



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación
Biocomputación y Física
de Sistemas Complejos
Universidad Zaragoza

Caracterización funcional de AIFM₃ (*Apoptosis-inducing factor mitochondrion-associated 3*) mediante inactivación del gen por la técnica CRISPR-Cas9 y sobreexpresión de la proteína en bacterias y células eucariotas

Functional characterization of AIFM₃ (*Apoptosis inducing factor mitochondrion-associated 3*) through the knock-out of its gene with the technique CRISPR-Cas9 and over-expression of the protein in bacteria and eukaryotic cells

Trabajo Fin de Grado

Autora

Nerea Novo Huerta

Directores

Dr. José Alberto Carrodegua Villar

Dra. María Milagros Medina Trullenque

Instituto Universitario de Investigación, Biocomputación y Física de Sistemas Complejos

Grado de Biotecnología de la Universidad de Zaragoza (Facultad de Ciencias)

Curso 2016/2017

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. La muerte celular	5
1.2. La familia AIF	6
1.3. La técnica CRISPR-Cas9 para la modificación del genoma	9
2. OBJETIVO	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. Cultivos bacterianos	10
3.2. Líneas celulares	12
3.3. CRISPR/Cas9	14
3.4. Ligación	16
3.5. Digestión	16
3.6. Electroforesis	16
3.7. Tinción con Coomassie	17
3.8. Electrotransferencia	17
3.9. <i>Western Blot</i> y revelado	17
3.10. Secuenciación	18
3.11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	18
3.12. Inducción con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. Silenciamiento del gen <i>aifm3</i> mediante la técnica CRISPR/Cas9	19
4.2. Sobreexpresión del gen <i>aifm3</i>	22
CONCLUSIONES	28
CONCLUSIONS	28
BIBLIOGRAFÍA	29
ANEXOS	31
ANEXO I – ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE LA FAMILIA AIF	31
ANEXO II – ANÁLISIS BLAST DE LA SECUENCIA DE AIFL HUMANO	33
ANEXO III – ALINEAMIENTO CON CLUSTAL ω DE VARIAS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS TRAS EL ANÁLISIS BLAST DE AIFL HUMANO	35
ANEXO IV – LISTA DE MEDIOS Y TAMPONES EMPLEADOS	37
ANEXO V –SILENCIAMIENTO DEL GEN <i>aifm3</i> MEDIANTE CRISPR/Cas9	39

ANEXO VI – ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE pNNH _{4.1} , pNNH _{4.2} , pNNH _{5.4} Y pNNH _{5.5} CON SUS INSERTOS (KO-AIFL-UP Y KO-AIFL-DWN).....	43
ANEXO VII –SOBREEXPRESIÓN DEL GEN <i>aifm3</i>	45
ANEXO VIII – INFORME DE LA OPTIMIZACIÓN DEL GEN <i>aifm3</i>	49
ANEXO IX – TABLA DE VECTORES EMPLEADOS	57
ANEXO X – MAPAS GENERADOS CON EL PROGRAMA VECTOR NTI DE LOS PLÁSMIDOS pNNH ₁ , pNNH ₂ Y pNNH ₃	59
ANEXO XI – ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS DE LAS MUESTRAS DE pNNH ₁ Y pNNH ₂ CON SUS SECUENCIAS TEÓRICAS.....	63
ANEXO XII - SECUENCIAS.....	91

RESUMEN

El factor inductor de apoptosis homólogo a AIF (AIFL) es un miembro de la familia de proteínas AIF (factor inductor de apoptosis) del que se posee escasa información tanto a nivel estructural como funcional. Con el objeto de estudiar la función de esta proteína se generó una línea celular humana KO para el gen que la codifica, *aifm3*, por medio de la técnica de edición genómica CRISPR/Cas9. La expresión ubicua del factor sugiere una posible función esencial en la célula, que se vio sustentada por la observación de un crecimiento significativamente ralentizado en la línea celular silenciada. En paralelo, se estudió la hipotética función pro-apoptótica del factor, diseñando vectores de expresión tanto para células procariotas como eucariotas con el fin de sobreexpresar el gen *aifm3* en *Escherichia coli* y en la línea celular humana HEK293T. La sobreexpresión en bacterias se demostró mediante *Western Blot*, mientras que no se observó expresión ni efectos significantes en las células humanas transfectadas. La optimización de la expresión en bacterias permitirá, en estudios posteriores, diseñar un protocolo de purificación para su caracterización tanto bioquímica (mediante ensayos cinéticos) como estructural (por técnicas de cristalización).

ABSTRACT

The apoptosis inducing factor-like (AIFL) is a member of the AIF (apoptosis inducing factor) family of proteins for which scarce information is available both regarding its structure and function. In order to evaluate the cellular role of this protein, a knock-out of a human cellular line was generated for the gene that encodes it, *aifm3*, through the genome-editing technique CRISPR/Cas9. The factor's ubiquitous expression suggests an essential cellular function, which was supported by the observation of a significantly impaired growth of the silenced cells. At the same time, the hypothetical pro-apoptotic role of the factor was studied, designing expression vectors for both prokaryotic and eukaryotic cells to over-express the *aifm3* gene in *Escherichia coli* as well as in the human cell line HEK293T. Over-expression in bacteria was demonstrated by Western Blot, whereas no expression or significant effects were observed in the transfected human cells. Fine tuning the gene's expression in bacteria will allow the design of a purification protocol for both its biochemical (through kinetic assays) and structural (through crystallization techniques) characterization.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La muerte celular

Una serie de criterios morfológicos y bioquímicos establecidos, junto con las circunstancias características que la rodean, permiten clasificar gran parte de la muerte celular observada durante el desarrollo normal de un organismo en una de dos posibles categorías. Estas muestran un patrón de cambio a nivel morfológico fácilmente distinguible al microscopio y se originan bajo condiciones significativamente diferentes y características (*fig. 1*).¹

La **necrosis** es una muerte celular accidental o patológica, causada por un daño físico o químico agudo e intenso (radiaciones ionizantes, traumatismos, hipoxia, toxinas...). Se caracteriza por la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, el hinchamiento del citoplasma y los orgánulos, y el vertido del contenido celular al exterior. Este último suceso provoca el reclutamiento de las células del sistema inmune y consecuentemente da lugar a un proceso de inflamación.²

La **apoptosis** es una muerte celular programada y dirigida, que tiene lugar de forma natural en el organismo a lo largo de su desarrollo. En contraposición, se caracteriza por el encogimiento de la

célula y una condensación y digestión características del DNA, sin pérdida de la integridad de la membrana plasmática y sin afectación a los orgánulos. Eventualmente la célula se rompe en varios fragmentos que todavía mantienen parte de la membrana a su alrededor. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos circundantes sin dar lugar a inflamación.³

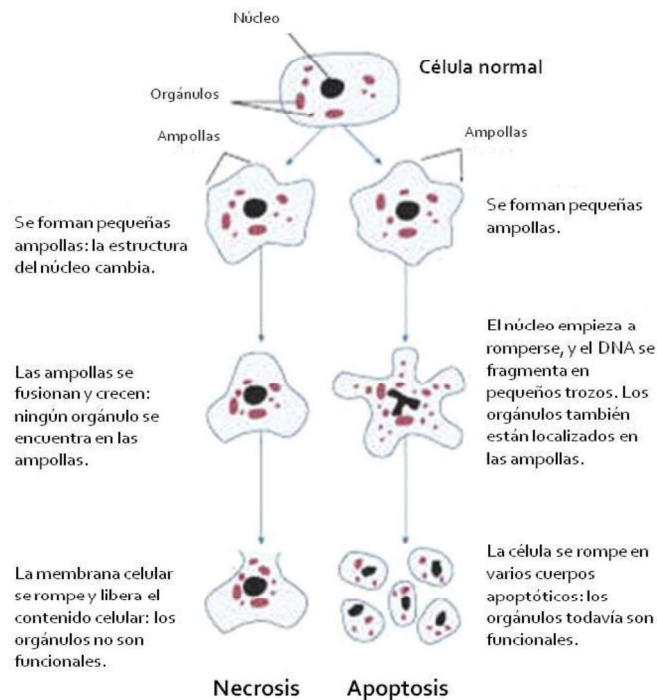


Figura 1. Cambios estructurales observados en células en necrosis o apoptosis.³

1.1.1. La muerte celular programada o apoptosis

La apoptosis puede tener lugar durante el desarrollo normal de una célula y en condiciones patológicas, a través de dos posibles rutas no excluyentes: la **intrínseca** (bajo decisión propia de la célula e iniciada en la mitocondria) y la **extrínseca** (estimulada por factores externos con la interacción entre ligandos y sus receptores de membrana). La mitocondria posee un papel central en la ejecución de la apoptosis mediada por ambas rutas⁴. Varias moléculas conocidas como "pro-apoptóticas" son liberadas de diferentes compartimentos de la mitocondria, donde residen en condiciones normales, como respuesta a múltiples estímulos (intracelulares o extracelulares) para iniciar la apoptosis. Entre estas destacan el citocromo c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, EndoG y AIF.⁴ En particular, el factor inductor de apoptosis (AIF) promueve la iniciación de la apoptosis independiente de caspasas: sufre un corte proteolítico que libera su dominio C-terminal (465-595aa), donde reside la actividad letal, para ser translocado al núcleo donde desencadena la fragmentación del DNA cromosómico. En situación basal, no obstante, AIF se encuentra anclado a la membrana interna de la mitocondria en su forma no truncada, funcionando como captador de radicales libres y participando en la función normal de la fosforilación oxidativa⁵.

1.2. La familia AIF

El factor inductor de apoptosis (AIF) es el miembro principal de la familia de proteínas AIF. Las proteínas que conforman esta familia muestran cierta homología (*ver anexo 1*) y comparten dos actividades fundamentales: la **actividad oxidoreductasa** y la **actividad inductora de apoptosis**.

En humanos, la familia AIF cuenta concretamente con tres componentes: AIF, el factor inductor de muerte asociado a mitocondria homólogo a AIF (AMID), y el factor inductor de apoptosis homólogo a AIF (AIFL). AMID es también conocida como PRG3 (gen de respuesta a p53 3) y presenta un patrón

de plegamiento muy similar al de AIF. En contraposición, AIFL parece estar vagamente relacionado con AIF, y su estructura no ha sido resuelta todavía.⁵

Los miembros de la familia AIF tienen algo más en común: se localizan principalmente en la mitocondria, aunque carecen de una secuencia de localización mitocondrial (MLS) consenso⁵. AIF presenta una MLS en su extremo N-terminal⁶ que no se encuentra en ninguno de los otros dos componentes de la familia. AMID podría poseer una secuencia de localización interna⁷, y AIFL parece carecer de una secuencia de localización comparable a las recogidas en las bases de datos de servidores como Mitopred⁸ (Fig. 2).

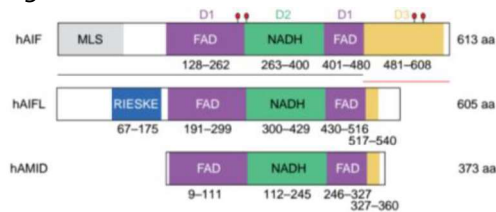


Figura 2. Dominios característicos de las proteínas humanas AIF, AMID y AIFL: dominio de unión a FAD (D_1 , magenta), dominio de unión a NADH (D_2 , verde), dominio C-terminal (amarillo) y dominio Rieske (azul). Bajo cada fragmento se muestran los residuos que componen el dominio.⁵

AIF, AMID y AIFL comparten una hipotética actividad inductora de la muerte celular, pero no existe un consenso que relacione esta función apoptótica común con la estructura ligeramente dispar de cada factor. AIF muestra susceptibilidad frente a mutaciones en los residuos implicados en la unión al DNA y en el extremo C-terminal (ausente en sus homólogos AIFL y AMID), pero su actividad letal no se ve influida por modificaciones que afectan a su actividad redox o a la unión al ligando FAD. Similarmente, AIFL puede prescindir del dominio con actividad oxidoreductasa (191-556aa), pero requiere del dominio Rieske (1-190aa) para iniciar la apoptosis.⁵

1.2.1. Factor inductor de apoptosis homólogo a AIF (AIFL)

El factor inductor de apoptosis homólogo a AIF (AIFL) o factor inductor de apoptosis asociado a la mitocondria 3 (AIFM3) fue identificado, clonado y caracterizado por primera vez por el grupo de Qiang Xie en el año 2005⁸. Realizando un BLAST del genoma humano encontraron un tercer gen que presentaba homología de secuencia con AIF, al que denominaron gen homólogo a AIF (AIFL).

