



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Iztapalapa**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**“Regulación de Cas9 por las proteínas virales Tat y Rev para la inactivación del VIH-1”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**Doctor en Biología Experimental**

P R E S E N T A

**Mtro. Biol. Exp. Moisés Vergara Mendoza**

Matricula 2133801986

**Comité Tutorial**

**Directora**

Dra. Roxana Uri Miranda Labra  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

**Co-Directora**

Dra. Mónica Viveros Rogel  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

**Asesor**

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

**Jurado**

**Presidente:** Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

**Vocal:** Dr. Héctor Enrique Espinosa Arciniega

**Vocal:** Dr. Santiago Ávila Ríos

**Secretario:** Dr. Héctor Fernando Serrano

Iztapalapa, Ciudad de México, diciembre 2020

## Declaración de originalidad

El que suscribe **Moisés Vergara Mendoza**, con número de matrícula **2133801986** alumno del posgrado Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **“Regulación de Cas9 por las proteínas virales Tat y Rev para la inactivación del VIH-1”**

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante la comisión de posgrado para lo obtención del grado de doctor es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autorial y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 09 de septiembre del 2020.

Atentamente



**Moisés Vergara Mendoza**

## CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 09 de septiembre del 2020

Comisión Académica del Posgrado

Presente

El que suscribe **Moisés Vergara Mendoza** alumno con número de matrícula **2133801986**, del posgrado en **Biología Experimental** de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación "**Regulación de Cas9 por las proteínas virales Tat y Rev para la inactivación del VIH-1**" a desarrollar en la **Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán**, lo anterior en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiese ocasionarse a esta Casa de Estudios.



**Moisés Vergara Mendoza**



**“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.**

**Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 425730**

## Miembros del jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: **“Regulación de Cas9 por las proteínas virales Tat y Rev para la inactivación del VIH-1”** que presento **Moisés Vergara Mendoza**

El día 24 de septiembre del 2020

### Sinodales



**Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**

Adscrito a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa  
Laboratorio de Fisiología Celular.



**Dr. Héctor Enrique Espinosa Arciniega**

Adscrito al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas  
Laboratorio de Inmunología Integrativa



**Dr. Héctor Fernando Serrano**

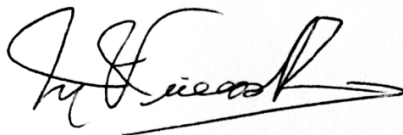
Adscrito a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa Lab. Biología  
Molecular y Regulación Endócrina Intragonadal.



**Dr. Santiago Ávila Ríos**

Adscrito al Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas del Instituto  
Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas

## Miembros del comité Tutorial



**Dra. Mónica Viveros Rogel**

Codirectora. Adscrita al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Departamento de Infectología. Laboratorio de Infectología.



**Dra. Roxana Uri Miranda Labra**

Codirectora. Adscrita a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Laboratorio de Fisiología Celular.



**Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz**

Asesor. Adscrito a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Laboratorio de Fisiología Celular.

## RESUMEN

**Introducción.** Desde la identificación del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) y del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA); se ha desarrollado un gran número de estrategias para combatir la infección, entre las cuales destaca por su eficacia el uso de los fármacos antirretrovirales. La terapia antirretroviral combinada (TARc) ha tenido un gran impacto en el tratamiento de la infección por el VIH-1; sin embargo, los problemas persistentes durante la infección, como la inflamación crónica, la activación inmunológica persistente, la formación del reservorio, la latencia viral, la resistencia y los efectos secundarios de los antirretrovirales, han conducido al diseño de nuevas estrategias dirigidas a erradicar al reservorio viral. La edición del genoma mediante el sistema CRISPR/Cas9 se ha convertido en una herramienta eficaz para eliminar la infección por VIH-1 o para prevenir su replicación, debido a su fácil programación que depende de un ARN guía (ARNg) que le permite identificar a una secuencia específica del ADN e inducir un corte doble. Además, cuando se seleccionan a más de un ARNg se puede escindir al ADN en varios fragmentos. No obstante, existen riesgos inherentes a la edición génica como la posibilidad de inducir mutaciones inespecíficas y que limitan la aplicación de estas estrategias moleculares en humanos, hasta establecer protocolos seguros. La selección de blancos específicos mediante el uso de programas bioinformáticos y la inducción de mutaciones únicamente en las células infectadas, pueden ayudar a que la terapia génica basada en CRISPR/Cas9 sea segura, fácil y personalizada, evitando poner en riesgo la integridad de las células sanas.



**Objetivo.** Controlar la expresión de Cas9 con las secuencias reguladoras LTR, INS y RRE, e inducir su expresión en presencia del virus y dirigir mutaciones a los genes reguladores *tat* y *rev* para autorregular al sistema e inactivar al VIH-1.

**Metodología.** En este estudio, se aislaron las secuencias reguladoras LTR, INS y RRE del VIH-1 y se usaron para controlar la expresión de Cas9 en células HEK293. Se diseñaron ARNg para inducir mutaciones en las regiones conservadas de los genes reguladores *tat* y *rev* del VIH-1. Para verificar el efecto de los ARNg en la replicación viral, se evaluó el sistema pLCI-ARNg diseñado en un modelo de partículas de VIH-1 pseudotipado con VSV-G.

**Resultados.** Se demostró la autorregulación de la expresión del gen de Cas9 en presencia de las proteínas virales Tat y Rev y se comprobó la escisión de un fragmento de 2500 pb con una eficiencia del 90% y que incluye a los genes *tat*, *rev* y *env* del VIH-1. La concentración de la proteína p24 de la cápside viral en sobrenadantes de cultivo disminuyó hasta niveles indetectables cuantificados por un ensayo de ELISA, lo que sugiere la cura funcional del cultivo celular. Los ARNg diseñados confieren protección a las células en presencia del VIH-1, manteniendo la viabilidad y la proliferación celular.

**Conclusiones.** Se desarrolló una estrategia efectiva para regular la expresión de Cas9 cuya activación depende de las proteínas virales Tat y Rev mediante la adición de las secuencias reguladoras LTR e INS-RRE del VIH-1, además de la autorregulación proporcionada por los ARNg. La edición múltiple dirigida a los genes

*tat* y *rev* sugiere que es una estrategia confiable y precisa para eliminar la infección *in vitro* por el VIH-1 y cuyo efecto se restringe a las células infectadas.

**ÍNDICE GENERAL**

Miembros del jurado .....	i
Miembros del comité Tutorial .....	iii
<b>Resumen .....</b>	<b>iv</b>
<b>Índice general.....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de figuras .....</b>	<b>x</b>
<b>Índice de tablas .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<i>Terapia génica para la infección por VIH-1 .....</i>	<i>2</i>
<i>Sistema CRISPR/Cas9.....</i>	<i>4</i>
<i>Inactivación del genoma del VIH-1 por CRISPR/Cas9 .....</i>	<i>6</i>
<i>Control de la expresión génica del VIH-1 .....</i>	<i>14</i>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>21</b>
OBJETIVOS PARTICULARES .....	21
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
MATERIAL .....	23
1.-Líneas celulares.....	23
2.- Bacterias .....	24
3.- Plásmidos.....	24
4.-Estuches para la extracción y purificación del ADN .....	26
5.- Oligonucleótidos .....	27
6.- Enzimas.....	27
7.- Anticuerpos .....	28

<b>MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<i>Diseño de oligonucleótidos.....</i>	<i>30</i>
<i>Obtención de las secuencias reguladoras.....</i>	<i>33</i>
<i>Preparación del medio de cultivo RPMI 1640® suplementado.....</i>	<i>34</i>
<i>Cultivo de células 8E5.....</i>	<i>34</i>
<i>Obtención del promotor LTR del VIH-1.....</i>	<i>35</i>
<i>Obtención de la secuencia INS-RRE-LTR3'.....</i>	<i>36</i>
<i>Fusión de productos de PCR.....</i>	<i>37</i>
<i>Transformación de bacterias E. coli por choque térmico.....</i>	<i>38</i>
<i>Obtención de los plásmidos pLTR5', pIRL y pLCI.....</i>	<i>39</i>
<i>Cambio del promotor CAG por el LTR5'.....</i>	<i>39</i>
<i>Cambio de la señal de poliadenilación por la secuencia IRL a los plásmidos pCAGCas9 y p-LTR.....</i>	<i>41</i>
<i>Secuenciación de pLTR5, pIRL y pLCI.....</i>	<i>42</i>
<i>Análisis de la secuenciación.....</i>	<i>42</i>
<i>Diseño de los ARNg.....</i>	<i>42</i>
<i>Reprogramación del plásmido LCI.....</i>	<i>43</i>
<i>Evaluación de las secuencias reguladoras LTR e IRL.....</i>	<i>46</i>
<i>Preparación del medio de cultivo DMEM® suplementado.....</i>	<i>47</i>
<i>Cultivo de células HEK293.....</i>	<i>48</i>
<i>Procedimiento de la transfección de las células HEK293.....</i>	<i>48</i>
<i>Western Blot.....</i>	<i>50</i>
<i>Viabilidad celular.....</i>	<i>54</i>
<i>Ensayo de cristal violeta.....</i>	<i>54</i>
<i>Análisis de citometría de flujo.....</i>	<i>55</i>
<i>Infeción de las células MT2.....</i>	<i>56</i>
<i>Determinación del antígeno p24 de la cápside viral.....</i>	<i>56</i>
<i>Análisis Estadístico.....</i>	<i>57</i>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>

Obtención de las secuencias reguladoras LTR, INS y RRE del VIH-1 .....	58
<i>Doble unión por PCR</i> .....	59
<i>Construcción del plásmido pLTR</i> .....	63
<i>Construcción de los plásmidos pIRL y pLCI</i> .....	64
<i>Análisis de la secuencia del promotor LTR5'</i> .....	65
<i>Análisis de la secuencia INS</i> .....	69
<i>Análisis de la secuencia RRE</i> .....	72
<i>Análisis de la secuencia LTR3'</i> .....	73
<i>Estructura de los plásmidos</i> .....	74
Evaluación del control de la expresión génica por las secuencias LTR e IRL.....	74
<i>Curva de titulación de los plásmidos pLCI y pCV1</i> .....	79
Inhibición de la expresión de GFP por los ARNg.....	81
Inhibición de la replicación del VIH-1 por ARNg.....	85
<i>Viabilidad</i> .....	91
<i>Ensayo de infección de MT2</i> .....	95
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>97</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>104</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>105</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura general del sistema CRISPR/Cas9.	5
<b>Figura 2.</b> Estructura general del genoma del VIH-1.	7
<b>Figura 3.</b> Resumen de ARNg dirigidos al LTR5' del VIH-1.	8
<b>Figura 4.</b> Principales blancos génicos para el VIH-1.	12
<b>Figura 5.</b> Estrategias de edición del genoma viral por Cas9.	13
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática del promotor LTR del VIH-1.	15
<b>Figura 7.</b> Regulación de la expresión génica del VIH-1.	17
<b>Figura 8.</b> Esquema de la regulación propuesta.	19
<b>Figura 9.</b> Diseño experimental	29
<b>Figura 10.</b> Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del promotor LTR del VIH-1.	30
<b>Figura 11.</b> Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las secuencias reguladoras INS, RRE y LTR3' del VIH-1.	32
<b>Figura 12.</b> Estructura y alineamiento de los oligonucleótidos para programar el ARNg en el plásmido PX458.	44
<b>Figura 13.</b> Esquemización de la estrategia para comprobar la programación del plásmido LCI con la secuencia de los ARNg.	45
<b>Figura 14.</b> Esquema que indica la posición de los ARNg en los exones de los genes tat y rev y la posición en la que se unen los anticuerpos monoclonales Anti-Tat y Anti-Rev.	51
<b>Figura 15.</b> Esquema que indica la posición de los ARNg dirigidos contra los genes tat y rev y el sitio de unión de los oligonucleótidos usados para amplificar y secuenciar a los genes tat y rev del VIH-1.	53
<b>Figura 16.</b> Estrategia para obtener las secuencias reguladoras LTR, INS y RRE del VIH-1.	59
<b>Figura 17.</b> Diseño de la estrategia para la fusión de productos por PCR.	60
<b>Figura 18.</b> Fusión de productos de PCR correspondientes a las secuencias reguladoras INS, RRE y LTR3'.	61
<b>Figura 19.</b> Comprobación de la identidad del producto IRL.	62

<b>Figura 20.</b> Construcción del plásmido pLTR.	63
<b>Figura 21.</b> Construcción de los plásmidos pIRL y pLCI.	64
<b>Figura 22.</b> Alineamiento de la secuencia de referencia correspondiente al LTR.	66
<b>Figura 23.</b> Análisis de las mutaciones del promotor LTR5'.	67
<b>Figura 24.</b> Predicción de la estructura secundaria de la secuencia TAR.	68
<b>Figura 25.</b> Mutaciones encontradas en la secuencia IRL.	70
<b>Figura 26.</b> Alineamiento de la secuencia INS.	71
<b>Figura 27.</b> Estructura secundaria del RRE.	72
<b>Figura 28.</b> Estructura secundaria de la señal de poliadenilación.	73
<b>Figura 29.</b> Representación esquemática de la estructura de los plásmidos.	74
<b>Figura 30.</b> Inhibición de la expresión génica por las secuencias reguladoras LTR, INS y RRE.	76
<b>Figura 31.</b> Regulación de la expresión génica por las proteínas Tat y Rev.	77
<b>Figura 32.</b> Regulación del gen GFP dependiente de la presencia de las proteínas Tat y Rev.	79
<b>Figura 33.</b> Reactivación de la expresión de GFP dependiente de la concentración de pCV1.	80
<b>Figura 34.</b> Secuencias de los ARNg para la inactivación de los genes tat y rev del VIH-1.	81
<b>Figura 35.</b> Programación de las secuencias de los ARNg en pLCI.	82
<b>Figura 36.</b> Inhibición de la expresión del gen GFP por los ARNg.	84
<b>Figura 37.</b> Producción del VIH-1 pseudotipado con VSV-G.	85
<b>Figura 38.</b> Inhibición de la replicación del VIH-1 por los ARNg.	86
<b>Figura 39.</b> Escisión del genoma viral por los ARNg.	88
<b>Figura 40.</b> Gráfica que representa el porcentaje de plásmidos que contienen los productos de PCR de 444 pb, 558 pb y 3000 pb que se obtuvieron por el efecto de los ARNg1-3.	89
<b>Figura 41.</b> Secuencia representativa del corte del genoma viral por los ARNg.	90
<b>Figura 42.</b> Imágenes de las células HEK293 transfectadas con los plásmidos pLCI, pLCI-ARNg1-3, pLCI-ARNg1-3 /pNL4-3/pVSVG y pLCI/pNL4-3/pVSVG.	92

<b>Figura 43.</b> La transfección de pLCI-ARNg 1-3 no mostró cambios en la viabilidad celular y protege a las células de la muerte causada por el virus codificado en pNL4-3.	93
<b>Figura 44.</b> Ensayos de viabilidad celular.	94
<b>Figura 45.</b> Ensayo de infección en células MT2.	96
<b>Figura 46.</b> Representación esquemática de la regulación de la expresión de Cas9 y GFP mediada por Tat y Rev.	103



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados para la obtención del LTR.	30
<b>Tabla 2.</b> Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las secuencias reguladoras.	31
<b>Tabla 3.</b> Secuencias y características de los oligonucleótidos adicionales para la amplificación, verificación y secuenciación.	33
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos usados para obtener los pre amplificados de las secuencias INS, RRE y LTR3'.	36
<b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos usados para obtener las secuencias INS, RRE y LTR3'.	37
<b>Tabla 6.</b> Oligonucleótidos usados para la secuenciación de pJetLTR y pJetIRL.	42
<b>Tabla 7.</b> Oligonucleótidos que contienen las secuencias de los ARNg usados para programar pLCI.	44
<b>Tabla 8.</b> Oligonucleótidos usados para la comprobación del plásmido LCI programado con la secuencia de los ARNg.	45
<b>Tabla 9.</b> Plásmidos usados para transfectar a las células HEK293 y evaluar la regulación de las secuencias LTR, INS y RRE.	49
<b>Tabla 10.</b> Concentraciones usadas para evaluar la sensibilidad de los plásmidos pLCI y pCV1.	49
<b>Tabla 11.</b> Plásmidos usados para transfectar a las células HEK293 y evaluar el efecto de los ARNg (1-3) con pCV1.	50
<b>Tabla 12.</b> Plásmidos usados para evaluar el efecto de los ARNg (1-3) con pNL4-3. Se indican las concentraciones de los plásmidos usados para transfectar a las células HEK293.	52
<b>Tabla 13.</b> Secuencia de los oligonucleótidos usados para amplificar y secuenciar los genes tat y rev del VIH-1.	53.

## INTRODUCCIÓN

La infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) que produce, continúan siendo un problema de salud importante a nivel mundial a pesar de los avances significativos en el diagnóstico, la prevención y en el tratamiento de la enfermedad.

La terapia antirretroviral combinada (TARc) ha sido muy efectiva para controlar la replicación del VIH-1 y tiene un efecto favorable en el pronóstico de la enfermedad. (Egger, y col., 2002; Dash y col., 2020). Está bien documentado que la TARc disminuye eficazmente la carga viral plasmática, lo que permite restaurar a un nivel subóptimo la población de los linfocitos TCD4+, manteniendo una infección crónica y latente controlada. Sin embargo, aún con la TARc se mantiene una viremia residual en el plasma que puede variar entre 1-39 copias/ml (Chen y col., 2013) y que puede contribuir a la estabilidad del reservorio, de tal forma que el virus permanece latente en el organismo (Blankson y col., 2002).

Cabe destacar que el establecimiento del reservorio viral es determinante para la progresión de la enfermedad, ya que una vez que se retira el tratamiento, la carga viral aumenta en unas pocas semanas, a niveles similares a los que presentan los pacientes vírgenes al tratamiento antirretroviral (Imamichi y col., 2001). Si se toma en cuenta la vida media de las células TCD4+ con infección latente, se estima que se

necesitarían alrededor de 60 años para agotar al reservorio viral principal (Siliciano y col., 2003).

Debido a que el tratamiento antirretroviral no logra una cura permanente de la infección por el VIH-1, al no poder eliminar al provirus que permanece en estado de latencia y a los problemas persistentes durante la infección como son la activación inmunológica y la inflamación crónica, así como la resistencia a los antirretrovirales y sus efectos secundarios, se han desarrollado nuevas estrategias moleculares encaminadas a erradicar al virus integrado para lograr una cura funcional o esterilizante.

### **Terapia génica para la infección por VIH-1**

En los últimos años, la terapia génica ha surgido como una alternativa al uso de los fármacos antirretrovirales (Pernet y col., 2016). Idealmente este tipo de terapia debe dirigirse a células progenitoras hematopoyéticas humanas, para producir un sistema inmune con múltiples linajes resistentes al VIH, que sean capaces de colonizar la sangre y los tejidos, para sustituir a las poblaciones celulares susceptibles a la infección (Pernet y col., 2016). Sin embargo, es necesario establecer un protocolo seguro y fácil de aplicar, que no presente ningún riesgo para la persona infectada.

Una alternativa de terapia génica para tratar la infección por VIH-1 es el uso de los ARNs de interferencia (ARNi) que inducen la degradación específica de las secuencias de los ARNm virales (Fire y col., 1998). Esta estrategia ha sido probada *in vitro* y se ha demostrado que los ARNi dirigidos a los ARNm virales, producen

células T resistentes al VIH-1 (ter Brake y col., 2009), en ensayos clínicos realizados en humanos (Levine y col., 2006). Se ha descrito que el uso de hasta tres ARNi dirigidos a los ARNm de los genes virales disminuye eficazmente la replicación viral sin causar toxicidad celular (Centlivre y col., 2013). Sin embargo, la degradación incompleta de los ARNm o la fijación de las mutaciones en el genoma viral impide que los ARNi sean eficaces a largo plazo.

Otras investigaciones se han enfocado en los sistemas de trasplante de células madre deficientes en el correceptor para el VIH-1, CCR5 (Allers y col., 2011) o en la edición del genoma con el uso de la Nucleasa con dedos de Zinc (ZFNs) o con la nucleasa con actividad similar a activador de transcripción (TALENs), para inducir mutaciones en los correceptores CXCR4 o CCR5, ofreciendo alternativas prometedoras (Yuan y col., 2012; Perez y col., 2008; Tebas y col., 2014; Ye y col., 2014). Sin embargo, la programación de estas nucleasas es compleja.

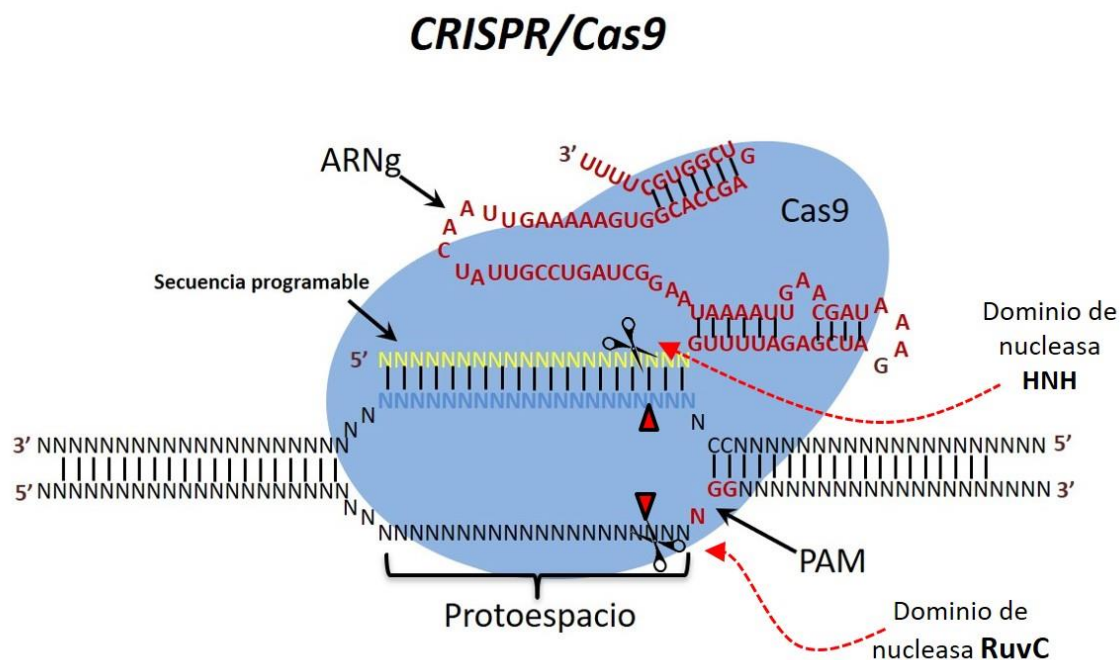
Recientemente, el sistema Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated (CRISPR/Cas) ha mejorado significativamente la perspectiva del uso de la terapia génica para el tratamiento de diversas enfermedades, ya que permite inducir mutaciones dirigidas a un blanco específico o incluso la extracción del genoma viral completo. Estas características brindan la posibilidad de establecer terapias personalizadas utilizando un sistema de entrega relativamente sencillo (Liang y col., 2016).

## Sistema CRISPR/Cas9

Las bacterias y las arqueas han desarrollado un sistema inmune adaptativo como defensa ante las infecciones de fagos u otros virus. Este sistema se ha encontrado en aproximadamente el 40% de las bacterias y en el 90% del genoma de las arqueas y se denomina CRISPR/Cas (Grissa y col., 2007). Su mecanismo de acción se basa en una nucleasa (Cas) capaz de realizar cortes al ADN de doble cadena y que está dirigida por un ARN guía CRISPR-ARN (crARN) programable (Terns y col., 2011). Existen más de 40 familias diferentes de proteínas Cas que se clasifican en tres tipos I, II y III (Makarova y col., 2011). CRISPR/Cas del tipo II necesita sólo a la proteína Cas9 que contiene un dominio de nucleasa HNH y un dominio similar a la nucleasa RuvC (Jinek y col., 2012).

El sistema CRISPR/Cas9 requiere de un crARN combinado con un crARN transactivador (tracrARN) que es parcialmente complementario a crARN para formar un complejo crARN-tracrARN capaz de guiar a Cas9 al sitio blanco, donde se requiere de un pequeño motivo denominado PAM, cuya secuencia puede variar de 2-4 nucleótidos y que es esencial para que el sistema de edición no realice cortes indeseables (Zhang y col., 2014). El sistema CRISPR/Cas9 más comúnmente empleado pertenece a *Streptococcus pyogenes* con la secuencia PAM de tres nucleótidos “NGG” donde N es cualquier nucleótido (Horvath y col., 2008; Jinek y col., 2012). Este sistema ha sido modificado para que la edición del genoma sea más fácil y eficiente de tal forma que los ARN guía (ARNg) sean ARN quiméricos que contienen todos los componentes esenciales del crARN y tracrARN en una sola

hebra y puedan ser programados para cualquier blanco (Jinek y col., 2012). En el núcleo de la célula, Cas9, el ARNg y el ADN diana forman un complejo. Los dominios HNH y RuvC de Cas9 cortan al ADN de doble cadena y ocurre un mecanismo de reparación por recombinación homóloga (HDR) o por unión de extremos no homólogos (NHEJ). (Tsai y col., 2016 ) (**Figura 1**)



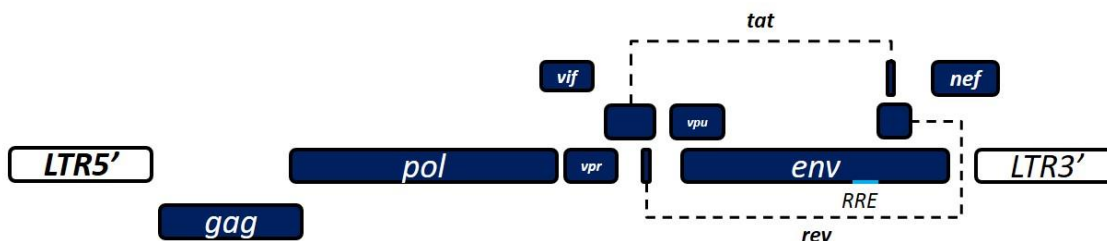
**Figura 1.** Estructura general del sistema CRISPR/Cas9 modificado para su aplicación. El sistema CRISPR/Cas9 está constituido por la nucleasa Cas9 asociada con un ARNg quimérico. Se indica en amarillo la secuencia programable, el protoespacio representa la secuencia blanco y la secuencia PAM (motivo adyacente al protoespacio) "NGG" que permite el corte de Cas9 en ambas cadenas.

CRISPR/Cas9 es una herramienta útil, versátil y robusta que permite identificar a blancos genéticos e inducir mutaciones de manera precisa, así como la regulación de la expresión génica en una célula sana o con alteraciones producidas por patógenos como los virus (Zhang y col., 2014). El sistema CRISPR/Cas9 puede ser codificado

en plásmidos que expresan Cas9 y el ARNg, para inducir modificaciones genéticas específicas en las células humanas e incluso inducir mutaciones en células madre pluripotenciales (Jinek y col., 2013; Hou y col., 2013). Recientemente CRISPR/Cas9 ha sido utilizado para erradicar la infección latente del VIH-1, dando como resultado la inhibición de la replicación viral o incluso su escisión parcial o total del genoma celular.

### **Inactivación del genoma del VIH-1 por CRISPR/Cas9**

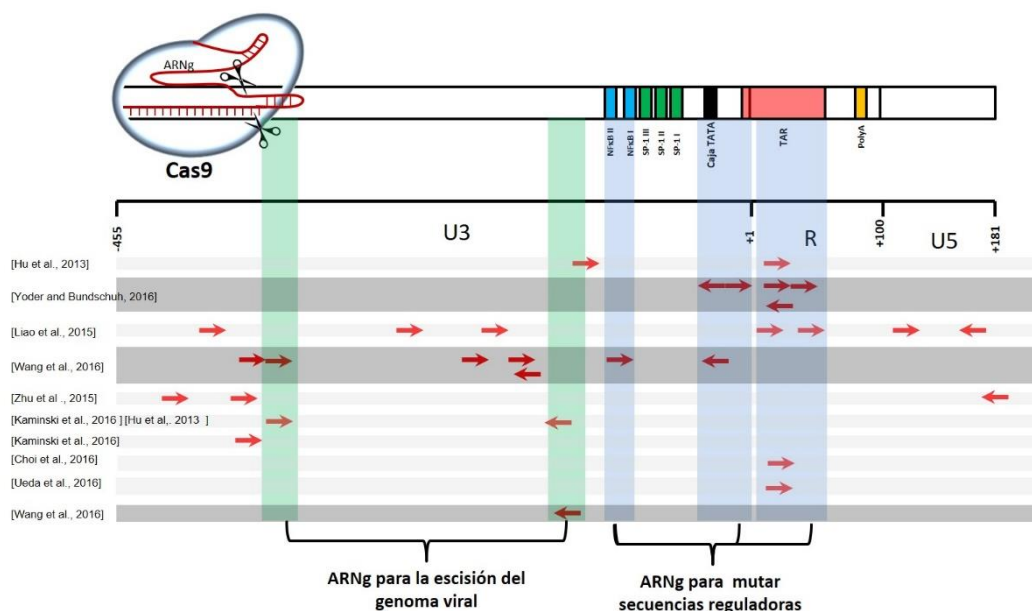
El VIH-1 es un retrovirus que se caracteriza por la transcripción reversa del genoma del ARN viral en ADN de doble cadena (ADNdc) y su integración en el genoma de la célula hospedera, constituyendo la forma proviral. El genoma del VIH-1 está compuesto de dos copias de ARN de cadena sencilla lineal, de polaridad positiva, con aproximadamente 9.8 kb, flanqueado por dos secuencias terminales repetidas (LTR) homólogas. El genoma viral codifica para 9 genes que producen 15 proteínas (Danielson y col., 2009). Consta de tres genes constitutivos principales, *gag* que codifica para las proteínas de la matriz y de la cápside; *env* codifica para las proteínas de la envoltura (gp120 y gp41); *pol* codifica para las enzimas transcriptasa reversa, proteasa e integrasa, cuatro genes accesorios *vif*, *vpr*, *vpu*, y *nef* y dos genes reguladores *tat* y *rev*, necesarios para la replicación del virus (**Figura 2**) (Frankel y Joung., 1998).



**Figura 2.** Estructura general del genoma del VIH-1, en rectángulos blancos se indican las secuencias correspondientes a los LTR y en azul los genes del VIH-1.

Uno de los blancos más utilizados y consistentes en los estudios realizados con el sistema CRISPR/Cas9 para erradicar al provirus latente, ha sido el promotor LTR (**Figura 3**), debido a que esta secuencia es capaz de regular la expresión génica y se encuentra flanqueando al genoma viral en los extremos 5' y 3'. Cabe destacar que el LTR5' y el LTR3' son secuencias homólogas y el dirigir un ARNg en una de estas regiones conduce a un doble rompimiento del ADN que puede traer como consecuencia la delección de casi todo el genoma proviral, y con ello la erradicación de la infección. Asimismo, al usar uno o dos ARNg que no tengan secuencias homólogas en el genoma celular, se pueden reducir los efectos de la edición génica en blancos inespecíficos.





**Figura 3.** Resumen de ARNg dirigidos al LTR5' del VIH-1. Se muestran con flechas rojas la posición y la dirección de los ARNg para inactivar al promotor del VIH-1; en rectángulos color verde se muestran los ARNg usados para la escisión del genoma viral completo; en color azul se indican los ARNg dirigidos a las secuencias reguladoras del promotor del VIH-1 y en color gris oscuro se indican los ARNg que han inducido la aparición de variantes resistentes a Cas9.

Desde el 2013 se han desarrollado diversas estrategias de edición del genoma del VIH-1 con el sistema CRISPR/Cas9 utilizando como blanco al LTR (Ebina y col., 2013). En el 2014 Kalili y colaboradores demostraron que la extracción del genoma proviral de las células infectadas es posible usando como blanco al LTR 5' y 3', tanto en líneas celulares, así como en cultivos primarios y más recientemente en modelos de animales transgénicos, entregando el sistema CRISPR/Cas9 con uso de la transfección hasta la transducción con vectores lentivirales y adenovirales. (Hu y col., 2014; Kaminski y col., 2016a; Kaminski y col., 2016b; Kaminski y col., 2016c).

Por otra parte, Wang y colaboradores en el 2016 reportaron que la edición génica realizada por CRISPR/Cas9 con ARNg dirigidos a las secuencias menos

conservadas del virus como la región U3 del LTR, dio origen al surgimiento de mutaciones de escape en tiempos cortos (10 a 15 días), en comparación con secuencias codificantes más conservadas (hasta 40 días) (Wang y col., 2016c).

Se ha encontrado que la variación genética del promotor LTR disminuye debido a la administración de la terapia antirretroviral sin embargo, pueden surgir hasta 20 mutaciones por año (Dampier y col., 2014; Dampier y col., 2016). Esta evidencia sugiere que para la estrategia de escisión del genoma del VIH-1 deben ser diseñados varios ARNg dirigidos al LTR, con el fin de lograr una escisión completa de todas las cuasiespecies del genoma proviral en pacientes con TARc. Sin embargo, la estrategia de entrega del sistema a todas las células que forman parte del reservorio sería complicada y no se podría garantizar su aplicación a todos los pacientes. También es importante considerar la actividad de los ARNg y la posibilidad de editar blancos inespecíficos (Dampier y col., 2014; Ishida y col., 2015).

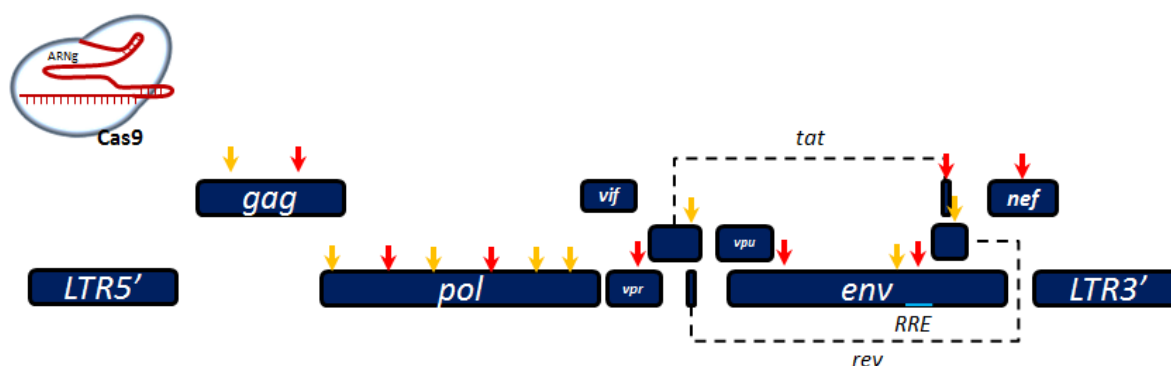
Otras investigaciones se han enfocado en dirigir los ARNg a secuencias no codificantes del LTR, con funciones esenciales en la replicación viral, así como en secuencias necesarias para la exportación nuclear. Tomando en cuenta la importancia de las secuencias de regulación como el promotor LTR, TAR y RRE, se han dirigido mutaciones para alterar su función y obtener como resultado una inhibición de la replicación viral como lo han demostrado varios grupos de investigación. Ebina H. y colaboradores en el 2013, demostraron que a través de varias transfecciones secuenciales del sistema CRISPR/Cas9 y ARNg dirigidos a secuencias de unión a NF $\kappa$ B y a la región TAR en las regiones U3 y R del LTR

respectivamente, indujeron una desregularización en la actividad del promotor llevando a la baja la expresión de un gen reportero (Ebina y col., 2013). Asimismo, Yoder y colaboradores en el 2016 encontraron que las mutaciones dirigidas a las secuencias TATA, TAR y RRE, disminuyen la expresión de los genes virales, así como la exportación de los mensajeros del núcleo al retículo endoplásmico para su posterior traducción. Sin embargo, también encontraron que las mutaciones inducidas daban lugar a la fijación de mutaciones de escape y por consecuencia, a la formación de variantes virales resistentes a la edición de Cas9 en un lapso de tiempo de 8 a 12 días después de la infección con dos cepas virales con distinta cinética de replicación. Además, sus resultados no mostraron evidencia de que los ARNg dirigidos a los LTRs indujeran una delección eficiente del genoma proviral como lo sugiere el grupo de Kalili (Yoder y col., 2016). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Canver y colaboradores, quienes mostraron que existe una relación inversamente proporcional entre la frecuencia de escisión, con el tamaño del fragmento eliminado, es decir, a mayor distancia a la que se encuentren dos ARNg, la frecuencia de delección es menor (Canver y col., 2017). Por lo tanto, las delecciones pequeñas del genoma viral podrían ser más eficientes y conducir a un mejor control de la replicación del virus.

Por otro lado, Yoder y Bundschuh sugieren que las mutaciones dirigidas a secuencias reguladoras no codificantes, no son tan eficientes para controlar la replicación viral por tiempo prolongado (Yoder y Bundschuh, 2016). Wang G y colaboradores en el 2016, encontraron resultados similares al realizar las mutaciones

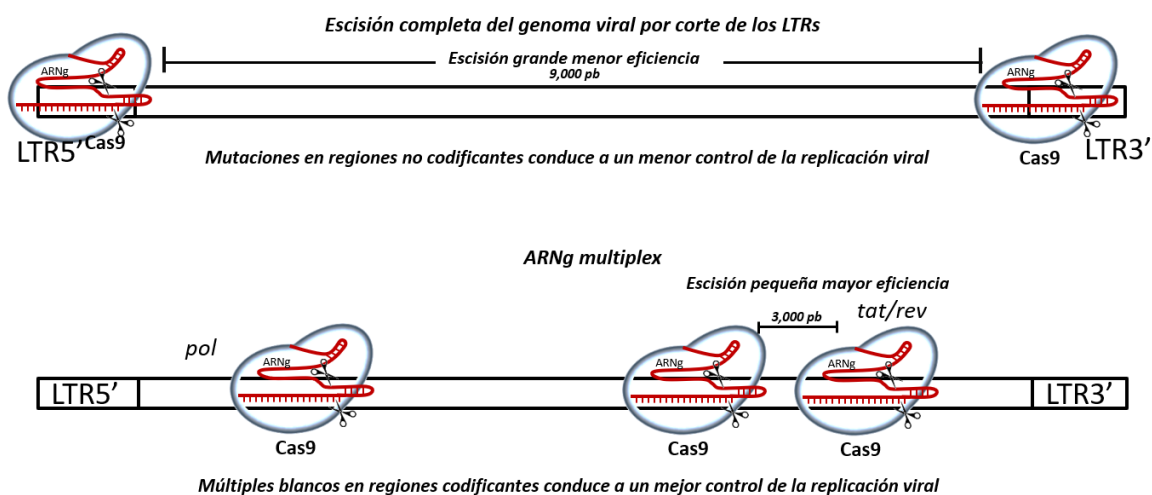
dirigidas al LTR obteniendo como resultado un control ineficiente en la replicación viral, en contraste con las mutaciones dirigidas a regiones codificantes conservadas tales como *gag*, *pol* y *tat/rev*, las cuales mantienen atenuada la replicación viral por mas tiempo (Wang y col., 2016b). Asimismo, Wang Z y colaboradores en el 2016, demostraron que las mutaciones dirigidas al LTR conducen a una inhibición de la replicación viral menos sostenida en comparación con los ARNg dirigidos a los genes *pol* y *rev* (Wang y col., 2016c). Se sabe que las inserciones y las deleciones que no son múltiplos de tres, conducen a un cambio en el marco de lectura y por lo tanto ocasionan un cambio en toda la proteína a partir del codón modificado, mostrando un efecto inhibitor mayor en comparación con las secuencias reguladoras no codificantes (Wang y col., 2016a; Yoder y Bundschuh, 2016).

Se han descrito más de 80 posibles secuencias blanco a lo largo del genoma viral y se han identificado al menos 10 sitios en las secuencias del gen *pol* y en las regiones que codifican para las proteínas Tat y Rev, que han demostrado ser eficientes para la inactivación del virus y la formación de nuevas partículas virales (Zhu y col., 2015) (Figura 4).



**Figura 4.** Principales blancos génicos para el VIH-1. Se indica con flechas amarillas los sitios más conservados donde la edición génica mediada por Cas9 conduce a un mayor control de la replicación y retrasa la aparición de variantes virales con resistencia a Cas9 por hasta 40 días después de la edición génica (genes *gag*, *pol* y *tat/rev*). Las flechas rojas indican la posición de las secuencias blanco que después de la edición génica inducen la aparición de variantes virales con resistencia a Cas9 en menos de 19 días.

La combinación de diferentes ARNg (múltiple) puede aumentar la potencia del sistema CRISPR/Cas9 para inhibir la replicación del virus, evitando al mismo tiempo el escape viral y la formación de variantes virales resistentes (**Figura 5**). Las combinaciones de dos o más ARNg dirigidos a los genes *pol*, *rev* y *tat* han mostrado ser hasta 24 veces más eficaces en su capacidad de inhibir la replicación viral, que cuando se utilizan otras combinaciones o un solo ARNg, por lo que estos blancos virales son ideales para atacar al VIH-1 (Zhu y col., 2015).



**Figura 5.** Estrategias de edición del genoma viral por Cas9. Se muestran los dos enfoques usados para inactivar al VIH-1. Las mutaciones inducidas en los LTR pueden escindir al genoma completo del VIH-1, sin embargo las mutaciones dirigidas a las secuencias codificantes conducen a un mejor control de la replicación viral.

