



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

Papel en la regulación del metabolismo
intermediario de la isoforma citosólica de la
fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK)
mediante edición genómica con CRISPR-Cas9

Role in intermediate metabolism regulation of the cytosolic
isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) by
genomic edition with CRISPR-Cas9

Autora

Alba Beltrán McAndrew

Directores

José Alberto Carrodegas

Pascual López Buesa

Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI)

Grado en Biotecnología - Junio 2017

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 La enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica (PEPCK-C).....	2
1.2 CRISPR-Cas9 en células procariotas	3
1.3 Edición del genoma usando CRISPR-Cas9 en células eucariotas.....	4
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3.1 Diseño de los sgRNAs	6
3.2 Anillamiento de oligonucleótidos y ligación en el plásmido	8
3.3 Transformación de bacterias y cultivo	9
3.4 Selección de los clones positivos.....	9
3.5 Congelación de bacterias positivas para los plásmidos	10
3.6 Líneas celulares.	10
3.7 Cotransfección de los plásmidos en células 293T y selección de clones	11
3.8 Comprobación del <i>knock-out</i> : PCR y electroforesis	11
3.9 Comprobación del <i>knock-out</i> : secuenciación	12
3.10 Comprobación del <i>knock-out</i> : análisis de proteínas por Western Blot	12
3.11 Recuperación de la función de PEPCK-C	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1 Transformación de bacterias y selección de colonias	14
4.2 Comprobación del <i>knock-out</i> : PCR.....	16
4.3 Comprobación del <i>knock-out</i> : secuenciación	18
4.4 Comprobación del <i>knock-out</i> : Western Blot.....	19
4.5 Recuperación de la función de PEPCK-C	20
5. CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFÍA.....	24
Anexo 1.....	26
Anexo 2.....	28
Anexo 3.....	30
Anexo 4.....	34

RESUMEN

La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) es una enzima que cataliza la descarboxilación de oxalacetato en fosfoenolpiruvato y presenta un papel clave en la ruta de la gluconeogénesis. Se han descrito 2 isoformas, la mitocondrial (PEPCK-M) y la citosólica (PEPCK-C); esta última se encuentra codificada en humanos por el gen *Pck1*. La PEPCK-C se expresa principalmente en hígado, riñón y tejido adiposo y tiene relevancia en enfermedades como la obesidad o la diabetes de tipo II.

Con el fin de llevar a cabo un estudio funcional controlado del gen *Pck1*, se ha realizado un *knock-out* en la línea celular HEK293T de riñón embrionario humano empleando CRISPR/Cas9, una técnica de modificación genética precisa y novedosa que ha permitido producir un corte en el ADN dirigido específicamente contra el inicio de la traducción del gen *Pck1*. La delección se analizó por PCR y por secuenciación, observándose 3 clones silenciados. Para comprobar si el *knock-out* producía la inhibición de la expresión de PEPCK-C se realizó un Western Blot, que sugirió la producción de un silenciamiento parcial, con una expresión disminuida. Por último, se comprobó que al transfectar en los clones silenciados un plásmido con la secuencia del gen se producía la reversión del silenciamiento en los 3 casos.

Este trabajo abre la posibilidad de estudiar la función de la PEPCK-C en el metabolismo, determinando así su papel en distintos tejidos y en las enfermedades en las que interviene.

ABSTRACT

Phosphoenolpyruvate carboxykinase is a key enzyme in gluconeogenesis that catalyses conversion of oxaloacetate to phosphoenolpyruvate. There are two isoforms of this enzyme, a mitochondrial (PEPCK-M) and a cytosolic form (PEPCK-C). Human PEPCK-C is codified by *Pck1* gene and is expressed mainly in liver, kidney and adipose tissue. It is believed to play an essential role in type II diabetes and obesity.

With the purpose of carrying out a functional study of *Pck1* gene, we conducted a knock-out in HEK293T cell line (derived from human embryonic kidney) with CRISPR/Cas9, a new and powerful technique that allowed us to specifically cut DNA and eliminate the translation start site of *Pck1* gene. The results for both PCR and sequencing confirmed *Pck1* knock-out in three of the analysed clones. Furthermore, a Western Blot analysis carried out to test whether PEPCK-C protein expression was inhibited in these clones suggested partial silencing, as some expression still remained. Lastly, we studied the effect of plasmid transfection containing *Pck1* in the silenced clones, concluding silencing was reversed in all three cases by overexpression of *Pck1* gene.

In conclusion, further research into this subject may help understand the role of PEPCK-C in the metabolism of different tissues and in metabolic disorders such as obesity and diabetes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica (PEPCK-C)

La **fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK)** es una enzima de la familia de las liasas que participa en la ruta metabólica de la gluconeogénesis y constituye el paso limitante de esta.¹ La **gluconeogénesis** es la síntesis de glucosa a partir de precursores orgánicos de 3-4 carbonos; es una ruta presente en la mayor parte de los organismos, que tiene lugar mayoritariamente en el hígado en animales y en menor medida en el riñón. La PEPCK cataliza la descarboxilación de oxalacetato en fosfoenolpiruvato con el consumo de una molécula de GTP (Figura 1).²

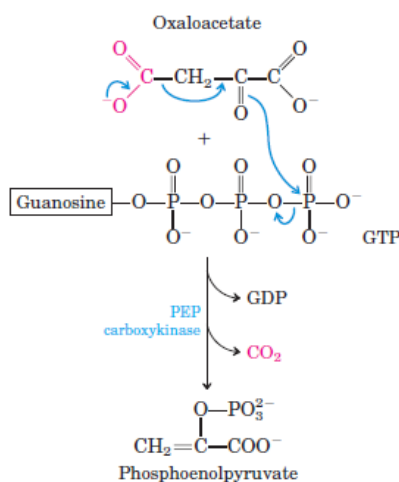


Figura 1. Reacción catalizada por la PEPCK. El oxalacetato se descarboxila para pasar a fosfoenolpiruvato, con el consumo de una molécula de GTP. *Lehninger, A. Principles of Biochemistry.*

Han sido descritas 2 isoformas diferentes: la isoforma citosólica (PEPCK-C) y la mitocondrial (PEPCK-M), cada una codificada por un gen diferente del genoma. Mientras que el gen que codifica la PEPCK-C es el *Pck1*, localizado en humanos en el cromosoma 20 en el brazo largo (20q13.31)³, el de la PEPCK-M es el *Pck2*, en la posición 14q11.2 en el brazo largo del cromosoma 14⁴. En total la longitud del gen *Pck1* es de 7.033 pares de bases. Codifica para la enzima PEPCK-C, una proteína de 622 aminoácidos y peso molecular de 69,2kDa que se encuentra como monómero. El producto del gen tiene como cofactor el Mn²⁺ y su actividad es potenciada por la acetilación¹.

La regulación y expresión de *Pck1* y *Pck2* es muy diferente. Los diversos factores que regulan la expresión de PEPCK-C (es estimulada por el glucagón, la adrenalina, los glucocorticoides y la hormona tiroidea y es inhibida por la insulina) no parecen afectar a la transcripción de la PEPCK-M. La expresión más elevada de PEPCK-C ocurre en el hígado, el riñón y el tejido adiposo, que es donde se da la regulación por estos factores⁵. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito la expresión en muchos tejidos y tipos celulares, incluidos el intestino, pulmones y cerebro, aunque todavía hay poca información funcional⁶. En cambio, la PEPCK-M se expresa en una variedad más grande de tejidos, incluyendo las células T y B, células pancreáticas y neuronas⁷.

En cuanto a la función de la enzima PEPCK-C, se considera generalmente como la enzima clave en la **gluconeogénesis** hepática y renal. En *knock-outs* completos de la enzima en ratones, se dio

hiperglucemia severa; estos animales morían poco después de nacer⁸. Pero cuando el gen de la PEPCK-C fue eliminado exclusivamente del hígado en ratones, mantenían una homeostasis normal de glucosa⁹ y podían hacerse diabéticos en ausencia de esta enzima¹⁰, destacando la importancia de la gluconeogénesis renal en el control de la glucosa sanguínea.

Sin embargo, estudios recientes confirman que además de estar involucrada en la gluconeogénesis, la PEPCK-C también juega un papel importante en otras rutas metabólicas. Por ejemplo, PEPCK-C interviene en la **cataplerosis**, la eliminación de los metabolitos del ciclo de Krebs creados por fuentes como la degradación de los aminoácidos. En los ratones con *knock-outs* para la PEPCK-C, se observa acumulación de malato en los hepatocitos por la pérdida de cataplerosis de malato/oxalacetato en la mitocondria, lo cual lleva a un aumento del contenido hepático de lípidos⁶. Además, se sabe que la PEPCK-C interviene en el metabolismo lipídico como parte de la **gliceroneogénesis**, un proceso que genera 3-fosfoglicerol a partir de piruvato y sus precursores y que controla la tasa de reesterificación de ácidos grasos en tejido adiposo e hígado. Los fallos en el gen de la PEPCK-C están implicados en la obesidad y en la diabetes tipo II⁵.

Debido a la importancia genética de la PEPCK-C en estas enfermedades, resulta interesante estudiar más a fondo su función en la regulación del metabolismo intermediario. La realización de un *knock-out* del gen que la codifica, *Pck1*, puede contribuir a elucidar la función biológica de esta proteína. Para ello, la técnica elegida es el CRISPR/Cas9, una novedosa herramienta de ingeniería genética que proporciona inhibiciones de la expresión más duraderas y específicas que la interferencia de RNA (RNAi).

1.2 CRISPR-Cas9 en células procariotas

Las bacterias y arqueas han desarrollado evolutivamente una defensa adaptativa mediada por RNA llamada **CRISPR** (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), que protege a estos organismos de ser infectados por virus y plásmidos¹¹. Este sistema de defensa se basa en pequeñas moléculas de RNA que se unen a secuencias específicas del DNA foráneo para silenciarlo. CRISPR/Cas9 se compone de genes *cas* organizados en operones, y *arrays* CRISPR que contienen secuencias que reconocen los genes exógenos (espaciadores) y repeticiones idénticas entre ellos¹².

El sistema consta de 3 fases. En la fase **adaptativa**, las bacterias y arqueas con sitios CRISPR responden al virus o plásmido invasor integrando pequeños fragmentos de DNA extraño (protoespaciadores) en el cromosoma del huésped en el extremo proximal del *array* de CRISPR. En las fases de **expresión** e **interferencia**, se transcribe el espaciador y la repetición a moléculas de CRISPR RNA (pre-crRNA), y por acción enzimática se corta en fragmentos más pequeños de RNA que se conocen como crRNA y que pueden unirse por complementariedad a las secuencias del protoespaciador en el virus o plásmido invasor. El reconocimiento por crRNA dirige el silenciamiento de las secuencias extrañas por medio de las proteínas Cas que funcionan conjuntamente con los crRNAs¹³.

Se conocen 3 tipos de sistemas CRISPR. En el I y III, unas endonucleasas especializadas procesan el pre-crRNA, que se asocia en complejos proteicos multi-Cas una vez maduro. En el sistema de **tipo II**, en cambio, un transactivador crRNA (tracrRNA) complementario a las secuencias repetidas del pre-crRNA desencadena el procesamiento por la ribonucleasa RNasa III en la presencia de la **proteína Cas9**, la única responsable del silenciamiento¹⁴. El tracrRNA se requiere para el reconocimiento del

ADN diana, posiblemente para la correcta orientación del crRNA en su interacción con el ADN. La localización del corte, por otro lado, depende tanto de la complementariedad entre crRNA y el ADN diana protoespaciador como de pequeñas regiones junto a la región complementaria llamadas **PAM** (*protospacer adjacent motif*). Estas, además de estar involucradas en el reconocimiento de las secuencias propias frente a las extrañas y en la formación del lazo R, podrían tener relevancia en la transición entre las conformaciones de Cas9 de unión a la diana y rotura del ADN. Los motivos PAM contienen solo unos pocos pares de bases, en el CRISPR/Cas tipo II consisten en una secuencia consenso NGG, localizada a una base *downstream* del sitio de unión de crRNA (Figura 2)¹³.

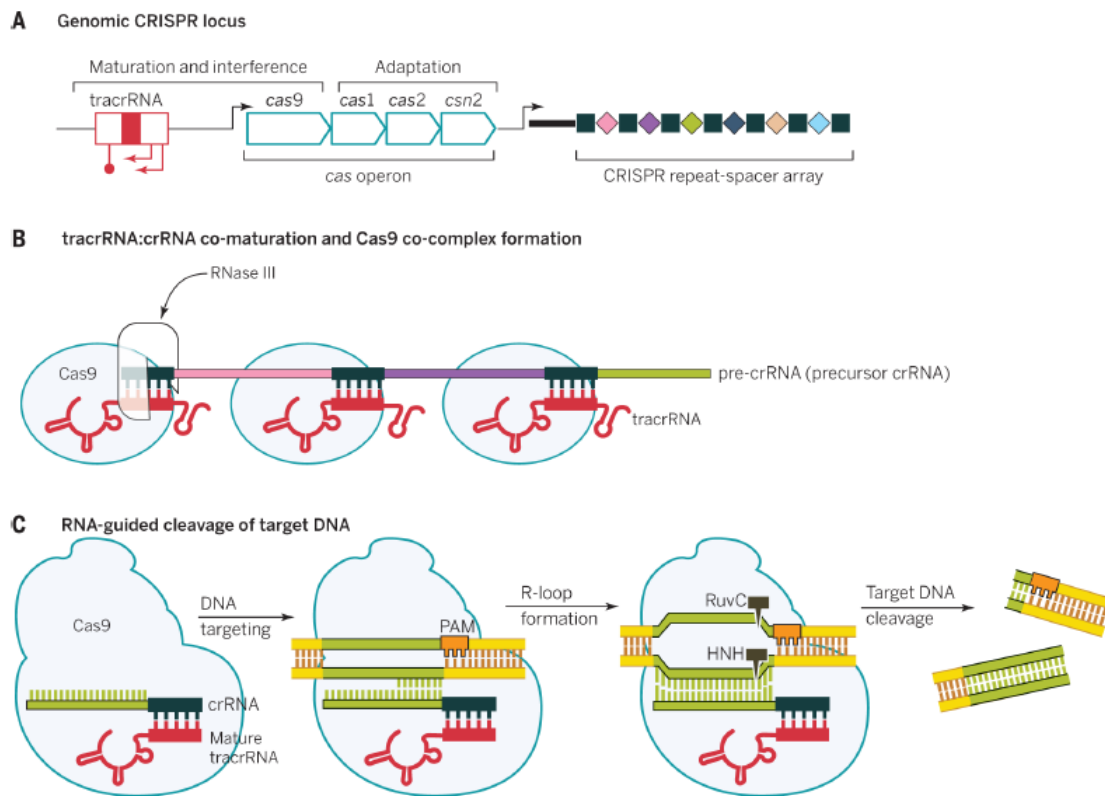


Figura 2. El sistema CRISPR/Cas9 tipo II de *S.pyogenes*. (A) El operón del gen Cas junto con el tracrRNA y el array CRISPR. (B) Cas9 se asocia con el complejo tracrRNA-crRNA, la RNasaIII procesa el RNA. (C) Rotura del ADN por Cas9 con el complejo tracrRNA-crRNA. Doudna et al (2014)

La proteína Cas9 consta de 2 dominios; cada uno corta una cadena de ADN y son homólogos a las endonucleasas **HNH y RuvC**. El dominio HNH corta la cadena de ADN complementaria al crRNA, mientras que el dominio RuvC corta la no complementaria¹⁴.