La proteína AIFL humana cuenta con 605 aminoácidos y se encuentra **significativamente conservada** a nivel filogenético a lo largo de los tres reinos taxonómicos. La figura 3 muestra un árbol filogenético generado con la herramienta online Phylogeny⁹ tras el alineamiento con Clustalw (ver anexo III) de las secuencias de varias especies obtenidas a través del análisis BLAST de la secuencia de la AIFL humana sobre una base de datos de organismos modelo (ver anexo II).

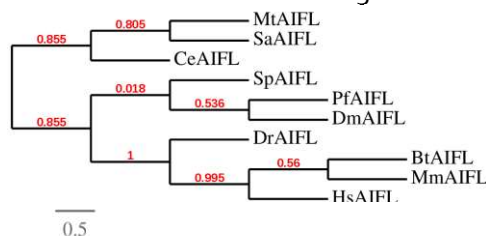


Figura 3. Árbol filogenético de la secuencia de AIFL en varias especies (*Homo sapiens* -Hs-, *Bos taurus* -Bt-, *Mus musculus* -Mm-, *Drosophila melanogaster* -Dm-, *Danio rerio* -Dr-, *Caenorhabditis elegans* -Ce-, *Plasmodium falciparum* -Pf-, *Schizosaccharomyces pombe* -Sp-, *Mycobacterium tuberculosis* -Mt- y *Sulfolobus acidocaldarius* -Sa-). Realizado con Phylogeny⁹.

El análisis de su estructura con el programa SMART llevado a cabo por Xie *et al.* (2005) reveló la existencia de un dominio Rieske característico (comprendido entre los residuos C67-Q175⁵) y un

dominio piridin-nucleótido disulfuro oxidoreductasa (Pyr-redox, Y191-L540⁵). Una búsqueda actual empleando la misma herramienta permite identificar un dominio adicional contenido en el fragmento 512-562aa: un dominio reductasa C (Fig. 4). A continuación se describen los dominios:

- El **dominio ferredoxina de tipo Rieske** contiene un núcleo [2Fe-2S] coordinado por dos residuos cisteína y dos residuos histidina. Cada pareja de residuos coordina a uno de los dos iones de hierro. Los dos iones sulfuro conectan los iones hierro formando un grupo plano y rómbico. Este dominio es habitual en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria y el cloroplasto, y en oxigenasas de hierro tipo no-hemo.
- El **dominio piridin-nucleótido disulfuro oxidoreductasa** consiste en un pequeño dominio de unión a NADH contenido en un dominio de unión a FADH de mayor tamaño. Está implicado en reacciones de tipo redox.
- El **dominio reductasa C**, implicado en la dimerización de la putidaredoxin reductasa¹⁰ y en la interacción entre la FAD NADH-ferredoxin reductasa y la ferredoxina de tipo Rieske¹¹.



Figura 4. Localización relativa de los dominios de AIFL humano. Realizado con la herramienta SMART.

Modjtahedi *et al.* (2006) generaron computacionalmente un modelo teórico de AIFL humano (fig. 5). Partiendo de un alineamiento secuencia-estructura con AIF, generaron y optimizaron un modelo tridimensional. Los aminoácidos clave implicados en la coordinación de los iones hierro del núcleo [2Fe-2S] del dominio Rieske (C109, H111, C128 y H131) se conservaron en el modelo generado. La homología de secuencia con AIF en el dominio Pyr-redox que obtuvieron fue un 35%, aunque no detectaron modificaciones significativas en los dominios de unión a NADH o FAD. Además observaron que AIFL, al igual que AMID, carece de parte del dominio C-terminal característico de AIF humano y en el cual reside la actividad letal.⁵

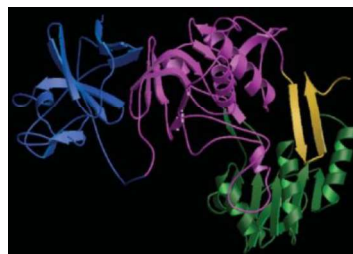


Figura 5. Modelo tridimensional teórico de AIFL humano. Se emplea el código de colores de la figura 2.⁵

Xie *et al.* (2005) demostraron que AIFL carece de una **secuencia de localización mitocondrial** (MLS) canónica, en contraposición con su homólogo AIF, analizando la secuencia de la proteína con la herramienta online Mitopred (actualmente obsoleta). Un análisis con la herramienta actualizada MitoFates tampoco identifica un dominio MLS. No obstante, se ha demostrado experimentalmente que AIFL se localiza predominantemente en la membrana interna de la mitocondria (y a bajo nivel en el retículo endoplasmático) y no se transloca al núcleo con la inducción de apoptosis⁸.

Para demostrar que el factor AIFL puede promover la apoptosis, el grupo de Qiang Xie expresó la proteína heterológamente en células HEK293T. La transfección causó la liberación de citocromo c de la mitocondria y la escisión de la caspasa 3, demostrando que AIFL induce **apoptosis por una ruta dependiente de caspasas**, al contrario que AIF⁸. Adicionalmente observaron una despolarización significativa de la membrana mitocondrial. El dominio de tipo Rieske parece contener por sí solo la actividad letal de la AIFL, mientras que el dominio Pyr-redox se localiza en el citoplasma cuando se expresa por separado y consecuentemente no induce apoptosis⁸.

La expresión de la proteína AIFL en tejidos humanos es prácticamente ubicua, lo que indica una potencial función constitutiva en estado celular basal⁸. La presencia de un dominio ferredoxina de tipo Rieske, capaz de mediar el intercambio de electrones a través de su núcleo iónico, junto con el dominio Pyr-redox, implicado en reacciones de oxido-reducción, sugieren la posibilidad de que AIFL esté encargada de captar radicales libres *in vivo*, promoviendo la supervivencia celular⁸. Su función pro-apoptótica podría ser inducible (por estímulos todavía desconocidos), en similitud con AIF.

1.3. La técnica CRISPR-Casg para la modificación del genoma

Los sistemas CRISPR-Cas, identificados en arqueas y bacterias, hacen uso de una **actividad nucleasa guiada por RNA** para proveer a la célula de inmunidad adaptativa frente a la invasión de elementos genéticos extraños (p.ej. de un plásmido o un fago). Se basan en secuencias cortas y repetitivas presentes en el genoma (repeticiones palindrómicas agrupadas regularmente interespaciadas, CRISPR) entre las que se encuentran incorporados fragmentos cortos de DNA espaciador, proveniente de DNA extraño de infecciones previas. El RNA contenido en estos espaciadores programa a las endonucleasas, conocidas como Cas (asociada a CRISPR), para reconocer y cortar específicamente el DNA o RNA exógeno de una potencial infección posterior.¹²

Cuando se produce una infección, la degradación enzimática del material genético extraño genera secuencias cortas que son insertadas en el locus CRISPR, convirtiéndose en nuevos espaciadores y aportando así memoria inmunológica a la bacteria. Ante una infección subsiguiente, el locus en su totalidad es transcrito y procesado para dar pequeños crisprRNAs (crRNAs) que forman complejos con las proteínas Cas efectoras. Los crRNA guían a las endonucleasas para que degraden el DNA o RNA vírico invasor de forma específica por complementariedad de secuencia.¹³ (Fig. 6)

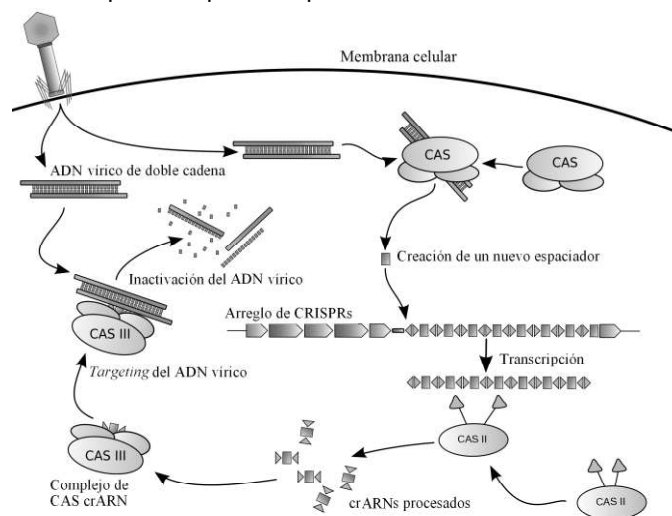


Figura 6. Esquema del posible mecanismo de acción de los sistemas CRISPR-Cas. Tras la inserción del DNA exógeno de un virus o plásmido, el complejo Cas reconoce el DNA extraño y lo integra como un nuevo espaciador en el locus CRISPR. El locus es transcrito y procesado para dar los crisprRNAs maduros, que son consecuentemente empleados como guías por el complejo Cas para degradar el ácido nucleico invasor.²¹

Existen varios tipos de sistemas CRISPR/Cas, entre los que destaca el sistema CRISPR/Casg de *Streptococcus pyogenes* por su simplicidad. En esta bacteria Gram positiva una única proteína, la Casg, es suficiente para producir el corte en la doble hebra del DNA diana. Su actividad endonucleasa es guiada por dos RNAs: el crRNA, cuya complementariedad de secuencia aporta la especificidad, y el tracrRNA (RNA transactivador), que actúa como puente entre la Casg y el crRNA. El diseño de un RNA quimérico, bautizado como RNA guía (gRNA), permite mimetizar la acción de estos dos RNAs y simplificar así el procedimiento experimental.¹⁴

La transfección con el gen de la proteína Cas9 y un gRNA sintético permite modificar la dotación genética de una célula. El corte producido por el sistema CRISPR/Cas9 es corregido *in vivo* por los sistemas de reparación celulares (bien por reparación dirigida por homología, HDR, o por unión de extremos no homólogos, NHEJ), dando lugar a inserciones o deleciones que silencian el gen diana. Alternativamente, aprovechando el sistema HDR, la célula puede ser transfectada en paralelo con un oligonucleótido “de reparación” (con extremos homólogos *upstream* y *downstream* de la secuencia noqueada) para introducir secuencias de forma dirigida en el genoma.¹⁴

El sistema CRISPR/Cas9 tiene un único requerimiento para su funcionamiento: la presencia de una secuencia corta (secuencia protoespaciadora adyacente, PAM) inmediatamente a continuación de la secuencia reconocida por el gRNA en la hebra diana del DNA. Esta secuencia puede ser “NGG” o, con una eficiencia significativamente reducida, “NAG” (donde N puede ser cualquier nucleótido)¹⁴.

La proteína Cas9 de *S. pyogenes* cuenta con dos dominios con actividad nucleasa independientes: RuvC, que produce una mella en la cadena complementaria a la diana, y HNH, encargada de cortar la hebra sencilla de la cadena diana (reconocida por el gRNA).¹⁴ El uso de variantes deficientes conocidas como nickasas, con uno de los dos dominios mutados, aporta una mayor especificidad a la técnica reduciendo drásticamente el índice de *off-targets*¹⁵.

2. OBJETIVO

El objetivo que persigue este trabajo es estudiar la función constitutiva y apoptótica de la proteína AIFL humana mediante la generación de una línea celular KO por la técnica CRISPR/Cas9, y a través de su sobreexpresión tanto en células procariontas como en células eucariotas. La sobreexpresión permite, adicionalmente, purificar la proteína para poder llevar a cabo una caracterización más intensiva de la misma, tanto a nivel bioquímico (mediante ensayos cinéticos *in vitro*, entre otros) como a nivel estructural (mediante técnicas de cristalización).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivos bacterianos

3.1.1. Cepas bacterianas: la cepa DH5 α

Las células DH5 α son una cepa de *Escherichia coli* modificada genéticamente para optimizar su eficiencia de transformación. Se emplean para amplificar plásmidos sintéticos o productos de ligaciones. La cepa cuenta con tres mutaciones características: *recA1* (inhibe la recombinación homóloga), *endA1* (inactiva las endonucleasas intracelulares para prevenir la degradación del plásmido) y *lacZM15* (permite la selección de las células transformadas por α -complementación).¹⁶

3.1.2. Cepas bacterianas: la cepa BL21 (DE3)

Las células BL21 (DE3) son una cepa comercial y competente de *Escherichia coli*, modificadas para que su eficiencia en la producción de flavoproteínas como AIF en cultivo con sulfóxido de hierro sea significativamente mayor. Poseen el gen de la polimerasa del fago T7 (*locus DE3*) insertado en su genoma, por lo que pueden sobreexpresar genes bajo el control del promotor T7¹⁷.

