

# EDICIÓN GENÓMICA EN DROSOPHILA MELANOGASTER MEDIANTE CRISPR-CAS9

Trabajo Final de Grado  
del alumno



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 29 de mayo de 2017

# **EDICIÓN GENÓMICA EN DROSOPHILA MELANOGASTER MEDIANTE CRISPR-CAS9**

Trabajo Final de Grado

del alumno

**EMILIANO SALVADOR VILARDO**

Dr.  
**Evaluador**

Dr.  
**Evaluador**

Dr.  
**Evaluador**

Dra. Carla Layana  
**Co-Directora**

Dr. Rolando Rivera Pomar  
**Director**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 29 de mayo de 2017.

### **Agradecimientos:**

Después de un intenso número de meses me toca escribir esta sección que es el toque final de este archivo tantas veces editado. Ha sido un periodo de gran aprendizaje, no solamente en el campo de la ciencia, sino también a nivel personal. Me gustaría reflejar mi agradecimiento en las personas que tuvieron alguna influencia para que hoy exista esta tesina.

Ante todo, quisiera expresar mi sincera gratitud a quienes orquestaron este trabajo final de licenciatura. A Rolando, por la oportunidad de ser parte de este excitante mundo de CRISPR. Por ser un transportador activo de material indispensable entre Alemania y Argentina, por perfeccionarme en el arte de la paciencia y por la libertad para trabajar. Gracias por los ajustes sutiles que bastaron para que este proyecto logre atravesar los valles del ondeante paisaje Waddingtoniano hasta adquirir su forma final. A mi co-directora, Carla, por su motivación, entusiasmo y guía. No me imagino teniendo una mejor consejera a la hora de la clonación. Gracias por darle una oportunidad a CRISPR.

A los habitantes del CeBio y del CREG. A los primeros por hacerme sentir bienvenido y por los miércoles de comida en mi breve paso por allí. Especialmente a Pamela por encontrar el sORF-7. A los segundos porque siempre estuvieron dispuestos a ayudarme, por las palabras de ánimo, los perspicaces consejos y por ser el cómo llego de la zona sur. Al otro drosophilista del grupo, Gonza, por cuidar a mis mutantes en ocasiones. A Jose, por los vaya uno a saber cuántos kilómetros recorridos en la Autopista BsAs-La Plata y la instrucción cinematográfica.

A mis compañeros genetistas de Pergamino, por el tiempo compartido, la diversión de estos años y por darme de una forma u otra más de lo que por aquí les podría dar crédito. Me tomo el atrevimiento de mapearlos en tres grupos de ligamiento. Gise, Guada, Mati, Vivi, Yael; Anto, Belu, Cami, Manu, Ro; Ale, Estefi, Jose, Rami. Por más centimorgans que nos separen, no nos dejemos recombinar.

A todos los que invitaron a comer a su humilde narrador alguna vez, a los Domingos en la casa de la Flaca con Natalia, Ramiro, Gerardo y Maxi. A mis abuelas, a las familias del Nene y de Eva. A Ernesto y sus asados. A Cristina y Juan. A Ely, mi compañera de aventuras. A Juli, Tuti y Caro. Al Cordobés, al Pampa y a Mili. A Lu, Mati y Andrea por

entender que el tarro no puede llamarse tarro de antes. Especialmente gracias a Matías y Lujan por la amistad y los favores de último minuto, último año, últimos años. En fin, le agradezco a todos los que hayan compartido conmigo un Nesquik, un terraplén, una cancha, un cine, un apunte, una espera en la fotocopiadora, una biblioteca en verano o unos fideos con albahaca.

A todos los profesores de la UNNOBA. A Susana por ser un faro para los estudiantes náufragos. A mis amigos de Carlos Casares. A la CIN por darme una beca.

A mis nuevas amigas mutantes. Ralph Greenspan dice en su libro “Fly pushing: the theory and practice of *Drosophila*” que uno no puede trabajar decentemente con un modelo animal sin conectarse de alguna manera y las mosquitas de la futa son la clase de cosas con las que, luego de pocas semanas es imposible no encariñarse. Por eso también le regalo mi tesis a mis mutantes favoritas, por no cuestionar mis limitadas habilidades como tutor, mostrar sus marcadores en cada cruce y poner huevos cuando lo ameritó la situación.

Por último, aunque no por ello menos importante le doy las gracias a mi familia por el apoyo en mi vida en general. Gracias Mary y Laly. Gracias Mateo y Juanchi.

Espero que disfruten leyendo la tesis y si tienen alguna duda siéntanse libres de preguntarme.

Muchas gracias a todos!

**Abreviaturas**

<b>Abreviatura</b>	<b>Español</b>	<b>Inglés</b>
<b>CRISPR</b>	Repeticiones palíndromas cortas regularmente espaciadas y agrupadas	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
<b>crRNA</b>	ARN CRISPR	CRISPR RNA
<b>DSB</b>	Ruptura Doble Cadena	Double-strand break
<b>dsDNA</b>	ADN doble cadena	Double-stranded DNA
<b>sgRNA</b>	ARN guía individual	Single guide RNA
<b>chiRNA</b>	ARN quimera	Chimeric RNA
<b>HDR</b>	Reparación dirigida por homología	Homology-directed repair
<b>InDel</b>	Inserción-Delección	Insertion-Deletion
<b>NHEJ</b>	Unión de extremos no homólogos	Non-homologous end joining
<b>PAM</b>	Motivo adyacente al protoespaciador	Protospacer adjacent motif
<b>TIM</b>	Motivo de interferencia del blanco	Target Interference Motifs
<b>ssDNA</b>	ADN de simple cadena	Single-stranded DNA
<b>tracrRNA</b>	ARN trans-activador	Trans-activating CRISPR RNA
<b>Cas</b>	Proteína asociada a CRISPR	CRISPR associated protein
<b>WT</b>	Tipo Salvaje	Wild-Type
<b>Cascade</b>	Complejo asociado a CRISPR para defensa antiviral	CRISPR-associated complex for antiviral defense
<b>ncRNA</b>	ARN no codificante	noncoding RNA
<b>T7E1</b>	T7 Endonucleasa I	T7 Endonuclease I
<b>RGN</b>	Nucleasa guiadas por ARN	RNA-guided nuclease
<b>ZFN</b>	Nucleasas con dedos de zinc	Zinc-finger nucleases
<b>TALEN</b>	Nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción	Transcription Activator-Like Effector Nucleases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa	Polymerase Chain Reaction
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto	Open Reading Frame
<b>sORF</b>	Pequeño marco de lectura abierto	small Open Reading Frame
<b>RNP</b>	Ribonucleoproteína	Ribonucleoprotein
<b>OT</b>	Blanco inespecífico	Off-Target
<b>KO</b>	Noqueado génico	Knock-out
<b>KI</b>	Inserción génica	Knock-in
<b>snRNA</b>	ARN nuclear pequeño	small nuclear RNA

**ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Sistema CRISPR-Cas .....</b>	<b>9</b>
1.1.1 Generalidades del sistema.....	9
1.1.2 Mecanismo de acción .....	10
1.1.3 Clasificación .....	12
1.1.4 Edición genómica mediante CRISPR-Cas9.....	13
<b>1.2 Razones para elegir <i>Drosophila melanogaster</i>.....</b>	<b>18</b>
1.2.1 Descripción y ventajas .....	18
1.2.2 Ciclo de vida.....	18
1.2.3 Desarrollo temprano.....	19
<b>1.3 Razones para generar sgRNAs contra <i>me31B</i> .....</b>	<b>21</b>
1.3.1 Rol de Me31B.....	21
1.3.2 Estructura del gen <i>me31B</i> .....	22
<b>1.4 Razones para generar sgRNAs contra sORF-7 .....</b>	<b>23</b>
1.4.1 ORFs y sORFs .....	23
1.4.2 sORFs en <i>Drosophila melanogaster</i> .....	24
1.4.3 sORF-7.....	25
<b>1.5 Objetivos .....</b>	<b>26</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i>.....</b>	<b>29</b>
2.1.1 Stocks utilizados .....	29
<b>2.2 Selección y diseño de sitios blanco para CRISPR/Cas9.....</b>	<b>31</b>
<b>2.3 Generación de plásmidos de expresión del sgRNA.....</b>	<b>32</b>
<b>2.4 Búsqueda de plásmidos con inserto.....</b>	<b>35</b>
2.4.1 PCR para screening .....	35
2.4.2 Screening de los clones vía PCR.....	35
2.4.3 Verificación de los clones por secuenciación .....	36
<b>2.5 Preparación de ADN para inyección.....</b>	<b>36</b>
<b>2.6 Preparación de los embriones para inyección .....</b>	<b>37</b>
2.6.1 Placas de agar-jugo de manzana .....	37
2.6.2 Recolección.....	37
2.6.3 Decorionación .....	38

---

2.6.4	Alineamiento.....	38
2.6.5	Deseccación.....	39
<b>2.7</b>	<b>Inyecciones .....</b>	<b>39</b>
<b>2.8</b>	<b>Extracción de ADN genómico .....</b>	<b>40</b>
2.8.1	A partir de embriones .....	40
2.8.2	A partir de moscas individuales o patas .....	41
<b>2.9</b>	<b>Búsqueda por PCR de moscas mutantes .....</b>	<b>41</b>
<b>2.10</b>	<b>Cruzas de moscas nos-cas9 .....</b>	<b>42</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Selección y diseño de sitios blanco para <i>me31B</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2</b>	<b>Selección y diseño de sitios blanco para sORF-7 .....</b>	<b>49</b>
<b>3.3</b>	<b>Screening de los clones .....</b>	<b>51</b>
3.3.1	Screening de clones para <i>me31B</i> .....	51
3.3.2	Screening de clones para sORF-7.....	53
<b>3.4</b>	<b>Secuenciación de clones .....</b>	<b>54</b>
3.4.1	Secuenciación de clones para <i>me31B</i> .....	54
3.4.2	Secuenciación de clones para sORF-7 .....	55
<b>3.5</b>	<b>Inyección de los plásmidos para Me31B.....</b>	<b>55</b>
<b>3.6</b>	<b>Búsqueda de la delección F+1 .....</b>	<b>56</b>
3.6.1	Búsqueda en embriones 24hs post-inyección .....	56
3.6.2	Búsqueda de la delección en moscas adultas.....	57
<b>3.7</b>	<b>Inyección de los plásmidos para sORF-7 .....</b>	<b>58</b>
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>
<b>5.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>65</b>
<b>6.</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>73</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Sistema CRISPR-Cas

### 1.1.1 Generalidades del sistema

CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated protein) es un sistema de inmunidad adaptativa frente a elementos genéticos exógenos de genomas virales que se encuentra presente en la mayoría de las arqueas (84%) y en muchas bacterias (45%) funcionando bajo el principio de discriminación propio-no propio ([Makarova et al. 2013](#)). Normalmente actúa como mecanismo de defensa frente a la transferencia horizontal de ADN y posee analogía con el sistema inmune de mamíferos ([Marraffini et al. 2008](#), [Goren et al. 2012](#)). Los loci CRISPR generalmente están formados por múltiples repeticiones palíndromas directas cortas separadas por secuencias no repetitivas llamadas espaciadores. En muchos sistemas estos espaciadores provienen de elementos genéticos móviles que residen en bacteriófagos y plásmidos, los cuáles se insertan de modo polarizado hacia el extremo 5' del locus. Los espaciadores pueden ser nativos (si ya estaban presentes en la cepa salvaje) o inducidos (si fueron adquiridos luego de un experimento in vivo o in vitro).

A pesar de que las secuencias palindrómicas de CRISPR fueron descubiertas en regiones intergénicas de *Escherichia coli* en 1987 la función de estas estructuras en el genoma no se conoció hasta dos décadas después ([Ishino et al. 1987](#), [Nakata et al. 1989](#)). Fueron asociados a la resistencia frente a fagos en 2007 y recién en 2010 se demostró su participación en la degradación de plásmidos ([Barrangou et al. 2007](#), [Garneau et al. 2010](#)). Subsecuentemente, se documentaron otras funciones biológicas de los sistemas CRISPR-Cas pero la inmunidad adaptativa sigue siendo su rol primario ([Koonin et al. 2013](#)). Existe fuerte evidencia de que al menos en algunos organismos el Sistema CRISPR-Cas lleva a cabo funciones regulatorias no relacionadas con la inmunidad, en el comportamiento social bacteriano o la expresión génica endógena.

El laboratorio de O'Toole ha descripto un rol del Sistema CRISPR-Cas en la regulación de la formación de biofilm en *P. aeruginosa*, cuando un profago específico está presente en su genoma ([Zegans et al. 2009](#)). Otro grupo de investigaciones demostró que, cuando la bacteria del suelo *M. xanthus* se enfrenta a la escasez de nutrientes, inicia un programa de desarrollo complejo mediado por CRISPR que lo lleva a convertirse en un organismo con organización multicelular ([Kroos 2007](#), [Velicer et al. 2009](#)).

### 1.1.2 Mecanismo de acción

Los sistemas CRISPR incorporan fragmentos de ADN exógeno (llamados espaciadores) en locus CRISPR, luego lo transcriben incluyendo al espaciador y lo procesan para generar moléculas pequeñas de ARN llamadas crRNAs (ARNs CRISPR) que se emplean para degradar el genoma del bacteriófago o el plásmido asociado ([Van der Oost et al. 2009](#), [Makarova et al. 2011](#), [Barrangou et al. 2012](#), [Wiedenheft et al. 2012](#)). Adyacente al locus CRISPR se encuentra un operón que codifica las numerosas y diversas proteínas Cas (CRISPR-associated) ([Haft et al. 2005](#), [Makarova et al. 2006](#)).

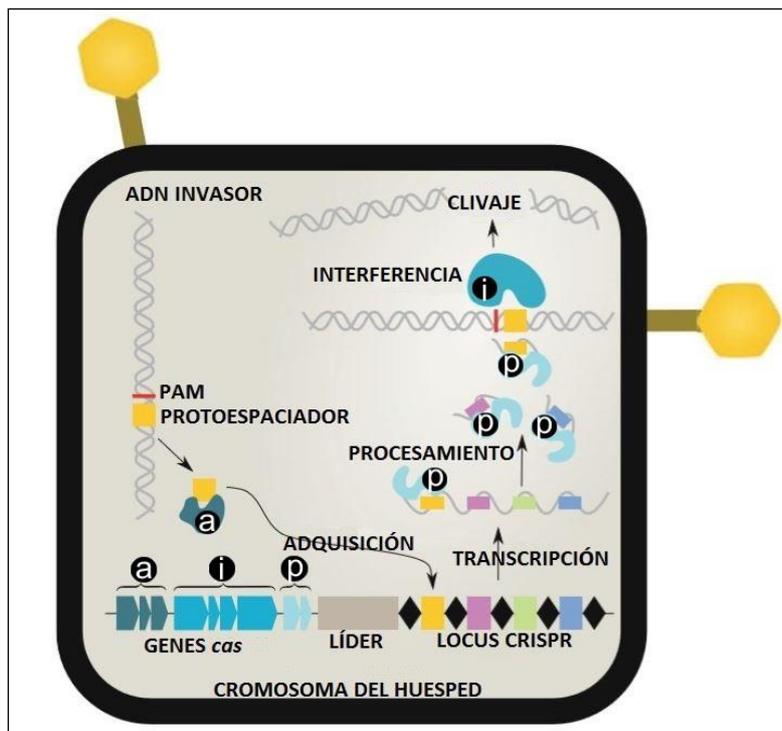
El mecanismo de CRISPR-Cas9 es usualmente dividido en 3 etapas: 1) adaptación o integración del espaciador. 2) procesamiento de los transcritos primarios largos (pre-crRNA) y maduración de los crRNAs que incluyen el espaciador completo y fragmentos de las repeticiones flanqueantes. 3) Interferencia ADN o ARN ([Figura 1](#)) ([Westra et al. 2012](#), [Barrangou 2013](#)).

Las proteínas Cas1 y Cas2, presentes en la mayoría de los sistemas CRISPR-Cas9 conocidos son suficientes para la inserción de los espaciadores en el locus de CRISPR ([Yosef et al. 2012](#)). Estas dos proteínas forman un complejo que es requerido para el proceso de adaptación. La actividad de Cas1 es requerida para la integración del espaciador mientras que Cas 2 parece tener una función no enzimática ([Richter et al. 2012](#), [Nuñez et al. 2014](#)). El procesamiento del pre-crRNA para generar los crRNA puede ser llevado a cabo tanto por un complejo ARN-endonucleasa o por una vía alternativa que involucra la RNasa III en los sistemas de tipo II ([Deltcheva et al. 2011](#)).

La integración de los fragmentos cortos de ácidos nucleicos invasores se da en los loci CRISPR en el cromosoma del huésped. Precediendo a los locus CRISPR existe una secuencia rica en A-T conocida como líder que controla la transcripción del locus CRISPR. ([Pougach et al. 2010](#)). Este se transcribe generando un transcrito primario largo que luego es procesado para producir crRNAs maduros cuyas secuencias son complementarias al protoespaciador del ácido nucleico invasor ([Barrangou et al. 2007](#), [Biswas et al. 2014](#)). El crRNA maduro se amalgama con una (en el tipo II) o varias (en el tipo I y III) proteínas Cas para formar así el complejo efector que realiza el clivaje del ADN

invasor ([Jinek et al. 2012](#), [Sashital et al. 2012](#)). El ADN clivado es complementario a los espaciadores ubicados entre las repeticiones ([Deveau et al. 2010](#)).

La función primordial de los sistemas CRISPR-Cas en las bacterias es evitar la diseminación de elementos genéticos transmisibles que contengan el protoespaciador correspondiente al espaciador insertado en el locus de CRISPR. Una secuencia que no sea exactamente igual al protoespaciador pero que contenga un alto porcentaje de identidad con la misma puede ser clivada por error ya que pocas diferencias son toleradas, estas secuencias se conocen con el nombre de blancos inespecíficos (Off-targets/OTs). Una restricción importante para evitar los cortes inespecíficos es el requerimiento de motivos específicos ubicados adyacentes al protoespaciador, llamados generalmente PAMs (Protospacer Adjacent Motifs) o más específicamente TIMs (Target Interference Motifs) ([Shah et al. 2013](#)).



**Figura 1.** Representación esquemática del mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas. Se compone de un juego de genes cas generalmente agrupados y que son responsables de la adquisición (a), expresión y procesamiento (p) e interferencia (i). Es condición sine qua non que exista al menos un locus CRISPR formado por repeticiones (diamantes negros) alternadas con secuencias espaciadoras (cuadros de colores), hacia el extremo 5' esta la secuencia líder (barra gris) que contiene el promotor principal del locus CRISPR. Los espaciadores son complementarios a los protoespaciadores que están adyacentes a una secuencia PAM (marcada en rojo) en el ADN invasor (Adaptado de R. Barrangou y J. van der Oost, 2013).

### 1.1.3 Clasificación

Debido a la enorme diversidad de sistemas CRISPR-Cas, y a su considerable complejidad en composición y arquitectura no existe todavía un criterio de clasificación único. Se ha propuesto un enfoque politético basado en evidencia filogenética, genómica comparativa y análisis estructurales ([Makarova et al. 2011](#)). Actualmente se conocen al menos 65 proteínas Cas, clasificadas en 45 familias proteicas diferentes. La secuencia de la mayoría de las proteínas es altamente divergente, presumiblemente debido a la rápida evolución que caracteriza a los sistemas de defensa.

Los sistemas CRISPR-Cas pueden clasificarse en 3 tipos mayoritarios en función de la presencia de genes característicos y a su vez se dividen en 10 subtipos (IA, IB, IC, ID, IE, IF, IIA, IIB, IIIA y IIIB) ([Makarova et al. 2011](#)).

El sistema tipo I se caracteriza por contener el gen *cas3*, y el complejo efector encargado del clivaje Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defense) ([Brouns et al. 2008](#)).

El sistema tipo II posee como gen característico a *cas9*, que codifica para una proteína multidominio que actúa como complejo efector. Cada locus CRISPR de este tipo además de contar con el gen *cas9* posee los genes ubicuos *cas1* y *cas2*. La vasta mayoría de los sistemas de tipo II contiene un gen no codificante que se transcribe en un ARN trans-activador (tracrRNA), cuya secuencia es parcialmente homologa a la secuencia repetitiva del locus CRISPR y es indispensable para el correcto funcionamiento del sistema. La proteína Cas9 posee entre 800 y 1400 aminoácidos y contiene dos dominios de nucleasa (RuvC y HNH) en el centro de la proteína y ambos son requeridos para el clivaje del ADN.

Los sistemas tipo III poseen el gen *cas10* que codifica para una proteína multidominio que contiene un dominio similar al de las polimerasas por lo que al principio fue erróneamente clasificado en esta familia. El complejo que lleva a cabo el clivaje en estos sistemas es Cmr/crRNA o Csm/crRNA.

#### 1.1.4 Edición genómica mediante CRISPR-Cas9

Las técnicas de genética molecular son herramientas invaluable a la hora de manipular genomas de organismos con el objetivo de entender la función de un gen. La ingeniería de genomas nació en los finales de los 70s, cuando múltiples grupos mostraron que el ADN exógeno podía ser tomado por levaduras o bacterias y ser insertado azarosamente en su genoma. Trabajos subsecuentes mostraron que el proceso podía también ocurrir en forma dirigida. En 1989 se descubrió que inyecciones de ADN en los núcleos de las células estimulaban la recombinación homóloga (HR) permitiendo modificaciones en sitios específicos y se creó el primer ratón knockout, un punto de inflexión en la ingeniería de genomas ([Capecchi 1989](#), [Zimmer et al. 1989](#)). La HR es la piedra angular de la ingeniería de genomas, pero con la desventaja de que ocurre a bajas frecuencias, limitando la eficiencia de edición. Para mejorar las tasas de edición, los investigadores explotaron la función de las nucleasas, las cuales crean rupturas de doble cadena (DSB) difíciles de reparar. Dirigiendo estas enzimas a un locus específico se puede clivar el ADN induciéndolo a recombinar.

La mutagénesis en *Drosophila* dependía en sus principios de métodos químicos o físicos, etilmetanosulfonato (EMS) o rayos X respectivamente, para alterar al azar el ADN a nivel nucleotídico o cromosómico ([Muller 1927](#), [Lewis et al. 1968](#), [Eeken et al. 1994](#)). Desde el descubrimiento de los transposones, particularmente del elemento P, en 1977, emergieron rápidamente otras técnicas como los sistemas FLP/FRT y GAL4-UAS ([Engels 1992](#), [Brand et al. 1995](#), [Golic et al. 1997](#)). Estas técnicas se han utilizado arduamente para generar pérdida de función de genes ([St Johnston 2002](#), [Venken et al. 2005](#)). Cuando en el 2000 se completó el genoma de *Drosophila* y aparecieron los primeros métodos para mutagénesis dirigida se hicieron posibles modificaciones genómicas más precisas basadas en el reclutamiento de la maquinaria de HDR (recombinación homóloga) o NHEJ (unión de extremos no homólogos) mediante la generación de rupturas de doble cadena (DSB) ([Adams et al. 2000](#), [Rong et al. 2000](#)).

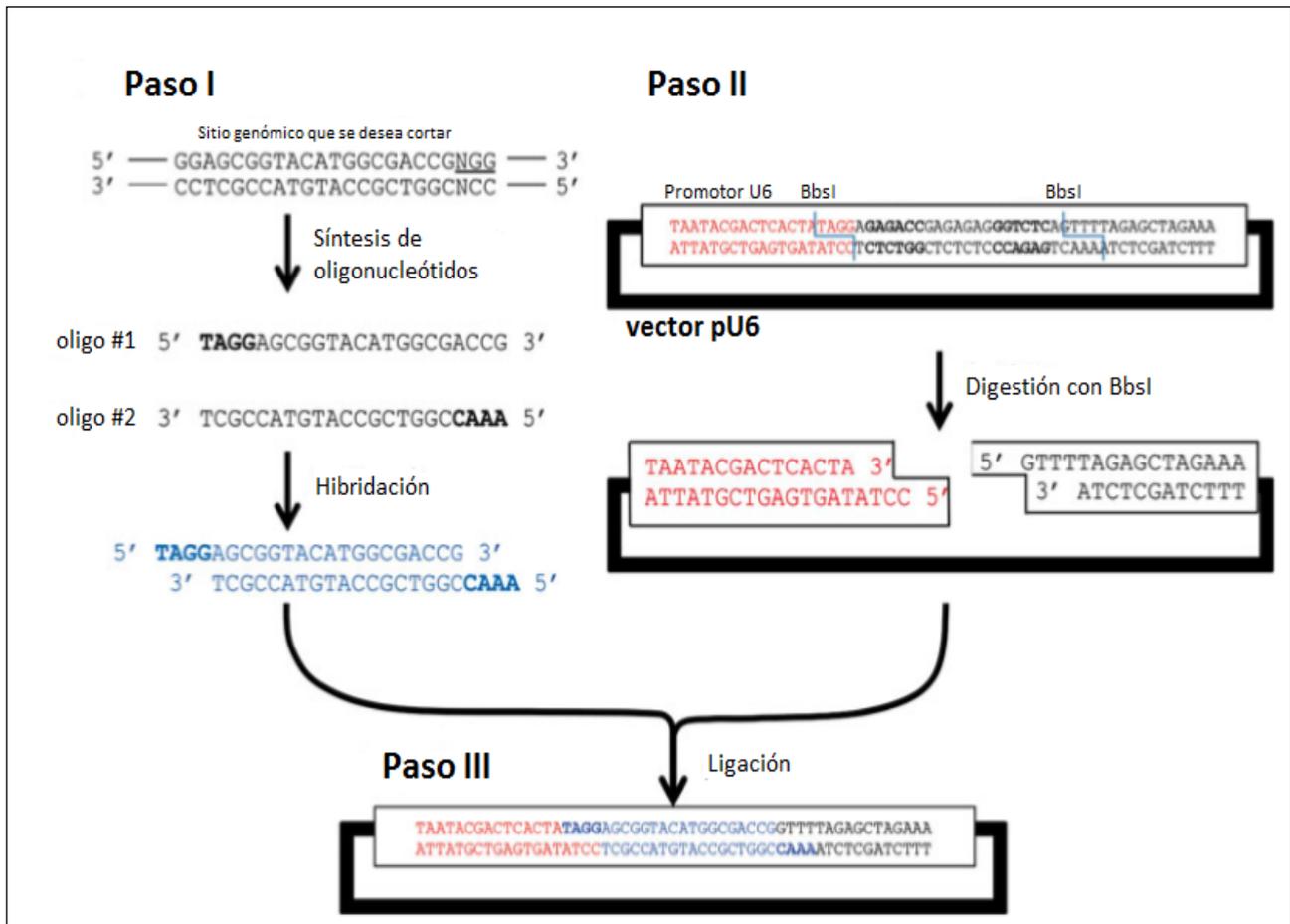
Para generar DSBs se han empleado ZFNs (Zinc-finger nucleases) y TALENs (transcription activator-like effector nucleases) ([Bibikova et al. 2002](#), [Beumer et al. 2006](#), [Liu et al. 2012](#)). Ambas técnicas son laboriosas y consumen mucho tiempo ya que

requieren de la generación de proteínas únicas para cada manipulación que se desee realizar.