1.3 Edición del genoma usando CRISPR-Cas9 en células eucariotas

Aunque el sistema mediado por tracrRNA:crRNA funciona de forma eficaz *in vivo*, se puede usar un único **RNA quimérico** para la edición específica del genoma, fusionando el extremo 3' del crRNA con el extremo 5' del tracrRNA¹⁵. Esta molécula, llamada **sgRNA** o *single guide RNA*, permite guiar la rotura del ADN catalizada por Cas9 de una manera similar al complejo tracrRNA:crRNA. Contiene 20 nucleótidos de secuencia guía que son complementarios a la diana, el único requerimiento es la presencia de la secuencia PAM inmediatamente *downstream* de la diana. De este modo, se pueden diseñar las secuencias de manera que se produzca el corte en un lugar específico del ADN (Figura 3)^{16 17}.

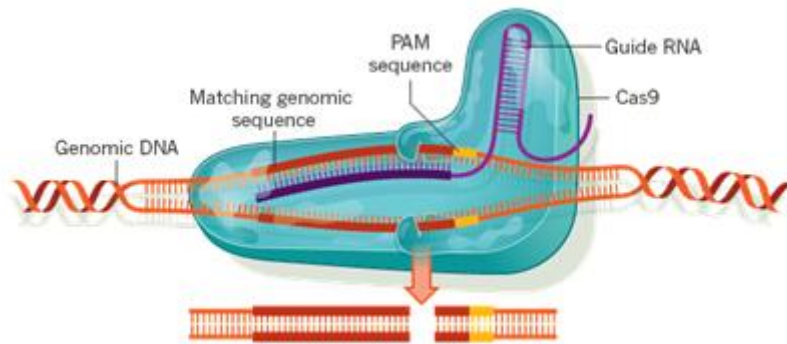


Figura 3. sgRNA quimérico y su interacción con Cas9. La enzima Cas9 es guiada al ADN diana por una molécula de sgRNA complementaria a la región que se quiere cortar, con secuencias PAM. Se crean cortes de doble cadena, que pueden ser reparados por NHR (*homology-directed repair*) o por NHEJ (*non-homologous end-joining*). Adaptado de Charpentier et al (2013)

Los cortes producidos por el sistema pueden ser reparados por recombinación homóloga (*homology-directed repair* o NHR) o por unión de extremos no mediada por recombinación homóloga (*nonhomologous end-joining* o NHEJ). En este segundo caso la célula trata de reparar el corte, pero la reparación es propensa al error; esto lleva a mutaciones que inactivan el gen¹⁶.

La enzima Cas9 empleada es la de *Streptococcus pyogenes*, que da una edición del genoma eficiente en una gran variedad de especies y tipos celulares, incluyendo líneas celulares humanas. Por otro lado, los CRISPR arrays se pueden procesar a sgRNAs maduros sin necesidad de introducir la RNasa III bacteriana; es probable que las RNasas endógenas de mamíferos jueguen un papel similar¹⁷.

Además, Cas9 puede ser convertida en una “nickasa” que crea una rotura de una sola cadena (*single-stranded break* o SSB), por inactivación de uno de los dos dominios, HNH o RuvC, mediante mutaciones puntuales (como D10A en RuvC)¹⁸. Con esta técnica, por otro lado, se puede aumentar la especificidad de la rotura de doble cadena (DSB), utilizando pares de sgRNAs con una *nickasa* mutante SpCas9 HNH⁺/RuvC⁻ (Figura 4)¹⁹. Si los cortes están convenientemente separados se puede mimetizar el corte de doble cadena (DSB), la eficacia aumenta hasta 1500 veces comparado con la enzima Cas9 *wildtype* y se reduce el corte no específico en regiones distintas a la diana. Además, la longitud del reconocimiento de la diana se duplica²⁰.

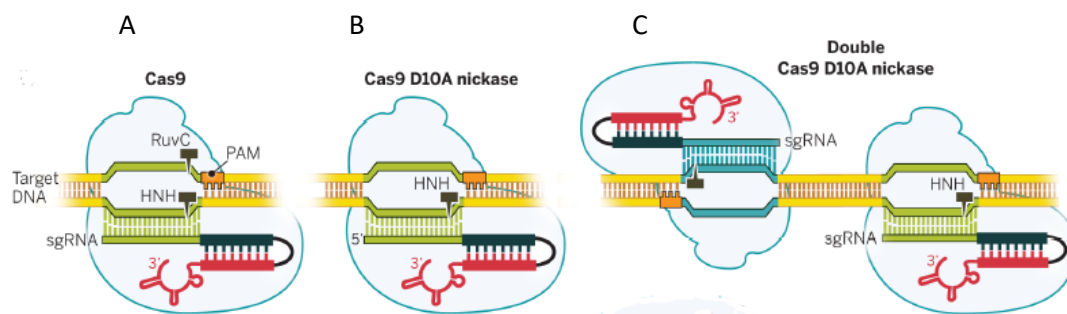


Figura 4. Corte de una cadena de ADN por Cas9 mutantes. (A) El corte habitual de Cas9 se produce en las dos cadenas por acción de los dominios RuvC y HNH. (B) Cuando se inactiva uno de los dos dominios, Cas9 puede funcionar como una *nickasa*, cortando una sola cadena. (C) Cuando Cas9 *nickasa* se usa con 2 sgRNAs en regiones cercanas, se mimetiza el corte de doble cadena. Adaptado de Doudna et al (2014)

En comparación con otras técnicas, como las TALENs (transcription activator-like effector nucleases), los dedos de zinc (ZFs) y las meganucleasas, CRISPR/Cas9 es más accesible y fácil de implementar¹⁵. Mientras que los ZFs o TALENs son sistemas complejos con reconocimiento de dominios mediados por proteínas, CRISPR/Cas9 se puede aplicar de manera mucho más sencilla, ya que se basa en el ARN y por lo tanto solo es preciso diseñar la secuencia de esta molécula. La eficacia de CRISPR/Cas9, además, es igual o mayor que en los otros casos²¹. Asimismo, CRISPR-Cas ofrece una gran versatilidad y capacidad para modificar el genoma permanentemente, mientras que la interferencia de RNA (RNAi) está restringida a inhibir la expresión de un gen y puede dar lugar a inhibiciones incompletas o inespecificidades¹⁴.

CRISPR/Cas9 también cuenta con algunas limitaciones. El requerimiento de una secuencia PAM NGG limita la diana de SpCas9 a cada 8pb de media en el genoma humano, sin contar con las posibles restricciones por la estructura secundaria del crRNA o la accesibilidad genómica que resulta de los estados de metilación del ADN y la cromatina. Para mejorar la especificidad de CRISPR, se ha planteado evaluar homólogos de Cas9 identificados por bioinformática y la evolución dirigida de estas nucleasas. De manera similar, el rango de secuencias diana de CRISPR puede ser ampliado por el uso de homólogos con distintos requerimientos de la secuencia PAM o por evolución dirigida^{18 19}.

En conclusión, la facilidad de dirigir Cas9, su alta eficiencia y la posibilidad de llevar a cabo varias modificaciones simultáneas han hecho de CRISPR-Cas9 una técnica ampliamente usada que ha permitido desarrollar multitud de aplicaciones biológicas, médicas y biotecnológicas¹⁶.

2. OBJETIVOS

Partiendo de la importancia de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica (PEPCK-C), el objetivo de este trabajo es crear una línea celular HEK293T (derivada de un cultivo de células embrionarias de riñón humanas) que carezca del gen que la codifica (*Pck1*), mediante edición genómica con CRISPR/Cas9. Usando 2 moléculas RNA guía (sgRNAs) y la enzima Cas 9 *nickasa*, que crea un corte en una sola cadena, se pretende llevar a cabo el silenciamiento del gen y comprobar que se inhibe la expresión de la PEPCK-C. Por otro lado, se quiere determinar si se produce la recuperación de la expresión de la enzima al transfectar con un plásmido que contiene *Pck1*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño de los sgRNAs

Partiendo de la secuencia del gen de la enzima PEPCK citosólica (NCBI referencia NC_000020.11, Anexo 1), se observaron 2 posibles codones de inicio de la traducción. Una secuencia ATG se encontraba en la posición 333, mientras que la segunda se encontraba en la posición 547. Sin embargo solo se produce la isoforma larga, como muestra el número de aminoácidos de la proteína, 622³. En consecuencia, se diseñaron 2 sgRNAs (sgRNA1 para la cadena superior, y sgRNA2 para la cadena inferior) que se dirigieran específicamente a eliminar el ATG situado en la posición 333, para así poder inhibir la expresión de la PEPCK citosólica.

El vector empleado para la clonación de los sgRNAs es PX335 (Addgene plasmid # 42335), un vector de expresión en células de mamífero que contiene el gen de la *nickasa* de Cas9 humanizada de *S.pyogenes* (D10A) y el *gRNA scaffold* que reconoce la proteína Cas9. Cuenta además con un gen de resistencia a ampicilina que permite su selección y un origen de replicación para bacterias (Figura 5).

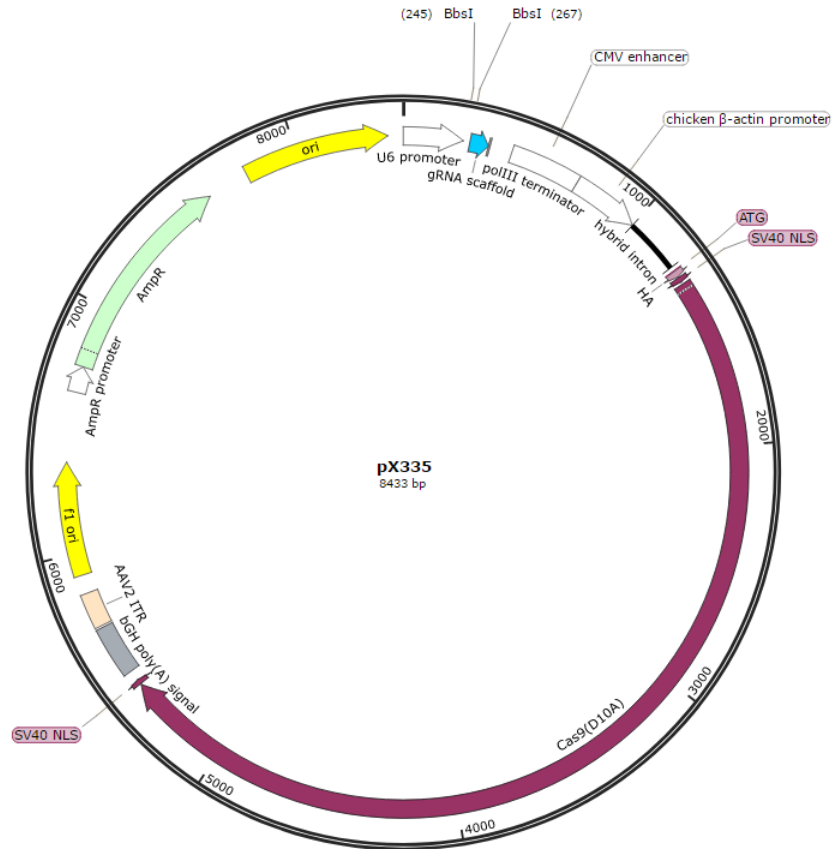


Figura 5. Esquema del plásmido PX335, un vector de expresión en células de mamífero que contiene el gen de la *nickasa* de Cas9 humanizada (D10A), el *gRNA scaffold* que reconoce a Cas9, un gen de resistencia a ampicilina y un origen de replicación para bacterias.²²

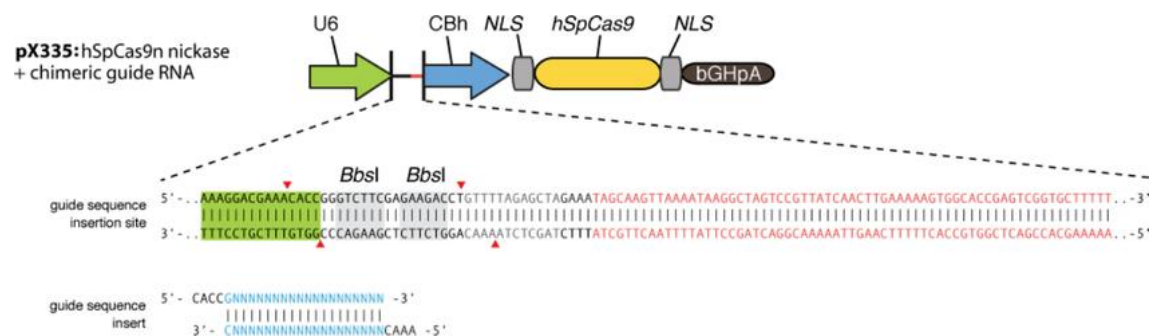


Figura 6. Ampliación de la región de clonaje dentro del plásmido PX335. El lugar de corte (señalado mediante flechas rojas) viene dado por la enzima de restricción *BbsI*. La región reconocida se representa en gris.²³

El lugar de corte para la inserción en el plásmido está determinado por la enzima de restricción *BbsI* (Figura 6), por lo que se diseñaron los oligonucleótidos para que incluyeran esta secuencia. Hay 2 sitios de corte con esta enzima en el vector, son secuencias distintas y por tanto se favorece el clonaje direccional (corta en una región diferente a la que reconoce). Adicionalmente, la longitud de

unión al gen *Pck1* debe tener unos 20 nucleótidos, incluir la secuencia PAM (NGG) imprescindible para que se produzca la eliminación por CRISPR y empezar por el nucleótido G (mejora la eficiencia). El gRNA2 tendrá la misma secuencia de nucleótidos que la cadena superior de *Pck1*, mientras que gRNA1 será reverso y complementario (Figura 7). Se diseñaron también oligonucleótidos complementarios a estos (KO-*Pck1*-UPrv y KO-*Pck1*-DWNrv) para la inserción en el vector.

gRNA1 GCUGCUAAGGGGCACGAAUGUG

Oligonucleótido diseñado: KO-*Pck1*-UPfw 5'-CACCGGCTAAGGGGCACGAATGTG-3'

KO-*Pck1*-UPrv 3'- CCGATTCCCCGTGCTTACACCAA -5'

gRNA2 UGCCUCCUCAGCUGCAAAA

Oligonucleótido diseñado: KO-*Pck1*-DWNfw 5'-CACCGTGCCTCCTCAGTGCAAAA-3'

KO-*Pck1*-DWNrv 3'- CACGGAGGAGTCGACGTTTTCAAA -5'

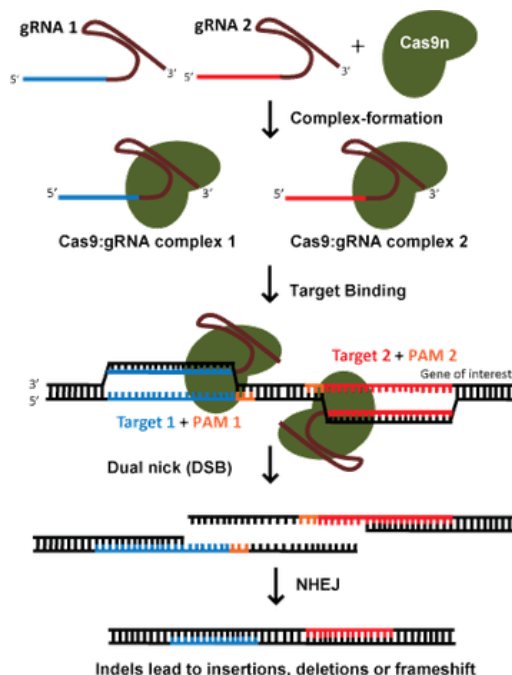


Figura 7. Esquema de la unión de los sgRNAs al gen diana. Cas9 genera cortes de doble cadena (DSBs) por la combinación de la acción de sus dos dominios. La Cas9 *nickasa* tiene un dominio inactivado, de forma que corta una sola cadena. Se pueden usar 2 *nickasas* que se dirigen a cadenas opuestas para generar un corte de doble cadena, lo cual aumenta la especificidad.²⁴

3.2 Anillamiento de oligonucleótidos y ligación en el plásmido

Los oligonucleótidos se sintetizaron en cadena sencilla (todos fueron sintetizados por Invitrogen), pero se debían anillar para poder insertarlos dentro del plásmido, que se transformó en bacterias. Para el anillamiento de los oligonucleótidos de sgRNA1 y sgRNA2 se mezclaron 3µL a 100µM con su complementario, se añadieron 44µL de TE/CiNa a 50mM y se calentó, dejando enfriar lentamente. Por otro lado el vector donde se ligaron los oligonucleótidos, PX335, se digirió con la enzima *BbsI* (tampón NEB 2.1, Biolabs) y se purificó. Después se unió a los oligonucleótidos anillados con la enzima ligasa (1µL ligasa, 4µL buffer x5 de ligasa, 2µL del vector y 2µL de cada oligo en un volumen final de 20µL), a 16°C durante toda la noche. Se obtuvieron dos plásmidos, PX335 con sgRNA1 (pABM1) y PX335 con sgRNA2 (pABM2).