Además del escape viral, otra limitación del sistema basado en CRISPR/Cas9 a considerar cuando se usan objetivos múltiples, es que puede inducir cortes fuera del objetivo debido a su expresión continua y generar cambios indeseables en las células (Cullot y col., 2019). El riesgo de realizar un corte fuera del sitio deseado puede reducirse mediante el uso de un software para hacer una selección rigurosa de los ARNg con un alto puntaje de especificidad. Un enfoque alternativo es controlar

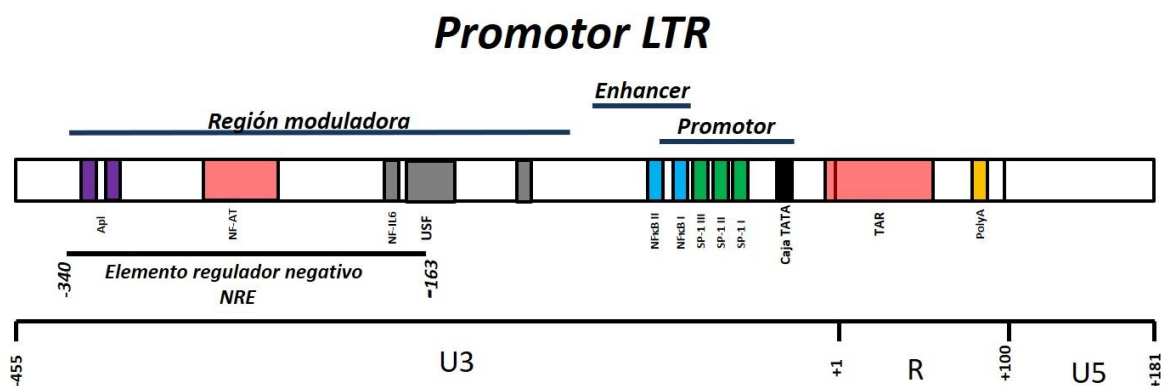
la presencia de la nucleasa Cas9 sólo en las células infectadas para disminuir la posibilidad de inducir mutaciones indeseables que puedan causar transformación o muerte celular (Cao y col., 2016).

### **Control de la expresión génica del VIH-1**

Una vez que el VIH-1 se integra en el genoma celular, inicia el proceso de replicación y expresión de sus genes que son controlados por secuencias reguladoras como el promotor LTR, secuencias inhibidoras (INS) y el elemento de respuesta a Rev (RRE) y las proteínas virales Tat y Rev que, en conjunto, promueven la expresión y el transporte de sus ARNm.

El LTR-5' del VIH-1 es un promotor que incluye a múltiples elementos de regulación que sirven como sitios de unión para iniciar la transcripción celular. El LTR se puede dividir en dos porciones únicas (U3 y U5) y una región repetida (R). Las regiones R y U5 son generalmente más conservadas que U3; esta última contiene una región moduladora para la unión de los factores de transcripción. En el segmento R se encuentran de una a dos regiones ricas en AT que proporcionan al LTR una o dos cajas TATA, una señal de poliadenilación (motivo AATAAA) y el elemento de respuesta a la transactivación (TAR) necesaria para la activación por Tat (Benachenhou y col., 2013; Feng y col., 1988; Harrich y col., 2000; Helga-Maria y col., 1999). El promotor está optimizado y contiene tres sitios de unión en tandem para SP1 (Jones y col., 1986), dos motivos de unión a NFκB (Nabel y col., 1987), una caja TATA (García y col., 1989), y una secuencia iniciadora (INR). Estos elementos participan de manera cooperativa para la unión del Factor de Transcripción II D

(TFIID), dando como resultado un promotor extremadamente eficiente y capaz de soportar altos niveles de transcripción, incluso más que el promotor tardío principal de adenovirus o el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) (McCoubrie y col., 2004; Karn y col., 2012) (**Figura 6**).



**Figura 6.** Representación esquemática del promotor LTR del VIH-1. Se indican los sitios de unión para los Factores de Transcripción y la región del promotor U3, R y U5.

Para promover la replicación viral en la infección temprana, el VIH controla la expresión de sus genes mediante las proteínas reguladoras Tat y Rev a nivel transcripcional y postranscripcional, respectivamente (Karn y Stoltzfus, 2012). Tat induce y aumenta la transcripción al estimular el alargamiento de los ARNm de LTR a través de ARN-TAR, que se ubica después del sitio de inicio de la transcripción (posición 453-513 de HXB2). TAR forma una estructura secundaria de ARN que recluta a la proteína viral Tat asociada con P-TEFb (un factor promotor de la elongación de los ARNm), lo que hace que Tat sea necesario para una replicación viral eficiente y cuya ausencia conduce a una latencia viral (Selby y col., 1989).



Una vez que comienza la transcripción regulada por P-TEFb-Tat-TAR, se generan más de 40 tipos de ARNm, los cuales se organizan por su tamaño en tres grupos: ARNm cortados y empalmados con tamaño aproximado de 1.8 kb, ARNm cortados y empalmados incompletamente de aproximadamente 4 kb y ARNm no cortados y empalmados de 9 kb. Estas últimas dos especies de ARNm contienen las secuencias de los genes *gag*, *pol* y *env* en las que se codifican secuencias inhibitoras (INS) además de un elemento de respuesta a Rev (RRE) de 351 nucleótidos (posición RRE-RNA 7710-8061 de HXB2), que una vez transcrito, forma un loop que se asocia con Rev, para ser transportados del núcleo al citoplasma y posteriormente traducidos (Malim y col., 1989; Karn y col., 2012; Daugherty y col., 2008; Schwartz y col., 1992a; Wolff y col., 2003). El transporte fuera del núcleo ocurre una vez que Rev se une al RRE e interactúa con Crm1 o exportina 1, la cual lleva a los ARNm a través de los complejos del poro nuclear para su traducción posterior (Karn y col., 2012) (**Figura 7**).

Las proteínas virales Tat y Rev son esenciales para la replicación viral y pueden regular la expresión de otros genes de forma similar.

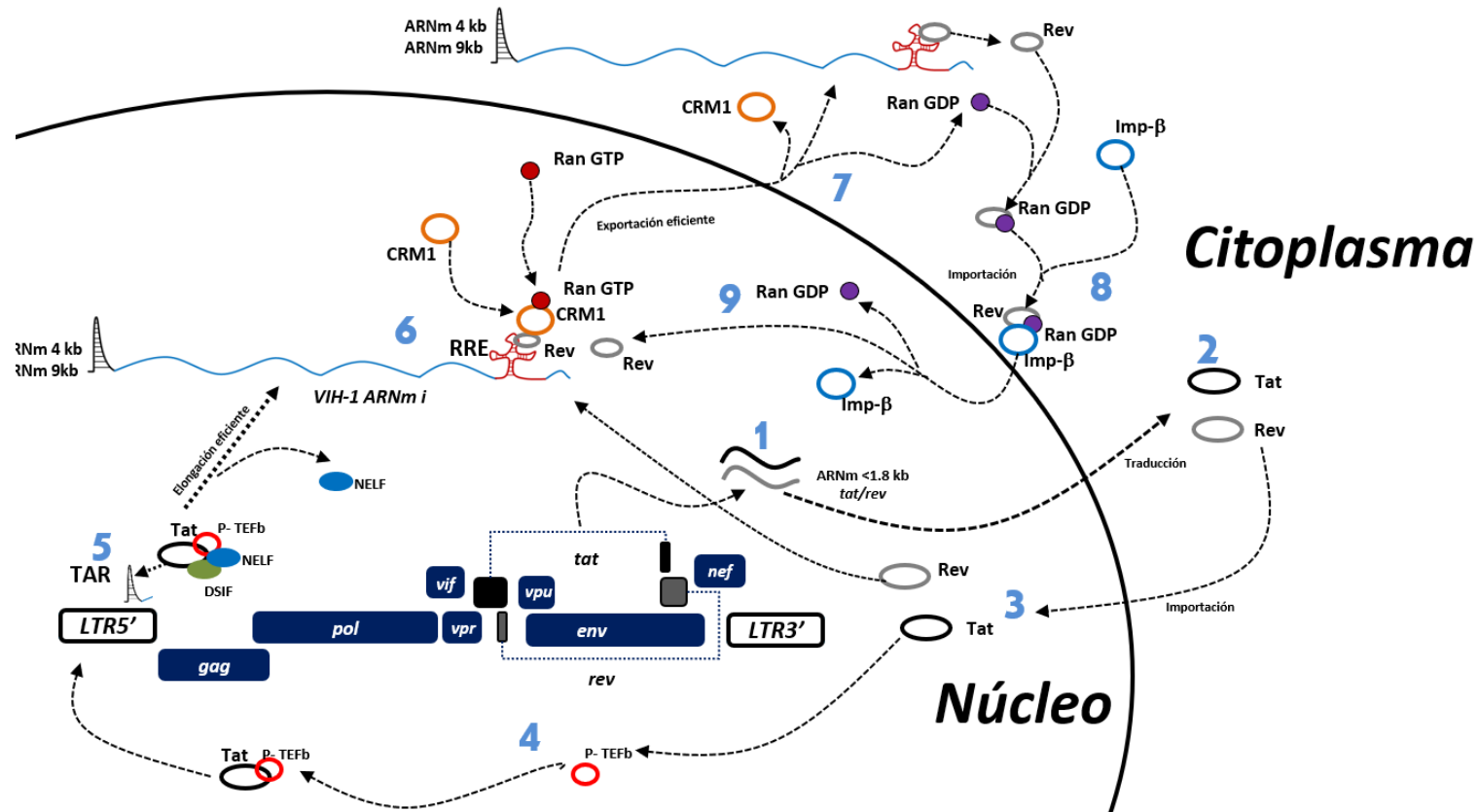


Figura 7 **Regulación de la expresión génica del VIH-1.** 1. Después de la integración del genoma viral inicia la transcripción de los ARNm pequeños (<1.8kb) en los que se codifican las proteínas reguladoras Tat y Rev del VIH-1. 2. Los ARNm de tat y rev son transportados al citoplasma donde son traducidos. 3. Las proteínas Tat y Rev son translocadas al núcleo mediante la señal de localización nuclear. 4. Tat recluta al factor promotor de la elongación P-TEFb para localizarlo en el promotor, debido a su afinidad con la secuencia TAR. 5. P-TEFb promueve la elongación de los ARNm del VIH-1 de tamaño mayor a 4.8 kb mediante la fosforilación del factor inhibidor de la elongación NELF, lo cual induce su disociación; DSIF es fosforilado y se convierte en un factor promotor de la elongación; P-TEFb fosforila a la ARN polimerasa aumentando su procesividad y se elongan todos los ARNm. 6. Los ARNm inmaduros son retenidos en el núcleo, en este momento REV se asocia con RRE y recluta a CRM1 (exportina 1) mediante su dominio de exportación nuclear y se recluta a Ran GTP para promover la exportación nuclear. 7. Después de salir del núcleo CRM1, Ran GDP, Rev y el ARNm se disocian, permitiendo la traducción del resto de las proteínas virales para la producción de nuevas partículas de VIH-1. 8. Rev inicia su regreso al núcleo celular mediante su asociación con Impβ y Ran GDP. 9. Rev es reciclado y reinicia el proceso de exportación de los ARNm del VIH-1.

El promotor LTR se ha usado para evaluar la infección de líneas celulares por varios aislados virales. Un ejemplo es la línea celular TZM-bl que contiene integrados los genes reporteros de la luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa dirigidos por el LTR y que pueden ser expresados en presencia de la proteína Tat del VIH-1 (Cara y col., 1996). Se ha demostrado además que el LTR puede regular la expresión de Bax, una proteína apoptótica usada para eliminar a las células infectadas por el VIH-1 (McCoubrie y col., 2004). De la misma manera, se ha reportado que el promotor LTR y las secuencias INS pueden regular la expresión de tBid, otra proteína apoptótica, respaldando la evidencia de que el VIH-1 puede inducir la muerte celular al modular la expresión de estos genes (Huelsmann y col., 2011). En conjunto, estas evidencias demuestran que las secuencias reguladoras del VIH-1 pueden modular la expresión de otros genes, con la dependencia a la presencia de las proteínas virales Tat y Rev.

En este trabajo se presenta el diseño, construcción y evaluación de una estrategia molecular que controla la expresión de Cas9 mediante las secuencias reguladoras LTR, INS y RRE, para inducir mutaciones únicamente en las células infectadas con el VIH-1. La edición múltiple por los ARNg dirigidos a los genes reguladores *tat* y *rev* permitió inactivar al sistema propuesto y abatir la replicación viral (**Figura 8**).

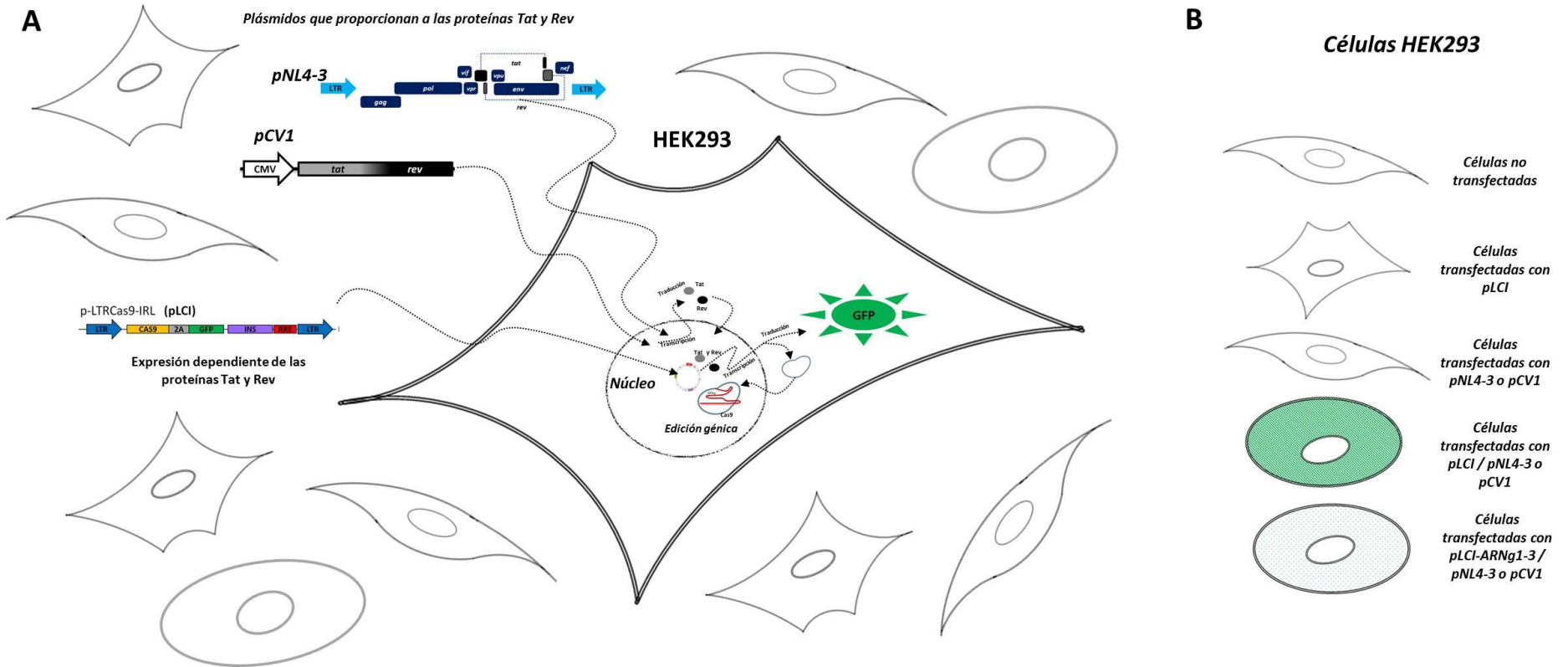


Figura 8 Esquema de la regulación propuesta. A) inducción de la expresión génica en pLCI mediada por pCV1 o pNL4-3. B) Posibles escenarios de la regulación de Cas9/GFP dependiente de la presencia de cada plásmido.

## JUSTIFICACIÓN

La TARc ha mejorado significativamente la calidad y la esperanza de vida de las personas infectadas con el VIH. Sin embargo, los efectos secundarios y la aparición de variantes virales resistentes, así como la persistencia de la infección por falta de una cura, siguen siendo factores importantes que justifican la exploración de opciones terapéuticas alternativas. El uso de CRISPR/Cas9 como una herramienta para inducir mutaciones en el genoma viral, ha permitido la eliminación y/o inactivación del virus y ofrece una oportunidad para la erradicación de la infección por el VIH-1. Sin embargo, se debe considerar la posibilidad de inducir mutaciones o cortes fuera del blanco deseado, por lo que la expresión de Cas9 de forma constante y su presencia en células no infectadas puede incrementar la posibilidad de realizar cambios no deseados en las células sanas o infectadas. Por lo tanto, el desarrollo de una estrategia capaz de controlar la presencia y la función de Cas9 ofrece una alternativa eficiente y segura.

## HIPÓTESIS

El uso de las secuencias reguladoras LTR, INS y RRE del VIH-1 para controlar la expresión de Cas9, puede conducir a la edición génica dependiente de la presencia del VIH-1.

## OBJETIVO GENERAL

Autorregular la expresión de Cas9 mediante las secuencias reguladoras LTR, INS y RRE del VIH-1 y abatir la replicación viral con el uso de ARNg dirigidos a los genes *tat* y *rev*.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Acoplar las secuencias LTR, INS y RRE al plásmido PX458 para controlar la expresión de Cas9/GFP.
- Evaluar el efecto de las secuencias reguladoras LTR, INS y RRE en la expresión del gen de Cas9/GFP.
- Evaluar la sensibilidad de la expresión de Cas9/GFP por las proteínas virales Tat y Rev del VIH-1.
- Autorregular la expresión de Cas9 mediante el diseño y el acoplamiento de ARNg dirigidos a los genes virales *tat* y *rev*.

- Examinar el efecto citotóxico de los ARNg.
- Inactivar la replicación *in vitro* del VIH-1 y verificar la eficiencia de la escisión del genoma viral por la edición múltiple con el sistema CRISPR/Cas9 diseñado.
- Evaluar el escape viral en presencia del sistema CRISPR/Cas9 diseñado.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### MATERIAL

#### 1.-Líneas celulares

Línea celular 8E5 de linfoblastos humanos, derivada de células CEM, que contiene una copia única defectuosa de la transcriptasa reversa (RT) del genoma del VIH-1, la cual no es infecciosa. La línea celular 8E5 se utilizó para aislar al promotor LTR y a las secuencias INS RRE y LTR3' del VIH-1. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640® suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Línea celular HEK 293 de riñón de embrión humano. Esta línea celular se utilizó para realizar las transfecciones de los plásmidos y para evaluar la expresión del gen de la proteína verde fluorescente (GFP). Carece del antígeno T del SV40. Las células se cultivaron en medio de cultivo DMEM® suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 1% de aminoácidos no esenciales 100X y 1 mM de piruvato de sodio, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

La línea celular MT2 proveniente de células T humanas aisladas a partir de linfocitos de sangre de cordón umbilical y co-cultivadas con células de pacientes con leucemia de células T adultas, se cultivaron en medio RPMI 1640® suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.



## 2.- Bacterias

La cepa *E. coli* Stbl3 se utilizó para la transformación y el aislamiento de los plásmidos que contienen los elementos de repetición o las secuencias retrovirales/lentivirales. Estas células se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina o 10 µg/ml de tetraciclina (para pCV1) como medio de selección a 37°C.

## 3.- Plásmidos

El plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP (pCAGCas9 o PX458) se obtuvo de Addgene (#48138, Ran y col., 2013). PX458 posee un gen de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias; además contiene la secuencia del gen hSpCas9 de *S. pyogenes* unido al gen de la GFP por la secuencia del péptido 2A, para la co-traducción de ambas proteínas. La expresión de ambos genes está dirigida por el promotor sintético CAG. El plásmido contiene también a las secuencias que se requieren para la expresión de los ARN guías.

**pLTR** se deriva de PX458 y contiene al promotor **LTR** del VIH-1. Se utilizó para analizar el efecto de la expresión del gen de Cas9 y GFP en presencia de la proteína viral Tat.

**pIRL** se deriva de PX458 y contiene a las secuencias INS-RRE-LTR3' (**IRL**) del VIH-1. Se utilizó para analizar el efecto de la expresión del gen de Cas9 y GFP en presencia de la proteína viral Rev.

**pLCl** se deriva de PX458 y contiene a las secuencias del promotor **LTR** e **IRL** del VIH-1. Se utilizó para analizar el efecto de la expresión del gen de Cas9 y GFP en presencia de las proteínas virales Tat y Rev.

**pLCl-ARNg (1-3)** se derivan de pLCl que fue programado con las secuencias de los ARNg dirigidos contra los genes *tat* y *rev*.

**pCV1** codifica para los genes *tat* y *rev* del VIH-1 bajo la expresión del promotor del CMV. El plásmido fue obtenido del NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pCV-1 del Dr. Flossie Wong-Staal (Número de catálogo: 303) (Arya y col., 1985). Este plásmido contiene un gen de resistencia a tetraciclina para su selección en bacterias.

**pNL4-3** contiene al genoma completo del VIH-1 y produce virus competentes del subtipo B clona molecular NL4-3. El plásmido fue obtenido del NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: HIV-1 NL4-3 Infectious Molecular Clone (pNL4-3) del Dr. Malcolm Martin (Número de catálogo: 114) (Adachi y col., 1986). Este plásmido contiene un gen de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias.

**pJET1.2/blunt Cloning Vector** (Thermo Scientific, EE.UU.) es un plásmido de selección positiva para la clonación de los productos de PCR (hasta 10 kb con extremo romo o cohesivo) generados con cualquier ADN polimerasa termoestable. El plásmido permite la transformación directa de cepas *E. coli* y contiene un gen letal que se interrumpe por la ligadura de un inserto de ADN en el sitio de clonación.

Como resultado de la transformación, sólo las células bacterianas con plásmidos recombinantes son capaces de formar colonias. Este plásmido contiene un gen de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias.

#### **4.-Estuches para la extracción y purificación del ADN**

Se realizó la extracción del material genético de las células con el estuche de extracción QIAamp DNA Blood Mini Kit® (QIAGEN, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los plásmidos fueron extraídos y purificados con el estuche Plasmid Midi Kit® (QIAGEN, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para purificar los productos de PCR se usó el estuche MinElute Reaction Cleanup Kit® (QIAGEN, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para purificar fragmentos de ADN contenidos en el gel de agarosa se usó el estuche MinElute Gel Extraction Kit® (QIAGEN, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La cuantificación del material genético y la determinación de su pureza se realizaron por espectrofotometría con el equipo Nanodrop 2000C®. La pureza del material genético extraído para realizar las transfecciones se determinó por la relación 260/280 y cuyo cociente fuera mayor a 1.8.

## 5.- Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos usados en este trabajo se solicitaron a la empresa Integrated DNA Technologies (IDT, [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)) para su síntesis. Se generaron alícuotas con concentración de 10 pmol/ $\mu$ l.

## 6.- Enzimas

**Platinum® Taq DNA Polimerasa** (Invitrogene, EE.UU.) es una enzima para PCR de alta fidelidad, ideal para obtener fragmentos largos y de alto rendimiento. Esta enzima tiene función de corrección 3'→5' con actividad de exonucleasa. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 200 nM de cada oligonucleótido (excepto en donde se indique otra concentración), 5% de DMSO y una concentración de Mg<sup>2+</sup> de 2.5 mM.

**Enzimas de restricción para el intercambio de las secuencias reguladoras:** *XhoI* (CTCGAG), *AgeI* (ACCGGT), *BsrGI* (TGTACA), *NotI* (GCGGCCGC) y *HindIII* (AAGCTT) todas de Thermo Scientific, EE.UU.

**Bpil (BbsI)** (5'GAAGAC N<sub>2↓</sub> 3') ( 3'CTTCTG N<sub>6↑</sub> 5') (Thermo Scientific, EE.UU.) es una enzima de restricción usada para la programación de los ARNg.

**T4 DNA Ligase** (Thermo Scientific, EE.UU.) es una enzima usada para unir fragmentos del ADN.

**T4 PKN** (T4 Polynucleotide Kinase) (Thermo Scientific, EE.UU.) es una enzima usada para fosforilar oligonucleótidos.

## **7.- Anticuerpos**

Para detectar la presencia de las proteínas virales Tat y Rev mediante Western Blot (WB) se usaron los anticuerpos monoclonales HIV1 Tat antibody (MA1-71512, clone N1[TatN1], aa 71-81 KQPASQPRGDP subtipo B) y HIV1 Rev-1 antibody (MA1-71514, clone 10 [03-002], aa 34-40 TRGARRN subtipo B) (Thermo Scientific, EE.UU.).

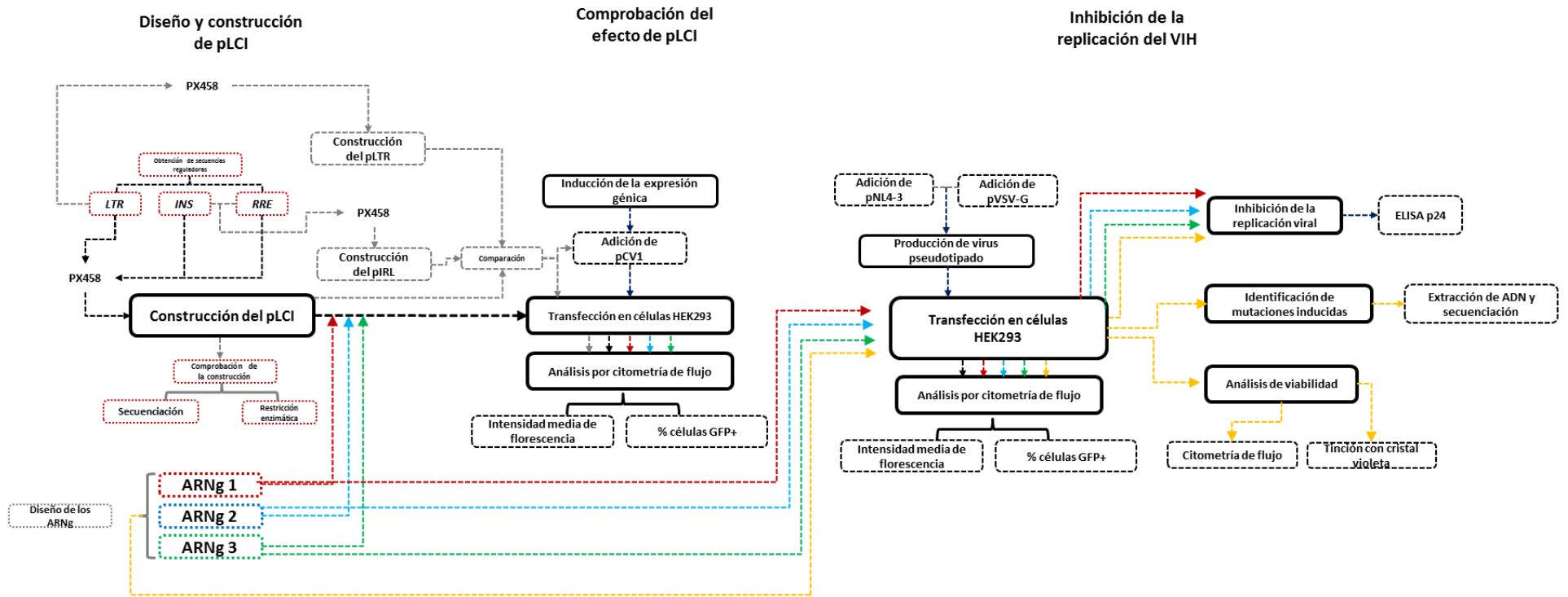


Figura 9 Diseño experimental

## MÉTODOS

### Diseño de oligonucleótidos.

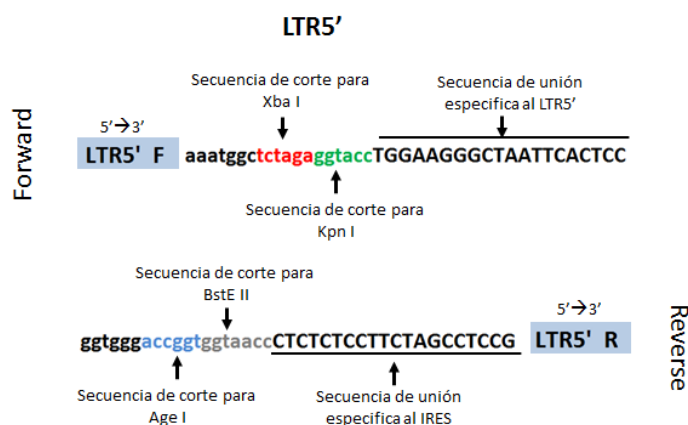
Se diseñaron oligonucleótidos con ayuda del software A plasmid Editor (ApE, M. Wayne Davis v2.0.47, EE.UU.), para amplificar las secuencias reguladoras del VIH-1 (LTR'5, INS, RRE y LTR3') tomando como referencia la secuencia de la cepa HXB2 y considerando los sitios de corte del plásmido PX458.

Las secuencias de los oligonucleótidos están ubicadas en los extremos de las secuencias reguladoras flanqueando a LTR5', INS, RRE y LTR3'. Cada secuencia fue diseñada como se describen a continuación:

**Promotor LTR5'**: la secuencia de los oligonucleótidos en sentido (forward) y antisentido (reverse) se diseñó flanqueando a las secuencias del VIH-1 correspondiente al promotor LTR (posición 1) y hasta la finalización de la secuencia IRES (posición 789). Así mismo, se agregaron secuencias de corte para las enzimas de restricción *XbaI-KpnI* y *AgeI-BstEII* en la posición 5' y 3' respectivamente (ver **Tabla 1 y Figura 8**).

**Tabla 1.** Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados para la obtención del LTR. F=forward (sentido), R= reverse (antisentido).

NOMBRE	SECUENCIA 5'→3'	TAMAÑO	% GC	TM
LTR5' F	AAATGGCTCTAGAGGTACCTGGAAGGGCTAATTCCTCC	39	48.7	65.6
LTR5' R	GGTGGGACCGGTGGTAACCCTCTCTCCTTCTAGCCTCCG	39	64.1	71



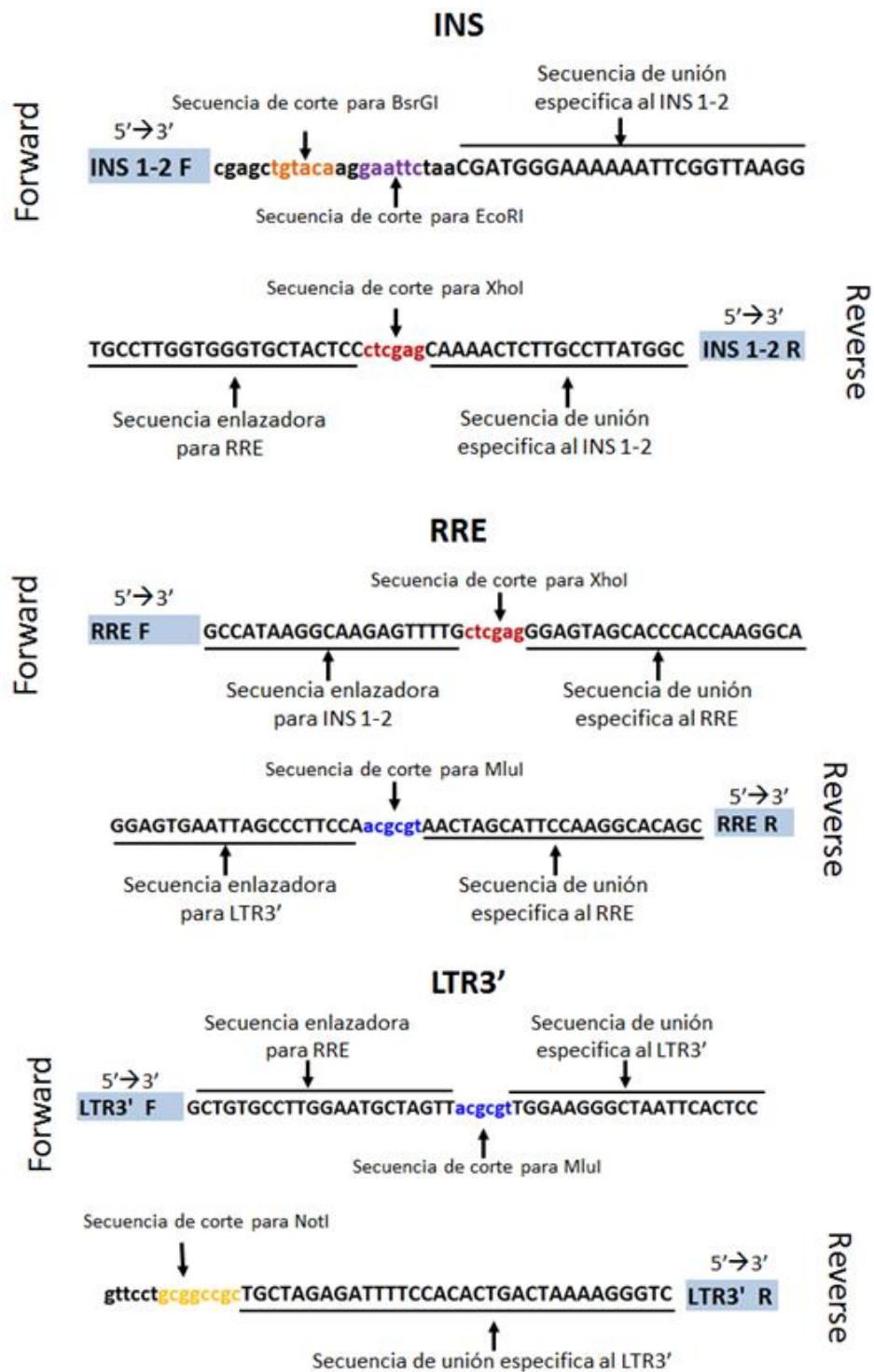
**Figura 10.** Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del promotor LTR del VIH-1. Se indican con color los sitios de corte adicionados y en mayúsculas la secuencia de unión a la secuencia blanco.

**Secuencias INS, RRE y LTR3':** las secuencias de los oligonucleótidos forward y reverse se diseñaron flanqueando a las secuencias del VIH-1 correspondientes al INS (posición 790 a 1878), RRE (posición 7710 a 8061) y LTR3' (posición 9086 a 9719). Se agregaron secuencias enlazadoras para unir todos los productos de PCR (**Tabla 2**) y se colocaron sitios de corte *BsrGI* en posición 5' del INS, sitios de corte *XhoI* y *MluI* flanqueando al RRE y *NotI* en posición 3' del LTR3' (**Figura 9**).

**Tabla 2.** Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las secuencias reguladoras INS, RRE y LTR3'. F=forward, R=reverse.

NOMBRE	SECUENCIA 5'-->3'	TAMAÑO	% GC	TM
INS 1-2 F	CGAGCTGTACAAGGAATTCTAACGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGG	46	41.3	64.6
INS 1-2 R	TGCCTTGGTGGGTGCTACTCCCTCGAGCAAACTCTTGCCATTATGGC	46	47.8	67.6
RRE F	GCCATAAGGCAAGAGTTTTGCTCGAGGGAGTAGCACCCACCAAGGCA	47	55.3	71.4
RRE R	GGAGTGAATTAGCCCTTCCAACGCGTAACTAGCATTCCAAGGCACAGC	52	42.3	66.3
LTR3' F	GCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTACGCGTTGGAAGGGCTAATTCACTCC	52	42.3	66.3
LTR3' R	GTTCTGCGGCCGCTGCTAGAGATTTCCACACTGACTAAAAGGGTC	47	53.2	69.5





*Figura 11. Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las secuencias reguladoras INS, RRE y LTR3' del VIH-1. Se indican con color los sitios de corte adicionales y en mayúsculas las secuencias enlazadoras y/o de unión a la secuencia blanco.*

Para amplificar y verificar las construcciones realizadas, se usaron los oligonucleótidos que se describen en la **Tabla 3**. Se realizó la secuenciación por el método de Sanger, de las secuencias reguladoras.

**Tabla 3.** Secuencias y características de los oligonucleótidos adicionales para la amplificación, verificación y secuenciación. En el nombre del oligonucleótido se indica el sentido de la secuencia (F=forward, R= reverse) y la posición en que se alinean para la cepa viral HXB2 del VIH-1.

OLIGONUCLEÓTIDO	CODIGO	SECUENCIA 5'→3'	Longitud	TM
F3-9352HXB2-LTR	F3	GACAGCCGCCTAGCATTTCATC	22	60°C
F4-9645HXB2-LTR	F4	GTGCCCGTCTGTTGTGTGACT	21	60°C
F5-335HXB2-LTR	F5	TCGAGCTTGCTACAAGGGAC	20	60°C
F6-796HXB2	F6	GCGAGAGCGTCAGTATTAAGC	21	60°C
F7-1268HXB2	F7	AAGAGAAGGCTTTCAGCCCAG	21	60°C
R0-1784HXB2	R0	GTCTTACAATCTGGGTTCGC	20	60°C
R1-1486HXB2	R1	GTTCTGCTATGTCACTTCC	20	60°C
R3-768HXB2	R3	CTCTCCTTCTAGCCTCCGCT	20	60°C
R4-408HXB2-LTR	R4	TATGCAGGATCTGAGGGCTCG	21	60°C
R5-124HXB2-LTR	R5	AGCTTGTAGCACCATCCAAAGG	22	60°C
R6-9327HXB2-LTR	R6	CCTCCACTCTAACACTTCTCTC	22	60°C

### Obtención de las secuencias reguladoras

Para obtener las secuencias reguladoras LTR, INS y RRE del VIH-1 se usó el genoma de las células 8E5 como templado para el PCR. Estas células tienen integrada una copia del genoma del VIH-1. Las células 8E5 se cultivaron como se indica a continuación.

### **Preparación del medio de cultivo RPMI 1640® suplementado**

Para el cultivo y el mantenimiento de las líneas celulares de linfocitos humanos 8E5 y MT2, se disolvió el medio de cultivo RPMI1640® en polvo en un volumen aproximado de 500 ml de agua bidestilada y se mezcló con un agitador magnético. Se adicionaron 2 g de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) y se ajustó el pH a  $7 \pm 0.2$  empleando ácido clorhídrico (HCl) 1 N. El medio de cultivo se aforó a 1 L con agua bidestilada, se esterilizó por filtración con membranas de  $0.22 \mu\text{m}$  y se almacenó a temperatura ambiente y protegido de la luz hasta su uso. Para cultivar a las células 8E5 y MT2, el medio RPMI1640® se suplementó con 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina. Al medio suplementado se le denominó R-10 y se almacenó a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso y se atemperó a  $37^\circ\text{C}$  en el momento de usarse.

### **Cultivo de células 8E5**

Para cultivar a las células 8E5 se usó el medio de cultivo R-10. Las células se cultivaron en botellas de cultivo a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml a  $37^\circ\text{C}$ , 85% de humedad y 5% de  $\text{CO}_2$ . El medio se cambió cada tercer día mediante la recuperación y centrifugación de las células en suspensión a  $805 \times \text{g}$  por 10 min. Posteriormente se descartó el medio de cultivo y las células se resuspendieron en la solución salina amortiguadora de fosfatos 1X (PBS 1X) para realizar el conteo celular en el hemocitómetro o cámara de Neubauer. Una vez realizado el conteo celular, se ajustó la concentración de las células a  $1 \times 10^6$  células /ml en el medio R-10 y se

continuó el cultivo. Se realizó la extracción del material genético de  $1 \times 10^7$  células con el estuche de extracción QIAamp DNA Blood Mini Kit® (QIAGEN, EE.UU.).

### **Obtención del promotor LTR del VIH-1**

Para obtener al promotor LTR del VIH-1 se realizó una primera PCR de punto final utilizando los oligonucleótidos LTR5' F y R1 (Tabla 1 y Tabla 3), correspondiente al producto pre-LTR, un fragmento de 1525 pb que contiene a la secuencia correspondiente al promotor LTR. Se utilizaron 300 ng del material genético de las células 8E5.

La PCR se realizó con el estuche Platinum® *Taq* DNA Polymerasa High Fidelity, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de la PCR para obtener el producto que contiene la secuencia del promotor fueron las siguientes: un ciclo de 2 min a 95°C, 25 ciclos de 15 seg a 95°C, seguido de 15 seg a 60 °C y 90 seg a 68°C y finalmente un ciclo de 7 min a 68°C. Al terminar el ciclo de amplificación, la reacción se mantuvo a 4°C. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr® Safe DNA gel stain (Invitrogene, EE.UU.).

Posteriormente se realizó una segunda PCR semi-anidado para la obtención del promotor LTR, para lo cual se agregó 1 µl de la reacción anterior y los oligonucleótidos LTR5' F y LTR5' R, para obtener un fragmento de 827 pb. Las condiciones de la PCR para la obtención del promotor fueron las siguientes: un ciclo de 2 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 seg a 95 °C, seguido de 15 seg a 64 °C y 60 seg a 68°C y finalmente un ciclo de 7 min a 68°C. Al terminar el ciclo de amplificación, la

reacción se mantuvo a 4°C. El producto de la PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% y teñido con Sybr® Safe DNA gel stain (Invitrogene, EE.UU.). Una vez obtenido el LTR5' se purificó en columnas del estuche MinElute Reaction Cleanup Kit® (QIAGEN, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Obtención de la secuencia INS-RRE-LTR3'

Para obtener productos individuales de las secuencias INS, RRE y LTR3' se realizó una preamplificación usando como templado 300 ng de ADN de las células 8E5 y los oligonucleótidos que se describen en la **Tabla 4**.

*Tabla 4. Oligonucleótidos usados para obtener los pre amplificados de las secuencias INS, RRE y LTR3'.*

Producto	Forward	Reverse	Tamaño
Pre-INS	F3'	INS R	1612 pb
Pre-RRE	RRE F	R7	1121 pb
Pre-LTR3'	F2	LTR3' R	818 pb

La PCR se llevó a cabo usando el estuche Platinum® Taq DNA Polymerasa High Fidelity siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: un ciclo de 2 min a 95 °C, 25 ciclos de 15 seg a 95 °C, seguido de 15 seg a 60 °C y 90 seg a 68°C y finalmente un ciclo de 7 min a 68°C. Al terminar el ciclo de amplificación, la reacción se mantuvo a 4°C. Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr® Safe DNA gel stain (Invitrogene, EE.UU.).

