

sugieren que Nme2Cas9 tiene una tolerancia muy baja para los desajustes, particularmente en su secuencia semilla.

3. Eficiencia de la edición genómica de Nme2Cas9

Nme2Cas9 se usó para dirigirse a cuarenta (40) sitios objetivo diferentes en todo el

5 genoma humano en células HEK293T mediante el uso de transfecciones transitorias. Tabla 4.

Tabla 4: Sitios objetivo Nme2Cas9 de células HEK293T representativas

Número	Nombre del Sitio	Secuencia Espaciadora	PAM	Locus	Indeles con 150ng de plásmido Cas9 (%)	Nombre del Cebador TIDE	Cebador FW TIDE	Cebador RV TIDE
1	TS1	GGTCTGGGTACTTTATCTGTCC	CCTCCACC	AAVS1	0,2	AAVS1_TIDE1	TGGCTTAGCACCTCTCCAT	AGAACTCAGGACCAACTTATTCTG
2	TS4	GTCTGCCTAACAGGAGGTGGGGGT GAATATCAGGAGACTAGGAAGGA G	TAGACCA A	AAVS1	11	AAVS1_TIDE1	TGGCTTAGCACCTCTCCAT	AGAACTCAGGACCAACTTATTCTG
3	TS5		GAGGCCA	AAVS1	15	AAVS1_TIDE1	TGGCTTAGCACCTCTCCAT	AGAACTCAGGACCAACTTATTCTG
4	TS6	GCCTCCCTGCAGGGCTGCTCCC	CAGCCCAA	LINC0158 8	20	LINC01588_TID E	AGAGGAGCCTTCTGACTGCTGCAGA	ATGACAGACACAACCAAGAGGGCA
5	TS10	GAGCTAGTCTTCTTCTCCAACCC	GGGCCCA	AAVS1	3,5	AAVS1_TIDE1	TGGCTTAGCACCTCTCCAT	AGAACTCAGGACCAACTTATTCTG
6	TS11	GATCTGTCCCTCCACCCACAGT GGCCAAATGAAAGGAGTGAGAG G	GGGGCCA C	AAVS1	9	AAVS1_TIDE1	TGGCTTAGCACCTCTCCAT	AGAACTCAGGACCAACTTATTCTG
7	TS12		TGACCCGA	AAVS1	10	AAVS1_TIDE2	TCCGCTTCTCCCACTCC	TAGGAAGGAGGAGGCGCTAAG
8	TS13	GCATCCTCTTGCTTTCTTGCTG	GACACCC	AAVS1	2	AAVS1_TIDE2	TCCGCTTCTCCCACTCC	TAGGAAGGAGGAGGCGCTAAG
9	TS16	GGAGTCGCCAGAGGCGGTGGTGG	ATTTCCTC	LINC0158 8	28	LINC01588_TID E	AGAGGAGCCTTCTGACTGCTGCAGA	ATGACAGACACAACCAAGAGGGCA
10	TS17	GCCAGCGGCGGATATCAGCTGC	CACGCCCG	LINC0158 8	0,2	LINC01588_TID E	AGAGGAGCCTTCTGACTGCTGCAGA	ATGACAGACACAACCAAGAGGGCA
11	TS18	GGAAGGGAACATATTACTATTGC	TTTCCTCT	CYBB	1	NTS55_TIDE	TAGAGAACTGGGTAGTGTG	CCAATATTGGATGGGATGG
12	TS19	GTGGAGTGGCTGCTATCAGCTAC	CTATCCAA	CYBB	6	NTS55_TIDE	TAGAGAACTGGGTAGTGTG	CCAATATTGGATGGGATGG
13	TS20	GAGGAAGGGAACATATTACTATTG	CTTTCCTC	CYBB	11,2	NTS55_TIDE	TAGAGAACTGGGTAGTGTG	CCAATATTGGATGGGATGG
14	TS21	GTGAATTCATCAGCTAAATGC	CAAGCCTT	CYBB	1	NTS55_TIDE	TAGAGAACTGGGTAGTGTG	CCAATATTGGATGGGATGG
15	TS25	GCTCACTCACCCACAGACACAC	ACGTCCCT	VEGF A	15,6	VEGF_TIDE3	GTACATGAAGCAACTCCAGTCCCA	ATCAAATTCAGCACCAGGCGC
16	TS26	GGAAGAATTTCATTCTGTTCTCAG	TTTTCCTG	CFTR	2	hCFTR_TIDE1	TGGTGATTATGGGAGAACTGGAGC	ACCATTGAGGAGCTTTGTCTCAC
17	TS27	GCTCAGTTTCTCGATTATGCTC	GGCACCAT	CFTR	4	hCFTR_TIDE1	TGGTGATTATGGGAGAACTGGAGC	ACCATTGAGGAGCTTTGTCTCAC
18	TS31	GCGTTGGAGCGGGGAGAAGGCCA G	GGGTCACT	VEGFA	9	VEGF_TIDE3	GTACATGAAGCAACTCCAGTCCCA	ATCAAATTCAGCACCAGGCGC
19	TS34	GGGCCCGGAGATAGCTGCAGGGC	GGGGCCCC	LINC0158 8	0	LINC01588_TID E	AGAGGAGCCTTCTGACTGCTGCAGA	ATGACAGACACAACCAAGAGGGCA
20	TS35	GCCACCCGCGGCGCTCCCTGC	AGGGCTGC	LINC0158 8	0	LINC01588_TID E	AGAGGAGCCTTCTGACTGCTGCAGA	ATGACAGACACAACCAAGAGGGCA
21	TS36	GCGTGGCAGCTGATATCCGGCCG	TGGGCGTC	LINC0158 8	0	LINC01588_TID E	AGAGGAGCCTTCTGACTGCTGCAGA	ATGACAGACACAACCAAGAGGGCA