3.3 Transformación de bacterias y cultivo

Los vectores se transformaron en bacterias para producir una amplificación del ADN. Las bacterias competentes empleadas fueron *Escherichia coli* de la cepa *DH5 alpha*, que poseen una eficacia de transformación de hasta 1×10^9 transformantes/ μg de ADN plasmídico y que proporcionan una alta estabilidad de los insertos. Para producir la transformación, se mezclaron $5\mu\text{L}$ de los vectores ligados con $100\mu\text{L}$ de estas bacterias, se introdujeron media hora en hielo, 1 minuto a 42°C y se volvieron a introducir en hielo para que las bacterias incorporaran el ADN exógeno.

El cultivo de las bacterias se hizo en medio LB, un medio rico en nutrientes que es usado generalmente para el cultivo de bacterias como *E.coli* (ver Anexo 4) y con ampicilina (50mL de ampicilina $1000\times$), un antibiótico que permite la selección de las bacterias que han incorporado los plásmidos (estos tienen un gen de resistencia a ampicilina). Primero se añadió 1mL de LB sin ampicilina y se dejaron recuperar las bacterias; pasada media hora se pusieron a cultivar durante una noche en placas de Petri en el medio con ampicilina. Se prepararon 2 placas, la primera con bacterias transformadas con pABM1 y la segunda, con pABM2. Como control, se usaron bacterias *E.coli DH5 alpha* transformadas con el plásmido vacío y sembradas igualmente en placas de Petri.

3.4 Selección de los clones positivos

Con el fin de seleccionar aquellas bacterias que hubieran incorporado el vector con el inserto se tomaron 5 colonias aleatoriamente de cada una de las 2 placas de Petri y se cultivaron en LB con ampicilina, en tubos de 50mL tipo Falcon, en un agitador orbital a 37°C durante una noche.

Para el aislamiento del plásmido de las bacterias primero se obtuvo un *pellet* de bacterias resultante de 3mL del cultivo y se extrajo el material genético de los plásmidos empleando el kit *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit*, de Favorgen, eluyendo en $100\mu\text{L}$ de tampón de elución.

La comprobación de la inserción de los oligonucleótidos diseñados se hizo empleando dos enzimas de restricción, *BbsI* y *EcoRI*. El sitio de corte con *EcoRI* se encuentra en el plásmido en la posición 5451, y por lo tanto se cortará en todos los casos. El sitio de corte con *BbsI*, sin embargo, se mantiene solo en el caso de no haberse introducido el inserto, al ser una enzima que corta en un punto distinto de la secuencia que reconoce (Figura 6). Para la digestión se empleó el tampón NEBuffer 2.1 (Biolabs), para el cual las dos enzimas tienen una efectividad máxima. Se realizó de la siguiente manera:

- **Muestra:** $0,2\mu\text{L}$ *BbsI*, $0,2\mu\text{L}$ *EcoRI*, $2\mu\text{L}$ tampón NEB 2.1, $12,6\mu\text{L}$ agua estéril y $5\mu\text{L}$ plásmido pABM1 o pABM2 ($80\text{ng}/\mu\text{L}$).
- **Control:** $0,2\mu\text{L}$ *BbsI*, $0,2\mu\text{L}$ *EcoRI*, $2\mu\text{L}$ tampón NEB 2.1, $17,1\mu\text{L}$ agua estéril y $0,4\mu\text{L}$ plásmido vacío ($80\text{ng}/\mu\text{L}$).

Seguidamente se hizo una electroforesis a 80 voltios durante 1 hora; en un gel de agarosa al 1% con SYBRSafe para visualizar el ADN por fluorescencia, en TBE (Tris, ácido bórico y EDTA). Se cargaron $10\mu\text{L}$ en cada pocillo y, en uno de los pocillos, el marcador de pesos moleculares *1kb Plus DNA Ladder*. Se descartaron los plásmidos que se observaron como 2 bandas en el gel y el resto se cuantificaron con un espectrofotómetro *NanoVue*, enviando a secuenciar 500ng a la empresa Sistemas Genómicos (Paterna, Valencia).

3.5 Congelación de bacterias positivas para los plásmidos

Se prepararon *stocks* de glicerol de las bacterias positivas para su almacenamiento a largo plazo. Para ello se añadieron 200µL de 80% de glicerol a 500µL de los cultivos de bacterias, y se congelaron a -80°C.

3.6 Líneas celulares.

3.6.1 Células HEK293T

Las células 293T, también llamadas HEK293T, son una línea celular derivada de células humanas embrionarias de riñón en cultivo. Contienen ADN de adenovirus y el antígeno T de SV40, que permite la replicación de plásmidos con el origen de replicación del poliomavirus SV40. Son ampliamente usadas por su eficacia de transfección, y requieren un nivel 2 de bioseguridad ya que contienen fragmentos de adenovirus. Tienen una morfología epitelial, son adherentes y crecen en monocapa, de manera que su cultivo se realiza en medio completo DMEM (el DMEM de 500mL, de la casa comercial Pan-Biotech, se hace completo añadiendo 50mL de suero fetal bovino 10x, 5mL de penicilina-estreptomicina 100x y 5mL de glutamina 100x).

3.6.2 Mantenimiento de las líneas celulares

El manejo de las líneas celulares se hizo en esterilidad en campanas de flujo laminar (PV30/70), y se mantuvieron en incubadores a 37°C con un 5% de CO₂ y aire saturado de humedad. Se realizaron subcultivos cada pocos días en frascos de 25cm² (volumen final de 5mL) o de 75cm² (volumen final de 15mL). Todos los clones se observaban cada día al microscopio invertido para determinar la confluencia, su morfología y posibles contaminaciones.

El método seguido para hacer subcultivos fue aspirar el medio, añadir 5mL de una preparación comercial de tripsina (Pan-Biotech) en los frascos de 75cm² (2mL en el caso de los de 25cm²) e introducir en el incubador termostatzado. Pasados 5 minutos, se pipeteó la cantidad de células necesaria para la dilución deseada y se completó hasta el volumen final con DMEM completo.

3.6.3 Criopreservación de las líneas celulares

Tras trypsinizar las células en los frascos de 75cm² con 5mL de tripsina se transfirió el contenido a un tubo tipo Falcon de 15mL con 10mL de DMEM completo. Se centrifugó durante 5 minutos a 500g, se aspiró el medio y se resuspendió el *pellet* en 2mL de medio completo fresco. Se añadió 1mL a cada uno de 2 criotubos, añadiendo 100µL de DMSO a ambos. El DMSO es un crioprotector que minimiza el daño celular durante la congelación, sin embargo es tóxico para las células por lo que se agitó al añadirlo y se evitó que permaneciera mucho tiempo a temperatura ambiente. Los criotubos se congelaron lentamente hasta -80°C, descendiendo la temperatura a 1°C/minuto en contenedores con isopropanol, y al día siguiente se trasladaron a tanques de nitrógeno líquido.

Para descongelar las células, los criotubos se introdujeron en un baño a 37°C durante 1 minuto aproximadamente. Después el contenido se trasvasó rápidamente a un frasco de 25cm² con 5mL de medio. Tras 2 horas, se observaron las células y al comprobar que estaban adheridas se cambió el medio, lo que permitió eliminar el DMSO tóxico.

3.7 Cotransfección de los plásmidos en células 293T y selección de clones

De los vectores que se demostró que habían incorporado el inserto se eligieron 2 (uno de cada, pABM1 y pABM2) y se cotransfectaron en células HEK393T para producir el *knock-out* por CRISPR/Cas9. El día previo a la cotransfección, se sembraron células 293T *wild-type* al 50% de confluencia en placas de 24 pocillos (volumen total de 500µL por pocillo) y se mantuvieron en la estufa a 37°C. Al día siguiente, se incubaron 1,5µL de GeneJuice con 12,5µL de Optimem (Pan-Biotech) durante 5 minutos; después se añadieron 500ng de los dos plásmidos pABM1 y pABM2 (que contenían el sgRNA1 y sgRNA2), previamente purificados de las bacterias *E.coli DH5 alpha*, y se incubó la mezcla durante otros 15 minutos a temperatura ambiente. Se empleó Optimem ya que no contiene suero fetal bovino, que impediría la correcta formación de los liposomas. A continuación, se añadieron 20µL a las células en la placa de 24 pocillos. Este proceso se hizo por triplicado, para asegurar la reproductividad del proceso.

Posteriormente, se quisieron seleccionar clones que hubieran cotransfectado los dos plásmidos. Las células transfectadas se incubaron durante 24 horas, tras lo cual se tripsinizaron en la placa de 24 pocillos (500µL en cada pocillo), para después preparar una primera placa de Petri con 200µL de las células tripsinizadas y 10mL de medio completo DMEM. Se emplearon placas de Petri ya que para la selección se precisó de cilindros de clonaje, que no podían usarse en frascos. Se hicieron 6 diluciones seriadas 1:10 a partir de cada una anterior, siempre en un volumen de 10mL. Finalmente se seleccionó la dilución donde los clones crecían separados, de forma que pudieran ser aislados y cultivados, para después comprobar si se había producido la inhibición de la expresión de la PEPCCK-C.

Para la selección de los clones se aspiró el medio y se colocó un cilindro de clonaje (Sigma-Aldrich) sobre cada uno de 15 clones diferentes con ayuda de pinzas. Se añadieron 50µL de tripsina-EDTA en cada cilindro y se incubó 5 minutos a 37°C, tras lo cual se pipeteó el contenido a placas de 24 pocillos con 500µL de medio DMEM completo. Después del cultivo de los clones, se transfirieron a frascos de 25cm² y, cuando crecieron, a frascos de 75cm², de los cuales se hicieron dos *stocks* con DMSO por clon. Un tercio de las células de cada clon se mantuvo en cultivo hasta completar los experimentos.

3.8 Comprobación del *knock-out*: PCR y electroforesis

3.8.1 Aislamiento y cuantificación de ADN

El ADN cromosómico se aisló de los clones de las células 293T con el kit de extracción de ADN *Blood Genomic DNA Extraction MiniKit* (Favorgen). Posteriormente se cuantificó el ADN total con *NanoVue*, y se diluyó convenientemente para tener una concentración de ADN de cada clon de 100ng/µL.

Por otro lado, se diseñaron 2 cebadores (directo y reverso) para amplificar la región del gen *Pck1* donde se debería haber producido la eliminación de unas 53pb de la secuencia. Se diseñaron computacionalmente y se sintetizaron (Invitrogen), la temperatura de anillamiento (*T_m*) a 50mM Na⁺ resultante fue de 50°C para el cebador directo y 49°C para el cebador reverso. En el caso de las células *wild-type* la amplificación por PCR debería dar un producto de 518pb, mientras que debería ser de 465pb si se hubiese producido el *knock-out*.

Cebadores para PCR

*Pck1*CRISPFOR 5'-AAACCTGTGGATCTCCCTTCGA-3'

*Pck1*CRISPREV 5'-TCCTCCATCTGGCCCAGAA-3'

3.8.2 PCR con *Taq* polimerasa

Se empleó esta polimerasa para hacer un primer *screening* de los clones positivos, ya que aunque es menos fiel que la *Pfu* polimerasa, también es más barata. La PCR se realizó en un volumen final de 25µL empleando *Taq* mastermix 2x de Bioron (que incluye *Taq* polimerasa, su tampón y dNTPs); 1µL del ADN aislado a una concentración de 100ng/µL; 2,5µL de los cebadores específicos del gen *Pck1* a una concentración de 10µM y un 5% de DMSO, completando hasta 25µL con agua. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Minicycler MJ Research* con una desnaturalización inicial 2 minutos y 40 ciclos de desnaturalización 10 segundos a 94°C, hibridación del cebador 20 segundos a 50°C (la *Tm* de los cebadores) y extensión 45 segundos a 72°C.

3.8.3 PCR con *Pfu* polimerasa

La *Pfu* polimerasa es más fiel que la *Taq* polimerasa, y por lo tanto es conveniente emplearla para hacer secuenciaciones, puesto que la secuencia será más exacta. En este caso el volumen final fue de 50µL, empleando 5µL de *10x PfuUltra II reaction buffer*, 0,5µL de *dNTP mix 100mM* (25mM cada uno) y 1µL de *PfuUltra II fusión H5 DNA polymerase*. Al igual que antes, la mezcla contenía un 5% de DMSO, 1µL de los cebadores correspondientes a una concentración de 10µM y 1µL del ADN aislado a una concentración de 100ng/µL, completando hasta el volumen final con agua. Se hizo una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C y 30 ciclos de desnaturalización 20 segundos a 95°C, hibridación del cebador 20 segundos a 50°C y extensión 30 segundos a 72°C.

3.8.4 Electroforesis

La electroforesis se corrió durante 40 minutos y 75 voltios en un gel de 2% de agarosa y añadiendo SYBRSafe, en tampón TBE 1x. El marcador de pesos moleculares que se empleó fue *1kb Plus DNA Ladder*, y se cargó en cada pocillo 10µL de la muestra de ADN amplificada por PCR.

3.9 Comprobación del *knock-out*: secuenciación

Como comprobación adicional, se enviaron a secuenciar aquellos clones con resultados positivos tras la PCR y electroforesis. Se aisló el ADN de la mezcla de PCR llevada a cabo con *Pfu* polimerasa (esta polimerasa presenta mayor fidelidad que la *Taq* polimerasa y por lo tanto es más adecuada para la secuenciación) con el kit *DNA, RNA and protein purification* de Macherey-Nagel. La muestra se eluyó con 30µL de tampón de elución del kit y se cuantificó el ADN. Se envió a secuenciar a la empresa Sistemas Genómicos (Paterna, Valencia) aproximadamente 100ng del ADN junto con uno de los 2 cebadores diseñados para la PCR (3,5µL a 1µM) en un volumen final de 19µL, completando con agua.

3.10 Comprobación del *knock-out*: análisis de proteínas por Western Blot

Para analizar la presencia de la PEPC-C en los clones, se diseñó un experimento de Western Blot.

3.10.1 Producción de extractos celulares

Procedimiento A: Tras descongelar las células de los clones a analizar y de las células *wild type*, se obtuvieron *pellets* de todos por centrifugación y se lavaron con PBS. Se resuspendieron en 100µL de tampón de carga de proteínas (SLB, ver Anexo 5) y se sonicaron en hielo 5 minutos con la finalidad de romper el ADN. Tras 5 minutos de descanso para enfriar las muestras se volvió a sonicar durante otros 5 minutos. Después se vortexeó y como seguía siendo viscoso se introdujo en un tanque de

nitrógeno líquido, también con el fin de romper el ADN. Finalmente se hirvió la muestra a 100°C durante 5 minutos.