En 2013, los métodos basados en el sistema CRISPR-Cas demostraron ser eficientes para la ingeniería genómica en metazoos simplificando la generación de DBSs. El método CRISPR-Cas9, es el más utilizado actualmente y fue adaptado del sistema tipo II de *Streptococcus pyogenes*. En este un crRNA (ARN CRISPR) que contiene una secuencia complementaria al ADN invasor y un ARN trans-activador (tracrRNA) interaccionan con la nucleasa Cas9 (CRISPR-associated nuclease 9) para dirigir el clivaje. Posteriormente el método fue simplificado al reducir los componentes mínimos requeridos de tres a dos mediante la fusión de los dos ARN (crRNA y tracrRNA) en un único ARN artificial de aproximadamente 100 pares de bases denominado chiRNA (chimeric RNA) o sgRNA (single guide RNA) ([Jinek et al. 2012](#)). A diferencia de los ZFNs y los TALENs, con el método CRISPR-Cas9 se puede dirigir una nucleasa común a una secuencia específica de ADN por un ARN corto que es fácilmente generado. Esto elimina la dificultad de crear una nucleasa nueva para cada modificación genómica.

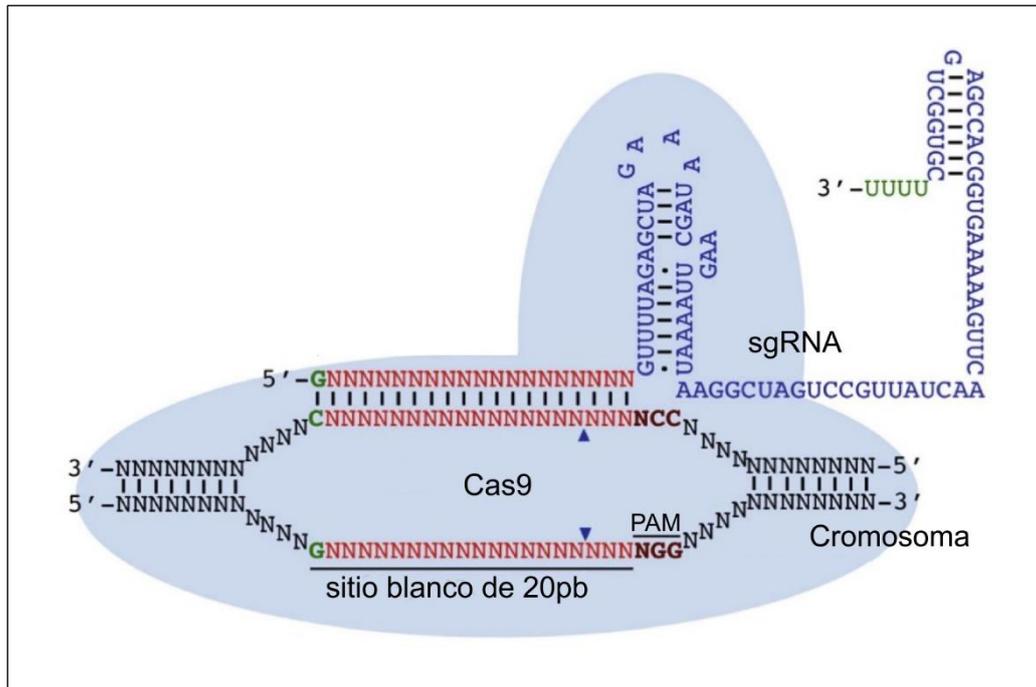
Metodológicamente, existen varias maneras de introducir los componentes del sistema: puede inyectarse la Cas9 purificada, o su ARNm generado in vitro o pueden crearse animales transgénicos que la expresen. De manera similar, el sgRNA puede ser transgénico, transcripto in vitro, o incorporarse en un plásmido estable que lo exprese con simples pasos ([Figura 2](#)).

El sgRNA está compuesto por las secuencias de crRNA y tracrRNA que dirigen el clivaje secuencia específico del ADN genómico por Cas9 a través de un apareamiento de bases ([Figura 3](#)). Los sgRNAs son fácilmente programables para reconocer secuencias de 20 nucleótidos y dirigen el clivaje dependiente de Cas9 en ambas hebras en un sitio definido. El único requerimiento para la elección de los sitios blanco es la presencia de una secuencia de tres pares de bases denominada PAM. La secuencia PAM debe poseer la forma NGG y ubicarse inmediatamente 3' de la secuencia de reconocimiento de 20nt. Por lo tanto, los sitios potenciales para dirigir la Cas9 son frecuentes ya que ocurren en promedio una vez cada 8 pares de bases. Los DSBs inducidos por Cas9 inducen la entrada en escena de la maquinaria de reparación del ADN que puede ser aprovechada para la edición del genoma.



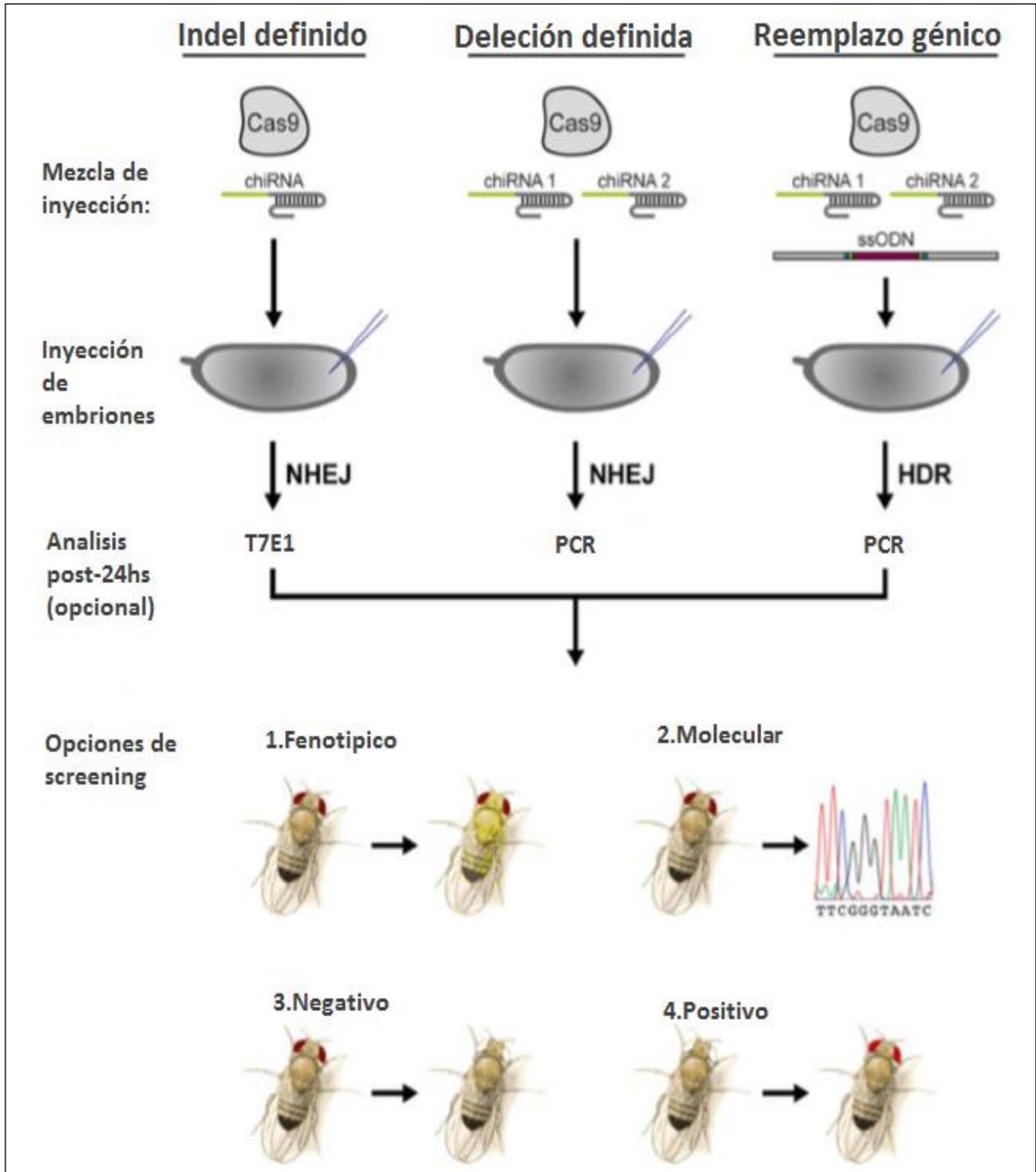
**Figura 2.** Estrategia de clonado de oligonucleótidos en el vector de expresión pU6. En el paso 1 se muestran las secuencias de ADN de los oligonucleótidos pedidos para un sitio específico. La secuencia PAM es requerida en el sitio blanco, pero no debe ser incluida en la secuencia del oligonucleótido. En el paso 2 se muestran los extremos cohesivos generados por la digestión con BbsI. En el paso 3 se muestra la secuencia final del vector ligado a los oligonucleótidos. (Adaptado de Magnus Lundgren et al., 2015)

La vía de reparación NHEJ es propensa a errores que pueden dar como resultado pequeñas inserciones y deleciones generando pérdidas de función de los genes (generando knockouts, KO) debido a corrimientos en la lectura del ORF ([Santiago et al. 2008](#), [Gaj et al. 2013](#)). Estas mutaciones sin sentido afectan tanto la síntesis proteica como la estabilidad del ARNm ya que existen mecanismos de vigilancia que se encargan de la detección y degradación de los ARN mensajeros sin sentido ([Ishigaki et al. 2001](#), [Alonso et al. 2003](#)). Normalmente la HDR usa la cromátida hermana como molde para una reparación precisa, pero si se suministra un molde de ADN exógeno en exceso se puede explotar esta vía para editar con precisión un gen cambiando o agregando secuencias que no estaban en el locus original (generando knockins, KI) ([Figura 4](#)).



**Figura 3.** Esquema que ilustra la estructura del sgRNA y el mecanismo de reconocimiento del sitio blanco. El sgRNA debe comenzar de ser posible con una “G” (en verde) para aumentar la eficiencia de transcripción a partir del promotor U6. La secuencia de 19N (en rojo) corresponde al crRNA y debe ser específica para el sitio blanco de 20pb en el cromosoma. La secuencia que sigue (en azul) es el tracrRNA que es común para todos los sgRNAs. Al final del sgRNA se encuentra el terminador U6 (en verde). Con puntas de flecha se indican los sitios de clivaje de la Cas9. La secuencia PAM es necesaria para el clivaje y se encuentra adyacente a los 20pb del sitio blanco pero está ausente en el sgRNA. N: cualquier nucleótido. ([Belhaj et al. 2013](#))

Las facilidades del sistema CRISPR-Cas9 permiten vislumbrar un tiempo donde la ingeniería de genomas sea una práctica de rutina tal como la PCR. Un gran número de grupos de investigación ya han demostrado que el sistema CRISPR/Cas9 es capaz de inducir DSBs sitio específicos en genomas eucariotas incluyendo células de mamíferos, células madre humanas y levaduras ([Cho et al. 2013](#), [DiCarlo et al. 2013](#), [Ding et al. 2013](#), [Jinek et al. 2013](#), [Mali et al. 2013](#)). El Sistema CRISPR-Cas9 está transformando la ingeniería genética con su simplicidad mientras leen estas hojas. En *Drosophila*, ya ha sido empleado tanto para interrumpir, como deletar y/o reemplazar genes ([Bassett et al. 2013](#), [Gratz et al. 2013](#), [Kondo et al. 2013](#), [Ren et al. 2013](#), [Yu et al. 2013](#), [Gratz et al. 2014](#), [Sebo et al. 2014](#)). Estas modificaciones son transmitidas eficientemente a través de la línea germinal posibilitando la rápida generación de animales con alelos mutados.



**Figura 4.** Diferentes abordajes experimentales permitidos por la técnica de CRISPR-Cas9. Los plásmidos apropiados (pBS-Hsp70-Cas9 o pU6-BbsI-chiRNA) son inyectados en embriones en estadio de pre-blastodermo. 24 horas post-inyección entre 10-15 embriones puede ser evaluados para determinar la presencia de la modificación y determinar la eficiencia. Una vez que los embriones llegan a adultos se pueden cruzar y recuperar modificaciones heredables. Los métodos para identificar moscas con la modificación son: screening fenotípico, si la modificación es conocida y observable; screening molecular por PCR; screening negativo si la modificación implica la eliminación de un marcador; screening positivo si se usa un dsDNA con un marcador visible. (Adaptado de Magnus Lundgren et al., 2015)

## 1.2 Razones para elegir *Drosophila melanogaster*

### 1.2.1 Descripción y ventajas

Desde la introducción de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) en la genética, por Castle ([Castle et al. 1906](#)) y algo más tarde por Morgan ([Morgan 1910](#)), su utilización experimental ha llevado al descubrimiento de numerosas e importantes leyes genéticas. En el estado salvaje es una pequeña mosca diploide de aproximadamente 2mm de longitud que se origina a partir de uno de los ciclos biológicos más comunes entre los insectos, pasando desde huevo a adulto a través de larva y pupa. A 25°C este ciclo se completa en 10 días, produciéndose un considerable aumento de tamaño durante las etapas larvarias. Después de la metamorfosis de la pupa los adultos que emergen ya no sufren ninguna división celular excepto en sus órganos reproductivos. Son fáciles de criar, robustas, capaces de sobrevivir con mínimos requerimientos, prolíficas, tolerantes a condiciones adversas y los cromosomas politénicos de sus larvas son identificables con facilidad. El progreso de la genética en *Drosophila* fue fomentado por el relativamente fácil acceso a líneas de moscas mutantes. Los mutantes son considerados propiedad de la comunidad científica y el laboratorio de Morgan estableció una base de datos de mutantes y una red de intercambio donde cualquiera podía obtenerlas.

*Drosophila melanogaster* consta de 4 pares de cromosomas: los cromosomas sexuales X e Y (cromosoma I) y 3 pares de autosomas (II, III, IV). Los cromosomas Y y IV son pequeños y telocéntricos, siendo el cromosoma Y heterocromático y portador de algunos genes relacionados con la espermatogénesis. La mayoría de los genes se localizan en los cromosomas X, II y III, que son metacéntricos y grandes.

Una ventaja a la hora de considerar el uso del método CRISPR-Cas9 para realizar edición en *Drosophila melanogaster* es el relativamente pequeño tamaño de su genoma debido a que esto implica menor cantidad de OTs.

### 1.2.2 Ciclo de vida

Su desarrollo ([Tabla 1](#)) incluye un período de embriogénesis dentro del huevo y una sucesión de estadios larvales que culminan con una metamorfosis completa (holometábola), de la que finalmente surge un adulto. El desarrollo se completa en 10 días a 25° C y 60 % de humedad relativa. Del huevo emerge una pequeña larva (primer

estadio), la cual muda al cabo de un día y llega al último estadio larval en el tercer día. Durante la metamorfosis, la hormona ecdisona desencadena una serie de cambios en el organismo entre los cuales se cuentan la destrucción de ciertos tejidos y órganos larvarios (histólisis) y la organización de las estructuras del adulto a partir de los discos imaginales y de células larvarias que se diferencian. El estado pupal lleva 3 a 5 días del ciclo hasta la emergencia del adulto.

Por día	Por hora	Fase
0	0	Huevo depositado
0-1	0-22	Embrión
1	22	Eclosión del huevo (larva 1)
2	47	Primera muda (larva 2I)
3	70	Segunda muda (larva 3)
5	118	Formación del pupario
5	122	Muda "prepupal" (4 <sup>to</sup> estadio)
5.5	130	Pupa
5.7	167	Pigmentación de ojos pupales
9	214	Adulto emerge del pupario
9	215	Expansión de las alas

**Tabla 1.** Cronología del desarrollo de *Drosophila melanogaster* a 25°C. Tomado de Doane, 1967.

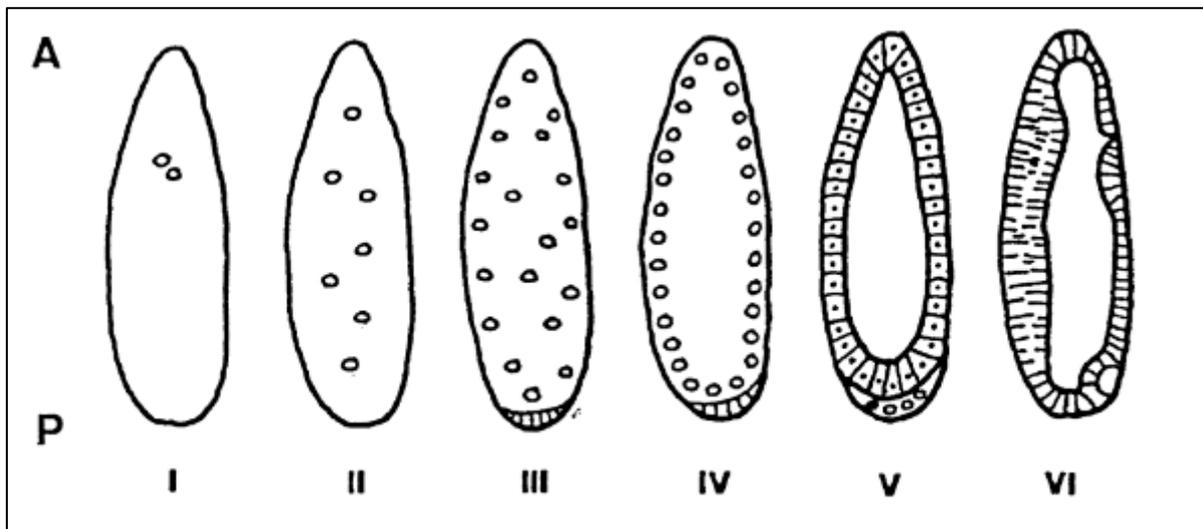
### 1.2.3 Desarrollo temprano

En el desarrollo de *Drosophila* las membranas celulares no se forman hasta la 13<sup>o</sup> división nuclear. Antes de este momento, todos los núcleos en división comparten un citoplasma común y el material puede difundir por todo el embrión. El patrón de clivaje en *Drosophila* difiere del de la mayoría de los insectos y posee características únicas y fascinantes. En el huevo de *Drosophila* el proceso de cariocinesis (división nuclear) ocurre en ausencia de citocinesis (división celular) creando un sincitio, una única célula con muchos núcleos residiendo en un citoplasma compartido ([Mazumdar et al. 2002](#)).

Los núcleos llevan a cabo varias divisiones mitóticas. En la porción central del cigoto, se producen 256 núcleos en una serie de 8 divisiones nucleares promediando los 8 minutos cada una. Durante la 9<sup>o</sup> división, aproximadamente 5 núcleos se dirigen al polo posterior del embrión y son rodeados por membrana celular generando las células polares que producirán las gametas en el adulto. En el 10<sup>o</sup> ciclo, el resto de los núcleos migran a la periferia y la mitosis continua, pero a un ritmo más lento. Durante estos estadios de división nuclear pero no de división celular el embrión se llama blastodermo sincitial, ya que la única membrana que existe es la del huevo en sí mismo ([Foe et al. 1983](#)). Luego

del 13° ciclo de división la membrana celular que antes cubría el embrión se pliega hacia adentro entre los núcleos que se encuentran en este momento en la periferia y los rodea formando una célula a partir de cada núcleo. Este proceso crea el blastodermo celularizado en el cual una monocapa de células queda envolviendo un corazón de vitelo ([Mazumdar et al. 2002](#)) (Figura 5)

Las inyecciones de los plásmidos que expresaran los sgRNAs deben realizarse antes del estadio de blastodermo celularizado, es decir, antes de que las membranas rodeen los núcleos. De esta manera, cuando las membranas se formen, los plásmidos quedarán retenidos dentro de ellas.



**Figura 5.** Desarrollo embrionario temprano de *Drosophila melanogaster*. A: Extremo Anterior; P: Extremo Posterior. I: Huevo fertilizado luego de la deposición. Pronúcleos todavía sin fusionar. II: Clivaje. Distribución de los núcleos en el huevo. III: Migración de los núcleos. IV: Preblastodermo. Núcleos en la periferia. V: Blastodermo. Formación de las membranas celulares. VI: Inicio de la gastrulación ([Scriba 1969](#)).

## 1.3 Razones para generar sgRNAs contra *me31B*

### 1.3.1 Rol de Me31B

Una de las etapas de regulación de la expresión génica involucra el control de los ARNm en focos citoplasmáticos que constituyen agregados de complejos de ribonucleoproteínas (mRNPs). Son estructuras altamente dinámicas que están en equilibrio con polisomas, respondiendo de esta manera al estado traduccional de la célula. Entre los componentes conservados en diferentes especies encontramos a la helicasa rck/p54 (cuyo homólogo en *D. melanogaster* es Me31B) y al factor de traducción eIF4E ([Andrei et al. 2005](#), [Layana et al. 2012](#)). De ambos, eIF4E es un componente clave de la maquinaria de traducción, participando en procesos opuestos: la traducción y el silenciamiento de ARNm ([Layana et al. 2012](#)).

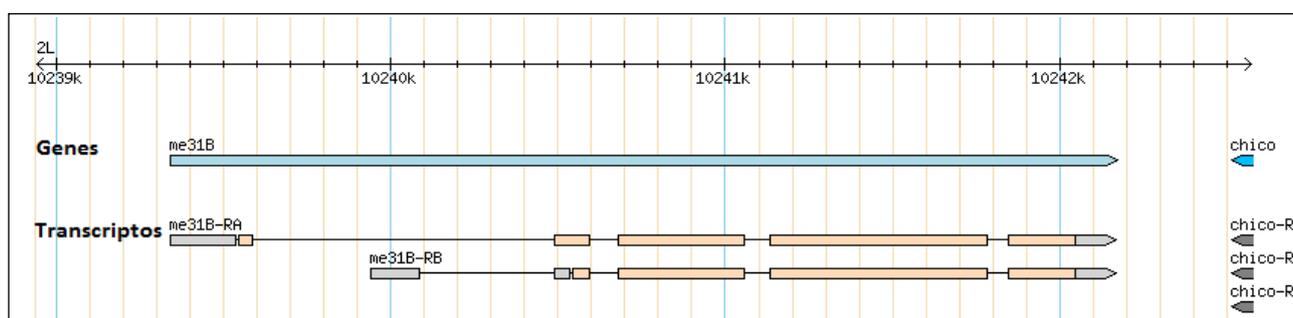
Me31B es esencial durante la oogénesis en *D. melanogaster*; junto a eIF4E, silencia la traducción del ARNm durante su transporte al oocito ([Nakamura et al. 2001](#), [Nakamura et al. 2004](#)). Los mecanismos de silenciamiento post-traduccional adquieren mayor importancia en el desarrollo de la línea germinal (oogénesis, espermatogénesis), ya que en estos procesos es escasa la actividad de transcripción ([Richter et al. 2011](#)). Por otro lado, estos procesos son determinantes de la capacidad reproductiva, generando esterilidad en los mutantes. Se ha mostrado la interacción entre Me31B y eIF4E tanto en células humanas ([Andrei et al. 2005](#)) como en células S2 de *Drosophila* (Layana 2012, tesis doctoral). La proteína-eIF4E tiene 8 isoformas diferentes, las cuáles varían principalmente en su extremo amino terminal ([Hernandez et al. 2005](#)). Durante la oogénesis eIF4E-1 y Me31B, junto a la proteína Cup (homólogo de eIF4E-T de mamíferos), regulan la expresión del mensajero de *oskar* (Nakamura et al., 2001; Nakamura et al., 2004). Es destacable que los factores que afectan los procesos de polaridad embrionaria se encuentran acumulados en gránulos, como por ejemplo los que forman el plasma polar (posterior), entre ellos Cup, Vasa, Me31B, etc. tal como se ha descrito en *Xenopus*, *C. elegans* y otros organismos ([Anderson et al. 2006](#), [Eulalio et al. 2007](#), [Buchan et al. 2009](#)). El desarrollo de la línea germinal del macho también depende del control de la traducción de los ARNm, aunque ha sido objeto de estudios moleculares menos exhaustivos que la oogénesis ([Schafer et al. 1995](#)). En las primeras etapas de la espermatogénesis la mayoría de los ARNm se encuentran silenciados y posteriormente

se van activando diferencialmente en el espacio y el tiempo ([Schafer et al. 1995](#), [Fuller 1998](#), [Kleene 2003](#)).