3.1.3. Preparación de placas con medio LB y antibiótico

El medio LB-agar (*ver anexo IV*) se fundió durante 30 minutos en el microondas a baja intensidad, procurando evitar que se quemara. Se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 55°C. Seguidamente, con un mechero Bunsen encendido en una campana para mantener la esterilidad, se

añadieron 10 mL de medio LB-agar fundido más 10 μ L de antibiótico 1000x (previamente descongelado en hielo) por placa a un tubo tipo Falcon de 50 mL. Se empleó el antibiótico pertinente a cada caso (ampicilina o kanamicina) dependiendo del gen de resistencia presente en cada plásmido (*ver anexo VIII*). Rápidamente se vertió el medio LB con antibiótico en cada placa hasta que el fondo quedó completamente cubierto (aproximadamente 10mL de medio por placa). Las placas preparadas se mantuvieron durante 15 minutos a temperatura ambiente hasta que se solidificó el medio. Se conservaron en la nevera a 4°C, selladas con parafilm.

3.1.4. Transformación de bacterias y cultivo

Se transformaron bacterias de la cepa DH5 α con los vectores de interés con el objetivo de amplificar el DNA plasmídico, y bacterias de la cepa BL21 para sobreexpresar la proteína de interés. Las células (*descritas en los apartados 3.1.1. y 3.1.2.*), almacenadas como alícuotas en viales en un congelador a -80°C, se descongelaron en hielo hasta que la solución mostró una apariencia viscosa. Los viales se rotularon con el nombre del vector correspondiente, la cepa bacteriana y la fecha. En condiciones de esterilidad, se pipeteó sobre la solución de células un volumen de solución de vector equivalente a 50ng de DNA plasmídico. El vial de células se incubó durante 30 minutos en hielo, y seguidamente se realizó un choque térmico a 42°C durante 1 minuto. Tras 2 minutos más en hielo, se añadieron 800 μ L de medio LB sin antibiótico en esterilidad y se incubaron las células durante 1h a 37°C y 220 rpm en un agitador orbital. A continuación, en esterilidad se pipetearon 200 μ L de las células transformadas sobre una placa Petri con medio LB con antibiótico, previamente preparada y rotulada. La solución se extendió con ayuda de un asa estéril. Cuando el medio había incorporado la solución de células, las placas se introdujeron en una estufa a 37°C, donde se mantuvieron durante 24 horas. Finalmente se conservaron en una nevera a 4°C, selladas con parafilm.

3.1.5. Selección de colonias

Varias colonias de cada placa de células transformadas se seleccionaron al azar con el propósito de aislar su DNA plasmídico para comprobar si éste se había incorporado correctamente. En esterilidad, se añadieron 5 mL de medio LB más 5 μ L de antibiótico 1000x (ampicilina o kanamicina) dependiendo del gen de resistencia presente en cada plásmido (*ver anexo VIII*) por colonia en un tubo tipo Falcon de 50 mL. La mezcla se agitó y repartió entre tantos tubos como colonias seleccionadas. A continuación, con ayuda de unas pinzas esterilizadas se cogieron puntas amarillas y se picaron al azar varias colonias. Éstas se incubaron durante medio día a 37°C y 220 rpm en un agitador orbital. Tras esto se conservaron a 4°C en una nevera hasta su procesamiento.

3.1.6. Preparación de stocks con glicerol

Se prepararon stocks con glicerol de las colonias seleccionadas positivas para poder conservar una alícuota de las mismas indefinidamente. En condiciones de esterilidad, se añadieron 500 μ L de cultivo a un tubo de 1,5 mL y sobre el mismo se pipetearon 200 μ L de glicerol al 80% y se mezclaron. Los stocks se conservaron en un congelador a -80°C.

3.1.7. Aislamiento del DNA plasmídico

El DNA plasmídico se aisló de las colonias seleccionadas para comprobar si el vector se había incorporado correctamente. En esterilidad, se pipetearon 1,5 mL de cada cultivo a un tubo del mismo volumen. Se centrifugó durante 1 minuto a la máxima potencia (14.100 g), se desechó el sobrenadante y se repitió el procedimiento para obtener un pellet equivalente a 3 mL de cultivo. A continuación se siguió el protocolo del kit de Miniprep para DNA plasmídico de Favorgen. El DNA plasmídico eluido se conservó en un tubo de 1,5 mL en una cámara a -20°C.

3.2. Líneas celulares

3.2.1. La línea celular HEK293T

La línea celular HEK293T se eligió para realizar el silenciamiento del gen AIFL humano a través de la técnica CRISPR/Cas9. Se trata de una línea celular con una elevada eficiencia de transfección, derivada de células embrionarias humanas de riñón que contienen el antígeno T del poliomavirus SV40. La presencia de este antígeno le otorga la capacidad de replicar vectores que contengan el origen de replicación SV40. Su morfología característica es de tipo epitelial y son ligeramente adherentes, creciendo en monocapa. Exceptuando protocolos que indiquen lo contrario, se cultivan en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) completo (ver anexo IV).¹⁸

3.2.2. Establecimiento y mantenimiento de la línea celular

Una alícuota de 1 mL de la línea celular HEK293T, almacenada en nitrógeno líquido, se descongeló en un baño termostático a 37°C y se transfirió a un tubo tipo Falcon de 15 mL. Seguidamente se añadieron 5 mL de medio DMEM completo y se centrifugó 5 minutos a 500 g. El sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió en 1 mL de medio nuevo, eliminando así el crioprotector tóxico (DMSO). Tras esto el mililitro de cultivo se transfirió a un frasco de cultivo de 25 cm², y se completó hasta un volumen final de 5 mL con más medio.

El cultivo se mantuvo de forma continua a 37°C con un 5% de CO₂ en atmósfera humidificada en un incubador (*Incubator Barnstead Lab-Line*). Se manipuló siempre en condiciones de esterilidad, en el interior de una campana de flujo laminar vertical (*Telstar PV-30/70*) para evitar posibles contaminaciones. El seguimiento del cultivo se realizó mediante observación al microscopio óptico, evaluando la morfología y el porcentaje de confluencia. Cuando este porcentaje era mayor de un 80%, aproximadamente, se realizaba un pase al cultivo diluyéndolo tres o cuatro veces.

Dado que la línea celular HEK293T es ligeramente adherente, las células debían ser previamente tripsinizadas para poder realizar el pase. Se emplearon 2 mL de tripsina para los frascos de 25 cm² y 5 mL para los de 75 cm². Tras una incubación de 5 minutos a 37°C, las células despegadas se transferían a un recipiente nuevo. Se transfería un volumen determinado de cultivo según la dilución deseada. Finalmente, para la determinación de la cantidad de células en el cultivo se empleó un contador celular portátil (*Scepter*, Millipore) partiendo de alícuotas de 1 mL del cultivo tripsinizado.

3.2.3. Transfección

3.2.3.1. Transfección directa

En primer lugar, las células HEK293T se prepararon para la transfección: en una placa de 24 pocillos se completaron tres filas de cultivo con diferentes porcentajes de confluencia (50%, 20% y 10%), determinando previamente la cantidad de células con el contador celular portátil. Una incubación de entre 16 y 24 horas permitió que las células se asentaran y comenzaran a crecer. Visualizando los pocillos al microscopio, se estableció el porcentaje de confluencia sobre el que se quería trabajar. Finalmente, se realizó la transfección siguiendo el protocolo de GeneJuice (Novagen). Las células transfectadas se incubaron 48h a 37°C en el incubador.

3.2.3.2. Transfección reversa

En primer lugar, el cultivo de HEK293T se tripsinizó, previa aspiración del medio, y se determinó su concentración celular. De esta forma se pudo calcular el volumen necesario a sembrar en un pocillo de una placa de 24 para obtener un porcentaje de confluencia del 50% (equivalente a 2×10^5 células en 2 cm²). Se preparó la mezcla de transfección en un tubo de 1,5 mL. Se mezclaron 1,5 µL de

GeneJuice con 16,5 μL de OptiMem y se incubó a temperatura ambiente 5 minutos. A continuación se añadió un volumen de vector que contuviera 500 ng de DNA plasmídico y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se transfirió a la placa de 24 pocillos, 20 μL por pocillo. Las células HEK293T se añadieron encima de la mezcla de transfección. La placa se incubó a 37°C.

3.2.4. Preparación de stocks con DMSO y criopreservación

Cuando el cultivo de células HEK293T salvajes o transfectadas había alcanzado la confluencia en un frasco de cultivo de 75 cm^2 , se prepararon stocks con DMSO para criopreservar los cultivos. Previa aspiración del medio, se añadieron 5 mL de tripsina y se incubó 5 minutos a 37°C. En un tubo tipo Falcon de 15 mL se añadieron 10 mL de medio nuevo y se traspasó el cultivo tripsinizado, resuspendiendo las células. Se centrifugó 5 minutos a 500 g, se desechó el sobrenadante y se añadieron 4 mL de medio nuevo.

Una alícuota de 1 mL se transfirió a un tubo de 1,5 mL. Por medio de una centrífuga pequeña, se obtuvo el pellet de células. El sobrenadante se aspiró y la alícuota se conservó a -80°C en un congelador. El pellet celular se utilizó para extraer el DNA genómico y, posteriormente, se analizó por PCR para determinar si la transfección había tenido lugar correctamente. A los 3 mL de cultivo restantes se les añadieron 330 μL de DMSO, lentamente y agitando para minimizar el efecto tóxico sobre las células. Se transfirió 1 mL de cultivo con DMSO a cada uno de tres crioviales, que se congelaron durante una noche en el congelador a -80°C en un contenedor con isopropanol. Este compuesto permite una congelación lenta de aproximadamente 1 grado por minuto, minimizando efectivamente la formación de cristales de agua que podrían lisar las células. Finalmente los tubos se transfirieron a un contenedor de nitrógeno líquido para conservar el cultivo indefinidamente.

3.2.5. Diluciones seriadas

Se realizaron diluciones seriadas 1:10 del cultivo HEK293T transfectado para poder seleccionar clones individuales. Se añadieron 10 mL de medio DMEM completo en una placa Petri (dilución 1:10) y 9 mL de medio en cuatro placas más (1:10², 1:10³, 1:10⁴ y 1:10⁵). Para realizar la primera dilución se pipetearon 200 μL de cultivo en la primera placa. Se mezcló para homogeneizar, se tomó 1 mL de medio con cultivo de la primera placa y se transfirió a la segunda placa (dilución 1:10²), de nuevo mezclando bien. Este paso se repitió para cada placa hasta haber obtenido las cinco diluciones.

3.2.6. Selección de clones por el método de los cilindros

Se llevó a cabo la selección de clones individuales del cultivo transfectado para realizar posteriormente un estudio más detallado de su morfología y metabolismo. Se eligió una placa Petri de las diluciones seriadas con clones individuales separados de un tamaño mediano (que ocuparan gran parte del campo visual al microscopio). A continuación, con ayuda de unas pinzas esterilizadas se cogieron quince cilindros uno a uno y se colocaron encima de quince clones, rodeándolos. Estos cilindros llevan silicona en su parte inferior, asegurando un cierre hermético en el fondo de la placa. Seguidamente se añadieron 50 μL de tripsina a cada cilindro y se incubó durante 5 minutos a 37°C. Mientras tanto, en una placa de 24 pocillos se añadieron 500 μL de medio DMEM completo en quince pocillos. Comprobando al microscopio que las células se habían tripsinizado correctamente, se realizó el traspase de los 50 μL de cultivo tripsinizado a cada uno de los quince pocillos.

3.2.7. Traspase

3.2.7.1. Traspase a frasco de cultivo de 25 cm^2

Las células transfectadas fueron traspasadas de los pocillos de la placa de 24 a frascos individuales de 25 cm^2 cuando alcanzaron la confluencia, aumentando así la superficie disponible para su

crecimiento. Para ello, el medio del pocillo se aspiró y se tripsinizaron las células con 200 µL de tripsina, incubando 5 minutos a 37°C. En un frasco nuevo de 25 cm² se añadieron 5 mL de medio DMEM completo, y a continuación se pasaron los 200 µL de cultivo tripsinizado del pocillo.

3.2.7.2. Traspase a frasco de cultivo de 75cm²

Cuando las células habían alcanzado la confluencia en los frascos de 25 cm², se realizó un traspase a frascos de 75 cm². El medio se aspiró y se tripsinizaron las células con 2 mL de tripsina, incubando 5 minutos a 37°C. En un frasco nuevo de 75 cm² se añadieron 13 mL de medio DMEM completo, y sobre este se pasaron los 2 mL de cultivo tripsinizado del frasco de 25 cm².