Procedimiento B: Tras descongelar las células de los clones a analizar y de las células *wild type*, se obtuvieron *pellets* de todos y se lavaron con PBS. Por otro lado se preparó el tampón de lisis, que contenía 2-mercaptoetanol a 2mM, el inhibidor de proteasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) a 1mM y una disolución de HEPES 25mM, NaCl 500mM e Imidazol 10mM a pH 7,5 en un volumen final de 5mL. Se añadieron 100µL de este tampón de lisis a cada uno de los clones y se centrifugó a 10.000g durante 5 minutos. Se recogieron 50µL del sobrenadante y se mezclaron con 50µL de tampón de carga SLB 2x. Finalmente se hirvió la muestra a 100°C durante 5 minutos.

3.10.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se llevaron a cabo electroforesis de poliacrilamida desnaturalizante en SDS (SDS-PAGE). Los geles que se emplearon constaban de un gel concentrador en la parte superior con 4% de poliacrilamida, y de un gel separador en la parte inferior con 10% de poliacrilamida. El hecho de usar esta concentración se debe al tamaño de la proteína que interesa separar, en este caso PEPCCK-C, de 69,2kDa. Se cargaron 5µL del marcador de pesos moleculares *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* de Thermofisher y 15µL de las muestras, y se corrieron en este gel durante 50 minutos a 180 voltios en *Running Buffer 1x* (ver Anexo 5).

3.10.3 Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF para Western Blot

Tras activar la membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) en metanol, se llevó a cabo la electrotransferencia a la membrana a 4°C y en hielo. Se colocó en un soporte una esponja, dos papeles para mejorar el contacto con el gel, el gel, la membrana, otros dos papeles y una esponja (asegurándose de que el gel quedaba en el lado negativo en la electrotransferencia). Después se aplicó una corriente de 100V durante 70 minutos utilizando tampón de transferencia frío (ver Anexo 5), hielo y un agitador magnético para homogeneizar la temperatura, en la cámara fría. Pasado este tiempo, se recuperaron las membranas.

3.10.4 Detección de la proteína PEPCCK citosólica y revelado del Western Blot

Tras la electrotransferencia, y para bloquear la membrana (impidiendo la unión inespecífica de los anticuerpos a ella), se empleó una disolución de BSA al 5% en PBST (0,1% de Tween-20 en PBS) y se incubó durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C en un agitador con el anticuerpo primario. Este anticuerpo era un monoclonal anti-PEPCCK-C a una concentración de 1:2.000 en PBS-Tween-20 al 0,1% y 5% de BSA, obtenido en ratón (Santa Cruz Biotechnology). Además, se añadió un anticuerpo anti-actina a una concentración de 1:10.000, obtenido en conejo (Sigma-Aldrich), que sirvió de control.

Al día siguiente, se hicieron 3 lavados de 10 minutos con PBST para retirar el anticuerpo primario no unido. Después se incubó durante 1 hora en agitación con los anticuerpos secundarios. Por un lado se empleó un anticuerpo anti-IgG de ratón obtenido en caballo (Cell signaling Technology), marcado con peroxidasa y a una concentración de 1:10.000 en la disolución de PBS-Tween-20 al 0,1% y 5% de BSA. Por otro lado se añadió el anticuerpo anti-IgG de conejo obtenido en cabra (Cell signaling Technology), marcado también con peroxidasa, a una concentración de 1:10.000 en la misma disolución. Se volvieron a hacer 3 lavados con PBST, de 8 minutos de duración cada uno.

La membrana se incubó con los reactivos de Millipore *Immobilon Western - Chemiluminescent HRP Substrate* (HRP Substrate Peroxide Solution y HRP substrate Luminol Reagent) en relación 1:1. Cuando la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario interacciona con el peróxido y el luminol del kit, emite luz. Después se envolvió en papel de film y se reveló en oscuridad en películas *Amersham Hyperfilm™ ECL – GE Healthcare*, donde se captó la luz mostrando las bandas. Se empleó revelador y fijador, el proceso se llevó a cabo en un cuarto oscuro, manualmente.

3.11 Recuperación de la función de PEPCK-C

Para tratar de recuperar la expresión de PEPCK-C en las células silenciadas se produjo una transfección reversa de las células HEK293T *wild-type* y de los clones positivos con un plásmido que contenía el gen *Pck1* y con un plásmido vacío como control. En una transfección reversa la introducción de los ácidos nucleicos en la célula ocurre antes de que las células se adhieran, el orden de la adición del ADN y de la adherencia de las células es el inverso al orden convencional en la transfección. Para ello primero se incubaron los pocillos con polilisina durante 1 hora (la polilisina funciona como adherente celular impidiendo que las células se desprendan durante el procesamiento). Por otro lado se incubaron 3μL de GeneJuice y Optimem durante 5 minutos y, tras mezclar con el vórtex, también se añadió el plásmido a transfectar a una concentración de 1μg/μL durante 15 minutos adicionales. El volumen final fue de 100μL. Posteriormente se calculó la densidad de células del cultivo de HEK 293T con el contador de células *Scepter™* (Millipore) y se introdujeron 700.000 en cada pocillo de placas de 6 pocillos. Después de añadir los 100μL de la mezcla de plásmido, GeneJuice y Optimem se completó el pocillo con medio completo hasta 3mL y se dejaron crecer las células.

Pasados 2 días, las células se lavaron con PBS y posteriormente se despegaron del pocillo con un lavado adicional. Se obtuvo un *pellet* de células y se analizó la presencia de PEPCK-C por la técnica de Western Blot (mediante el procedimiento B de extracción celular).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo realizado consistió en el silenciamiento de la expresión de la enzima PEPCK-C mediante una eliminación por CRISPR/Cas del inicio de la traducción del gen que la codifica, *Pck1*. Primero se diseñaron los oligonucleótidos para formar los sgRNAs propios de la técnica CRISPR/Cas9, y se clonaron en plásmidos PX335 (con el gen de la Cas9 *nickasa*) que se amplificaron en bacterias *E.coli DH5 alpha*. Los plásmidos se cotransfectaron en células HEK293T, donde se produjo la eliminación por CRISPR/Cas9, se seleccionaron los clones silenciados y por último se evaluaron los efectos del *knock-out*.

4.1 Transformación de bacterias y selección de colonias

Las bacterias *E.coli DH5 alpha* competentes se transformaron con los plásmidos pABM1 y pABM2, que llevaban respectivamente las secuencias del sgRNA1 y sgRNA2. Después, las bacterias se cultivaron con ampicilina, para producir la selección de las bacterias transformadas. Como control en la transformación se emplearon placas de bacterias en las que se transformó el plásmido vacío. Para la selección de los plásmidos con el inserto se hizo una digestión con *EcoRI* y *BbsI* para obtener un patrón de corte distinto en plásmidos que hubieran integrado el inserto.

En las placas de bacterias, esperamos ver que el control con el plásmido vacío tenga menos colonias que las otras dos placas con los insertos del sgRNA1 y sgRNA2. Al estar linealizado el vector, no debería ser viable en estas bacterias, por lo que no deberían sobrevivir en un medio con ampicilina (solamente si han introducido el inserto pasarán a ser circulares). El resultado no es el esperado, ya que el control tenía aproximadamente las mismas colonias que las otras, esto puede indicar que no se estuviera produciendo el corte por *BbsI* en los dos sitios de corte, pudiendo llegar a circularizarse. Por lo tanto, aunque habrá colonias que hayan incorporado el inserto, las probabilidades disminuyen. Además, las colonias presentes en la placa control eran más pequeñas, lo cual no está justificado.

A continuación, tras aislar el plásmido y hacer una electroforesis observamos que las colonias 1, 3 y 4 de la primera placa con el plásmido pABM1, y 6, 7, 8, 9, 10 de la segunda con el plásmido pABM2 podrían tener el inserto (Figura 8). Estas se observaban como una banda en la electroforesis, lo cual indica que solo tienen un sitio de corte (de la enzima de restricción *EcoRI*). El otro sitio de corte, de la enzima *BbsI*, fue destruido al introducirse el inserto. El plásmido tenía 8434 pb, al cual le introdujimos 20 pb más con el inserto. Por consiguiente, deberíamos observar la banda correspondiente al plásmido con el inserto a una altura entre las bandas del marcador de 8000 y 9000. Las bandas aparecieron un poco más arriba de lo esperado pero esto entra dentro de lo normal, por lo que tomamos estas colonias como positivas para el inserto. Si no se hubiera introducido el inserto, sí que observaríamos 2 bandas claras a 3000 y 5000 pb, resultado del corte con las enzimas *EcoRI* y *BbsI*.

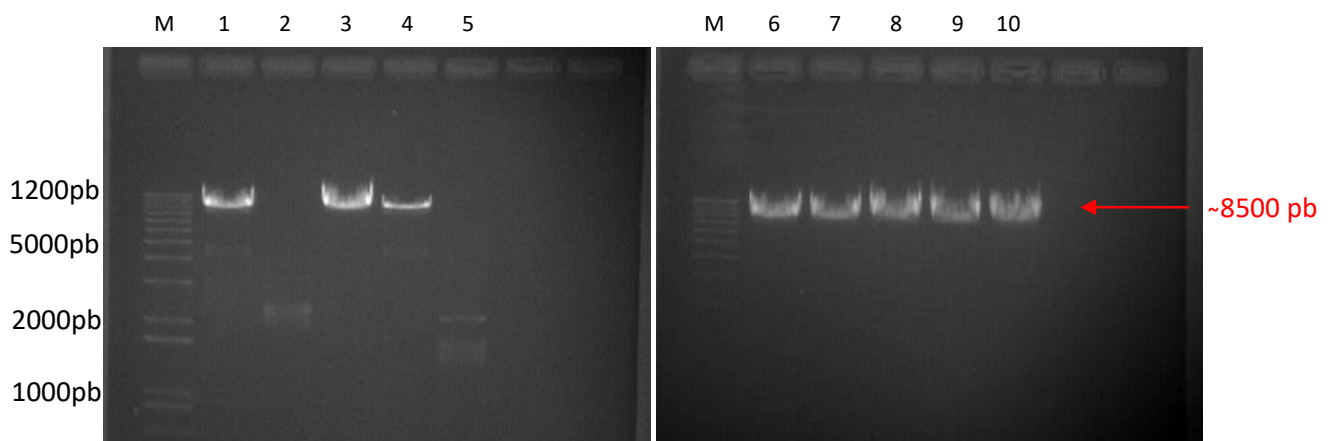


Figura 8. Digestión con *EcoRI* y *BbsI* de los plásmidos purificados de colonias de bacterias, para la comprobación de la integración del inserto. Izquierda: colonias 1, 2, 3, 4 y 5 de la primera placa con pABM1, que contiene el vector con el sgRNA1. Derecha: colonias 6, 7, 8, 9 y 10 de la segunda placa con pABM2, que contiene el vector con el sgRNA2. A la izquierda se muestran las bandas del marcador de pesos moleculares, *1kb plus DNA Ladder*, con bandas cada 1000 pb. Los números en la parte superior indican el número de colonia, y la flecha roja señala la banda que se obtiene del plásmido digerido con *EcoRI*, a unos 8500pb.

Se eligieron 2 colonias de cada vector para enviar a secuenciar sus plásmidos. Del primero se tomaron la 1 y 3 (que se nombraron pABM1-1 y pABM1-3). En estas colonias se observan bandas inferiores que no deberían aparecer y que pueden deberse a ADN contaminante, ADN que se ha degradado, actividad estrella de la *EcoRI* (relajación o alteración en la especificidad de la reacción de escisión, que puede darse por condiciones no óptimas de la digestión), por alguna modificación no deseada en el plásmido, etc. Del segundo gel se eligieron las colonias 9 y 10 (pABM2-9 y pABM2-10), aunque todas parecían tener el mismo aspecto en el gel.

Se cuantificó el ADN antes de enviar a secuenciar, obteniendo valores de A260/A280 y A260/A230 adecuados, en torno a 1,8 y 2 respectivamente. pABM1-1: 63,5µg/mL, pABM1-3: 105,5µg/mL, pABM2-9: 141,5µg/mL, pABM2-10: 139,5µg/mL.

Las secuencias de pABM1-1 y pABM1-3 parecían indicar que se había integrado el inserto, ya que al utilizar el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para alinearlas con la secuencia del inserto había coincidencia total, señalada con asteriscos (Figura 9).

```
pABM1-3      --NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGGCTTTATATATCTTGTGGANGGACGAAACACC
pABM1-1      NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACC
oligo        -----CACC
                                     * * * *

pABM1-3      GGCTAAGGGGCACGAATGTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC
pABM1-1      GGCTAAGGGGCACGAATGTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC
oligo        GGCTAAGGGGCACGAATGTG-----
                                     * * * * * * * * * * * * * * *
```

Figura 9. Alineamiento de las secuencias de pABM1-1, pABM1-3 y el oligonucleótido insertado en el vector pABM1. Las coincidencias en la secuencia, marcadas con asteriscos, muestran la correcta integración del inserto.

Por otro lado, las secuencias pABM2-9 y pABM2-10 también parecían haber introducido el oligonucleótido (Figura 10), al volver a observar coincidencia total entre las secuencias (secuencias completas del vector pABM1 y pABM2 en Anexo 2).

```
pABM2-10     NNNNNNNNCNNNNNNNNNNATTNCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGTG
pABM2-9      ---NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGTG
oligoF       -----CACCGTG
                                     * * * * * * *

pABM2-10     CCTCCTCAGCTGCAAAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGT
pABM2-9      CCTCCTCAGCTGCAAAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGT
oligoF       CCTCCTCAGCTGCAAAA-----
                                     * * * * * * * * * * *
```

Figura 10. Alineamiento de las secuencias pABM2-9, pABM2-10 y el oligonucleótido insertado en el vector pABM2. La total coincidencia de las secuencias indica la presencia del inserto en el vector.

En conclusión, se obtuvieron varios plásmidos pABM1 y pABM2 que parecían ser positivos al digerirlos con las dos enzimas de restricción, ya que se observó una sola banda. De estos elegimos 4 plásmidos (2 de cada uno de los vectores) para secuenciar. Todos ellos habían integrado correctamente el inserto, con lo cual elegimos uno de cada vector, pABM1-1 y pABM2-9 (renombrados pABM1 y pABM9), para la cotransfección en células HEK293T.

4.2 Comprobación del *knock-out*: PCR

Los vectores adecuados seleccionados en el paso anterior, pABM1 y pABM9, se cotransfectaron en células HEK293T con GeneJuice y Optimem para la formación de liposomas. Se cultivaron en placas de Petri mediante diluciones seriadas para obtener una placa donde los clones estuvieran suficientemente separados como para aislarlos individualmente.

Se seleccionaron 15 clones de las diluciones mediante cilindros de clonaje, que se cultivaron en frascos separados. En este momento algunos de los clones se deberían haber transfectado con uno de los plásmidos, otros con ninguno y otros con los dos. Solamente en aquellos donde se produjo la cotransfección se debería haber dado el *knock-out* de la región de inicio de la traducción del gen de

la PEPCK-C. Se realizó una PCR con *Taq* polimerasa para su comprobación, empleando cebadores que comprendían la región que debería haberse deletado por CRISPR/Cas9.