La isoforma eIF4E-3 en *D. melanogaster* se requiere específicamente durante la espermatogénesis, siendo su deficiencia causante de esterilidad en los machos, con defectos en la segregación meiótica de los cromosomas, la citocinesis, la conformación nuclear y la individualización de gametas ([Hernández et al. 2012](#)). Por otro lado, se ha demostrado la expresión de *me31B* en la línea germinal del macho (Layana, Corujo y Rivera-Pomar, no publicado). Por lo que proponemos que Me31B tiene una función en la línea germinal paterna mediante su interacción con eIF4E-3 de un modo equivalente a lo definido en ovarios para eIF4E-1.

### 1.3.2 Estructura del gen *me31B*

El gen *me31B* se encuentra en el cromosoma 2L y cuenta con dos transcritos y dos polipéptidos anotados. El nombre completo del gen es “*maternal expression at 31B*”



debido a su localización en el mapa citológico en la región 31B ([Figura 6](#)).

**Figura 6.** Esquema de la región genómica del gen *me31B* en GBrowser de flybase.org

En la [Figura 7](#) se muestra la secuencia de aminoácidos de Me31B extraída de <http://www.uniprot.org/uniprot/P23128> donde se marcan los posibles sitios de interacción con eIF4E importantes para realizar sus funciones de regulación de la traducción. Los sitios predichos mediante modelado por homología y predicción de acoplamiento proteína-proteína (docking) (Paulucci, Layana, Rivera resultados no publicados) se muestran en color celeste. Mientras que en rojo se marcaron los posibles sitios de interacción según la secuencia consenso YXXXXLφ donde φ= L,M,F y X es cualquier aminoácido, según un

alineamiento múltiple realizado con otras proteínas de unión a eIF4E ([Standart et al. 2008](#)).

La estrategia bajo la cual se idearon los sgRNA para realizar CRISPR-Cas9 es la de generar deleciones definidas ([Figura 4](#)) que dejen afuera de las proteínas truncadas estos posibles sitios de interacción con eIF4E.

```
MMTEKLN SGHTNLTSKGIINDLQIAGNTSDDMGWKS KLKLPKDNRFKTTDVTDRGN
E FEEFCLKRELLMGIFEKGWERPSP IQEAAIPIALSGKDV LARAKNGTGKTGA YCIPVLE
QIDPTKDYIQALVMVPTRE LALQTSQICIELAKHLDIRVMVTTGGTILKDDILRIYQKVQLII
ATPGRILD LMDKKVADMSHCRILVLDEADKLLSLDFQGM LDHVILKLPKDPQILLFSATF
PLTVKNFMEKHLREP YEINLMEELTLKGV TQYYAFVQERQKVHCLNTLFSKLQINQSIIF
CNSTQRVELLAKKITELGYCCYYIHAKMAQAHRNRV FHFDFRQGLCRNLVCSDFLTRGI
DVQAVNVVINFD FPRMAETYLHRIGRSGRFGHLG IAINLITYEDRFDLHRIEKELGTEIKP
IPKVIDPALYVANVGASVGDTCNNSDLNNSANEEGNVSK
```

**Figura 7.** Secuencia de aminoácidos de Me31B junto a sus posibles sitios de interacción con eIF4E según la secuencia consenso (en rojo) y según docking (en celeste).

## 1.4 Razones para generar sgRNAs contra sORF-7

### 1.4.1 ORFs y sORFs

Se denomina marco de lectura abierto (ORF, del inglés Open Reading Frame) a cada una de las secuencias de ADN comprendida entre un codón de inicio (ATG) y un codón de terminación de la traducción, excluyendo las secuencias que corresponden a los intrones en caso de haberlas. Se encuentra acotado por los UTRs (secuencias no traducidas).

Las herramientas bioinformáticas consideran un ORFs si posee al menos 50 codones. Un small ORF (sORF) es aquel que escapa a dicha definición por poseer menos de 50 codones y se caracterizan por no estar anotados en la mayoría de los casos). El primer estudio funcional de sORFs se realizó utilizando como modelo a *Saccharomyces cerevisiae* ([Kastenmayer et al. 2006](#)). Se encontraron 299 sORFs en su genoma lo cual representa el 5% de los ORFs anotados. Este hallazgo fue la primera evidencia de la transcripción de cientos de marcos de lectura pequeños no anotados.

### 1.4.2 sORFs en *Drosophila melanogaster*

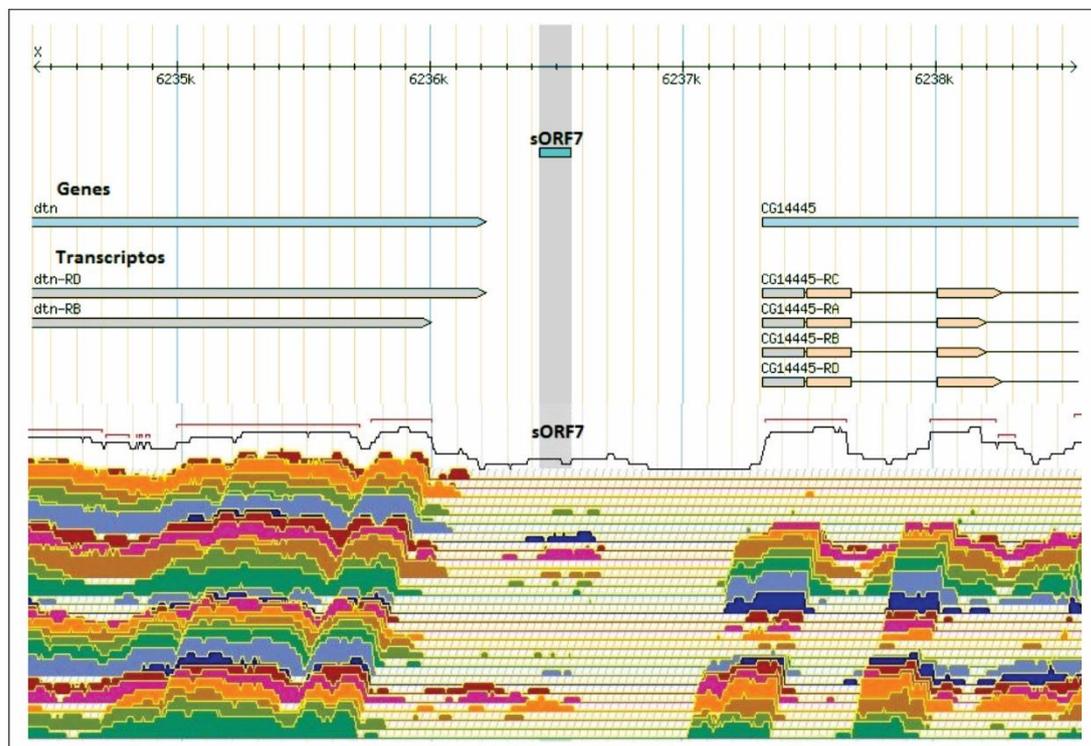
El primer ORF pequeño (sORF) de *Drosophila melanogaster* en ser estudiado fue *polished-rice* (*pri*), también conocido como *tarsal-less* (*tal*), que causa defectos epidérmicos cuando se encuentra mutado ([Pueyo et al. 2008](#)). El gen *tal* posee varios ORFs de 33 nucleótidos contenidos en un solo transcripto, siendo este un locus policistrónico ([Galindo et al. 2007](#)). El gen *tal* define dos nuevos paradigmas en los genes codificantes eucariotas: la existencia de pequeños péptidos con funciones biológicas, y su arreglo en mensajeros policistrónicos. La falta de tricomas (pelos) en la epidermis en mutantes recuerda a los mutantes de *shavenbaby* (*svb*), que codifica un factor de transcripción que controla donde aparecen los tricomas durante la embriogénesis. La expresión de *svb* se encuentra ausente en los mutantes de *tal*. Kondo, Plaza y colegas investigaron las relaciones funcionales entre los dos genes ([Kondo et al. 2010](#)). La expresión de *svb* no se encuentra afectada por las mutaciones en *tal*. Sin embargo, los autores mostraron que cuatro de los péptidos cortos derivados del ARNm de *tal* dirigen el clivaje proteolítico del dominio amino-terminal de la proteína Svb. Esta proteína Svb truncada ahora pasa de ser un represor a ser un activador. La actividad proteolítica de *tal* es un interruptor temporal crucial ya que solamente cuando *tal* se expresa Svb puede activar otros genes e iniciar la formación de tricomas. El gen *tal* se encuentra conservado en insectos por lo que esta nueva función identificada probablemente no sea específica de *Drosophila*. El largo del gen *tal* se encuentra por debajo del umbral requerido para una anotación genómica adecuada pero otros péptidos cortos similares podrían estar escondidos en varios lugares del genoma.

A pesar de que los sORFs no encajan en la definición estándar de gen y de encontrarse en regiones consideradas como no informacionales podrían tener un rol en muchos procesos biológicos, modulando el flujo de información de una manera aún impredecible. En el laboratorio se efectuó una búsqueda por espectrometría de masas de péptidos expresados en el embrión de *Drosophila melanogaster* cuyo tamaño era menor o igual a 10 codones. Como resultado se obtuvieron varios potenciales candidatos. Algunos de ellos demostraron estar codificados por sORFs (Magjor y Rivera Pomar, resultados no

publicados). El estudio funcional de los sORFs tiene el inconveniente de que en muchos casos se encuentran dentro de otros genes y los procedimientos tradicionales de mutagénesis afectan ambos. Es por eso que la edición genética puede resultar más eficiente.

### 1.4.3 sORF-7

Uno de los sORFs descubiertos mediante espectrometría de masas en *Drosophila melanogaster* es el sORF-7. Está ubicado en el cromosoma X, en la región intergénica entre los genes *detonator* (*dtn*) y CG14445 (Figura 8). Los resultados de RNASeq evidencian que existe transcripción en la región genómica que contiene el sORF-7 en varios estadios del desarrollo.



**Figura 8.** Región genómica de las cercanías del sORF-7 en GBrowser de FlyBase.org y resultados de RNASeq (modENCODE) de diferentes estadios de *Drosophila melanogaster*. Cada color indica un estadio diferente del desarrollo.

La estrategia con CRISPR-Cas9 consistió en generar sgRNAs que introduzcan la producción de InDels mediante NHEJ, que provoquen corrimientos en la lectura del ORF y, por lo tanto, alelos nulos.

## 1.5 Objetivos

El objetivo general es generar líneas mutantes de *Drosophila melanogaster* para *me31B* y sORF-7 aplicando el método CRISPR-Cas9.

Los objetivos específicos propuestos son:

- Seleccionar sitios blanco para realizar CRISPR-Cas9 en el gen *me31B* y en el sORF-7.
- Generar sgRNAs contra el gen *me31B* y el sORF-7 y validarlos mediante secuenciación.
- Generar moscas mutantes para los genes *me31B* y para sORF-7 mediante inyección en embriones de *Drosophila melanogaster* con el sistema CRISPR-Cas9.
- Realizar el screening de la edición genómica utilizando técnicas de PCR.



## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1 Líneas de *Drosophila melanogaster*

Las líneas de moscas *Drosophila melanogaster* fueron criadas en un ciclo de luz:oscuridad 12:12 a 25°C en medio basado en polenta-dextrosa-levadura-agar (modificado de Brent y Oster, 1974) que se detalla a continuación: Para 1/2 litro de comida: 450ml de H<sub>2</sub>O, 5,2g de agar, 10g de levadura, 50g de polenta, 44g de dextrosa, 1g de metil p-hidroxibenzoato (Nipagín) disuelto en 10ml de etanol, 5ml de ácido propiónico. Se utilizó dextrosa en lugar de sacarosa con la intención de reducir las infecciones por *Leuconostoc*.

### 2.1.1 Stocks utilizados

Se utilizaron moscas transgénicas que expresan Cas9 en la línea germinal de manera que solo deba ser incorporado con la inyección el vector que expresa el sgRNA. Los transgenes son una forma popular de suplementar la proteína Cas9 para facilitar la edición genómica en *Drosophila melanogaster*. Proveen alta eficiencia y permiten restringir la actividad de CRISPR/Cas en tiempo y espacio. Debajo se brindan detalles de las líneas de moscas transgénicas que se criaron ([Zhang et al. 2014](#), [Gratz et al. 2015](#), [Port et al. 2016](#)). Todas se encuentran disponibles en Bloomington *Drosophila* Stock Center.

**act-cas9** (BDSC 54590; y<sup>1</sup> P(act5c-cas9, w+) M(3xP3-RFP.attP)ZH-2A w\*)

Esta línea posee fuerte expresión ubicua de Cas9. Contiene la secuencia de cas9 optimizada con codones humanos. La secuencia codificante fue amplificada por PCR a partir del plásmido y clonada debajo de un fragmento de 4.4kb de la secuencia regulatoria río arriba del gen actina5C. El plásmido resultante fue integrado en el stock attP2A (Bloomington 24480) en el cromosoma X. La línea *act-cas9* ha sido evaluada exitosamente en varios laboratorios y es una de las líneas más activas con alta actividad somática y en línea germinal. Cuando es cruzada con moscas transgénicas para el sgRNA casi logra imitar el fenotipo mutante del gen en cuestión. Es ideal para generar nuevos alelos en genes no esenciales.

***nos-cas9*** (BDSC 54591;  $y^1$  P(nos-cas9, w+) M(3xP3-RFP.attP)ZH-2A w\*

Esta línea también usa la Cas9 optimizada. El ORF fue clonado en un plásmido que contenía el promotor y el 3'UTR de *nanos* para restringir la expresión a la línea germinal. El transgen fue insertado en la línea attP2A (BDSC 24480) en el cromosoma X. Posee actividad intermedia restringida a la línea germinal ya que la Cas9 se expresa durante la oogénesis. En combinación con un sgRNA inyectado es ideal para generar mutaciones letales. Es una de las líneas más utilizada en la mayoría de los laboratorios.

***nos-Gal4VP14 UAS-cas9*** (BDSC 54593; P{ry<sup>+7.2</sup>=hsFLP1},  $y^1$  w<sup>1118</sup>; P{y<sup>+7.7</sup> w<sup>+mC</sup>=UAS-Cas9.P}attP2 P{w<sup>+mC</sup>=GAL4::VP16-nos.UTR}CG6325<sup>MVD1</sup>)

Para esta línea se combinó el popular driver *nanos-Gal4VP16* con una construcción UAS-cas9. Ambos transgenes están ubicados en el tercer cromosoma. Posee alta actividad predominantemente en la línea germinal, pero también una significativa actividad somática por lo que para la mayoría de los experimentos las líneas 54590 y 54591 darán mejores resultados.

***vasa-cas9*** (BDSC 51323;  $y^1$  M{vas-Cas9}ZH-2A w<sup>1118</sup>/FM7c)

Expresa la proteína Cas9 en el ovario bajo el control de la secuencia regulatoria del gen *vasa* para brindar actividad restringida a la línea germinal.

***act5C-Cas9-Lig4<sup>-</sup>*** (BDSC 58492;  $y^1$  M{Act5C-Cas9.P.RFP-}ZH-2A w<sup>1118</sup> Lig4<sup>169</sup>)

Es la línea más eficiente para introducir secuencias nuevas en el sitio de corte por recombinación homóloga ya que cuenta con un alelo nulo para *lig4* lo cual inhabilita el mecanismo de reparación por NHEJ.

## 2.2 Selección y diseño de sitios blanco para CRISPR/Cas9

Una vez que se determinaron las modificaciones genómicas que se deseaban realizar y se diseñó una estrategia general se identificaron los mejores sitios para inducir DSBs con el sistema CRISPR-Cas9. Para mutagénesis vía InDel, se buscaron sitios blanco en una región donde una pequeña inserción o delección tenga el potencial para ser disruptiva, por ejemplo, mediante un corrimiento de la lectura del ORF. Para generar delecciones definidas de una región se buscaron dos sitios blanco flanqueando la región a escindir.

Para cada región blanco se identificó una secuencia de 20-nt flanqueado en el extremo 3' por una secuencia PAM (NGG) de manera que el sitio blanco tenga la forma 5'-G(19N)(NGG). La secuencia PAM no es parte del sgRNA pero es requerida en el sitio blanco por la Cas9. Los blancos fueron seleccionados para minimizar los cortes potenciales en otras regiones del genoma, llamados off-targets (OT) o blancos inespecíficos. Varios estudios mostraron que los 12-nt de la secuencia target inmediatamente adyacentes al PAM (región "semilla") son críticos para la eficiencia del clivaje, por lo tanto de ser posible deben ser únicos ([Semenova et al. 2011](#), [Wiedenheft et al. 2011](#), [Cradick et al. 2013](#), [Fu et al. 2013](#), [Hsu et al. 2013](#), [Pattanayak et al. 2013](#), [Cho et al. 2014](#)).

Para cada sitio se seleccionaron los targets con el menor número de OTs en el genoma. Para definir los OTs se utilizaron los siguientes criterios ([Cong et al. 2013](#), [Jiang et al. 2013](#)):

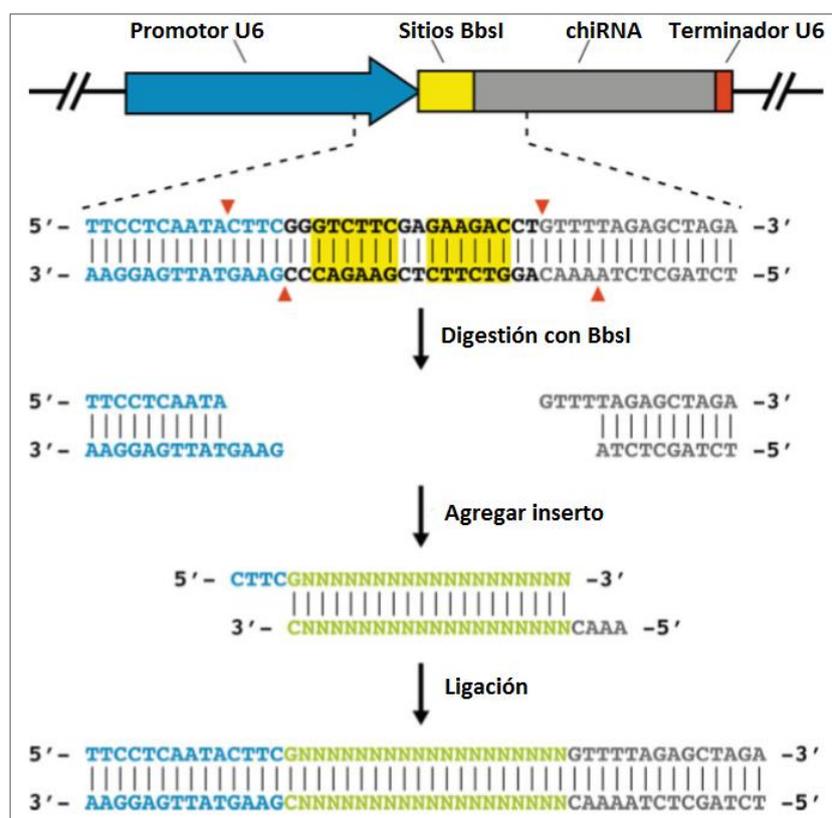
- (a) Sitios adyacentes a un PAM y que tienen  $\geq 11/12$  coincidencias con la secuencia semilla (seed) del blanco. Se definió la secuencia semilla como los 10-12 nucleótidos más próximos al PAM
- (b) Sitios adyacentes a un PAM con  $\geq 18/20$  coincidencias con la secuencia entera del target.
- (c) Sitios que reúnan los criterios anteriores y que estén adyacentes a un PAM con la forma NAG o NGG.

Para facilitar el diseño de sgRNAs de alta calidad se utilizó la herramienta web, CRISPR Optimal Target Finder desarrollada por C. Dustin Rubinstein, Ed O'Connor-Giles y Kate M. O'Connor-Giles; que ayuda a identificar secuencias blanco posibles en el genoma de *Drosophila melanogaster* y en otras especies de invertebrados ([Gratz et al. 2014](#)). La herramienta se puede encontrar en <http://tools.flycrispr.molbio.wisc.edu/targetFinder/>. Para complementar la búsqueda se utilizó CRISPRdirect disponible en <https://crispr.dbcls.jp/> ([Naito et al. 2015](#)).

### 2.3 Generación de plásmidos de expresión del sgRNA

Las secuencias para CRISPR se sintetizaron como oligonucleótidos (Invitrogen o Eurofins Genomics), se realizó la hibridación (annealing) y se incorporaron en el vector de expresión de sgRNA, pU6-BbsI-chiRNA ([Figura 9](#)). Este plásmido específico para *Drosophila* cuenta con dos sitios de corte para la enzima BbsI y está diseñado para la expresión *in vivo* a partir de un promotor de Pol III (derivado del locus snRNA:U6:96Ab también conocido como U6-2). El plásmido pU6-BbsI-chiRNA (#45946 en Addgene) fue un obsequio de Melissa Harrison, Kate O'Connor-Giles y Jill Wildonger.

Se incluyeron extremos cohesivos en la secuencia de los oligonucleótidos para facilitar el clonado. La hebra de arriba (oligonucleótido sentido o top strand) se diseñó con el formato 5'-CTTCG(19N)-3', donde G(19N) corresponde a la secuencia target única que comienza con una G para aumentar la eficiencia de transcripción a partir del promotor de *Drosophila* U6. La hebra de abajo (oligonucleótido antisentido o bottom strand) se diseñó con el formato 5'-AAAC(19N)C-3', con (19N)C representando la reversa complementaria de la secuencia blanco. Se pueden pedir los oligonucleótidos 5' fosforilados o pedirlos no fosforilados y usar Polinucleotido kinasa T4 (PNK) para añadir fosfatos en los extremos 5' (En nuestro caso se pidieron fosforilados). Los oligonucleótidos se resuspendieron a una concentración de 100µM en agua libre de nucleasas.



**Figura 9.** Clonado del sgRNA. El vector pU6-BbsI-chiRNA contiene dos sitios de reconocimiento para la enzima de restricción de tipo IIS BbsI (marcados en amarillo). Las enzimas de restricción de tipo IIS realizan cortes fuera del sitio de reconocimiento por lo que son ideales para este tipo de estrategia de ligación denominadas Golden Gate (Engler et al. 2008, Engler et al. 2009). Los cortes realizados por BbsI se marcaron con triángulos rojos. Luego de la digestión con BbsI, los 4-nt que sobresalen son únicos por lo que el plásmido no puede religarse, haciendo más eficiente el clonado de las secuencias hibridadas. Las secuencias a insertar se generan como dos oligonucleótidos fosforilados en el extremo 5' que se hibridan para crear un inserto con nucleótidos sobresalientes complementarios a los del plásmido digerido (5'-CTTC son los nucleótidos que sobresalen en el oligonucleótido de la hebra de arriba; 5'-AAAC sobresalen en el oligonucleótido de la hebra de abajo) para facilitar la ligación en el plásmido linearizado. (Gratz et al. 2015)

Se realizó el annealing (hibridación) de los pares de oligonucleótidos de secuencias blanco: Se combinaron 1µL de cada oligonucleótido fosforilado (100µM stock), 1µL de buffer de Ligasa T4 (Fermentas), 7µL de H<sub>2</sub>O (Tabla 2). Se incubaron a 37°C durante 30 minutos y a 95°C por 5 minutos, luego se bajó la temperatura hasta 25°C a una tasa de -5°C/min.

Oligo Sentido (100µM)	1µl
Oligo Antisentido (100µM)	1µl
Buffer Ligasa T4	1µl
H <sub>2</sub> O	7µl
Volumen final	10µl

**Tabla 2.** Reacción de hibridación (annealing) de los oligonucleótidos.

Se preparó el plásmido pU6-BbsI-chiRNA para el clonado transformándolo vía shock térmico en células DH5 $\alpha$  y seleccionando colonias en placas con 100 $\mu$ g/ml de ampicilina. Se purificó el ADN plasmídico usando miniprep por TELT-Lisozima y se resuspendió en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas.

Se determinó la concentración de ADN plasmídico utilizando el programa imageJ luego de realizar la corrida electroforética del mismo. Se realizó la digestión de 1 $\mu$ g de pU6-BbsI-chiRNA con BbsI ([Tabla 3](#)), se incubó a 37°C durante toda la noche y se inactivó la enzima a 65°C por 20 minutos.

<b>BbsI (5U/<math>\mu</math>l NEB)</b>	1 $\mu$ l
<b>Plásmido (101.3 ng/<math>\mu</math>l)</b>	10 $\mu$ l
<b>NEBuffer 2.1</b>	5 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O</b>	34 $\mu$ l
<b>Volumen final</b>	50 $\mu$ l

**Tabla 3.** Reacción de digestión del plásmido Pu6-BbsI-chiRNA con BbsI.

Se purificó el vector cortado a partir del gel obtenido por electroforesis utilizando QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) y se determinó la concentración de ADN desde el gel con imageJ ([Schneider et al. 2012](#)).

Posteriormente se realizó la ligación del inserto previamente hibridado con el plásmido pU6BbsI- chiRNA digerido purificado ([Tabla 4](#)). Se incubó toda la noche a 16°C y luego se inactivó la enzima durante 10 minutos a 65°C. Finalmente se transformaron bacterias competentes con 5 $\mu$ l de cada reacción de ligación (25ng de plásmido).