Se realizó una segunda PCR semi-anidado tomando 1  $\mu$ l del producto obtenido anteriormente (pre-INS, pre-RRE y pre-LTR3') y los oligonucleótidos correspondientes para cada fragmento deseado (**Tabla 5**). Las condiciones de la PCR para la obtención de los productos deseados fueron las siguientes: un ciclo de 2 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 seg a 95 °C, seguido de 15 seg a 65 °C y 60 seg a 68°C y finalmente un ciclo de 7 min a 68°C. Al terminar el ciclo de amplificación, la reacción se mantuvo a 4°C. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con Sybr® Safe DNA gel stain (Invitrogene, EE.UU.).

*Tabla 5 Oligonucleótidos usados para obtener las secuencias INS, RRE y LTR3'.*

Producto	Forward	Reverse	Tamaño
INS	INS F	INS R	1096 pb
RRE	RRE F	RRE R	410 pb
LTR3'	LTR3' F	LTR3' R	670 pb

Una vez obtenidos los productos correspondientes al INS, RRE y LTR3', se purificaron con columnas del estuche MinElute Reaction Cleanup Kit® (QIAGEN, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Fusión de productos de PCR

Para la unión de las secuencias INS-RRE-LTR3' (IRL) se realizó una PCR de punto final usando los oligonucleótidos INS F y LTR3' R (Tabla 3) a una concentración de 200 nM y 40 nM por reacción de PCR y 10 ng de cada uno de los productos INS, RRE y LTR3' purificados previamente. Los tres productos de PCR se usaron como

templados para obtener un producto final de 2076 pb. La PCR se llevó a cabo usando el estuche Platinum® *Taq* DNA Polymerasa High Fidelity de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las condiciones de termociclación fueron las siguientes: un ciclo de 2 min a 95 °C, 1 ciclo de 15 seg a 95 °C, seguido de 10 min a 64 °C y 4 min a 68°C, posteriormente se siguió con 25 ciclos de 15 seg a 95 °C, seguido de 15 seg a 64 °C y 2 min a 68°C, finalmente un ciclo de 7 min a 68°C y se mantuvo a 4°C. El producto de PCR se purificó con el estuche MinElute Gel Extraction Kit® (QIAGEN, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para verificar la identidad del fragmento obtenido se realizó una digestión simple con la enzima de restricción *HindIII*.

#### **Transformación de bacterias *E. coli* por choque térmico.**

Se usaron las bacterias *E. coli* Stbl3 para ser transformadas mediante choque térmico. Para este procedimiento se usaron 100 ng de cada plásmido o 5 µl de cada ligación y se mezclaron de manera uniforme con 50 µl de bacterias Stbl3 ultracompetentes previamente acondicionadas. La mezcla se incubó en hielo por 15 min, posteriormente 2 min a 42°C y 2 min en hielo. Después del choque térmico las células se colocaron en 1 ml de medio LB y se incubaron a 37°C con agitación por una hora. Finalmente se tomaron 200 µl de las células en suspensión y se sembraron en cajas Petri con agar LB, suplementado con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml o 10 µg/ml de tetraciclina (para pCV1) que se usó como medio de selección para favorecer el crecimiento de las células transformadas con el plásmido. Las

placas con las células se incubaron a 37°C por 16 hrs y las colonias que crecieron, se aislaron y se cultivaron nuevamente en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina o 10 µg/ml de tetraciclina (para pCV1) por 16 hrs a 37°C y en agitación constante. Después del cultivo, las células se cosecharon y los plásmidos se extrajeron con el estuche de extracción Plasmid Midi Kit® (QIAGEN, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Obtención de los plásmidos pLTR5', pIRL y pLCI**

Una vez obtenidos los fragmentos correspondientes al promotor LTR (827pb) y la secuencia de IRL (2076 pb), se usaron 100 ng de cada producto para ser clonados individualmente al plásmido pJET1.2/blunt Cloning Vector (plásmidos de transición pJetLTR5' y pJetIRL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las ligaciones pJetLTR5' y pJetIRL, se usaron para transformar bacterias *E. coli* Stbl3 mediante choque térmico. Las colonias que crecieron después de 16-24 h fueron aisladas y cultivadas en 5 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina por 16 h a 37°C y agitación constante. Se cosecharon las células y se realizó la extracción de los plásmidos para los siguientes experimentos.

### **Cambio del promotor CAG por el LTR5'**

El cambio de promotor del plásmido p-CAGCas9 (PX458) se llevó a cabo cortando los promotores CAG del plásmido PX458 y el LTR del plásmido pJetLTR. El corte se realizó con las enzimas de restricción *Xba*I y *Age*I (Thermo Scientific, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usó el buffer Tango 1X para favorecer



la doble restricción y 2  $\mu\text{g}$  de cada plásmido; la reacción se dejó incubando toda la noche a 37°C. Una vez finalizada la incubación, las restricciones se verificaron en un gel de agarosa al 1.5% y teñido con Sybr® Safe DNA gel stain (Invitrogene, EE.UU.).

A continuación, se realizó la purificación de las bandas correspondientes al plásmido PX458 sin promotor (S/P) y con el promotor LTR, utilizando el estuche MinElute Gel Extraction Kit® (QIAGEN, EE.UU.) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para obtener el plásmido pLTRCas9 (**pLTR**), se mezclaron 100 ng del promotor LTR5' con 300 ng del p-CAGCas9 S/P y se unieron con la ligasa T4 de Invitrogene, EE.UU. siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez obtenida la ligación se usaron 5  $\mu\text{l}$  para transformar bacterias *E. coli* Stab13 por choque térmico. Las colonias obtenidas fueron resembradas en medio LB suplementado con 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ampicilina y se incubaron a 37 °C Después de 12 hrs, se cosecharon las bacterias y se realizó la extracción del plásmido con el estuche de extracción Plasmid Midi Kit® (QIAGEN, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La verificación del plásmido pLTR, se realizó mediante una doble digestión con las enzimas de restricción *Xba*I y *Age*I (Thermo Scientific, EE.UU.), para obtener un patrón de bandeo específico. El procedimiento se llevó a cabo usando 1  $\mu\text{g}$  del plásmido pLTR. La restricción se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% y teñido con Sybr® Safe DNA gel stain (Invitrogene, EE.UU.).

## Cambio de la señal de poliadenilación por la secuencia IRL a los plásmidos pCAGCas9 y p-LTR

Para unir la secuencia reguladora IRL a los plásmidos p-CAGCas9 y p-LTRCas9 se retiró la secuencia de poliadenilación (PA) de ambos plásmidos mediante una doble digestión con las enzimas de restricción *BsrGI* y *NotI*, (Thermo Scientific, EE.UU.). Se usó el buffer Tango 2X y 2  $\mu$ g de cada plásmido. Se obtuvo la secuencia IRL del plásmido pJetIRL con el mismo procedimiento. La restricción se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% y teñido con Sybr® Safe DNA gel stain (Invitrogene, EE.UU.)

Después del análisis de la restricción, se realizó la purificación de las bandas correspondientes al plásmido pCAGCas9 S/PA, el pLTR S/PA y la secuencia IRL, con el estuche MinElute Gel Extraction Kit® (QIAGEN, EE.UU.).

Finalmente, para obtener los plásmidos p-CAGCas9-IRL (**pIRL**) y p-LTRCas9-IRL (**pLCI**) se mezclaron 140 ng de la secuencia IRL y 300 ng de los plásmidos pCAGCas9s/PA y el p-LTRCas9S/PA por separado y se unieron con la T4 DNA ligasa (Thermo Scientific, EE.UU.). Una vez obtenida la ligación de los plásmidos, se usaron 5  $\mu$ l de cada uno (pIRL y pLCI) para transformar bacterias *E. coli StbI3* por choque térmico. Las colonias obtenidas fueron resembradas en medio LB suplementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina por 12 hrs a 37 °C. Se cosecharon las bacterias y se realizó la extracción del plásmido con el estuche de extracción Plasmid Midi Kit® (QIAGEN, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Secuenciación de pLTR5, pIRL y pLCI.

Finalmente, para verificar los plásmidos y la funcionalidad de las secuencias reguladoras LTR e IRL se llevó a cabo la secuenciación mediante el marcaje con el estuche BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems® EE.UU. y con uso de oligonucleótidos específicos para cada construcción (**Tabla 6**). La secuenciación se realizó en el secuenciador 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, EE.UU.).

*Tabla 6. Oligonucleótidos usados para la secuenciación de pJetLTR y pJetIRL.*

Secuencia	µg/reacción	Oligonucleótidos Forward	Oligonucleótidos Reverse
LTR5'	0.5	LTR5' F, F3, F4	LTR5' R, R5, R4, R3
IRL	0.5	INS F, RRE F, LTR3' F, F3, F4, F6, F7	INS R, RRE R, LTR3' R R0 R1, R4, R5

### Análisis de la secuenciación

Una vez obtenidas las secuencias de los plásmidos pJetLTR y pJetIRL, se realizó el alineamiento y la obtención de las secuencias consenso con el programa SeqScape (ABI Prism ® versión 2.1, EE.UU.), para identificar las mutaciones presentes en cada secuencia. Para verificar la funcionalidad de las secuencias reguladoras, se realizó un análisis de predicción de estructuras secundarias de ARN con ayuda de la herramienta informática Mobylye QPasteur MFOLD 3.6 (disponible en línea <http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::mfold>).

### Diseño de los ARNg

Para diseñar los ARNg se tomaron como referencia a las secuencias de los genes correspondientes a *tat* (primer exón 5,831-6,045 y segundo exón 8,379-8,469) y *rev*

(primer exón 5970-6045 y segundo exón 8,379-8,653) de la cepa viral HXB2. Se usó el software de Broad Institute (disponible en la página <http://www.broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sARNg-design>) que proporcionó las secuencias candidatas de ARNg para los objetivos planteados.

Se seleccionaron los ARNg que por su posición pudieran inducir un cambio en el marco de lectura más próximo al extremo 5' y que se encontraran en regiones conservadas del virus, tomando en cuenta 769 secuencias del VIH-1 subtipo B, la variación de las secuencias de ADN fue calculada mediante la entropía de Shannon. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos de secuencias del VIH del Laboratorio Nacional de Los Álamos de EE.UU. Disponible en: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>.

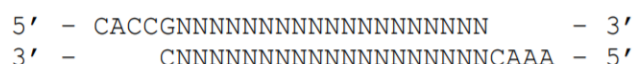
### Reprogramación del plásmido LCI

Las secuencias seleccionadas de los ARNg se usaron para programar al plásmido pLCI (**Tabla 7**). Se diseñaron dos oligonucleótidos complementarios para cada ARNg seleccionado siguiendo la estructura de la **Figura 10**. Los oligonucleótidos fueron alineados y fosforilados con la enzima T4 PNK de Invitrogene, EE.UU. de acuerdo con el siguiente protocolo: se mezclaron 100 mM de cada oligonucleótido (1  $\mu$ l de cada uno), 1  $\mu$ l del buffer 10x de PKN, 6.5  $\mu$ l de agua milliQ y 0.5  $\mu$ l de la enzima T4 PKN para obtener un volumen final de 10  $\mu$ l. La mezcla de reacción se colocó en un termociclador y se programó un ciclo de 37°C por 30 min, 95 °C por 5 min y

finalmente un descenso gradual de la temperatura de 5°C cada minuto hasta 25°C, para obtener los oligonucleótidos fosforilados y alineados para la clonación.

**Tabla 7.** Oligonucleótidos que contienen las secuencias de los ARNg usados para programar pLCI. Se muestran dos oligonucleótidos por cada ARNg utilizado para el alineamiento y la fosforilación.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Tamaño
<b>ARNg1 F</b>	CAC CGT AGA TCC TAG ACT AGA GCC C	25
<b>ARNg1 R</b>	AAA CGG GCT CTA GTC TAG GAT CTA C	25
<b>ARNg2 F</b>	CAC CGC CTT AGG CAT CTC CTA TGG C	25
<b>ARNg2 R</b>	AAA CGC CAT AGG AGA TGC CTA AGG C	25
<b>ARNg3 F</b>	CAC CGA GGG GAC CCG ACA GGC CCG A	25
<b>ARNg3 R</b>	AAA CTC GGG CCT GTC GGG TCC CCT C	25



**Figura 12.** Estructura y alineamiento de los oligonucleótidos para programar el ARNg en el plásmido PX458. Donde N es cualquier nucleótido.

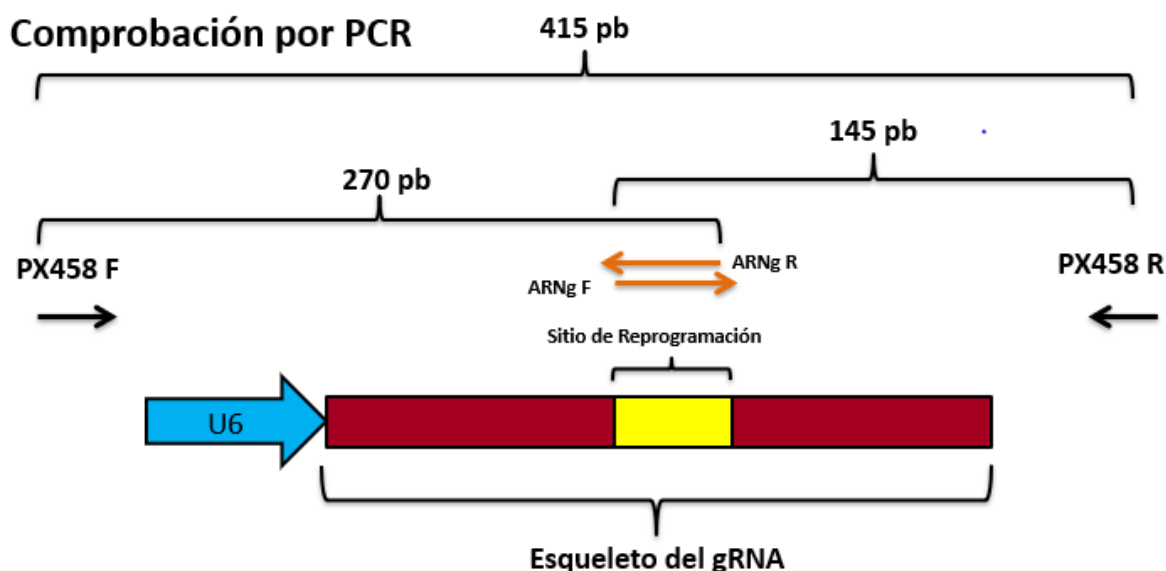
Antes de realizar la clonación y para generar los extremos cohesivos para la programación del pLCI, se realizó la restricción de 1 µg del plásmido pLCI con la enzima BbsI (Thermo Scientific, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El plásmido restringido se purificó con el estuche MinElute Gel Extraction Kit® (QIAGEN, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Finalmente, para obtener el plásmido programado con los ARNg se tomaron 100 ng del plásmido restringido con BbsI, 1 µl de una dilución 1:200 de los oligonucleótidos alineados y fosforilados, 1 µl del buffer 10X de la ligasa T4, 1 µl de la T4 DNA Ligasa de (Thermo Scientific, EE.UU.) y el volumen de reacción se llevó hasta 10 µl con agua milliQ. La reacción se dejó incubando por 30 min a temperatura ambiente y 5 µl de la ligación se usaron para transformar bacterias Stbl3 por choque térmico para

obtener colonias con los plásmidos programados (pLCIARNg1-3). Los plásmidos fueron comprobados por PCR usando los oligonucleótidos de la Tabla 8 y los oligonucleótidos que se utilizaron para programar al plásmido pLCI (Tabla 7 y Figura 11).

**Tabla 8.** Oligonucleótidos usados para la comprobación del plásmido LCI programado con la secuencia de los ARNg.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Tamaño	% GC	TM
PX458 F	GGGCCTATTTCCCATGATTCC	21	52.4	55.7
PX458 R	GCGCTAAAAACGGACTAGCC	20	55	56.5



Para obtener una confirmación positiva de la reprogramación del plásmido deben aparecer tres bandas escalonadas con tamaño de **415 pb, 270 pb y 145 pb**

**Figura 13.** Esquemización de la estrategia para comprobar la programación del plásmido LCI con la secuencia de los ARNg.

Las condiciones del PCR para obtener los productos deseados fueron las siguientes: un ciclo de 5 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 seg a 95 °C, seguido de 15 seg a 58 °C y

30 seg a 68°C y finalmente un ciclo de 7 min a 68°C. Al terminar el ciclo de amplificación, la reacción se mantuvo a 4°C. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% y teñido con Sybr® Safe DNA gel stain (Invitrogen, EE.UU.).

### **Evaluación de las secuencias reguladoras LTR e IRL**

Para evaluar la funcionalidad de las secuencias reguladoras se realizó la transfección de todas las construcciones en las células HEK293. Previamente se realizó la producción y extracción de los siguientes plásmidos:

**PX450:** control de transfección

**pLTR:** se usó para evaluar el efecto del promotor LTR y la dependencia a la proteína viral Tat.

**pIRL:** se usó para evaluar el efecto de las secuencias INS y la dependencia a la proteína viral Rev.

**pLCI:** se usó para evaluar el efecto del promotor LTR y las secuencias INS en conjunto, así como la dependencia a las proteínas virales Tat y Rev.

**pLCI-ARNg1-3:** Se usaron para verificar el efecto de los ARNg sobre la autorregulación de la expresión génica y la inhibición de la replicación viral.

**pCV1:** se usó para producir las proteínas virales Tat y Rev.

**pNL4-3:** se usó para producir partículas infecciosas del VIH-1 y evaluar el efecto de los ARNg sobre la replicación del virus.

**pVSV-G:** se usó para pseudotipar al VIH-1 y permitir que el virus infectara al cultivo de las células HEK293.

Para obtener todos los plásmidos se cultivaron las colonias de las bacterias *E. coli* Stbl3 en 500 ml de medio LB suplementado con 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina o 10  $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina para pCV1. Todos los plásmidos se extrajeron con el estuche Plasmid Midi Kit® (QIAGEN, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Preparación del medio de cultivo DMEM® suplementado**

Para el cultivo y el mantenimiento de las células HEK293 se preparó medio de cultivo DMEM®, para lo cual se adicionó el medio en polvo en un volumen aproximado de 500 ml de agua bidestilada y se mezcló con un agitador magnético. Se adicionaron 2.7 g de  $\text{NaHCO}_3$  y se ajustó el pH a  $7 \pm 0.2$  empleando una solución de NaOH 1 N o HCl 1 N. El medio de cultivo se aforó a 1 L con agua bidestilada y se esterilizó por filtración con membranas de 0.22  $\mu\text{m}$ , para su posterior almacenamiento a temperatura ambiente y protegido de la luz. Para cultivar a las células HEK293, el medio DMEM® se suplementó con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina, 1% de aminoácidos no esenciales 100X, y 1 mM de piruvato de sodio. El medio suplementado al que se le denominó D-10 se almacenó a 4°C y se atemperó a 37 °C al momento de su uso.



### **Cultivo de células HEK293**

Las células HEK293 se cultivaron en el medio de D-10, en botellas de 25 cm<sup>2</sup> a 37°C, 85% de humedad y 5% CO<sub>2</sub>. Las células se subcultivaron cuando la confluencia fue de 80%, mediante la adición de una solución de tripsina-EDTA (0.25% de tripsina en 0.53 mM de EDTA 1X) para desprender a las células adherentes y posteriormente se inactivó la tripsina-EDTA con 1 ml de medio de cultivo D-10. Las células se concentraron por centrifugación a 805 xg por 10 min, posteriormente se descartó el sobrenadante de cultivo y el botón celular se resuspendió en PBS 1X para realizar el conteo de las células en la cámara de Neubauer. Una vez realizado el conteo celular, se resembraron las células en placas de cultivo de 48 pozos para realizar los experimentos, o bien, se resembraron 5x10<sup>5</sup> células en una botella de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con medio D-10 para continuar con el cultivo.

### **Procedimiento de la transfección de las células HEK293**

Veinticuatro hrs antes de la transfección se sembraron 1x10<sup>5</sup> células por pozo en placas de 48 pozos con 300 µl de medio D-10. Dos hrs antes de la transfección se retiró el medio de cultivo y se agregaron 300 µl de medio de cultivo DMEM sin suplementar y sin antibióticos. La transfección se realizó con el estuche Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para comparar el efecto de las secuencias reguladoras y la transactivación por las proteínas virales Tat y Rev, las células HEK293 se transfectaron con los plásmidos

PX458, pLTR, pIRL y pLCI con las mezclas y concentraciones que se indican en la **Tabla 9**. Los resultados se analizaron por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo 48 hrs después de la transfección.

**Tabla 9.** Plásmidos usados para transfectar a las células HEK293 y evaluar la regulación de las secuencias LTR, INS y RRE.

Plásmido	[ng]/reacción	Características
<b>PX458</b>	600 ng	Plásmido control
<b>pLTR</b>	36 ng	Promotor sin TAT
<b>pIRL</b>	45 ng	Inhibidor sin REV
<b>pLCI</b>	45 ng	Promotor/Inhibidor sin TAT/REV
<b>pLTR/pCV1</b>	36 ng / 600 ng	Promotor con TAT
<b>pIRL/pCV1</b>	45 ng / 600 ng	Inhibidor con REV
<b>pLCI/pCV1</b>	45 ng / 600 ng	Promotor/Inhibidor con TAT/REV

Se evaluó la sensibilidad de la construcción pLCI en presencia de pCV1 mediante una curva de titulación usando diferentes concentraciones de ambos plásmidos como se muestra en la **Tabla10**. Los resultados se analizaron por citometría de flujo 48 hrs después de la transfección.

**Tabla 10.** Concentraciones usadas para evaluar la sensibilidad de los plásmidos pLCI y pCV1

		pCV1 [ng]						
		15/0	15/35	15/70	15/150	15/200	15/300	15/600
pLCI [ng]	30/0	30/35	30/70	30/150	30/200	30/300	30/600	
	45/0	45/35	45/70	45/150	45/200	45/300	45/600	
	60/0	60/35	60/70	60/150	60/200	60/300	60/600	

Para evaluar la autorregulación de la estrategia propuesta, se realizó la transfección de las construcciones pLCI-ARNg1, pLCI-ARNg2 y pLCI-ARNg-3 en presencia del plásmido pCV1, las concentraciones y mezclas utilizadas se indican en la **Tabla 11**. Los resultados se analizaron por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo 48 hrs después de la transfección.

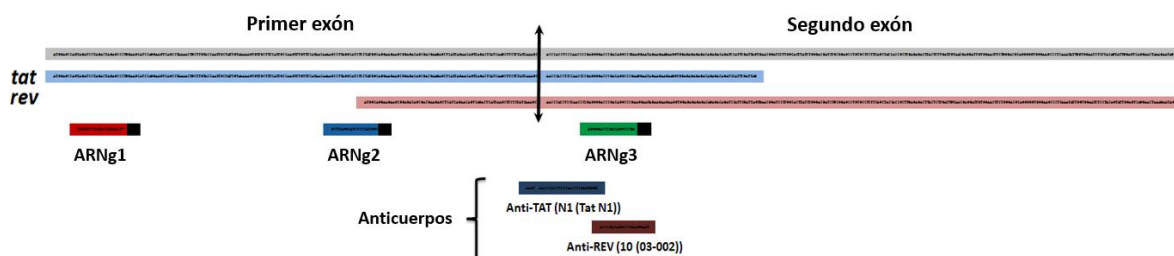
**Tabla 11.** Plásmidos usados para transfectar a las células HEK293 y evaluar el efecto de los ARNg (1-3) con pCV1.

Plásmido	[ng]/reacción	Características
pLCI	45 ng	Plásmido control negativo
pLCI/pCV1	45 ng / 600 ng	Plásmido control positivo
pLCI-ARNg1/pCV1	45 ng / 600 ng	ARNg dirigido al primer exón de <i>tat</i>
pLCI-ARNg2/pCV1	45 ng / 600 ng	ARNg dirigido al primer exón de <i>tat/rev</i>
pLCI-ARNg3/pCV1	45 ng / 600 ng	ARNg dirigido al segundo exón de <i>tat/rev</i>

### Western Blot

Para identificar la presencia de las proteínas virales Tat y Rev, las células HEK293 se cosecharon y se lisaron para extraer el contenido proteico mediante la incubación de las células en M-PER™ (Thermo Scientific, EE.UU.) durante 30 min en hielo. Se concentró el lisado por centrifugación a 17,000 xg durante 10 min a 4°C. Noventa microgramos de los lisados celulares se mezclaron en proporción 1:1 y se desnaturalizaron con una solución amortiguadora Laemmli Sample 2X (BioRad, EE.UU.) que contenía 5% de 2-mercaptoetanol. La mezcla se incubó a 95°C durante 7 min, y se corrió en un gel SDS-PAGE con solución amortiguadora de Tris-glicina (pH 8,8) y se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (BioRad, EE.UU.). La membrana se bloqueó en una solución de leche descremada al

5% en solución salina amortiguadora con Tris y detergente Tween® 20 (TBST) durante 1 hora y se incubó con un anticuerpo monoclonal anti-Tat del VIH-1 hecho en ratón (clona N1 [TatN1], Thermo Scientific, EE.UU.) o con el anticuerpo monoclonal anti-Rev del VIH-1 hecho en ratón (clona 10 [03-002], Thermo Scientific, EE.UU.) en una dilución 1:1,000 durante toda la noche a 4°C. Después, las membranas se lavaron 3 veces con TBST y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón hecho en conejo (cadenas IgG H&L) conjugado con peroxidasa de rábano (abcam ab6728) en dilución 1:8,000 durante 2 hrs a temperatura ambiente. Después de una serie de 3 lavados con TBST, la membrana se analizó usando el equipo Kodak GL 1500 Gel Logic Imaging System™. En la **Figura12** se indican los sitios de unión de los anticuerpos monoclonales anti-Tat y anti-Rev, y la posición de los ARNg en los exones de los genes *tat* y *rev* del VIH-1.



**Figura 14.** Esquema que indica la posición de los ARNg en los exones de los genes *tat* y *rev* y la posición en la que se unen los anticuerpos monoclonales Anti-Tat y Anti-Rev.

### Inhibición de la replicación viral

El efecto de la construcción pLCl y los ARNg en la replicación viral y sobre el genoma del VIH-1 se evaluó mediante la transfección de las células HEK293 con

pLCI-ARNg1-3, pNL4-3 y pVSV-G con las concentraciones que se indican en la

### Tabla 12.

**Tabla 12.** Plásmidos usados para evaluar el efecto de los ARNg (1-3) con pNL4-3. Se indican las concentraciones de los plásmidos usados para transfectar a las células HEK293.

Plásmido	[ng]/reacción	Características
pLCI/pVSVG	45 ng/15 ng	Control negativo de infección
pLCI/pNL4-3/pVSVG	45 ng/30 ng/15 ng	Control positivo de infección
pLCI-ARNg1/pNL4-3/pVSVG	45 ng/30 ng/15 ng	ARNg dirigido al primer exón de TAT
pLCI-ARNg2/pNL4-3/pVSVG	45 ng/30 ng/15 ng	ARNg dirigido al primer exón de TAT/REV
pLCI-ARNg3/pNL4-3/pVSVG	45 ng/30 ng/15 ng	ARNg dirigido al segundo exón de TAT/REV
pLCI-ARNg1-3/pNL4-3/pVSVG	45 ng/30 ng/15 ng	Mezcla de los ARNg1-3

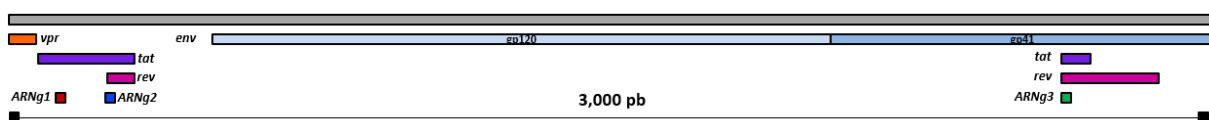
Después de 6 días se colectó el medio de cultivo de las células tratadas con los plásmidos, para realizar los ensayos de infección en las células MT2 y para determinar la presencia del virus mediante la cuantificación de la proteína p24 de la cápside del VIH-1 por ELISA. Por otra parte, se cosecharon las células para realizar la extracción del material genético con el estuche de extracción QIAamp DNA Blood Mini Kit® (QIAGEN, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usaron 600 ng de ADN como templado para las reacciones de PCR.

Para verificar la escisión del genoma viral por la edición múltiple se flanquearon y amplificaron por PCR los genes correspondientes a *tat* y *rev* (primer y segundo exón **Figura 13**) usando los oligonucleótidos de la **Tabla 13**. Las condiciones de la PCR para la obtener los productos de los genes *tat* y *rev* fueron las siguientes: un ciclo de 2 min a 95°C, 40 ciclos de 15 seg a 95°C, seguido de 15 seg a 60 °C y 180 seg a

68°C y finalmente un ciclo de 7 min a 68°C. Al terminar la reacción se mantuvo a 4°C. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1.5% y teñido con Sybr® Safe DNA gel stain (Invitrogene, EE.UU.)

**Tabla 13.** Secuencia de los oligonucleótidos usados para amplificar y secuenciar los genes *tat* y *rev* del VIH-1.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Tamaño	% GC	TM
<b>tat/rev-FWRseq</b>	CATAGCAGAATAGGCGTTACTCG	23	48	58
<b>tat/rev-REVseq</b>	GCAAAATCCTTTCCAAGCCCTG	22	50	60



**Figura 15.** Esquema que indica la posición de los ARNg dirigidos contra los genes *tat* y *rev* y el sitio de unión de los oligonucleótidos usados para amplificar y secuenciar a los genes *tat* y *rev* del VIH-1.

Los productos de PCR obtenidos se purificaron con el estuche MinElute Gel Extraction Kit® (QIAGEN, EE.UU.) y se clonaron en el plásmido pJET1.2 siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usaron 5 µl de la ligación para transformar bacterias *E. coli* Stabl3 por choque térmico. Se seleccionaron y aislaron 44 colonias que se sembraron en medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante 12 hrs a 37°C. Finalmente, las bacterias se cosecharon y se les realizó la extracción de los plásmidos para su comprobación por PCR y por secuenciación utilizando los oligonucleótidos que se indican en la **Tabla 13**.

### Viabilidad celular

Para evaluar la proliferación y la viabilidad celular en presencia de los plásmidos pLCI-ARNg1-3 y pNL4-3/pVSVG, se sembraron  $1 \times 10^4$  células HEK293 en placas de 96 pozos, 24 hrs después se realizó la transfección de los plásmidos con las concentraciones que se indican en la **Tabla12** y se monitoreó el cultivo celular durante 7 días. La proliferación celular se midió mediante la tinción con azul tripano y las células se contaron en la cámara de Neubauer en los días 1, 3, 5 y 7 después de la transfección; asimismo, se realizó el ensayo de tinción por cristal violeta y la determinación de la viabilidad celular por citometría de flujo al día 7 después de la transfección. La viabilidad celular se determinó mediante el uso del estuche LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain (Invitrogene, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Ensayo de cristal violeta

Para determinar la viabilidad por el ensayo de cristal violeta, se retiró cuidadosamente el medio de cultivo de cada pozo a los 7 días después de la transfección y se realizaron dos lavados con agua, teniendo cuidado de no agregar el agua directamente sobre las células. Se retiró el agua inmediatamente y se agregaron 150  $\mu$ l de cristal violeta al 0.5% a cada pozo y la placa se incubó por 20 min a temperatura ambiente con agitación suave. Después se realizaron cuatro lavados con agua, teniendo cuidado de no despegar a las células, se retiró el exceso de agua y se dejó secando por dos hrs a temperatura ambiente. Posteriormente se

agregaron 300 ml de metanol a cada pozo y se incubó por 20 min a temperatura ambiente en agitación suave. Finalmente se cuantificó la densidad óptica a 570 nm en un espectrofotómetro Benchmark Plus Microplate Reader® (BIO-RAD). Se tomó como 100% de viabilidad el valor de densidad óptica de las células que no recibieron tratamiento.

### **Análisis de citometría de flujo.**

La expresión de GFP y la viabilidad de células HEK293 se cuantificó usando el citómetro de flujo BD FACS Aria II™ (BD Biosciences). El día del análisis, se cosecharon las células HEK293 mediante la adición de tripsina-EDTA, la cual posteriormente se inactivó con 500  $\mu$ l de medio de cultivo D-10. Las células se lavaron dos veces con 500 ml de PBS 1X por centrifugación a 805 xg durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS 1X y se mantuvieron a 4°C protegidas de la luz hasta ser procesadas en el citómetro.

Para determinar la viabilidad celular se probaron también células HEK293 sin transfectar y transfectadas con PX458 para tener células GFP+; ambos cultivos se tomaron como control de muerte celular. Las células se incubaron con peróxido de hidrogeno al 30% durante 1 hora. Para verificar la muerte en los cultivos las células cosechadas se tiñeron con 1  $\mu$ l por muestra de LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain (Invitrogene, EE.UU.) por 30 min a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Después de la incubación, las células se concentraron por centrifugación y se realizó un lavado con PBS 1X para retirar el exceso de la tinción. Finalmente, las



células se resuspendieron en 200  $\mu$ l de PBS 1X y se mantuvieron a 4°C protegidas de la luz hasta ser procesadas en el citómetro. Se cuantificaron  $1 \times 10^5$  células HEK293 de cada muestra. Los datos fueron analizados con el software FlowJo v.10.

### **Infección de las células MT2**

Para cultivar y mantener a las células MT2 se usó el medio de cultivo R-10 y el mismo protocolo usado con las células 8E5 mencionado anteriormente. El día de la infección, se sembraron  $6 \times 10^4$  células MT2 en 50  $\mu$ l de medio R-10, en una placa de 96 pozos y se infectaron con 50  $\mu$ l del sobrenadante de las células HEK293 tratadas con la construcción pLCI-ARNg1-3 y con los plásmidos pNL4-3/pVSVG. La placa de cultivo se incubó a 37°C, 85% de humedad y 5% CO<sub>2</sub> durante 10 días. Se observaron las células diariamente para monitorear la aparición de sincicios (células gigantes multinucleadas que se forman por la fusión de células infectadas con el VIH-1). El sobrenadante fue cosechado al día 10 después de la infección para la determinación cuantitativa del antígeno p24 de la cápside viral por ELISA.

### **Determinación del antígeno p24 de la cápside viral**

El sobrenadante de cultivo obtenido de las células HEK293 y MT2 infectadas, se usó para cuantificar la concentración del antígeno p24 de la cápside del virus, con el estuche Alliance HIV-1 P24 Antigen ELISA® (Perkin Elmer, EE.UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se tomaron 200  $\mu$ l de una dilución 1:1,000 de los sobrenadantes de cultivo correspondientes al control positivo, y una dilución 1:2 de los sobrenadantes tratados con los ARNg para determinar la concentración de p24.

Se realizó la lectura de la absorbancia por espectrofotometría a 490 nm en un espectrofotómetro Benchmark Plus Microplate Reader® (BIO-RAD)

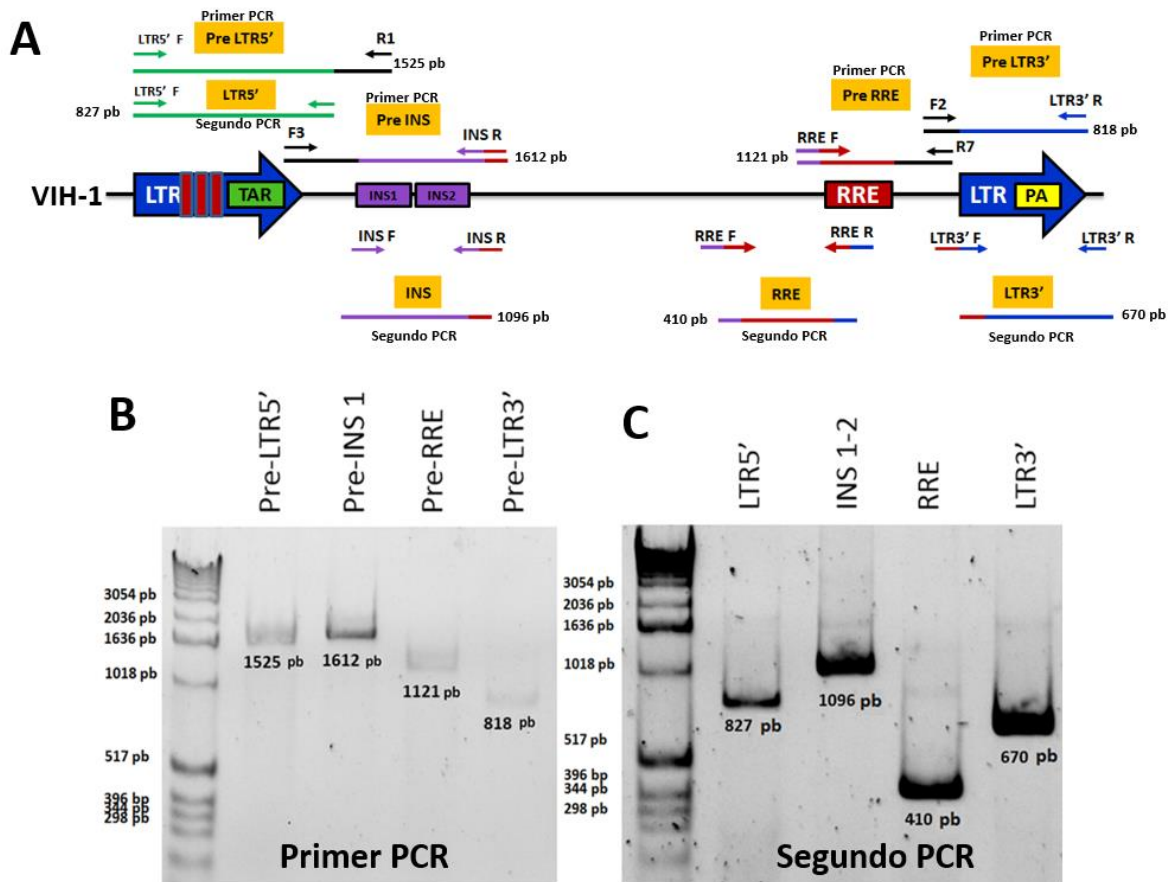
### **Análisis Estadístico**

Los resultados se presentan como el promedio de los triplicados independientes de cada experimento  $\pm$  la desviación estándar (DE) del promedio y se calcularon con la prueba ANOVA de una vía, utilizando el programa estadístico GraphPad Prism7, para indicar las diferencias entre los grupos. Se consideró un valor de  $P$  de  $<0.05$ , como estadísticamente significativo (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  y \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ).

## RESULTADOS

### Obtención de las secuencias reguladoras LTR, INS y RRE del VIH-1

Debido al diseño y a la estructura de los oligonucleótidos usados, se realizó una estrategia de dos PCRs para aislar las secuencias reguladoras LTR5', INS, RRE y el LTR3' y optimizar su amplificación, como se muestra en el esquema de la **Figura 14A**. Con esta estrategia se obtuvieron los productos Pre-LTR5', Pre-INS, Pre-RRE y Pre-LTR3' en el primer PCR (**Figura 14B**) y se usaron como un templado enriquecido para facilitar la amplificación de las secuencias reguladoras LTR5', INS, RRE y el LTR3' del VIH-1, mediante un segundo PCR semianidado. Los productos obtenidos del segundo PCR semianidado corresponden al tamaño esperado como se muestra en la **Figura 14C**.

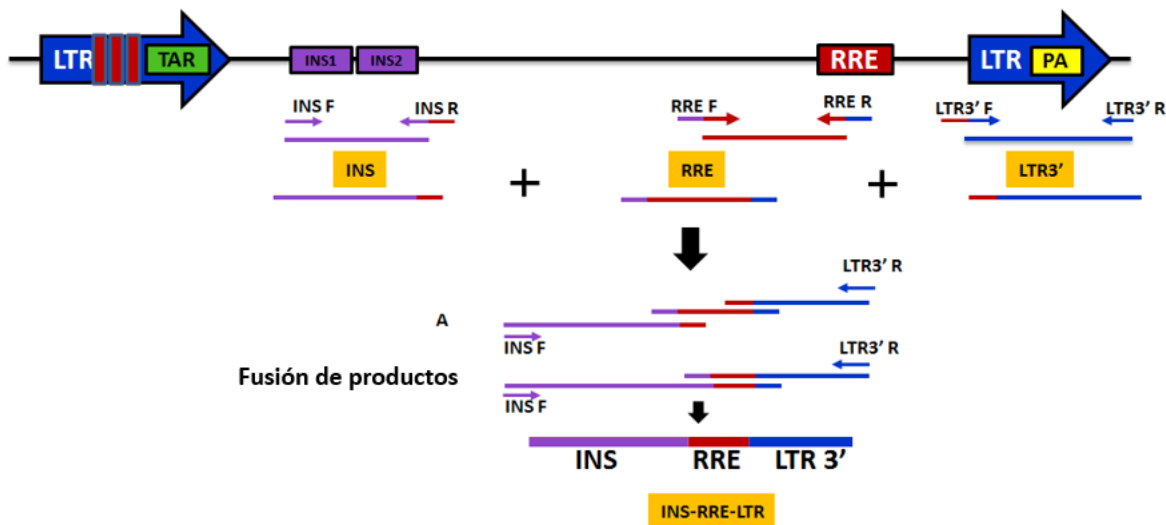


**Figura 16.** Estrategia para obtener las secuencias reguladoras LTR, INS y RRE del VIH-1. **A)** Diseño de la estrategia para la obtención de las secuencias reguladoras LTR, INS y RRE. Se indican los productos del primer y segundo PCR, los oligonucleótidos usados y el tamaño de los productos esperados. **B)** Amplificación de las secuencias correspondientes al promotor pre-LTR 5' (carril 2), la secuencia inhibidora pre-INS1 (carril3), secuencia de unión a REV pre-RRE (carril4) y la secuencia con la señal de poliadenilación del LTR3' pre-LTR3' (carril 5). **C)** Productos del PCR semi-anidado para la obtención de los fragmentos correspondientes al promotor LTR5' (carril2), INS (carril 3), RRE (carril4) y LTR3' (carril 5).