3.2.8. Aislamiento de DNA genómico

Se traspasaron 800 µL de la alícuota de cultivo transfectado conservado previamente a -80°C a un tubo de 1,5 mL. El tubo se centrifugó 5 minutos a 300 g para obtener el pellet de células, desechando el sobrenadante. A continuación se resuspendió el pellet en PBS hasta un volumen final de 200 µL y se siguió el protocolo de aislamiento de DNA genómico (*Blood Genomic DNA Extraction MiniKit*) de Favorgen. El DNA genómico eluido (volumen final 200 µL) se conservó a -20°C en una cámara fría.

3.3. CRISPR/Cas9

3.3.1. Obtención del plásmido pX335

Como vector de clonación para los gRNA se empleó el plásmido pX335 (*Addgene plasmid #42335*), un vector para la expresión proteica en mamíferos que contiene el gen de la nickasa Cas9(D10A) de *S. pyogenes* con codones optimizados para su expresión en humanos, y una secuencia de gRNA denominada *scaffold* que reconoce la nickasa. Adicionalmente cuenta con un gen marcador de resistencia a ampicilina y un origen de replicación en bacterias, ya que es un vector tipo pUC (*fig. 7*).

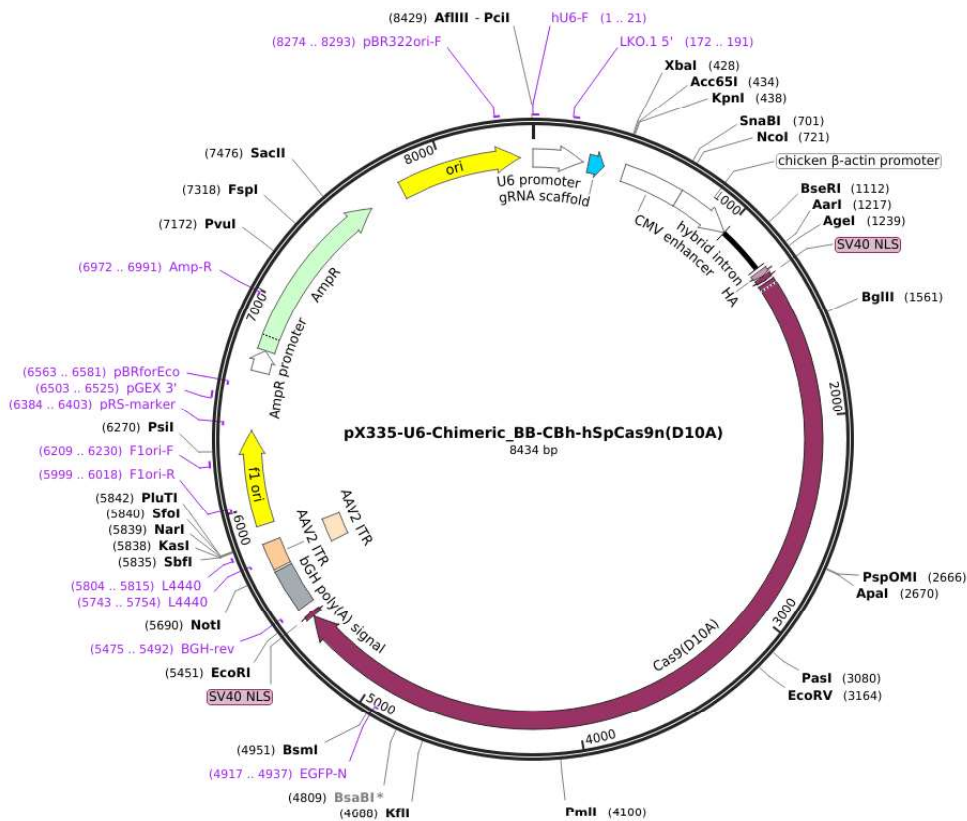


Figura 7. Esquema del plásmido pX335, vector de expresión en mamíferos que contiene el gen de la nickasa SpCas9, el gRNA scaffold, un gen marcador de resistencia a ampicilina y un origen de replicación bacteriano.

El plásmido pX335 cuenta con dos sitios de restricción de la endonucleasa *BbsI* (fig. 8), una enzima de tipo *homing* que corta a cuatro nucleótidos de su secuencia de reconocimiento. Estas secuencias de cuatro nucleótidos, que quedarán como extremos cohesivos tras el corte, son distintas entre sí, por lo que permite el clonaje direccional. El inserto se introduce entre esos dos sitios de corte.

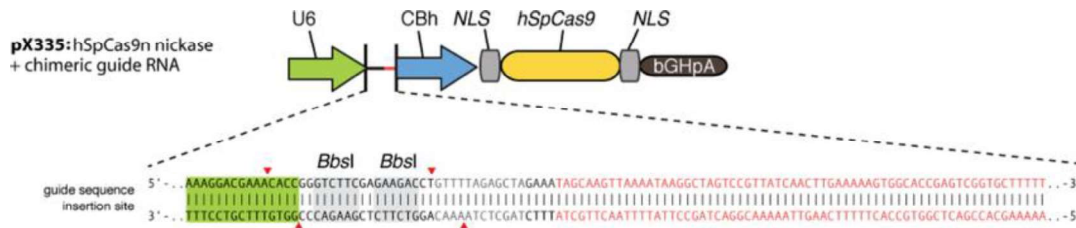


Figura 8. Esquema de los sitios de corte *BbsI* del plásmido pX335. Los sitios de corte se indican con flechas rojas, y las regiones reconocidas por la enzima se muestran marcadas en gris.

3.3.2. Diseño de los oligonucleótidos gRNA

Para diseñar los oligonucleótidos (de aquí en adelante "oligos") que van a codificar los gRNAs y guiar a la nickasa *SpCas9*(D10A) al gen de interés, se debieron cumplir varios requisitos: la secuencia debía contener una región completamente homóloga al gen de interés de al menos 20 nucleótidos de longitud, esta debía estar precedida por la secuencia PAM (NGG) para su correcto reconocimiento por la nickasa, y como primer nucleótido se debía encontrar una guanina para mejorar la eficiencia de la transcripción. Adicionalmente, la secuencia de los oligos debía estar flanqueada por los extremos cohesivos producidos por la enzima *BbsI* en el vector pX335 para su clonaje posterior.

Con el objetivo de aumentar la especificidad del silenciamiento se diseñaron dos gRNAs diferentes (gRNA1 y gRNA2) para dirigir a la nickasa. El oligo gRNA1 debía tener la misma secuencia que la hebra inferior del gen *aifm3*, mientras que el gRNA2 debía ser reverso y complementario a la misma. El mecanismo de acción de la enzima se muestra en la figura 9.

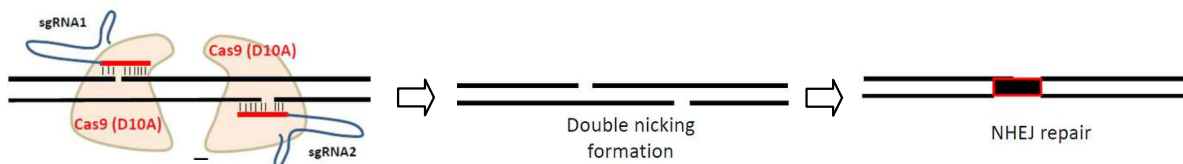


Figura 9. Mecanismo de acción de la nickasa *Cas9*(D10A) de *S. pyogenes*. La enzima es dirigida por dos gRNAs (gRNA1 reconoce la región upstream del gen y gRNA2 reconoce la región downstream), produciendo dos cortes de hebra sencilla que son reparados por la célula, resultando en el silenciamiento del gen.

Además, se diseñaron oligos complementarios a los gRNAs (KO-AIFM3-UPrv y KO-AIFM3-DWNrv) para el clonaje en el vector. El diseño se llevó a cabo con el programa Vector NTI (Informax/Invitrogen). La secuencia de los dos gRNAs y sus complementarios se ven en la figura 10.

gRNA1 GCCTGCCGGCCATCCTCAGC

Oligos para el clonaje pX335/*BbsI*: **KO-AIFL-UPfw** 5'-CACCGCTGAGGATGGCCGGCAGGC-3'

KO-AIFL-UPrv 3'-CGACTCTACCGCCGCTCCGCAAA-5'

gRNA2 GGCTTCTCCAAACCCAAACC

Oligos para el clonaje pX335/*BbsI*: **KO-AIFL-DWNfw** 5'-CACCGCTGAGGATGGCCGGCAGGC-3'

KO-AIFL-DWNrv 3'-CCGAAGAGGTTTGGGTTTGCAAA-5'

Figura 10. Secuencias de los gRNAs diseñados, y los oligos directo (fw) y reverso (rv) para su clonaje en el plásmido de expresión pX335. El vector pX335 contiene el gen de la nickasa *Cas9*D10A, que será guiada por los gRNAs para producir el silenciamiento del gen diana *aifm3*. Los extremos cohesivos al vector pX335 digerido con la enzima *BbsI* aparecen subrayados. En rojo se muestra el primer nucleótido de los oligos (G).

3.3.3. Anillamiento de los oligonucleótidos

Los oligos fueron sintetizados como DNA de cadena sencilla por la empresa Invitrogen, por lo que debieron ser anillados para poder, posteriormente, ligarlos con el plásmido pX335 linearizado. Se diluyeron en tampón TE (Tris-EDTA) hasta una concentración de 100 μ M. Se traspasaron 3 μ L de cada pareja de oligos complementarios a dos tubos de 1,5 mL y se añadieron 44 μ L de TE/NaCl 50 mM. Tras esto se hirvieron las muestras a 100°C en un vaso de precipitados. Se dejó el agua enfriar hasta temperatura ambiente, y finalmente se conservaron las muestras a -20°C en una cámara fría.

3.4. Ligación

Para ligar un vector linearizado con los oligos anillados o un inserto, se añadieron los siguientes componentes a un tubo de 1,5 mL: 25 ng de vector y 75 ng de inserto en el volumen correspondiente según su concentración (conservando siempre la proporción 1:3), 1 μ L de T₄ DNA ligasa, 4 μ L de tampón de ligasa 5x, y agua hasta un volumen final de 20 μ L. Se incubó durante una noche a 4°C o, muy excepcionalmente, 5 minutos a temperatura ambiente.

3.5. Digestión

Para realizar la digestión de vectores e insertos, en primer lugar se preparó una mezcla de digestión que contenía: 3 μ L de un tampón apropiado para la pareja de enzimas de restricción elegidas (encontrado a través de la herramienta online *Double Digest Finder*¹⁹ de Biolabs Inc.) y el volumen correspondiente a 5 unidades de cada enzima. Seguidamente se añadió un volumen de muestra que contuviese aproximadamente 250 ng de DNA y se rellenó hasta un volumen final de 30 μ L con agua. Se incubó 2 horas a 37°C en un baño termostatzado.

3.6. Electroforesis

3.6.1. Electroforesis horizontal en gel de agarosa

En primer lugar, se calentó una solución de agarosa (de la concentración necesaria según el tamaño del fragmento de DNA de interés) en un microondas a alta intensidad durante cortos periodos de tiempo (30 s – 1 min) para evitar la formación de espuma. Se dejó enfriar ligeramente y a continuación se vertió el volumen necesario para preparar un gel único (30 mL) o doble (50 mL) en un tubo tipo Falcon de 50 mL. Seguidamente se añadieron 2,5 μ L o 4 μ L de SybrSafe y se mezcló rápidamente. La solución se vertió sobre un soporte para gel único o gel doble de electroforesis previamente preparado y se dejó solidificar. Mientras tanto se añadió el volumen necesario de tampón de carga 6x (*ver composición en anexo IV*) a las muestras a cargar en un tubo de 1,5 mL. Se cargaron 10 μ L de patrón de peso molecular 1 Kb y un máximo de 30 μ L de muestra. El gel se corrió durante 1 hora a 80 voltios (o excepcionalmente el tiempo que fuese necesario para separar la banda de interés). Tras esto el patrón de bandas de cada muestra pudo ser visualizado bajo luz azul.