<b>Plásmido Abierto (15,43ng/<math>\mu</math>l)</b>	3,2 $\mu$ l
<b>Inserto (10<math>\mu</math>M)</b>	1 $\mu$ l
<b>Buffer T4 Ligasa</b>	1 $\mu$ l
<b>T4 Ligasa (Fermentas)</b>	1 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3,8 $\mu$ l
<b>Volumen final</b>	10 $\mu$ l

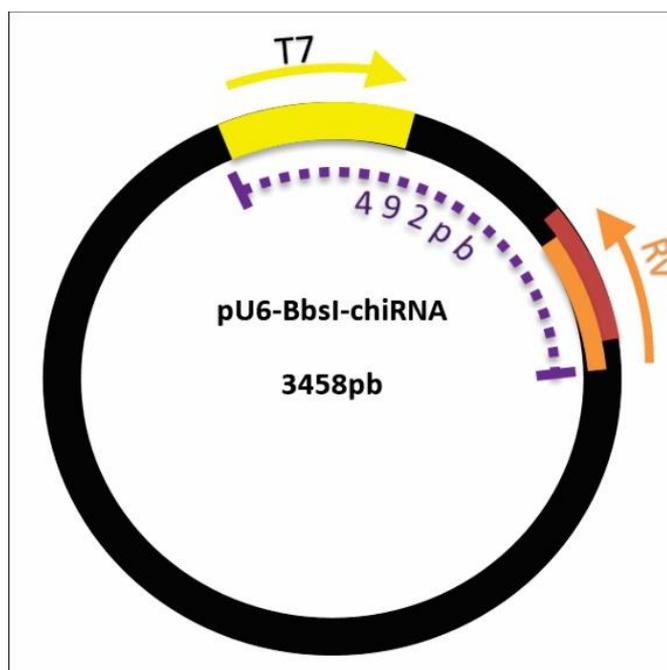
**Tabla 4.** Reacción de ligación del plásmido pU6-BbsI-chiRNA con el inserto.

Se seleccionaron las colonias en placas de LB-agar con ampicilina (100 $\mu$ g/ml). De cada placa (cada una correspondiente a una ligación específica) se repicaron 10 colonias a tubos con caldo LB-ampicilina (50 $\mu$ g/ml) y se incubaron a 37°C por 16hs. Se realizó miniprep de cada uno de los 10 tubos de cada ligación para obtener ADN plasmídico.

## 2.4 Búsqueda de plásmidos con inserto

### 2.4.1 PCR para screening

Se ideó un método para determinar que plásmidos contaban con el inserto correcto, para ello se realizaron PCRs donde el primer reverse corresponde a la secuencia del fragmento insertado y el primer forward a T7 (Figura 10).



**Figura 10.** Esquema del plásmido pU6-BbsI-chiRNA donde se marcan los sitios de pegado de los primers. Los oligonucleótidos sentido y antisentido, se muestran en rojo y naranja respectivamente. Para la PCR se utilizaron el oligonucleótido antisentido (flecha naranja) como primer reverse y T7 como primer forward (flecha amarilla). El producto esperado es de 492 pares de bases.

### 2.4.2 Screening de los clones vía PCR

Para el screening de los clones de *me31B* las condiciones de PCR fueron las siguientes: 94°C 5min; (94°C 30seg+51°C 1min+72°C 1min)x25 ciclos; 72°C 5min; 4°C HOLD.

Molde (20ng/μl)	0,5μl
Primer Fw (10μM)	1μl
Primer Rv (10μM)	1μl
Buffer Pegasus (10X; PB-L)	2μl
MgCl (50μM)	0,9μl
dNTPs (10μM)	1μl
DNA Pol Pegasus (5U/μl; PB-L)	0,4μl
H <sub>2</sub> O	13,2 μl

**Tabla 5.** Mezcla de PCR para screening de los clones *me31B*.

Para los experimentos con el sORF-7 se realizaron PCRs utilizando como molde directamente las colonias de bacterias (colony PCR, [Tabla 6](#)). Se utilizó el programa detallado a continuación: 98°C 3min; (98°C 30seg+68°C 40secs+72°C 20secs)x25 ciclos; 72°C 7min; 8°C HOLD. Como primer Forward y Reverse se usaron T7 y sORF-7-1CRISPR Rv o sORF-7-2CRISPR Rv respectivamente.

Primer Fw (10µM)	0,3µl
Primer Rv (10µM)	0,3µl
Buffer Phusion (10X)	2µl
MgCl (50µM)	0,9µl
dNTPs (10µM)	1µl
Phusion High-Fidelity DNA Pol (2U/µl)	0,1µl
H <sub>2</sub> O	7 µl

**Tabla 6.** Mezcla de la PCR a partir de colonias para screening de los clones sORF-7.

### 2.4.3 Verificación de los clones por secuenciación

Se confirmaron los clones que dieron positivos por PCR mediante secuenciación (Macrogen Inc.).

## 2.5 Preparación de ADN para inyección

Para amplificar el ADN de los clones obtenidos se realizaron cultivos líquidos de las bacterias transformadas en 50ml de caldo LB con ampicilina (100µg/ml). La extracción de ADN plasmídico se realizó con el sistema QIAGEN Plasmid Midi Kit PLUS (libre de endonucleasas). La concentración y cantidad de ADN obtenido se cuantificó ya sea con un equipo NanoDrop o Qubit (Thermo Fisher Scientific).

Para preparar el ADN para la inyección se eliminó el buffer de elución por precipitación etanólica. Se utilizaron 50µg de ADN plasmídico purificado de 100µl con una concentración de NaAcO 0,3M; se agregaron 2,5 volúmenes de etanol frío y se dejó toda la noche a -20°C. Se centrifugó durante 30 minutos a 13200 rpm a temperatura ambiente. El precipitado se lavó con etanol 70% y se dejó secar al aire por 5 minutos. El precipitado se disolvió en 12µl de H<sub>2</sub>O y se ajustó la concentración en 300µg/µl con buffer de inyección. Finalmente, la solución de ADN se filtró a través de microfiltros de 0,2µm (Merck Millipore) y se guardó a 4°C hasta su uso.

Buffer de Inyección (10X): 1mM Buffer de Fosfato de Sodio pH 6.8, 50mM KCl.

## **2.6 Preparación de los embriones para inyección**

### **2.6.1 Placas de agar-jugo de manzana**

Para 1L de solución se utilizaron 30 gramos de agar, 300ml de jugo de fruta de manzana (Baggio), 700ml de H<sub>2</sub>O y 0,5g de Nipagín (metil p-hidroxibenzoato) disuelto en 10ml de etanol. Se agregó el agar al H<sub>2</sub>O y se autoclavó por 40 minutos (el jugo no se autoclava de lo contrario no gelifica). Se disolvió el Nipagín en etanol absoluto y se agregó al jugo de manzana. Rápidamente se mezcló el jugo con el agar autoclavado y se dispensó en las placas de petri. Se guardaron a 4°C.

### **2.6.2 Recolección**

Se recolectaron embriones entre 0,5 a 1 h a 25°C para que las inyecciones tengan lugar en estadio de blastodermo sincitial. El día previo a las inyecciones se colocaron en las trampas aproximadamente 200 moscas de 1-2 días de vida. Se les proveyó de abundante pasta de levadura fresca en placas de agar con jugo de manzana y se dejaron toda la noche. Para obtener mejor rendimiento en la puesta de huevos se cambiaron las placas frecuentemente en el día previo al experimento mediante golpes suaves contra el fondo de la red metálica para bajar las moscas y realizar el rápido reemplazo de la placa vieja por una nueva. El reemplazo frecuente de las placas sirve para mantener las moscas bien alimentadas y acostumbradas a los golpeteos contra el fondo de la trampa. Se rebalsó la placa con agua utilizando una piseta y se rastrillo el fondo suavemente con un pincel para levantar la mayor cantidad de embriones. Luego se vertió agua en una canasta de recolección. Es importante evitar remover demasiada levadura del centro de la placa con el flujo de agua ya que puede tapar la tela de la canasta. Se lavó tres veces sumergiendo la canasta en agua corriente.

### 2.6.3 Decorionación

Si bien el corion<sup>1</sup> puede ser ópticamente invisibilizado mediante la inmersión en el aceite halocarbonado Voltalef 10S, es suficientemente duro como para romper frecuentemente la punta de las agujas de microinyección. Es por eso que los embriones se trataron durante tres minutos con una solución de lavandina 50% hasta que los apéndices dorsales desaparecieron, indicando la remoción del corion. Con una pipeta pasteur se mantuvo un recambio frecuente de la solución para que todos los embriones se decorionen de manera uniforme. Se utilizó lavandina de la marca Ayudín doble rendimiento con un contenido de 58g de hipoclorito de sodio por litro.

Inmediatamente después de terminada la decorionación, los embriones se lavaron con una solución de NaCl al 0,6% con un 0,02% de Triton X-100 para eliminar el hipoclorito de sodio. Los embriones decorionados son moderadamente higroscópicos por lo que varios pueden quedar pegados a la parte plástica de la canasta, para evitar esto hay que realizar el llenado de la canasta con extremo cuidado y de ser necesario se pueden rescatar al final de este paso con un pincel. Finalmente, los embriones decorionados se transfirieron de la seda a una placa de jugo de manzana fresca sin levadura.

### 2.6.4 Alineamiento

Se transfirió un grupo de embriones (100-200) a una almohadilla de agarosa al 3% (5x10x2mm). Se utilizó un pincel con un solo pelo para alinear los embriones en el borde de la almohadilla. El alineamiento se realizó bajo una lupa. La agarosa se humedeció para que la tensión superficial del agar húmedo mantenga a los embriones quietos en el lugar de manera que pueden ser fácilmente orientados con respecto a dorsal/ventral y anterior/posterior. Los embriones se alinearon dejando un espacio entre ellos de al menos un diámetro de embrión. Se orientaron con el polo posterior hacia la izquierda ya que es más conveniente para su inyección y por razones inherentes al experimento. La

---

<sup>1</sup> El embrión posee una capa o cáscara rígida externa llamada corion, la cual presenta dos proyecciones características (orejitas) en la zona antero-dorsal: apéndices dorsales, los cuales facilitarían el intercambio gaseoso con el medio ambiente y especialmente la difusión de oxígeno hacia el embrión durante la embriogénesis. Al eliminar el corion el embrión queda recubierto únicamente por la membrana vitelina.

localización del micrópilo<sup>2</sup> ayuda a orientarlos ya que se encuentra en el polo anterior del embrión. Se cortaron 3cm de cinta doble-faz transparente (3M VHB 4910 ancho 12mm), se pegó a un cubreobjetos y este se apoyó sobre los embriones del agar para levantarlos de manera que los polos posteriores queden apuntando hacia afuera de la cinta.

### 2.6.5 Desecación

Este procedimiento es necesario para disminuir la presión de turgencia en el embrión, ya que, en caso de no disminuirse, los embriones eyectan el citoplasma y vitelo cuando penetra la aguja. Se colocaron los embriones en un desecador con gel de sílice<sup>3</sup> durante 5 minutos. El tiempo de desecación se determinó empíricamente ya que depende de la temperatura y la humedad. Por último, se colocó una gota de Voltalef 10S (VWR) y se desparramó a lo largo de la línea de embriones. Los aceites halocarbonados previenen la desecación y, a la vez, son permeables al oxígeno. Por otro lado, el Voltalef 10S suprime la dispersión de la luz refractada por la cubierta vitelina.

## 2.7 Inyecciones

Se preparó la mezcla de inyección apropiada para la modificación deseada. Cuando se usó un sgRNA solo para generar InDels vía NHEJ, se usó una mezcla de inyección con 250ng/ $\mu$ L del vector pU6-BbsI-chiRNA. Para generar deleciones definidas se usaron 250ng/ $\mu$ L de cada vector pU6-BbsI-chiRNA. Se prepararon las mezclas de inyección en buffer de inyección

Las inyecciones deben ser realizadas antes de la celularización del blastodermo y de la formación de las células polares a partir del plasma polar. Esto sucede aproximadamente 60 minutos luego de la puesta (a 25°C) o unos 75 minutos (a 18°C). Esta última temperatura se usó para expandir la ventana de tiempo disponible para inyectar.

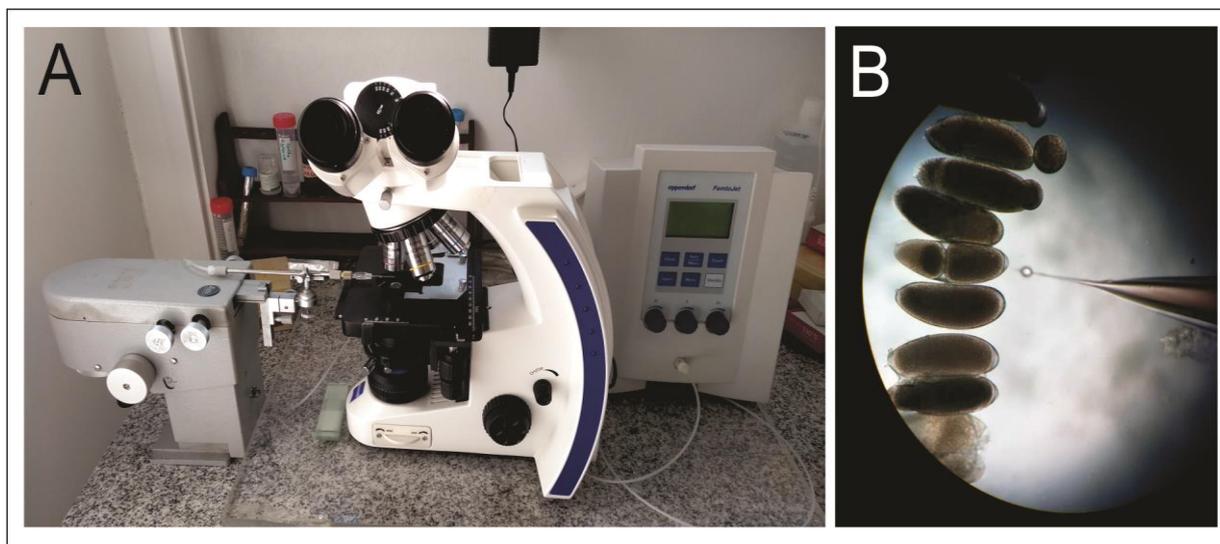
Se inyectaron los embriones usando un microinyector FemtoJet 5247 (Eppendorf) y un microscopio (Carl Zeiss) equipado con micromanipulador (Leitz) (Figura 11). Como

---

<sup>2</sup> El micrópilo es el único sitio por donde el espermatozoide puede entrar al huevo. Es un túnel en el corión (cáscara del huevo) localizado en la futura región dorsal-anterior. El micrópilo permite que pase un solo espermatozoide por vez y probablemente evita la polispermia.

<sup>3</sup> A pesar de su nombre el gel de sílice es un sólido. Su gran porosidad le permite reducir la humedad en espacios cerrados hasta un 40%.

agujas de microinyección se utilizaron Femtotips® II (Eppendorf; diámetro:0,5µm) y Microloaders™(Eppendorf) para cargarlas con la mezcla de inyección.



**Figura 11.** **A.** Equipo de microinyección. De izquierda a derecha: micromanipulador, microscopio y microinyector. La aguja de microinyección se encuentra colocada. **B.** Campo de visión con aumento de 10x durante la microinyección de los embriones. Los mismos se encuentran decorionados, desecados y alineados con los polos posteriores hacia la derecha. La aguja presenta una gota descargada en el aceite por fuera del embrión para que se aprecie en comparación con el tamaño de los embriones.

Las inyecciones se realizaron con los siguientes parámetros: Presión de inyección (Pi):150hPa; Presión de compensación(Pc):50hPa; Tiempo de inyección(Ti):0,1seg.

Luego de las inyecciones se transfirieron los embriones a una placa de agar-jugo de manzana y pasta de levadura para permitir el desarrollo de las larvas. Después de 3–4 días se transfirieron las larvas a un vial con comida para completar su ciclo de vida hasta adultos.

## 2.8 Extracción de ADN genómico

### 2.8.1 A partir de embriones

Se colectaron embriones a las 24hs post inyección y se colocaron en tubos de PCR de 0,2ml. Se aspiraron 20µl de buffer de homogeneización y sin dispensarlo se machacó el embrión contra la pared del tubo con el tip. Luego si se descargó el buffer y se incubó a 37°C durante 30 minutos, seguido de 5 min a 95°C para inactivar la Proteinasa K.

Buffer de homogeneización de embriones: 10mM Tris-HCl (pH 8.2), 25mM NaCl, 1mM EDTA, 0.2% Triton-X100. Inmediatamente antes de usar añadir proteinasa K (stock 20µg/ml) para una concentración de 200µg/ml.

### 2.8.2 A partir de moscas individuales o patas

Se colocó una mosca en un tubo de PCR (0.2 ml) y se machacó durante 10 segundos con la punta de un tip para pipetas de 200 conteniendo 50µl de buffer SB, sin expeler el líquido (debido a que suficiente líquido se escapa por la punta del tip). Se incubó a 37°C durante 30min. Se inactivó la proteinasa K por calor a 95°C durante 3 minutos y se centrifugó a 13200 rpm por 5 minutos para precipitar la masa sólida resultante y separar el sobrenadante que se transfirió a un nuevo tubo. Se usó 1µl de la extracción en una reacción de PCR con un volumen final de 20µl.

En los casos en que se necesitó mantener vivo al individuo para proceder a cruces posteriores, la PCR se realizó a partir de una pata amputada del individuo a analizar. En estos casos el protocolo es el mismo que para mosca adultas salvo que se utilizaron 10µl de buffer SB.

Buffer de homogeneización de moscas adultas o Squishing Buffer (SB): 10mM Tris-HCl pH8; 1 mM EDTA; 25mM NaCl; 200µg/ml Proteinasa K.

## 2.9 Búsqueda por PCR de moscas mutantes

Para determinar la edición genómica (InDels) se diseñaron primers específicos para generar un producto de amplificación del locus mutado que difiere en tamaño al obtenido a partir del locus WT ([Figura S2](#)). Las condiciones de PCR utilizadas fueron 94°C 3min; (94°C 30seg+51°C 1min+72°C 1min)x40 ciclos; 72°C 5min; 4°C HOLD. La mezcla de reacción fue la siguiente:

Molde ADN	1µl
Primer Fw (10µM)	1µl
Primer Rv (10µM)	1µl
Buffer Pegasus (10X; PB-L)	2µl
MgCl (50µM)	0,9µl

dNTPs (10µM)	1µl
DNA Pol Pegasus (5U/µl; PB-L)	0,4µl
H <sub>2</sub> O	13,2 µl

**Tabla 7.** Mezcla de PCR para amplificar un fragmento de me31B.

La **Figura 12** muestra a modo de ejemplo el caso específico de la búsqueda de la deleción F+1. Se utilizaron los primers Me31BY323A-Fw (en azul) y Me31B-Screen-Rv (en amarillo).



**Figura 12.** Fragmento genómico de *Drosophila melanogaster* que abarca una parte del gen me31B utilizada para la búsqueda de la deleción F+1. Se muestra con triángulos (▼) los sitios de corte teóricos de Cas9 para el sitio blanco Me31B-FCRISPR (en verde) y Me31B-1CRISPR (en violeta). En azul y amarillo se indican los primers forward y reverse respectivamente. Utilizando estos primers se espera un producto de amplificación por PCR de 680pb o 351pb según el gen tenga o no la deleción F+1. En gris se muestran los PAMs.

## 2.10 Cruzas de moscas nos-cas9

Con las moscas nos-cas9 adultas nacidas a partir de inyecciones con los plásmidos para la deleción F+1 se realizaron las siguientes cuatro cruzas.

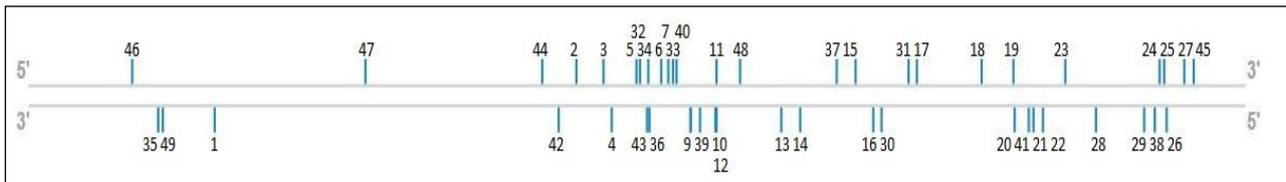
Cruza	Machos	Hembra
1	3 WT	1 inyectado nos-cas9
2	3 WT	1 inyectada nos-cas9
3	1 inyectado nos-cas9	3 vírgenes WT
4	3 inyectados nos-cas9	1 inyectada nos-cas9

**Tabla 8.** Cruzas realizadas con moscas nos-cas9 nacidas a partir de embriones inyectados con los plásmidos pU6 Me31B-FCRISPR y Me31B-1CRISPR para generar la deleción F+1.

### **3. RESULTADOS**

### 3.1 Selección y diseño de sitios blanco para *me31B*

El análisis de la secuencia de *me31b* mediante la herramienta CRISPR *Optimal Target Finder* encontró 49 posibles sitios blanco (Figura 13). La búsqueda estaba restringida a las secuencias que comiencen con una G ya que tiene la función de aumentar la eficiencia de transcripción a partir del promotor U6.



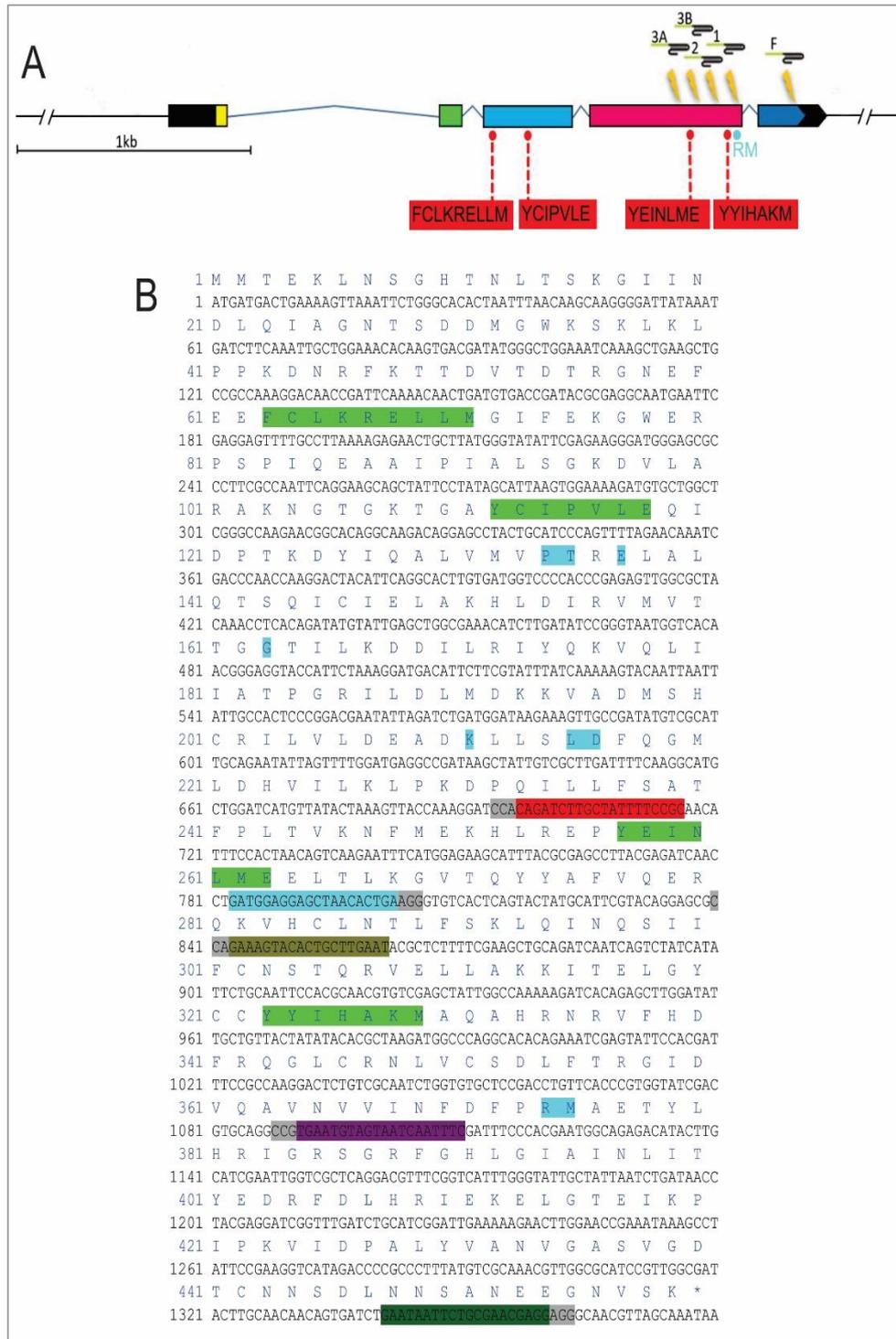
**Figura 13.** Disposición de los sitios blanco obtenidos con CRISPR *Optimal Target Finder* en un esquema de la secuencia genómica correspondiente a *me31B* y numerados del mejor (1) al peor (49) según los parámetros que evalúa. Se seleccionaron el 16, 17, 22 y 27.

En la Tabla 9 se detallan los sitios blanco predichos de acuerdo a la herramienta bioinformática. Se eligieron blancos para CRISPR-Cas9 que generen proteínas truncadas que pierden los sitios putativos de interacción con eIF4E (Figura 14).

Se continuó el trabajo con los siguientes sitios: F-CRISPR (sitio 27), 1-CRISPR (sitio 22), 3A-CRISPR (sitio 16) y 3B-CRISPR (sitio 17). Paralelamente se diseñó un sitio adicional (de forma manual), 2-CRISPR. A cada uno se le asignó un color que lo representará a lo largo de todo el trabajo de tesis (Figura 15).