## Doble unión por PCR

Una vez obtenidas las secuencias reguladoras INS, RRE y LTR3' se unieron en un solo producto de 2,076 pb para adicionarlas al plásmido pCAGCas9 (PX458). Este procedimiento se llevó a cabo mediante la técnica de unión por PCR (**Figura 15**), cuya estrategia depende del alineamiento de las secuencias enlazadoras

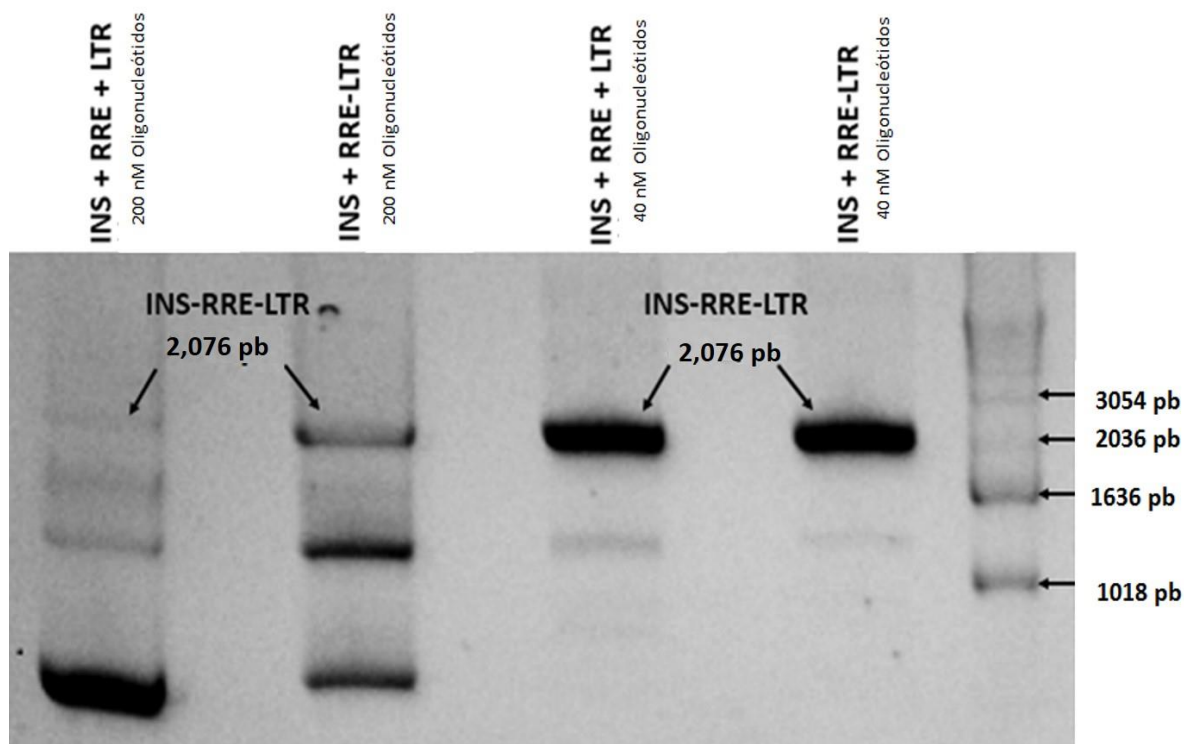
previamente diseñadas en los oligonucleótidos usados para la amplificación de INS, RRE y el LTR3' (**Figura 9**).



**Figura 17.** Diseño de la estrategia para la fusión de productos por PCR. Se realizó la fusión de las secuencias INS, RRE y LTR3' por PCR. Cada producto se identifica con un color (INS: morado, RRE: rojo y LTR: Azul) y las secuencias enlazadoras de los oligonucleótidos indican el sentido y el orden de la unión.

Se logró obtener el amplificado correspondiente al IRL mediante la disminución de la concentración de los templados usados (10 ng de cada producto de INS, RRE y LTR3') y la disminución de la concentración de los oligonucleótidos (40 nM, INS F y LTR3' R). Además, se realizó un ajuste de los ciclos de la PCR con un único ciclo inicial con tiempos de hibridación y elongación extendidos, para favorecer el alineamiento de las secuencias enlazadoras, seguido de 25 ciclos con tiempos regulares (**Figura16, carriles 3 y 4**). La adición de más de 10 ng de cada producto correspondiente al INS, RRE y LTR3', o el aumento de la concentración de los oligonucleótidos usados (>40 nM,) conduce a la aparición de productos inespecíficos (**Figura 16 carriles 1 y 2**). De igual manera, el aumento en el

número de ciclos en el PCR favorece la formación de amplificados no específicos (datos no mostrados).

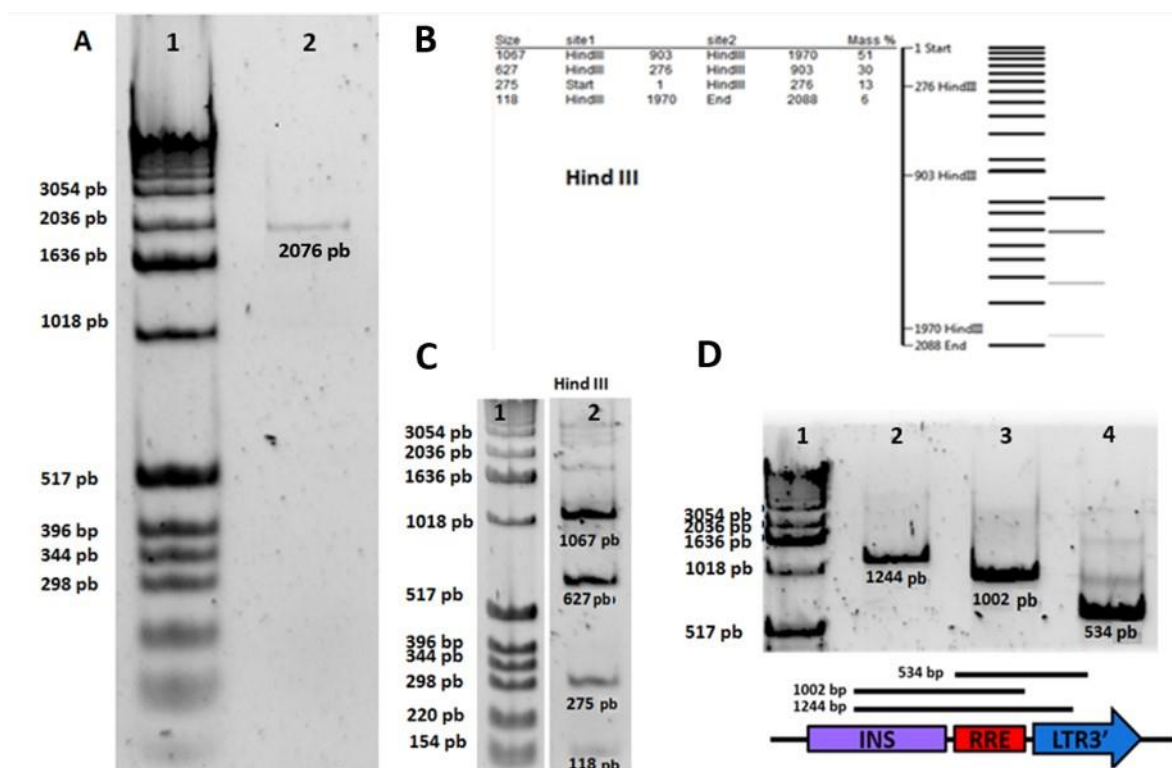


**Figura 18.** Fusión de productos de PCR correspondientes a las secuencias reguladoras INS, RRE y LTR3'. Se muestra la unión de los productos INS, RRE y LTR3' por medio de PCR de punto final (carriles 1-4). Se observa la aparición de productos inespecíficos con concentración de 200 nM por cada oligonucleótido (carriles 1 y 2), mientras que la concentración de 40 nM (carriles 3 y 4) disminuye eficientemente la formación de productos inespecíficos y favorece la amplificación de los productos esperados.

Después de la obtención del fragmento IRL (**figura 17A**) y para garantizar su ensamblaje, fue necesario verificar la identidad del producto obtenido antes de ligarlo al plásmido pJet1.2blunt. La verificación consistió en la obtención de un patrón de digestión específico por la enzima de restricción *HindIII*, cuya secuencia se encuentra presente repetidas veces en el producto IRL. De acuerdo con el análisis *in silico* en el programa ApE, la digestión con *HindIII* produce cuatro

bandas de 1067 pb, 627 pb, 275 pb y 118 pb (**Figura 17B**) las cuales fueron obtenidas como se observa en la **Figura 17C**.

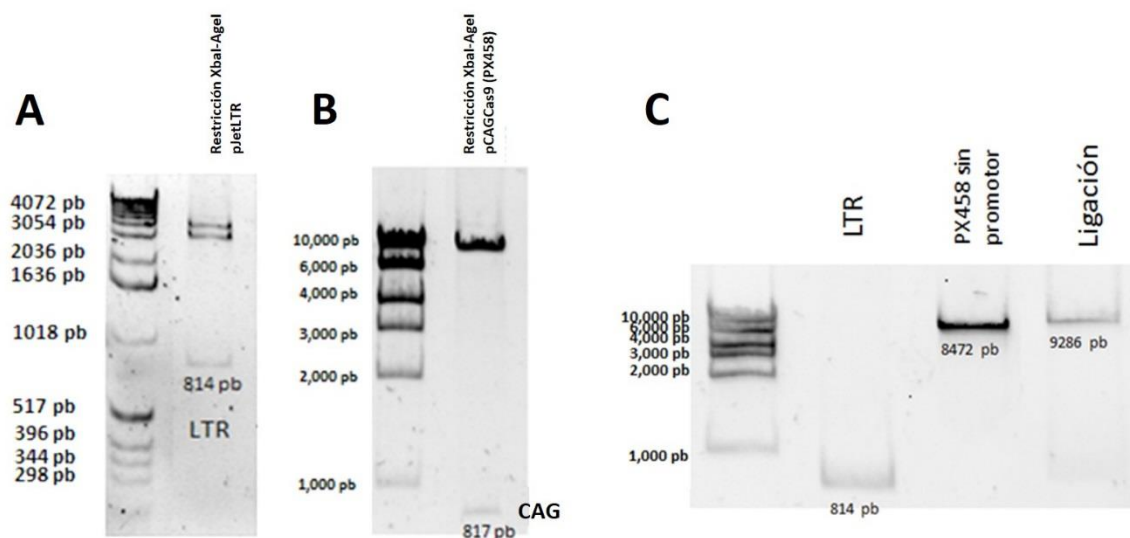
Se comprobó que el ensamblaje de la secuencia IRL fue correcto, mediante la amplificación de tres productos de PCR con oligonucleótidos que flanquean a los sitios de fusión (**Figura 17D**). La obtención de los productos con los tamaños esperados confirma el sentido y la posición de las secuencias INS-RRE-LTR (**Figura 17D carriles 2, 3 y 5 para el INS, RRE y LTR3'** respectivamente) lo que garantiza su identidad.



**Figura 19.** Comprobación de la identidad del producto IRL. **A)** Producto de 2076 pb correspondiente a IRL después de la purificación. **B)** Predicción del patrón de bandeo producido por el software ApE tras la digestión enzimática con HindIII. **C)** Comprobación de la identidad del IRL por medio de la restricción con la enzima HindIII. **D)** Comprobación de la identidad del IRL por PCR. Se observan los productos amplificados que flanquean a los sitios de fusión de las secuencias INS, RRE y LTR3'. Los productos obtenidos tienen el tamaño esperado de acuerdo con el esquema.

## Construcción del plásmido pLTR

Una vez obtenido el LTR (**Figura 14C LTR**) se clonó en el plásmido pJet y para comprobarlo, se realizó la liberación del promotor con las enzimas *Xba*I-*Age*I que flanquean a esta secuencia (**Figura 18A**). El producto de 814 pb se usó para realizar el cambio del promotor en el plásmido pCAGCas9 (PX458). Para realizar el intercambio de las secuencias se retiró el promotor CAG (817 pb) de pCAGCas9 realizando la restricción con las enzimas *Xba*I y *Age*I (**Figura 18B**). Las bandas correspondientes al promotor LTR5' (814 pb) y al plásmido p-CAGCas9 sin promotor (S/P) (8472 pb) se purificaron y ligaron para obtener el plásmido pLTR (9286 pb) (**Figura 18C carriles 2 y 3**) y transformar a las bacterias *E. coli* Stbl3.



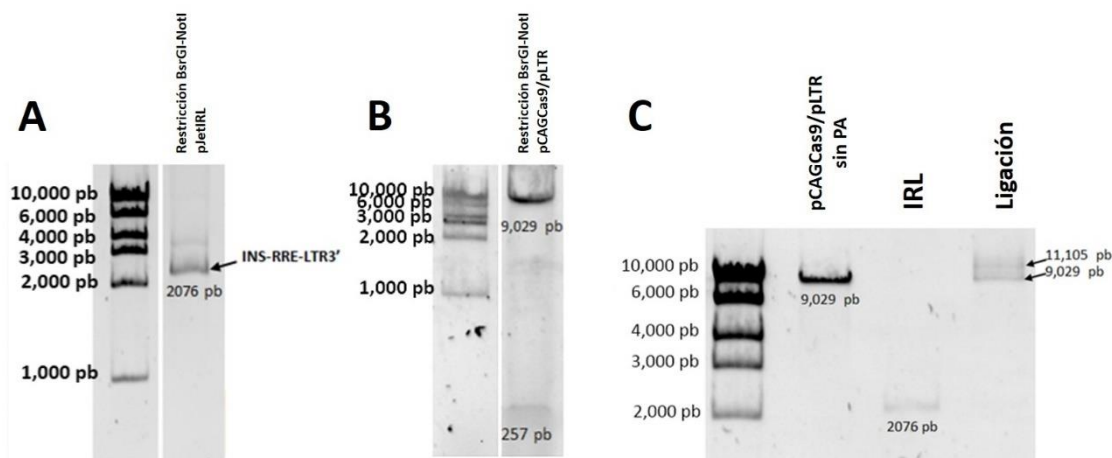
**Figura 20.** Construcción del plásmido pLTR. **A)** Se muestra la liberación del promotor LTR de 814 pb del plásmido pJetLTR5' mediante una doble restricción con las enzimas *Xba*I-*Age*I. **B)** Se muestra la liberación del promotor CAG de 817 pb del plásmido p-CAGCas9 mediante una doble restricción con las enzimas *Xba*I-*Age*I. **C)** Se observan las bandas correspondientes a la purificación del promotor LTR5' (814 pb) carril 2, la purificación del plásmido pCAGCas9 sin promotor (PX458) (8,472 pb) carril 3 y la ligación del promotor LTR5' con el plásmido p-CAGCas9 S/P (9,286 pb) carril 4.



## Construcción de los plásmidos pIRL y pLCI

Una vez obtenido el producto correspondiente al IRL (**Figura 16**) se clonó en el plásmido pJet. Para comprobarlo se realizó la liberación de este fragmento con las enzimas *BsrGI-NotI* que flanquean a esta secuencia (**Figura 19A**). El producto de 2,076 pb se utilizó para intercambiar la secuencia de poliadenilación en el plásmido pCAGCas9 y pLTR.

Para unir el IRL se retiró la secuencia de poliadenilación (257 pb) en ambos plásmidos, el corte se realizó con las enzimas *BsrGI* y *NotI* (**Figura 19B**). Las bandas correspondientes al INS (2,076 pb) y los plásmidos pCAGCas9 y pLTR sin poliadenilación (S/P) (9,029 pb) se purificaron y ligaron para obtener los plásmidos pIRL y pLCI (11,105 pb) (**Figura 19C**) y transformar las bacterias *E. coli* Stbl3.



**Figura 21.** Construcción de los plásmidos pIRL y pLCI. **A)** Se muestra la liberación de la secuencia IRL (2076 pb) del plásmido pJetIRL por la doble restricción con las enzimas *BsrGI* y *NotI*. **B)** Se muestra la liberación de la secuencia de poliadenilación (257 pb) de los plásmidos pCAGCas9 y pLTR por la doble restricción con las enzimas *BsrGI* y *NotI*. **C)** Se observan las bandas correspondientes a la purificación de plásmidos pCAGCas9 y pLTR sin la señal de poliadenilación (9,029 pb) carril 2 y la purificación de la secuencia IRL (2076 pb) carril 3; se observa además el producto de la ligación de los plásmidos pCAGCas9 y pLTR con la secuencia IRL (11,105 pb)

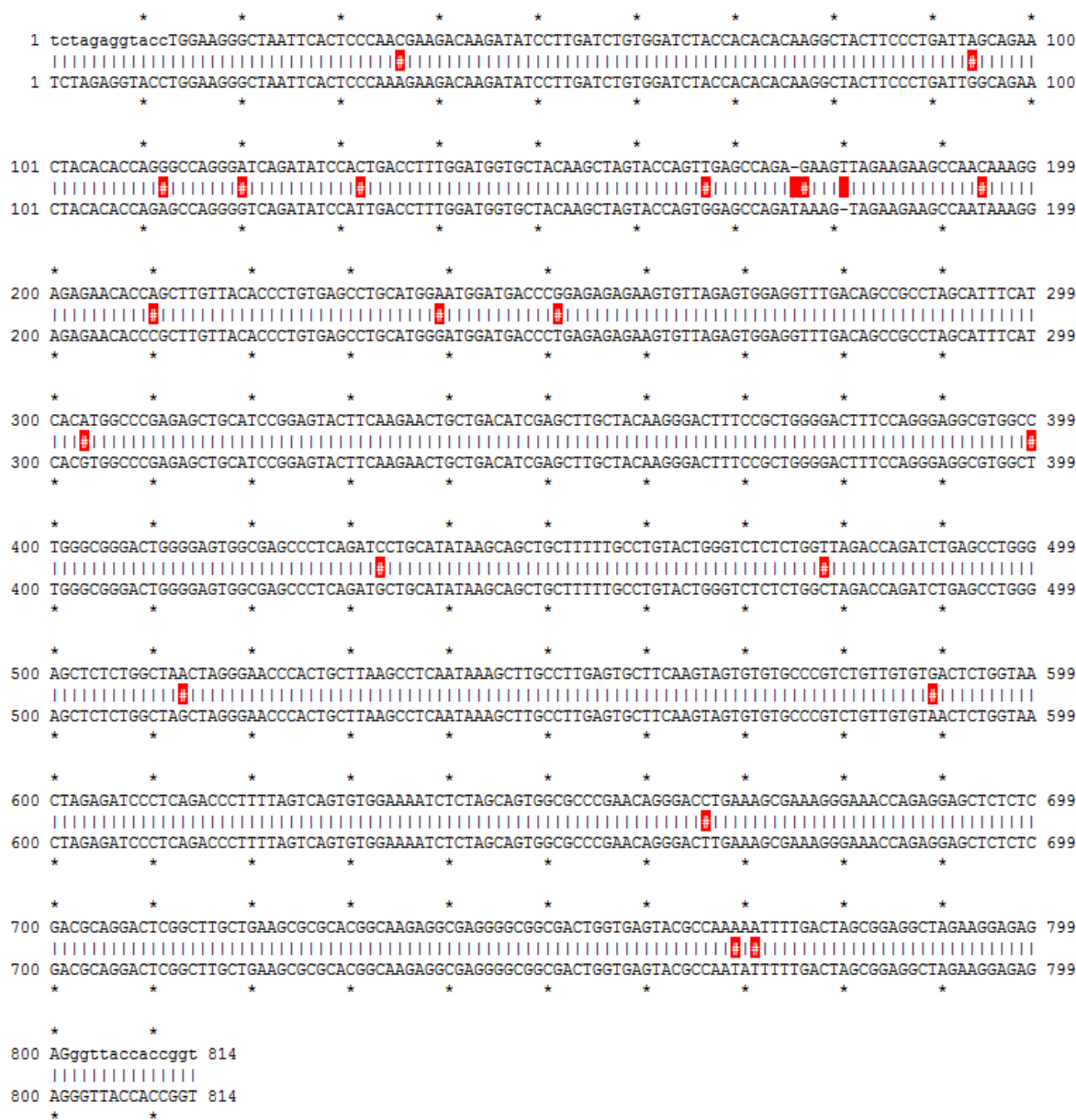
Una vez obtenidos los plásmidos pLTR, pIRL y pLCI se confirmó su identidad por secuenciación de Sanger y se analizaron las secuencias obtenidas para verificar la funcionalidad de cada uno de ellos como se indica a continuación.

### **Análisis de la secuencia del promotor LTR5'**

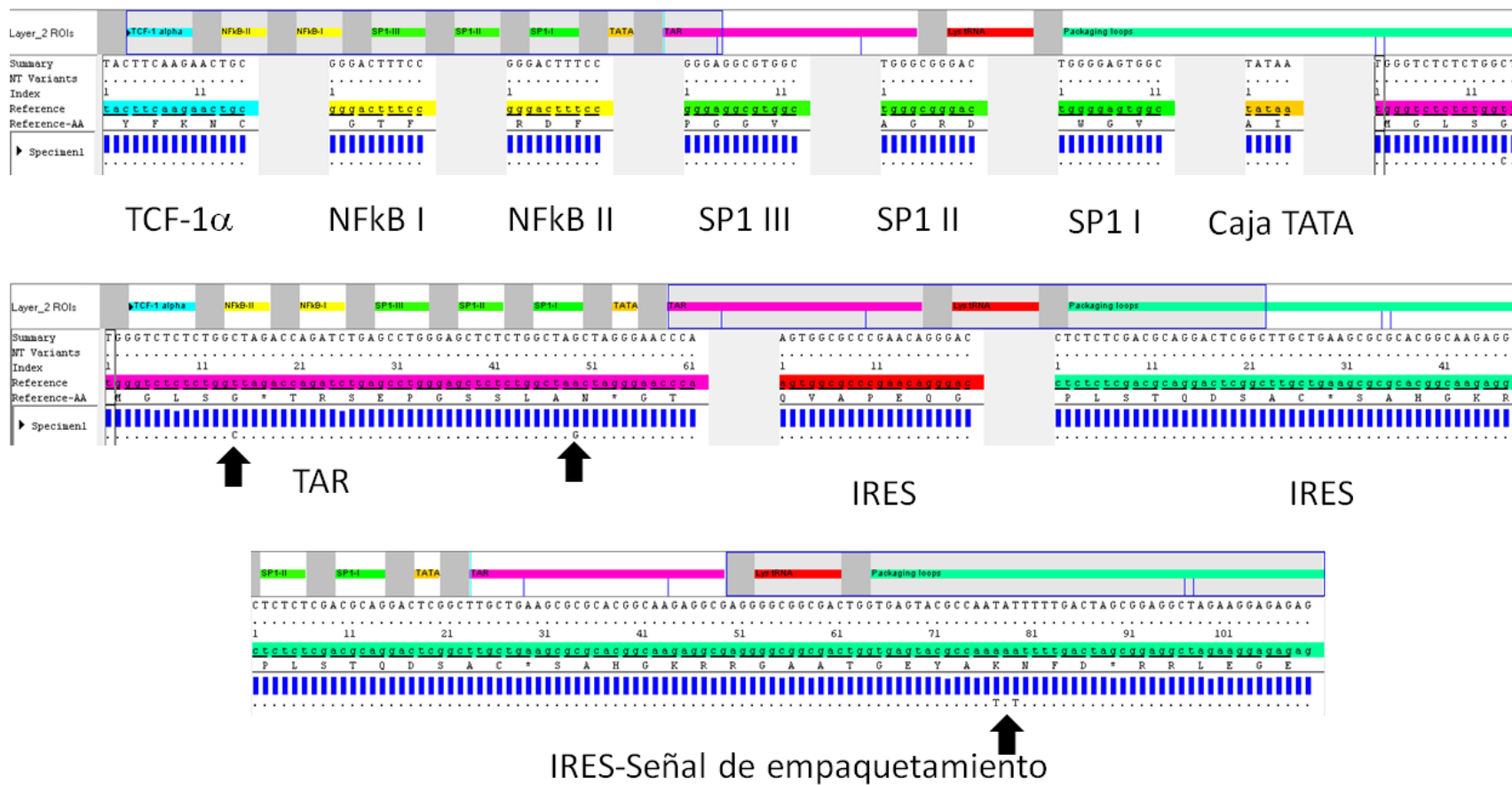
Se encontraron 21 mutaciones en el promotor LTR (**Figura 20**) y se analizaron para verificar si alteraban la función del promotor o cambiaban la secuencia de la caja TATA, la secuencia de unión a los factores de transcripción más importantes como SP1, NF $\kappa$ B, TCF-1 $\alpha$  o la función de la secuencia TAR. Se comprobó que las mutaciones no alteran las secuencias de unión a los factores de transcripción (**Figura 21**). Se identificaron dos mutaciones en la secuencia TAR por lo que se realizó una predicción de la estructura secundaria con el software MobyE QPasteur MFOLD. Las dos mutaciones encontradas no alteran la estructura de la secuencia TAR ni el sitio de unión a la proteína TAT al compararse con la predicción de la estructura secundaria de la secuencia TAR de la cepa de referencia HXB2 (**Figura 22**). Estos resultados sugirieron que la secuencia de promotor LTR se encuentra intacta y por ende no se altera su función para regular la expresión génica.

PROMOTOR.str from 1 to 814  
 Alignment to  
 SECUENCIACIÓN.str from 1 to 814

Matches():793  
 Mismatches(#):20  
 Gaps( ):2  
 Unattempted(.):0

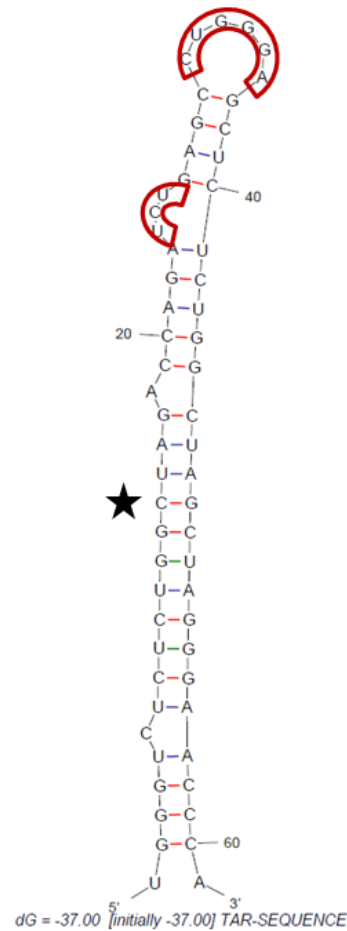


**Figura 22.** Alineamiento de la secuencia de referencia correspondiente al LTR de la cepa HXB2 del VIH-1 con la secuencia LTR aislada para regular la expresión de Cas9. Se muestran en rojo las mutaciones encontradas. Alineamiento obtenido con el software ApE.



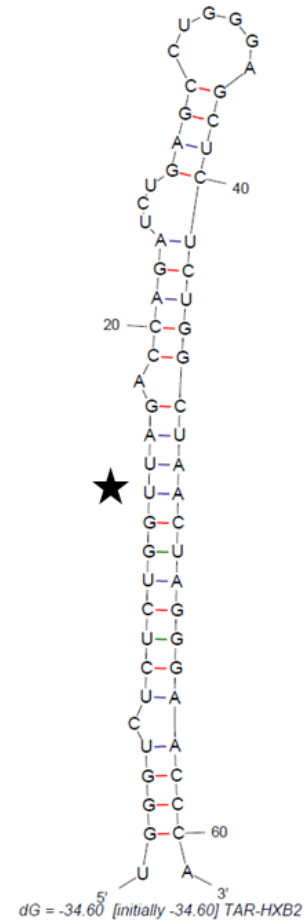
**Figura 23.** Análisis de las mutaciones del promotor LTR5'. Se indica en código de colores las secuencias de unión a los factores reguladores de la transcripción: TCF-1α (azul), NFκB I y II (amarillo), SP1 I, II, III (verde), caja TATA (naranja), la secuencia de unión a Tat-TAR (rosa), IRES (rojo) e IRES-señal de empaquetamiento (turquesa). Las mutaciones encontradas se indican con flechas negras.

Output of si\_graph ©  
mfold 3.6



Created Wed Feb 3 19:52:55 2016

Output of si\_graph ©  
mfold 3.6

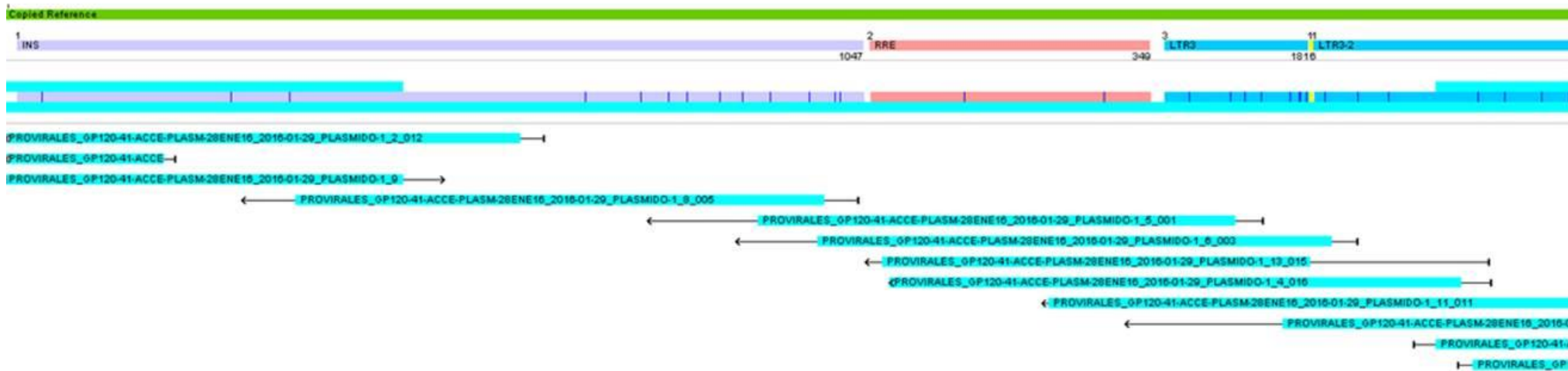


**Figura 24.** Predicción de la estructura secundaria de la secuencia TAR. En el lado izquierdo se muestra la estructura obtenida de la secuenciación y se indica con una estrella la posición de ambas mutaciones y en rojo las secuencias funcionales de TAR. En el lado derecho de la figura se muestra la predicción de la secuencia TAR de la cepa de referencia HXB2 del VIH-1.

### **Análisis de la secuencia INS**

Se analizó la secuencia correspondiente al INS para evaluar si la presencia de mutaciones podría sugerir una pérdida de su función. Se encontraron 13 mutaciones a lo largo de la secuencia INS (**Figuras 23 y 24**). Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre las mutaciones que podrían alterar la función del INS y se identificaron los sitios activos para la inhibición de la exportación nuclear, de acuerdo con lo publicado por Schneider, R y col. en 1997. Las 13 mutaciones encontradas no se encuentran sobre las regiones funcionales de la secuencia inhibidora.

# IRL



**Figura 25.** Mutaciones encontradas en la secuencia IRL. Se marca en color morado la secuencia correspondiente al INS, en rojo RRE y en azul el LTR3'. Se encontraron 31 mutaciones que están marcadas a lo largo de las barras de colores como líneas verticales de color azul.

```

INS.ape from 1 to 1046
Alignment to
Secuenciación INS.ape from 1 to 1046

Matches():1033
Mismatches():13
Gaps():0
Unattempted():0

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1  GATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAAAATAAAATTAACAATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCCGAGTTAATCC 100
   ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1  GATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCcGGGGGAAAGAAAAAATAAAATTAACAATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCCGAGTTAATCC 100

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
101 TGGCCTGTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAACTCTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACA 200
   ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
101 TGGCCTaTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAACTCTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACA 200

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
201 GTAGCAACCCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAG 300
   ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
201 GTAGCAACCCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAG 300

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
301 CACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGCAATCAGGTTCAGCCAAAATTACCCATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAAATGGTACATCAGGCCATATC 400
   ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
301 CACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGCAATCAGGTTCAGCAAAAATTACCCATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAAATGGTACATCAGGCCATATC 400

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
401 ACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAAGGCTTTCAGCCCAAGAGTGATACCCATGTTTTCAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCCA 500
   ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
401 ACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAAGGCTTTCAGCCCAAGAGTGATACCCATGTTTTCAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCCA 500

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
501 CAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAG 600
   ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
501 CAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGgGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAG 600

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
601 TGCATCCAGTGCATGCGAGGGCCATTGTCACAGGCCAGATGAGAGAACCAGGGGAAAGTGACATAGCAGGAACTACTAGTACCCCTTCAGGAACAAATAGG 700
   ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
601 TGCATCCAGTGCATGCGAGGGCCATTGTCACAGGCCAGATGAGAGAACCAGGGgGAAGTGACATAGCAGGAACTACTAGTACCCCTTCAGGAACAAATAGG 700

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
701 ATGGATGACAAATAATCCACTATCCAGTAGGAGAAATTTATAAAGATGGATAATCCTGGGATTAATAAATAAGTAAAGATGTATAGCCCTACCAGC 800
   ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
701 GGGATGACAAATAATCCACTATCCAGTAGGAGAAATTTATAAAGATGGATAATCCTGGGATTAATAAATAAGTAAAGATGTATAGCCCTACCAGC 800

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
801 ATTCTGGACATAAGACAAAGACCAAAGAACCCCTTTAGAGACTATGTAGACCGGTTCTATAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAGGAGGTAAAA 900
   ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
801 ATTCTGGACATAAGACAAAGACCAAAGAACCCCTTTAGAGACTATGTAGACCGGTTCTATAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAGGAGGTAAAA 900

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
901 ATTGGATGACAGAAACCTTGTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTAAAAGCATTGGGACCAGCGGCTACACTAGAAGAAATGATGAC 1000
   ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
901 ATTGGATGACAGAAACCTTGTGGTCCGAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTAAAAGCATTGGGACCAGCGCTACACTAGAAGAAATGATGAC 1000

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1001 AGCATGTGAGGGAGTAGGAGGCCCGGCCATAAGGCAAGAGTTTG 1046
   ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
1001 AGCATGTGAGGGAGTAGGAGGCCCGGCCATAAGGCAAGAGTTTG 1046

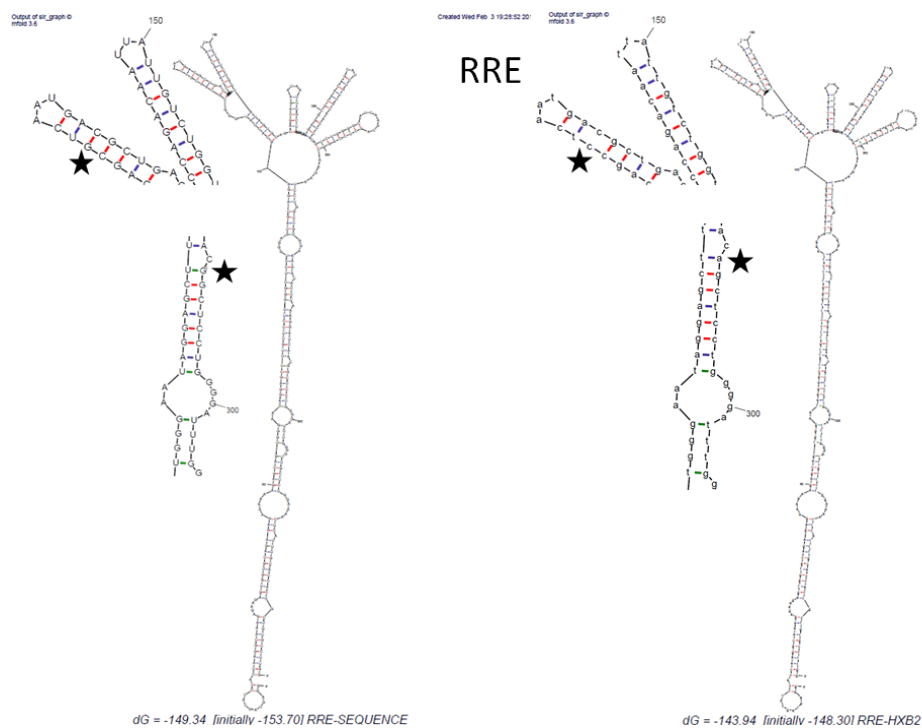
```

**Figura 26.** Alineamiento de la secuencia INS de la cepa de referencia HXB2 con la secuencia INS aislada para inhibir la expresión de Cas9. Las mutaciones encontradas se muestran en color rojo. Alineamiento obtenido con el software ApE.



## Análisis de la secuencia RRE

La secuencia RRE, presentó dos mutaciones. Debido a que la función de esta secuencia depende de la estructura secundaria que forma, se verificó si las mutaciones pudieran alterar la función del RRE, para lo cual se realizó la predicción de la estructura secundaria usando el software Mobyly QPasteur MFOLD. La predicción muestra que las mutaciones encontradas no alteran la estructura secundaria con respecto a la predicción obtenida por la secuencia RRE de la cepa de referencia HXB2 (**Figura 25**).

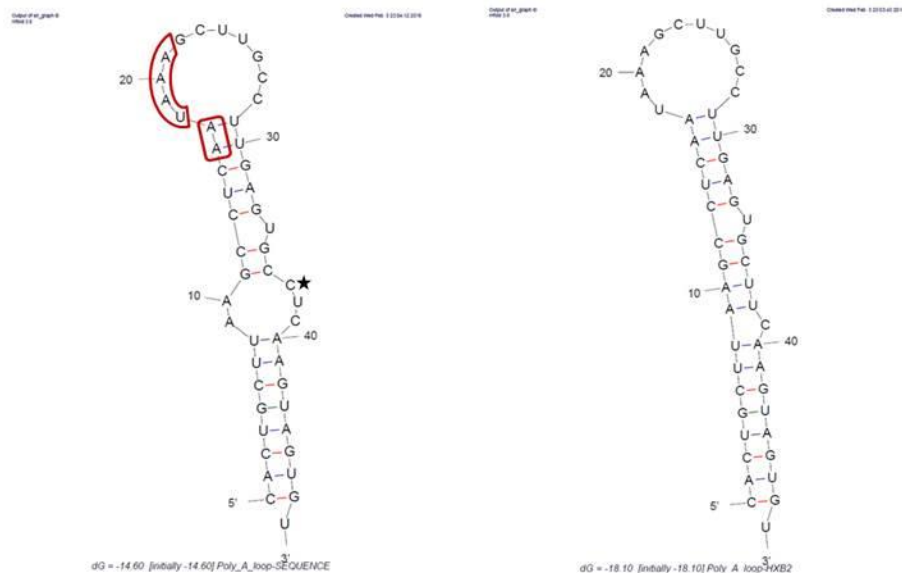


**Figura 27.** Estructura secundaria del RRE. A la izquierda se muestra la estructura obtenida por secuenciación. Las mutaciones encontradas en la secuencia se indican con una estrella de color negro en comparación con la estructura del RRE de la cepa HXB2 del VIH-1 que se encuentra a la derecha.

### Análisis de la secuencia LTR3'

Al analizar la secuencia LTR3' se encontraron las mismas mutaciones que en LTR5'.

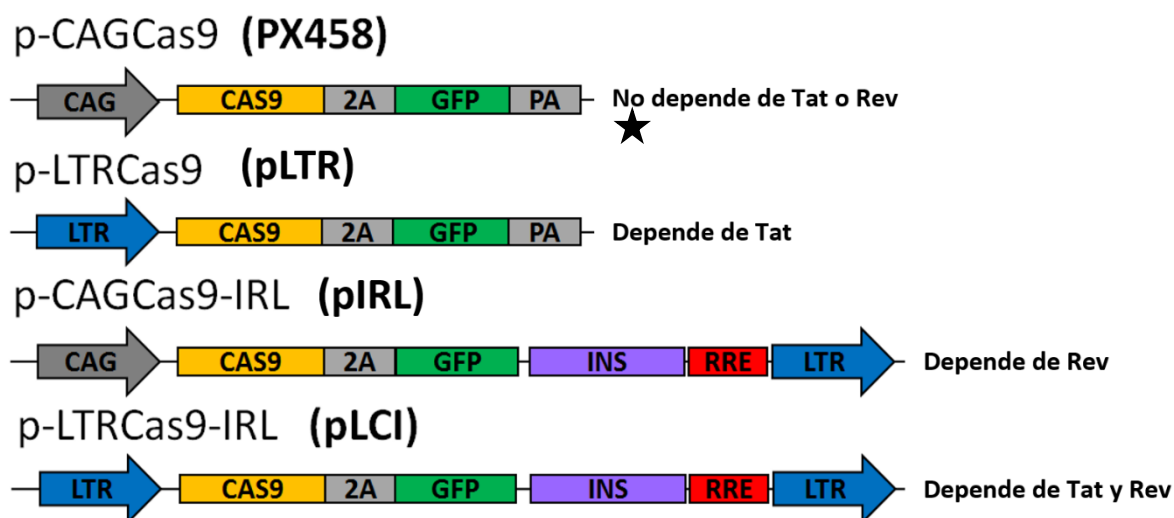
Sin embargo, en el análisis de la predicción de la estructura secundaria se identificó una única mutación en el tallo de la estructura de la región de poliadenilación. La secuencia funcional de la señal de poliadenilación se encuentra localizada en el asa de la estructura, lo que sugiere que su función se mantiene íntegra (**Figura 26**).