22	TS37	GCCGCGGCGCAGCTGGAGCCAGC	CCCGCAA	LINC0158 8	0,5	LINC01588_TID E	AGAGGAGCCTTCTGACTGCTGCAGA	ATGACAGACACAACCAAGAGGGCA
23	TS38	GTGCTCCCCAGCCAAACCGCCGC	GGCGGCA C	LINC0158 8	2	LINC01588_TID E	AGAGGAGCCTTCTGACTGCTGCAGA	ATGACAGACACAACCAAGAGGGCA
24	TS41	GTCAGATTGGCTTGCTCGGAATTG	CCAGCCAA	AGA	3	AGA_TIDE1	GGCATAAGGAAATCGAAGGTC	CATGTCCCTCAAGTCAAGACAAG
25	TS44	GCTGGGTGAATGAGCGAGCAGCG	TCTTCGAG	VEGFA	3	VEGF_TIDE3	GTACATGAAGCAACTCCAGTCCCA	ATCAAATTCAGCACCAGGCGC
26	TS45	GTCTGGAGTGACCCCTGGCCTTC	TCCCGGCT	VEGFA	7,4	VEGF_TIDE3	GTACATGAAGCAACTCCAGTCCCA	ATCAAATTCAGCACCAGGCGC
27	TS46	GATCCTGGAGTGACCCCTGGCCTT	CTCCCGGC	VEGFA	6	VEGF_TIDE3	GTACATGAAGCAACTCCAGTCCCA	ATCAAATTCAGCACCAGGCGC
28	TS47	GTGTGTCCCTCTCCCAACCCGTCC	CTGTCCGC	VEGFA	23,1	VEGF_TIDE3	GTACATGAAGCAACTCCAGTCCCA	ATCAAATTCAGCACCAGGCGC
29	TS48	GTTGGAGCGGGGAGAAGGCCAGG G	GTCACCTC	VEGFA	2	VEGF_TIDE3	GTACATGAAGCAACTCCAGTCCCA	ATCAAATTCAGCACCAGGCGC
30	TS49	GCGTTGGAGCGGGGAGAAGGCCA G	GGGTCACT	VEGFA	4	VEGF_TIDE3	GTACATGAAGCAACTCCAGTCCCA	ATCAAATTCAGCACCAGGCGC
31	TS50	GTACCCCTCAATAATTGGCTGGC	AATTCCGA CAAGCCA A	AGA	6	AGA_TIDE1	GGCATAAGGAAATCGAAGGTC	CATGTCCCTCAAGTCAAGACAAG
32	TS51	GATAATTGGCTGGCAATTCCGAG		AGA	4,5	AGA_TIDE1	GGCATAAGGAAATCGAAGGTC	CATGTCCCTCAAGTCAAGACAAG
33	TS58 (DS11)	GCAGGGGCCAGGTGTCTTCTCTG	GGGGCCTC	VEGFA	5	VEGF_TIDE4	ACACGGGCAGCATGGGAATAGTC	GCTAGGGGAGAGTCCCACTGTCCA
34	TS59 (DS12)	GAATGGCAGCGGAGGTGTACTG	GGGGCCA G	VEGFA	11,5	VEGF_TIDE5	CCTGTGTGGCTTTGCTTTGGTCG	GTAGGGTGTGATGGGAGGCTAAG C
35	TS60 (DS13)	GAGTGAGAGAGTGAGAGAGAGAC A	CGGGCCA G	VEGFA	3	VEGF_TIDE5	CCTGTGTGGCTTTGCTTTGGTCG	GTAGGGTGTGATGGGAGGCTAAG C
36	TS61 (DS14)	GTGAGCAGGCACCTGTGCCAAT	GGGGCCGC	VEGFA	3,5	VEGF_TIDE5	CCTGTGTGGCTTTGCTTTGGTCG	GTAGGGTGTGATGGGAGGCTAAG C
37	TS62 (DS15)	GCGTGGGGCTCCGTGCCACGC	GGGTCCAT	VEGFA	3,4	VEGF_TIDE6	GGAGGAAGAGTAGCTCGCCGAGG	AGACCGAGTGGCAGTGACAGCAA G
38	TS63 (DS16)	GCATGGGCAGGGGCTGGGTGCAC	AGGCCCA G	VEGFA	16	VEGF_TIDE7	AGGGAGAGGGAAGTGTGGGGAAGG	GTCTTCTGCTCTGTGCGCACGAC
39	TS64	GAAAATTGTGATTCCAGATCCAC	AAGCCCA A	FANCI	7	Fanci_TIDE5	GTGGGGGCTCTAAGTTATGTAT	CTTCATCTGATCTTCAGGATCA
40	TS65	GAGCAGAAAAATTGTGATTCC	AGATCCAC	FANCI	0	Fanci_TIDE5	GTGGGGGCTCTAAGTTATGTAT	CTTCATCTGATCTTCAGGATCA

72 horas después de la transfección, las células se recolectaron seguido de la extracción
10 de ADN y la amplificación selectiva del locus objetivo. Se utilizó un análisis de Seguimiento
de Indeles mediante descomposición (TIDE) para medir las tasas de indeles en cada locus. Se

observó una edición eficiente por Nme2Cas9, a pesar de que las tasas de indel variaron significativamente dependiendo de la secuencia objetivo y el locus. Figura 38A. Además, la afinidad de Nme2Cas9 por los sitios objetivo cerca a/en loci terapéuticamente relevantes tales como *CYBB* (mutaciones causan la enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X) y