N°	Secuencia	Hebra	Cromosoma	Comienzo	Final	OTs
1	GTTGCTAAAATACAGATCTTCGG	-	2L	10239765	10239779	0
2	GAGTTTGCCGACAAATCAATCGG	+	2L	10240602	10240616	0
3	GTATTGCCATTGCCTTACTCAGG	+	2L	10240666	10240680	0
4	GAATTCATTGCCTCGCGTATCGG	-	2L	10240687	10240701	0
5	GCTTATGGGTATATTCGAGAAGG	+	2L	10240744	10240758	0
6	GCTATTCCTATAGCATTAAAGTGG	+	2L	10240799	10240813	0
7	GTGGAAAAGATGTGCTGGCTCGG	+	2L	10240818	10240832	0
8	GGTCGATTTGTTCTAAAACCTGGG	-	2L	10240871	10240885	0
9	GGGTCGATTTGTTCTAAAACCTGG	-	2L	10240872	10240886	0
10	GTAGCGCCAACTCTCGGGTGGGG	-	2L	10240928	10240942	0
11	GATGGTCCCCACCCGAGAGTTGG	+	2L	10240930	10240944	0
12	GGTTTGTAGCGCCAACTCTCGGG	-	2L	10240933	10240947	0
13	GTTGCAATTAACCGATATTAGG	-	2L	10241084	10241098	0
14	GCAATAATTAATTGACTGCAGG	-	2L	10241126	10241140	0
15	GCTTGATTTTCAAGGCATGCTGG	+	2L	10241253	10241267	0
16	GCGGAAAATAGCAAGATCTGTGG	-	2L	10241297	10241311	0
17	GATGGAGGAGCTAACACTGAAGG	+	2L	10241394	10241408	0
18	GCCAAAAGATCACAGAGCTTGG	+	2L	10241545	10241559	0
19	GTATTCCACGATTTCCGCCAAGG	+	2L	10241620	10241634	0
20	GATTGCGACAGATCCTTGGCGG	-	2L	10241626	10241640	0
21	GGCCTGCACGTCGATACCACGGG	-	2L	10241670	10241684	0
22	GAAATTGATTACTACATTCACGG	-	2L	10241691	10241705	0
23	GAGACATACTTGCATCGAATTGG	+	2L	10241740	10241754	0
24	GCCCTTTATGTGCGCAAACGTTGG	+	2L	10241958	10241972	0
25	GCAAACGTTGGCGCATCCGTTGG	+	2L	10241970	10241984	0
26	GTTGTTGCAAGTATCGCCAACGG	-	2L	10241978	10241992	0
27	GAATAATTCTGCGAACCAGGAGG	+	2L	10242017	10242031	0
28	GAGAAACGAAGATTGTAATAGG	-	2L	10241815	10241829	1
29	GGGTCTATGACCTTCGGAATAGG	-	2L	10241926	10241940	1
30	GACTGTTAGTGGAATGTTGCGG	-	2L	10241316	10241330	1
31	GCCTTACGAGATCAACCTGATGG	+	2L	10241376	10241390	1
32	GGGTATATTCGAGAAGGGATGGG	+	2L	10240750	10240764	1
33	GTGCTGGCTCGGGCCAAGAACGG	+	2L	10240829	10240843	1
34	GGAGCGCCCTTCGCCAATTCAGG	+	2L	10240771	10240785	1
35	GTTTGTGGGACACCAAGCTTGG	-	2L	10239633	10239647	1
36	GGAATAGCTGCTTCTGAATTGG	-	2L	10240776	10240790	1
37	GCATTGCAGAATATTAGTTTTGG	+	2L	10241208	10241222	1
38	GCCAACGTTTGCGACATAAAGGG	-	2L	10241951	10241965	2
39	GCCTGAATGTAGTCCTTGGTTGG	-	2L	10240893	10240907	2
40	GCTCGGGCCAAGAACGGCACAGG	+	2L	10240835	10240849	2
41	GATACCACGGGTGAACAGGTCGG	-	2L	10241658	10241672	2
42	GTTTTGAATCGGTTGTCCTTTGG	-	2L	10240565	10240579	2
43	GCTGCTTCTGAATTGGCGAAGG	-	2L	10240770	10240784	2
44	GGAAACACAAGTGACGATATGGG	+	2L	10240525	10240539	2
45	GGCAACGTTAGCAAATAAACCGG	+	2L	10242039	10242053	3
46	GCACACTAATTTAACAAGCAAGG	+	2L	10239570	10239584	3
47	GCGCCATGAACAGTTATTCGTGG	+	2L	10240114	10240128	3
48	GGCGAAACATCTTGATATCCGGG	+	2L	10240984	10240998	3
49	GCATGCATATTATGTTTGTGGG	-	2L	10239646	10239660	7

**Tabla 9.** Sitios blanco para me31B obtenidos mediante la búsqueda con la herramienta CRISPR Optimal Target Finder. Se encuentran ordenados de mejor a peor según la herramienta. Se indica si la hebra con la que se aparea el sgRNA es la codificante (+) o la no codificante o molde (-). Además, se indica el cromosoma en el que se encuentra el target, el inicio, final y número de OTs.



**Figura 14. A.** Esquema que muestra la disposición de los exones e intrones del gen de *me31B* de *D. melanogaster* y los sitios a los cuales se encuentran dirigidos los cortes con CRISPR/Cas9 para generar formas truncadas de la proteína. Los exones corresponden a las cajas de colores. En las cajas negras figuran las regiones no traducidas del gen. Los sitios de corte (rayos) fueron diseñados para cortar en el exón 4 y en el final del exón 5. Los puntos rojos indican los posibles sitios de interacción con eIF4E. El punto celeste indica otro posible sitio de interacción según una predicción de acoplamiento proteína-proteína entre las estructuras 3D de *Me31B* y eIF4E. **B.** Secuencia nucleotídica del ORF de *me31B* (letras negras) alineadas con la secuencia proteica (en azul) en el que se muestran los sitios blanco para CRISPR/Cas9 con sus respectivos colores. Se indican los posibles sitios de interacción de *Me31B* con eIF4E según alineamiento múltiple (en verde) o según docking (celeste). En gris se muestran los PAMs.

<p><b>F-CRISPR</b> (sitio número 27) para deletionar al final de la proteína, de modo que combinándolo con otros cortes se produzcan deleciones.</p> <p><b>GAATAATTCTGCGAACGAGGAGG</b> PAM</p> <p>Oligo Sentido: CTTCGAATAATTCTGCGAACGAGG Oligo Antisentido: AAACCCTCGTTCGCAGAATTATTC</p> <p>5' - CTTCGAATAATTCTGCGAACGAGG - 3' 3' - CTTATTAAGACGCTTGCTCCAAA - 5'</p>	<p><b>1-CRISPR</b> (sitio número 22) para combinarlo con F-CRISPR y dejar fuera el posible sitio de interacción con eIF4E según docking.</p> <p><b>GAAATTGATTACTACATTCA</b>CGG PAM</p> <p>Oligo Sentido: CTTCGAAATTGATTACTACATTCA Oligo Antisentido: AAAGTGAATGTAGTAATCAATTC</p> <p>5' - CTTCGAAATTGATTACTACATTCA - 3' 3' - CTTTAACTAATGATGTAAGTCAA - 5'</p>																																																																					
<p><b>3A-CRISPR</b> (sitio número 16) combinado con F-CRISPR dejará afuera el sitio YEINMLE.</p> <p><b>GCGGAAAATAGCAAGATCTGTGG</b> PAM</p> <p>Oligo Sentido: CTTGCGGAAAATAGCAAGATCTG Oligo Antisentido: AAACCAGATCTTGCTATTTCCGC</p> <p>5' - CTTGCGGAAAATAGCAAGATCTG - 3' 3' - CGCCTTTTATCGTTCTAGACAAA - 5'</p>	<p><b>3B-CRISPR</b> (sitio número 17) en combinación con F-CRISPR elimina el sitio de interacción YYIHAKM.</p> <p><b>GATGGAGGAGCTAACACTGA</b>AGG PAM</p> <p>Oligo Sentido: CTTGATGGAGGAGCTAACACTGA Oligo Antisentido: AAAGTCAAGTGTAGCTCCTCCATC</p> <p>5' - CTTGATGGAGGAGCTAACACTGA - 3' 3' - CTACCTCCTCGATTGTGACTCAA - 5'</p>																																																																					
<p><b>2-CRISPR:</b> adicionalmente se realizó la búsqueda manual de un sitio blanco que elimine el dominio YYIHAKM, este en particular no inicia con una G.</p> <p><b>ATTCAAGCAGTGTACTTTCTGG</b> PAM</p> <p>Este sitio fue seleccionado a través de una búsqueda manual ya que la herramienta online no considera como blancos las secuencias que no comiencen con una G. La G se agregó en el extremo 5' (G subrayada). Posee un OT en el cromosoma X, en verde se muestran los nucleótidos que coinciden con el target y en rojo los que no.</p>																																																																						
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th colspan="20">Secuencia</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Me31B-2</td> <td>T</td><td>A</td><td>T</td><td>T</td><td>C</td><td>A</td><td>A</td><td>G</td><td>C</td><td>A</td><td>G</td><td>T</td><td>G</td><td>T</td><td>A</td><td>C</td><td>T</td><td>T</td><td>T</td><td>C</td><td>T</td><td>G</td><td>G</td> </tr> <tr> <td>Off-target</td> <td>A</td><td>G</td><td>A</td><td>A</td><td>G</td><td>G</td><td>T</td><td>G</td><td>C</td><td>A</td><td>G</td><td>T</td><td>G</td><td>T</td><td>A</td><td>C</td><td>T</td><td>T</td><td>T</td><td>C</td><td>T</td><td>G</td><td>G</td> </tr> </tbody> </table>			Secuencia																				Me31B-2	T	A	T	T	C	A	A	G	C	A	G	T	G	T	A	C	T	T	T	C	T	G	G	Off-target	A	G	A	A	G	G	T	G	C	A	G	T	G	T	A	C	T	T	T	C	T	G	G
	Secuencia																																																																					
Me31B-2	T	A	T	T	C	A	A	G	C	A	G	T	G	T	A	C	T	T	T	C	T	G	G																																															
Off-target	A	G	A	A	G	G	T	G	C	A	G	T	G	T	A	C	T	T	T	C	T	G	G																																															

**Figura 15.** Sitios blanco elegidos para realizar CRISPR/Cas9 en me31B. En cada recuadro se indica para cada sitio el número de la figura 13 con el que se correlaciona, los sitios con los que serán combinados para generar deleciones, su secuencia resaltada con un color asociado que se mantendrá a lo largo del trabajo para un mejor entendimiento. Debajo de cada sitio se muestran los oligonucleótidos utilizados para cada caso, así como la disposición del inserto que se clonará en el plásmido pU6-BbsI-chiRNA.

Con el fin de confirmar los datos obtenidos con CRISPR Optimal Target Finder se realizó la búsqueda de sitios blancos con el software: CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>) que brindó la siguiente información adicional de los sitios blanco (Tabla 10):

1. %GC: corresponde al porcentaje de guanina y citosina que contiene la secuencia de 20nt. Reportes previos sugieren que las secuencias de sgRNA con contenido de GC muy alto o muy bajo fueron poco efectivas en células humanas (Wang et al. 2014).

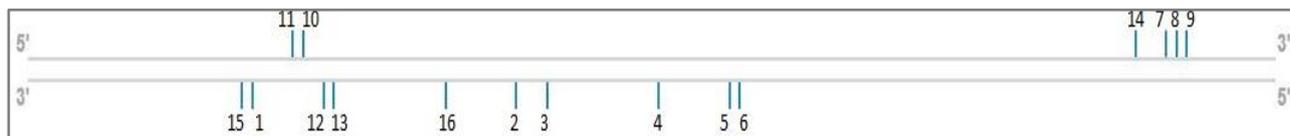
2. Tm (temperatura de melting): temperatura en la cual la mitad del ADN se encuentra en forma de simple cadena.
3. TTTT indica la presencia o ausencia de cuatro timinas (T) en nuestro sgRNA y la relevancia de este dato radica en que esta secuencia TTTT causa la terminación de la transcripción por la Pol III (el vector pU6-BbsI-chiRNA utiliza un promotor de Pol III para transcribir el sgRNA por lo que es importante evitar los cuádruplex de T).
4. 20-mer indica las coincidencias perfectas de los 20 nucleótidos de nuestra secuencia contra el genoma de referencia elegido. Un número 1 en esta sección es lo ideal ya que indica que esos 20nt son únicos en el genoma. Un 20-mer igual a 0 (cero) no es conveniente ya que significa que la secuencia no tiene coincidencia en el genoma, estas secuencias podrían estar ubicadas en zonas de unión exón-exón y deben ser evitadas.
5. 12-mer se refiere a las coincidencias con el genoma de referencia de los 12 nucleótidos más cercanos a la región 3' (adyacentes al PAM), conocida como región semilla ya que contiene los residuos críticos para la especificidad.
6. 8-mer también indica las coincidencias con el genoma, pero solo de los 8nt más cercanos al PAM por lo que contiene residuos incluso más críticos para la especificidad.

Nombre	Secuencia Blanco	%GC	Tm (°C)	TTTT	20mer	12mer	8mer
<b>3A-CRISPR</b>	CCACAGATCTTGCTATTTTCCGC	45	68.33	-	1	1	227
<b>3B-CRISPR</b>	GATGGAGGAGCTAACACTGAAGG	50	72.28	-	1	1	138
<b>2-CRISPR</b>	CCAGAAAGTACACTGCTTGAAT	35	64.16	-	1	2	137
<b>1-CRISPR</b>	CCGTGAATGTAGTAATCAATTC	25	57.59	-	1	1	150
<b>F-CRISPR</b>	GAATAATTCTGCGAACGAGGAGG	45	67.30	-	1	1	277

**Tabla 10.** Sitios blanco contra me31B obtenidos mediante la búsqueda con la herramienta CRISPRdirect. Se muestra información como el contenido de GC, temperatura de melting, presencia o ausencia de TTTT, número de off-target en los 20mer, 12mer, 8mer.

### 3.2 Selección y diseño de sitios blanco para sORF-7

Se encontraron 16 posibles sitios blanco (Figura 16 y Tabla 11) con CRISPR Optimal Target Finder en la secuencia correspondiente al sORF-7.



**Figura 16.** Disposición de los sitios blanco obtenidos con CRISPR Optimal Target Finder para la secuencia genómica correspondiente al sORF-7 y numerados del mejor (1) al peor (16) según los parámetros que evalúa. Se seleccionaron el 1 y el 16.

N°	Secuencia	Cadena	Cromosoma	Comienzo	Final	OTs
1	<b>AAGGAGCCCAAATGGGATCAAGG</b>	-	X	6236447	6236461	0
2	GGCACTCGGATATCAGCTGGCGG	-	X	6236473	6236487	0
3	ATGGGCACTCGGATATCAGCTGG	-	X	6236476	6236490	0
4	GATGATCGCTTATGGGCACTCGG	-	X	6236487	6236501	0
5	TGATGATGATGATCGCTTATGGG	-	X	6236494	6236508	0
6	ATGATGATGATGATCGCTTATGG	-	X	6236495	6236509	0
7	TTATATAATTCGCAATTCGGCGG	+	X	6236534	6236548	0
8	TATATAATTCGCAATTCGGCGGG	+	X	6236535	6236549	0
9	<b>ATATAATTCGCAATTCGGCGGG</b>	+	X	6236536	6236550	0
10	GGACGCCCTTGATCCCATTGGG	+	X	6236449	6236463	1
11	CGGACGCCCTTGATCCCATTGG	+	X	6236448	6236462	1
12	GCGGCAAAGGAGCCCAAATGGG	-	X	6236454	6236468	1
13	GGCGGCAAAGGAGCCCAAATGG	-	X	6236455	6236469	2
14	TCGTTATATAATTCGCAATTCGG	+	X	6236531	6236545	2
15	AGGAGCCCAAATGGGATCAAGGG	-	X	6236446	6236460	2
16	GGATATCAGCTGGCGGCAAAGG	-	X	6236466	6236480	6

**Tabla 11.** Sitios blanco para sORF-7 obtenidos mediante la búsqueda con la herramienta CRISPR Optimal Target Finder numerados del mejor (1) al peor (16) según los parámetros que evalúa. Se seleccionaron el 1 y el 9 para dirigir CRISPR/Cas9. Se indica con que cadena se aparea el sgRNA, "+" si la hebra que se aparea con el sgRNA es la hebra codificante y "-" en el caso contrario donde el sgRNA se aparea con la hebra no codificante o molde. El cromosoma en el que se encuentra, el número de off-targets, el nucleótido en el que comienza y termina la secuencia target. Los sitios elegidos para realizar CRISPR se encuentran resaltados en rosa y verde con los PAMs en gris.

Se eligieron dos sitios (Figura 17): uno cercano al ATG que marca el supuesto inicio de traducción y otro a un ATG intermedio que también puede ser un sitio alternativo de inicio de traducción. La Figura 18 muestra la traducción automática del sORF-7 donde se resaltan los sitios blanco en la secuencia nucleotídica.

<p>• sORF7-1CRISPR:</p> <p><b>ATATAATTCGCAATTCGGCGGGG</b> PAM</p> <p>Oligo Sentido: CTTCGATATAATTCGCAATTCGGCG Oligo Antisentido: AAACCGCCGAATTGCGAATTATATC</p> <p>5' - <b>CTTC</b>GATATAATTCGCAATTCGGCG - 3' 3' - <b>C</b>TATATTAAGCGTTAAGCCG<b>C</b>AAA - 5'</p>	<p>• sORF7-2CRISPR:</p> <p><b>AAGGAGCCCAAATGGGATCAAGG</b> PAM</p> <p>Oligo Sentido: CTTCGAAGGAGCCCAAATGGGATCA Oligo Antisentido: AAACCTGATCCCATTGGGCTCCTTC</p> <p>5' - <b>CTTC</b>GAAGGAGCCCAAATGGGATCA - 3' 3' - <b>C</b>TTCCTCGGGTTTACCCTAGT<b>C</b>AAA - 5'</p>
---	--

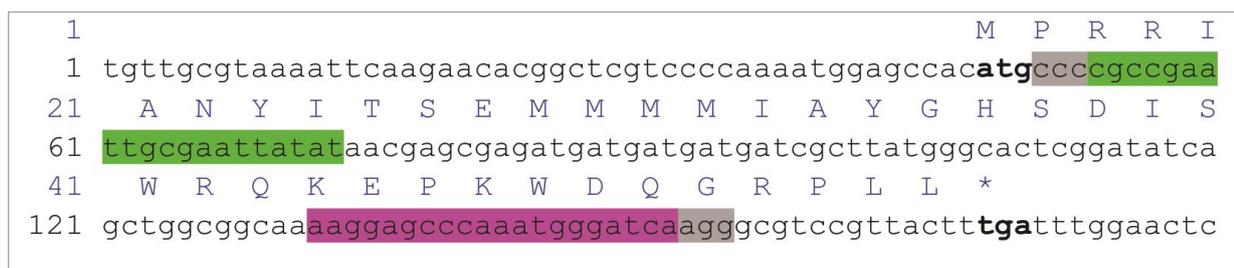


Figura 17. Sitios blanco elegidos para realizar CRISPR/Cas9 en sORF-7.

Figura 18. Secuencia nucleotídica (en letras negras) y proteica (letras azules) del sORF-7 en el que se muestran los dos sitios blanco 1 y 2 para CRISPR-Cas9 marcados en verde y rosa respectivamente. En gris se muestran los PAMs.

La búsqueda en CRISPR direct (Tabla 12) arrojó información adicional sobre los sitios blanco seleccionados. Ambos se encuentran entre los más específicos de la lista, cuentan con %GC y Tm adecuados. No tienen OTs en 20mer ni en 12mer. Tampoco tienen tetranucleótidos de timina que podrían detener la transcripción del sgRNA por la pol

Hebra	Secuencia Blanco	GC (%)	Tm (°C)	TTTT	20mer	12mer	8mer
-	<b>CCTTGATCCCATTGGGCTCCTT</b>	50	74.57	-	1	1	140
+	<b>ATATAATTCGCAATTCGGCGGGG</b>	40	66.42	-	1	1	169

III.

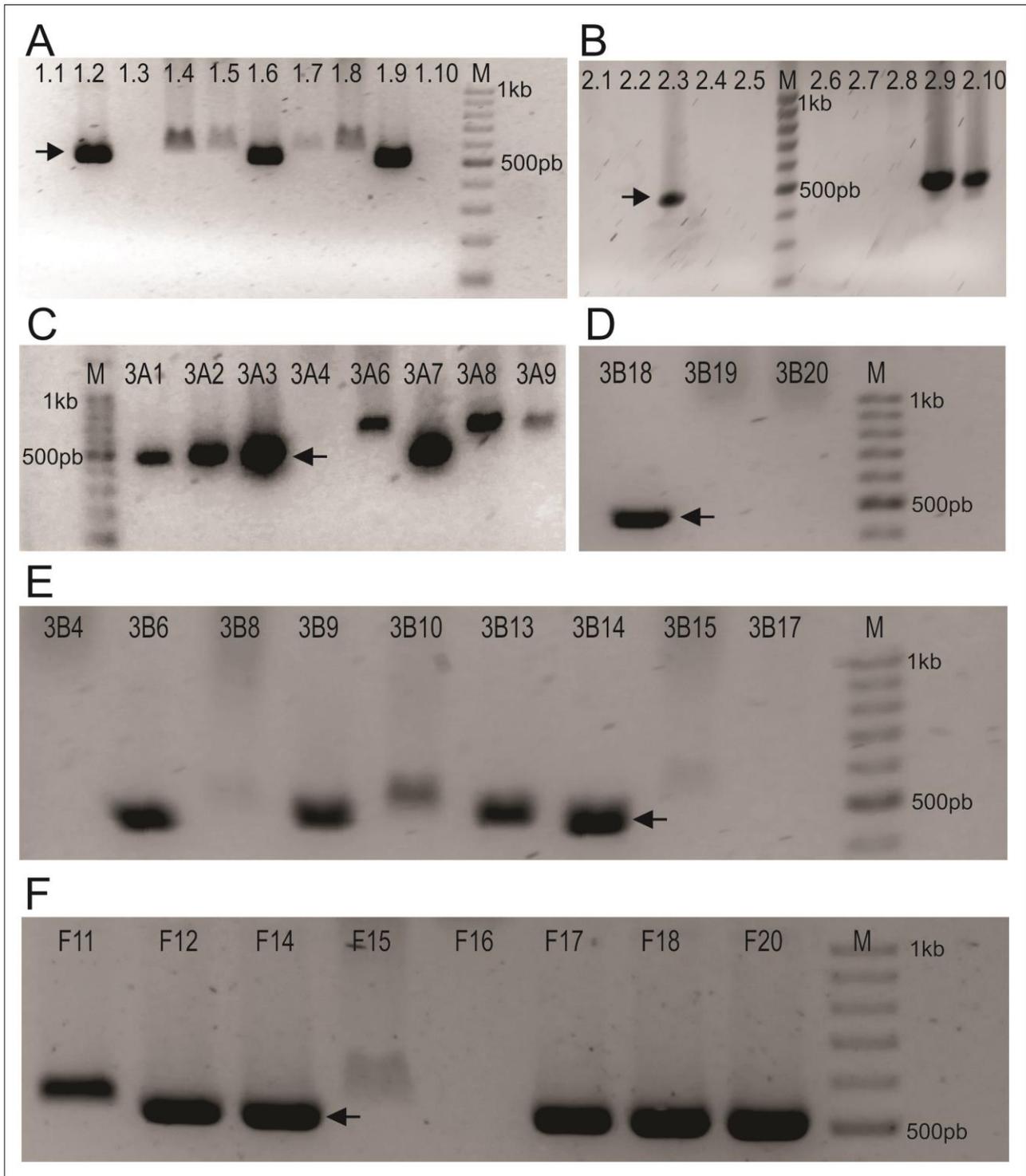
Tabla 12. Sitios blanco para sORF-7 analizados mediante la herramienta CRISPRdirect.

### 3.3 Screening de los clones

#### 3.3.1 Screening de clones para *me31B*

Los resultados obtenidos del screening por PCR de los clones de *me31B* en pU6-BbsI-chiRNA se muestran en la [Figura 19](#). Un resultado positivo corresponde a la amplificación de un fragmento de 500pb. Se obtuvieron resultados positivos para todos los sitios blanco seleccionados. Para F-CRISPR los clones positivos fueron: F.11; F.12; F.14; F.17; F.18; F.20. Para 1-CRISPR: 1.2; 1.6; 1.9; 2.3; 2.9; 2.10. Para 2-CRISPR: 2.3; 2.9; 2.10. Para 3A-CRISPR: 3A.1; 3A.2; 3A.3; 3A.7. Para 3B-CRISPR: 3B.6; 3B.9; 3B.13; 3B.14; 3B.18.

Los clones positivos se secuenciaron para verificar la ausencia de mutaciones (Macrogen Inc., Corea del Sur). Los clones 1.3 y 1.4 se enviaron para controlar que los negativos por PCR sean también negativos en la secuenciación. El clon 3A8 se envió a secuenciar para comprobar la calidad de clonación de un resultado dudoso en la PCR ya que el fragmento correspondía a un peso molecular mayor que el esperado, dada su movilidad respecto al fragmento de marcador de 500pb.

