigación en Medicina Transfusional, Tisular y Celular (GIMTYC) del Hemocentro Distrital de Bogotá está interesado en el estudio de las propiedades de las células estromales mesenquimales aisladas de la membrana del cordón umbilical y la gelatina de Wharton y sus potenciales aplicaciones como agentes medicinales, por lo que solicita su colaboración en esta investigación con la donación de una muestra del cordón umbilical (aprox. 15 cm) y una muestra de membrana del saco amniótico.
4. PARTICIPACION VOLUNTARIA Su participación voluntaria en la donación implica: Donar un fragmento de cordón umbilical aproximadamente de 15cm y un fragmento de membrana amniótica que serán colectados por personal especializado del Hemocentro Distrital después del parto natural o cesárea. La obtención de esta muestra NO implicara un riesgo para la madre o su hijo/hija, generalmente el destino de este tipo de tejidos es el descarte intrahospitalario. Permitir que el material obtenido a partir de las muestras sea almacenado (congelado a -195°C) y sea utilizado para investigación éticamente aprobada.
5. POSIBLES RIESGOS El procedimiento de recolección del fragmento de cordón umbilical y membrana amniótica NO representa peligro para su hijo ni para usted. En general la donación de estos tejidos es extremadamente segura, y no afectara la atención habitual del parto.
6. BENEFICIOS La donación de cordón umbilical y membrana amniótica constituye una donación altruista y desinteresada. Por esto, La donación no generara a su favor derecho alguno de naturaleza económica o de otro tipo sobre los

resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con sus muestras ni sobre la investigación a desarrollar. Por lo tanto el principal beneficio es la satisfacción de ayudar a las diversas investigaciones que podrían contribuir a un mayor conocimiento de muchas enfermedades y orientarse a posibles tratamientos clínicos.

7. OBLIGACION FINANCIERA

Su participación no le generará costo alguno, ni al servicio de salud. Tampoco se le pagará ni se le dará beneficio alguno por tomar parte del programa.

8. PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD

Sólo el personal autorizado de la Unidad de Terapia Celular tendrá acceso a su información personal o de su bebé y los registros de esta donación. Su nombre, nombre de su bebé, u otra información de identificación no aparecerá en los registros de la investigación o en los de control de calidad. La Unidad de Terapia Celular no revelará su participación o la de su bebé a cualquier persona u organización, sino por su solicitud por escrito o permiso, o menos que sea requerido por las leyes estatales o locales, o los organismos reguladores.

9. RETIRO DEL PROGRAMA

Dado que su participación en el programa es voluntaria, usted es libre de abstenerse de participar en cualquier momento. Su negativa no tendrá efecto en la atención en salud presente o futura, ni suya ni de su hijo.

10. GARANTIA DE PARTICIPACION

No hay garantía de que la muestra de cordón umbilical o Membrana amniótica que usted accede a donar será efectivamente recolectada o almacenada. Por ejemplo, puede que la toma no se lleve a cabo si el equipo de colecta no está disponible en el momento del parto o porque se presente alguna complicación médica que la contraindique. No le será informado el destino final de la muestra de cordón y de membrana amniótica.

11. CONTACTO

Si tiene preguntas o dudas sobre el proyecto por favor remítalas a las personas responsables de este estudio en la Unidad de Terapia Celular, Planta Baja Hemocentro Distrital, Secretaría Distrital de Salud, Carrera 32 # 12 – 81, Bogotá, Colombia. E mail: utc.hemocentro@gmail.com

Declaración y firma de la participante

12. APROBACIÓN DE DONACIÓN VOLUNTARIA

Firma de la Donante: _____ Fecha: _____

Nombre de la donante _____ Edad: _____

Nombre del padre/ madre o representante legal: _____

Documento de identidad del padre/ madre o representante legal: tipo: _____ Número _____

Su participación en este estudio será voluntaria y confidencial. La muestra colectada será usada únicamente en investigación básica. La obtención de esta muestra no le representará ningún gasto adicional ni tampoco usted será retribuido económicamente por la donación.