La electroforesis de la PCR del ADN genómico permitió ver cuáles de estos clones eran positivos para el *knock-out*. Los cebadores amplificaban una región de 518 pb del gen *Pck1 wild-type*. En el caso de ser positivos, los productos de la PCR de los clones deberían migrar más rápido con respecto a los obtenidos con células *wild-type*, al carecer del fragmento eliminado (53 pb). También podrían aparecer varias bandas, signo de que la población es mixta (no se trata de un solo clon con un único genoma) o de que la delección en el gen se ha producido en uno de los alelos pero se ha mantenido completo en otro.

Lo primero que se pudo observar fue que en cada carril se ve una única banda, por lo que supusimos que no había poblaciones mixtas en los clones seleccionados, y que no había diferencias entre alelos en cada uno. Los clones en los que probablemente se dio la eliminación en el gen *Pck1* son el 17 y el 20 (Figura 1Figura 111), debido a que migraron más rápido en el gel de electroforesis. Basándonos en el control, se observa que la mayoría de clones poseen el gen *wild-type*, ya que los productos de la PCR migran a una altura similar al de las células *wild-type*. Sin embargo, si se ha producido la delección (53 pb eliminadas) el producto de la PCR migrará en torno a 465 pb; el número de pares de bases puede variar, ya que cuando la célula intenta reparar el corte producido por las dos Cas9 *nickasas*, puede eliminar nucleótidos adicionales a los presentes entre los dos puntos de corte. Los clones 17 y 20 presentan una banda ligeramente desplazada que aparece como se espera en torno a 465 pb, pudiendo tratarse de los clones deletados.

Debido a esto, los clones 17 y 20 se seleccionaron para comprobar por secuenciación y Western Blot. Además, también se envió a secuenciar el clon 5, que no producía resultados muy claros en la electroforesis.

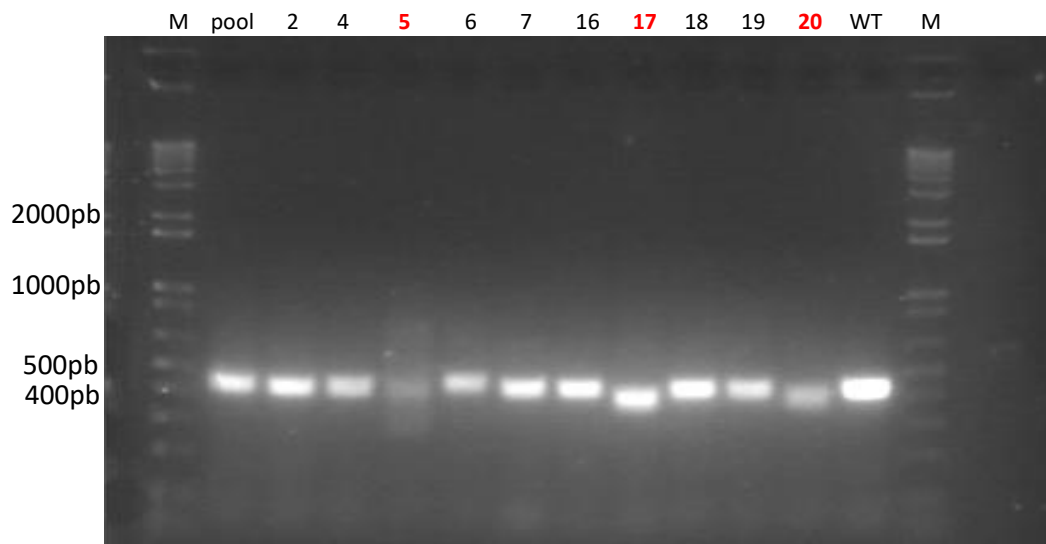


Figura 11. PCR del ADN genómico con *Taq* polimerasa de los clones 2, 4, 5, 6, 7, 16, 17, 18, 19, 20, la línea *wild-type* (WT) y el pool que contiene todos los clones cotransfectados, antes de ser aislados mediante los cilindros de clonaje. A la izquierda se muestran las bandas del marcador de pesos moleculares, *1kb Plus DNA Ladder*, y sobre cada carril se muestra el clon al que corresponde el producto de PCR que migra en la electroforesis. Los clones con el gen tipo *wild-type* aparecen a unas 518pb, mientras que los deletados aparecen a unas 465pb. En rojo, los posibles clones positivos.

En resumen, se analizaron los productos de la PCR de varios clones cotransfectados, constatando que los clones 5, 17 y 20 se deleccionaron en la región delimitada por los dos sgRNAs diseñados.

4.3 Comprobación del *knock-out*: secuenciación

Para secuenciar, amplificamos la región de 518pb con los mismos cebadores, con una polimerasa más fiel que la *Taq* polimerasa, para ello se empleó *Pfu* polimerasa. Se amplificaron los clones 5, 17, 20 y la línea *wild-type* (Figura 1Figura 122); esto sirvió además como validación de los resultados, ya que se comprobó que las muestras migraron más que las de la línea *wild-type* para los clones en los 3 casos, incluido el clon 5. Se obtuvieron algunas bandas inespecíficas, que podían deberse a una posible contaminación con ADN exógeno o a condiciones no óptimas de la PCR que pudieran producir la unión de los cebadores a otras regiones del ADN.

Asimismo también se analizó el clon 1, dividido en 1C (células crecidas en medio DMEM completo) y 1M (células crecidas en medio mínimo) que había crecido más lentamente. En un principio se pensó que podían ser clones en los cuales se había producido el *knock-out* correctamente y, al carecer de la enzima PEPCCK-C, no pudieran llevar a cabo la gluconeogénesis; esto podría suponer una desventaja metabólica, resultando en un crecimiento retardado. Decidimos probar a crecerlas en medio mínimo por si esto pudiera suponer una diferencia respecto al medio completo, y analizamos el producto de PCR con *Pfu* polimerasa. No obstante, en el gel de electroforesis aparecen a la misma altura que la cepa WT, por lo que podemos sospechar que la causa de este comportamiento no es la delección de *Pck1* sino una mutación espontánea.

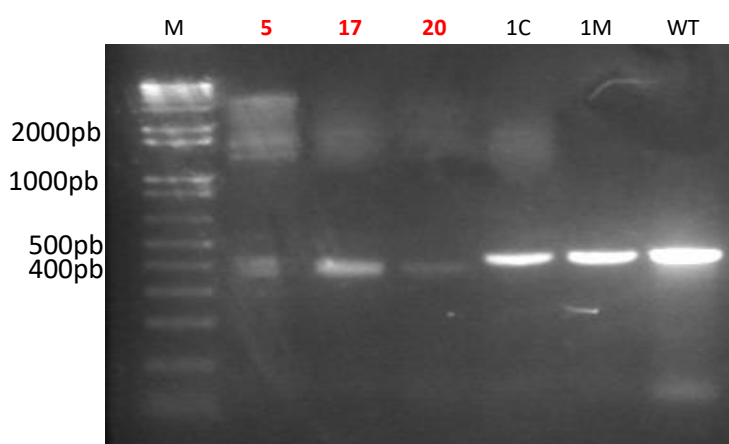


Figura 12. PCR del ADN genómico con *Pfu* polimerasa de los clones 5, 17, 20, 1C (clon 1 en medio completo), 1M (clon 1 en medio mínimo) y WT. A la izquierda se muestran las bandas del marcador de pesos moleculares, y sobre cada carril aparece el clon cuyo producto de PCR se analiza en la electroforesis. En rojo, los clones positivos para la delección.

Habiendo hecho la purificación del producto de esta PCR, se cuantificó el ADN obtenido. Clon 5: 15,8µg/mL. Clon 17: 25,5 µg/mL. Clon 20: 13,8 µg/mL.

La secuenciación coincidía con lo visto en la electroforesis, con lo cual el CRISPR sí habría funcionado (Anexo 3). Al emplear Clustal Omega y alinear las secuencias de los productos de PCR de los clones con el gen *Pck1* anotado (NCBI referencia NC_000020.11, Anexo 1) se produce una coincidencia total hasta llegar al punto donde se debería haber deleccionado. Aunque en esa región sí que aparecen ligeras coincidencias de secuencia, lo asociamos a un mal alineamiento más que a la presencia de esta región en el genoma.

4.4 Comprobación del *knock-out*: Western Blot

Finalmente, se hizo un Western Blot a partir de los clones 5, 17 y 20 y de la línea *wild-type* para analizar la presencia de la proteína PEPCK-C. Aunque ya se había confirmado el *knock-out* en los clones seleccionados, podría estar produciéndose una proteína truncada debido a la iniciación de la traducción en un ATG situado más adelante (*downstream*), todavía con actividad. Por ello, un Western Blot permite sacar conclusiones sobre la expresión de la proteína.

En un principio, se siguió el procedimiento A de producción de extractos celulares (ver Materiales y Métodos). En este Western Blot aparecen muchas bandas debidas a uniones inespecíficas del anticuerpo (Figura 13). Como no se ha hecho ningún proceso de purificación, se observan muchas señales (en esta muestra se encuentran todas las proteínas presentes en la célula). La actina, usada como control de carga, debería aparecer a 41,7 kDa²⁵. En efecto, aunque se encuentra un poco más arriba de lo que se esperaba, se ve una señal de actina intensa que nos permite confirmar que el Western Blot ha funcionado. Se puede apreciar que hay una señal que aparece por debajo de la banda de 72 kDa y que es más intensa en la línea WT comparada con los otros clones. Aunque resulta difícil saber si se trata de la PEPCK-C, que no se encontraría en los clones, sí que aparece a la altura esperada (su peso molecular es de 69,2kDa¹) por lo que podemos suponer que la proteína no se expresa.

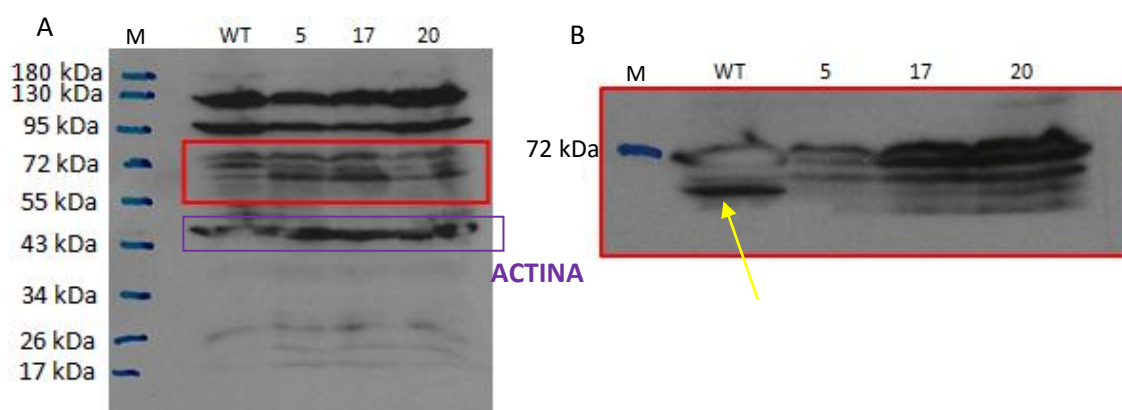


Figura 13. Western Blot del clon WT, 5, 17 y 20. El extracto celular en este caso se obtuvo por lisado de las células directamente en tampón de carga y rotura del ADN. (A) película completa, con señal de actina (morado) y la posible expresión de PEPCK-C en la línea *wild-type* (rojo). En la parte superior aparece el número del clon analizado, y a la izquierda se muestran las bandas del marcador de pesos moleculares *Prestained Protein Ladder*. (B) se repitió el experimento analizando solamente la región donde se esperaba encontrar la PEPCK-C. La banda mostrada corresponde a un peso molecular de 72kDa, y la flecha amarilla señala la posible señal de la PEPCK-C.

Si bien la banda observada podría tratarse de la PEPCK-C, se llevó a cabo otro método de obtención de extractos celulares (procedimiento B, ver Materiales y Métodos), que consistía en un tampón de lisis en el que era soluble la proteína PEPCK-C, pero no así otras proteínas incluyendo la PEPCK-M. La eficacia de este tampón se comprobó experimentalmente; la PEPCK-M tiene regiones muy hidrófobas en el extremo C-terminal, por lo que es necesario utilizar detergentes para estabilizarla²⁶. En estas condiciones, se debería reducir el ruido provocado por otras señales inespecíficas, al disminuir el número de proteínas presentes en la membrana. Se corrieron las muestras obtenidas con ambos procedimientos en el mismo gel, para poder comparar los resultados (Figura 14). Aquí se vuelve a observar la banda correspondiente a la actina, más clara en la muestra obtenida por el

procedimiento B basado en el tampón de lisis. A unos 70 kDa por el método B se observa una sombra en el carril de la línea *wild-type* (Figura 14, A) que se puede apreciar claramente si se expone la película un tiempo más prolongado (Figura 14, B), y ligeramente en los clones 5 y 20.

Se llegó a la conclusión de que el silenciamiento había sido efectivo, ya que la señal de la enzima es mucho mayor en el clon WT y por otro lado la señal de la actina es similar en todos los clones, indicando que las diferencias observadas no se deben a una diferente cantidad de proteínas de las células en el gel. Sin embargo, aparece señal en los carriles correspondientes a los clones 5 y 20, que puede deberse a ruido de fondo o a un silenciamiento únicamente parcial de la expresión de la proteína. En un principio podemos descartar la presencia de una proteína truncada formada por el inicio de la traducción de un ATG *downstream*, puesto que en ese caso se observaría una señal a un peso molecular menor por la unión del anticuerpo primario al fragmento de la proteína. No se observa dicha señal, aunque cabe destacar que también podría deberse a que aunque este fragmento se expresa, se ha eliminado la región de reconocimiento del anticuerpo primario.

En cuanto a la comparación de los dos métodos de obtención del extracto celular, se podría afirmar que el procedimiento B fue más efectivo. El ruido de fondo disminuyó considerablemente, y se redujeron la cantidad de proteína total y las uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Mientras que por el primer procedimiento es complicado discernir la banda correspondiente a la PEPCK-C, en el procedimiento B se mejora considerablemente la pureza, pudiendo llegar a conclusiones sobre su nivel de expresión.

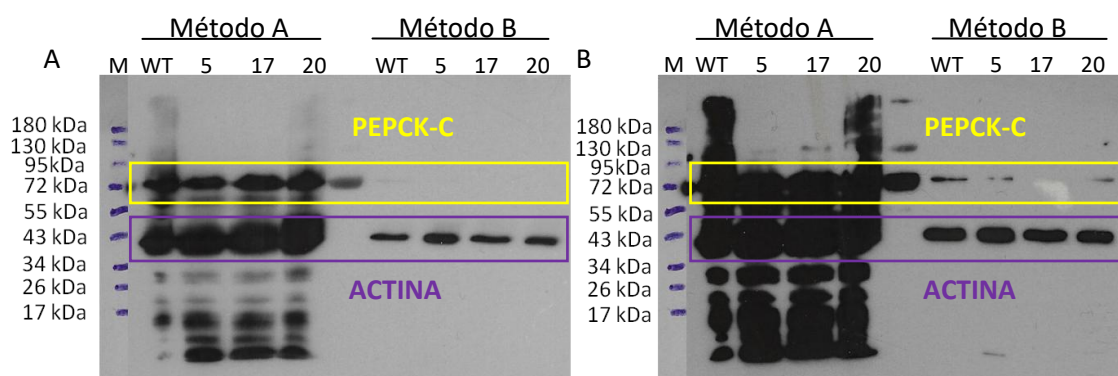


Figura 14. Western Blot para la detección de PEPCK-C, con un tiempo de exposición mayor en la imagen B. En las dos imágenes, A y B, se muestran los resultados tras aplicar el método A de obtención de extractos celulares (izquierda) y el método B (derecha). A la izquierda de cada imagen se muestran las bandas del marcador de pesos moleculares *prestained protein ladder*, y en la parte superior se indica el método de obtención de extractos y el clon analizado. En morado están representadas las bandas de actina (usada como control de carga), y en amarillo las bandas correspondientes a la PEPCK-C, que tiene una mayor expresión en la línea *wild-type*.