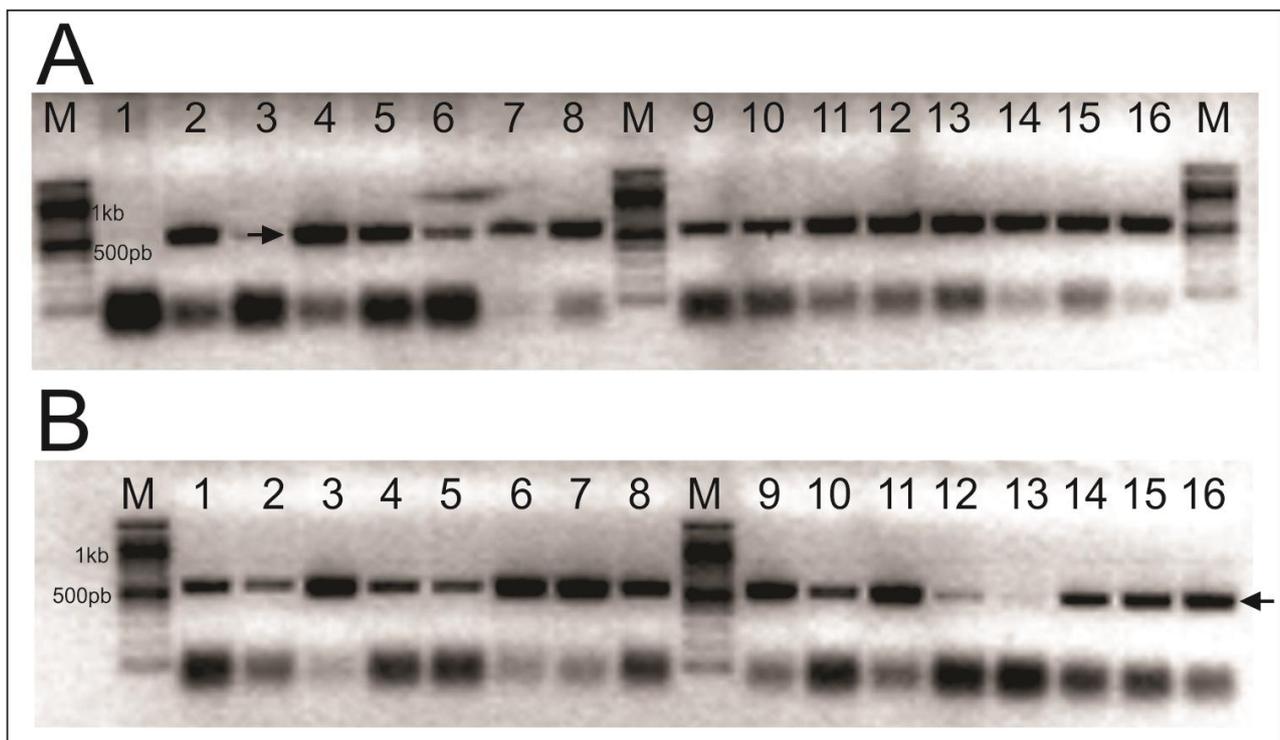


**Figura 19.** Screening por PCR de los clones CRISPR contra *me31B*. **A:** CRISPR-1; **B:** CRISPR-2; **C-D:** CRISPR-3A; **E:** CRISPR-3B; **F:** CRISPR-F. Clones positivos: F.11; F.12; F.14; F.17; F.18; F.20; 1.2; 1.6; 1.9; 2.3; 2.9; 2.10; 3A.1; 3A.2; 3A.3; 3A.7; 3B.6; 3B.9; 3B.13; 3B.14; 3B.18. En las calles M se sembró el marcador de peso molecular de 100pb (PB-L). Se indican los fragmentos de ADN de 500pb y 1kb. En cada gel se marca con una flecha alguno de los fragmentos de 500pb indicativos de la presencia del inserto.

### 3.3.2 Screening de clones para sORF-7

Los resultados obtenidos del screening por PCR de los clones de sORF-7 en pU6-BbsI-chiRNA se muestran en la [Figura 20](#). Se obtuvieron resultados positivos para ambos sitios blanco seleccionados. Para el sitio 1 (sORF-7-1) se obtuvieron 14 clones positivos: 7-1-2, 7-1-4, 7-1-5, 7-1-6, 7-1-7, 7-1-8, 7-1-9, 7-1-10, 7-1-11, 7-1-12, 7-1-13, 7-1-14, 7-1-15, 7-1-16. Para el sitio 2 (sORF-7-2) se obtuvieron 15 clones positivos: 7-2-1, 7-2-2, 7-2-3, 7-2-4, 7-2-5, 7-2-6, 7-2-7, 7-2-8, 7-2-9, 7-2-10, 7-2-11, 7-2-12, 7-2-14, 7-2-15, 7-2-16.

Se realizó la secuenciación (Macrogen Inc.) de tres clones para cada sitio: 7-1-14, 7-1-15, 7-1-16, 7-2-14, 7-2-15, 7-2-16.



**Figura 20.** Screening por PCR de los clones contra sORF-7. **A:** Clones positivos para sORF-7.1: 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16. **B:** Clones positivos para sORF-7.2: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16. En las calles M se sembró el marcador de peso molecular de 100pb (NEB). Se indican los fragmentos de 500pb y 1kb. En cada gel se marca con una flecha alguno de los fragmentos con el peso indicativo de la presencia del inserto.

### 3.4 Secuenciación de clones

#### 3.4.1 Secuenciación de clones para *me31B*

Los resultados de la secuenciación se resumen en la [Tabla 13](#). Mediante la secuenciación se confirmó que todos los clones positivos en la PCR contienen el inserto correcto en la posición adecuada y sin mutaciones respecto al original.

Clon	Secuenciación	Clon	Secuenciación
F.11	-	2.3	✓
F.12	✓	2.9	✓
F.14	✓	2.10	✓
F.17	✓	3A.1	✓
F.18	✓	3A.2	✓
F.20	✓	3A.3	✓
1.2	✓	3A.7	✓
1.3	×	3A.8	×
1.4	×	3B.13	✓
1.6	✓	3B.14	✓
1.9	✓	3B.18	✓

**Tabla 13.** Resultados de secuenciación de los clones para *me31B*. Con un (✓) se muestran los que contienen el inserto correcto y con una cruz (×) los que no. Con un (-) se indica una secuenciación de mala calidad que no permitió definir si el clon contiene o no el inserto.

Los clones elegidos para realizar las microinyecciones fueron: 1.2; 2.3; 3A-13; 3B.14; F.12 ([Figura S5](#)). Los plásmidos fueron amplificados y purificados como se describe en la sección materiales y métodos obteniendo las siguientes concentraciones de los plásmidos.

Plásmido	Concentración
pU6-Me31B-1.2	640ng/μl
pU6-Me31B-2.3	916ng/μl
pU6-Me31B-3A.1	810ng/μl
pU6-Me31B-3B.14	555ng/μl
pU6-Me31B-F.12	614ng/μl

**Tabla 14.** Cuantificación de los plásmidos pU6 contra *me31B*.

### 3.4.2 Secuenciación de clones para sORF-7

Se confirmó mediante secuenciación que todos los clones contienen el inserto deseado en la posición adecuada. Los resultados de la secuenciación se resumen en la [Tabla 15](#).

Clon	Secuenciación
7.1.14	✓
7.1.15	✓
7.1.16	✓
7.2.14	✓
7.2.15	✓
7.2.16	✓

**Tabla 15.** Resultados de secuenciación de los clones para sORF-7. Con un tic (✓) se muestran los que contienen el inserto correcto.

Se eligieron los clones 7.1.14 y 7.2.14 para realizar las microinyecciones. Los mismos fueron amplificados y purificados como se describe en la sección materiales y métodos obteniendo las siguientes concentraciones de los plásmidos.

Plásmido	Concentración
pU6-sORF-7.1.14	0,79 µg/µl
pU6-sORF-7.2.14	1,30 µg/µl

**Tabla 16.** Cuantificación de los plásmidos pU6 contra sORF-7

## 3.5 Inyección de los plásmidos para Me31B

En la [Tabla 17](#) se muestran los resultados de las inyecciones con los plásmidos pU6 contra *me31B* en las moscas transgénicas *nos-cas9* (#54591) y *vasa-cas9* (#51323). De los 50 embriones *nos-cas9* inyectados con los pU6 para generar la delección F+1 se obtuvieron 8 adultos mientras que al inyectar los mismos plásmidos en *vasa-cas9* no se obtuvieron adultos. Con los adultos nacidos de embriones *nos-cas9* pudimos realizar búsquedas de la delección por PCR.

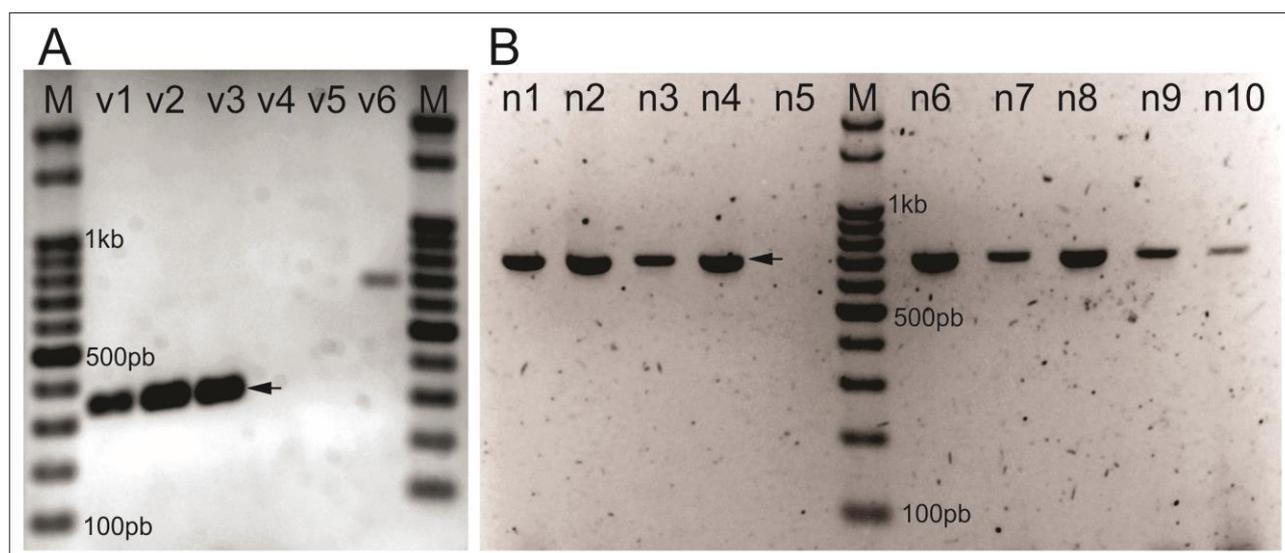
	<i>nos-cas9</i>	<i>vasa-cas9</i>
Plásmidos inyectados	pU6-Me31B-1.2 + pU6-Me31B-F.12	pU6-Me31B-1.2+ pU6-Me31B-F.12
Embriones inyectados	50	50
Adultos	8	0

**Tabla 17.** Resultado de las inyecciones con los pU6 contra *me31B*.

### 3.6 Búsqueda de la deleción F+1

#### 3.6.1 Búsqueda en embriones 24hs post-inyección

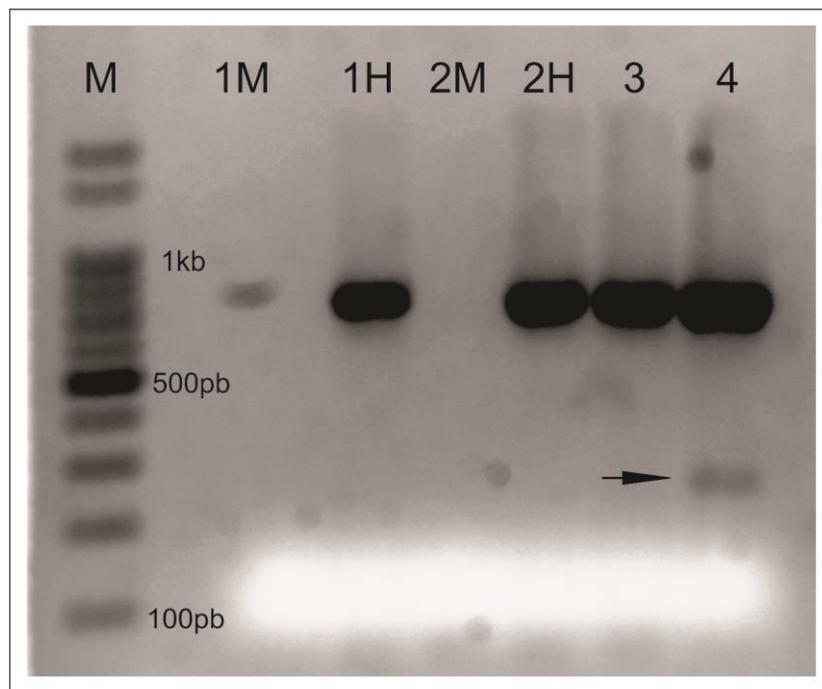
Se realizó una PCR a partir de embriones que habían sido inyectados con los pU6 para generar la deleción F+1. Los fragmentos de ADN de aproximadamente 700pb indican que el gen no posee deleción alguna mientras que un fragmento menor a 700pb muestra que se produjo deleción en el locus. A partir de 10 embriones *nos-cas9* tomados 24hs post-inyección, se obtuvieron fragmentos de 700pb producto de la amplificación del locus WT (Figura 21B). En las PCRs realizadas a partir de seis embriones *vasa-cas9* se obtuvieron fragmentos indicativos de la deleción en tres de los cinco embriones evaluados (Figura 21A). Esto sugiere que, en las condiciones experimentales descritas, la cepa *vasa-cas9* funcionó más eficientemente que la cepa *nos-cas9* para la generación de InDels.



**Figura 21.** Búsqueda de la deleción F+1 en embriones. **A.** Electroforesis de las PCRs realizadas a partir de 6 embriones *vasa-cas9* 24hs post-inyección con pU6-Me31B-1.2 + pU6-Me31B-F.12 (Calles 2 a 7). En las calles v1, v2, v3, v4, v5, v6 se sembraron los productos de las PCRs a partir de ADN de 6 embriones de *vasa* (*vasa1*, *vasa2*, *vasa3*, *vasa4*, *vasa5* y *vasa6* respectivamente). En las calles correspondientes a los embriones 1, 2 y 3 se observan fragmentos de ADN próximos a los 350pb correspondientes a la deleción. Los embriones número 4 y 5 no amplificaron mientras que a partir del embrión número 6 el fragmento obtenido fue de 700pb. En las calles v1, v2, v3, v4, v5, v6 se sembraron los productos de las PCRs a partir de ADN de 6 embriones de *vasa* (*vasa1*, *vasa2*, *vasa3*, *vasa4*, *vasa5* y *vasa6* respectivamente). En las calles indicadas con una M se sembraron marcadores moleculares de 100pb (PB-L). Con una flecha se indica uno de los fragmentos indicativos de la deleción. **B.** Electroforesis en agarosa 1% de las PCRs a partir de 10 embriones *nos-cas9* tomados 24hs post-inyección con pU6-Me31B-1.2 + pU6-Me31B-F.12 (Calles 1 a 5 y 6 a 11). 9 de 10 PCRs amplificaron fragmentos de 700pb. En la calle 5 no se observa amplificación. La M indica la calle correspondiente al marcador de 100pb. Con una flecha se indica uno de los fragmentos de 700pb producto de la amplificación del locus salvaje.

### 3.6.2 Búsqueda de la delección en moscas adultas

Con las moscas *nos-cas9* adultas nacidas a partir de embriones inyectados con los plásmidos para la delección F+1 se realizaron cruzas tal como se indica en la sección materiales y métodos. Para determinar la presencia de la delección F+1 (Figura 22) se realizó una PCR a partir de una pata amputada de adultos provenientes de la progenie de cada cruz. La progenie de la cruz 4 dio como resultado un fragmento de ADN con una movilidad electroforética correspondiente a un tamaño aproximado de 300pb de acuerdo a la referencia usada lo que indica la amplificación de la delección. Las PCRs realizadas a partir de la progenie hembra de la cruz 1, 2 y la progenie total de la cruz 4 generaron fragmentos de amplificación de 700pb. También se realizaron PCRs a partir de moscas individuales de la progenie de la cruz 4 (con el objetivo de balancear<sup>4</sup> la mutación) pero no se logró observar el fragmento de ADN característico de la delección F+1 nuevamente.



**Figura 22.** Búsqueda de la delección F+1 en moscas adultas. Electroforesis de las PCRs de ADN extraído de patas de la progenie de las cruces. 1M hace referencia a machos de la progenie de la cruz 1. 1H son las hembras de la progenie de la cruz 1. 2M son los machos de la progenie de la cruz 2. 2H son las hembras de la progenie de la cruz 2. 3 hace referencia a la progenie de la cruz 3 sin

<sup>4</sup>Utilizar un cromosoma balanceador para mantener la mutación en un stock heterocigota. Un cromosoma balanceador contiene múltiples inversiones que suprimen la recombinación entre homólogos y marcadores que son fácilmente detectables.

separar en machos y hembras. 4 hace referencia a la progenie de la cruce 4 sin separar en machos y hembras. La flecha indica el fragmento de aproximadamente 300pb característica de la delección F+1.

### 3.7 Inyección de los plásmidos para sORF-7

Se inyectaron embriones de las cepas *act5C-cas9* (#54590) y *nos-cas9* (#54591) con los plásmidos pU6-sORF-7-1-14 y pU6-sORF-7-2-14. Como control se inyectó el plásmido pU6-BbsI-chiRNA, el cual genera el tracrRNA sin el crRNA. En la [Tabla 18](#) se indica la suma de los resultados obtenidos a partir de cinco inyecciones independientes con cada uno de los plásmidos contra sORF-7 (pU6-sORF-7-1-14 y pU6-sORF-7-2-14) y dos inyecciones independientes con pU6-BbsI-chiRNA. La inyección de pU6-sORF7-1 resultó en un alto nivel de letalidad embrionaria (90%) en la cepa *act5c-cas9* mientras que en la cepa *nos-cas9* resultó en un 73% de letalidad. La letalidad fue medida como el número de embriones que no llegaban a completar su desarrollo y nacer del huevo con respecto al número total de embriones inyectados. Para la inyección de pU6-sORF7-2-14 la letalidad medida fue de 84% en *act5c-cas9* y 65% en *nos-cas9*. Las inyecciones con el plásmido control dieron una letalidad mucho menor, 15% y 22% en *act5c-cas9* y *nos-cas9* respectivamente, lo cual está en coincidencia con la letalidad basal del método debido a malas inyecciones. Si bien en estos experimentos no se comprobó la presencia de InDels, los resultados nos permiten hipotetizar: 1- La edición genómica en el locus putativo sORF-7 resulta en letalidad o bien es dominante o bien es producto de la edición simultánea de ambos complementos genómicos. 2- Dado que la mayor letalidad ocurre en la cepa que expresa de manera ubicua Cas9, la letalidad podría ser a nivel celular.

	pU6-sORF-7-1-14	pU6-sORF-7-2-14	pU6-BbsI-chiRNA
<b><i>act5c-cas9</i></b>	474/525 (90%)	381/452 (84%)	23/155 (15%)
<b><i>nos-cas9</i></b>	251/344 (73%)	186/287 (65%)	36/163 (22%)

**Tabla 18.** Letalidad embrionaria obtenida mediante CRISPR-Cas9 en el sORF-7. Se muestra la relación letal/inyectados, el porcentaje de letalidad para cada caso se indica entre paréntesis.

## **4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

En este trabajo hemos generado cinco plásmidos que expresan sgRNAs para el gen de *me31B* y dos para el sORF-7 e iniciado los estudios preliminares de su validez en la edición genómica de los respectivos loci.

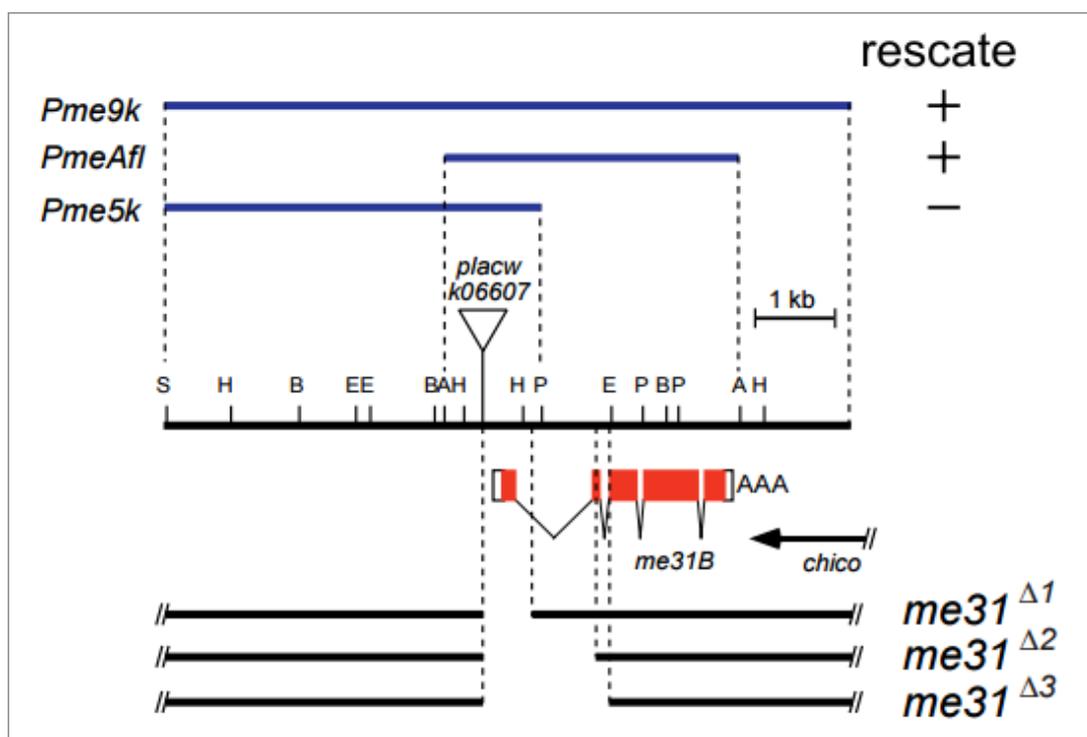
Se generó una delección en el locus *me31B* mediante la co-inyección de dos plásmidos de expresión de gRNAs que fue comprobada experimentalmente mediante PCR. Sin embargo, no se logró establecer un stock debido a que la búsqueda por PCR de moscas mutantes individuales no generó la amplificación de un fragmento cuya movilidad electroforética se corresponda al tamaño indicativo de la delección F+1. Esto se debe posiblemente a que las moscas de las que se obtuvieron amplicones del tamaño deseado no sobrevivieron luego de la amputación de las patas.

Al analizar embriones *vasa-cas9* a las 24hs post-inyección se encontraron fragmentos de amplificación por PCR ([Figura 21A](#)) indicativos de la presencia de una delección, sin embargo, los embriones no completaron su ciclo de vida hasta llegar a moscas adultas. Estos resultados son un indicio de que la delección podría ser letal larvaria, razón por la cual, los embriones si bien nacieron, no extendieron el ciclo más allá del estadio de larva 1. Contrariamente, al inyectar este mismo par de plásmidos en *nos-cas9* se obtuvieron moscas adultas viables. Estas moscas se cruzaron individualmente con moscas salvajes y se dejó que la descendencia se aparee libremente, en esta nueva generación se buscó la delección lográndose evidencia de la misma mediante PCR no letal a partir de patas amputadas ([cruza 4, Figura 22](#)).

El hecho de que hayan nacido moscas a partir de las inyecciones en *nos-cas9* y no en *vasa-cas9* se puede explicar por el grado de restricción de la acción de Cas9 a la línea germinal, ya que en estudios previos se demostró que *vasa-cas9* posee una significativa contribución somática, a pesar de estar clasificada como una línea con actividad de Cas9 restringida a línea germinal ([Port et al. 2014](#)). Al ser inyectados embriones *vasa-cas9* con sgRNAs contra el gen *wingless* (un gen esencial) genera una letalidad cercana al 100%. Por otro lado, en este mismo estudio se muestra que al inyectar el mismo sgRNA en *nos-cas9* el 100% de las moscas nacidas mostraban fenotipo salvaje y fueron capaces de transmitir alelos mutantes de *wingless* a la progenie ([Port et al. 2014](#)). A estos individuos capaces de transmitir alelos a la progenie se los llama fundadores ya que son portadores de nuevos alelos transmisibles en sus gametas sin manifestar el fenotipo letal y son la

clave para generar líneas estables. En este trabajo final de grado, a partir de la inyección de plásmidos que generan sgRNAs en la cepa *nos-cas9* pudimos encontrar la delección en las moscas inyectadas, sin embargo, quedó pendiente la obtención de la línea estable dentro del tiempo asignado para la realización de este trabajo por no poder establecer individuos fundadores. Sin embargo queda puesto en evidencia la eficacia del método abriendo una nueva metodología para el estudio de los genes de interés para el laboratorio.

Nakamura y col. demostraron que *me31B* es un gen esencial mediante la generación de delecciones utilizando la movilización de elementos P insertados en la región 31B (Figura 23). Las delecciones parciales comienzan 100pb upstream, y ninguna de ellas abarcó los exones 4 y 5 sin afectar los exones 1, 2 y 3 (*me31B<sup>Δ1</sup>*, *me31B<sup>Δ2</sup>* y *me31B<sup>Δ3</sup>*). En todos los casos las delecciones generaron pérdida de función (Nakamura et al. 2001). Nuestros plásmidos que expresan sgRNAs fueron diseñados para eliminar los exones 4 y 5 sin afectar el inicio de la transcripción.



**Figura 23.** Organización genómica del locus de *me31B*. El elemento P k06607 está insertado aproximadamente 100pb upstream de *me31B*. Mediante la movilización de este elemento P se aislaron tres delecciones parciales (*me31B<sup>Δ</sup>*). La letalidad en las líneas *me31B<sup>Δ</sup>* es rescatada por los transgenes *pme9k* y *PmeAfl* pero no por *Pme5k*. A, AflIII; B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; P, PstI; S, Sall. (Nakamura et al. 2001)

Otro antecedente de la eliminación del gen de *me31B* es la deficiencia Df(2L)J2 generada por De Valoir y colaboradores, que abarca el locus entero de *me31B* y es letal en homocigosis ([de Valoir et al. 1991](#)). Resta completar el análisis realizando nuevas inyecciones con las demás combinaciones de gRNAs para generar deleciones que puedan revelar la importancia de la región C-terminal. Recientemente, en el grupo de trabajo, planteamos la idea de utilizar la estrategia de recombinación homóloga inducida por CRISPR/Cas9 para reemplazar el gen de *me31B* por un sitio de recombinación attP. El reemplazo de un gen con sitios attP provee una manera más eficiente de realizar modificaciones en el locus evitando el uso reiterado de CRISPR/Cas9 para cada mutación que se desee generar. ([Gao et al. 2009](#), [Huang et al. 2009](#), [Gratz et al. 2014](#)). Esto permitiría analizar los diferentes sitios de interacción Me31B-eIF4E con mayor precisión. Esta fase del trabajo excede el objetivo de un trabajo final de licenciatura por su complejidad y extensión y forma parte de un futuro proyecto de doctorado.