**Figura 28.** Estructura secundaria de la señal de poliadenilación. A la izquierda se muestra la estructura obtenida por secuenciación y los sitios funcionales se indican con rojo. La mutación se indica con una estrella de color negro. A la derecha se muestra la estructura secundaria correspondiente a la señal de poliadenilación de la cepa de referencia HXB2 del VIH-1.

## Estructura de los plásmidos

Con los resultados anteriores se comprobó la identidad de cada una de las construcciones y se garantizó la función de las secuencias reguladoras para controlar la expresión de los genes Cas9 y GFP. La estructura general de los plásmidos construidos se muestra en la **Figura 27** y se indica la dependencia a las proteínas virales Tat y Rev.

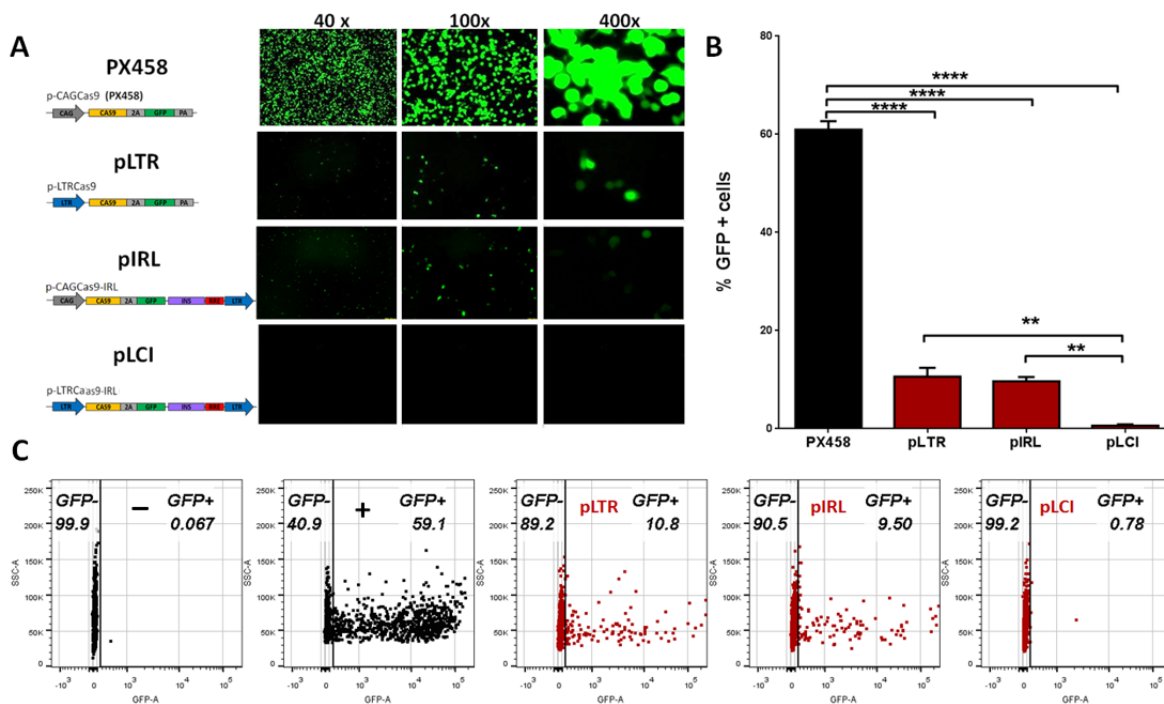


**Figura 29.** Representación esquemática de la estructura de los plásmidos usados para la transfección de las células HEK293. La dependencia o independencia a las proteínas virales Tat o Rev se indica en cada plásmido. CAG: promotor sintético constitutivo; 2A: péptido de autoescisión; PA: señal de poliadenilación; LTR: promotor de VIH-1; INS: secuencia inhibidora; RRE: elemento de respuesta a Rev.

## Evaluación del control de la expresión génica por las secuencias LTR e IRL.

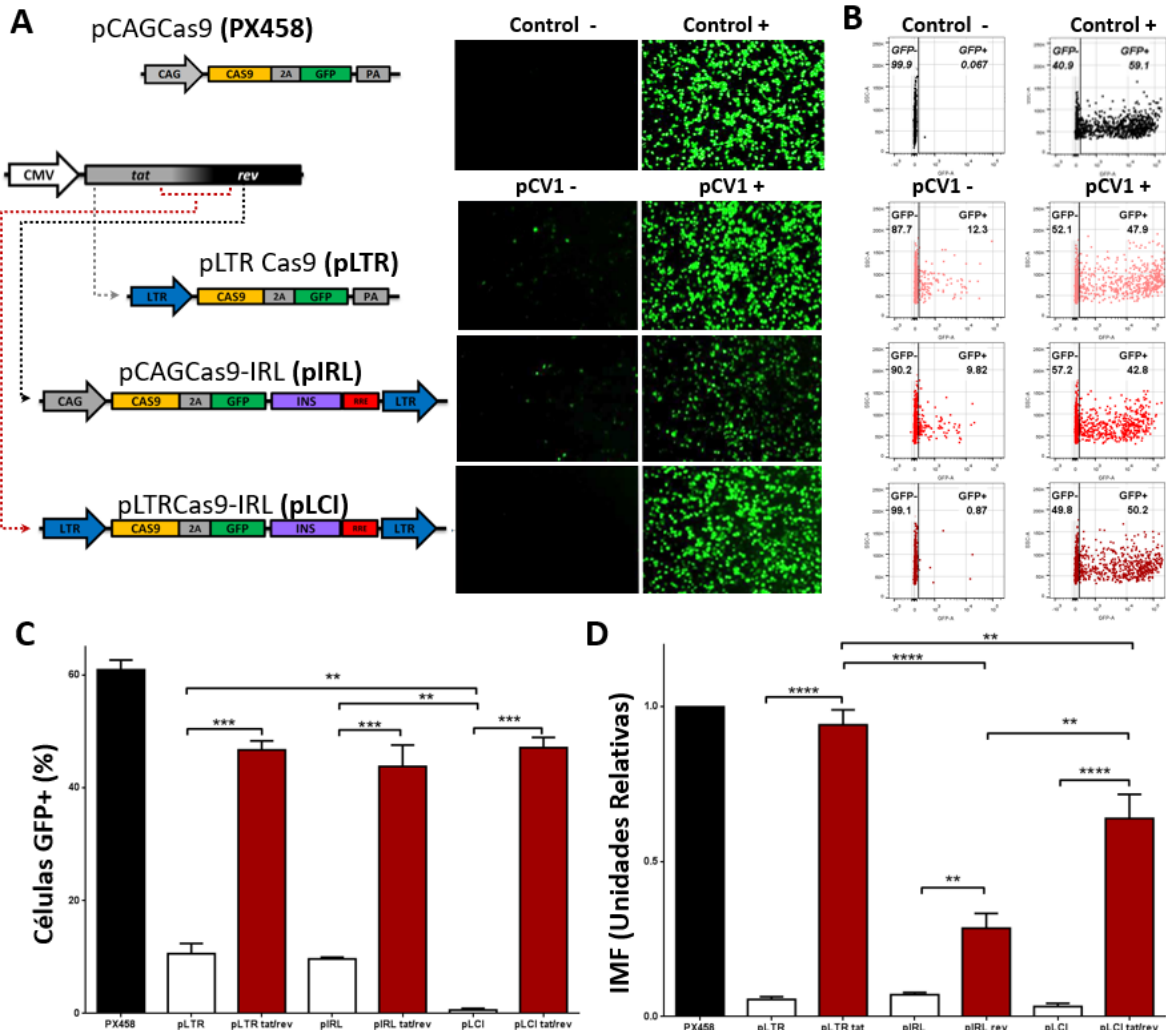
Para evaluar el control de la expresión génica por las secuencias reguladoras del VIH-1, se usó el plásmido PX458 como control de transfección. Se usaron los plásmidos pLTR, pIRL y pLCI en concentraciones equimolares considerando el tamaño de las construcciones, para transfectar células HEK293 y comparar el

efecto entre las secuencias reguladoras. Las células GFP+ se observaron 48 hrs después de la transfección por microscopía de fluorescencia (**Figura 28A**). La presencia de GFP indicó la capacidad que tienen las secuencias pLTR y pIRL del VIH-1 para inhibir la expresión del gen Cas9 (**Figuras 28A y B**). Los ensayos de transfección mostraron una disminución en el porcentaje de células GFP+ para pLTR (13.27%), pIRL (11.49%) y pLCI (0.54%) en comparación con PX458 (60.4% de células) (**Figura 28B**). La disminución en la expresión de GFP sugirió que estaba regulada negativamente por el promotor LTR y las secuencias inhibidoras presentes en IRL, y que las proteínas virales Tat y Rev son necesarias para inducir la expresión de GFP. Por otra parte, se observó que LTR e IRL (pLCI) presentaron un efecto regulador sinérgico que se reflejó en una fuerte disminución en el número de células GFP+ en comparación con el promotor (pLTR) y con las secuencias inhibidoras solas (pIRL) (**Figuras 28B y C**).



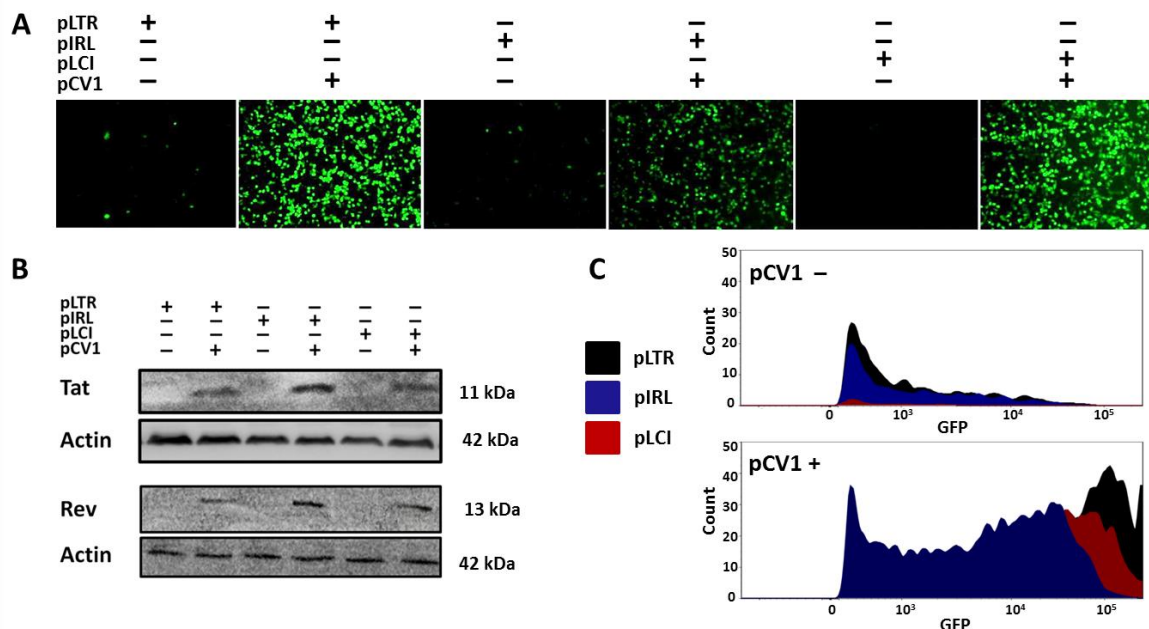
**Figura 30.** Inhibición de la expresión génica por las secuencias reguladoras LTR, INS y RRE. **A)** Inhibición diferencial de la expresión del gen GFP en células HEK293 transfectadas con PX458 (control de transfección), pLTR, pIRL y pLCI en ausencia de las proteínas virales Tat y Rev. Las células GFP+ se observaron 48 h después de la transfección por microscopía de fluorescencia a 40, 100 y 400x. **B)** Gráfica representativa de promedio del porcentaje de células GFP+ transfectadas con PX458, pLTR, pIRL y pLCI. **C)** Representación de gráfica de puntos para células GFP+ de las transfecciones realizadas con PX458, pLTR, pIRL y pLCI (se muestran 1,000 eventos). Se observó la inhibición de la expresión del gen GFP por las secuencias reguladoras del VIH-1 (LTR e IRL)  $P < 0,0001$ . Se muestra el promedio  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

Por otra parte, para comprobar la dependencia a las proteínas Tat y Rev e inducir la expresión de GFP, los ensayos de transfección se llevaron a cabo utilizando el plásmido pCV1 (el cual proporciona ambas proteínas) y los plásmidos que contienen las secuencias reguladoras (pLTR, pIRL y pLCI) (**Figura 29A esquema de transactivación**). La cotransfección de las construcciones pLTR, pIRL y pLCI con pCV1 dio como resultado una sobreexpresión del gen GFP, que muestra una regulación positiva de la expresión de Cas9 y GFP. Los resultados se confirmaron por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (**Figuras 29A-D**). Se observó que no hubo diferencia en el porcentaje del número de células GFP+ al comparar las construcciones probadas (**Figura 29C**).



**Figura 31.** Regulación de la expresión génica por las proteínas Tat y Rev. **A)** Representación esquemática de la regulación de la expresión del gen GFP por Tat y Rev para pLTR, pIRL y pLCI. Expresión diferencial del gen GFP en células HEK293 transfectadas con PX458 (control de transfección), pLTR, pIRL y pLCI con o sin pCV1. Las células GFP+ se observaron 48 h después de la transfección por microscopía de fluorescencia a 100x. **B)** Representación gráfica de puntos de células GFP+ para PX458, pLTR, pIRL y pLCI con o sin pCV1 (se muestran 1,000 eventos). Se observó la inhibición de la expresión del gen GFP por secuencias reguladoras del VIH-1 (LTR e IRL) y la sobreexpresión de la GFP por la presencia de las proteínas virales Tat y Rev (pCV1+). **C)** Gráfica representativa del promedio del porcentaje de células GFP+ transfectadas con PX458, pLTR, pIRL y pLCI con o sin pCV1.  $P < 0,0001$ . **D)** Gráfica representativa del promedio de la IMF de células HEK293 transfectadas con cada construcción con o sin pCV1.  $P < 0,0001$ . Para todos los gráficos, la barra negra representa el control de transfección; las barras blancas representan la transfección de pLTR, pIRL y pLCI en ausencia de Tat y Rev; Las barras rojas indican el efecto de Tat y Rev en la expresión de GFP para todas las construcciones. Se muestra el promedio  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

En cambio, se observó una diferencia en la intensidad media de fluorescencia entre las construcciones probadas, lo que sugiere que puede ser dependiente del efecto de las secuencias reguladoras. Se pudo observar que las secuencias INS tienen un efecto potente para disminuir la expresión génica aún con la proteína viral Rev pero no un efecto directo en el número de células que expresan GFP **(Figuras 29C y D)**. Cuando el promotor CAG fue sustituido por el LTR, se observó que la proteína Tat del VIH mejora notablemente la eficiencia transcripcional del LTR en comparación con el promotor CAG **(pIRL comparado con pLCI, IMF Figuras 29D y 30 A y C)**. El efecto inhibitor otorgado por el INS fue compensado por la fuerte activación del LTR por Tat. Este resultado coincide con lo reportado en otros estudios en donde se ha demostrado que el LTR-Tat es un promotor mucho más eficiente que el promotor de CMV (McCoubrie y col., 2004). Para confirmar la dependencia de las construcciones a las proteínas virales, se detectó por Western Blot la presencia de Tat y Rev en las células transfectadas con o sin pCV1 **(Figura 30B)**.



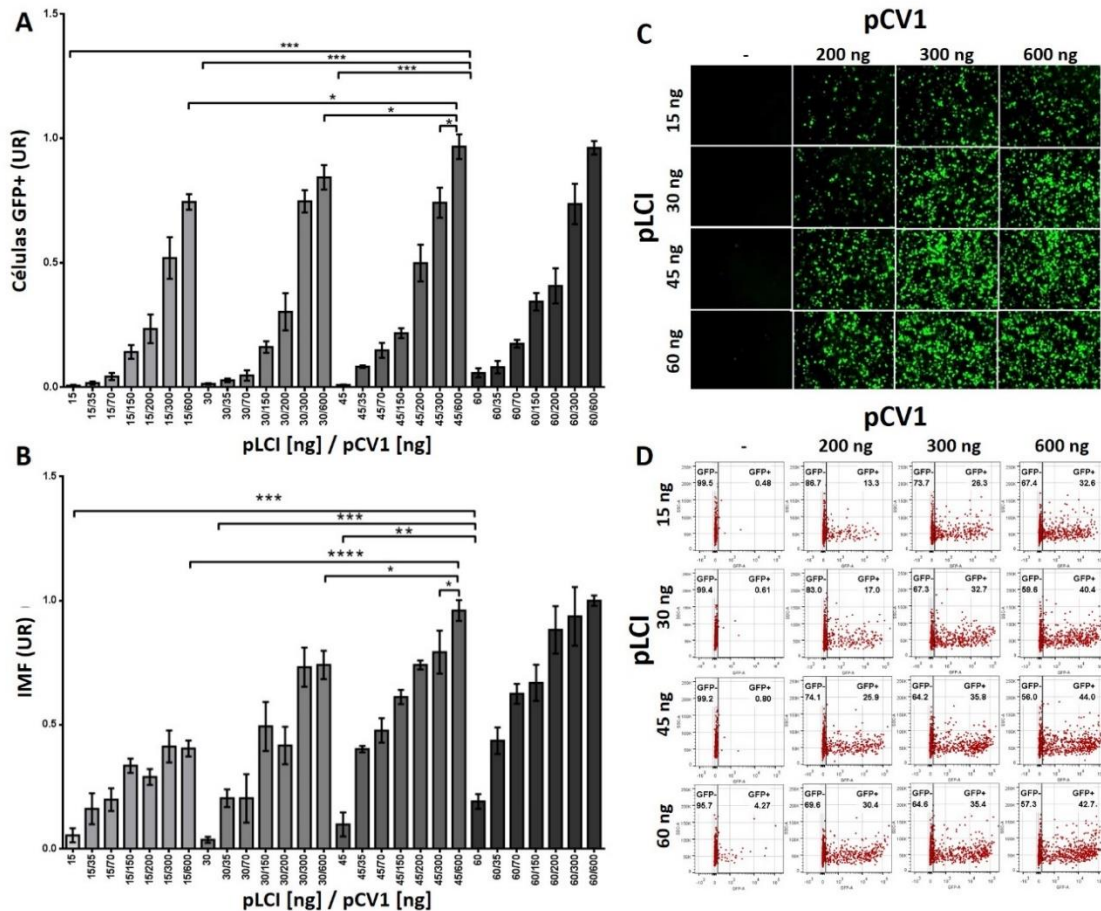
**Figura 32.** Regulación del gen GFP dependiente de la presencia de las proteínas Tat y Rev. **A)** Imágenes de microscopía de fluorescencia a 100x que muestra a las células HEK293 positivas para GFP que se transfectoron con pLCl con o sin pCV1. **B)** Detección de las proteínas virales Tat y Rev por Western Blot en células transfectadas con o sin pCV1. La actina se utilizó como control de carga de proteínas. **C)** Histograma de citometría de flujo que muestra la superposición de la población de las células GFP+ por el LTR e IRL por separado y en conjunto, en presencia o ausencia de Tat y Rev (pCV1 +/-). Se observa una expresión diferencial medida a través de la presencia de células positivas para GFP y la IMF. pLTR en negro, pIRL en azul y pLCl en rojo.

### Curva de titulación de los plásmidos pLCl y pCV1

Para evaluar la sensibilidad de la regulación propuesta, se realizó un experimento de titulación de pLCl y pCV1 para inducir la expresión de Cas9. Las células HEK293 se transfectaron con diferentes concentraciones de pLCl y pCV1 y la expresión de GFP se analizó por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo 48 hrs después de la transfección. Se observó que las concentraciones de pLCl menores de 45 ng en ausencia de Tat y Rev, mantuvieron la expresión de GFP controlada, y el aumento de la concentración de pLCl a 60 ng, condujo a la presencia de GFP (**Figura 31A**). La concentración mínima de pCV1 necesaria para expresar la GFP fue de 35 ng (**Figura 31B**). Por otra parte, la proporción para



obtener la máxima expresión de GFP fue de 1:13 de pLCI (45 ng) y pCV1 (600 ng), respectivamente (**Figuras 31A-D**). No se observó un aumento en el número de células GFP+ o en la IMF a concentraciones mayores a 600 ng de pCV1 y de 45 ng de pLCI, lo que sugiere la saturación del sistema. Estos resultados demuestran que el sistema puede responder a bajas concentraciones de Tat y Rev y que la expresión es directamente proporcional a la disponibilidad de las proteínas virales Tat y Rev.

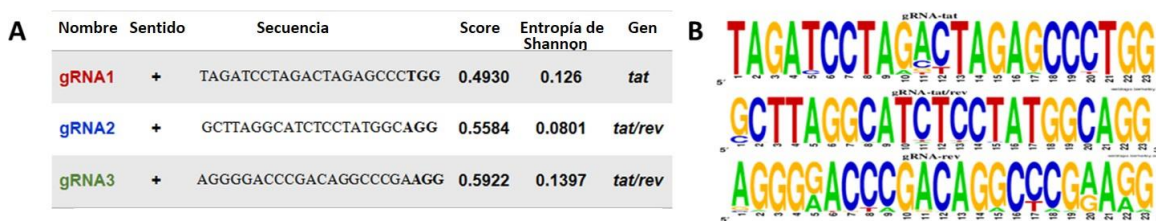


**Figura 33.** Reactivación de la expresión de GFP dependiente de la concentración de pCV1. **A)** Gráfica que representa los valores promedio de las células GFP+ para cada concentración de pLCI y pCV1. **B)** Gráfica que representa los valores promedio de la IMF de la expresión de GFP para cada concentración de pLCI y pCV1. El aumento de los niveles de expresión de GFP depende directamente de las concentraciones de pCV1; se observa el mayor número de células GFP+ y de la IMF con 45 ng y 600 ng de pLCI y pCV1 respectivamente.  $P < 0,01$ . **C)** Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HEK293 48 h después de la transfección con diferentes concentraciones de pLCI (15-60 ng) y pCV1 (200-600 ng). **D)** Representación de

gráfica de puntos de células GFP+ para la cotransfección de pLCl (15-60 ng) y pCV1(200-600 ng) (se muestran 1,000 eventos). Se muestran los valores promedio  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

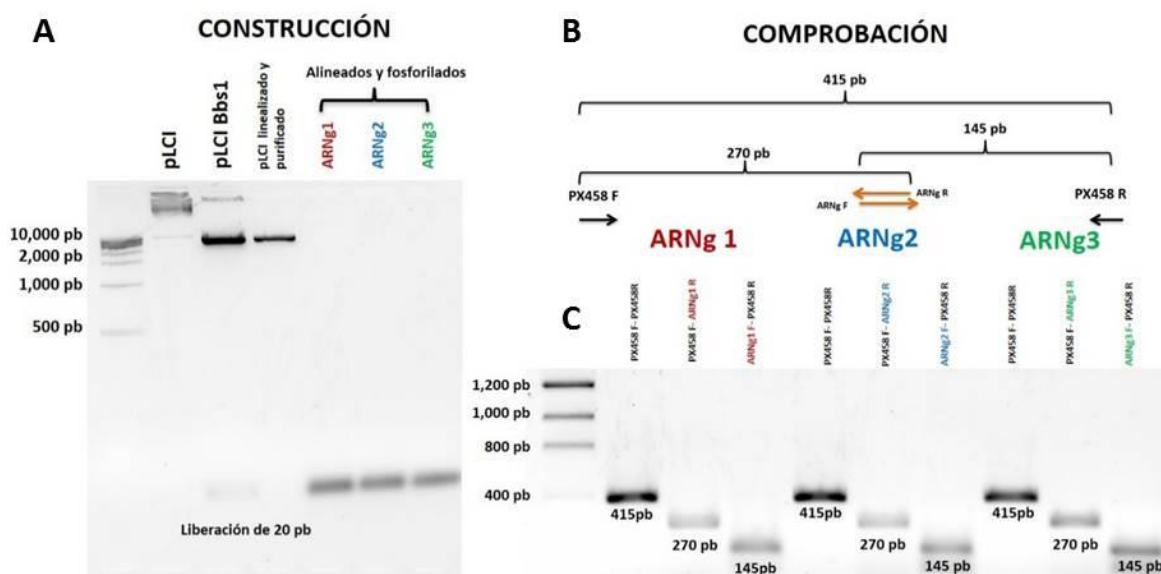
## Inhibición de la expresión de GFP por los ARNg

Se seleccionaron tres ARNg dirigidos a los genes *tat* y *rev* del VIH-1, los cuales cumplieron con los criterios de selección del Broad Institute que incluyen una alta actividad para inducir el corte y que se representa como “score” y ser altamente conservados, para abarcar a un mayor número de variantes virales. Los ARNg también fueron seleccionados tomando en cuenta su proximidad al extremo 5’ para mejorar el efecto de inhibición (**Figuras 32A y B**).



**Figura 34.** Secuencias de los ARNg para la inactivación de los genes *tat* y *rev* del VIH-1. **A)** Las puntuaciones de especificidad para CRISPR se calcularon mediante el software CRISPRko (<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>). **B)** Imagen que muestra la conservación de cada secuencia de los ARNg. Se alinearon 769 secuencias del VIH-1 del subtipo B correspondientes a cada ARNg del Compendio de Secuencias del VIH del Laboratorio Nacional de Los Alamos (LANL) de EE.UU.

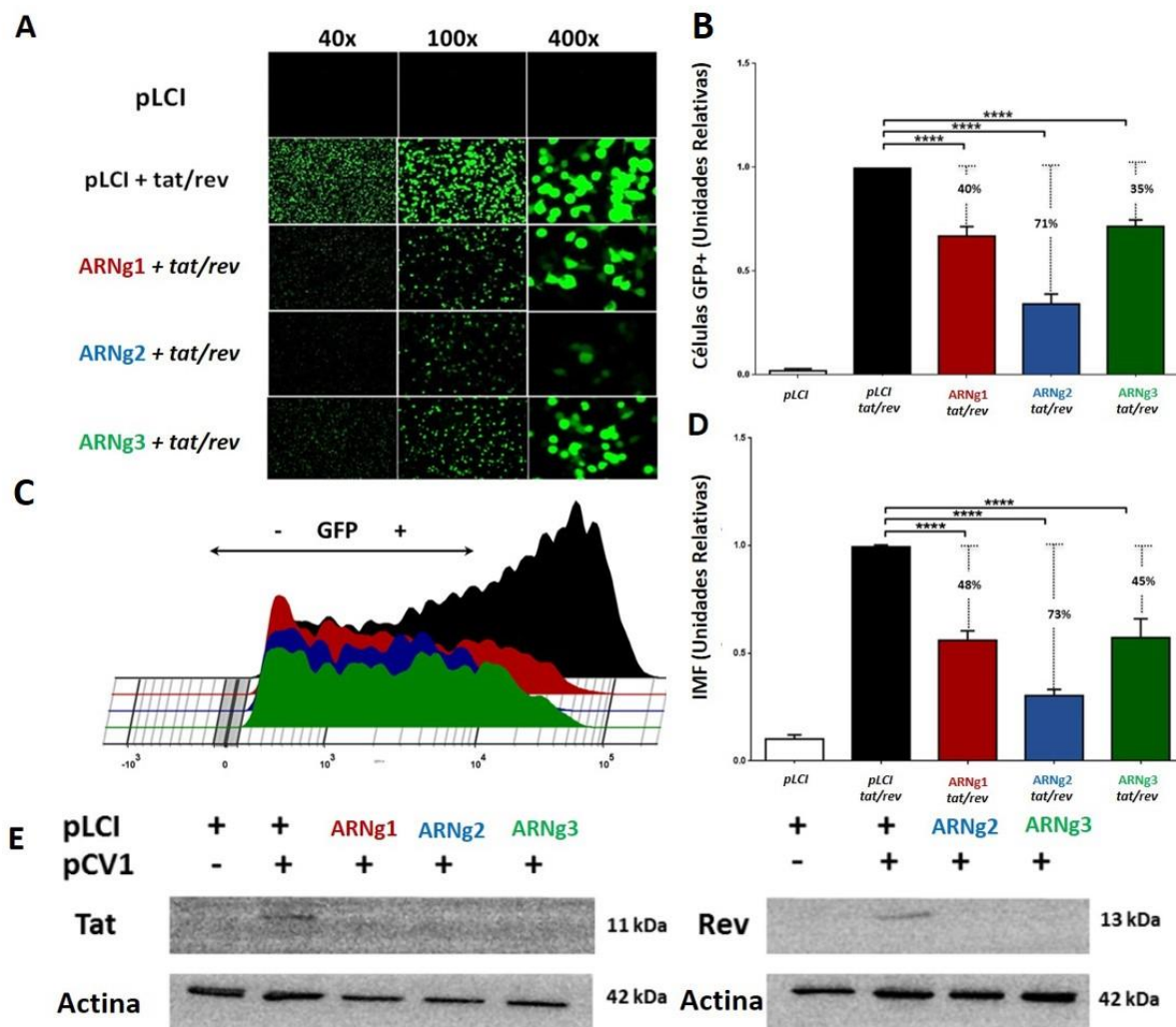
Una vez seleccionados, los ARNg se acoplaron al plásmido pLCI. Los oligonucleótidos se alinearon y se fosforilaron para ser unidos al plásmido pLCI, el cual se cortó previamente con la enzima BbsI para ser programado (**Figura 33A**). Se corroboró la restricción en pLCI al observar la liberación de 20 pb y después se realizó la purificación. Los plásmidos programados con cada ARNg se comprobaron por PCR como se indica en la (**Figuras 33B y C**).



**Figura 35.** Programación de las secuencias de los ARNg en pLCI. **A)** Restricción del plásmido LCI con la enzima BbsI para liberar 20 pb y generar los extremos cohesivos para ligar las secuencias de los ARNg1,2,3 previamente alineados y fosforilados (carriles 5-7). **B)** Esquema que indica la estrategia para comprobar los plásmidos programados mediante la amplificación por PCR de 3 productos con tamaños específicos. **C)** Comprobación por PCR para cada ARNg. Se observa el patrón de bandas que confirma los plásmidos programados con cada ARNg.

Una vez programados los plásmidos, se evaluó el efecto de los ARNg dirigidos a los genes *tat* y *tat/rev*. Los ensayos de transfección con los ARNg mostraron una disminución en el porcentaje de células GFP+ en presencia de las proteínas Tat y Rev codificadas por pCV1, en comparación con el control (ARNg1 40%, ARNg2 71% y ARNg3 35% (**Figura 34B**). Además, el análisis de citometría de flujo mostró

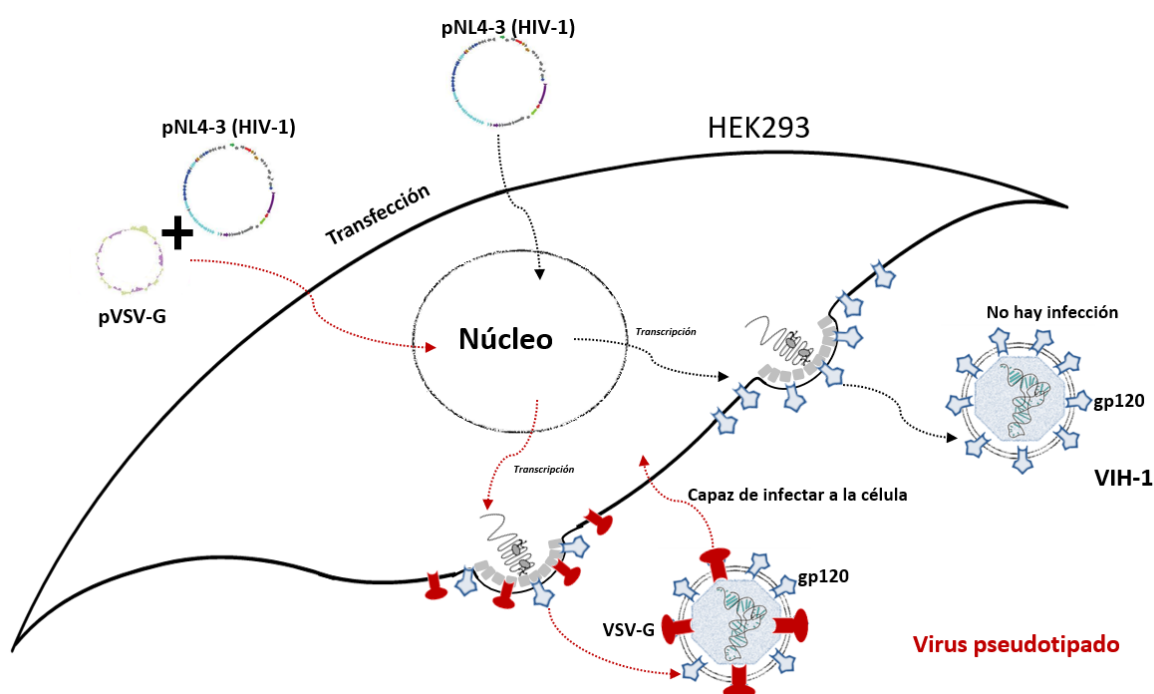
una disminución en la IMF para todos los ARNgS (ARNg1 48%, ARNg2 73% y ARNg3 45%;  $P < 0.001$  (**Figura 34 D**). Se observó que el ARNg2 tuvo un efecto regulador más potente que los ARNg1 y ARNg3, tanto en el número de células GFP+ como en la IMF. Esto puede deberse probablemente a que el ARNg2 está dirigido contra los dos genes regulatorios *tat* y *rev* ( $P < 0.001$ ) (**Figuras 34 A-D**). El análisis de WB también mostró una disminución en la detección de Tat y Rev en las células transfectadas con los ARNg1-3, lo que demuestra la autorregulación del sistema (**Figura 34E**). Se observó, además, un desplazamiento de la población de células GFP+ a bajos niveles de fluorescencia, cuando se probaron los 3 ARNg en presencia de Tat y Rev (**Figura 34C**).



**Figura 36.** Inhibición de la expresión del gen GFP por los ARNg. **A)** Expresión de GFP en las células HEK293 transfectadas con pLCl, pLCl con pCV1 y pLCl-ARNg1-3 con pCV1, 48 hrs después de la transfección. Las células se observaron en microscopio de fluorescencia a 40x, 100x y 400x. **B)** La gráfica representa los valores promedio de las células GFP+. Las secuencias reguladoras del VIH-1 y la adición de los ARNg dirigidos contra tat y tat/rev muestran una inhibición de las células GFP+ en presencia de proteínas Tat y Rev (ARNg1 40.3%, ARNg2 71% y ARNg 35%),  $P < 0.001$ . **C)** Comparación de la inhibición de la expresión del gen GFP por LTR e IRL. La gráfica muestra un desplazamiento de las células GFP+ a menor intensidad de fluorescencia para todos los ARNg en presencia de Tat y Rev. Se muestra la inducción de la expresión de GFP por las proteínas Tat y Rev (negro) y el efecto de los ARNg 1, 2 y 3 (rojo, azul y verde, respectivamente). **D)** La gráfica representa el promedio de la IMF de la expresión de GFP. Las secuencias reguladoras del VIH-1 y la adición de ARNg dirigidos contra tat y tat/rev muestran una inhibición de MFI en presencia de proteínas Tat y Rev (ARNg1 48%, ARNg 73% y ARNg 45%),  $P < 0.001$ . **E)** Detección de las proteínas virales Tat y Rev por Western blot en células HEK293 transfectadas. Se observa el abatimiento de las proteínas Tat y Rev por los ARNg1,2,3. Se usó actina como control de carga de proteínas. Se muestran los valores promedio  $\pm$  DE de tres experimentos independientes.

## Inhibición de la replicación del VIH-1 por ARNg

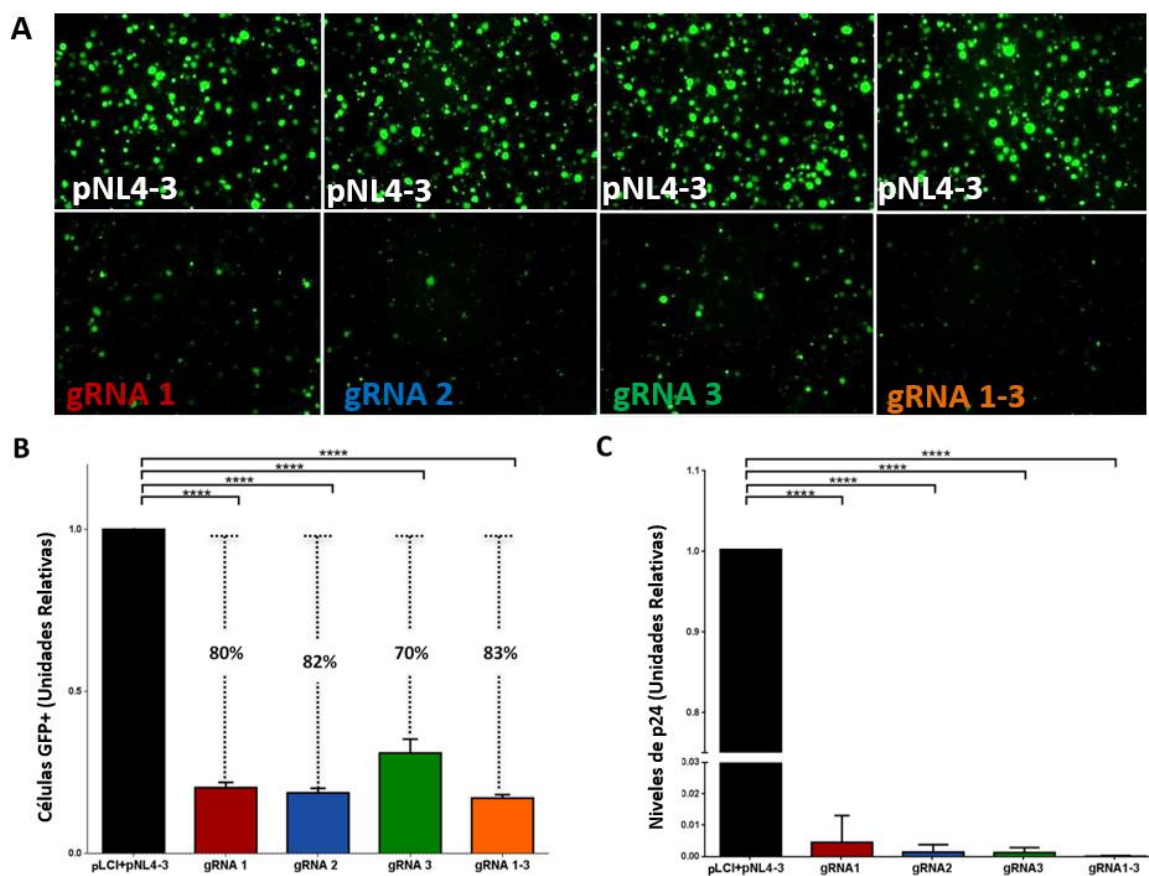
Para verificar el efecto de los ARNg sobre la replicación viral, se usó un modelo de producción del VIH-1 pseudotipado con VSV-G (**Figura 35**), usando los plásmidos pNL4-3 y pVSV-G. El virus producido fue capaz de infectar a la línea celular HEK293.



**Figura 37.** Producción del VIH-1 pseudotipado con VSV-G. La transfección del plásmido pNL4-3 en las células HEK293 induce la producción de partículas virales infecciosas del VIH-1. La cotransfección de pNL4-3 con pVSV-G induce la formación de partículas virales del VIH-1 las cuales acoplan a su membrana a la glicoproteína VSV-G lo que le confiere al virus la capacidad de infectar cualquier tipo celular emulando un modelo de infección.

Se realizó la cotransfección de pNL4-3/pVSV-G con pLCI-ARNg y después de 6 días, se observó una fuerte inhibición de la expresión de GFP con cada ARNg probado de manera independiente (75-82%) y la mezcla de todos (83%), en comparación con el control pLCI/pNL4-3/pVSV-G (**Figuras 36A y B**). Para confirmar que la autorregulación del sistema tiene un efecto sobre la replicación

viral, se cuantificó por ELISA la concentración del antígeno de la cápside p24 en el sobrenadante de cultivo. Se observó una fuerte disminución de los niveles de p24 cuando los ARNg se probaron de forma individual; sin embargo, cuando se probó la mezcla de todos los ARNg1-3 se alcanzó la indetectabilidad de p24 (Figura 36C).