En definitiva, el Western Blot permitió comprobar que en los clones en los que había sido efectivo el CRISPR/Cas9 (clones 5, 17 y 20) dejó de expresarse la enzima PEPCK-C. Al eliminar el inicio de la traducción, se inhibe la correcta formación de la proteína.

4.5 Recuperación de la función de PEPCK-C

Una vez obtenidos los clones con el *knock-out* del gen *Pck1* y en los que no se producía la expresión de PEPCK-C, se quiso hacer un experimento de recuperación de la función de PEPCK-C. Se transfectaron las células de los clones 17 y 20 (en este caso elegimos solo 2 de los 3 clones positivos, para simplificar el experimento) con un plásmido que contenía el gen *Pck1*, esperando ver con ello un

aumento de la señal de la enzima PEPCK-C en un Western Blot al revertir el silenciamiento. Sirve como control, como confirmación final de que las diferencias entre la línea *wild-type* y los clones se deben al silenciamiento del gen *Pck1*. Podría tener lugar la eliminación mediada por CRISPR/Cas9 del gen *Pck1* que se introduce, si pABM1 y pABM2 se hubieran integrado en el genoma y se produjeran los sgRNAs y la proteína Cas9 de forma constitutiva (esto ocurre con muy baja probabilidad). En este caso, no observaríamos un aumento de la expresión de PEPCK-C y habría que realizar la sobreexpresión modificando codones del gen *Pck1* del plásmido en la región de reconocimiento de los sgRNAs para que codificaran para los mismos aminoácidos pero ya no pudieran ser reconocidos por los sgRNAs.

Podemos confirmar que el Western Blot (Figura 15) ha funcionado correctamente, por la presencia de las bandas de actina. Por otro lado, aparecen bandas a la altura aproximada de 70 kDa que se corresponden con la PEPCK-C. En el carril de la línea *wild-type* se observa una banda fina, que en los clones 17 y 20 apenas se distinguen (como ya se demostró en anteriores experimentos, esto confirmaría el éxito del CRISPR/Cas9 y el silenciamiento de la expresión de PEPCK-C). Además, en los carriles con las muestras que han sido cotransfectadas con el plásmido la banda se hace más intensa, como cabía esperar si se hubiera producido la sobreexpresión. Aparecen también otras bandas producidas por la unión inespecífica de los anticuerpos primarios y secundarios.

Se pudo concluir que el CRISPR/Cas9 producía el silenciamiento de la expresión del gen *Pck1* en los clones 17 y 20, y que la sobreexpresión funcionó, revirtiendo el silenciamiento con la adición de un plásmido con la secuencia del gen.

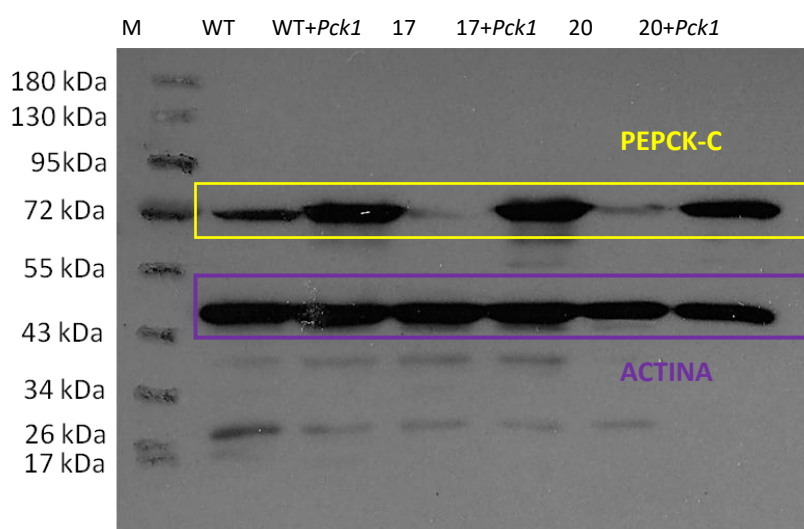


Figura 15. Resultados del Western Blot con recuperación de la función. De izquierda a derecha: marcador de pesos moleculares, células *wild-type*, células *wild-type* con el plásmido con *Pck1*, clon 17, clon 17 con el plásmido, clon 20 y clon 20 con el plásmido. A la izquierda se muestran las bandas del marcador de pesos moleculares, *Prestained Protein Ladder*. En amarillo se indica la banda de la PEPCK-C, y en morado la de la actina.

En resumen, para hacer un *knock-out* de parte de la secuencia del gen *Pck1* primero se diseñaron sgRNAs que se clonaron en plásmidos y se transformaron en bacterias. Se identificaron las colonias de bacterias que habían incorporado los vectores pABM1 y pABM2, de las cuales se eligieron 2 (una con cada vector) para cotransfectar en células HEK293T. Tras la cotransfección, se hicieron 3 comprobaciones del correcto *knock-out*. Por un lado se realizó una PCR y una posterior electroforesis

en la que se identificaron 3 clones positivos, el 5, 17 y 20. En segundo lugar se enviaron a secuenciar estos clones, alineándolos con la secuencia completa del gen *Pck1*, que permitió corroborar los resultados. Por último se llevó a cabo un análisis de la producción de la proteína por Western Blot, y se observó que se inhibe la producción de la proteína parcialmente en los 3 clones. Adicionalmente, una vez confirmado el *knock-out*, se consiguió la sobreexpresión de la enzima PEPCCK-C por transfección de un plásmido con el gen *Pck1*.

Hacer un *knock-out* del gen *Pck1* de esta manera en células HEK293T permite llevar a cabo estudios funcionales controlados, diferenciándolo de otros *knock-outs* previos a la realización de este trabajo. Se da pie a la realización de futuros experimentos en la línea celular HEK293T, como estudios de consumo o producción de glucosa, estudios de su papel en el metabolismo de los lípidos, o el doble *knock-out* de los genes de la PEPCCK-C y la PEPCCK-M. Además, estas mismas construcciones se pueden emplear para hacer un *knock-out* del gen en otras líneas celulares, determinando así el papel en distintos tejidos y en las enfermedades en las que interviene, como la diabetes tipo II y la obesidad.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se extraen de este trabajo de acuerdo con los resultados obtenidos son las siguientes:

1. Los plásmidos pABM1-1, pABM1-3, pABM2-9 y pABM2-10 integraron correctamente el inserto dentro de la secuencia del plásmido, conformando los sgRNAs del sistema CRISPR/Cas9 *nickasa* dirigidos a eliminar el gen *Pck1*.
2. Por PCR se consiguieron identificar 3 clones de células HEK293T (clones 5, 17 y 20) que eliminaron la región de inicio de la traducción del gen *Pck1*, en los que el CRISPR/Cas9 tuvo éxito.
3. La secuenciación del producto de PCR corroboró los resultados, por lo que se aceptaron estos clones como positivos para el *knock-out*.
4. Por Western Blot se comprobó que la proteína PEPCK-C dejó de expresarse en estos clones, demostrando que el *knock-out* de esa región inhibe la correcta traducción del ARN mensajero.
5. La transfección de un plásmido que contiene el gen *Pck1* permite recuperar la expresión de PEPCK-C en los clones silenciados.
6. El estudio de las líneas celulares obtenidas puede permitir en un futuro elucidar el papel del gen *Pck1* en distintos tejidos y una comprensión más profunda de las bases moleculares de la diabetes tipo II y la obesidad.

CONCLUSIONS

The conclusions drawn from this research project, based on the results obtained, are the following:

1. The plasmids pABM1-1, pABM1-3, pABM2-9 and pABM2-10 correctly incorporated the insertion into their sequence, forming the sgRNAs that are necessary in the CRISPR/Cas9 nickase system and that target the *Pck1* gene.
2. Three clones derived from HEK293T cell line (clones 5, 17 and 20), which had correctly eliminated the translation start site in *Pck1* gene and in which therefore CRISPR/Cas9 had been successful, were identified by PCR.
3. The sequencing of the PCR products was in agreement with the PCR results, hence confirming that these clones lack the sequence knocked out by CRISPR/Cas9.
4. The Western Blot experiment verified that the expression of PEPCK-C protein was inhibited in these clones, thus concluding that the elimination of that region in *Pck1* impedes RNA translation.
5. Transfection of a plasmid containing *Pck1* sequence allowed the recovery of PEPCK-C expression in the silenced clones.
6. In the future, the study of the cell lines obtained can help understand the role of the *Pck1* gene in different tissues and unravel the molecular basis of type II diabetes and obesity.

BIBLIOGRAFÍA

1. Uniprot.org. (2017). PCK1 - Phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP] - Homo sapiens (Human) - PCK1 gene & protein. [online] Available at: <http://www.uniprot.org/uniprot/P35558>.
2. Lehninger, A., Nelson, D., Cox, M., Tilberry, S., Landau, A. and Waites, J. *Principles of biochemistry*. (2000).
3. Database, G. (2017). PCK1 Gene - GeneCards | PCKGC Protein | PCKGC Antibody. [online] Genecards.org. Available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PCK1>.
4. Database, G. (2017). PCK2 Gene - GeneCards | PCKGM Protein | PCKGM Antibody. [online] Genecards.org. Available at: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PCK2&keywords=pck2>.
5. Chakravarty, K., Cassuto, H., Reshef, L. & Hanson, R. W. Factors That Control the Tissue-Specific Transcription of the Gene for Phosphoenolpyruvate Carboxykinase-C. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **40**, 129–154 (2005).
6. Semakova, J. *et al.* PEPCK-C reexpression in the liver counters neonatal hypoglycemia in Pck1 del/del mice, unmasking role in non-gluconeogenic tissues. *J. Physiol. Biochem.* **73**, 89–98 (2017).
7. Méndez-Lucas, A., Hyroššová, P., Novellasdemunt, L., Viñals, F. & Perales, J. C. Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) is a pro-survival, endoplasmic reticulum (ER) stress response gene involved in tumor cell adaptation to nutrient availability. *J. Biol. Chem.* **289**, 22090–102 (2014).
8. Hakimi, P. *et al.* Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the critical role of cataplerosis in the control of hepatic metabolism. *Nutr. Metab. (Lond)*. **2**, 1–12 (2005).
9. She, P. *et al.* Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Is Necessary for the Integration of Hepatic Energy Metabolism. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6508–6517 (2000).
10. She, P. *et al.* Mechanisms by which liver-specific PEPCK knockout mice preserve euglycemia during starvation. *Diabetes* **52**, 1649–1654 (2003).
11. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Soria, E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* **60**, 174–182 (2005).
12. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., Soria, E. & Juez, G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology* **36**, 244–246 (2000).
13. Jinek, M. *et al.* A Programmable Dual-RNA – Guided. **337**, 816–822 (2012).
14. Doudna, J. A. & Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (80-.)*. **346**, 1258096–1258096 (2014).
15. Cho, S. W., Kim, S., Kim, J. M. & Kim, J.-S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* **31**, 230–232 (2013).
16. Hsu, P. D., Lander, E. S. & Zhang, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome

- engineering. *Cell* **157**, 1262–1278 (2014).
17. Charpentier, E. & Doudna, J. A. Biotechnology: Rewriting a genome. *Nature* **495**, 50–51 (2013).
 18. Mali, P. *et al.* RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9 Prashant. *Science* (80-.). **339**, 823–826 (2013).
 19. Cong, L. *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/VCas Systems. *Science* (80-.). **339**, 819–823 (2013).
 20. Ran, F. A. *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* **154**, 1380–1389 (2014).
 21. Perkel, J. Special Feature CRISPR / CAS FACES THE BIOETHICS SPOTLIGHT IO IT IN. *Biotechniques* **58**, 223–226 (2015).
 22. Snapgene.com. (2017). pX335 Sequence and Map. [online] Available at: http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/crispr_plasmids/pX335/.
 23. Addgene.org. (2017). Addgene: pX335-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9n(D10A). [online] Available at: <https://www.addgene.org/42335/>.
 24. Addgene.org. (2017). Addgene: CRISPR/Cas9 Guide. [online] Available at: <https://www.addgene.org/crispr/guide/>.
 25. UniProtKB (2017). UniProtKB - P60709 (ACTB_HUMAN) [online]. Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/P60709>.
 26. Holyoak, T., Sullivan, S. M. & Nowak, T. Structural insights into the mechanism of PEPCK catalysis. *Biochemistry* **45**, 8254–8263 (2006).

Anexo 1

Secuencia del gen *Pck1* humano

Fuente:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_000020.11?report=genbank&from=57561080&to=57568112.

Los dos posibles tripletes de comienzo de la traducción que se han observado se representan aquí resaltados en amarillo. Las secuencias a las cuales se unen los cebadores de PCR se resaltan en verde, y la secuencia eliminada por CRISPR/Cas9 se encuentra marcada en azul.

```
1 atttaaagct gggaggttct gccaccaagc acggccttcc cactgggaac acaaacttgc
61 tggcgggaag agcccggaaa gaaacctgtg gatctccctt cga gatcatc caaagagaag
121 aaagtaagt agagctttgc atttacattt tgaaaaatta caaagatgaa ctcatTTTTT
181 tcctgagagc aataactatt tggcaatgca cagccctggc aaaaggccgt cgaatgtgtt
241 tgaaggtgtc tgttgttgtt tttgttcagg acgcttgogt tttctatttc aggtgacctc
301 acattcgtgc cccttagcag cactctgcag aaatgcctcc tcagctgcaa aacggcctga
361 acctctcgcc caaagtgtgc caggaagcc tggaagcctt acccaggca gtgaggaggt
421 ttctcgagaa taacgctgag ctgtgtcagc ctgatcacat ccacatctgt gacggctctg
481 aggaggagaa tgggcggc ttctgggccaga tggaggaa ga gggcatcctc aggcggctga
541 agaagt atga caactggtaa gctcggcccc cgctgcctgt ccagcacc tgcaggcagg
601 gctcccctgc gtctcctggg agttggtgga gaaaggtgaa tgaaggcctt cgggtagttt
661 cagactcttg agaagatgaa tgcaatggtc agaaccatac agacttgaat tttgtgacat
721 tagtgggcca gcccaagctt taaatgaggt gtgtgcacaa aagctctgcc aactagattc
781 ctgattaaaa aaaaggcagc ccctctccta cagaccaggt cctagtggag taaatgtcca
841 cctggccatg tcttagatgg tctgtgtgtt cacactgatg gactgttgtt agcgtgctca
901 gcaactctgt aggcattgaa agccacggta ctgaaggaga tggttcgtgc cccgtggtgc
961 ttggctgaaa ggaagcctgt gatttttgc gctggttggc tctactgac cccagggatg
1021 tggccaggat cgaaagcaag acggttatcg tcaccaaga gcaaagagac acagtgccca
1081 tccccaaaa acggcctcagc cagctcggtc gctggatgtc agaggaggat tttgagaaaag
1141 cgttcaatgc caggttccca ggtgcatga aagtgagcg gaacattgat ttgattgggt
1201 aaaacagcag agagcctttt cttatttaca tctatcctaa tggtaattca aacaataatg
1261 gaagctccca ccacctcaga tgtctttcag ttccatacat gaagttggca atgtattgaa
1321 aatgcacatc cctcttctgc ttttacagac tgtcttatac aaacgtgaaa actagtcca
1381 tgcataatggg ttttaaatag cttggtggga cccaattgca catttatgaa aactctttaa
1441 tttcagcagg ctgttcaact tccagtggcc tcttctaacc cagggggctg gtgaccagca
1501 ggggtgtgtg gtgttagtgg aacaccgtga aaatgggtct acctgggaaa aaaatgctgg
1561 tcgtgttcga agtccaaggt catttctcac cagtgcacc ccacgcacc ctgtaggtcg
1621 caccatgtac gtcaccccat tcagcatggg gccgctgggc tcgcctctgt caaagatcgg
1681 catcgagctg acggattcac cctacgtggt ggccagcatg cggatcatga cgcggatggg
1741 cacgcccgtc ctggaagcag tgggcgatgg ggagttgtc aaatgcctcc attctgtggg
1801 gtgcctctcg cctttacaaa gtaagtgtat tatttcagaa tcaaaagtca aaataaaaaa
1861 gaaagctgaa cgcaaacccc agtgagtgcc tcggggaccc ccaagcaggg ccttggcgca
1921 ctgacttggg aggggtcctt gttcacagag cctttgggtc acaactggcc ctgcaacccg
1981 gagctgacgc tcatcgccca cctgcctgac cgcagagaga tcatctcctt tggcagtggg
2041 tacggcggga actcgtctgt cgggaagaag tgctttgtc tcaggatggc cagccggctg
2101 gccaaaggagg aagggtggct ggcagagcac atgctggtga gcctgcagga agccctgatg
2161 tgcagatgag aggcctgggg ggtggcagaa acaaacagca ttacagtcc caccgctcag
2221 cacacctctc tgagcgtgca ggttcccggg cagatcggga aacccacca gtaatgatta
2281 gtttacacat atacatcgt tttgaaggcc ccaaacacc aggggacat agagatcctt
2341 tggacttcat gattctggga gtgtttgtt gcactgata ctgaagaaat agatcttgag
2401 ggccactcatt ccaacctctg ggtgaaagta ccaacctcgg ggagaaggaa acaaagatca
2461 caataaagaa tcttgtcccc aacagattct ggggtataacc aacctgagg gtgagaagaa
2521 gtacctggcg gccgcatttc ccagcgctg cgggaagacc aacctggcca tgatgaaccc
2581 cagcctcccc ggggtggaag ttgagtgcgt cgggatgac attgcctgga tgaagtttga
2641 cgcacaaggt gactctttta gacccaactc ttggtaacga ttggactcaa gcgaatcggt
2701 ggccttcgaa acatgtcaca ttctcctcag tccagtgtt ggatttttaa actctgttag
2761 tccagagttg gccaaagcctt agaaatatgg atcctgtaag aattcttcaa cttaatattc
2821 aatctggatt gaaactgggc catatgttgc tgtttgttta catacataca tttgtttaaa
2881 tggatttggg ggaaaattgt ggaggaagca agagtgcgta acgtatcaaa gttgcataatg
2941 atgcttgat gaaaagagat aaatgcata tctagggagg gaaaaagat ttgagaagtt
3001 ggcatagaaa ttagtccggc aatatataag agtatatgtt ctgctttgcc tggcactcac
```