Bibliografía

1. Singh J, Di Ferrante N, Niebes P, Tavella D. N acetylgalactosamine 6 sulfate sulfatase in man. Absence of the enzyme in Morquio disease. *J Clin Invest*. 1976;57(4):1036-1040. doi:10.1172/JCI108345
2. Javier C, Díaz A, María A, Suárez M, Tomatsu S, A LAB. Contribución Colombiana al Conocimiento de la Enfermedad de Morquio A. *Medicina (B Aires)*. 2012;34(3):221-241.
3. Wood TC, Harvey K, Beck M, et al. Diagnosing mucopolysaccharidosis IVA. *J Inherit Metab Dis*. 2013;36(2):293-307. doi:10.1007/s10545-013-9587-1
4. Lyseng-Williamson KA. Elosulfase alfa: A review of its use in patients with mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A Syndrome). *BioDrugs*. 2014;28(5):465-475. doi:10.1007/s40259-014-0108-z
5. Tomatsu S, Orii KO, Vogler C, et al. Mouse model of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase deficiency (Galns $\Delta\Delta$) produced by targeted disruption of the gene defective in Morquio A disease. *Hum Mol Genet*. 2003;12(24):3349–3358. doi:10.1093/hmg/ddg366
6. Morquio L. Sur une forme de dystrophie osseuse familiale. *Arch médecine des enfants*. 1929;32:129-135.
7. Brailsford JF. Chondro-osteo-dystrophy. Roentgenographic & clinical features of a child with dislocation of vertebrae. *Am J Surg*. 1929;7(3):404-410. doi:10.1016/S0002-9610(29)90496-7
8. Pedrini V, Lennzi L, Zambotti V. Isolation and identification of keratosulphate in urine of patients affected by Morquio-Ullrich disease. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1962;110(4):847-849. doi:10.3181/00379727-110-27668
9. Sukegawa K, Orii T. Residual activity in fibroblasts from two brothers with the late-onset form of N-acetylgalactosamine-6-sulphate sulphatase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 1982;5(4):231-232. doi:10.1007/BF02179150

10. Matalon R, Arbogast B, Justice P, Brandt IK, Dorfman A. Morquio's syndrome: Deficiency of a chondroitin sulfate N-acetylhexosamine sulfate sulfatase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1974;61(2):759-765. doi:10.1016/0006-291X(74)91022-5
11. Hecht JT, Scott CI, Smith TK, Williams JC. Mild manifestations of the Morquio syndrome. *Am J Med Genet*. 1984;18(2):369-371. doi:10.1002/AJMG.1320180222
12. Lin HY, Lin SP, Chuang CK, et al. Incidence of the Mucopolysaccharidoses in Taiwan, 1984-2004. *Am J Med Genet Part A*. 2009;149(5):960-964. doi:10.1002/ajmg.a.32781
13. Poorthuis BJHM, Wevers RA, Kleijer WJ, et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet*. 1999;105(1-2):151-156. doi:10.1007/s004399900075
14. Bernal JE, Briceno I. Genetic and other diseases in the pottery of Tumaco-La Tolita culture in Colombia-Ecuador. *Clin Genet*. 2006;70(3):188-191. doi:10.1111/j.1399-0004.2006.00670.x
15. Stenson PD, Ball E V., Mort M, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat*. 2003;21(6):577-581. doi:10.1002/HUMU.10212
16. Tapiero-Rodriguez SM, Guio JCA, Porras-Hurtado GL, et al. Determination of genotypic and clinical characteristics of Colombian patients with mucopolysaccharidosis IVA. *Appl Clin Genet*. 2018;11:45-57. doi:10.2147/TACG.S141881
17. Khan SA, Peracha H, Ballhausen D, et al. HHS Public Access Molecular Genetics and Metabolism. 2018;121(3):227-240. doi:10.1016/j.ymgme.2017.05.016.Molecular
18. Rodríguez-lópez A, Alméciga-díaz CJ, Sánchez J, Barrera LA. No Title. (43):7-8.
19. Nathan AJ, Scobell A. Lehninger Principles of Biochemistry: 7th International Edition. *Foreign Aff*. Published online 2019:1689-1699. Accessed February 3, 2022. <https://www.bibguru.com/b/how-to-cite-lehninger-principles-of-biochemistry/>
20. Gargiulo V, Lanzetta R, Parrilli M, De Castro C. Structural analysis of chondroitin sulfate from *Scyliorhinus canicula*: A useful source of this polysaccharide. *Glycobiology*. 2009;19(12):1485-1491. doi:10.1093/GLYCOB/CWP123
21. Olgierd B, Sklarek A, Siwek P, Waluga E. Methods of Biomaterial-Aided Cell or Drug Delivery: Extracellular Matrix Proteins as Biomaterials. *Stem Cells Biomater Regen Med*. Published online January 1, 2019:163-189. doi:10.1016/B978-0-12-