En lo que respecta a los sORFs obtuvimos altos índices de la letalidad embrionaria al inducir cortes con CRISPR-Cas9 en ambos sitios diseñados. Los porcentajes de letalidad van del 90% (*act-cas9+pU6-sORF-7-1-14*) al 64% (*nos-cas9+ pU6-sORF-7-2-14*). Una observación válida es la diferencia de letalidad entre las líneas ya que los porcentajes son mayores en *act-cas9* que en *nos-cas9*. Es propicio aclarar que *act-cas9* es una línea transgénica con una expresión constitutiva muy elevada de Cas9 y es la opción recomendada a la hora de generar nuevos alelos de genes no esenciales ([Port et al. 2014](#)). Por lo tanto, el uso de esta línea permitió inferir que sORF-7 sería esencial. Sin embargo, esto también la convierte en la opción menos conveniente para generar líneas estables y realizar futuros trabajos ya que esta letalidad inesperada fue el mayor impedimento para cumplir dicho objetivo.

La letalidad embrionaria presumiblemente se deba a letalidad celular causada por mutaciones en pseudo-homocigosis en el locus sORF-7 (es decir cortes en ambos complementos genómicos generan InDels que no necesariamente son idénticos e implican bialelismo, pero cuyo resultado final es un mutante no complementario similar a un homocigota). Esto implica que el sistema CRISPR-Cas9 tuvo alta eficiencia en las condiciones experimentales usadas. Se puede inferir que el sORF-7 se estaría expresando al menos como gen zigótico en el embrión de *Drosophila*, lo cual está de

acuerdo con el patrón de expresión revelado por RNASeq (Figura 8) y que, además, es requerido para el correcto desarrollo. Port y col. han demostrado la capacidad de CRISPR/Cas9 para analizar en forma directa la función génica en células somáticas mediante la generación de mosaicos genéticos en los cuales los clones de células poseen disrupciones génicas bialelicas (Port *et al.* 2014). La recombinación mitótica usando la recombinasa de levadura Flp es lo que se ha utilizado tradicionalmente para este propósito en *Drosophila* (Bischof *et al.* 2008). El análisis de mutaciones mediante el método de mosaicos genéticos ha sido invaluable, sin embargo, generarlos consume mucho tiempo de trabajo ya que requiere que ocurra recombinación homóloga entre la mutación de interés y un cromosoma que contiene un sitio FRT, lo cual es complicado para genes localizados cerca del sitio FRT debido a la baja frecuencia de recombinación (Wolfner *et al.* 1994). CRISPR/Cas9 genera mosaicos en un solo de un paso y, además, a diferencia del sistema FRT/Flp, no existe *a priori* razón para pensar que requiera de división celular.

La técnica de RNAi puede revelar fenotipos mutantes también en un solo paso, sin embargo, frecuentemente reduce la expresión génica solo parcialmente, lo que significa que algunos fenotipos podrían no tener penetrancia completa o se podrían no observar debido a proteína residual. Por otro lado, como actúa a nivel de ARNm, en aquellos genes que comparten exones o intrones (genes dentro de genes o genes anidados), como es el caso de muchos sORFs, no se puede hacer una distinción de uno con respecto a otro. CRISPR/Cas9 rápidamente provee acceso a fenotipos de mutantes causados por mutaciones bialelicas de cambio de lectura del ORF. Port y col. revelaron fenotipos de pérdida de función con alta penetrancia coherentes con los fenotipos clásicos al utilizar CRISPR/Cas9 contra los genes *e*, *y*, *cu*, *wg*, y *wls* (Port *et al.* 2014).

Es significativo destacar que este trabajo final confirmó que la técnica de CRISPR-Cas9 es una herramienta ideal para resolver problemas de importancia biológica sobre los sORFs. Al ser loci tan pequeños que no solo se encuentran en regiones intergénicas sino dentro de intrones y aún ORFs de otros genes, era casi imposible usar los métodos tradicionales de genética reversa, ya que también afectaban al gen que los contenía. Los pequeños péptidos conocidos, como neuropéptidos, cumplen importantes funciones biológicas, mayormente en la comunicación neural y endócrina, pero en todos los casos

descriptos son productos maduros clivados de un ORF mayor. Gracias a la bioinformática cada vez se conocen más péptidos menores a 50 aminoácidos en el genoma de *Drosophila melanogaster* y otros insectos, péptidos que son codificados por ARN mensajeros mono o policistrónicos y en donde técnicas de noqueo tradicionales como inserción y escisión de elementos P no tendrían éxito en eliminar un sORF único ubicado en una hilera de sORFs. CRISPR-Cas9 demuestra ser de utilidad en estos casos produciendo cortes precisos y dirigidos a uno solo o varios sORFs a la vez. En este estudio he demostrado que el sORF-7 sería esencial en el desarrollo. Son muy pocos los ejemplos de funciones conocidas para péptidos derivados de sORFs. Uno de ellos es el codificado por el locus *tarsal-less* (*tal*, también llamado *polished rice*, *pri*), que regula la actividad del producto del gen *shavenbaby* (*svb*), cambiando su función de regulador negativo de la transcripción a positivo por interacción directa del producto de *tal* con *svb*. Desconocemos la función de sORF-7, pero el trabajo presentado aquí abre la posibilidad de indagar sobre su función biológica.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. D., S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, S. E. Scherer, P. W. Li, R. A. Hoskins, R. F. Galle, R. A. George, S. E. Lewis, S. Richards, M. Ashburner, S. N. Henderson, G. G. Sutton, J. R. Wortman, M. D. Yandell, Q. Zhang, L. X. Chen, R. C. Brandon, Y. H. Rogers, R. G. Blazej, M. Champe, B. D. Pfeiffer, K. H. Wan, C. Doyle, E. G. Baxter, G. Helt, C. R. Nelson, G. L. Gabor, J. F. Abril, A. Agbayani, H. J. An, C. Andrews-Pfannkoch, D. Baldwin, R. M. Ballew, A. Basu, J. Baxendale, L. Bayraktaroglu, E. M. Beasley, K. Y. Beeson, P. V. Benos, B. P. Berman, D. Bhandari, S. Bolshakov, D. Borkova, M. R. Botchan, J. Bouck, P. Brokstein, P. Brottier, K. C. Burtis, D. A. Busam, H. Butler, E. Cadieu, A. Center, I. Chandra, J. M. Cherry, S. Cawley, C. Dahlke, L. B. Davenport, P. Davies, B. de Pablos, A. Delcher, Z. Deng, A. D. Mays, I. Dew, S. M. Dietz, K. Dodson, L. E. Doup, M. Downes, S. Dugan-Rocha, B. C. Dunkov, P. Dunn, K. J. Durbin, C. C. Evangelista, C. Ferraz, S. Ferreira, W. Fleischmann, C. Fosler, A. E. Gabrielian, N. S. Garg, W. M. Gelbart, K. Glasser, A. Glodek, F. Gong, J. H. Gorrell, Z. Gu, P. Guan, M. Harris, N. L. Harris, D. Harvey, T. J. Heiman, J. R. Hernandez, J. Houck, D. Hostin, K. A. Houston, T. J. Howland, M. H. Wei, C. Ibegwam, M. Jalali, F. Kalush, G. H. Karpen, Z. Ke, J. A. Kennison, K. A. Ketchum, B. E. Kimmel, C. D. Kodira, C. Kraft, S. Kravitz, D. Kulp, Z. Lai, P. Lasko, Y. Lei, A. A. Levitsky, J. Li, Z. Li, Y. Liang, X. Lin, X. Liu, B. Mattei, T. C. McIntosh, M. P. McLeod, D. McPherson, G. Merkulov, N. V. Milshina, C. Mobarry, J. Morris, A. Moshrefi, S. M. Mount, M. Moy, B. Murphy, L. Murphy, D. M. Muzny, D. L. Nelson, D. R. Nelson, K. A. Nelson, K. Nixon, D. R. Nusskern, J. M. Pacleb, M. Palazzolo, G. S. Pittman, S. Pan, J. Pollard, V. Puri, M. G. Reese, K. Reinert, K. Remington, R. D. Saunders, F. Scheeler, H. Shen, B. C. Shue, I. Siden-Kiamos, M. Simpson, M. P. Skupski, T. Smith, E. Spier, A. C. Spradling, M. Stapleton, R. Strong, E. Sun, R. Svirskas, C. Tector, R. Turner, E. Venter, A. H. Wang, X. Wang, Z. Y. Wang, D. A. Wassarman, G. M. Weinstock, J. Weissenbach, S. M. Williams, WoodageT, K. C. Worley, D. Wu, S. Yang, Q. A. Yao, J. Ye, R. F. Yeh, J. S. Zaveri, M. Zhan, G. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, X. H. Zheng, F. N. Zhong, W. Zhong, X. Zhou, S. Zhu, X. Zhu, H. O. Smith, R. A. Gibbs, E. W. Myers, G. M. Rubin and J. C. Venter (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." Science **287**(5461): 2185-2195.
- Alonso, C. R. and M. Akam (2003). "A Hox gene mutation that triggers nonsense-mediated RNA decay and affects alternative splicing during *Drosophila* development." Nucleic Acids Res **31**(14): 3873-3880.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2006). "RNA granules." J Cell Biol **172**(6): 803-808.
- Andrei, M. A., D. Ingelfinger, R. Heintzmann, T. Achsel, R. Rivera-Pomar and R. Luhrmann (2005). "A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies." RNA **11**(5): 717-727.
- Barrangou, R. (2013). "CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference." Wiley Interdiscip Rev RNA **4**(3): 267-278.
- Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero and P. Horvath (2007). "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes." Science **315**(5819): 1709-1712.
- Barrangou, R. and P. Horvath (2012). "CRISPR: new horizons in phage resistance and strain identification." Annu Rev Food Sci Technol **3**: 143-162.
- Barrangou, R. and J. Van der Oost (2013). CRISPR-Cas Systems: RNA-mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea. Heidelberg, Springer-Verlag Berlin.
- Bassett, A. R., C. Tibbit, C. P. Ponting and J. L. Liu (2013). "Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system." Cell Rep **4**(1): 220-228.

- Belhaj, K., A. Chaparro-Garcia, S. Kamoun and V. Nekrasov (2013). "Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system." Plant Methods **9**(1): 39.
- Beumer, K., G. Bhattacharyya, M. Bibikova, J. K. Trautman and D. Carroll (2006). "Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc-finger nucleases." Genetics **172**(4): 2391-2403.
- Bibikova, M., M. Golic, K. G. Golic and D. Carroll (2002). "Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases." Genetics **161**(3): 1169-1175.
- Bischof, J. and K. Basler (2008). Recombinases and Their Use in Gene Activation, Gene Inactivation, and Transgenesis. *Drosophila: Methods and Protocols*. C. Dahmann. Totowa, NJ, Humana Press: 175-195.
- Biswas, A., P. C. Fineran and C. M. Brown (2014). "Accurate computational prediction of the transcribed strand of CRISPR non-coding RNAs." Bioinformatics **30**(13): 1805-1813.
- Brand, A. H. and E. L. Dormand (1995). "The GAL4 system as a tool for unravelling the mysteries of the *Drosophila* nervous system." Curr Opin Neurobiol **5**(5): 572-578.
- Brent, M. M. and I. I. Oster (1974). "Nutritional Substitution- a new approach to microbial control for *Drosophila* cultures." Dro. Inf. Ser. **51**: 155-157.
- Brouns, S. J., M. M. Jore, M. Lundgren, E. R. Westra, R. J. Slijkhuis, A. P. Snijders, M. J. Dickman, K. S. Makarova, E. V. Koonin and J. van der Oost (2008). "Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes." Science **321**(5891): 960-964.
- Buchan, J. R. and R. Parker (2009). "Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Out of Translation." Molecular cell **36**(6): 932.
- Capecchi, M. R. (1989). "The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting." Trends Genet **5**(3): 70-76.
- Castle, W. E., F. W. Carpenter, A. H. Clark, S. O. Mast and W. M. Barrows (1906). "The Effects of Inbreeding, Cross-Breeding, and Selection upon the Fertility and Variability of *Drosophila*." Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences **41**(33): 731-786.
- Cho, S. W., S. Kim, J. M. Kim and J. S. Kim (2013). "Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease." Nat Biotechnol **31**(3): 230-232.
- Cho, S. W., S. Kim, Y. Kim, J. Kweon, H. S. Kim, S. Bae and J.-S. Kim (2014). "Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases." Genome Research **24**(1): 132-141.
- Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini and F. Zhang (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." Science **339**(6121): 819-823.
- Cradick, T. J., E. J. Fine, C. J. Antico and G. Bao (2013). "CRISPR/Cas9 systems targeting  $\beta$ -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity." Nucleic Acids Research **41**(20): 9584-9592.
- de Valoir, T., M. A. Tucker, E. J. Belikoff, L. A. Camp, C. Bolduc and K. Beckingham (1991). "A second maternally expressed *Drosophila* gene encodes a putative RNA helicase of the "DEAD box" family." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(6): 2113-2117.
- Deltcheva, E., K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, M. R. Eckert, J. Vogel and E. Charpentier (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Nature **471**(7340): 602-607.
- Deveau, H., J. E. Garneau and S. Moineau (2010). "CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions." Annu Rev Microbiol **64**: 475-493.

- DiCarlo, J. E., J. E. Norville, P. Mali, X. Rios, J. Aach and G. M. Church (2013). "Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems." Nucleic Acids Res **41**(7): 4336-4343.
- Ding, Q., S. N. Regan, Y. Xia, L. A. Oostrom, C. A. Cowan and K. Musunuru (2013). "Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs." Cell Stem Cell **12**(4): 393-394.
- Doane, W. W. (1967). *Drosophila. Methods in Developmental Biology*. F. H. Wilt and N. K. Wessells. New York, Thomas Y. Crowell Company: 219-244.
- Eeken, J. C., A. W. de Jong, M. Loos, C. Vreeken, R. Romeyn, A. Pastink and P. H. Lohman (1994). "The nature of X-ray-induced mutations in mature sperm and spermatogonial cells of *Drosophila melanogaster*." Mutat Res **307**(1): 201-212.
- Engels, W. R. (1992). "The origin of P elements in *Drosophila melanogaster*." Bioessays **14**(10): 681-686.
- Engler, C., R. Gruetzner, R. Kandzia and S. Marillonnet (2009). "Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes." PLoS One **4**(5): e5553.
- Engler, C., R. Kandzia and S. Marillonnet (2008). "A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability." PLoS One **3**(11): e3647.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant and E. Izaurralde (2007). "P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(1): 9-22.
- Foe, V. E. and B. M. Alberts (1983). "Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis." J Cell Sci **61**: 31-70.
- Fu, Y., J. A. Foden, C. Khayter, M. L. Maeder, D. Reyon, J. K. Joung and J. D. Sander (2013). "High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells." Nat Biotechnol **31**(9): 822-826.
- Fuller, M. T. (1998). "Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis." Semin Cell Dev Biol **9**(4): 433-444.
- Gaj, T., C. A. Gersbach and C. F. Barbas (2013). "ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering." Trends in biotechnology **31**(7): 397-405.
- Galindo, M. I., J. I. Pueyo, S. Fouix, S. A. Bishop and J. P. Couso (2007). "Peptides Encoded by Short ORFs Control Development and Define a New Eukaryotic Gene Family." PLoS Biology **5**(5): e106.
- Gao, G., N. Wesolowska and Y. S. Rong (2009). "SIRT combines homologous recombination, site-specific integration, and bacterial recombineering for targeted mutagenesis in *Drosophila*." Cold Spring Harb Protoc **2009**(6): pdb.prot5236.
- Garneau, J. E., M. E. Dupuis, M. Villion, D. A. Romero, R. Barrangou, P. Boyaval, C. Fremaux, P. Horvath, A. H. Magadan and S. Moineau (2010). "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA." Nature **468**(7320): 67-71.
- Golic, M. M., Y. S. Rong, R. B. Petersen, S. L. Lindquist and K. G. Golic (1997). "FLP-mediated DNA mobilization to specific target sites in *Drosophila* chromosomes." Nucleic Acids Research **25**(18): 3665-3671.
- Goren, M., I. Yosef, R. Edgar and U. Qimron (2012). "The bacterial CRISPR/Cas system as analog of the mammalian adaptive immune system." RNA Biol **9**(5): 549-554.
- Gratz, S. J., A. M. Cummings, J. N. Nguyen, D. C. Hamm, L. K. Donohue, M. M. Harrison, J. Wildonger and K. M. O'Connor-Giles (2013). "Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease." Genetics **194**(4): 1029-1035.

- Gratz, S. J., C. D. Rubinstein, M. M. Harrison, J. Wildonger and K. M. O'Connor-Giles (2015). "CRISPR-Cas9 Genome Editing in *Drosophila*." Curr Protoc Mol Biol **111**: 31.32.31-20.
- Gratz, S. J., F. P. Ukken, C. D. Rubinstein, G. Thiede, L. K. Donohue, A. M. Cummings and K. M. O'Connor-Giles (2014). "Highly Specific and Efficient CRISPR/Cas9-Catalyzed Homology-Directed Repair in *Drosophila*." Genetics.
- Gratz, S. J., F. P. Ukken, C. D. Rubinstein, G. Thiede, L. K. Donohue, A. M. Cummings and K. M. O'Connor-Giles (2014). "Highly Specific and Efficient CRISPR/Cas9-Catalyzed Homology-Directed Repair in *Drosophila*." Genetics **196**(4): 961-971.
- Haft, D. H., J. Selengut, E. F. Mongodin and K. E. Nelson (2005). "A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes." PLoS Comput Biol **1**(6): e60.
- Hernandez, G., M. Altmann, J. M. Sierra, H. Urlaub, R. Diez del Corral, P. Schwartz and R. Rivera-Pomar (2005). "Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*." Mech Dev **122**(4): 529-543.
- Hernández, G., H. Han, V. Gandin, L. Fabian, T. Ferreira, J. Zuberek, N. Sonenberg, J. A. Brill and P. Lasko (2012). "Eukaryotic initiation factor 4E-3 is essential for meiotic chromosome segregation, cytokinesis and male fertility in *Drosophila*." Development (Cambridge, England) **139**(17): 3211-3220.
- Hsu, P. D., D. A. Scott, J. A. Weinstein, F. A. Ran, S. Konermann, V. Agarwala, Y. Li, E. J. Fine, X. Wu, O. Shalem, T. J. Cradick, L. A. Marraffini, G. Bao and F. Zhang (2013). "DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases." Nat Biotechnol **31**(9): 827-832.
- Huang, J., W. Zhou, W. Dong, A. M. Watson and Y. Hong (2009). "Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(20): 8284-8289.
- Ishigaki, Y., X. Li, G. Serin and L. E. Maquat (2001). "Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20." Cell **106**(5): 607-617.
- Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura and A. Nakata (1987). "Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product." J Bacteriol **169**(12): 5429-5433.
- Jiang, W., D. Bikard, D. Cox, F. Zhang and L. A. Marraffini (2013). "RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems." Nat Biotechnol **31**(3): 233-239.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna and E. Charpentier (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Science **337**(6096): 816-821.
- Jinek, M., A. East, A. Cheng, S. Lin, E. Ma and J. Doudna (2013). "RNA-programmed genome editing in human cells." Elife **2**: e00471.
- Kastenmayer, J. P., L. Ni, A. Chu, L. E. Kitchen, W. C. Au, H. Yang, C. D. Carter, D. Wheeler, R. W. Davis, J. D. Boeke, M. A. Snyder and M. A. Basrai (2006). "Functional genomics of genes with small open reading frames (sORFs) in *S. cerevisiae*." Genome Res **16**(3): 365-373.
- Kleene, K. C. (2003). "Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells." Cytogenet Genome Res **103**(3-4): 217-224.
- Kondo, S. and R. Ueda (2013). "Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*." Genetics **195**(3): 715-721.

- Kondo, T., S. Plaza, J. Zanet, E. Benrabah, P. Valenti, Y. Hashimoto, S. Kobayashi, F. Payre and Y. Kageyama (2010). "Small peptides switch the transcriptional activity of Shavenbaby during *Drosophila* embryogenesis." Science **329**(5989): 336-339.
- Koonin, E. V. and K. S. Makarova (2013). "CRISPR-Cas: evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes." RNA Biol **10**(5): 679-686.
- Kroos, L. (2007). "The *Bacillus* and *Myxococcus* developmental networks and their transcriptional regulators." Annu Rev Genet **41**: 13-39.
- Layana, C., P. Ferrero and R. Rivera-Pomar (2012). "Cytoplasmic Ribonucleoprotein Foci in Eukaryotes: Hotspots of Bio(chemical)Diversity." Comparative and Functional Genomics **2012**: 7.
- Lewis, E. and F. Bacher (1968). "Method of feeding ethyl methane sulfonate (EMS) to *Drosophila* males." Dros Inf Serv **43**(193).
- Liu, J., C. Li, Z. Yu, P. Huang, H. Wu, C. Wei, N. Zhu, Y. Shen, Y. Chen, B. Zhang, W. M. Deng and R. Jiao (2012). "Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy." J Genet Genomics **39**(5): 209-215.
- Lundgren, M., E. Charpentier and P. C. Fineran (2015). CRISPR: Methods and Protocols. New York, Humana Press.
- Makarova, K. S., N. V. Grishin, S. A. Shabalina, Y. I. Wolf and E. V. Koonin (2006). "A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action." Biol Direct **1**: 7.
- Makarova, K. S., D. H. Haft, R. Barrangou, S. J. Brouns, E. Charpentier, P. Horvath, S. Moineau, F. J. Mojica, Y. I. Wolf, A. F. Yakunin, J. van der Oost and E. V. Koonin (2011). "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems." Nat Rev Microbiol **9**(6): 467-477.
- Makarova, K. S., Y. I. Wolf and E. V. Koonin (2013). "Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria." Nucleic Acids Research **41**(8): 4360-4377.
- Mali, P., L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville and G. M. Church (2013). "RNA-guided human genome engineering via Cas9." Science **339**(6121): 823-826.
- Marraffini, L. A. and E. J. Sontheimer (2008). "CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA." Science **322**(5909): 1843-1845.
- Mazumdar, A. and M. Mazumdar (2002). "How one becomes many: blastoderm cellularization in *Drosophila melanogaster*." Bioessays **24**(11): 1012-1022.
- Morgan, T. H. (1910). "Sex Limited Inheritance in *Drosophila*." Science **32**(812): 120-122.
- Muller, H. J. (1927). "Artificial transmutation of the gene." Science **66**(1699): 84-87.
- Naito, Y., K. Hino, H. Bono and K. Ui-Tei (2015). "CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites." Bioinformatics **31**(7): 1120-1123.
- Nakamura, A., R. Amikura, K. Hanyu and S. Kobayashi (2001). "Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during *Drosophila* oogenesis." Development **128**(17): 3233-3242.
- Nakamura, A., K. Sato and K. Hanyu-Nakamura (2004). "*Drosophila* cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA translation in oogenesis." Dev Cell **6**(1): 69-78.
- Nakata, A., M. Amemura and K. Makino (1989). "Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome." J Bacteriol **171**(6): 3553-3556.

- Nuñez, J. K., P. J. Kranzusch, J. Noeske, A. V. Wright, C. W. Davies and J. A. Doudna (2014). "Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity." Nature structural & molecular biology **21**(6): 528-534.
- Pattanayak, V., S. Lin, J. P. Guilinger, E. Ma, J. A. Doudna and D. R. Liu (2013). "High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity." Nat Biotechnol **31**(9): 839-843.
- Port, F. and S. L. Bullock (2016). "Creating Heritable Mutations in Drosophila with CRISPR-Cas9." Methods Mol Biol **1478**: 145-160.
- Port, F., H. M. Chen, T. Lee and S. L. Bullock (2014). "Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in Drosophila." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(29): E2967-2976.
- Pougach, K., E. Semenova, E. Bogdanova, K. A. Datsenko, M. Djordjevic, B. L. Wanner and K. Severinov (2010). "Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in Escherichia coli." Mol Microbiol **77**(6): 1367-1379.
- Pueyo, J. I. and J. P. Couso (2008). "The 11-aminoacid long Tarsal-less peptides trigger a cell signal in Drosophila leg development." Dev Biol **324**(2): 192-201.
- Ren, X., J. Sun, B. E. Housden, Y. Hu, C. Roesel, S. Lin, L. P. Liu, Z. Yang, D. Mao, L. Sun, Q. Wu, J. Y. Ji, J. Xi, S. E. Mohr, J. Xu, N. Perrimon and J. Q. Ni (2013). "Optimized gene editing technology for Drosophila melanogaster using germ line-specific Cas9." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(47): 19012-19017.
- Richter, C., T. Gristwood, J. S. Clulow and P. C. Fineran (2012). "In vivo protein interactions and complex formation in the Pectobacterium atrosepticum subtype I-F CRISPR/Cas System." PLoS One **7**(12): e49549.
- Richter, J. D. and P. Lasko (2011). "Translational Control in Oocyte Development." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **3**(9): a002758.
- Rong, Y. S. and K. G. Golic (2000). "Gene targeting by homologous recombination in Drosophila." Science **288**(5473): 2013-2018.
- Santiago, Y., E. Chan, P. Q. Liu, S. Orlando, L. Zhang, F. D. Urnov, M. C. Holmes, D. Guschin, A. Waite, J. C. Miller, E. J. Rebar, P. D. Gregory, A. Klug and T. N. Collingwood (2008). "Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(15): 5809-5814.
- Sashital, D. G., B. Wiedenheft and J. A. Doudna (2012). "Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system." Mol Cell **46**(5): 606-615.
- Schafer, M., K. Nayernia, W. Engel and U. Schafer (1995). "Translational control in spermatogenesis." Dev Biol **172**(2): 344-352.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband and K. W. Eliceiri (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." Nat Methods **9**(7): 671-675.
- Scriba, M. E. (1969). "[Embryonale hypogenese at nullosomy and tetrasomy of Drosophila melanogaster third chromosome]." Dev Biol **19**(2): 160-177.
- Sebo, Z. L., H. B. Lee, Y. Peng and Y. Guo (2014). "A simplified and efficient germline-specific CRISPR/Cas9 system for Drosophila genomic engineering." Fly **8**(1): 52-57.
- Semenova, E., M. M. Jore, K. A. Datsenko, A. Semenova, E. R. Westra, B. Wanner, J. van der Oost, S. J. Brouns and K. Severinov (2011). "Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(25): 10098-10103.
- Shah, S. A., S. Erdmann, F. J. M. Mojica and R. A. Garrett (2013). "Protospacer recognition motifs: Mixed identities and functional diversity." RNA Biology **10**(5): 891-899.