3061 tactgcttct ctggtttaaa actctccagg tcatttaagg gccatcaacc cagaaaatgg
3121 ctttttcggg gtctgctcctg ggacttcagt gaagaccaac cccaatgccca tcaagaccat
3181 ccagaagaac acaatcttta ccaatgtggc cgagaccagc gacggggggcg tttactggga
3241 aggcattgat gagccgctag cttcagggtg caccatcacg tcctggaaga ataaggagtg
3301 gagctcagag gatggtgtgt ccctgccaga ggccttggtg tgccgggctg cagggaactgc
3361 ctgtttgagc caggcactca cgagcctttc tctgtcttat aggggaacct tgtgccacc
3421 ccaactcgag gttctgcacc cctgccagcc agtgcccat cattgatgct gcctgggagt
3481 ctccggaagg tgttccatt gaaggcatta tctttggagg ccgtagacct gctggtgagg
3541 ctctccttca tttaggctgg gaacatgggt gtgctgggta ccgaagggca tctgtgaaat
3601 ctctcctttt ccatgacctt gtcagagggt gccaggggc ttcctttctt gagcttctt
3661 cccaaagatc cagaataatt ggcaagttca aatgtagaac caacccttct ggtcacctgg
3721 aacctttctg aatccctgat ctattgtagc ttgatcaaat tttacttttt actttgtggc
3781 ctcagtcatt taactttgag ttagcagttt tctgcaattt agcttggtga acgcaaaact
3841 agctcgatta caaagttatt gtcttgccgt gtctttccgt gttgtgaata acaccactgg
3901 ttgtggagtc tgaatttcaa agcctctgat gaacatttct cttttttttt cctgctaaag
3961 gtgtccctct agtctatgaa gctctcagct ggcaacatgg agtctttgtg gggcgggcca
4021 tgagatcaga ggccacagcg gctgcagaac ataaaggtaa atcaaagtcc tgatctgaaa
4081 ccacagagaa gtgggattag agcactcttc gtcactctta tgtctctctc cttttctgtg
4141 tctgtgtgtg gggagagaga gagagagaaa gagagagagg agaacaaagc atgctaattg
4201 caacaatcaa tggcgctcagt cttgcctagg agagcctcat ttactaatga actccctctc
4261 tgtttaacag gcaaaatcat catgcatgac ccctttgccca tgcggccctt ctttggttac
4321 aacttcggca aatacctggc ccactggctt agcatggccc agcaccagc agccaaactg
4381 cccaagatct tccatgtcaa ctggttccgg aaggacaagg aaggcaaat cctctggcca
4441 ggctttggag agaactccag ggtgctggag tggatgttca accggatoga tggaaaagcc
4501 agcaccaagc tcacgcccac aggtcacatc cccaaggagg atgcctgaa cctgaaaggc
4561 ctggggcaca tcaacatgat ggagcttttc agcatctcca aggaattctg ggagaaggag
4621 gtggaagaca tcgagaagta tctggaggat caagtcaatg ccgacctccc ctgtgaaatc
4681 gagagagaga tccttgccct gaagcaaaga ataaagccaga tgtaatcagg gcctgagtgc
4741 tttaccttta aaatcattcc ctttcccatc cataaggtgc agtaggagca agagagggca
4801 agtgttccca aattgacgcc accataataa tcatcaccac accgtgagca gatctgaaag
4861 gcacactttg atttttttaa ggataagaac cacagaacac tgggtagtag ctaatgaaat
4921 tgagaaggga aatcttagca tgctccaaa aattcacatc caatgcatag tttgttcaaa
4981 tttaaaggta ctcaggcatt gatcttttca gtgttttttc actttagcta tgtggattag
5041 ctagaatgca caccaaaaaa atacttgagc tgtatatata tatgtgtgtg tgtgtgtgtg
5101 tgtgtgtgtg tgtgtgtgca tgtatgtgca catgtgtctg tgtgttatat tttgttatgt
5161 gtatttgtat gtactgttat tgaaaatata ttttaatact ttggaaaaat cttgggcaag
5221 atgacctact agtttttctt gaaaaaaagt tgctttgtta ttaatatgtt gcttaaatat
5281 tttttataca ccattgttcc ttacctttac ataattgcaa tatttcccc tttactactc
5341 ttggaaaaaa attacaaaat gaagttttat agaaaagatg gatttgcttt gcttggtttt
5401 tcttatattga gctaccaaga ggagagaact ctgattaaat atcttgtgat ttaaactctg
5461 cccctcccc aagaagggtg ggacgttcag aatcacactt gaagaggggg tgcatgtcct
5521 ggtcccaggg agaaggaggg agcagatggg gaggaatgag gcagggaacc atggttgggg
5581 ttttctgaat ttgctgaagc cactagttgg catcctttta caattctaca aacctttaga
5641 ttgtgagcct tatgtggcag gactgggagg gtttaatgca tgctttttga cagtttgat
5701 ctggaggggt ctcaggcttc cacaaaaatt acattgtgga cagtttcata ggattttgcc
5761 ttttaactct tcaaagcaac agttttctca actgtcatcc ccgcggggga gcagaggaag
5821 acaagtgaga aggaaaaggg gacaggatct gggttgagca agcattaatt gaggccttc
5881 tgtatcccg acatcatgcc aacaccatgg gctgcccag agagagaggg ggtggtttg
5941 tcccagctc tgcttgaaac cctcacctgc tctcctctac tcccagtggt tattggatat
6001 tccagaacag tccaaacgaa ccataaactt tatatcacag attcaatctg tgtaaatact
6061 attatcttca agttgtagtt tctttcttgg gccaggctg tgaaattggc ttcacccta
6121 ccacacccca gcgggcaggc ttgttcttat gtcacactcc acccctccag tctcctcaac
6181 ttgaaaactt gcctcttttc ctacttctc ctgctcctta caatggcttc atatggaagg
6241 tgaagctgag atcaccccaa ttttacaggg gaggaactg aggtcaagct aggagcgtcc
6301 agcggggctg agaaattgcc aggatttctc tccccattaa ggagctgaga gtcttagctc
6361 cagacacgtt ggcttggtat aatatcaaaa ccaccgaagg gaaaaacca cttactggaa
6421 ttaaatgcta tctgctgtat tagtttaaac cagtggcggt caaacttggt tctccttttc
6481 actgcggaac acgttcttga catgtacttg actcagagtc ccatgtctaa aggagacaga
6541 gcccaaggca gccacactga agctggggag ggagtccaaa gtgcaagcca cctgggtctc
6601 atttcccgcc cccttggggg ccttggggca gctccttgg cccctgaaag aggcaccag
6661 gataaacttt gttaaaatgc atgccttgtg cccactgtc ctattacggg ctttcagtag
6721 tctccactcc ctggcaggc aaagacactg gccatctcca aattccctcc cctcctgcac
6781 agcatcagcc acctggcaag cagtctcaca taggaccatt tgccagcagg cctgcaagc
6841 ctgggggaca gcctagagga ggtgacttac atacacagca taagagtttt caggagacca
6901 aaaagattca atatatgtca ttaactctg actcagtttc cccaaacat gcctcctgag
6961 tgctccctct gtctccaaat cctgattttt gtgcgaggac ccctgtctac aataaacagg
7021 atcctatgac ttc

Anexo 2

Secuencias de los clones pABM1-1 y pABM1-3

Alineamiento mediante el programa Clustal Omega, entre pABM1-1, pABM1-3 y el oligo directo diseñado a partir de sgRNA1 para insertar en el plásmido.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
pABM1-3      --NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGGCTTTATATATCTTGTGGANGGACGAAACACC
pABM1-1      NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGGCTTTATATATCTTGTGAAGGACGAAACACC
oligoF       -----CACC
                                     * * * *

pABM1-3      GGCTAAGGGGCACGAATGTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC
pABM1-1      GGCTAAGGGGCACGAATGTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC
oligoF       GGCTAAGGGGCACGAATGTG-----
               *****

pABM1-3      CGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATA
pABM1-1      CGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATA
oligoF       -----

pABM1-3      GCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGC
pABM1-1      GCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGC
oligoF       -----

pABM1-3      TCTAGAGGTACCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGA
pABM1-1      TCTAGAGGTACCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGA
oligoF       -----

pABM1-3      CCCCCGCCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT
pABM1-1      CCCCCGCCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT
oligoF       -----

pABM1-3      GGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC
pABM1-1      GGAGTATTTACGGT-AACTGCCCCTTNGCANTACATCAAGTGTATCCTATG-----
oligoF       -----

pABM1-3      GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTGTGCCAGTACATGAC
pABM1-1      -----
oligoF       -----

pABM1-3      CTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGT
pABM1-1      -----
oligoF       -----

pABM1-3      CGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCNACCCCCAAT
pABM1-1      -----
oligoF       -----

pABM1-3      TTTGTNC
pABM1-1      -----
oligoF       -----
```

Secuencias de los clones pABM2-9 y pABM2-10

Alineamiento mediante el programa Clustal Omega, entre pABM2-10, pABM2-9 y el oligo directo diseñado a partir de sgRNA2 para insertar en el plásmido.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

pABM2-10      NNNNNNNNCNNNNNNNNATTNCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGTG
pABM2-9      ---NNNNNNNNNNNNNNNNNNNTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGTG
oligoF      -----CACCGTG
                                     *****

pABM2-10      CCTCCTCAGCTGCAAAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGT
pABM2-9      CCTCCTCAGCTGCAAAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGT
oligoF      CCTCCTCAGCTGCAAAA-----
               *****

pABM2-10      TATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTTTGTGTTTAGAGCTAGAAATAGCA
pABM2-9      TATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTTTGTGTTTAGAGCTAGAAATAGCA
oligoF      -----

pABM2-10      AGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCT
pABM2-9      AGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCT
oligoF      -----

pABM2-10      AGAGGTACCCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCC
pABM2-9      AGAGGTACCCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCC
oligoF      -----

pABM2-10      CCGCCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGA
pABM2-9      CCGCCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGA
oligoF      -----

pABM2-10      GTATTTACGGTAAACTGCCCACCTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC
pABM2-9      GTATTTACGGTAAACTGCCCACCTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC
oligoF      -----

pABM2-10      CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTGTGCCAGTACATGACCTT
pABM2-9      CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTGTGCCAGTACATGACCTT
oligoF      -----

pABM2-10      ATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCTGA
pABM2-9      ATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCTGA
oligoF      -----

pABM2-10      GGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTT
pABM2-9      GGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTT
oligoF      -----

pABM2-10      GTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGN
pABM2-9      GTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGG--
oligoF      -----

```

Anexo 3

Secuencias clones

Secuenciación llevada a cabo por Sistemas Genómicos (Paterna, Valencia) de los clones 5, 17 y 20, tanto con el cebador directo para la PCR (F) como con el cebador reverso para la PCR (R).