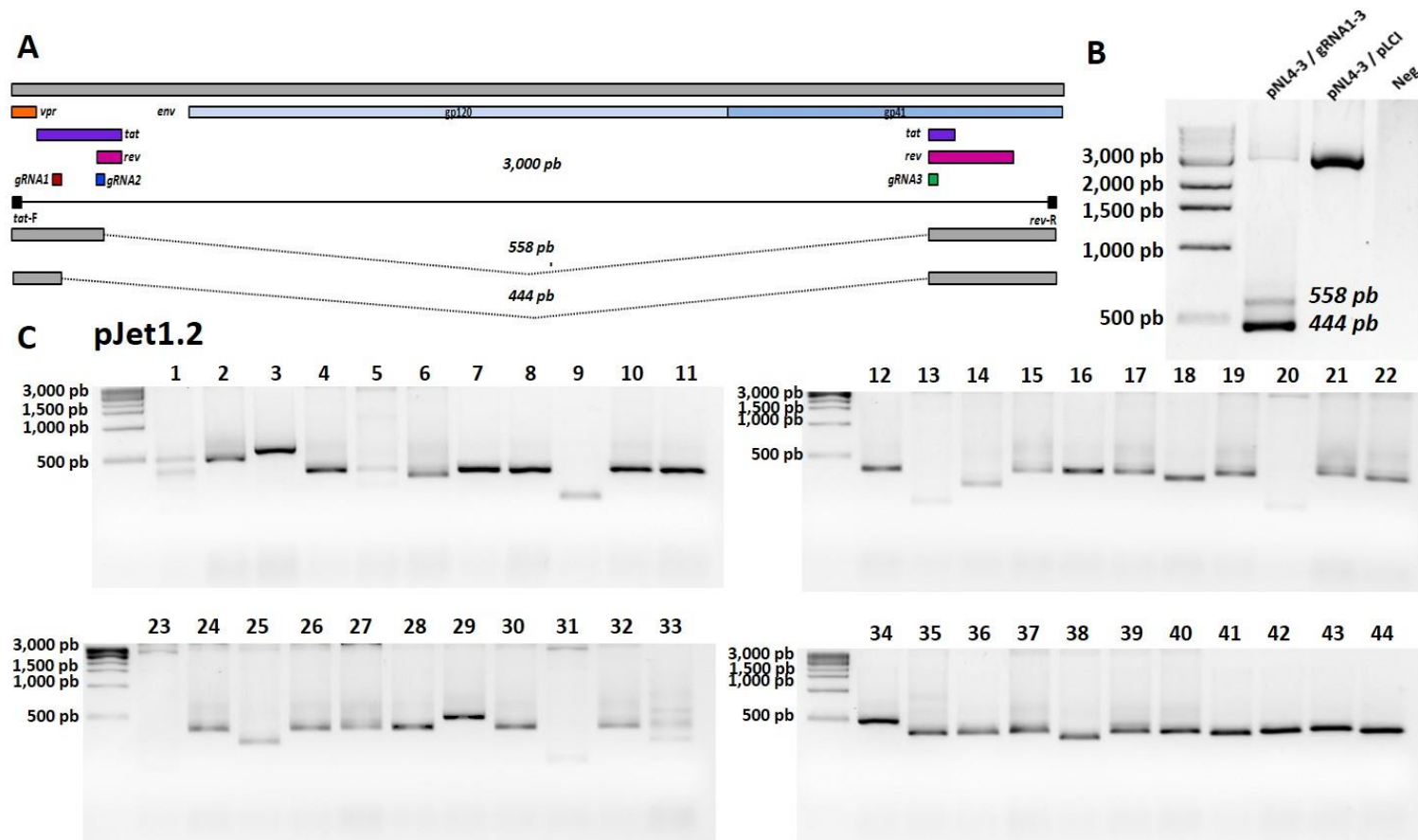


**Figura 38.** Inhibición de la replicación del VIH-1 por los ARNg. **A)** Las células HEK293 se co-transfectaron con pLCl, pLCl-ARNg1-3 y pNL4-3; 6 días después de la transfección, se observó la expresión de GFP por microscopía de fluorescencia a 100x. **B)** Inhibición de la expresión del gen GFP por los ARNg. Las células GFP+ tratadas con cada plásmido se cuantificaron por citometría de flujo. La barra negra representa el control de transfección de pLCl con pNL4-3, las transfecciones realizadas con pLCl con los ARNg1, 2, 3 representan las barras en color rojo, azul y verde respectivamente y la mezcla de todos los ARNg en color naranja; todos en presencia de pNL4-3, .  $P < 0,0001$ . **C)** La replicación del VIH-1 se determinó mediante la detección de los niveles de p24 en el sobrenadante por ELISA.

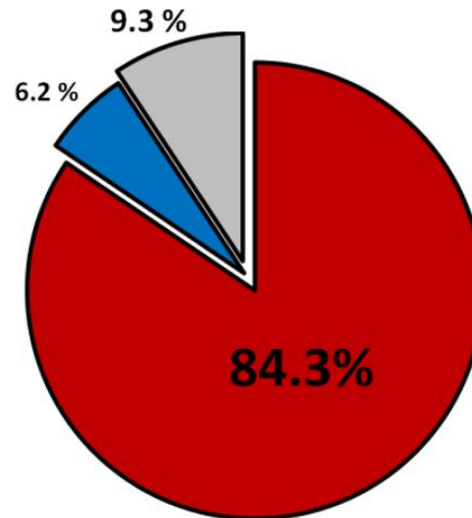
Se verificó la escisión del ADN inducida por el efecto de la mezcla de los ARNg, para lo cual se realizó la extracción de ADN celular y la amplificación por PCR usando oligonucleótidos que flanquean a los genes *tat* y *rev* (**Tabla 13**). Se observó la presencia de tres bandas correspondientes al ADN sin escisión (3,000 pb), el corte realizado por ARNg1/ARNg3 (444 pb) y por ARNg2/ARNg3 (558 pb) (**Figura 37B**). Estos resultados son consistentes con el análisis *in silico* (**Figura 37A**).




Los productos amplificados se clonaron en el plásmido pJet1.2 y se aislaron 44 colonias para posteriormente extraer los plásmidos y comprobar por PCR el tamaño del producto clonado (**Figura 37C**). Se confirmaron 32 secuencias que corresponden a las mutaciones esperadas y se determinó que la eficiencia del sistema diseñado para escindir al genoma viral fue del 90.6% y que incluye cortes realizados entre el ARNg1-ARNg3 y el ARNg2-ARNg3. El 9.3% corresponde a mutaciones hechas por un solo ARNg (**Figura 38**). Finalmente se comprobó la escisión por secuenciación (**Figura 39**) confirmando los cortes realizados con cada ARNg. Por otra parte, se descartaron 12 plásmidos debido a que no se obtuvo la secuenciación confirmatoria.



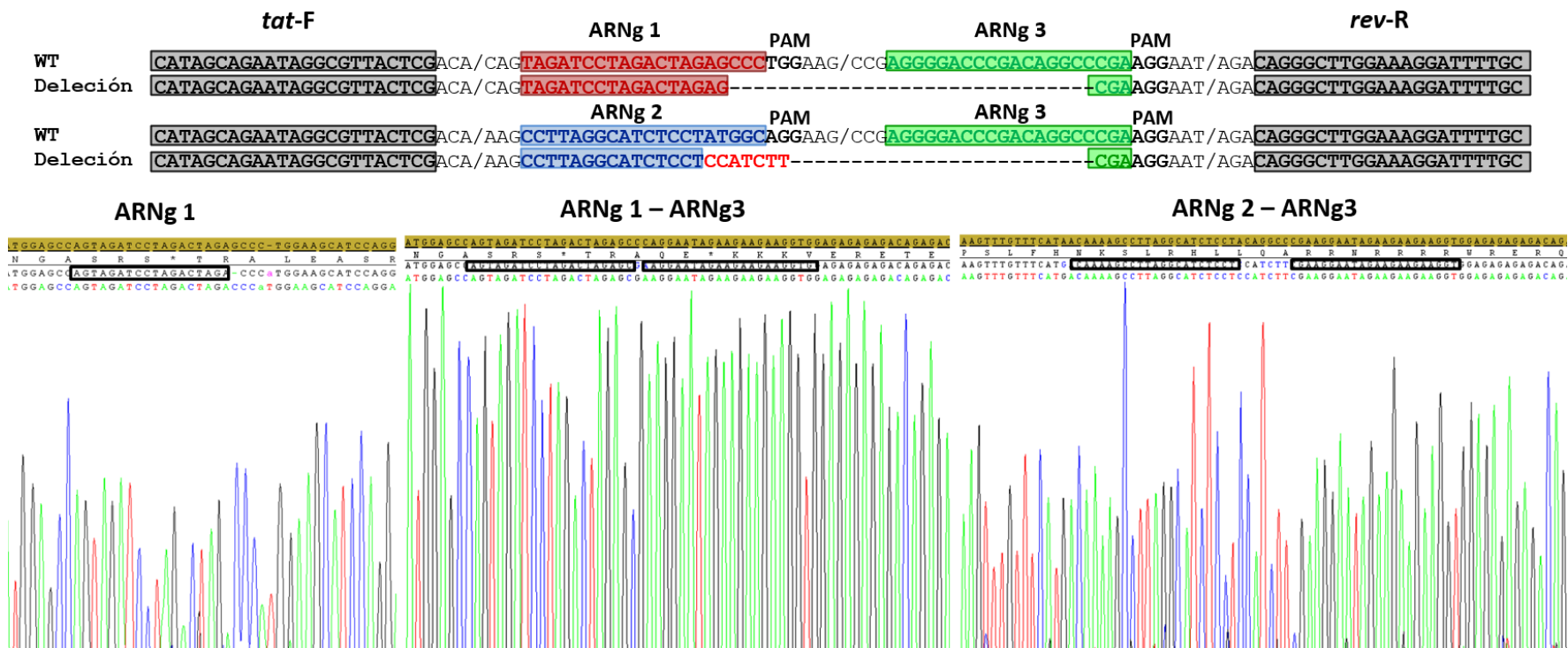


**Figura 39.** Escisión del genoma viral por los ARNg. **A)** Representación esquemática del genoma del VIH-1 que indica la ubicación de los ARNg en los exones correspondientes a los genes virales *tat* y *rev*. La ubicación de los ARNg se indica en rectángulos rojo, azul y verde, y la posición de los oligonucleótidos usados para obtener los productos de PCR se indica en negro. Los cortes realizados con los ARNg dan como resultado tres productos de 3000 pb (sin escisión), 558 pb y 444 pb. **B)** Identificación de los productos escindidos por los ARNg; la imagen del gel de agarosa al 1.5% muestra la presencia de bandas de 444 pb y 558 pb correspondientes a la pérdida de 2556 pb y 2442 pb, por el efecto del ARNg1-ARNg3 y ARNg2-ARNg3, respectivamente. **C)** Los productos de PCR obtenidos se clonaron en pJet1.2 y se obtuvieron 44 plásmidos. Se comprobó por PCR el producto ligado.



Combinación de ARNg	Tamaño	Numero de colonias
 ARNg1/ARNg3	444 pb	27/32 (84.3%)
 ARNg2/ARNg3	558 pb	02/32 (6.2%)
 Sin deleciones	3,000 pb	03/32 (9.3%)

**Figura 40.** Gráfica que representa el porcentaje de plásmidos que contienen los productos de PCR de 444 pb, 558 pb y 3000 pb que se obtuvieron por el efecto de los ARNg1-3.

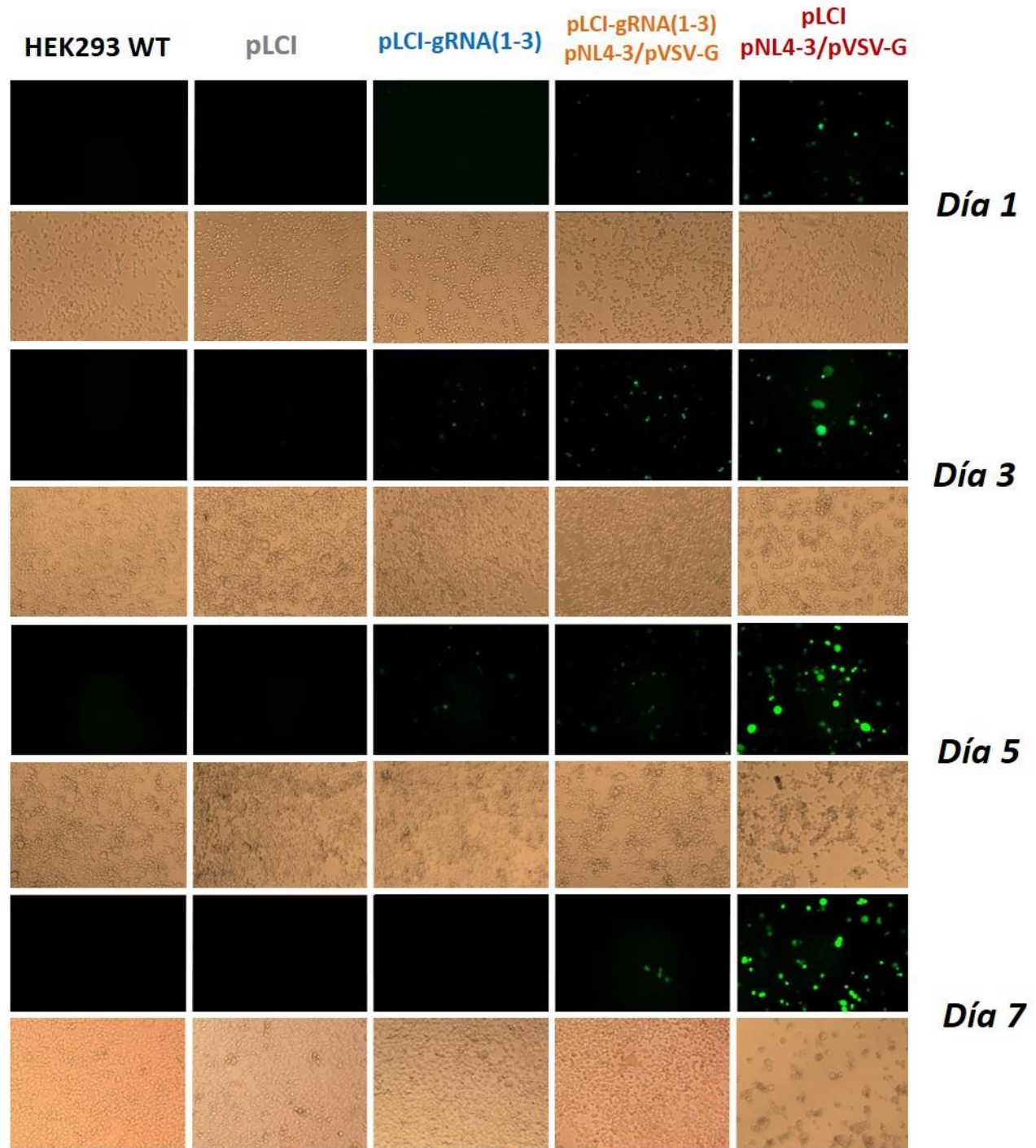


**Figura 41.** Secuencia representativa del corte del genoma viral por los ARNg. Se indica la secuencia de unión a los ARNg 1, 2 y 3 en color rojo, azul y verde respectivamente; además se muestra el electroferograma de cada escisión.

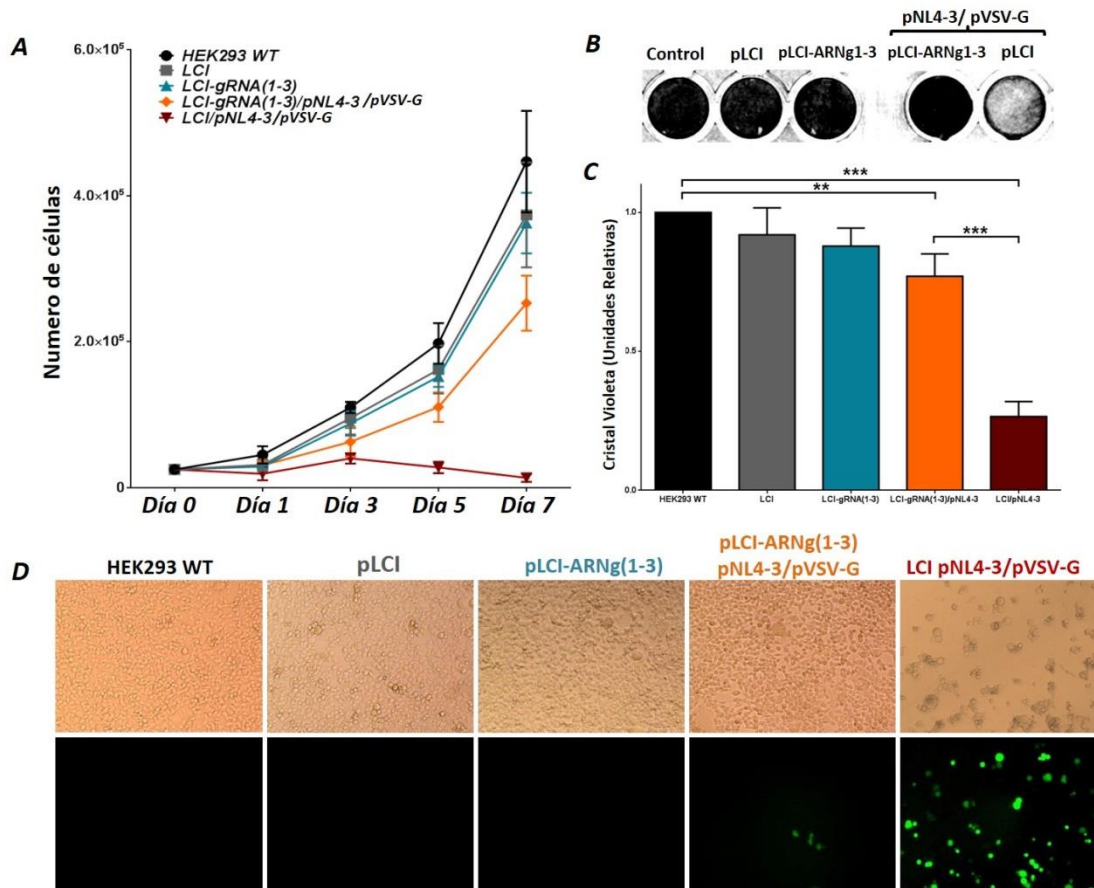
## Viabilidad

Una vez verificado el efecto de los ARNg para autorregular el sistema propuesto y tomando en cuenta que la edición múltiple conduce a la cura de las células infectadas, se evaluó su efecto sobre la proliferación y la viabilidad celular. El análisis de la viabilidad celular mostró que la mezcla de los ARNg es inocua ya que no afectó la proliferación celular en comparación con las células sin tratamiento y con las células transfectadas con Cas9 sin ARNg (pLCI) **(Figuras 40 y 41)**. Además, se observó que los ARNg protegen contra la muerte celular inducida por las partículas del VIH-1 pseudotipado con VSV-G **(Figura 42)**. Las células que produjeron al VIH-1 pseudotipado mostraron cambios en su morfología y en la tasa de proliferación desde el día 3; este efecto se incrementó para el día 7 donde se observó la inhibición contundente de la proliferación y muerte celular **(Figuras 40 y 41A)** que se comprobó por el ensayo de cristal violeta para la transfección de pLCI/pNL4-3/pVSVG en comparación con las células protegidas con los ARNg **(Figuras 41B y C)**.

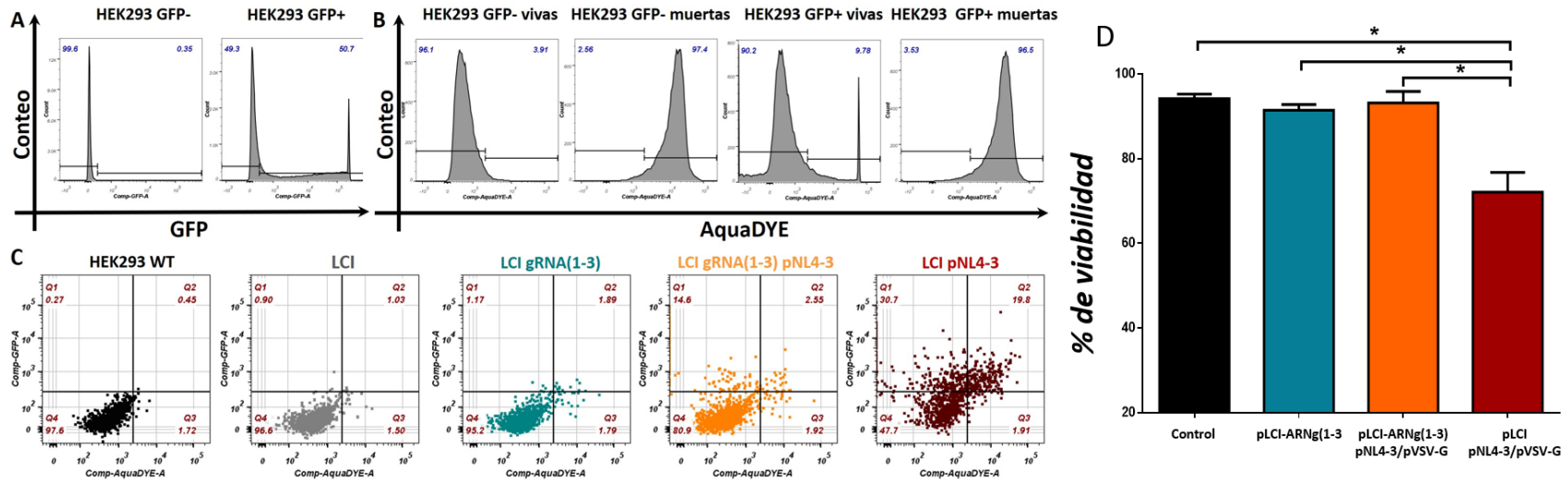
Para evaluar la viabilidad por citometría de flujo se usaron controles de células que expresaban GFP, células vivas y células muertas marcadas con el reactivo LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain (Invitrogene, EE.UU.), para compensar y evitar la interferencia entre ambas fluorescencias **(Figura 42A)**. Se observó una disminución significativa de la expresión de GFP en las células que se transfectaron con los ARNg1-3 en presencia del virus. Además se obtuvo una viabilidad por arriba del 94% en las células tratadas con los ARNg1-3 en comparación con las células no protegidas (pLCI/pNL4-3/pVSVG), lo que comprueba la inocuidad y la protección que confieren los ARNg **(Figura 42B)**.



**Figura 42.** Imágenes de las células HEK293 transfectadas con los plásmidos pLCl, pLCl-ARNg1-3, pLCl-ARNg1-3/pNL4-3/pVSVG y pLCl/pNL4-3/pVSVG después de 1, 3, 5 y 7 días de la transfección. Las células se observaron en campo claro y por microscopía de fluorescencia a 100x. Se aprecia que los ARNg no alteran la proliferación o la morfología celular, sin embargo, en ausencia del efecto protector de los ARNg (pLCl/pNL4-3/pVSVG), las células cambian su morfología y no proliferan manteniendo la expresión de la GFP.



**Figura 43.** La transfección de pLCI-ARNg 1-3 no mostró cambios en la viabilidad celular y protege a las células de la muerte causada por el virus codificado en pNL4-3. **A)** El gráfico muestra la proliferación de  $1 \times 10^4$  células HEK293 en placas de 96 pozos y el crecimiento celular se monitoreó durante 7 días. La viabilidad celular se midió mediante la prueba de exclusión del colorante azul Tripano. **B)** Fotografía de los pozos correspondientes al ensayo de cristal violeta. Se aprecia la muerte celular para el cultivo que no está protegido con los ARNg en presencia del VIH-1(pLCI-ARNg (1-3) pNL4-3/pVSV-G) **C)** Gráfica que representa la viabilidad de células HEK293 tratadas con cristal violeta en el día 7 después de la transfección. **D)** Imágenes de células HEK293 transfectadas con los plásmidos después de 7 días. Las células se observaron en campo claro y por microscopía de fluorescencia a 100x.

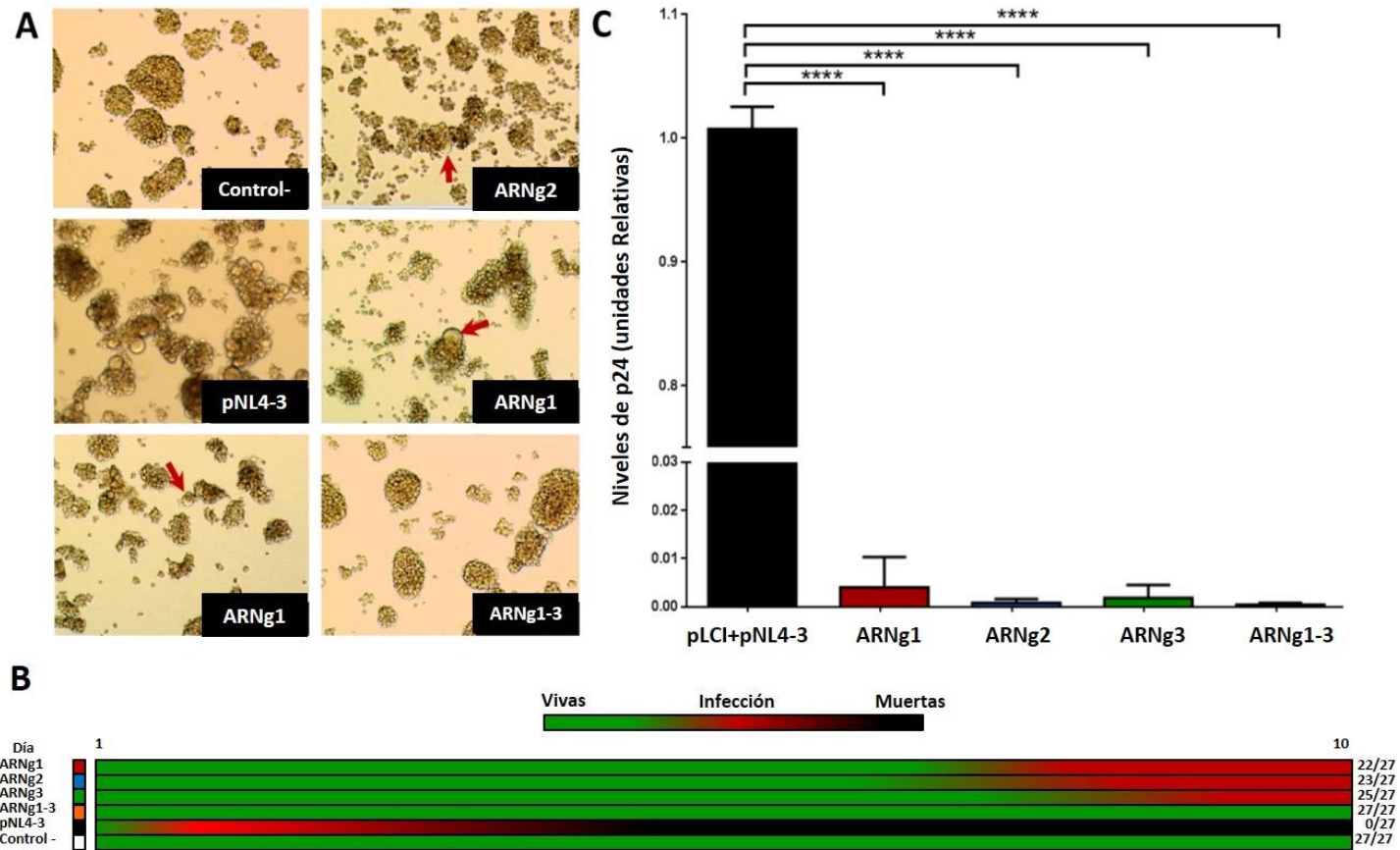


**Figura 44.** Ensayos de viabilidad celular. Las gráficas A y B representan los parámetros que se definieron para la determinación de la viabilidad celular. **A)** Histograma que representa a las células HEK293 sin tinción con el kit de células muertas, y células transfectadas con PX458 como control de expresión de GFP. **B)** Histogramas que representan las células teñidas con el kit de células muertas Aqua Fixable LIVE/DEAD tomando en cuenta la compensación por la fluorescencia de GFP; se usaron células vivas y muertas con y sin GFP para definir los parámetros para la medición de la muerte celular. **C)** Gráfica de puntos que indica de la viabilidad celular medida por citometría de flujo usando el kit de tinción de células muertas Aqua Fixable LIVE/DEAD. Se cuantificaron las células GFP+ para todas las condiciones, después de 7 días de la transfección. Se muestran 1,000 eventos para cada muestra. HEK293 WT (negro), pLCI vacío (plásmido que contiene el promotor LTR, secuencias inhibitoras de INS y RRE, Responsive Rev Element) (gris), pLCI con ARNg 1-3 (azul), pLCI-ARNg 1-3 y pNL4-3 (naranja) y pNL4-3 (rojo). **D)** Gráfica que representa el porcentaje de la viabilidad celular medida por citometría de flujo para el día 7 de la transfección con los pLCI-ARNg1-3 y pNL4-3/pVSV-G.

## Ensayo de infección de MT2

Finalmente, se examinó la presencia de los virus viables en los sobrenadantes de las células HEK293 para evaluar si había un escape del virus al efecto de los ARNg 1-3. Para esto, se realizaron ensayos de infección en células MT2, ya que esta línea celular tiene la característica de formar sincicios (células gigantes multinucleadas) cuando están infectadas con VIH-1, lo que permite visualizar más fácilmente al microscopio el seguimiento del cultivo. Se observó la formación de sincicios desde el segundo día de cultivo para las células que se infectaron con el sobrenadante de las células HEK293 no protegidas y transfectadas con pLCl/pNL4-3/pVSVG. Los cultivos mostraron muerte celular después del cuarto día, sin embargo, las infecciones provenientes de los sobrenadantes de células tratadas con los ARNg individuales en presencia del virus mostraron discretos indicios de la infección hasta 7 días después de haberse iniciado el cultivo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el ensayo de detección de p24 por ELISA (**Figura 36C**). Por otra parte, los sobrenadantes provenientes de las células transfectadas con la mezcla de todos los ARNg 1-3, no mostraron evidencia de la formación de sincicios o de la infección por VIH-1 que se cuantificó por la detección de p24 por ELISA (**Figuras 43A-C**). Estos resultados en conjunto con el análisis de secuenciación demuestran que la inducción de mutaciones múltiples en un sistema autorregulado puede conducir al control de la replicación y a la erradicación del VIH-1.





**Figura 45.** Ensayo de infección en células MT2. **A)** Las células MT2 se cultivaron con el sobrenadante de las células HEK293 transfectadas (células sin plásmido como control negativo, pNL4-3 como control de infección y células tratadas con los pLCI-ARNg1-3, por separado y todos juntos); la formación de sincicios indica la presencia del virus (flecha roja). Los cultivos celulares se siguieron hasta 10 días y se observó un mejor control de la replicación viral usando la mezcla de todos los ARNg 1-3. **B)** El mapa de calor indica el momento en que se evidenció la infección por VIH-1 en las células MT2 para cada ARNg. El mapa de calor es una representación de 27 experimentos y en el lado derecho se indica el número de cultivos celulares en los que no se observó la presencia de sincicios. **C)** La replicación del VIH-1 se cuantificó en los sobrenadantes de cultivo mediante la detección de los niveles del antígeno p24 de la cápside del VIH-1 por ELISA. No se detectó al antígeno p24 en la muestra proveniente de la mezcla de los ARNg1-3 ( $P < 0,0001$ ).

## DISCUSIÓN

El genoma proviral representa la principal barrera para la erradicación del VIH-1. La integración del genoma viral en las células T CD4+ conduce a la persistencia de la infección, evitando el efecto de los medicamentos antirretrovirales y el ataque del sistema inmune que no tienen acceso al núcleo celular (Blankson y col., 2002; Kulpa y Chomont, 2015; Pierson y col., 2000; Razooky y col., 2015). Por lo tanto, las herramientas y estrategias de edición génica representan actualmente la posibilidad de erradicar la infección mediante la inactivación del genoma integrado. CRISPR/Cas9 es un sistema versátil que se puede programar fácilmente por ARNg para inactivar a los genes involucrados en la replicación viral (Liang y col., 2016). Sin embargo, la posibilidad de inducir mutaciones inespecíficas que puedan dañar a las células sanas, representa un riesgo para la aplicación de CRISPR/Cas9 en pacientes infectados con VIH-1; por lo tanto, la edición del genoma debe de estar restringida a las células infectadas para reducir los efectos no deseados.

La regulación de la expresión génica es un proceso complejo que requiere un equilibrio para inducir o suprimir la presencia de una proteína en respuesta a un estímulo. En el caso del VIH-1, las secuencias reguladoras LTR e INS-RRE modulan la expresión génica mediante la unión de las proteínas reguladoras Tat y Rev (Huelsmann y col., 2011), de tal forma que es dependiente del mismo virus.

En este estudio, se evaluó la función de las secuencias LTR e INS-RRE acopladas en el plásmido PX458 para modular la expresión de Cas9 y GFP. Se demostró una fuerte reducción de la expresión génica, aunque los datos muestran que la regulación no fue absoluta si se utiliza una sola secuencia reguladora (**Figuras 28 y 29, LTR e IRL**). Estudios previos han demostrado que el LTR es un promotor débil en ausencia de Tat, y que el aumento en la expresión génica no específica, puede estar influenciada por diferentes factores (Rampalli y col., 2003; Shah y col., 2014) como el antígeno T del SV40 (Arya, 1988), la proteína helicasa del Síndrome de Werner (Mizutani y col., 2015), el factor regulador del interferón 1 (Sgarbanti y col., 2002), PKM2 (Sen y col., 2017) y la familia de factores de transcripción como NFAT (Romanchikova y col., 2003). El promotor LTR contiene secuencias de unión para estas proteínas y, por lo tanto, puede ser modulado por éstas, lo que sugiere que el LTR podría activarse de forma inespecífica en ausencia del VIH-1. Por otro lado, de forma similar, las secuencias INS regulan negativamente la expresión génica mediante un mecanismo de retención de los ARNm en el núcleo; aunque varios estudios han demostrado que las células mantienen una expresión génica discreta que se evidencia por los bajos niveles de una proteína reportera cuando se usan las secuencias INS (Wolff y col., 2003; Schneider y col., 1997; Schwartz y col., 1992b). Esta evidencia sugiere que el gen Cas9 regulado sólo por una de estas secuencias (LTR o INS-RRE) podría permitir la expresión de Cas9 en ciertas condiciones e inducir mutaciones indeseables, aumentando el riesgo cuando se usan múltiples ARNg. Por lo tanto, la dependencia de dos proteínas virales disminuye la posibilidad

de una activación no deseada de Cas9, haciendo que el sistema sea más seguro y efectivo cuando esta tecnología se aplique en humanos.

En este trabajo, se demostró un efecto sinérgico de las secuencias reguladoras LTR e INS-RRE cuando se usan en la misma construcción (pLCI), lo que llevó a un control más estricto de la expresión génica en comparación con las secuencias individuales y que al mismo tiempo es dependiente de las proteínas virales Tat y Rev (**Figura 29, pLTR, pIRL y pLCI**). Estos resultados indican que Tat y Rev son un interruptor molecular eficiente para la expresión de Cas9 cuando la expresión de este gen es controlada por el LTR e INS-RRE. Además, la sensibilidad de este sistema mostró un efecto dependiente de la concentración de Tat y Rev, por lo que la efectividad podría verse afectada por la cinética de la replicación del VIH-1 y la expresión de Tat y Rev (**Figuras 31A y B**). Cabe destacar que la expresión de GFP se indujo con las concentraciones más bajas de pCV1, lo que sugiere una correcta activación del sistema aún a concentraciones bajas de las proteínas reguladoras Tat y Rev. Por otra parte, la activación de la expresión de GFP en un número bajo de células en ausencia de las proteínas Tat y Rev, sugiere que la cantidad de copias de la construcción pLCI puede superar las barreras restrictivas de la célula (cuando se transfectaron más de 60 ng de pLCI, datos no mostrados), como son los factores de elongación negativa (NELF) o los mecanismos usados por la célula para confinar los ARNm inmaduros en el núcleo (Karn y Stoltzfus, 2012;). Nuestros resultados y algunos estudios previos sugieren que un sistema de Cas9 autorregulado debe de tener una sensibilidad óptima a la presencia del virus, además de activarse de

manera específica. Otro factor importante a considerar, es que el sistema Cas9 debe administrarse en un vector eficiente y seguro que garantice la integración de un número mínimo de los genes deseados en el genoma celular y que permanezcan disponibles para su activación.

Una vez que se demostró la sensibilidad y la eficiencia del mecanismo propuesto, se seleccionaron tres ARNg altamente conservados dirigidos a los genes *tat* y *rev* y que lograron autorregular al sistema, ya que mostraron una inhibición significativa de la expresión de GFP (**Figuras 34D-F y 36B**). Entre estas secuencias, el ARNg2 mostró un efecto anti-VIH más potente comparado con el ARNg1 y el ARNg3. Esto puede deberse a que el ARNg1 excluye al gen *rev*, lo que resulta en un menor control de la autorregulación. Por otro lado, también se ha demostrado que el primer exón de *tat* contiene al dominio funcional mínimo para generar una proteína competente (Carroll y col., 1991; Cordingley y col., 1990); por lo que el ARNg3 no condujo a una completa inhibición de la función de Tat (**Figura 34D**).

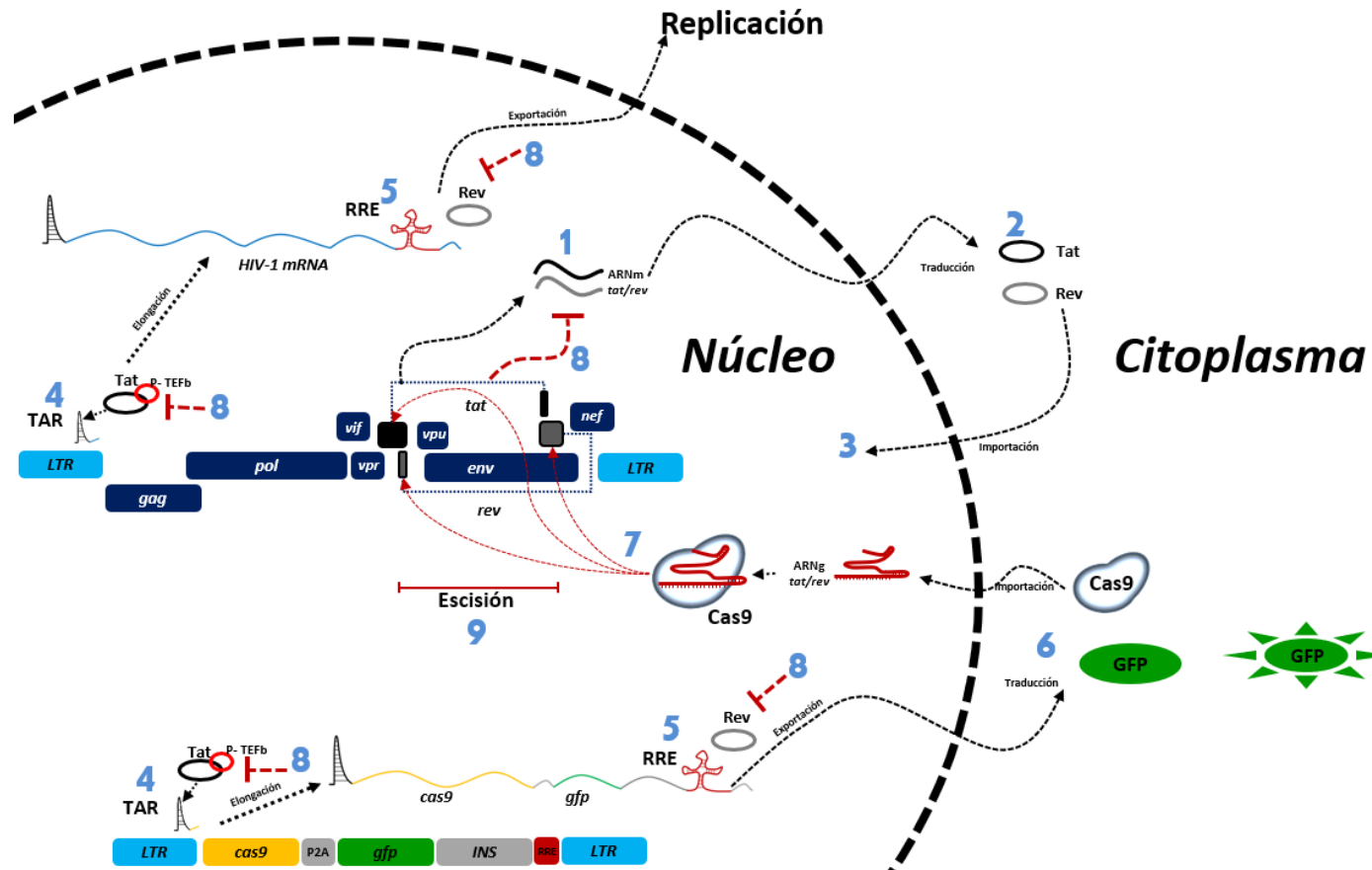
Considerando la relevancia de los genes reguladores del VIH-1 y que la edición múltiple es la estrategia más eficiente y eficaz para conducir a la cura de la infección por el VIH-1 y a la escisión del genoma viral (Wang G, y col., 2016b), se demostró que la mezcla de los ARNg1-3 fue capaz de controlar eficazmente la replicación viral en comparación con el efecto de un solo ARNg, que permitía el escape viral (**Figura 36C**). Estos resultados fueron confirmados por los ensayos de infección de las células MT2 (**Figuras 43A-C**). Por lo tanto, se puede concluir que el efecto antiviral potente de los ARNg es el resultado de la edición múltiple y la escisión del genoma

viral (**Figura 37**). La mezcla de los ARNg1-3 indujo la pérdida de tres genes, *tat*, *rev* y *env*, con una eficiencia del 90%, evitando la replicación viral y la formación de partículas virales completas las cuales no pueden unirse al receptor del VIH. También se demostró que los ARNg son seguros, ya que además de proteger a las células contra el VIH-1, no afectaron la proliferación celular (**Figuras 40-42**). Por lo tanto, concluimos que nuestra construcción basada en Cas9 dirigida a *tat* y *rev* podría ser una herramienta terapéutica eficaz y segura para su aplicación en humanos, utilizando un sistema de entrega inocuo.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los ARNg dirigidos a los genes *tat* y *rev* tienen un efecto potente anti-VIH y concuerdan con lo publicado por Wang y colaboradores, quienes demostraron que *tat* y *rev* son los objetivos genéticos más relevantes contra el VIH-1 para reducir la replicación viral (Wang y col., 2016a; 2016b). Los ARNg que se seleccionaron están dirigidos a las mismas regiones descritas en otros trabajos (Wang y col., 2016c; Ophinni y col, 2018), por lo que es factible que el control de la expresión de Cas9 en presencia del virus y dirigiendo las mutaciones a los genes reguladores del VIH-1, pueda conducir a una cura funcional y segura.