- St Johnston, D. (2002). "The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*." Nat Rev Genet **3**(3): 176-188.
- Standart, N. and N. Minshall (2008). "Translational control in early development: CPEB, P-bodies and germinal granules." Biochem Soc Trans **36**(Pt 4): 671-676.
- Van der Oost, J., M. M. Jore, E. R. Westra, M. Lundgren and S. J. Brouns (2009). "CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes." Trends Biochem Sci **34**(8): 401-407.
- Velicer, G. J. and M. Vos (2009). "Sociobiology of the myxobacteria." Annu Rev Microbiol **63**: 599-623.
- Venken, K. J. and H. J. Bellen (2005). "Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*." Nat Rev Genet **6**(3): 167-178.
- Wang, T., J. J. Wei, D. M. Sabatini and E. S. Lander (2014). "Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system." Science **343**(6166): 80-84.
- Westra, E. R., D. C. Swarts, R. H. Staals, M. M. Jore, S. J. Brouns and J. van der Oost (2012). "The CRISPRs, they are a-changin': how prokaryotes generate adaptive immunity." Annu Rev Genet **46**: 311-339.
- Wiedenheft, B., G. C. Lander, K. Zhou, M. M. Jore, S. J. Brouns, J. van der Oost, J. A. Doudna and E. Nogales (2011). "Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system." Nature **477**(7365): 486-489.
- Wiedenheft, B., S. H. Sternberg and J. A. Doudna (2012). "RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea." Nature **482**(7385): 331-338.
- Wolfner, M. F. and M. L. Goldberg (1994). "Harnessing the power of *Drosophila* genetics." Methods Cell Biol **44**: 33-80.
- Yosef, I., M. G. Goren and U. Qimron (2012). "Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*." Nucleic Acids Res **40**(12): 5569-5576.
- Yu, Z., M. Ren, Z. Wang, B. Zhang, Y. S. Rong, R. Jiao and G. Gao (2013). "Highly efficient genome modifications mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*." Genetics **195**(1): 289-291.
- Zegans, M. E., J. C. Wagner, K. C. Cady, D. M. Murphy, J. H. Hammond and G. A. O'Toole (2009). "Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **191**(1): 210-219.
- Zhang, X., W. H. Koolhaas and F. Schnorrer (2014). "A versatile two-step CRISPR- and RMCE-based strategy for efficient genome engineering in *Drosophila*." G3 (Bethesda) **4**(12): 2409-2418.
- Zimmer, A. and P. Gruss (1989). "Production of chimaeric mice containing embryonic stem (ES) cells carrying a homoeobox Hox 1.1 allele mutated by homologous recombination." Nature **338**(6211): 150-153.

## 6. ANEXO

Nombre	Secuencia (en dirección 5' a 3')	Utilización
Promotor T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	Búsqueda de plásmidos
Me31B-3ACRISPR Fw	CTTCGCGGAAAATAGCAAGATCTG	Generación de plásmidos
Me31B-3ACRISPR Rv	AAACCAGATCTTGCTATTTTCCGC	Generación y búsqueda de plásmidos
Me31B-3BCRISPR Fw	CTTCGATGGAGGAGCTAACACTGA	Generación de plásmidos
Me31B-3BCRISPR Rv	AAACTCAGTGTTAGCTCCTCCATC	Generación y búsqueda de plásmidos
Me31B-2CRISPR Fw	CTTCGATTCAAGCAGTGTACTTTC	Generación de plásmidos
Me31B-2CRISPR Rv	AAACGAAAGTACACTGCTTGAATC	Generación y búsqueda de plásmidos
Me31B-1CRISPR Fw	CTTCGAAATTGATTACTACATTCA	Generación de plásmidos
Me31B-1CRISPR Rv	AAACTGAATGTAGTAATCAATTTTC	Generación y búsqueda de plásmidos
Me31B-FCRISPR Fw	CTTCGAATAATTCTGCGAACGAGG	Generación de plásmidos
Me31B-FCRISPR Rv	AAACCCTCGTTTCGAGAATTATTC	Generación y búsqueda de plásmidos
Me31B <sup>Y323A</sup> Fw	GCATATATACACGCTAAGATG	Búsqueda de moscas mutantes
Me31B-Screen Fw	CGCAAAGTTGAATACGTGAGC	Búsqueda de moscas mutantes
Me31B-Screen Rv	CTCAGCACCAAAAACCCACAA	Búsqueda de moscas mutantes
sORF-7-1-CRISPR Fw	CTTCGATATAATTGCAATTCGGCG	Generación de plásmidos
sORF-7-1-CRISPR Rv	AAACCGCCGAATTGCGAATTATATC	Generación y búsqueda de plásmidos
sORF-7-2-CRISPR Fw	CTTCGAAGGAGCCCAATGGGATCA	Generación de plásmidos
sORF-7-2-CRISPR Rv	AAACTGATCCCATTTGGGCTCCTTC	Generación y búsqueda de plásmidos
sORF-7-1-Screen Fw	TTACAATATTATTAAGCGAAGGACAC	Búsqueda de moscas mutantes
sORF-7-1-Screen Rv	AGCGCTACCAGTTTTCCCGAGC	Búsqueda de moscas mutantes
sORF-7-2-Screen Fw	TTGTCTGTTATTGATCCTCTCCCGTG	Búsqueda de moscas mutantes
sORF-7-2-Screen Rv	TCCATCATAACGAGGCGAAACGAACC	Búsqueda de moscas mutantes

**Tabla S1.** Secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

<b>A</b> Alanina	<b>I</b> Isoleucina	<b>R</b> Arginina
<b>C</b> Cisteína	<b>K</b> Lisina	<b>S</b> Serina
<b>D</b> Aspartato	<b>L</b> Leucina	<b>T</b> Treonina
<b>E</b> Glutamato	<b>M</b> Metionina	<b>V</b> Valina
<b>F</b> Fenilalanina	<b>N</b> Asparagina	<b>W</b> Triptófano
<b>G</b> Glicina	<b>P</b> Prolina	<b>Y</b> Tirosina
<b>H</b> Histidina	<b>Q</b> Glutamina	<b>*</b> Stop

**Tabla S2.** Abreviatura de los aminoácidos.

<b>A</b> Adenina
<b>T</b> Timina
<b>C</b> Citosina
<b>G</b> Guanina
<b>X</b> Cualquiera de los 4

**Tabla S3.** Abreviatura de los nucleótidos.

<b>Cas</b>	Enzima de tipo nucleasa que efectúa el clivaje en los sistemas CRISPR de tipo II.
<b>CRISPR</b>	Región en el genoma de bacterias y arqueas que se usa como defensa frente a patógenos.
<b>Delección</b>	Reordenamiento del cromosoma en el que un fragmento es removido y los extremos remanentes se vuelven a unir.
<b>DSB</b>	Ruptura en ambas hebras del ADN generado a través del uso de Cas9.
<b>Efecto o actividad off-target</b>	Clivaje por parte de la Cas9 en ubicaciones no deseadas debido a que la homología con la secuencia del sgRNA es suficiente como para reclutar Cas9 de manera no intencionada.
<b>HDR</b>	Mecanismo de reparación del ADN que usa un molde para arreglar las DSBs
<b>InDel</b>	Tipo de mutación que puede resultar en la interrupción de un gen mediante corrimiento de la lectura del ORF o en la creación de codones de stop prematuros. Puede tratarse de una inserción o una delección.
<b>Modificación o manipulación genética</b>	Cualquier perturbación en el genoma, incluyendo knock-out, activación génica o represión.
<b>NHEJ</b>	Mecanismo de reparación del ADN que frecuentemente introduce InDels debido a su propensión a cometer errores.
<b>Nulo o Amorfo</b>	Tipo de alelo con una mutación que inactiva la función de un gen ya sea impidiendo que se forme producto o generando un producto no funcional.
<b>PAM</b>	Motivo de ADN con la forma NGG en el caso de Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i> (SpCas9); Necesario para la unión de la nucleasa al sitio blanco en el ADN; Debe encontrarse inmediatamente luego de la secuencia target. El PAM varía dependiendo de la bacteria de la cual se obtuvo, por ejemplo el PAM para la Cas9 de <i>Neisseria meningitidis</i> (NmCas9) tiene la forma NNNNGATT.
<b>PCR</b>	Técnica utilizada para amplificar una secuencia específica de ADN.
<b>SgRNA</b>	Fusión artificial del crRNA y tracrRNA que posee 102pb; Cumple con las funciones de reconocimiento específico del sitio target y de anclaje a la Cas9; No existe naturalmente; También se conoce con el nombre de gRNA y chiRNA.
<b>Sitio blanco o target</b>	Secuencia en el genoma a la cual se dirigen los sgRNAs; Corresponde a los 20 nucleótidos que se incorporan en el sgRNA sumados a la secuencia PAM.

**Tabla S4.** Glosario con palabras utilizadas durante el trabajo en orden alfabético.

>pU6-BbsI-chiRNA

CACCTGACGCGCCCTGTAGCGGGCATTAAAGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCC  
 TAGCGCCCGCTCCTTCGCTTCTCCCTTCTCCCTTCTCGCCACGTTCCGGGCTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTT  
 TAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAGTTGATTAGGGTATGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGA  
 TAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCT  
 CGGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTGCCGATTTCCGGCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAAT  
 TTTAACAAAAATTTAACGCTTACAATTTCCATTCCGCTTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCG  
 TATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGTAACGCCAGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAA  
 AACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTACTATAGGGCBAATTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGTTCGACGGTATCGATAAG  
 CTTGATGTTTCGACTTGCAGCCTGAAATACGGCACGAGTAGGAAAAGCCGAGTCAAATGCCGAATGCAGAGTCTCATTACAGCACA  
 TCAACTCAAGAAAACTCGACACTTTTTACCATTTGCACTTAAATCCTTTTTATTTCGTTATGTATACTTTTTGGTCCCTAACAAA  
 AAAAAACCAACTCTCTTAGTCGTCCTCTATATTTAAACTATCAATTTATTATAGTCAATAAATCGAACTGTGTTTTCAACAAACGA  
 ACAATAGGACACTTTGATTCTAAAGGAAATTTGAAAATCTTAAGCAGAGGGTTCTTAAGACCATTTGCCAATTTATAATTCTCAAC  
 TGCTCTTTCCTGATGTTGATCATTTATATAGGTATGTTTCCCTCAACTCTCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXTAGAGCTAGAAATA  
 GCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGA AAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTATCGAATTCCTGCAGCCCGGG  
 GATCCACTAGTTCTAGAGCGGGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTCCCTTATAGTGAGGTTAATTTTCGAGCTTGGCGTA  
 ATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAG  
 CTGGGGTGCCATAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGCTGCCAGC  
 TGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCGCTCACTGACTCGCTGCG  
 CTCGGTGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGA  
 AAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC  
 CTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGCGTTTTCCCCCTGG  
 AAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTT  
 CTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACAGCC  
 GACCGCTGCGCCTTATCCGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAA  
 CAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTAT  
 TTGGTATCTGCGCTGCTGTAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGC  
 GGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTACGGGGTCTGAC  
 GCTCAGTGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTTAAAT  
 GAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGAT  
 CTGTCTATTTTCGTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTG  
 CTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAG  
 TGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC  
 CAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTATTAGCTCCGTTCCCAACGATCAA  
 GGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCCGCTCCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGCA  
 GTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACT  
 CAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGC  
 AGAACTTTAAAAGTGTCTCATCTTGGAAAACGTTCTTCCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCCGATG  
 TAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCC  
 GCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACCGGAAATGTTGAATACTCATACTTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATT  
 GTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAAGTGC

**Figura S1.** Secuencia nucleotídica de pU6-BbsI-chiRNA en la que se muestra la secuencia amplificada para el screening de los plásmidos con insertos. Con cruces verdes (X) se marcan los 20 nucleótidos del inserto con los que hibrida el primer reverse (oligonucleótido antisentido de cada sitio blanco) y en amarillo la secuencia con la que hibrida el primer T7. El producto teórico de la amplificación es de 492pb.

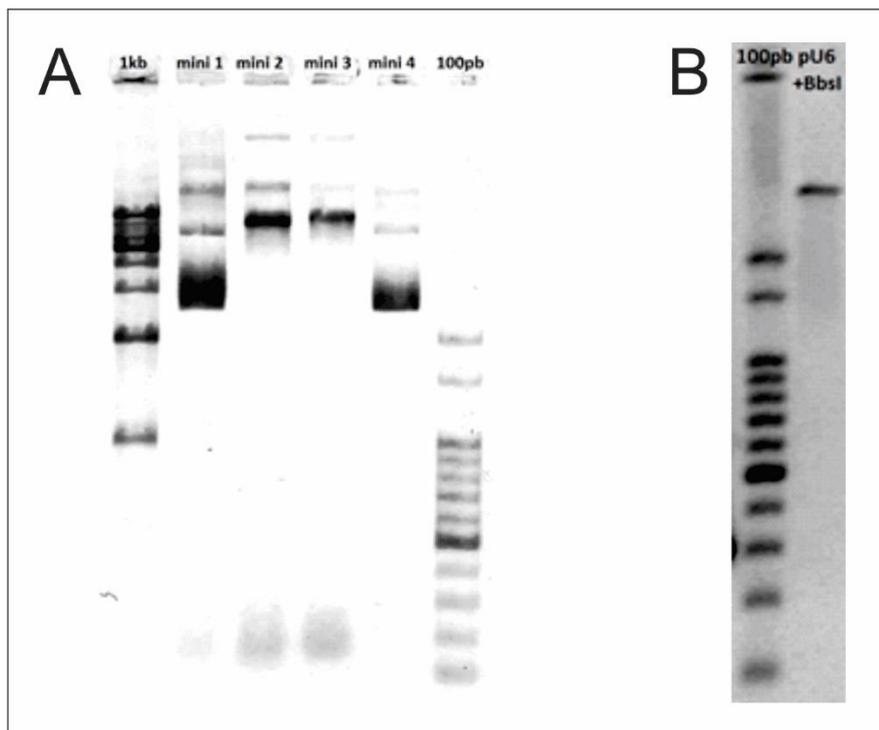


```

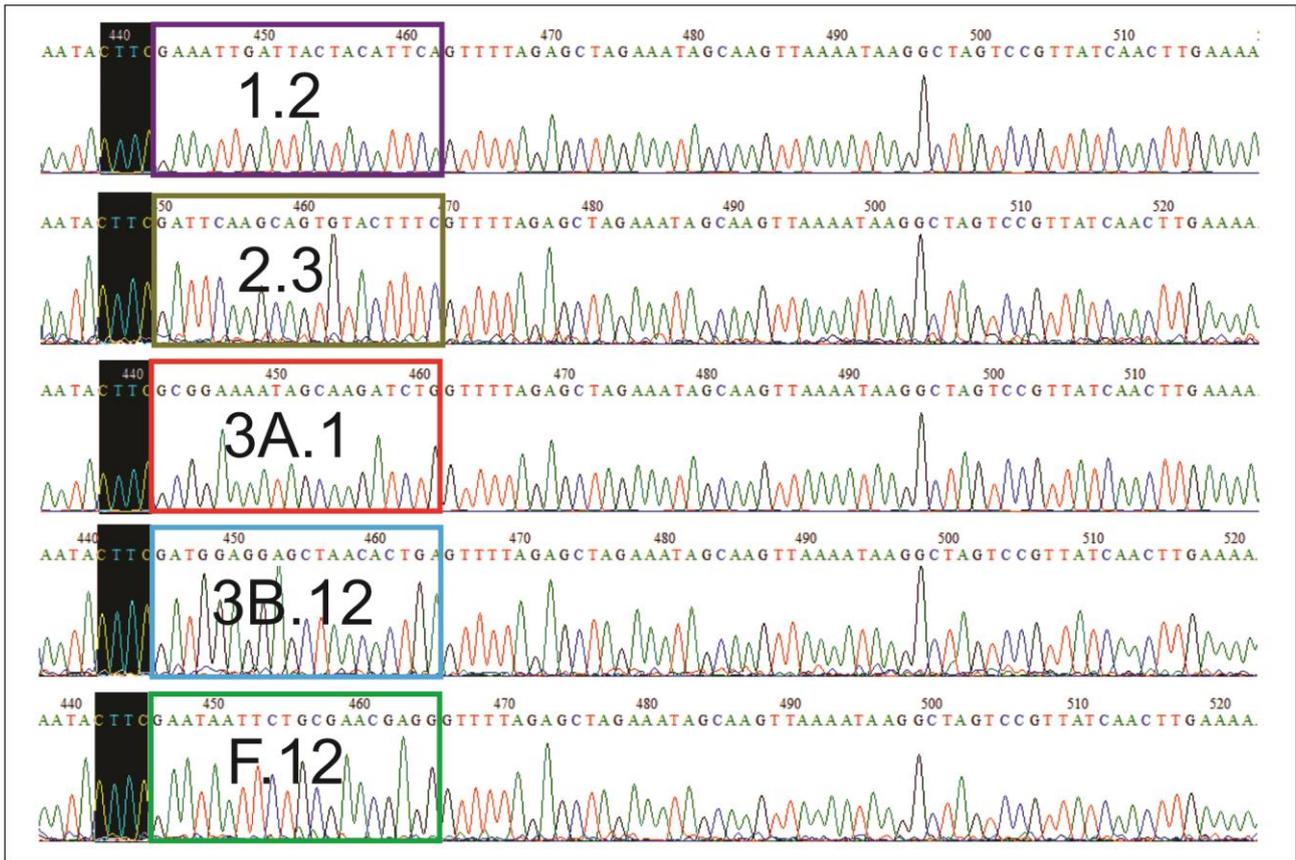
>X:6234528..6238545
ccctaaacctaaagctgtatgtacttgtatgtaatatcgaaacacacaaaaagcaacaaaaaaatcacaaaagaacatga
aaagaatgcacttcaaatatgaaaacaattcaaaatgaaactcttgatTTTTTTTTTcgaaaccattgaaacttggaat
tcatcgatTTtatatagTTaataactacctatatcgtgctaacaacaaaaaggcgccggttaagtgtaatgcaactaa
aaacataaaaaagcaaaacatatgcatatgaaatataatcgaaaaattatacaaatgctaagaaaaaggagaatcacaaa
agttgTTTTatgctgctTTTTgcaaaaaaaaaaataattgaaaatgaaaatgaaaaccggaaaattaggctatacttaa
tatacatacaaattaaactgtatattgTTTaaattgaaatataaatgagtggtgacgcttggcacaacaaaagtaaaccaa
accataaacaatccaaaaagagaaaaaaacgaaacaaaaaaagcaagaaaaataactaattacgctaaggagc
agaagaatcggagtaattcggaaaactactatacgaatctaattgTTTTgcatgtaagttctatgaaatgtcccacctgc
ctgatgtccccgcttcaagaaaatgcctagatgcaatccacacctcccccccccccccaagctaccgctgatttgcac
cgccccctcccaactacccaacacctcgccaaggctcgttgggggaattTTTTgtgcatgtagtgacttctatgtccatcg
atccgcccataattgTTaacatttgtatcggTTattaacgtagttgTTgtgtatgtatgtaagatgtaaatgt
gtgcttaccCCAatgccagcgcacgccccgccccgctcccccttcgccaacctgagaaaaataacgattacgatta
acggtaaagatagcgatactcaattcttgttgttattggcagcgcagctctTTTTaagagctagtgatataatgatttat
ctcgtattcttctccaaaaatcagacgTTTTtagcaagcaaaaccacacacacacacacacacacacacacacacaccca
aacacacacacactaggacacaagagagtgatctccacgaaatgcttatattactatatagtatatacacacccatata
taaacagcgtataaaagattataaaagtatatatatataaaatcataccaattgtataacaccacttttcgagcagtg
aaattccaaaaccctatcatcatatagaagacgatacaaatccaaatgagacgtaacacttttgcctctcctcagttcca
tcaatcagttcaatgcccgatcttccgatcgttggatccttggTTtatcatccaacaccgaaaacaaatcgaatccatc
ataacgagcgaacgaaccgaatcgaatcgaacgaaatgaaatgaaatgTTgcatgtataaacactttagtagttta
ttattataattattattattattattattactactagattattacaatattattaagcgaaggacacatttTgtttaaacy
aaggaaggcaaacgaagaagcaaacaaaaatattataaatattcaaaaatgaaaactgacaaaattaatttaaataaaa
taatttattaataaacacatattataaaatgaaaaaaaaaaaaacaatccttactcataatcgagactTTtaagttaa
agcaccaaatgctgctgaattttataattatggggcaatatgatatcatatcatgatgaaagttgactgccttatacgc
tgaaatgcttcttaatgtccgccaagattcactgcagccccatggccaatttTgtgcgggcaaccttgggtgttccgag
ttccaaaTCAAAGTAACGGACGCCCTTGATCCCATTTGGGCTCCTTTTGCCGCCAGCTGATATCCGAGTGCCCATAGC
GATCATCATCATCTCGCTCGTTATATAATTCGCAATTCGGCGGGGCATgtggctccatttTggggacgagccgtgt
tcttgaattttacgcaacagttggcgccgcagcagcgtgatcttggctatatagccatgtcogatggcgctcaacctgcgg
aaccacacgaaccatctgcaccatcgaaccaaaccaaaccaaaccaaccgatccgatccatcccatccatcagca
tcgcatcgcacgcagcttTgggttcgcccactccaccgggagaggatcaataacagacaataatgtgcccgttg
tctaattgtaagaaccaacttccaatttccagagacatccgacatgagcgcataaccctgTcccacagctcggggaaaaac
tggtagcgcTgcaagatttagTTaatttccgaactatgatgggctagaaatgttccaatatgatttttacttatgcttc
atagttggaagtaactacgtatacgtaatTTTTTcagggcatagctaataaatcgcgtatacagaccgtTTtacctgt
TTTTaaacaaaaagtcatataaaatttgattgaaatacagttTgaaaatggTatctataattcttactTTTctttatgc
catagataatatttagaaaattcgaaaatttaggcctaatagttctgcatcttgcgccagttgtacgcgtgtgtggga
ctttcatttcgctgatcggTgcccAACctagaagccaaagatgcgatgcgaagcgggcccattcagcgtataaaagc
gcttTgaaacgcagctacatttccagttgcttcaaaattatcgcccAACcggcaccctcagcgaattgcgatcgt
tttcgaatcgttttccgaatcgttttccgagtagatccgTTTgtTTTTTTTTTTTTTTTTTgcttccaaaacagttttt
tccgtgcccattttctgagcttcaaacatgctcgttccTgggcaacacatccgatctggagTgcgaaaagaacgagtt
cccgaggcagcaccctcgggcacatcaccAACggtggccgcccacaagctctccgcccagccAACggtggacggacaag
cgggaggatgactccgattcggaggTctcgtcgcgggataatttccTgaccaaaggTggacatggcccactcatacgc
taatcataaaagccaggggattgcgattataatattatagcagTgcagggTgatctataatctatctatatctctatat
aacacctcctgtTTTTattatattattatgttccgagttatgttccagttagaatgctaattTgtaagggtttagaaaagca
agtaaccaattggaagcttataggataattTggataataactaataatttaacgtagcaatcaacagctcttcaacta
tcattaccatcccactaatctagtagttgaagagactaacacgtagcctaaccagaacgtaatcgtacttacaggcg
ccttccattgacccatcctacgagttgTccatggaacgggcccctcatctgcgagaagatggcattcaagggatg
cttcagcttgacaaaaaccgctacagggcattctgtTTaaattctcacatccagatgactatcagggcggTgttcaagaag
ggcttccacaaggTtaccggggcgcgattctaccgcaaggTgagcccacccacccacacccacatctccagtgattTgga
agggcattatggggcacaaggTatgtgccacagcagtgaggTtagaggTgcaacaccttctcgattcagctcgaatgtc
ctgagagagtatctatcataagtgtgactaaatcgtgcccacaaacatttcaaatTgtgatccaaaattTTaaattca
atactcaatgctTTaatggTTTcaaaatttctatccgaaattTgtagtaaaagtacaaaaataattTTaaattcgataag
ttcaaacgaaaatgttaccacttgcattcagtaactgagcaaattagaaaattatctattgaagatt

```

**Figura S3.** Secuencia nucleotídica correspondiente a la región genómica de sORF-7 (descargada de flybase.org/). En azul mayúscula se muestra el sORF-7. Los supuestos codones de inicio y terminación de traducción se muestran en negrita. También se indica en negrita un codón de inicio intermedio que también puede ser un sitio alternativo de inicio de traducción.



**Figura S4.** A. Electroforesis de minipreps realizadas a partir de la transformación del plásmido pU6. Cuantificación a partir del gel con image J. Miniprep 1: 101.3 ng/ $\mu$ l, Miniprep 2: 61.3 ng/ $\mu$ l, Miniprep 3: 42.1 ng/ $\mu$ l, Miniprep 4: 64 ng/ $\mu$ l. B. Purificación del plásmido pU6 cortado con BbsI. Concentración plásmido cortado: 15,43ng/ $\mu$ l. "100pb" indica la calle en la que se sembró el marcador de peso molecular (PB-L).



**Figura S5.** Cromatogramas de los clones me31B a inyectar. Solamente se muestra la región del cromatograma en la que se encuentra el inserto de 20pb correspondiente a cada clon (recuadros de colores).