3.6.1.1. Purificación de DNA del gel de electroforesis

Con el objetivo de obtener el DNA purificado del gel de agarosa se siguió el siguiente procedimiento: usando gafas de protección, bajo la luz azul se delimitó con un bisturí el área donde se encontraba la banda correspondiente a la muestra deseada. Seguidamente se extrajo con ayuda del bisturí el fragmento de gel previamente delimitado. Éste se transfirió a un tubo de 1,5 mL. En una balanza, habiendo tarado previamente con un tubo vacío, se pesó el fragmento de gel. Tras esto se calculó el volumen necesario de tampón NTI para disolver el fragmento, de acuerdo con el protocolo de

purificación de DNA de gel de electroforesis de Macherey-Nagel (200 µL de tampón por cada 100 mg de gel). Siguiendo los pasos del protocolo se purificó la muestra de DNA del fragmento de gel.

3.6.2. Electroforesis vertical en gel de poliacrilamida

Con el objeto de demostrar que la inducción con IPTG había dado lugar a la sobreexpresión de la proteína, se realizó una electroforesis vertical en un gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE). Éste consta de una parte superior conocida como "gel concentrador", con poliacrilamida al 4%, y una parte inferior llamada "gel separador", con poliacrilamida al 10% (determinado por el tamaño de la proteína a separar). El gel se cargó con 20 µL de la fracción proteica del cultivo inducido sin diluir y diluido 1:2 (10 µL de muestra con 10 µL de tampón de carga (*ver composición en el anexo IV*)), y con 5 µL de patrón molecular *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific). Se corrió 50 minutos a 180 voltios en tampón separador (*ver composición en el anexo IV*).

3.6.2.1. Lisis del cultivo inducido para analizar las proteínas

Para analizar las proteínas del cultivo inducido, el pellet de células que se había obtenido previamente (*ver apartado 3.12.*) se resuspendió en 100 µL de tampón de carga. Se pipeteó y vortexó la muestra hasta que esta perdió la viscosidad. A continuación las muestras se sonicaron (sonicador Vibra-Cell, Sonics & Materials, Newtown, CT, USA) mediante dos ciclos de 5 minutos con 5 minutos de descanso en medio, en agua con hielo a 4°C para reducir el sobrecalentamiento. Finalmente se hirvieron a 100°C durante 5 minutos.

3.7. Tinción con Coomassie

Con ayuda de una espátula, se extrajo el gel del soporte para electroforesis vertical y se colocó en un recipiente con solución colorante (*ver composición en el anexo IV*) hasta que se pudieron apreciar las bandas. Tras esto se descartó el líquido, se lavó con agua destilada y se añadió la solución decolorante (*ver composición en el anexo IV*). Esta se renovó cada 10 minutos hasta que la banda de interés se pudo distinguir con claridad.

3.8. Electrotransferencia

Con el propósito de realizar un *Western Blot* con anticuerpo anti cola de histidinas para demostrar que la sobreexpresión de AIFL se había producido correctamente tras su inducción con IPTG, se llevó a cabo una electrotransferencia. Las proteínas separadas mediante una electroforesis vertical en gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) a 4°C durante 70 minutos a 100 V. La temperatura se mantuvo homogénea añadiendo un núcleo magnético y colocando la cubeta de electroforesis sobre un agitador magnético. La electrotransferencia se realizó en tampón de transferencia (*ver composición en el anexo IV*).

3.9. Western Blot y revelado

Tras haber realizado la electrotransferencia, se extrajo la membrana y se colocó en un recipiente con PBST (tampón de fosfato salino con 0.5% Tween 20) con 0.1% de BSA (albumina de suero bovino). Cuando se había empapado bien la membrana, se retiró el líquido y se añadió PBST con 5% de BSA. La membrana se bloqueó durante 1 hora con esta solución, a temperatura ambiente en un balancín. Tras esto se añadió el anticuerpo primario anti cola de histidinas (de GenScript, cedido por el grupo de Ramón Hurtado) diluido 1:1000 (3 µL en 3 mL) y se incubó durante una noche a 4°C. Transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados consecutivos de 5 minutos con PBS y se añadió el anticuerpo secundario anti-*mouse*-HRP (peroxidasa del rábano picante de ratón, Cell Signaling Technology)

diluido 1:10.000, con el que se incubó durante 1 hora. Finalmente se repitieron los tres lavados de 5 minutos con PBS. La señal de la membrana se usó para impresionar una película fotosensible que luego se reveló (*enhanced chemiluminescence, ECL*).

3.10. Secuenciación

Con el objeto de comprobar que las muestras de DNA aisladas de forma independiente mediante electroforesis se correspondían con lo esperado, estas se enviaron a secuenciar a la empresa Sistemas Genómicos (Paterna, Valencia) siguiendo las instrucciones indicadas en el formulario de solicitud de secuenciación analítica²⁰. El DNA se cuantificó previamente para determinar el volumen que contenía la cantidad establecida por el protocolo (aproximadamente 100 ng). El cebador se diluyó, en caso de ser necesario, hasta una concentración de 1 μ M.

3.11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En primer lugar se cuantificó el DNA de las muestras y, en caso de que fuera necesario, se diluyeron con agua milliQ hasta una concentración final de 100 ng/ μ L. Similarmente, los cebadores sintéticos (directo: 5'-TAAGACTCTTTCCGAAGCTCCCA-3' y reverso: 5'-AACATTCCGAGCGGGTTCTT-3') se diluyeron hasta una concentración de 10 μ M. A continuación se preparó la mezcla para todas las reacciones de PCR, multiplicando el volumen necesario para cada una por el número de muestras y sumando el de una muestra adicional (como margen de error): 12,5 μ L de *Taq Master Mix 5x* de Bioron (que contiene la enzima termorresistente Taq DNA polimerasa), 1,25 μ L de DMSO, 5,25 μ L de agua milliQ y 2,5 μ L de cada cebador (directo y reverso). En un tubo para PCR se añadieron 24 μ L de esta mezcla y 1 μ L de muestra. Se añadió DMSO para favorecer la desnaturalización del DNA, especialmente de las regiones ricas en guanina y citosina. La PCR se realizó en un termociclador *Minicycler MJ Research*, tomando como temperatura media el valor indicado por el proveedor de los oligos para una concentración de ión sodio de 50 mM. Se realizó una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido de cuarenta ciclos de: 10 s de desnaturalización a 94°C, 20 s de hibridación a 54°C, y 45 s de extensión a 72°C (dado que la longitud del fragmento a amplificar es de 403 pb). Las muestras se mezclaron con 5 μ L de tampón de carga y se corrieron en un gel de agarosa al 2% a 75 V durante 45 minutos. Los patrones de bandas se visualizaron bajo luz azul.

3.12. Inducción con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)

Como paso previo al procedimiento, se inoculó 1 mL del cultivo transformado y seleccionado en 9 mL de medio LB con kanamicina (1000x). Todo el procedimiento se realizó por duplicado, para poder comparar una muestra considerada positiva (inducida) con una negativa (sin inducir). Los cultivos se incubaron a 37°C y 220 rpm en un agitador orbital hasta una densidad óptica a 600 nm de 0.6 (máximo 0.8), midiendo la absorbancia cada 15-30 minutos con un espectrofotómetro (*Amersham Biosciences ultrospec 6300 pro*). Se tomó como referencia medio LB. Para realizar la posterior inducción, durante la incubación de los cultivos se preparó 1mL de IPTG a 100 mM. Cuando los cultivos habían alcanzado la densidad óptica deseada, a las muestras rotuladas como positivas (inducidas) se les añadieron 10 μ L de IPTG por cada mililitro de cultivo (30 μ L en 3 mL) hasta una concentración final de 1 mM. A las muestras rotuladas como negativas (sin inducir) no se les añadió IPTG. La inducción se produjo durante 3 horas a 37°C y 220 rpm en el agitador orbital. Finalmente se traspasaron 200 μ L de cada cultivo a un tubo de 1,5 mL, se centrifugó brevemente, se desechó el sobrenadante y se conservó el pellet a -20°C.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

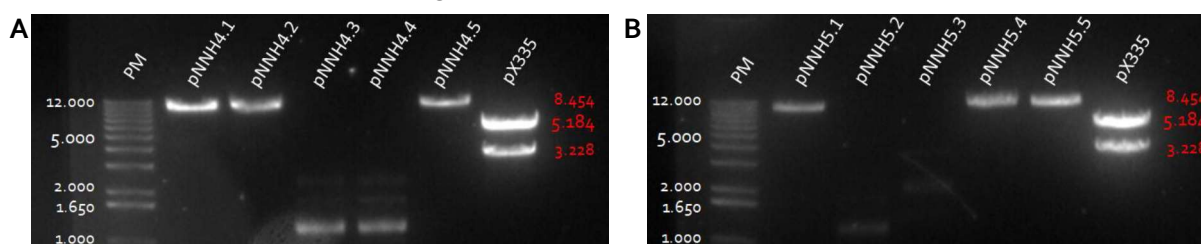
4.1. Silenciamiento del gen *aifm3* mediante la técnica CRISPR/Cas9

El hecho de que la expresión del gen *aifm3* sea prácticamente ubicua en todos los tejidos humanos da pie a la hipótesis de que la proteína que codifica, AIFL, posee una función basal constitutiva e incluso potencialmente vital para la supervivencia celular⁸. Con el objetivo de demostrar o refutar esta hipótesis, se llevó a cabo el silenciamiento del gen en células HEK293T por medio de la técnica de modificación del genoma CRISPR/Cas9. Esta técnica permitió eliminar el inicio de la traducción del gen *aifm3*, impidiendo consecuentemente la expresión de AIFL.

En primer lugar se diseñaron los oligos que iban a ejercer como gRNAs (gRNA₁ y gRNA₂), se insertaron en vectores pX335 (que contienen el gen D10A de la Cas9) y se amplificaron en la cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3). Tras haber purificado el DNA plasmídico se realizó la co-transfección de células HEK293T, dando lugar a la eliminación del gen *aifm3* por acción del sistema CRISPR/Cas9. Los clones positivos fueron seleccionados y conservados para la posterior evaluación de los efectos del silenciamiento. El anexo V muestra un esquema de los pasos, detallados a continuación.

4.1.1. Diseño de los gRNAs, ligación, transformación y selección de colonias

Los oligos diseñados (KO-AIFL-UP y KO-AIFL-DWN) se insertaron en plásmidos pX335 linearizados con *BbsI*, aprovechando que habían sido diseñados con extremos complementarios al vector linearizado. El sitio de corte de la enzima es independiente de su secuencia de reconocimiento, lo que permite diseñar extremos con secuencias diferentes y asegurar que se produce un clonaje direccional (*ver apartado 3.3.2.*). Los productos de la ligación, pNNH₄ y pNNH₅ respectivamente, se usaron para transformar bacterias *E. coli* BL21 (DE3) para su amplificación (la intención era utilizar la cepa DH5 α , pero en el laboratorio se habían rotulado por equivocación las BL21 como DH5 α). La selección de las colonias transformadas se realizó en medio LB con ampicilina, aprovechando la presencia del gen de la β -lactamasa en el vector. Sin embargo, esta selección no permitía discriminar las colonias deseadas de las potencialmente transformadas con el vector pX335 recircularizado, por lo que se seleccionaron al azar cinco colonias de cada placa (pNNH₄.1-pNNH₄.5 y pNNH₅.1-pNNH₅.5). Para comprobar que las colonias habían incorporado el plásmido con el inserto, se extrajo el DNA plasmídico, se digirió con las enzimas *EcoRI* y *BbsI* para obtener un patrón de corte diferencial, y se corrió una electroforesis (*fig. 11*). El plásmido pX335 se digirió y corrió en paralelo, actuando como control negativo.



De haberse producido la recircularización de pX335, la digestión con *BbsI* y *EcoRI* daría lugar a dos fragmentos de 3228 y 5184 pb. Esto se debe a que *BbsI* tiene dos sitios de corte (en las posiciones 245 y 267) tan cercanos que a efectos prácticos pueden considerarse como un sitio único (ya que el

fragmento liberado es muy pequeño) y *EcoRI* posee un sitio único (en la posición 5451). La introducción del inserto, en contraposición, habría destruido el sitio de corte de la *BbsI*, resultando en la linearización del vector tras su digestión y produciendo así una única banda a 8454 pb. Esto se debe a que el vector pX335 posee 8434 pb, que sumando los 20 pb del gRNA insertado da un total de 8454 pb. En la figura 11 se puede apreciar que efectivamente el plásmido pX335 digerido da lugar a dos bandas a 3228 y 5184 pb, claramente distinguibles de la banda única a 8454pb que se corresponde con los productos de ligación linearizados. Esto permitió concluir que existía una alta probabilidad de que las colonias 1, 2 y 5 transformadas con pNNH4, y las colonias 1, 4 y 5 transformadas con pNNH5 hubieran incorporado los productos de ligación.

Como método adicional de comprobación se envió a secuenciar el DNA plasmídico de las colonias supuestas como positivas (1, 2 y 5 para pNNH4, y 1, 4 y 5 para pNNH5). El DNA se cuantificó previamente: pNNH4.1 = 293,5 ng/μL; pNNH4.2 = 304,5 ng/μL; pNNH4.5 = 357,0 ng/μL; pNNH5.1 = 221,5 ng/μL; pNNH5.4 = 248,5 ng/μL; pNNH5.5 = 267,5 ng/μL. Los valores de las relaciones A260/A280 y A260/A230 se mantuvieron en torno a 1,8 y 2,2 respectivamente, indicando la ausencia de contaminación proteica y salina. Se tomaron 3 μL de cada muestra y 3,5 μL del cebador LKO.1 5' (concentración = 1 μM, Addgene). Este cebador es complementario al promotor U6 humano, presente en el vector pX335, por lo que actúa como cebador directo en la secuenciación.

Las secuencias se alinearon con sus respectivos insertos (*ver anexo VI*), lo que permitió confirmar que todas las colonias seleccionadas habían incorporado el plásmido con el inserto integrado, exceptuando pNNH5.4 que carecía de un nucleótido. Consecuentemente, se procedió a seleccionar una muestra válida de cada vector purificado (pNNH4.1 y pNNH5.5) para la co-transfección.

4.1.2. Co-transfección de células HEK293T y selección de clones

Las muestras pNNH4.1 y pNNH5.5 se emplearon para co-transfectar células HEK293T. Como ya se ha indicado, es necesario que las células incorporen los dos gRNAs (además de la proteína Cas9(D10A)), cada uno codificado en un plásmido pX335, para garantizar el correcto funcionamiento del sistema de las nickasas. Los clones positivos, en los que había tenido lugar el silenciamiento del gen *aifm3* por el sistema CRISPR/Cas9, se seleccionaron para el posterior estudio de los efectos fenotípicos y metabólicos del silenciamiento. Para ello se realizó una transfección reversa con GeneJuice en medio OptiMem, favoreciendo la formación de liposomas para transportar el DNA plasmídico al interior celular. Cuando el *pool* de células co-transfectadas alcanzó la confluencia, se realizaron cinco diluciones seriadas 1:10 en placas de Petri. Esto permitió aislar quince clones individuales con cilindros de clonaje, que se traspararon a una placa de 24 pocillos para el estudio separado de sus características.

Dadas las condiciones de la co-transfección, el *pool* contiene potencialmente tres tipos diferentes de clones: una mayoría que ha permanecido salvaje, los que se han transfectado con un único plásmido, y una minoría que ha incorporado ambos. Teóricamente, ya que se necesitan ambos gRNAs y la nickasa para el correcto funcionamiento del sistema, el silenciamiento del gen *aifm3* se debería haber producido únicamente en este último grupo. Para discriminar aquellos clones que no habían sido co-transfectados y seleccionar los positivos, se extrajo el DNA genómico de aquellos clones que habían alcanzado la confluencia (algunos clones no crecieron, posiblemente debido a un error técnico en la selección de los mismos (*ver apartado 3.2.6.*)) y se llevó a cabo una PCR con cebadores situados a ambos lados de la secuencia diana del sistema CRISPR/Cas9. En paralelo, se extrajo y amplificó el DNA genómico de la línea celular salvaje para emplearlo como control negativo.

Con los productos de la amplificación se corrió una electroforesis en agarosa 1%, permitiendo visualizar el patrón de bandas obtenido para cada clon y para la línea celular salvaje (*fig. 12*). Los cebadores amplifican una región del gen *aifm3* salvaje de aproximadamente 400 pb, entre los que se encuentran las secuencias diana de las nickasas (separadas por unas 50 pb, la región delecionada). La presencia de una banda a esta altura indicaría que no se ha producido la edición genómica y la secuencia diana ha permanecido intacta (y por lo tanto también el gen).

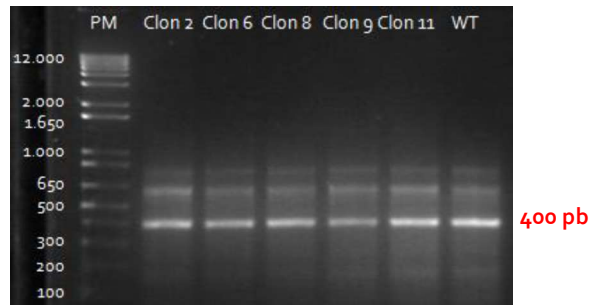


Figura 12. Electroforesis de los productos de amplificación del DNA genómico de los clones 2, 6, 8, 9 y 11 seleccionados tras la co-transfección de células HEK293T con pNNH4 y pNNH5, y de la línea celular salvaje. De izquierda a derecha: el patrón de peso molecular (tamaños indicados a la izquierda en pares de bases) y los productos de la amplificación del DNA genómico de los clones 2, 6, 8, 9 y 11, y de la línea celular salvaje HEK293T. La presencia de una banda a 400 pb indica que ninguno de los clones es positivo (la nickasa no ha eliminado el fragmento diana de 50 pb que hubiera silenciado el gen *aifm3*).

Esto podría confirmarse comparando con el patrón de bandas del control negativo. El producto de la PCR de los clones positivos, en los que sí se hubiera producido la eliminación de la secuencia diana, debería tener un tamaño de 350 pb, fácilmente distinguible del fragmento de 400 pb en un gel de agarosa a la concentración adecuada. La visualización de los patrones de bandas y su comparación con el control negativo confirmó que ninguno de los clones seleccionados había sufrido el silenciamiento del gen *aifm3*, ya que todos mostraban una banda que se corresponde con un tamaño de 400 pb (además de algunas bandas inespecíficas). Consecuentemente, se debería repetir la selección de clones del *pool* de células co-transfectadas, en busca de clones positivos en los que sí haya tenido lugar el silenciamiento del gen.

En resumen, se intentó realizar el silenciamiento del gen *aifm3* en células HEK293T mediante la co-transfección con vectores, previamente diseñados y producidos, que contenían los tres componentes necesarios para el funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9 elegido: los oligos gRNA1 y gRNA2, y la enzima nickasa. Tan sólo cinco de los quince clones aislados (los clones 2, 6, 8, 9 y 11) tras la co-transfección alcanzaron la confluencia, y de estos el 100% se confirmaron como negativos mediante la amplificación de la región diana de la nickasa. Un fallo técnico en el procedimiento de la co-transfección, que debería ser repetida para descartar esta posibilidad, podría ser causante de estos resultados. Sin embargo, el crecimiento ralentizado que mostraban los diez clones seleccionados que no llegaron a alcanzar la confluencia podría ser también indicativo de una potencial función vital de la proteína AIFL. Las células HEK293T poseen la particularidad de ser trisómicas (cuentan con tres copias de algunos cromosomas) por lo que podríamos suponer dos situaciones basadas en esta hipótesis: que la edición genómica haya tenido lugar de forma completa, dando lugar a células inviables; o de forma parcial, resultando en células heterocigotas (con dos alelos editados y uno salvaje, o viceversa) con un crecimiento ralentizado pero viables. Suponiendo que estos clones fueran efectivamente heterocigotos y, consecuentemente, que se

hubiese producido en ellos un silenciamiento parcial del gen *aifm3*, se podría hipotetizar que la ausencia de AIFL dificulta considerablemente el crecimiento celular. Esta hipótesis podría sustentar la teoría desarrollada por Xie *et al.* (2005) de que el factor AIFL posee una función constitutiva en la célula, necesaria para su supervivencia y correcto desarrollo. La obtención de clones positivos y el posterior estudio de su fenotipo y metabolismo podría finalmente confirmar o refutar esta hipótesis.

4.2. Sobreexpresión del gen *aifm3*

A pesar de estar clasificada dentro de la familia de proteínas del factor inductor de apoptosis (AIF), la relación de la proteína AIFL con este factor no parece significativa a nivel de secuencia ni función⁵. Los tres componentes de la familia (AIF, AMID y AIFL) comparten una hipotética actividad pro-apoptótica, pero la ausencia de un consenso dificulta relacionar esta función observada experimentalmente con la estructura de cada factor. El hecho de que la estructura de AIFL no haya sido resulta experimentalmente supone una complicación añadida.

Xie *et al.* demostraron en 2005 que la sobreexpresión del gen *aifm3* en células humanas inducía la muerte celular por apoptosis a través de una ruta aparentemente dependiente de caspasas⁸. No obstante, ningún otro grupo de investigación ha replicado el procedimiento para secundar estos resultados, lo que resta veracidad a la hipótesis funcional. Con el propósito de replicar el experimento realizado por el grupo de Qiang Xie para apoyar o rebatir los efectos observados, se diseñó un vector de expresión en eucariotas con el gen de la proteína AIFL con el que se procedió a transfectar células humanas de la línea celular salvaje HEK293T. Adicionalmente, se diseñó un vector de expresión en procariotas para sobreexpresar el factor en una cepa hiperproductora de *E. coli* BL21 (DE3). La transformación de la cepa bacteriana permitiría, tras una inducción de la sobreexpresión con IPTG, purificar la proteína para poder realizar un estudio más intensivo de sus propiedades funcionales y estructurales *in vitro*.

El anexo VII muestra un esquema del proceso, cuyos pasos se detallan a continuación.

4.2.1. Diseño del vector de clonaje y los vectores de expresión

El gen que codifica la proteína AIFL humana, denominado *aifm3*, fue sintetizado por la empresa GenScript y recibido como inserto en un vector pUC57. Dado que se deseaba sobreexpresar la proteína tanto en organismos procariotas como en eucariotas, los codones se optimizaron para *E. coli* y humano. La optimización fue llevada a cabo por la misma empresa. En el informe de optimización aportado (*ver anexo VIII*) se muestra un alineamiento de la secuencia original del gen humano con la secuencia optimizada. Las secuencias de nucleótidos son significativamente dispares después de la optimización pero se puede observar que las proteínas traducidas son idénticas.

La secuencia del gen *aifm3* humano se obtuvo de la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) a partir de la secuencia de mRNA de su primer transcripto (NM_144704.2), dado que ésta carece de las secuencias intrónicas que impedirían la correcta expresión del gen en organismos procariotas. El gen se localiza en el cromosoma 22 humano y posee un tamaño de aproximadamente 1.8 Kb desde el codón de inicio hasta el de terminación.

Los vectores de expresión elegidos, por su disponibilidad y fácil manejo, fueron pET28a(+) para la expresión en procariotas y pcDNA3.1(-) para la expresión en eucariotas. Con el objetivo de facilitar el clonaje posterior del gen en estos vectores, se añadieron cuatro sitios de restricción flanqueando la secuencia codificante. Las enzimas de restricción elegidas fueron *NheI*, *NcoI*, *NotI* y *EcoRI*.

Previamente se comprobó que la secuencia codificante carecía de sitios de restricción interiores para estas enzimas, visualizando la secuencia genética y sus sitios de corte con el programa *Vector NTI*.

Para clonar el gen en el vector pET28a(+) se eligieron las enzimas *NcoI* y *NotI*, dado que poseen sitios de restricción únicos en la secuencia del plásmido y no cortan la secuencia codificante del gen. El plásmido resultante se denominó pNNH1 (pET28a(+)-AIFL). El sitio *NcoI* [C|CATGG] se aprovechó como codón de inicio sin necesidad de realizar mutaciones en la secuencia original. El sitio *NotI* se añadió inmediatamente después del codón de terminación. El clonaje en el vector pcDNA3.1(-) se realizó con la pareja de enzimas *NheI-EcoRI*, añadiendo sus sitios de restricción inmediatamente antes y después, respectivamente, de los sitios de restricción *NcoI* y *NotI*. Estas enzimas también carecían de sitios internos en la secuencia codificante y poseían sitios únicos en el plásmido. El plásmido con inserto se denominó pNNH2 (pcDNA3.1(-)-AIFL).

Con el objetivo de facilitar el seguimiento y la purificación posteriores de la proteína, se decidió añadir una etiqueta a cada vector de expresión, colocada tras el extremo 5' del inserto (equivalente al carboxilo terminal de la proteína). Para el clonaje en procariontes se empleó una cola de histidinas, dado que su secuencia se encontraba ya en el vector pET28a(+) inmediatamente *downstream* del sitio de integración elegido. Para el clonaje en eucariotas, sin embargo, se eligió el monómero de la proteína fluorescente roja (*mRFP*). La secuencia del marcador *mRFP* no se encuentra en el vector pcDNA3.1(-), pero podía ser obtenida a partir de un clon pre-existente en el laboratorio donde se realizó este trabajo (pAOC2) e insertada tras el extremo C-terminal del inserto. La pareja de enzimas *EcoRI* y *HindIII* fue elegida para la extracción e integración del gen *mRFP*, aprovechando la presencia del sitio de restricción *EcoRI* en el plásmido pNNH2, formando el plásmido pNNH3 (pcDNA3.1(-)-AIFL-*mRFP*). Un nucleótido adicional (A) debió ser añadido delante del sitio de restricción *EcoRI* para mantener la pauta de lectura del *mRFP* proveniente de pAOC2. El anexo IX muestra una tabla con todos los vectores, y el anexo X recoge los mapas de los vectores diseñados con *Vector NTI*.

4.2.2. Transformación con pUC57 y selección de colonias

La cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) se transformó con el plásmido pUC57-AIFL sintetizado por GenScript. Las bacterias se cultivaron en medio LB con ampicilina, ya que el vector de tipo pUC contiene el gen de la β -lactamasa. La primera vez no se observó crecimiento por lo que el experimento tuvo que ser repetido. Dos colonias transformadas se seleccionaron y crecieron en cultivo líquido. Su DNA plasmídico se aisló y cuantificó: pUC57.1 = 47,0 ng/ μ L; pUC57.2 = 45,5 ng/ μ L.

4.2.3. Digestión y purificación del inserto, el vector de clonaje y los de expresión

Los vectores de expresión pET28a(+) y pcDNA3.1(-) se digirieron con las parejas de enzimas *NcoI-NotI* y *NheI-EcoRI* respectivamente. A su vez se digirió el plásmido pUC57 previamente aislado con ambas parejas de enzimas por separado, liberando el inserto *aifm3*. También se digirió el plásmido pAOC2 con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* para liberar el marcador *mRFP*. Dado que cada enzima muestra su actividad óptima en un tampón diferente, previamente se evaluó qué tampones emplear con cada pareja de enzimas (*tabla 1*) para mantener su actividad al máximo posible. Todas las enzimas pertenecían a la casa comercial New England BioLabs Inc.

Tabla 1. Enzimas empleadas para digerir los vectores de expresión y clonaje, tampones óptimos y tampones comunes elegidos para realizar cada digestión manteniendo la máxima actividad enzimática.

Pareja de enzimas	Tampones actividad óptima	Tampón elegido
<i>NcoI-NotI</i>	H	H
<i>NheI-EcoRI</i>	A, L o M	A, B o H
<i>EcoRI-HindIII</i>	A, B o H	B o L

Los productos de las digestiones se cargaron en un gel de agarosa 1% para su purificación por electroforesis. La tabla 2 recoge el tamaño de los insertos y vectores, su concentración y el volumen de muestra que fue digerido y cargado (aproximadamente 1 µg DNA). Los vectores pcDNA3.1(-) y pET28a(+) se diluyeron 1:2 en tampón de carga y se cargaron en dos pocillos (0,5 µg DNA/pocillo).

Tabla 2. *Tamaño, concentración y volumen de los vectores de clonaje y expresión, y de los insertos digeridos.*

Nombre	Tamaño [pb]	Concentración [ng/µL]	Volumen [µL]
AIFL	1839	47	21
pUC57	2710		
pET28a(+)	5369	58	17
pcDNA3.1(-)	5428	381	2,6
mRFP	678	81	12

El avance del frente se controló para garantizar que los fragmentos de tamaño más parecido (pUC57 y AIFL) se separaran correctamente sin que aquél de menor tamaño (*mRFP*) se saliese del gel. Transcurridos 45 minutos el gel fue visualizado bajo luz azul (*fig. 13*).

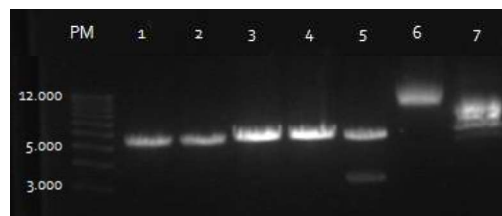


Figura 13. *Electroforesis con la digestión enzimática de los vectores de expresión y clonaje. De izquierda a derecha: patrón de peso molecular (PM), pET28a(+) NcoI-NotI (1 y 2), pcDNA3.1(-) NheI-EcoRI (3 y 4), pUC57 NcoI-NotI (5), pUC57 NheI-EcoRI (6) y pAOC2 EcoRI-HindIII (7).*

Sólo los productos de las digestiones enzimáticas de pET28a(+), pcDNA3.1(-) y pUC57 con la pareja de enzimas *NcoI-NotI* presentaron el patrón de bandas esperado. La digestión *NcoI-NotI* de pUC57 dio lugar a dos bandas, pero éstas no migraron a la velocidad correspondiente a su supuesto tamaño: la banda superior aparece a aproximadamente 5,3 Kb (ligeramente más avanzada que la banda de los vectores de expresión) y la inferior a 3 Kb. Sin embargo, pUC57 tiene un tamaño de 2,7 Kb y AIFL de 1,8 Kb. Esta incongruencia fue equívocamente obviada en un principio. Las bandas de interés, correspondientes supuestamente a los vectores purificados pET28a(+), pcDNA3.1(-) y al inserto AIFL con los extremos *NcoI-NotI*, fueron recortadas para extraer el DNA del gel.

Los patrones de bandas inesperados resultados de las digestiones de pUC57 con *NheI-EcoRI* y pAOC2 se consideraron efecto de la actividad estrella (corte en sitios inespecíficos) de la enzima que poseían en común (*EcoRI*) por lo que se procedió a repetir los experimentos con la versión de alta fidelidad de la enzima (*EcoRI High Fidelity*). Dado que la digestión de pcDNA3.1(-) también se había realizado con *EcoRI*, y ya que el fragmento comprendido entre los sitios de restricción posee un tamaño tan pequeño que su liberación no puede ser apreciada en el gel, se asumió que la banda observada contenía el vector circular y se decidió repetir también su digestión. Los tampones de digestión elegidos en esta ocasión se establecieron con la herramienta online *Double Digest Finder* de la empresa BioLabs: *CutSmart* para la pareja *NheI-EcoRI HF* y *NE 2.1* para *EcoRI HF-HindIII*.

Tras haber repetido las digestiones se procedió a cargar otro gel de agarosa 1% con las muestras digeridas. Junto a éstas se cargaron adicionalmente 5 µL de cada muestra extraída del gel anterior con 1 µL de tampón de carga para confirmar que el DNA se había purificado correctamente (*fig. 14*).

La presencia de una banda única en los pocillos cargados con una fracción de las muestras extraídas del gel de electroforesis anterior (*pocillos 1, 2 y 5, fig.14*) permitió confirmar que el DNA había sido

purificado adecuadamente. En el carril cargado con el producto de la digestión *EcoRI HF-HindIII* del plásmido pAOC2 (*pocillo 7, fig.14*) se observó *smearing* que fue postulado como consecuencia de una indeseada contaminación con DNAsa. La digestión del vector pUC57 con *NheI* y *EcoRI HF* dio lugar a una única banda con cierto *smearing*, sin liberación aparente de inserto (*pocillo 6, fig. 14*). La banda correspondiente al vector pcDNA3.1(-) nuevamente digerido sí apareció ligeramente más avanzada que la banda de vector purificado, por lo que se supuso que la digestión con la versión de alta fidelidad de la *EcoRI* había linearizado el vector apropiadamente.

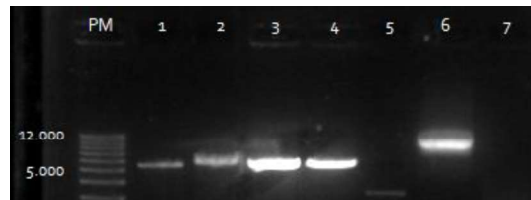


Figura 14. Electroforesis de las muestras digeridas con *EcoRI HF*. De izquierda a derecha: patrón de peso molecular (PM), pET28a(+) *NcoI-NotI* purificado (1), pcDNA3.1(-) *NheI-EcoRI* purificado (2), pcDNA3.1 *NheI-EcoRI HF* (3 y 4), pUC57 *NcoI-NotI* purificado (5), pUC57 *NheI-EcoRI HF* (6) y pAOC2 *EcoRI HF-HindIII* (7).

Bajo sospecha de que alguna de las enzimas implicadas podía estar contaminada o ser defectuosa, se repitió la digestión de pAOC2 bajo cuatro condiciones diferentes: en ausencia de enzimas (blanco), con *HindIII*, con *EcoRI HF*, y con ambas enzimas (*fig. 15*). La digestión de pUC57 con *NheI* y *EcoRI HF* también fue repetida para descartar la posibilidad de un fallo técnico en el procedimiento o el mal estado del plásmido sintético.



Figura 15. Electroforesis con pAOC2 digerido en cuatro condiciones diferentes para descartar la contaminación de alguna de las enzimas. De izquierda a derecha: patrón de peso molecular (PM), pAOC2 blanco (1), pAOC2 *HindIII* (2), pAOC2 *EcoRI HF* (3), pAOC2 *EcoRI HF-HindIII* (4) y pUC57 *NheI-EcoRI HF* (5).

Se observó *smearing* en todos los carriles cargados con las diferentes muestras digeridas de pAOC2, independientemente de la presencia de una u otra enzima, de ambas, o de su ausencia, por lo que se concluyó finalmente que el DNA plasmídico no se encontraba en buen estado o estaba erróneamente rotulado, y consecuentemente no podía ser empleado para extraer el gen del mRFP.

La repetida obtención de resultados inesperados, junto con la migración incongruente de los productos de la digestión *NcoI-NotI* de pUC57 observada en el primer gel de electroforesis (*fig. 13*), levantaron la sospecha de que se hubiese producido un fallo técnico en algún paso del procedimiento: concretamente, el intercambio de pUC57 por pX335, el vector empleado en la línea de investigación que se estaba realizando en paralelo (*ver apartado 4.1.*). Apoyando esta sospecha se encuentra el hecho de que la digestión hipotética (con el programa *Vector NTI*) de pX335 con *NcoI-NotI* libera dos fragmentos que coinciden en tamaño con los resultados observados.

Consecuentemente, se repitió la transformación con una nueva fracción del pUC57 sintetizado por GenScript. Tras la selección de colonias y el aislamiento del DNA plasmídico, se llevó a cabo la digestión con las dos parejas de enzimas establecidas inicialmente y se corrió una electroforesis a dos tiempos (*fig. 16*). Los patrones de bandas obtenidos sí se correspondieron con el tamaño esperado del inserto y el vector linearizado, confirmando que se había producido el intercambio.

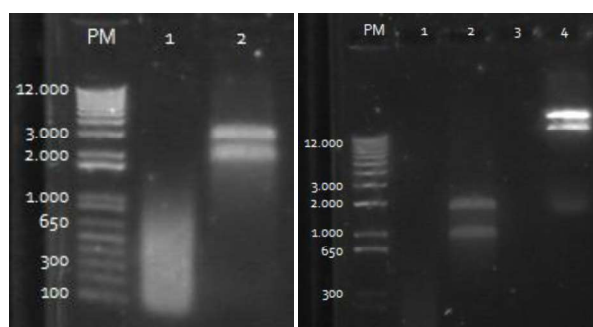


Figura 16. Electroforesis con los productos de la digestión de pUC57 a dos tiempos diferentes. Muestras: patrón de peso molecular (PM), pUC57 NcoI-NotI (1 y 4), pUC57 NheI-EcoRI HF (2). La muestra de pUC57 NcoI-NotI digerida se volvió a cargar al obtenerse un smearing, que se asumió efecto de un fallo técnico. En el carril 2 se observa la liberación del inserto AIFL (1,8 Kb). En la segunda electroforesis se observan dos bandas con una migración muy parecida, supuestamente pUC57 linearizado (2,7 Kb) y AIFL.

4.2.4. Integración del inserto AIFL en los vectores de expresión

El inserto AIFL con los extremos cohesivos NcoI-NotI y NheI-EcoRI se extrajo del gel de electroforesis (pocillos 2 y 4, fig. 16), se purificó y se ligó a los vectores linearizados pET28a(+) y pcDNA3.1(-) para formar pNNH1 y pNNH2. Se reservaron 10 µL de cada producto de ligación para transformar bacterias *E. coli* BL21 (DE3), y tras la selección de las colonias transformadas (en medio LB con kanamicina para pNNH1 o con ampicilina para pNNH2) se extrajo el DNA plasmídico, se digirió con las mismas parejas de enzimas (NcoI-NotI para pNNH1 y NheI-EcoRI para pNNH2) y se corrió un gel de electroforesis para comprobar que las ligaciones habían funcionado (fig. 17).

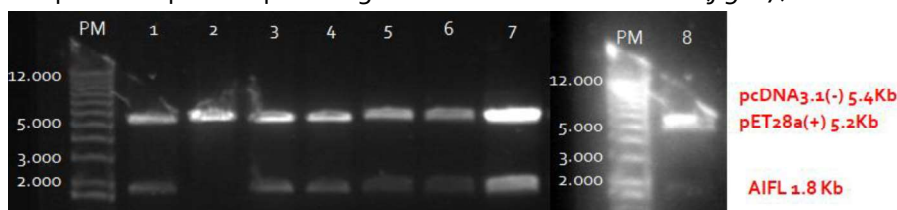


Figura 17. Electroforesis del DNA plasmídico aislado y digerido de las colonias transformadas con pNNH1 y pNNH2. De izquierda a derecha: patrón de peso molecular (PM), colonias transformadas con pNNH1 (1-4 y 8) o con pNNH2 (5-7). Se aprecia la liberación del inserto AIFL como una banda a 1,8 Kb y de los vectores pET28a(+) (1-4 y 8) y pcDNA3.1(-) (5-7) linearizados a aproximadamente 5,2 Kb y 5,4 Kb. La colonia pNNH1.2 parece haber incorporado un vector recircularizado, ya que no presenta banda a 1,8 Kb.

Como método adicional de confirmación, se mandó a secuenciar una fracción de las muestras extraídas y purificadas del gel de electroforesis (fig. 17). Para pNNH1 se emplearon los cebadores del promotor T7 y del terminador T7. Para pNNH2 se utilizó únicamente el cebador del promotor T7. En el anexo XI queda recogido el alineamiento de las secuencias obtenidas con las secuencias diseñadas computacionalmente en el programa *Vector NTI*. Las muestras pNNH1.5 y pNNH2.3 fueron seleccionadas para llevar a cabo la transformación y transfección posteriores.

4.2.5. Sobreexpresión en procariontes: transformación con pNNH1 e inducción

El producto de ligación pNNH1 aislado de la colonia número 5 (denominado pNNH1.5) se empleó para transformar una cepa bacteriana hiperproductora de flavoproteínas de *E. coli* BL21 (DE3). La selección se realizó con kanamicina, al poseer el vector pET28a(+) el gen de resistencia correspondiente. La sobreexpresión de AIFL fue inducida con IPTG y la fracción proteica fue aislada. Primeramente se realizó una electroforesis vertical en un gel de poliacrilamida seguida de una tinción con Coomassie, pero los resultados no fueron concluyentes. Alternativamente, se repitió la electroforesis vertical y se procedió a realizar una electrotransferencia. Con la fracción proteica

transferida a la membrana se llevó a cabo un *Western Blot* con un anticuerpo primario contra la cola de histidinas (*anti-His tag*) y un revelado que confirmó la sobreexpresión (*fig. 18*).

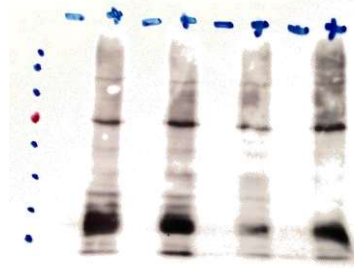


Figura 18. Película revelada mostrando la sobreexpresión de AIFL mediante un *Western Blot* con el anticuerpo anti cola de histidinas. Los carriles rotulados con un signo negativo se corresponden con las muestras no inducidas de dos colonias seleccionadas al azar (cargadas por duplicado, diluidas 1:2 y sin diluir), mientras que el signo positivo indica las muestras inducidas con IPTG. El patrón de peso molecular aparece en el carril más izquierdo, con puntos de color azul y rojo.

4.2.6. Sobreexpresión en eucariotas: transfección con pNNH2 y seguimiento

El producto de ligación pNNH2 aislado de la colonia número 3 (denominado pNNH2.3) se usó para transfectar de forma directa células HEK293T. Durante 48 horas se realizó el seguimiento del cultivo mediante un experimento de célula viva en campo claro con un microscopio invertido automatizado (*Leica DMI 6000B*), pero no se observaron diferencias significativas con respecto al control negativo (*figura no disponible*). La supuesta sobreexpresión de AIFL no tuvo un efecto obvio en la muerte celular, ni indujo aparentemente la apoptosis. Se concluyó que el experimento debía ser repetido para verificar si la ausencia de resultados recaía o no en un fallo técnico.

En resumen, se llevó a cabo la sobreexpresión del gen *aifm3* en células procariontas y eucariotas con dos vectores de expresión (pNNH1 y pNNH2) previamente sintetizados experimentalmente. La sobreexpresión en la cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) se confirmó mediante un *Western Blot* y posterior revelado. El siguiente paso en la investigación debería ser el establecimiento de un método de purificación de la proteína a partir de la fracción proteica obtenida, tras haber confirmado su presencia, mediante el uso de diferentes condiciones de pH y sales en diversos tampones. La literatura debería ser también estudiada en busca de posibles métodos ya desarrollados para la purificación de proteínas con propiedades, secuencia o estructura similares. La sobreexpresión en la línea celular HEK293T no dio resultados concluyentes. La repetición del experimento con el plásmido pNNH3 permitiría verificar la correcta transfección de las células, ya que la proteína AIFL sería expresada como una proteína de fusión con el marcador fluorescente *mRFP*. Esto permitiría, por un lado, comprobar la fluorescencia dentro de la célula, y, por otro, detectarla mediante *Western Blot* con un anticuerpo contra *mRFP* (dado que actualmente no disponemos de un anticuerpo contra AIFL). La presencia del marcador facilitaría así el seguimiento de la proteína, garantizando la veracidad de los resultados observados tras la sobreexpresión inducida.

CONCLUSIONES

El crecimiento ralentizado observado en más del 60% (n=15) de los clones seleccionados tras la co-transfección con los vectores que codificaban para el sistema CRISPR/Cas9 (pX335-gRNA1 y pX335-gRNA2) podría llevar a concluir que el factor AIFL posee una **función constitutiva vital** en la célula que, en su ausencia, afecta negativamente a la replicación celular. No obstante, se requiere de una confirmación experimental del silenciamiento (p.e. por medio de una PCR) para poder apoyar con veracidad dicha hipótesis. La hipotética función pro-apoptótica de la proteína, previamente descrita por Xie *et al.* (2005), tampoco pudo ser confirmada en este trabajo. Tras la transfección de la línea celular HEK293T con el vector de expresión previamente diseñado pNNH2 (pcDNA3.1(-)-AIFL) no se observaron efectos significativos en la morfología ni en el crecimiento con respecto al control negativo. La transfección pudo no haber sido realizada correctamente, lo que podría confirmarse repitiendo el experimento con el vector pNNH3 (pcDNA3.1(-)-AIFL-*mRFP*). Al codificar la proteína AIFL como una proteína de fusión con el marcador *mRFP*, la transfección con este vector permitiría realizar un seguimiento de la proteína detectando la fluorescencia emitida. En contraposición, la sobreexpresión del gen *aifm3* en la cepa competente *E. coli* BL21 (DE3) sí pudo ser confirmada por medio de un ensayo inmunoquímico, permitiendo concluir que el procedimiento (incluyendo el diseño y síntesis del vector de expresión pNNH1 (pET28a(+)-AIFL) y la transformación con el mismo) había sido desarrollado apropiadamente. En un futuro, el establecimiento de un método de purificación de la proteína a partir de la fracción proteica de la cepa transformada podría permitir la caracterización intensiva de la misma *in vitro*, tanto a nivel funcional como estructural.

CONCLUSIONS

The impaired growth observed in more than 60% (n=15) of the selected clones after the co-transfection with the vectors that encode the CRISPR/Cas9 system (pX335-gRNA1 and pX335-gRNA2) could lead to the conclusion that AIFL holds a **vital constitutive role** in the cell which, in its absence, negatively affects the cells' replication. However, an experimental confirmation of the knock-out (i.e. through a PCR) is required to support such hypothesis. The protein's hypothetical pro-apoptotic role, previously declared by Xie *et al.* (2005), could not be confirmed in this work. Following the transfection of the cellular line HEK293T with the previously designed expression vector pNNH2 (pcDNA3.1(-)-AIFL) no significant effects were observed neither morphology-wise nor growth-wise compared to the control. The transfection might not have been carried out correctly, which could be confirmed through the repetition of the experiment with the vector pNNH3 (pcDNA3.1(-)-AIFL-*mRFP*). Since it codifies the AIFL protein as a fusion protein with the *mRFP* tag, the transfection with this vector would allow tracking the protein by the emitted fluorescence. In contraposition, the over-expression of the *aifm3* gene in the *E. coli* BL21 (DE3) competent strain could in fact be confirmed through an immunochemical assay, leading to the conclusion that the procedure (including the design and synthesis of the expression vector pNNH1 (pET28a(+)-AIFL) and the transformation carried out with it) had been fulfilled appropriately. In the future, the establishment of a purification protocol for the protein from the transformed strain's protein fraction could allow its intensive characterization *in vitro*, both at the functional and structural level.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. & Currie, A. R. **Cell Death: The Significance of Apoptosis**. in 251–306 (1980). doi:10.1016/S0074-7696(08)62312-8
2. Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G. & Gabai, V. L. **Necrosis: A specific form of programmed cell death?** *Experimental Cell Research* **283**, 1–16 (2003).
3. Goodlett, C. R. & Horn, K. H. **Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system**. *Alcohol Res. Health* **25**, 175–184 (2001).
4. Wang, C. & Youle, R. J. **The Role of Mitochondria in Apoptosis**. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 95–118 (2009).
5. Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F. & Kroemer, G. **Apoptosis-inducing factor: vital and lethal**. *Trends in Cell Biology* **16**, 264–272 (2006).
6. Susin, S. a *et al.* **Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor**. *Nature* **397**, 441–446 (1999).
7. Wu, M., Xu, L. G., Li, X., Zhai, Z. & Shu, H. B. **AMID, an apoptosis-inducing factor-homologous mitochondrion-associated protein, induces caspase-independent apoptosis**. *J. Biol. Chem.* **277**, 25617–25623 (2002).
8. Xie, Q., Lin, T., Zhang, Y., Zheng, J. & Bonanno, J. a. **Molecular cloning and characterization of a human AIF-like gene with ability to induce apoptosis**. *J. Biol. Chem.* **280**, 19673–81 (2005).
9. Dereeper, A. *et al.* **Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist**. *Nucleic Acids Res.* **36**, W465–W469 (2008).
10. Sevrioukova, I. F., Li, H. & Poulos, T. L. **Crystal Structure of Putidaredoxin Reductase from *Pseudomonas putida*, the Final Structural Component of the Cytochrome P450cam Monooxygenase**. *J. Mol. Biol.* **336**, 889–902 (2004).
11. Senda, M. *et al.* **Molecular Mechanism of the Redox-dependent Interaction between NADH-dependent Ferredoxin Reductase and Rieske-type [2Fe-2S] Ferredoxin**. *J. Mol. Biol.* **373**, 382–400 (2007).
12. Horvath, P. & Barrangou, R. **CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea**. *Science (80-.)*. **327**, 167–170 (2010).
13. Kannan, R. & Ventura, A. **The CRISPR revolution and its impact on cancer research**. *Swiss Medical Weekly* **145**, (2015).
14. Jinek, M. *et al.* **A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity**. *Science* **337**, 816–21 (2012).
15. Ran, F. A. *et al.* **Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity**. *Cell* **154**, 1380–1389 (2013).
16. **Strain - DH5 α** . *cgsc2.biology.yale.edu*
17. **BL21(DE3) Competent E. coli | NEB**. Disponible en: <https://www.neb.com/products/c2527-bl21de3-competent-e-coli#pd-description>. (Acceso: 27 de Junio de 2017)
18. Temp, S. & Temp, S. **293t (atcc[®] crl-3216[™])**. 1–3
19. Recommendations, D. D. **Double Digest Finder**, NEB. 2012 (2012).
20. **Secuenciación analítica de doble cadena diagnóstica**, P. DE & Provincia, P. C. Servicios de secuenciación de ADN.
21. Horvath, P. & Barrangou, R. **CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea**. *Science (80-.)*. **327**, 167–170 (2010).