En conclusión, se desarrolló una estrategia efectiva para regular la expresión de Cas9 mediante la adición de las secuencias reguladoras LTR e INS-RRE del VIH-1 y cuya activación depende de las proteínas virales Tat y Rev, además de la autorregulación proporcionada por los ARNg (**Figura 44**). La edición múltiple dirigida a los genes *tat* y *rev* sugiere que es una estrategia confiable y precisa para abatir la

infección *in vitro* por el VIH-1 cuyo efecto se restringiría a las células infectadas. Este sistema también podría incorporar a más ARNg dirigidos a genes conservados del VIH-1, como *gag* o *pol*, para reducir el riesgo de mutaciones no deseadas y aumentar la efectividad de las terapias personalizadas.



**Figura 46.** Representación esquemática de la regulación de la expresión de Cas9 y GFP mediada por Tat y Rev. 1. Después de la integración del genoma viral, el VIH-1 inicia la expresión temprana de los genes *tat* y *rev*. 2. Los ARNm salen al citoplasma y se produce la traducción de las proteínas Tat y Rev. 3. Tat y Rev son llevados nuevamente al núcleo. 4. Transcripción activada por Tat; el complejo Tat / P-TEFb se recluta en el complejo de elongación mediante la interacción de Tat con el ARN TAR promoviendo la elongación de los ARNm sin el corte y empalme. Este proceso inicia tanto para VIH-1 como para Cas9. 5. Exportación al citoplasma del ARNm empalmado de forma incompleta, por Rev reclutado al RRE. 6. Traducción de las proteínas GFP y Cas9. 7. Cas9 se transporta nuevamente al núcleo y se asocia con los ARNg para inducir mutaciones en los genes *tat* y *rev*. 8. Las mutaciones dirigidas a los genes reguladores *tat* y *rev* inhiben la expresión génica de tal forma que se inhibe la replicación viral y se detiene la producción de Cas9. 9. En presencia de los tres ARNg propuestos, Cas9 escinde al genoma proviral e inactiva al virus por escisión parcial de su genoma que incluye a los genes *tat*, *rev* y *env*.



## CONCLUSIONES

- Las secuencias LTR, INS y RRE del VIH-1 regulan la expresión del sistema Cas9/GFP en células infectadas.
- La expresión del sistema Cas9/GFP es dependiente de las proteínas virales Tat y Rev, lo que reduce la activación inespecífica de Cas9.
- Los ARNg1-3 dirigidos a los genes *tat* y *rev* del VIH-1 regulan al sistema Cas9 propuesto, con una alta eficiencia antiviral.
- La edición múltiple por los ARNg dirigidos a los genes *tat* y *rev* del VIH-1, escindió de manera eficiente un fragmento del genoma del virus que incluye la pérdida de los genes: *tat*, *rev* y *env*.
- La autorregulación de Cas9 y la edición génica se proponen como una estrategia terapéutica contra el VIH-1, ya que su efecto se limitó únicamente a las células infectadas, por lo que es posible disminuir los riesgos de causar daño a las células sanas.
- La autorregulación de la expresión de Cas9 propuesta en este trabajo, puede incluir a más ARNg para garantizar la erradicación de la infección por el VIH-1.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Adachi, A., Gendelman, H.E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A. and Martin, M.A., 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 59(2),284-291.
2. Allers, K., Hutter, G., Hofmann, J., Loddenkemper, C., Rieger, K., Thiel, E. and Schneider, T., 2011. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Delta32/Delta32 stem cell transplantation. *Blood* 117(10), 2791-2799. doi: 10.1182/blood-2010-09-309591.
3. Arya, S.K., Guo, C., Josephs, S.F. and Wong-Staal, F., 1985. Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* 229 (4708), 69–73.
4. Benachenhou, F., Sperber, G.O., Bongcam-Rudloff, E., Andersson, G., Boeke, J.D. and Blomberg, J., 2013. Conserved structure and inferred evolutionary history of long terminal repeats (LTRs). *Mobile DNA* 4(1),5. doi: 10.1186/1759-8753-4-5.
5. Blankson, J.N., Persaud, D. and Siliciano R.F., 2002. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* 53, 557-593. doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.104024.
6. Canver, M.C., Bauer, D.E., Dass, A., Yien, Y.Y., Chung, J., Masuda, T., Maeda, T., Paw, B.H. and Orkin, S.H., 2017. Characterization of genomic deletion efficiency mediated by clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 nuclease system in mammalian cells. *J Biol Chem* 292(6), 2556. doi: 10.1074/jbc.A114.564625.
7. Cao, J., Wu, L., Zhang, S.M., Lu, M., Cheung, W.K., Cai, W., Gale, M., Xu, Q. and Yan, Q., 2016. An easy and efficient inducible CRISPR/Cas9 platform with improved specificity for multiple gene targeting. *Nucleic Acids Res* 44(19), e149. doi: 10.1093/nar/gkw660.
8. Cara, A., Cereseto, A., Lori, F. and Reitz, M.S., 1996. HIV-1 protein expression from synthetic circles of DNA mimicking the extrachromosomal

- forms of viral DNA. *J Biol Chem* 271(10), 5393–5397. doi: 10.1074/jbc.271.10.5393.
9. Carroll, R., Martarano, L. and Derse, D., 1991. Identification of lentivirus Tat functional domains through generation of equine infectious anemia virus/human immunodeficiency virus type 1 tat gene chimeras. *J Virol* 65(7), 3460-3467.
  10. Centlivre, M., Legrand, N., Klamer, S., Liu, Y.P., Jasmijn von Eije, K., Bohne, M., Rijnstra, E.S., Weijer, K., Blom, B., Voermans, C., Spits, H, and Berkhout B., 2013. Preclinical *in vivo* evaluation of the safety of a multi-shRNA-based gene therapy against HIV-1. *Molecular therapy Nucleic Acids* 2(9),e120. doi: 10.1038/mtna.2013.48.
  11. Chen, X., Zheng, Y., Mamadou, D., He, Y., Zhou, H., Chen, Z., Luo, Y., He, B., He, M. and Yao, Y., 2013, Dynamic changes of cellular HIV-1 DNA quantification during highly active antiretroviral therapy in Chinese HIV infected individuals. *Journal of Central South University. Medical Sciences* 38(5),537-544. doi: 10.3969/j.issn.1672-7347.2013.05.016.
  12. Cordingley, M.G., LaFemina, R.L., Callahan, P.L., Condra, J.H., Sardana, V. V, Graham, D.J., Nguyen, T.M., LeGrow, K., Gotlib, L., Schlabach, A.J., 1990. Sequence-specific interaction of Tat protein and Tat peptides with the transactivation-responsive sequence element of human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8985–8989. Doi: 10.1073 / pnas.87.22.8985
  13. Cullot, G., Boutin, J., Toutain, J., Prat, F., Pennamen, P., Rooryck, C., Teichmann, M., Rousseau, E., Lamrissi-Garcia, I., Guyonnet-Duperat, V., Bibeyran, A., Lalanne, M., Prouzet-Mauleon, V., Turcq, B., Ged, C., Blouin, J.M., Richard, E., Dabernat, S., Moreau-Gaudry, F., Bedel, A., 2019. CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations. *Nat Commun* 10(1), 1136. doi: 10.1038/s41467-019-09006-2.
  14. Dampier, W., Nonnemacher, M.R., Sullivan, N.T., Jacobson, J.M. and Wigdahl, B., 2014. HIV Excision utilizing CRISPR/Cas9 technology:

- Attacking the proviral quasispecies in reservoirs to achieve a cure. *MOJ Immunol* 1(4),00022. doi: 10.15406/moji.2014.01.00022.
15. Dampier, W., Nonnemacher, M.R., Mell, J., Earl, J., Ehrlich, G.D., Pirrone, V., Aiamkitsumrit, B., Zhong, W., Kercher, K., Passic, S., Williams, J.W., Jacobson, J.M. and Wigdahl, B., 2016. HIV-1 Genetic variation resulting in the development of new quasispecies continues to be encountered in the peripheral blood of well-suppressed patients. *PLoS One* 11(5), e0155382. doi: 10.1371/journal.pone.0155382.
  16. Danielson, C.M. and Hope, T.J., 2009. Imaging of HIV/host protein interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* 339,103-123. doi: 10.1007/978-3-642-02175-6\_6.
  17. Dash, P.K., Kevadiya, B.D., Su, H., Banoub, M.G., Gendelman, H.E., 2020. Pathways towards human immunodeficiency virus elimination. *EBioMedicine* 53, 102667
  18. Daugherty, M.D., D'Orso, I. and Frankel, A.D., 2008. A solution to limited genomic capacity: using adaptable binding surfaces to assemble the functional HIV Rev oligomer on RNA. *Mol Cell* 31(6),824-834. doi: 10.1016/j.molcel.2008.07.016.
  19. Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y. and Koyanagi, Y., 2013. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep* 3, 2510. doi: 10.1038/srep02510.
  20. Egger, M., May, M., Chene, G., Phillips, AN., Ledergerber, B., Dabis, F., Costagliola, D., D'Arminio Monforte, A., de Wolf, F., Reiss, P., Lundgren, J.D., Justice, A.C., Staszewski, S., Leport, C., Hogg, R.S., Sabin, C.A., Gill, M.J., Salzberger, B., Sterne, J.A., Collaboration ARTC. 2002. Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet* 360(9327),119-129. doi: 10.1016/s0140-6736(02)09411-4.
  21. Feng, S. and Holland, E.C., 1988. HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature* 334(6178),165-167. doi: 10.1038/334165a0.

22. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669),806-811. doi: 10.1038/35888.
23. Frankel, A.D. and J.A. Young 1998, *HIV-1: fifteen proteins and an RNA*. *Annu Rev Biochem.* **67**: p. 1-25
24. Garcia, J.A., Harrich, D., Soultanakis, E., Wu, F., Mitsuyasu, R. and Gaynor, R.B., 1989. Human immunodeficiency virus type 1 LTR TATA and TAR region sequences required for transcriptional regulation. *EMBO J* 8(3),765-778.
25. Grissa, I., Vergnaud, G. and Pourcel, C., 2007. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*,8, 172. doi: 10.1186/1471-2105-8-172.
26. Harrich, D., Hooker, C.W. and Parry, E., 2000. The human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA upper stem-loop plays distinct roles in reverse transcription and RNA packaging. *J Virol* 74(12),5639-5646. doi: 10.1128/jvi.74.12.5639-5646.2000.
27. Helga-Maria, C., Hammarskjold, M.L. and Rekosh, D., 1999. An intact TAR element and cytoplasmic localization are necessary for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J Virol* 73(5),4127-4135.
28. Horvath, P., Romero, D.A., Coute-Monvoisin, A.C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., Boyaval, P., Fremaux, C. and Barrangou, R., 2008. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 190(4), 1401-1412. doi: 10.1128/JB.01415-07.
29. Hou, Z., Zhang, Y., Propson, N.E., Howden, S.E., Chu, L.F., Sontheimer, E.J. and Thomson, J.A., 2013. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(39), 15644-15649. doi: 10.1073/pnas.1313587110.
30. Hu, W., Kaminski, R., Yang, F., Zhang, Y., Cosentino, L., Li, F., Luo, B., Alvarez-Carbonell, D., Garcia-Mesa, Y., Karn, J., Mo, X. and Khalili, K.,

2014. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(31), 11461-11466. doi: 10.1073/pnas.1405186111.
31. Huelsmann, P.M., Hofmann, A.D., Knoepfel, S.A., Popp, J., Rauch, P., Di Giallonardo, F., Danke, C., Gueckel, E., Schambach, A., Wolff, H., Metzner, K.J., Berens, C., 2011. A suicide gene approach using the human pro-apoptotic protein tBid inhibits HIV-1 replication. *BMC Biotechnol* 11, 4. doi.org/10.1186/1472-6750-11-4.
32. Imamichi, H., Crandall, K.A., Natarajan, V., Jiang, M.K., Dewar, R.L., Berg, S., Gaddam, A., Bosche, M., Metcalf, J.A., Davey, R.T. Jr., Lane, H.C., 2001. Human immunodeficiency virus type 1 quasi species that rebound after discontinuation of highly active antiretroviral therapy are similar to the viral quasi species present before initiation of therapy. *J Infect Dis* 183(1), 36-50. doi: 10.1086/317641.
33. Ishida, K., Gee, P., Hotta, A.. 2015. Minimizing off-Target Mutagenesis Risks Caused by Programmable Nucleases. *Int J Mol Sci* 16(10), 24751-24771. doi: 10.3390/ijms161024751.
34. Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E. and Doudna, J., 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2: e00471. doi: 10.7554/eLife.00471.
35. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096), 816-821. doi: 10.1126/science.1225829.
36. Jones, K.A., Kadonaga, J.T., Luciw, P.A. and Tjian, R., 1986. Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science* 232(4751),755-759. doi: 10.1126/science.3008338.
37. Kaminski, R., Bella, R., Yin, C., Otte, J., Ferrante, P., Gendelman, H.E., Li, H., Booze, R., Gordon, J., Hu, W. and Khalili, K.. 2016a. Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. *Gene Ther* 23(8-9), 690-695. doi: 10.1038/gt.2016.41.

38. Kaminski, R., Chen, Y., Salkind, J., Bella, R., Young, W.B., Ferrante, P., Karn, J., Malcolm, T., Hu, W. and Khalili, K., 2016b. Negative Feedback Regulation of HIV-1 by Gene Editing Strategy. *Sci Rep* 6, 31527. doi: 10.1038/srep31527.
39. Kaminski, R., Chen, Y., Fischer, T., Tedaldi, E., Napoli, A., Zhang, Y., Karn, J., Hu, W. and Khalili, K. 2016c. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Sci Rep* 6, 22555. doi: 10.1038/srep22555.
40. Karn, J. and Stoltzfus, C.M., 2012. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(2),a006916. doi: 10.1101/cshperspect.a006916.
41. Kulpa, D.A. and Chomont, N., 2015. HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *J Virus Erad* 1, 59-66.
42. Levine, B.L, Humeau, L.M., Boyer, J., MacGregor, R.R., Rebello, T., Lu, X., Binder, G.K., Slepushkin, V., Lemiale, F., Mascola, J.R., Bushman, F.D., Dropulic, B. and June, C.H., 2006. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(46),17372-17377. doi: 10.1073/pnas.0608138103.
43. Liang, C., Wainberg, M.A., Das, A.T. and Berkhout, B., 2016. CRISPR/Cas9: a double-edged sword when used to combat HIV infection. *Retrovirology* 13(1), 37. doi: 10.1186/s12977-016-0270-0.
44. Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F., van der Oost, J., Koonin, E.V., 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 9, 467-477. doi: 10.1038/nrmicro2577.
45. Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J.V. and Cullen, B.R., 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338(6212),254-257. doi: 10.1038/338254a0.

46. McCoubrie, J.E., Kendrick, T.S. and Minchin, R.F., 2004. HIV LTR-dependent expression of Bax selectively induces apoptosis in Tat-positive cells. *Biochem Biophys Res Commun* 325(4),1459-1464. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.195.
47. Mizutani, T., Ishizaka, A., Furuichi, Y., 2015. The werner protein acts as a coactivator of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) on HIV-1 and interleukin-8 (IL-8) promoters. *J Biol Chem* 290(30), 18391–18399. doi.org/10.1074/jbc.M115.657155
48. Ophinni, Y., Inoue, M., Kotaki, T., Kameoka, M., 2018. CRISPR/Cas9 system targeting regulatory genes of HIV-1 inhibits viral replication in infected T-cell cultures. *Sci Rep* 8(1), 7784. doi: 10.1038/s41598-018-26190-1.
49. Perez, E.E., Wang, J., Miller, J.C., Jouvenot, Y., Kim, K.A., Liu, O., Wang, N., Lee, G., Bartsevich, V.V., Lee, Y.L., Guschin, D.Y., Rupniewski, I., Waite, A.J., Carpenito, C., Carroll, R.G., Orange, J.S., Urnov, F.D., Rebar, E.J., Ando, D., Gregory, P.D., Riley, J.L., Holmes, M.C. and June, C.H., 2008. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 26(7),808-816. doi: 10.1038/nbt1410.
50. Pernet, O., Yadav, S.S. and An, D.S., 2016. Stem cell-based therapies for HIV/AIDS. *Adv Drug Deliv Rev* 103, 187-201. doi: 10.1016/j.addr.2016.04.027.
51. Pierson, T., McArthur, J. and Siliciano, R.F., 2000. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu Rev Immunol* 18, 665-708. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.665.
52. Rampalli, S., Kulkarni, A., Kumar, P., Mogare, D., Galande, S., Mitra, D., Chattopadhyay, S., 2003. Stimulation of Tat-independent transcriptional processivity from the HIV-1 LTR promoter by matrix attachment regions. *Nucleic Acids Research* 31(12), 3248-3256. doi: 10.1093/nar/gkg410.



53. Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., Zhang, F., 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 8(11), 2281–2308. doi:10.1038/nprot.2013.143.
54. Razooky, B.S., Pai, A., Aull, K., Rouzine, I.M. and Weinberger, L.S., 2015. A hardwired HIV latency program. *Cell* 160(5), 990-1001. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.009.
55. Romanchikova, N., Ivanova, V., Scheller, C., Jankevics, E., Jassoy, C., Serfling, E., 2003. NFAT transcription factors control HIV-1 expression through a binding site downstream of TAR region. *Immunobiology* 208(4), 361–365. doi.org/10.1078/0171-2985-00283.
56. Shah, S., Alexaki, A., Pirrone, V., Dahiya, S., Nonnemacher, M.R., Wigdahl, B., 2014. Functional properties of the HIV-1 long terminal repeat containing single-nucleotide polymorphisms in Sp site III and CCAAT/enhancer binding protein site I. *Virology* 11, 92. doi: 10.1186/1743-422X-11-92.
57. Schneider, R., Campbell, M., Nasioulas, G., Felber, B.K., Pavlakis, G.N., 1997. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J Virol* 71(7), 4892–4903.
58. Schwartz, S., Campbell, M., Nasioulas, G., Harrison, J., Felber, B.K., Pavlakis, G.N., 1992a. Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type 1 results in Rev-independent gag expression. *J Virol* 66(12), 7176–7182.
59. Schwartz, S., Felber, B.K., Pavlakis, G.N., 1992b. Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein. *J Virol* 66(1), 150-159.
60. Selby, M.J., Bain, E.S., Luciw, P.A., Peterlin, B.M., 1989. Structure, sequence, and position of the stem-loop in tar determine transcriptional elongation by tat through the HIV-1 long terminal repeat. *Genes Dev* 3(4), 547-558. doi: 10.1101/gad.3.4.547.

61. Sen, S., Deshmane, S.L., Kaminski, R., Amini, S., Datta, P.K., 2017. Non-Metabolic Role of PKM2 in Regulation of the HIV-1 LTR. *J Cell Physiol* 232(3), 517–525. doi.org/10.1002/jcp.25445.
62. Sgarbanti, M., Borsetti, A., Moscufo, N., Bellocchi, M.C., Ridolfi, B., Nappi, F., Marsili, G., Marziali, G., Coccia, E.M., Ensoli, B., Battistini, A., 2002. Modulation of human immunodeficiency virus 1 replication by interferon regulatory factors. *J Exp Med* 195(10), 1359–1370. doi: 10.1084/jem.20010753.
63. Siliciano, J.D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J.B., Kovacs, C., Gange, S.J. and Siliciano, R.F., 2003. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* 9(6):727-728. doi: 10.1038/nm880.
64. Sodroski, J., Goh, W.C., Rosen, C., Dayton, A., Terwilliger, E., Haseltine, W., 1986. A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* 321(6068), 412-417. doi: 10.1038/321412a0.
65. Tebas, P., Stein, D., Tang, W.W., Frank, I., Wang, S.Q., Lee, G., Spratt, S.K., Surosky, R.T., Giedlin, M.A., Nichol, G., Holmes, M.C., Gregory, P.D., Ando, D.G., Kalos, M., Collman, R.G., Binder-Scholl, G., Plesa, G., Hwang, W.T., Levine, B.L. and June, C.H., 2014. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J M* 370(10),901-910. doi: 10.1056/NEJMoa1300662.
66. ter Brake, O., Legrand, N., von Eije, K.J., Centlivre, M., Spits, H., Weijer, K., Blom, B. and Berkhout, B., 2009. Evaluation of safety and efficacy of RNAi against HIV-1 in the human immune system (Rag-2(-/-)gammac(-/-)) mouse model. *Gene Ther* 16(1),148-153. doi: 10.1038/gt.2008.124.
67. Terns, M.P. and Terns, R.M., 2011. CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol* 14(3), 321-327. doi: 10.1016/j.mib.2011.03.005.
68. Tsai, S.Q. and Joung, J.K., 2016. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR/Cas9 nucleases. *Nat Rev Gen* 17(5): 300-312. doi: 10.1038/nrg.2016.28.

69. Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B. and Das, A.T., 2016a. CRISPR-Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape. *Mol. Ther* 24(3), 522–526. doi.org/10.1038/mt.2016.24.
70. Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., Das, A.T., 2016b. A Combinatorial CRISPR-Cas9 Attack on HIV-1 DNA Extinguishes all infectious provirus in infected T cell cultures. *Cell Rep* 17(11), 2819–2826. doi.org/10.1016/j.celrep. 11.057.
71. Wang Z, Pan Q, Gendron P, Zhu W, Guo F, Cen S, Wainberg MA, Liang C. 2016c. CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Rep* 15(3), 481-489. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.042.
72. Wolff, H., Brack-Werner, R., Neumann, M., Werner, T., Schneider, R., 2003. Integrated functional and bioinformatics approach for the identification and experimental verification of RNA signals: application to HIV-1 INS. *Nucleic Acids Res* 31(11), 2839–2851. doi: 10.1093/nar/gkg390.
73. Ye, L., Wang, J., Beyer, A.I., Teque, F., Cradick, T.J., Qi, Z., Chang, J.C., Bao, G., Muench, M.O., Yu, J., Levy, J.A. and Kan, Y.W., 2014. Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Delta32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(26),9591-9596. doi: 10.1073/pnas.1407473111.
74. Yoder, K.E. and Bundschuh, R., 2016. Host Double Strand Break Repair Generates HIV-1 Strains Resistant to CRISPR/Cas9. *Sci Rep* 6, 29530. doi: 10.1038/srep29530.
75. Yuan, J., Wang, J., Crain, K., Fearn, C., Kim, K.A., Hua, K.L., Gregory, P.D., Holmes, M.C. and Torbett, B.E., 2012. Zinc-finger nuclease editing of human cxcr4 promotes HIV-1 CD4(+) T cell resistance and enrichment. *Mol Ther* 20(4),849-859. doi: 10.1038/mt.2011.310.
76. Zhang, F., Wen, Y. and Guo, X., 2014. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet* 23(R1), R40-46. doi: 10.1093/hmg/ddu125.

77. Zhu, W., Lei, R., Le Duff, Y., Li, J., Guo, F., Wainberg, M.A. and Liang, C., 2015. The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology* 12, 22. doi: 10.1186/s12977-015-0150-z.

## Artículo publicado

Antiviral Research 180 (2020) 104856



Contents lists available at ScienceDirect

Antiviral Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/antiviral](http://www.elsevier.com/locate/antiviral)

## Research paper

## Regulation of Cas9 by viral proteins Tat and Rev for HIV-1 inactivation

Moisés Vergara-Mendoza<sup>a,b</sup>, Luis E. Gomez-Quiroz<sup>c</sup>, Roxana U. Miranda-Labra<sup>c</sup>,  
Luis L. Fuentes-Romero<sup>a</sup>, Dámaris P. Romero-Rodríguez<sup>d</sup>, Jonathan González-Ruiz<sup>b</sup>,  
Sharik Hernández-Rizo<sup>b</sup>, Mónica Viveros-Rogel<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Infectious Diseases, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Graduate Program in Experimental Biology, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Cell Physiology Laboratory, Department of Health Sciences, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> Flow Cytometry Unit, Subdirection of Biomedical Research, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico City, Mexico



## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
CRISPR/Cas9  
HIV-1  
Tat  
Rev  
Viral regulation

## ABSTRACT

While combined antiretroviral therapy (cART) has had a great impact on the treatment of HIV-1 infection, the persistence of long-lived cells with an intact provirus precludes virus eradication and sterilizing cure. CRISPR/Cas9 genome editing has become an efficient tool to eradicate HIV-1 genome or prevent replication. Furthermore, regulation of Cas9 gene expression by HIV can induce mutations that could inactivate the proviral genome, making a gene therapy safe by preventing the induction of non-specific mutations, which could compromise the integrity of healthy cells.

In this study, isolated HIV-1 LTR, INS and RRE sequences were used to regulate Cas9 expression in HEK293 cells, and guide RNAs (gRNAs) were designed to target mutations in HIV-1 conserved regions such as *tat* and *rev* regulatory genes. We demonstrate that Cas9 expression in our system is controlled by the HIV-1 Tat and Rev proteins, leading to self-regulation of gene edition, and showing a strong antiviral effect by inactivating HIV-1 replication. Sequencing analysis confirmed that viral genome was partially excised by multiplex editing (90% efficiency), and viral capsid protein (CA-p24) was undetectable. In conclusion, the self-regulated CRISPR/Cas9 system may be a reliable and accurate strategy for eliminating HIV-1 infection whose effect will be restricted to infected cells.

## 1. Introduction

Combined antiretroviral therapy (cART) has been very effective to control HIV-1 replication and to arrest disease progression to maintain a chronic and latent controlled infection (Dash et al., 2020). Persistent problems during HIV-1 infection, including chronic inflammation, sustained immune activation, viral latency, drug resistance and antiretroviral side effects, have encouraged the design of new molecular strategies for the elimination of the proviral reservoir (Blankson et al., 2002) (Lorenzo-Redondo et al., 2016).

Gene therapy has emerged as a complementary strategy to cART; however, a safe protocol is needed, which represents no risk and could be easily provided to HIV-infected patients. The molecular strategies developed are specifically targeted to edit the viral genome and to eradicate it from the infected cell (Yuan et al., 2012).

Recently, a system based on clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-associated endonuclease Cas9 (CRISPR/

Cas9) has improved the perspective of the use of gene therapy, allowing to induce directed mutations or even the extraction of the complete viral genome and, therefore, the possibility of establishing personalized therapies (Liang et al., 2016). The CRISPR/Cas9 system allows to identify genetic targets and, lately, has been used to eradicate HIV-1 infection, resulting in inhibition of viral replication or even excision of the provirus (Zhang et al., 2014).

Since 2013, viral genome editing strategies have been developed using CRISPR/Cas9 with Long Terminal Repeat (LTR) as a target (Ebina et al., 2013). The extraction of the proviral genome from infected cells has been demonstrated using guide RNAs (gRNAs) directed to LTR5' and LTR3' (Hu et al., 2014; Kaminski et al., 2016a, 2016b, 2016c). Previous studies suggest that mutations targeting non-coding regulatory sequences are not as efficient to obtain a sustained control of viral replication (Yoder and Bundschuh, 2016). Similar results were found when mutations in HIV genome were generated targeting LTR and accessory genes such as *nef* and *vpr* which were found to be ineffective in

\* Corresponding author. Department of Infectious Diseases, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Avenida Vasco de Quiroga 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, Alcaldía Tlalpan, 14080, Mexico City, Mexico.

E-mail address: [monica.viveros@incmnsz.mx](mailto:monica.viveros@incmnsz.mx) (M. Viveros-Rogel).

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104856>

Received 21 November 2019; Received in revised form 10 June 2020; Accepted 12 June 2020

Available online 21 June 2020

0166-3542/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

controlling viral replication; however, mutations targeting conserved coding regions such as *gag*, *pol* and *tat/rev*, maintained an attenuated viral replication for a longer time compared to gRNAs targeted to LTR (Wang et al., 2016a). To control viral replication and prevent escape by resistance mutations, it is necessary to use several gRNAs to cure cell cultures through multiple mutations or partial excision of the viral genome (Wang et al., 2016b). This evidence suggests that mutation induction targeting poorly conserved regions, non-essential genes, regulatory sequences, or a simple mutation which does not induce a deletion, could allow viral escape.

In addition to viral escape, another limitation of the CRISPR/Cas9 to be considered when using multiplex gRNA targets, is that it can induce off-target cuts due to its continuous expression and generate undesirable changes in cells (Cullot et al., 2019). For this reason, the risk of off-target cutting may also be reduced by using trustworthy software to make a rigorous selection of gRNA with a high CRISPR specificity score, and Cas9 must be stringently controlled to avoid the possibility of causing cell death or cellular transformation.

To modulate viral replication in early infection, HIV directs the synthesis of Tat and Rev regulatory proteins at the transcriptional and post-transcriptional level, respectively (Karn and Stoltzfus, 2012). Tat induces and increases transcription by stimulating the elongation of mRNAs from LTR through the transactivation-responsive region (TAR-RNA), located after the transcription initiation site (position 453–513 of HXB2), which forms a stable secondary structure. This structure recruits Tat associated with the P-TEFb elongation promoting factor, making Tat necessary for efficient viral replication and whose absence leads to viral latency (Selby et al., 1989). On the other hand, unspliced and singly spliced mRNAs formed after elongation, contain inhibitory sequences (INS) that confine mRNAs in the nucleus (Schwartz et al., 1992; Wolff et al., 2003). The effect of these sequences is counteracted by the binding of Rev to the Rev Response Element (RRE-RNA position 7710–8061 of HXB2), which is encoded in the immature HIV-1 mRNA. Rev promotes the nuclear export of messengers to rough endoplasmic reticulum to produce viral proteins (Sodroski et al., 1986). This suggests that Tat and Rev proteins are essential for viral replication and regulate the expression of other genes.

LTR promoter has been used to evaluate HIV-1 infection in cell lines susceptible to several viral isolates (Cara et al., 1996). Furthermore, LTR was used to regulate the expression of Bax, a well-known apoptotic protein; results showed that LTR can be used to destroy HIV-infected cells (McCoubrie et al., 2004). Similarly, it has been reported that LTR and INS-RRE regulate the expression of bBid, another apoptotic protein, supporting the evidence that HIV-1 can induce cell death by modulating cellular gene expression (Huelsmann et al., 2011).

Here, we report a Cas9-based viral inactivation system coupled to HIV-1 LTR and INS-RRE regulatory sequences, and controlled by Tat and Rev proteins. This Cas9 system showed efficient HIV-1 genome editing and a partial excision of the viral genome. Our results suggest that specific functions of Tat and Rev and the efficiency of LTR and INS-RRE viral sequences, make them ideal candidates as molecular switches to direct protein expression by a viral-dependent mechanism.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacteria, plasmids and oligonucleotides

*Escherichia coli* Stbl3™ (Thermo Scientific, USA) was used for the transformation and isolation of plasmids. Bacteria were cultivated in Luria Bertani medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 100 µg/ml ampicillin at 37 °C. The plasmid pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458), kindly donated by Feng Zhang (Add gene # 48138) (Ran et al., 2013), contains the sequence of *Streptococcus pyogenes* hSpCas9 gene linked to the GFP gene. Plasmids pLTR, pIRL and pLCI were derived from PX458 and contain HIV-1 LTR, IRL and LTR and IRL sequences, respectively. pLCI-gRNA1 to 3 from pLCI contains the gRNAs directed to *tat* and *rev*. pCVI

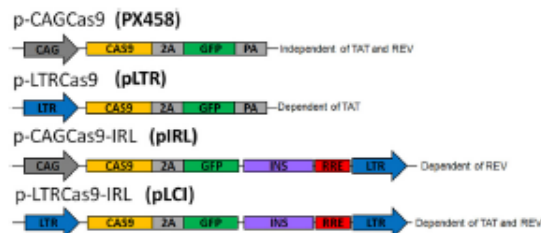


Fig. 1. Schematic representation of the plasmids structure used for transfection of HEK293 cells. The dependence or independence from Tat and Rev viral proteins is also indicated. CAG: promoter; 2A: self-cleaving peptide; PA: polyadenylation signal; LTR: HIV promoter; INS: inhibitory sequence; RRE: Responsive Rev Element.

encodes for HIV-1 *tat* and *rev* genes (Arya et al., 1985). pNL4-3 encodes for a full-length replication-competent, infectious HIV-1 subtype B NL4-3 molecular clone (Adachi et al., 1986); pCMV-VSV-G was a gift from Bob Weinberg (Addgene # 8454). Oligonucleotides were designed with the ApE-A plasmid Editor software (ApE, M. Wayne Davis v2.0.47, USA) to amplify HIV-1 regulatory sequences (Tables S1–S3 and Figures S1–S2). Oligonucleotides were obtained from Integrated DNA Technologies (IDT™).

### 2.2. Design of guide RNAs (gRNAs)

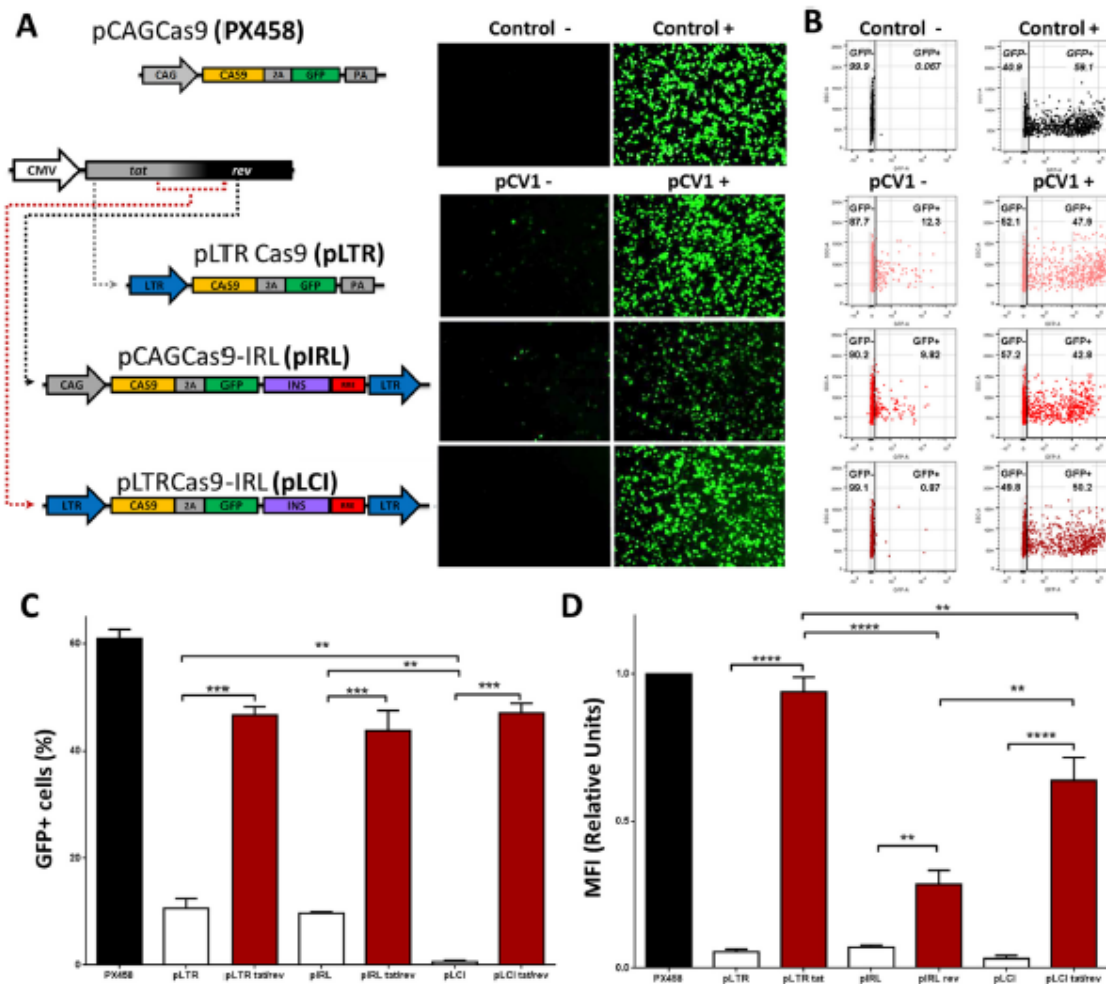
gRNAs target sequences were designed based on Los Alamos National Laboratory (LANL) HIV sequence database and were tested against 769 subtype B patient-derived HIV-1 *tat* and *rev* sequences (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>). To design the gRNAs, the sequences corresponding to *tat* and *rev* were taken from the HXB2 viral strain and predicted by using the Broad Institute Design sgRNAs for CRISPRko software (<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgma-design>).

### 2.3. Amplification of regulatory sequences by PCR

8E5 cell line was used to obtain HIV-1 LTR and IRL sequences. Cells were cultured in RPMI1640 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco), 2 mM L-Glutamine (Gibco), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco). 8E5 cells contain a unique copy of HIV-1 defective proviral genome (Folks et al., 1986). To obtain the region corresponding to LTR, an end-point PCR was performed (Table S1 and Figures S1 and S4). Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) was used. Amplification of LTR was performed using the following conditions: 95 °C for 2 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s, 64 °C for 15 s, 68 °C for 90 s, and 68 °C for 7 min. To obtain the sequence corresponding to IRL, this fragment was amplified separately by PCR. For amplification of INS, RRE and LTR3' sequences (Table S2; Figures S2 and S4), PCR cycling conditions were: 95 °C for 2 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s, 65 °C for 15 s, 68 °C for 60 s, and 68 °C for 7 min. Subsequently, 10 ng of each product were used to perform fusion by overlap extension PCR (Figure S3). Thermocycling conditions were: 95 °C for 2 min, 95 °C for 15 s, 64 °C for 10 min, 68 °C for 4 min, followed by 25 cycles of 95 °C for 15 s, 64 °C for 15 s, 68 °C for 2 min, and 68 °C for 7 min.

### 2.4. Plasmids construction

LTR and IRL were gel purified and subcloned in pJET1.2/blunt Cloning Vector (Thermo Scientific), and excised with XbaI-AgeI (LTR) and BsrGI-NofI (IRL) restriction enzymes (Promega). The purified products corresponding to LTR and IRL were ligated into promoter-free and polyadenylation sequences-free PX458 plasmid with T4 ligase



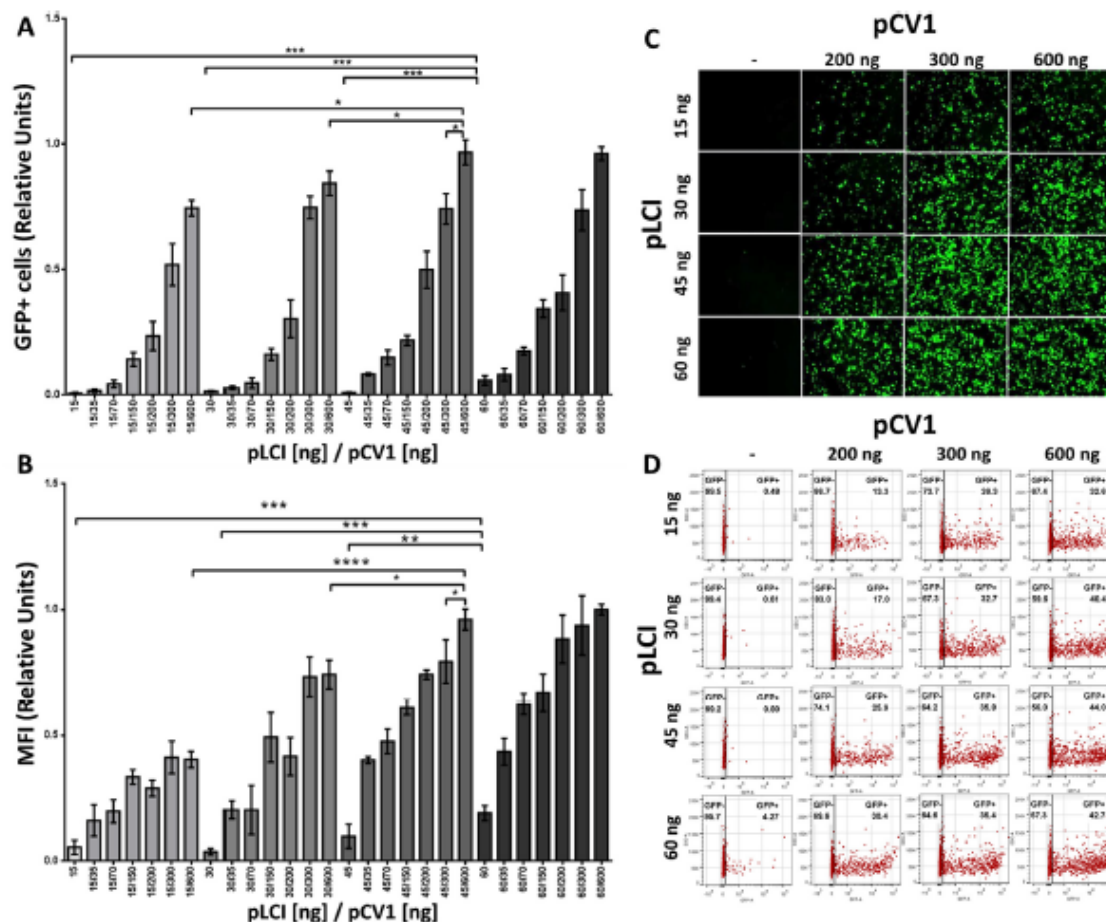
**Fig. 2.** Regulation of gene expression by HIV-1 Tat and Rev proteins. A) Schematic representation of GFP gene expression regulation by Tat and Rev for pLTR (plasmid containing LTR promoter), pIRL (plasmid containing INS inhibitory sequence and RRE Responsive Rev Element) and pLCI (plasmid containing LTR promoter, INS inhibitory sequence and RRE Responsive Rev Element) constructions. Differential expression of GFP gene in HEK293 cells transfected with PX458 (transfection control), pLTR, pIRL and pLCI with/without pCV1. GFP + cells were observed 48 h after transfection by fluorescence microscopy at 100x. B) Representative scatter plot of GFP + cells transfected with PX458, pLTR, pIRL and pLCI with/without pCV1 (1,000 events are shown). Inhibition of GFP gene expression by HIV-1 regulatory sequences (LTR and IRL) and GFP overexpression by Tat and Rev viral proteins (pCV1+) is shown. C) Representative graph of the mean of GFP + cells transfected with PX458, pLTR, pIRL and pLCI with/without pCV1.  $P < 0.0001$ . D) Graph represents the mean of MFI of HEK293 transfected with each construction with/without pCV1.  $P < 0.0001$ . For all graphs, black bar represents transfection control; white bars represent transfection of pLTR, pIRL and pLCI in the absence of Tat and Rev; red bars indicate the effect of Tat and Rev in GFP expression for all constructs. Mean  $\pm$  SD values of three independent experiments are shown.