- 812258-7.00011-3
22. Nieduszynski IA, Huckerby TN, Dickenson JM, et al. There are two major types of skeletal keratan sulphates. *Biochem J.* 1990;271(1):243. doi:10.1042/BJ2710243
 23. Funderburgh JL. MINI REVIEW Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology.* 2000;10(10):951-958. doi:10.1093/GLYCOB/10.10.951
 24. Masue M, Sukegawa K, Orii T, Hashimoto T. N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase in Human Placenta: Purification and Characteristics1. *J Biochem.* 1991;110(6):965-970. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123697
 25. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):27-30. doi:10.1093/NAR/28.1.27
 26. Rivera-Colón Y, Schutsky EK, Kita AZ, Garman SC. The structure of human GALNS reveals the molecular basis for mucopolysaccharidosis IV A. *J Mol Biol.* 2012;423(5):736-751. doi:10.1016/j.jmb.2012.08.020
 27. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605-1612. doi:10.1002/JCC.20084
 28. Beck M, Braun S, Coerdts W, Merz E, Young E, Sewell AC. Fetal presentation of morquio disease type A. *Prenat Diagn.* 1992;12(12):1019-1029. doi:10.1002/pd.1970121207
 29. De Franceschi L, Roseti L, Desando G, Facchini A, Grigolo B. A molecular and histological characterization of cartilage from patients with Morquio syndrome. *Osteoarthr Cartil.* 2007;15(11):1311-1317. doi:10.1016/j.joca.2007.04.008
 30. Dominici M, Blanc K Le, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells . The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
 31. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: Implications in transplantation. *Transplantation.* 2003;75(3):389-397. doi:10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9
 32. Jacobs SA, Roobrouck VD, Verfaillie CM, Van Gool SW. Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. *Immunol Cell Biol.* 2013;91(1):32-39. doi:10.1038/icb.2012.64
 33. Search of: mesenchymal stem cells - List Results - ClinicalTrials.gov. Accessed

- February 24, 2020.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=mesenchymal+stem+cells&cntry=&state=&city=&dist=>
34. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. *Nucleotide Sequence of the lap Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in Escherichia Coli, and Identification of the Gene Product*. Vol 169.; 1987.
 35. Mojica FJM, Juez G, Rodriguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol*. 1993;9(3):613-621. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x
 36. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (80-)*. 2007;315(5819):1709-1712. doi:10.1126/science.1138140
 37. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (80-)*. 2012;337(6096):816-821. doi:10.1126/science.1225829
 38. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(39):E2579-86. doi:10.1073/pnas.1208507109
 39. Jiang F, Doudna JA. CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms. *AnnuRevBiophys*. 2017;46(March):505-529. doi:DOI: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822
 40. Duroux-Richard I, Giovannangeli C, Apparailly F. CRISPR-Cas9: A revolution in genome editing in rheumatic diseases. *Jt Bone Spine*. 2017;84(1):1-4. doi:10.1016/j.jbspin.2016.09.012
 41. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013;8:2281. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
 42. Labun K, Montague TG, Krause M, Cleuren YNT, Valen E. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing H akon. 2019;47(May):171-174. doi:10.1093/nar/gkz365
 43. Gupta N, Susa K, Yoda Y, Bonventre J V., Valerius MT, Morizane R. CRISPR/Cas9-based Targeted Genome Editing for the Development of Monogenic

- Diseases Models with Human Pluripotent Stem Cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2018;45(1):e50. doi:10.1002/CPSC.50
44. Antibiotic Kill Curve. Accessed April 20, 2022. <https://www.mirusbio.com/applications/stable-cell-line-generation/antibiotic-kill-curve>
 45. Guschin DY, Waite AJ, Katibah GE, Miller JC, Holmes MC, Rebar EJ. A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification. *Methods Mol Biol.* 2010;649:247-256. doi:10.1007/978-1-60761-753-2_15
 46. van Diggelen OP, Zhao H, Kleijer WJ, et al. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A (MPS IV A). *Clin Chim Acta.* 1990;187(2):131-139. doi:10.1016/0009-8981(90)90339-T
 47. Silva-Cote I, Cruz-Barrera M, Cañas-Arboleda M, et al. Strategy for the Generation of Engineered Bone Constructs Based on Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Expanded with Human Platelet Lysate. *Stem Cells Int.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/7198215
 48. Zhan XS, El-Ashram S, Luo DZ, et al. A Comparative Study of Biological Characteristics and Transcriptome Profiles of Mesenchymal Stem Cells from Different Canine Tissues. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6). doi:10.3390/IJMS20061485
 49. Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(W1). doi:10.1093/NAR/GKU410
 50. Pachajoa H, Acosta MA, Alméciga-Díaz CJ, et al. Molecular characterization of mucopolysaccharidosis type IVA patients in the Andean region of Colombia. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2021;187(3):388-395. doi:10.1002/AJMG.C.31936
 51. Sentmanat MF, Peters ST, Florian CP, Connelly JP, Pruett-Miller SM. A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing. *Sci Reports 2018 81.* 2018;8(1):1-8. doi:10.1038/s41598-018-19441-8