ABM5F

NNNNNNNNNANANGTAGTAGAGCTTTGCATTTACATTTTGAAAAATTACAAAGATGAACTCATTTTTTTCCTGAGAGCAATA
ACTATTTGGCAATGCACAGCCCTGGCAAAAGGCCGTCGAATGTGTTTGAAGGTGTCTGTTGTTGTTTTGTTCAGGACGCTTG
CGTTTTCTATTTTCAGGTGACCTCATCTTCCCGCCCCAAATTGCCTTCTCAGACGCGTCTGAGCCGGACCATGGCGGGCTGCAG
GGNNNATGGANGAAAAACAGCCGGCCCCACGTGATCAGGGACACTCCCGTGAATGCCCTAAAGATGAGTCTGCCTGATCTATC
CACCTCTGTGAAAAANCTGAGGAGGACAATGGGCGCTTCTGNGACACATGGAAGAAGNN

ABM5R

NNNNNNNNNTNNNNANCANTCNAGATGTGGATGTGATCAAGCTGACACATCTCAACGTTATTCTCGAGAACTCCCTCACTGC
CTGGGGCAGGCTGTCCAGGCTTCCCTGGACAACCTTTGGCCGAGAGGTTTCAGGCCGTTTGACATCTAATGAGGCATTTTCCTTT
AAGGTTGTGATTTCCACAGCAAAAAACACATTCAGCGGCCCTTTTAANCTCTACAACCCATTCTTCTCTTTAGTGGTCCCNCA
GAAAAATGAATTCGTCTAAGTAATTTTCTAATGTAAATGCGAAGCTCTACTTANNTTCTTCTCTTTGGATGATCGCAATG
CAGATCTCCACGTTTAATTCGTCT

ABM17F

NNNNNANNNNNANANNTANNTAGAGCTTTGCATTTACATTTTGAAAAATTACAAAGATGAACTCATTTTTTTCCTGAGAGCAA
TAATAATTTGGCAATGCACAGCCCTGGCAAAAGGCCGTCGAATGTGTTTGAAGGTGTCTGTTGTTGTTTTGTTCAGGACGCT
TGCGTTTTCTATTTTCAGGTGACCTCACATTCGTGCCCTTAACAGCACTCCGGGAGAACCTCCCGCCGGAAGTGATGGAGGGAA
ACGCGAACACGCGGAGAGGGATCATCTCGAACAAATNCATGTGCTGGATCACCTGAAAAAAAAAAAAAGAGCAGG

ABM17R

NNNNNNNNNNNNNNNCGTCNCAGATGTGGATGTGATCAGGCTGACACAGCTCAGCGTTATTCTCGAGAACTCCCTCACTGC
CTGGGGCAGGCTGCCTGAATGCTTTTGGCGGACAGGATCGTGCGGACTGCTGCTATAGACAACAATGTCGTCCTGAACAAAA
ACAACAAACGACACCTTCCAACACATTCACACGCCCATTTGCCTTGGCTGTGCATTGACAGCCTTTTATTGCGCTCGTGAAAA
AAATGATTTTCATCTTTGTAATTTTCAAATGTAAATGCAAAGCTCTATTACCTTTCTTCTCTTAGGATGATCTCTTACGGAA
CACACNNATANNTANACGAAGNNCAATNACNNNTTNNNN

ABM20F

NNNNCANAANNANGTAGTAGAGCTTTGCATTTACATTTTGAAAAATTACAAAGATGAACTCATTTTTTTCCTGAGAGCAATA
ACTATTTGGCAATGCACAGCCCTGGCAAAAGGCCGTCGAATGTGTTTGAAGGTGTCTGTTGTTGTTTTGTTCAGGACGCTTG
CGTTTTCTATTTTCAGGTGACCTCAAATTCGCGCGGACCACTCGCCTGAACTTGTCGGCGGAAGCTGGGACAGCAAGCCCGGAG
CGCCGGCGCAGTGCCGTGAGGGAATTTCTCAACTATGTCACCCAGATGTGTCCCCATCTGTACCCGCTCTCAGGAAGAGATC
GGACGACGACAGGGGGCGAAGTATGAAAAAATGGAGAAAAA

ABM20R

NNNNNTNNNNNNNNNNANNCNCGTCNNNATGTGGATGTGATCAGGCTGACACAGCTCAGCGTTATTCTCGAGAACTCCCTCAC
TGCCTGGGGCAGGCTGTCCAGGCTTCCCTGGACAACCTTTGGCCGAGAGGTTTCAGGCCGTTTGTAGGTACCATTGTGTAGACAC
CGGAGCATAAAGCACAAAAGCAACATCACCAAACATCAACCAACTTCTTCAAACATTTTCCACGGCTGTGTGCTAAGGCTTA
GCTATGGCTAATAATTGAGGCAATANTTAAATTTAGAAATTTTCTTAATGAATAATCAAAANNCTAATGAAAAGATTTCCCT
AAGTACGATAACTTATGGAAAGGTGAAAGTTAATACCCCATCTCCATATNN

Alineamientos región PCR

Alineamiento mediante el programa Clustal Omega, en rojo se muestra la región que debería deletionarse en el CRISPR/Cas9. Los asteriscos muestran la coincidencia en la secuencia. **A:** Alineamiento entre las secuenciaciones de los clones 5, 17 y 20 con el cebador directo de la PCR y la región del gen *wild-type* entre los dos cebadores. **B:** Alineamiento entre la secuencia del clon 5 y el gen *Pck1* WT. **C:** Alineamiento entre la secuencia del clon 17 y el gen *Pck1* WT. **D:** Alineamiento entre la secuencia del clon 20 y el gen *Pck1* WT.

A. CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

ABM20F  -----NNNNCANAANNANGTAGTAGAGCTTTGCA
AMB5F   -----NNNNCANNNNANANGTAGTAGAGCTTTGCA
PCK     AAACCTGTGGATCTCCCTTCGAGATCATCCAAAGAGAAGAAAGGTAAGTAGAGCTTTGCA
ABM17F  -----NNNNNANNNNNANANNTANNTAGAGCTTTGCA
                                     *****

ABM20F  TTTACATTTTGAAAAATTACAAAGATGAACTCATTTTTCCTGAGAGCAATAACTATTT
AMB5F   TTTACATTTTGAAAAATTACAAAGATGAACTCATTTTTCCTGAGAGCAATAACTATTT
PCK     TTTACATTTTGAAAAATTACAAAGATGAACTCATTTTTCCTGAGAGCAATAACTATTT
ABM17F  TTTACATTTTGAAAAATTACAAAGATGAACTCATTTTTCCTGAGAGCAATAACTATTT
*****

ABM20F  GGCAATGCACAGCCCTGGCAAAAGGCCGTCGAATGTGTTTGAAGGTGTCTGTTGTTGTTT
AMB5F   GGCAATGCACAGCCCTGGCAAAAGGCCGTCGAATGTGTTTGAAGGTGTCTGTTGTTGTTT
PCK     GGCAATGCACAGCCCTGGCAAAAGGCCGTCGAATGTGTTTGAAGGTGTCTGTTGTTGTTT
ABM17F  GGCAATGCACAGCCCTGGCAAAAGGCCGTCGAATGTGTTTGAAGGTGTCTGTTGTTGTTT
*****

ABM20F  TTGTTTCAGGACGCTTGCGTTTTCTATTTCAGGTGACCTCAAATTCGCGCGGACCACTCGC
AMB5F   TTGTTTCAGGACGCTTGCGTTTTCTATTTCAGGTGACCTCATCTCCCGCCCCAAATGCC
PCK     TTGTTTCAGGACGCTTGCGTTTTCTATTTCAGGTGACCTCACATTCGTCGCCCTTAGCAGC
ABM17F  TTGTTTCAGGACGCTTGCGTTTTCTATTTCAGGTGACCTCACATTCGTCGCCCTTAACAGCA
*****          ***  **          *

ABM20F  CTGAACTTGTCGGCGGAAGCTGGGA-----CAGCAAGCCCGAGCGC-----
AMB5F   TTCTCAGACGCTCTGAGCCGGACCATGGC--GGGCTGCAGGGNNNA-----
PCK     ACTCTGCAGAAATGCCTCCTCAGCTGCAAAACGGC---CTGAACCTCTCGGCCAAAGTT
ABM17F  CTCCGGGAGAACCCTCCCGCGGAAGTGATGGAGGGAACGCGAACCACGCGGAG-----
                                     *          *

ABM20F  -----CGGCGCAGTGCCGTGAGGGAATTTCTCAACTATGTCAACC
AMB5F   -----TGGANGAAAAACAGCCGGCCCCACGTGATCAGGGACACTCCCGTGAATGCCCTA
PCK     GTCCAGGGAAGCCTTGACAGCCTACCCAGGCAGTGAGGGAGTTTCTCGAGAATAACGCT
ABM17F  -----AGGGATCATCTCGAACAAATNCAT
                                     *****  **  *          *

ABM20F  CAGATGTGTCCCCATCTGTCAACGCTCTCAGGAAGAGATCGGACGACGACGGGGGCGA
AMB5F   AAGATGAGTCTGCCTGA-TCTATCCACCTCTGTGAAAAANCTGAGGAGGACAATGGGCGC
PCK     GAGCTGTGTCAGCCTGATCACATCCACATCTGTGACGCTCTGAGGAGGAGAATGGGCGG
ABM17F  GTGCTGGATCACCTGAAAAAAGAGCAGG-----
      *  *  *  *  *

ABM20F  AGTATGAAAAAATGGAGAAAAA
AMB5F   TTTCTGNGACACATGGAAGAAGNN
PCK     CTTCTGGGCCAGATGGAGGAA---
ABM17F  -----

```

B. CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

PCK     AAACCTGTGGATCTCCCTTCGAGATCATCCAAAGAGAAGAAAGGTAAGTAGAGCTTTGCA
AMB5F   -----NNNNCANNNNANANGTAGTAGAGCTTTGCA
                                     *          *****

PCK     TTTACATTTTGAAAAATTACAAAGATGAACTCATTTTTCCTGAGAGCAATAACTATTT
AMB5F   TTTACATTTTGAAAAATTACAAAGATGAACTCATTTTTCCTGAGAGCAATAACTATTT
*****

```

```

PCK      GGCAATGCACAGCCCTGGCAAAAGGCCGTCGAATGTGTTGAAGGTGTCTGTTGTTGTTT
AMB5F    GGCAATGCACAGCCCTGGCAAAAGGCCGTCGAATGTGTTGAAGGTGTCTGTTGTTGTTT
          *****

PCK      TTGTTTCAGGACGCTTGCGTTTTCTATTTCAGGTGACCTCACATTTCGTGCCCCCTAGCAGC
AMB5F    TTGTTTCAGGACGCTTGCGTTTTCTATTTCAGGTGACCTCATCTTCCCGCCCCAAATTGCC
          *****

PCK      ACTCTGCAGAAATGCCTCCTCAGCTGCAAAACGGCCTGAACCTCTCGGCCAAAGTTGTCC
AMB5F    TTCTCAGACGCGTC--TGAGCCGGACCATGGCGGGCTGCAG-----GNN--
          *      *      *      *      *      *      *      *      *

PCK      AGGGAAGCCTGGACAGCCTACCCCAGGCAGTGAGGGAGTTTCTCGAGAATAACGCTGAGC
AMB5F    NATGGANGAAAAACAGCCGGCCCCACGTGATCAGGGACACTCCCGTGAATGCCCTAAAGA
          * *      *      *      *      *      *      *      *      *

PCK      TGTGTCAGCCTGATCACATCCACATCTGTGACGGCTCTGAGGAGGAGAATGGGCGGCTTC
AMB5F    TGAGTCTGCCTGA-TCTATCCACCTCTGTGAAAAANCTGAGGAGGACAATGGGCGGCTTC
          ** ** *      *      *      *      *      *      *      *      *

PCK      TGGGCCAGATGGAGGAA---
AMB5F    TGNGACACATGGAAGAAGNN
          ** * * *      *      *

```

C. CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

PCR      AAACCTGTGGATCTCCCTTCGAGATCATCCAAAGAGAAGAAAGGTAAGTAGAGCTTTGCA
ABM17F    -----NNNNNANNNNNANANNTANNTAGAGCTTTGCA
          * * *      *      *

PCR      TTTACATTTTGAAAAATTACAAAGATGAACCTATTTTTCCTGAGAGCAATAACTATTT
ABM17F    TTTACATTTTGAAAAATTACAAAGATGAACCTATTTTTCCTGAGAGCAATAACTATTT
          *****

PCR      GGCAATGCACAGCCCTGGCAAAAGGCCGTCGAATGTGTTGAAGGTGTCTGTTGTTGTTT
ABM17F    GGCAATGCACAGCCCTGGCAAAAGGCCGTCGAATGTGTTGAAGGTGTCTGTTGTTGTTT
          *****

PCR      TTGTTTCAGGACGCTTGCGTTTTCTATTTCAGGTGACCTCACATTTCGTGCCCTTAACAGCA
ABM17F    TTGTTTCAGGACGCTTGCGTTTTCTATTTCAGGTGACCTCACATTTCGTGCCCTTAACAGCA
          ***** * *

PCR      ACTCTGCAGAAATGCCTCCTCAGCTGCAAAACGGC---CTGAACCTCTCGGCCAAAGTT
ABM17F    CTCCGGGAGAACCTCCCGCCGAAGTGATGGAGGGAACGCGAACCACGCGGAG-----
          * * *      *      *      *      *      *      *      *

PCR      GTCCAGGGAAGCCTGGACAGCCTACCCCAGGCAGTGAGGGAGTTTCTCGAGAATAACGCT
ABM17F    -----AGGGATCATCTCGAACAAATNCAT
          *      *      *      *      *

PCR      GAGCTGTGTCAGCCTGATCACATCCACATCTGTGACGGCTCTGAGGAGGAGAATGGGCGG
ABM17F    GTGCTGGATCACCTGAAAAAAGAGCAGG-----
          * *      *      *      *      *      *

PCR      CTTCTGGGCCAGATGGAGGAA
ABM17F    -----

```

D. CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

PCR      AAACCTGTGGATCTCCCTTCGAGATCATCCAAAGAGAAGAAAGGTAAGTAGAGCTTTGCA
ABM20F    -----NNNNCANAANNANGTAGTAGAGCTTTGCA
          ... * . . . :*****

PCR      TTTACATTTTGAAAAATTACAAAGATGAACCTATTTTTCCTGAGAGCAATAACTATTT
ABM20F    TTTACATTTTGAAAAATTACAAAGATGAACCTATTTTTCCTGAGAGCAATAACTATTT
          *****

PCR      GGCAATGCACAGCCCTGGCAAAAGGCCGTCGAATGTGTTGAAGGTGTCTGTTGTTGTTT
ABM20F    GGCAATGCACAGCCCTGGCAAAAGGCCGTCGAATGTGTTGAAGGTGTCTGTTGTTGTTT
          *****

PCR      TTGTTTCAGGACGCTTGCGTTTTCTATTTCAGGTGACCTCACATTTCGTGCCCCCTAGCAGC

```

```

ABM20F      TTGTTTCAGGACGCTTGCGTTTTCTATTTCAGGTGACCTCAAATTCGCGCGGA-----CC
            ***** .***** ** . *

PCR          ACTCTGCAGAAATGCCTCCTCAGCTGCAAAACGGCCTGAACCTCTCGGCCAAAGTTGTCC
ABM20F      ACT-----CGCCTGAACCTGTCTCGGCGGAAGCTGGGA
            ***                ***** * ***** .*** ** .

PCR          AGGGAAGCCTGGACAGCCTACCCCAGGCAGTGAGGGAGTTTCTCGAGAATAACGCTGAGC
ABM20F      CAGCAAGCCCGGAGCGCCGCGCAGTGCCGTGAGGGAATTTCTCAACT-----
            ..* ***** ** .*** .* *. . ** .*****.*****.* :

PCR          TGTGTCAGCCTGATCACATCCACATCTGTGACGGCTCTGAGGAGGAGAATGGGCGGCTTC
ABM20F      -ATGTCACCCAGATGTGTCCCCATCTGTCACCGCTCTCAGGAAGAGATCGGACGACGAC
            .***** **:*** : : **.***** ** ***** ***.***: **.***.* :*

PCR          TGGGCCAGATGGAGGAA-----
ABM20F      AGGGGGCGAAGTATGAAAAAATGGAGAAAAAA
            :*** .**:* * ***

```

Anexo 4

Composición de medios empleados

- Medio LB: 10 g/L peptona, 5 g/L extracto de levaduras, 5 g/L NaCl
- *Running buffer* 10x: 30g de Tris, 144g de glicina, y 10g de SDS disueltos en 1000 ml de H₂O. El pH del tampón debería estar en torno a 8,3, y se diluye a 1x antes de su uso.
- Tampón de transferencia 1x: 28,8g de glicina, 6,04g de Tris, 200mL de metanol disueltos en 1,6L de ddH₂O.
- Tampón de carga 2x SLB (10mL): 1mL 1 M Tris-HCl pH 6,8; 4mL 10% SDS; 2 ml glicerol; 2,5mL β-mercaptoetanol; 500 µl 1% azul de bromofenol y hasta 10mL de dH₂O.
- Geles de acrilamida. El gel separador se hizo al 10% de poliacrilamida, mientras que el concentrador al 4%.

	Gel concentrador 4%	Gel separador 10%
Agua	2.8 mL	1,28 mL
Acrilamida/Bisacrilamida	1 mL	3,6 mL
Tris-HCl 1M, pH 6.8	625µL	-
Tris HCl 1M pH 8.8	-	3 mL
SDS al 10%	50µL	80µL
APS al 10%	25µL	40µL
TEMED	5µL	5µL