(Promega). Plasmid ligation was used to transform *E. coli* Stb13 by heat shock. Colonies were sub-cultured for plasmid extraction. To verify the identity of constructed plasmids, labeling was performed with BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) (Tables S3 and S4). Sequencing was conducted in 3130xl Genetic Analyzer Sequencer (Applied Biosystems).

To evaluate the regulation of gene expression by HIV-1 sequences, pLTR, pIRL, pLCI, pgRNA1-3, pCV1, pNL4-3 and PX458 plasmids were used. Plasmids were extracted and purified by the QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN).

## 2.5. Cell culture and transfection

HEK293 cells were purchased from ATCC and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% FBS (Gibco), 2 mM L-Glutamine (Gibco), 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco). Twenty-four hours before transfection, HEK293 cells were plated into 48-well plates at  $1 \times 10^5$ /well in 300  $\mu$ l of high-glucose supplemented DMEM medium; 2 h before transfection, culture medium was removed and 300  $\mu$ l of DMEM without supplements were added. HEK293 cells were transfected using Lipofectamine 3000 (Invitrogen) with each constructed plasmid, and to



**Fig. 3.** Reactivation of GFP expression dependent on pCV1 concentration. A) Graphics represent the average values of GFP + cells and B) mean fluorescence intensity of GFP expression. Increased levels of GFP expression were pCV1 dose-dependent; maximum number of GFP + cells and MFI were observed at 45 ng and 600 ng of pLCI (plasmid containing LTR promoter, INS inhibitory sequence and RRE Responsive Rev Element) and pCV1, respectively, maintaining the lowest percentage of GFP + cells in the absence of Tat and Rev.  $P < 0.01$ . C) Fluorescence microscopy imaging of HEK293 cells 48 h after transfection with different concentrations of pLCI (15–60 ng) and pCV1 (200–600 ng). D) Representative scatter plot of GFP + cells treated with different concentrations of pLCI and pCV1 (1,000 events are shown). Mean  $\pm$  SD values of three independent experiments are shown.

confirm Cas9 regulation by HIV-1 LTR and IRL, pCV1 transfected cells were harvested 48 h after transfection for flow cytometry.

## 2.6. HIV-1 inactivation and cell viability assay

HEK293 cells were transfected with an equimolar concentration of pLCI, gRNAs 1–3, pNL4-3 and pVSV-G. HIV-1 was produced by transfection of HEK293 with pNL4-3 and pVSV-G. Virus inactivation was performed by multiplex gRNA transfections mixing equimolar concentration of gRNAs with pNL4-3 and pVSV-G. To determine if pLCI and gRNAs 1–3 have an effect on cell proliferation or show cytotoxicity, HEK293 cells were plated at  $1 \times 10^4$  in 96-well plates and cell growth was monitored on days 1, 3, 5 and 7. Cell viability was measured by Trypan Blue dye exclusion test, crystal violet assay and flow cytometry using LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen). Virus spread was monitored by syncytia formation in MT2 cultures every day. Virus production was measured by CA-p24 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in culture supernatant according to the

manufacturer's protocol (Alliance HIV-1 p24 ELISA Kit, PerkinElmer™).

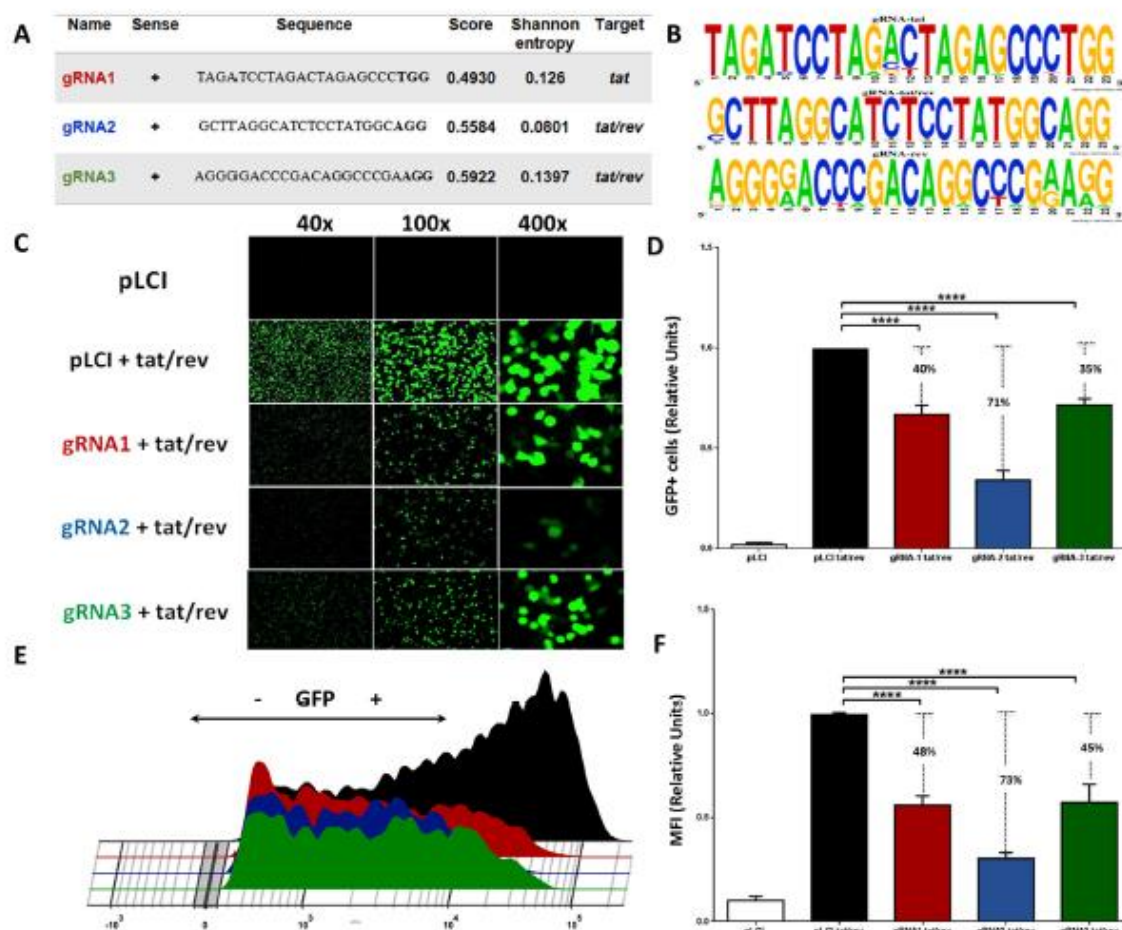
## 2.7. Flow cytometry analysis

GFP expression in HEK293 cells was quantified using BD FACS Aria II™ flow cytometer (BD Biosciences). At least  $1 \times 10^5$  HEK293 cells were recorded for each sample. Results are a mean of three replicates of each experiment. Data were analyzed by FlowJo v.10 software.

## 2.8. Statistical analysis

All data are representative of at least three independent experiments. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviations (SD), calculated by one-way ANOVA test using GraphPad Prism7 software to indicate the differences between groups. A  $P$ -value of  $< 0.05$  was considered statistically significant (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  and \*\*\*\* $P < 0.0001$ ).





**Fig. 4. Targets for HIV-1 inactivation and inhibition of GFP gene expression by gRNAs.** A) Sequences of gRNAs candidates for inactivation of HIV-1 *tat* and *rev* genes. CRISPR specificity scores were calculated by CRISPRko software (<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgma-design>). B) Image of gRNAs targets; the conservation of each sequence was tested across 769 HIV-1 subtype B strains from Los Alamos National Lab (LANL) HIV Sequence Compendium. C) HEK293 cells were transfected with pLCl (plasmid containing LTR promoter, INS inhibitory sequence and RRE Responsive Rev Element), pLCl with pCV1, and gRNAs with pCV1; 48 h after transfection, GFP expression was observed by fluorescence microscopy at 40X, 100x and 400x. D) Graphic represents the average values of GFP + cells. HIV-1 regulatory sequences and the addition of gRNAs targeted to *tat* and *tat/rev* showed a decrease in the number of GFP + cells in the presence of Tat and Rev proteins (gRNA1 40.3%, gRNA2 71% and gRNA3 35%),  $P < 0.001$ . E) A direct comparison of GFP gene expression inhibition by LTR and IRL showed a displacement of GFP + cells by the effect of gRNAs in the presence of Tat and Rev; GFP expression induction by Tat and Rev proteins (black) and the effect of gRNA1, gRNA2 and gRNA3 (red, blue and green, respectively) are shown. F) Graphic represents the average of MFI of GFP expression. HIV-1 regulatory sequences and the addition of gRNAs targeted to *tat* and *tat/rev* showed an inhibition of MFI in the presence of Tat and Rev proteins (gRNA1 48%, gRNA2 73% and gRNA3 45%),  $P < 0.001$ . Mean  $\pm$  SD values of three independent experiments are shown.

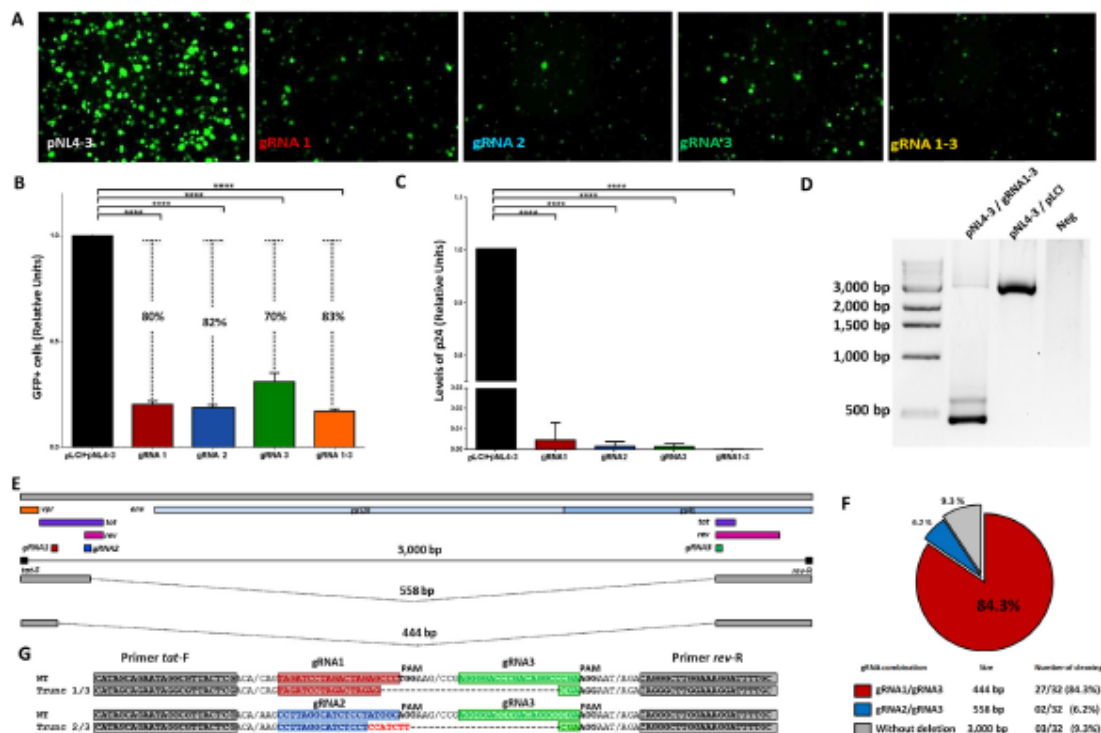
### 3. Results

#### 3.1. Differential expression of GFP gene in HEK293 transfected cells by LTR and IRL sequences

Once pLTR, pIRL and pLCl were sequenced, the mutations described were identified, suggesting that they conserved the function required for regulation of gene expression (Wolff et al., 2003; Schwartz et al., 1992) (Figures S5 to S8). The general structure of the plasmids is shown in Fig. 1.

To evaluate the control of gene expression given by HIV-1 sequences, we transfected HEK293 cells with equimolar concentrations of pLTR, pIRL and pLCl, and PX458 was used as a transfection control.

GFP + cells were observed by fluorescence microscopy at 48 h post-transfection (Fig. 2A). The presence of GFP indicated regulation of Cas9 gene expression given by the HIV-1 sequences pLTR and pIRL (Fig. 2A and B). The results showed a clear decrease in the number of GFP + cells transfected with pLTR (13.27%), pIRL (11.49%) and pLCl (0.54%) in comparison with PX458 (60.4% of cells) (Fig. 2B and C pCV1-). Therefore, the decrease in GFP gene expression indicated that it was being down-regulated by HIV-1 LTR and IRL, and that Tat and Rev viral proteins were required to increase levels of GFP. The regulatory effect of HIV-1 LTR and INS (pLCl) showed a significant reduction in the number of GFP + cells and mean fluorescence intensity (MFI) in GFP + population compared to the promoter (pLTR) and IRL sequences alone (Fig. 2C and D).



**Fig. 5.** Inhibition of HIV-1 replication by gRNAs. A) HEK293 cells were co-transfected with pLCl (plasmid containing LTR promoter, INS inhibitory sequence and RRE Responsive Rev Element), gRNAs and pNL4-3; 6 days after transfection, GFP expression was observed by fluorescence microscopy at 100x. B) Inhibition of GFP gene expression by gRNAs. GFP + cells treated with gRNAs either alone or in combination of three were quantified by flow cytometry. The black bar represents the transfection control of pLCl with pNL4-3, and red, blue, green and orange bars represent pLCl with gRNA1, 2, 3 and the mix of gRNAs co-transfections with pNL4-3, respectively.  $P < 0.0001$ . C) HIV-1 replication was determined through the detection of p24 levels in culture supernatants by ELISA.  $P < 0.0001$ . D) PCR identification of deleted products by all gRNAs in HEK293; agarose gel showed the presence of 444 bp and 558 bp bands corresponding to loss of 2556 pb and 2442 pb, by the effect of gRNA1-gRNA3 and gRNA2-gRNA3, respectively. E) Schematic representation of HIV-1 genome indicating gRNAs location in exons corresponding to *tat* and *rev* viral genes. gRNAs location is indicated in red, blue and green rectangles, and position of primers for PCR are indicated in black. The gRNAs cleavage sites are represented, resulting in three products, of 3000 bp (without excision), 558 bp and 444 bp. F) PCR products obtained by gRNAs-induced mutations were cloned into pJet1.2 and 32 plasmids and were Sanger sequenced; graph represents the percent of plasmids containing 444 bp, 558 bp and 3000 bp PCR products. Mean  $\pm$  SD values of three independent experiments are shown. G) Representative sequence of PCR products obtained by gRNAs' cleavage.

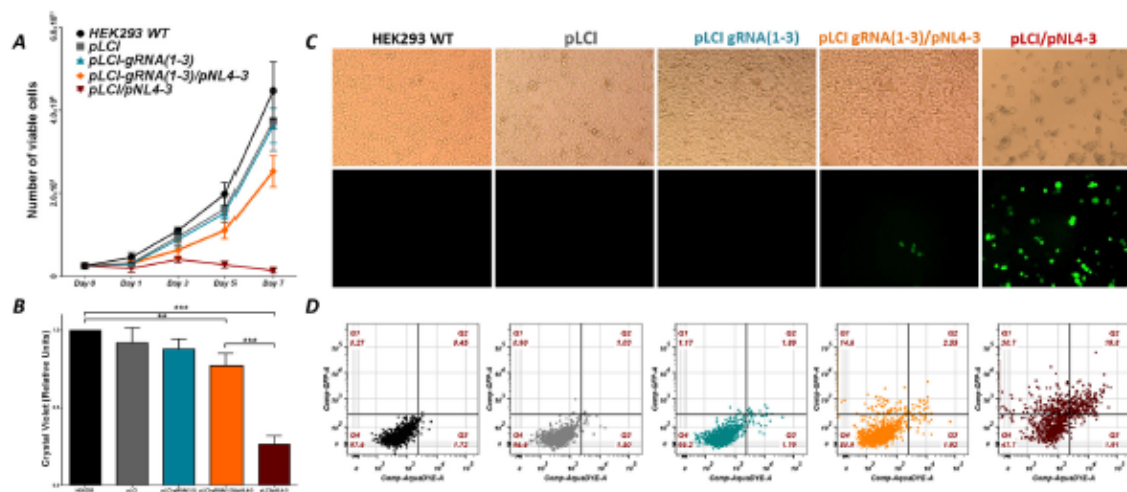
Transfection assays were conducted using pLTR, pIRL and pLCl with pCV1 to evaluate regulation of gene expression directed by Tat and Rev. The absence or presence of GFP indicated negative or positive regulation by HIV-1 LTR and INS-RRE regulatory sequences (Fig. 2A and B pCV1+). Co-transfection of constructs and pCV1 resulted in over-expression of GFP gene (Fig. 2C and D;  $P < 0.0001$ ), showing a negative and positive regulation of Cas9 and GFP expression. Results were confirmed by fluorescence microscopy and flow cytometry analysis, showing an increase in GFP + cells and MFI. Tat and Rev proteins in transfected cells with/without pCV1 were detected by Western blot (WB) (Fig. 2 and S9).

We also assessed the sensitivity of the proposed regulation by performing a pLCl and pCV1 titration experiment to induce Cas9 expression (Fig. 3). After 48 h, HEK293 cells were co-transfected with pLCl and pCV1, and GFP expression was analyzed by flow cytometry. Results showed that pLCl concentrations below 45 ng without Tat and Rev, kept the GFP expression controlled, and increasing pLCl concentration to 60 ng, led to the detection of GFP (Fig. 3A). GFP was detected when 35 ng of pCV1 were added to pLCl (Fig. 3B). The ratio to obtain the maximum transactivation in GFP + cells and MFI was 1:13 of pLCl

(45 ng) and pCV1 (600 ng), respectively (Fig. 3A–D). The GFP expression dependent on pCV1 concentration was confirmed by fluorescence microscopy and flow cytometry (Fig. 3C and D). No increase of GFP + cells or MFI was observed at concentrations of pCV1 greater than 600 ng (Data not shown).

### 3.2. Inhibition of GFP expression by gRNAs

The selected gRNAs met the Broad Institute's criteria for activity and conservation of the gRNAs (Fig. 4A y B). We evaluated the gRNAs' function directed to *tat* and *tat/rev* genes; results showed a decrease of GFP expression by gRNAs 1–3 in the presence of Tat and Rev proteins encoded by pCV1, compared to the control without gRNAs (Fig. 4C–F). Moreover, the effect of gRNAs was observed in GFP + cells and MFI, indicating a control of GFP gene expression and Cas9 by HIV-1 regulatory sequences and gRNAs. Flow cytometry analysis showed a decrease in MFI for all gRNAs (gRNA1 48%, gRNA2 73%, and gRNA3 45%;  $P < 0.001$ , Fig. 4F). A stronger regulatory effect was observed with gRNA2 directed against both genes ( $P < 0.001$ ), decreasing GFP + cells induced by Tat and Rev compared to gRNAs1 and gRNAs3



**Fig. 6.** pLCl-gRNA 1–3 transfection showed no changes in cell viability and protected cells from death caused by the virus encoded in pNL4-3. A) Graph shows proliferation of  $1 \times 10^4$  HEK293 cells in 96-well plates; cell growth was monitored for 7 days. Cell viability was measured by Trypan blue dye exclusion test. B) Graph of viability assay of treated HEK293 cells by crystal violet on day 7. C) Images of HEK293 cells transfected with plasmids on day 7. Cells were observed by fluorescence microscopy at 100 $\times$ . D) Representative scatter plot of cell viability measured by flow cytometry using LIVE/DEAD<sup>TM</sup> Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen). GFP + cells for all conditions were quantified on day 7. At least  $1 \times 10^5$  HEK293 cells were recorded for each sample. HEK293 WT (black), empty pLCl (plasmid containing LTR promoter, INS inhibitory sequences and RRE [Responsive Rev Element]) (gray), pLCl with gRNA(1–3) (blue), pLCl-gRNA(1–3) and pNL4-3 (orange) and pNL4-3 (red). Mean  $\pm$  SD values of three independent experiments are shown.

(Fig. 4D–F). WB analysis showed a decrease in the detection of Tat and Rev in transfected cells with gRNAs, establishing a self-regulation of our Cas9 system (Figure S10). We observed a displacement of GFP + cell population transfected with pLCl-gRNA 1–3 at low levels of fluorescence in the presence of Tat and Rev (Fig. 4E).

### 3.3. Inhibition of HIV-1 replication by gRNAs

To verify the effect of gRNAs on viral replication, we tested pLCl-gRNAs in a VSV-G pseudotyped HIV-1 virus particles model using pNL4-3 and pVSV-G. Six days after co-transfection of pLCl-gRNAs with pNL4-3 and pVSV-G, GFP expression was observed by fluorescence microscopy and percentage of GFP-positive cells were analyzed by flow cytometry. A significant inhibition of GFP expression was found in cells treated with each gRNA (75–82%) and mix of gRNAs 1–3 (83%) compared to pLCl/pNL4-3 control (Fig. 5A and B).

In addition, to confirm that self-regulation of our Cas9 system affected viral replication, we quantified p24 concentration in the supernatant by ELISA. Results from ELISA assay revealed a strong decrease of p24 when gRNAs 1–3 were tested alone; however, the combination of gRNAs 1–3 led to undetectable levels of p24 (Fig. 5C). We then verified the DNA cleavage induced by the effect of gRNAs; cell DNA extraction and PCR amplification were performed using oligonucleotides flanking *tat* and *rev* genes (Table S5). We detected three bands corresponding to DNA without cleavage (3,000 bp), the cut made by gRNA1/gRNA3 (444 bp), and gRNA2/gRNA3 (558 bp) (Fig. 5D). These results are consistent with *in silico* analysis (Fig. 5E). Samples treated with gRNAs were cloned and sequenced to confirm the excision of the viral genome with an efficiency of 90% (Fig. 5F and G).

Cell viability analysis showed that gRNAs 1–3 did not produce a cytotoxic effect compared to cells without gRNAs, which showed changes in proliferation, morphology and viability (Fig. 6A–D). Furthermore, gRNAs 1–3 protected against cell death because the virus continued infecting cells by a non-classical mechanism in presence of VSV-G (Fig. 6C and D). Flow cytometry analysis showed that infected cells without gRNAs died and GFP + population was maintained

(Fig. 6D).

To examine the viral escape and virus presence in HEK293 culture media, we treated MT2 cells with conditioned media from HEK293 cells treated with gRNAs either alone or with the mix of gRNAs 1–3. MT2 cells treated with single gRNA media exhibited syncytia formation, a clear sign of virus infection (van't Wout et al., 2008), but cells treated with the mix did not show any evidence of syncytia or p24 viral protein when tested by ELISA (Figure S11). These results confirmed the high efficiency of the mix of gRNAs 1–3 to inhibit HIV-1 replication.

## 4. Discussion

The establishment of a proviral reservoir represents the main barrier for HIV-1 eradication. The integration of viral genome in resting memory CD4<sup>+</sup> T cells leads to infection persistence, avoiding the effect of antiretroviral drugs and the attack of the immune system (Blankson et al., 2002; Kulpa and Chomont, 2015; Pierson et al., 2000; Razoooky et al., 2015). CRISPR/Cas9 is a robust and versatile system that can be programmed by gRNAs to inactivate genes necessary for viral replication (Liang et al., 2016). However, the possibility of inducing non-specific mutations that may damage healthy cells represents a risk for the application of CRISPR/Cas9 in HIV-1 infected patients; therefore, genome editing restricted to infected cells may reduce undesirable effects. The regulation of gene expression is a complex process that requires a balance to induce or suppress the presence of a protein in response to a stimulus. In the case of HIV-1, LTR and INS-RRE regulatory sequences modulate gene expression in the presence of the virus, as reported (Huelsmann et al., 2011).

In this study, we evaluated the function of LTR and INS-RRE sequences in plasmid PX458, demonstrating a strong reduction of gene expression, although regulation was not absolute (Fig. 2 LTR and IRL). Previous studies have demonstrated that LTR is a weak promoter, and a non-specific activation may be influenced by different factors (Qu et al., 2016; Rampalli et al., 2003; Shah et al., 2014) such as SV40 T antigen (Arya, 1988), Werner syndrome helicase protein (Mizutani et al., 2015), interferon-regulatory factor 1 (Sgarbanti et al., 2008), PKM2 (Sen et al.,

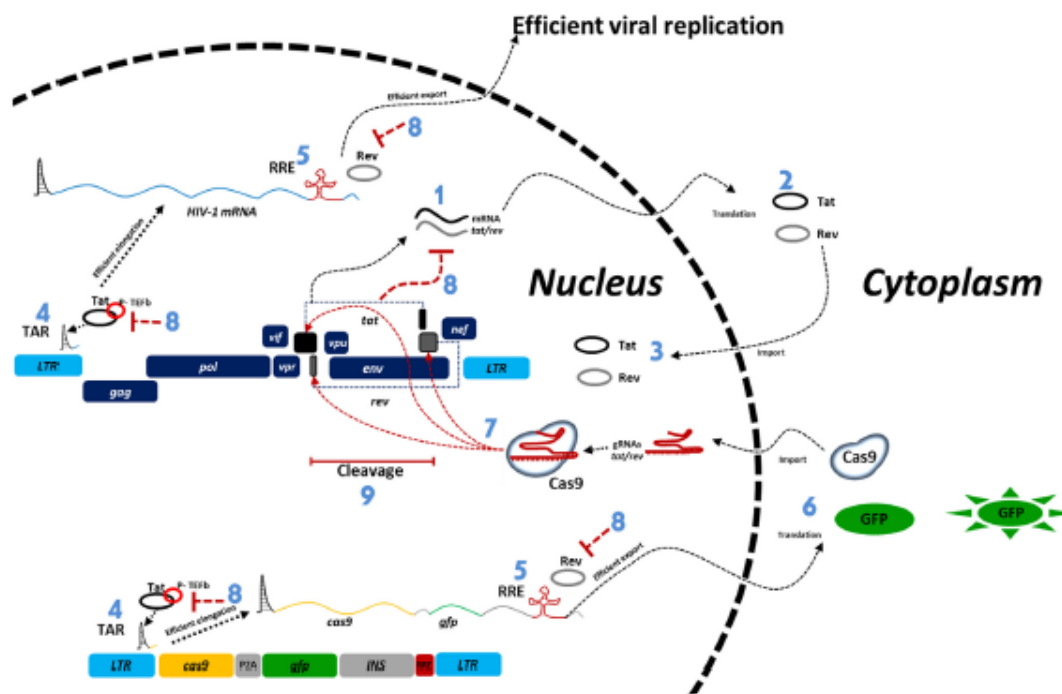


Fig. 7. Schematic representation of GFP regulation and Cas9 expression mediated by HIV-1 Tat and Rev proteins. 1. HIV-1 leads to an early expression of *tat* and *rev* genes and spliced mRNAs are produced. 2. mRNAs output to the cytoplasm and translation of Tat and Rev proteins. 3. Tat and Rev are carried back into the nucleus. 4. Tat-activated transcription; Tat/P-TEFb complex is recruited to the elongation complex via binding interactions with TAR RNA and production of incompletely spliced mRNA for both HIV-1 and Cas9. 5. Export of incompletely spliced mRNA to the cytoplasm by Rev recruited to RRE. 6. GFP and Cas9 translation. 7. Cas9 is carried back into the nucleus and is associated with gRNAs to induce mutations in *tat* and *rev* genes. 8. This process leads to the inactivation of the *tat* and *rev* genes, blocking gene expression, which prevents viral replication and stops Cas9 production by limiting its nuclease activity. 9. Cas9-gRNAs 1–3 cleaves HIV-1 proviral genome and the virus is inactivated by a partial genome excision that includes *tat*, *rev* and *env* genes.

2017), and family of NFAT (Romanchikova et al., 2003), suggesting that LTR is being activated in the absence of HIV-1. On the other hand, INS sequences similarly downregulated gene expression, although several studies have shown that cells maintain a low gene expression which is evidenced by low levels of a reporter protein (Wolff et al., 2003; Schneider et al., 1997; Schwartz et al., 1992). Cas9 gene regulated only by LTR or INS-RRE sequences could induce undesirable mutations at random sites, unlike when multiple gRNAs are selected. Therefore, dependence on two viral proteins decreases the possibility of unwanted activation of Cas9 making the system safer and more effective.

We demonstrated a synergistic effect of LTR and INS-RRE regulatory sequences, which showed a stronger control of gene expression compared to individual sequences and dependence of Tat and Rev proteins (Fig. 2, pLTR, pIRL and pLCI and Figure S9 B). These results indicate that Tat and Rev are an efficient molecular switch for Cas9 expression regulated by LTR and INS-RRE. Additionally, the sensitivity of this system showed a Tat and Rev dose-dependent effect, and the effectiveness could be affected by the kinetics of HIV-1 replication and Tat and Rev expression (Figs. 3A and 4B). Partial activation of GFP expression in a low number of cells, suggests that the amount of copies of our construction (> 60 ng, data not shown) may overcome the cell's restrictive barriers for gene expression regulation, like negative elongation factors (NELF) or the mechanisms to confine mRNAs in the nucleus in the absence of Tat and Rev proteins, respectively (Karn and

Stoltzfus, 2012; Jadlofsky et al., 2014). Our results and some previous studies, suggest that a self-regulated Cas9 system should have an optimal sensitivity to the presence of the virus in addition to being specifically activated. Another challenge which must be considered is that Cas9 system should be delivered by an efficient and safe vector that guarantees a minimum number of genes integrated into the sites that do not generate mutations in cell genes and remain available for activation.

Given the sensitivity and efficiency of the proposed mechanism, and keeping Cas9 self-regulation to limit the emergence of mutations, we selected three highly conserved gRNAs to induce mutations to *tat* and *rev* genes showing a strong inhibition of GFP expression (Fig. 4D–F and 5B). Among these sequences, gRNA2 showed a stronger anti-HIV effect than gRNA1 and gRNA3, possibly because of gRNA1 excluding the *rev* gene, resulting in a lower control of self-regulation. On the other hand, it has also been shown that the first exon of *tat* contains the minimal functional domain to generate a competent protein (Carroll et al., 1991; Cordingley et al., 1990); the resulting gRNA3 did not lead to a depletion in Tat function, and it showed an inhibitory effect targeted to Rev (Fig. 4D and F).

Considering the relevance of HIV-1 regulatory genes and that CRISPR/Cas9 system is the most efficient strategy to lead to the cure of HIV-1 infection based on multiplex editing and viral genome excision (Wang et al., 2016b), we demonstrated that the mix of gRNAs 1–3 targeting *tat* and *rev* genes efficiently controlled viral replication

compared to the effect of single gRNA, which allowed viral escape (Fig. 5C); these results were confirmed by MT2 infection assays (Figure S 11 A-C).

The antiviral effect of gRNAs 1-3 is the result of the multiplex edition and excision of the viral genome (Fig. 5D-G) that indicate the loss of three genes, *tat*, *rev* and *env*, preventing viral replication and the formation of complete viral particles, which are unable to bind to the HIV receptor. In addition to protecting cells, gRNAs 1-3 are innocuous because they did not affect cell proliferation (Fig. 6). Therefore, we conclude that our Cas9-based construction targeted to *tat* and *rev* could be an efficient and safe therapeutic tool.

Our results clearly demonstrate that gRNAs targeted to *tat* and *rev* genes had a strong anti-HIV effect as described in some previous studies, which defined these genes as the most relevant gene targets against HIV-1, besides gRNAs targeted to conserved regions which can reduce viral replication (Wang et al., 2016a; b). Interestingly, our targets agree with the same regions described by other groups (Wang et al., *tat* and *rev* for gRNA2 and Ophimni et al., *tatA* and *tatB* for gRNA1 and gRNA2), who demonstrated that CRISPR/Cas9 targeting HIV-1 regulatory genes may serve as a favorable means to achieve functional cures (Ophimni et al., 2018).

In conclusion, we developed an effective strategy to regulate Cas9 expression by the addition of HIV-1 LTR and INS-RRE regulatory sequences and whose activation depends on Tat and Rev viral proteins, in addition to the self-regulation provided by gRNAs (Fig. 7). The results suggest that it is a reliable and accurate strategy for abating HIV-1 infection whose effect would be restricted to infected cells. This system could also incorporate more gRNAs into HIV-1 conserved genes, as *gag* or *pol*, targeting exclusively infected cells in a controlled manner, reducing the risk of unwanted mutations and increasing the effectiveness for personalized therapies. Our future experiments will be focused on the evaluation of our system in a viral latency and reactivation model, in addition to developing a safe and efficient delivery system to stem cells.

#### Declaration of competing interest

None.

#### Acknowledgements

The authors thank Joaquín Zúñiga, PhD, from Subdirección de Biomedical Research, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico City, for support with the flow cytometry analysis; Luis Enrique Soto-Ramírez, MD, for providing anti-Tat and anti-Rev monoclonal antibodies for WB analysis; Santiago Ávila-Ríos, PhD, for providing pNL4-3 for infection assays; Beatriz Remus, MD, for critical review of the manuscript. Moisés Vergara-Mendoza is a PhD candidate from Graduate Program in Experimental Biology, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa and is the recipient of Fellowship No.425730 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) from Mexico. 8E5/IAV cell line was purchased from ATCC® CRL-8993™. The following reagents were obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pCV-1 from Dr. Flossie Wong-Staal (Cat# 303) and HIV-1 NL4-3 Infectious Molecular Clone (pNL4-3) from Dr. Malcolm Martin (Cat# 114).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104856>.

#### References

Adachi, A., Gendelman, H.E., Koenig, S., Folk, T., Willey, R., Rabonn, A., Martin, M.A., 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in

- human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* 59 (2), 284-291.
- Arya, S.K., Gao, C., Joseph, S.F., Wong-Staal, F., 1985. Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* 229 (4708), 69-73. <https://doi.org/10.1126/science.2990040>.
- Arya, S.K., 1988. Human and simian immunodeficiency retrovirus activation and differential transcription of gene expression. *AIDS Res. Retrovir.* 4 (3), 175-186. <https://doi.org/10.1089/aid.1988.4.175>.
- Blankson, J.N., Persaud, D., Siliciano, R.F., 2002. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Med.* 53, 557-593. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.104024>.
- Gara, A., Gereseto, A., Lori, F., Reitz, M.S., 1996. HIV-1 protein expression from synthetic circles of DNA mimicking the extrachromosomal forms of viral DNA. *J. Biol. Chem.* 271 (10), 5393-5397. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.10.5393>.
- Garroll, R., Martarano, L., Derse, D., 1991. Identification of lentivirus Tat functional domains through generation of equine infectious anemia virus/human immunodeficiency virus type 1 tat gene chimeras. *J. Virol.* 65 (7), 3460-3467.
- Gordingley, M.G., LaFemina, R.L., Callahan, P.J., Coondra, J.H., Sardana, V.V., Graham, D.J., Nguyen, T.M., LeGrow, K., Godlib, L., Schlabach, A.J., 1990. Sequence-specific interaction of Tat protein and Tat peptides with the transcription-responsive sequence element of human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (22), 8985-8989. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.22.8985>.
- Gillet, G., Boutin, J., Tountani, J., Priz, F., Pennanen, P., Rooryck, C., Teichmann, M., Rousseau, E., Lamrissi-Garcia, I., Guyonnat-Duperat, V., Bibeau, A., Lalanne, M., Prouzet-Mauléon, V., Turcq, B., Ged, C., Blouin, J.M., Richard, E., Dabernat, S., Moreau-Gaudry, F., Bedel, A., 2019. CRISPR-Cas9 genome editing induces megabase-scale chromosomal truncations. *Nat. Commun.* 10 (1), 1136. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09006-2>.
- Dadi, P.K., Kevadiya, B.D., Su, H., Ranouh, M.G., Gendelman, H.E., 2020. Pathways towards human immunodeficiency virus elimination. *EBioMedicine* 53, 102667. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102667>.
- Ehina, H., Mizawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y., 2013. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci. Rep.* 3, 2510. <https://doi.org/10.1038/srep02510>.
- Folks, T.M., Powell, D., Lightfoot, M., Koenig, S., Faud, A.S., Benn, S., Rabonn, A., Daugherty, D., Gendelman, H.E., Hoggan, M.D., 1986. Biological and biochemical characterization of a cloned Leu-3<sup>+</sup> cell surviving infection with the acquired immune deficiency syndrome retrovirus. *J. Exp. Med.* 164 (1), 280-290. <https://doi.org/10.1084/jem.164.1.280>.
- Hu, W., Kaminski, R., Yang, F., Zhang, Y., Coentino, L., Li, F., Luo, B., Alvarez-Carbonell, D., Garcia-Mesa, Y., Karn, J., Mo, X., Khalili, K., 2014. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (31), 11461-11466. <https://doi.org/10.1073/pnas.14.0518611>.
- Huelsmann, P.M., Hofmann, A.D., Koenig, S.A., Popp, J., Rauch, P., Di Girolando, F., Danke, C., Guackel, E., Schambach, A., Wolff, H., Metzner, K.J., Bressan, C., 2011. A suicide gene approach using the human pro-apoptotic protein Bcl-2 inhibits HIV-1 replication. *BMC Biotechnol.* 11, 4. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-4>.
- Jadlovsky, J.K., Wong, J.Y., Graham, A.G., Dobrowolski, C., Devor, R.L., Adams, M.D., Hujinaga, K., Karn, J., 2014. Negative elongation factor is required for the maintenance of proviral latency but does not induce promoter-proximal pausing of RNA polymerase II on the HIV long terminal repeat. *Mol. Cell Biol.* 34 (11), 1911-1928. <https://doi.org/10.1128/mcb.01013-13>.
- Kaminski, R., Bella, R., Yin, C., Ote, J., Ferrante, P., Gendelman, H.E., Li, H., Roone, R., Gordon, J., Hu, W., Khalili, K., 2016a. Excision of HIV-1 DNA by gene editing: a proof-of-concept in vivo study. *Gene Ther.* 23 (8-9), 690-695. <https://doi.org/10.1038/gt.2016.41>.
- Kaminski, R., Chen, Y., Fischer, T., Tedaldi, E., Napoli, A., Zhang, Y., Karn, J., Hu, W., Khalili, K., 2016b. Elimination of HIV-1 genomes from human T-lymphoid cells by CRISPR/Cas9 gene editing. *Sci. Rep.* 6, 22555. <https://doi.org/10.1038/srep22555>.
- Kaminski, R., Chen, Y., Salkind, J., Bella, R., Young, W.-B., Ferrante, P., Karn, J., Malcolm, T., Hu, W., Khalili, K., 2016c. Negative feedback regulation of HIV-1 by gene editing strategy. *Sci. Rep.* 6, 31527. <https://doi.org/10.1038/srep31527>.
- Karn, J., Stoltzfus, C.M., 2012. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2 (2), a006916. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006916>.
- Kulpa, D.A., Chomou, N., 2015. HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *J. Virus Evol.* 1 (2), 59-66.
- Liang, C., Walberg, M.A., Das, A.T., Berkhout, B., 2016. CRISPR/Cas9: a double-edged sword when used to combat HIV infection. *Retrovirology* 13 (1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0270-0>.
- Lorenzo-Rodondo, R., Fryer, H.R., Bedford, T., Kim, E.Y., Archer, J., Pond, S.L.K., Chung, Y.S., Penugonda, S., Chipman, J., Fletcher, C.V., Schacko, T.W., Mallin, M.H., Ramsour, A., Haase, A.T., McLean, A.R., Wollinsky, S.M., 2016. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* 530 (7588), 51-56. <https://doi.org/10.1038/nature16933>.
- McGourle, J.E., Kendrick, T.S., Minchin, R.F., 2004. HIV LTR-dependent expression of Bax selectively induces apoptosis in Tat-positive cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 (4), 1459-1464. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.195>.
- Mizutani, T., Ishizaka, A., Furuchi, Y., 2015. The Werner protein acts as a coactivator of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) on HIV-1 and interleukin-8 (IL-8) promoters. *J. Biol. Chem.* 290 (30), 18391-18399. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.657155>.
- Ophimni, Y., Inoue, M., Kotalid, T., Kameoka, M., 2018. CRISPR/Cas9 system targeting regulatory genes of HIV-1 inhibits viral replication in infected T-cell cultures. *Sci. Rep.* 8 (1), 7784. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26190-1>.
- Pierson, T., McArthur, J., Siliciano, R.F., 2000. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00121  
Matrícula: 2133801986

Regulación de Cas9 por las proteínas virales Tat y Rev para la inactivación de VIH-1

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 24 del mes de septiembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ  
DR. HECTOR FERNANDO SERRANO  
DR. SANTIAGO AVILA RIOS  
DR. HECTOR ENRIQUE ESPINOSA ARCINIEGA



Bejo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL  
DE: MOISES VERGARA MENDOZA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

MOISES VERGARA MENDOZA  
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. LUIS ENRIQUE GOMEZ QUIROZ

VOCAL

DR. HECTOR FERNANDO SERRANO

VOCAL

DR. SANTIAGO AVILA RIOS

SECRETARIO

DR. HECTOR ENRIQUE ESPINOSA  
ARCINIEGA

El presente documento cuenta con la firma -autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta - Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella