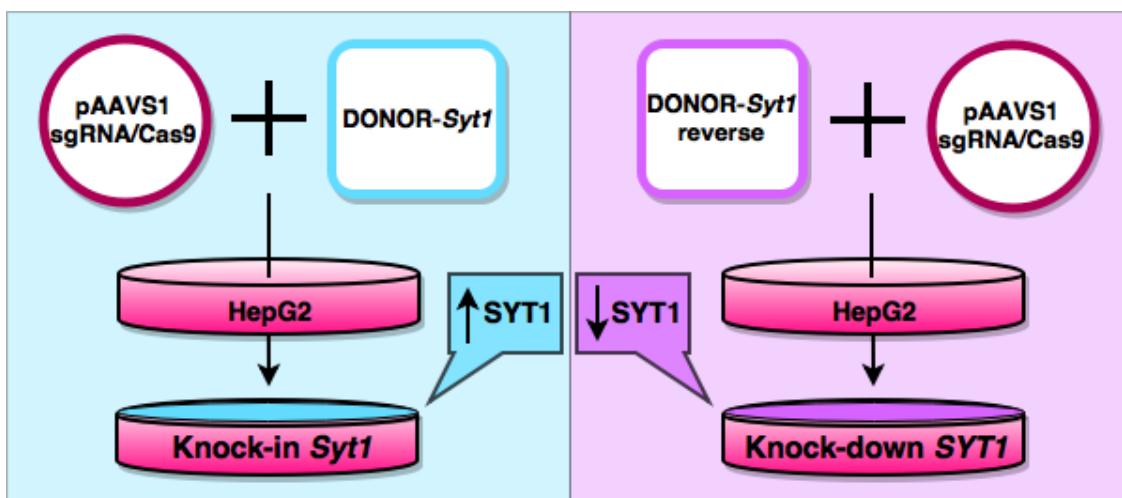


Trabajo Fin de Máster

GENERACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR QUE EXPRESE SINAPTOTAGMINA 1



Autor:

Palau Irisarri, Pablo

Directores:

Osada García, Jesús

Herrera Marcos, Luis Vte.

Rodríguez Yoldi, María Jesús

Máster en Biología Molecular y Celular

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular/
Departamento de Farmacología y Fisiología, Facultad de Veterinaria
Año 2017

ABREVIATURAS

AAVS1	Sitio de integración de los virus adenoasociados 1
AmpR	Gen de resistencia a la ampicilina
bGH-poly (A) signal	Secuencia de poliadelinlación de la hormona de crecimiento bovina
CMV	Promotor citomegalovirus
CRISPR/Cas9	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas asociada con la nucleasa Cas9
crRNA	CRISPR RNA
Cas	Proteína asociada a CRISPR
DMEM	Medio esencial Eagle modificado por Dulbecco
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DSB	Cortes de doble hebra
dsRNA	RNA de doble hebra
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EHGNA	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
EHNA / NASH	Esteatohepatitis
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GFP	Proteína fluorescente verde
HDR	Reparación por homóloga directa
HR	Recombinación homóloga
iRNA	RNA interferente
mRNA	RNA mensajero
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
ORF	Marco abierto de lectura
PAM	Motivos adyacentes a los protoespaciadores
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Ppib	Gen normalizador de expresión ciclofilina B
PuroR	Gen de resistencia a la puromicina
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
S.O.C.	Caldo super optimizado con represor de catabolitos
SFB	Suero Fetal Bovino
sgRNA	RNA guía única
siRNA	RNA interferente pequeño
Syt1	Gen Sinaptotagmina 1 de ratón
SYT1	Gen Sinaptotagmina 1 humana
Syt1	Proteína Sinaptotagmina 1 de ratón
SYT1	Proteína Sinaptotagmina 1 humana
TALEN	Proteína efectora de tipo activador transcripcional fusionada a nucleasas
tracrRNA	RNA trans-activador del CRISPR
ZFN	Nucleasa de dedos de zinc

1. RESUMEN/ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Antecedentes en la manipulación genética	3
2.2 Breve historia del sistema CRISPR/Cas9	4
2.3 CRISPR/Cas como sistema de edición genética	8
2.4 Sobreexpresión Génica	9
2.5 Silenciamiento Génico	10
2.6 Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico	10
2.7 SINAPTOTAGMINA 1 (SYT1)	11
2.8 Modelos celulares de estudio: Células HepG2	13
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAL Y MÉTODOS	15
4.1 Plásmidos	15
4.1.1 pCRII	15
4.1.2 pAAVS1 Donor Vector (DONOR)	16
4.1.3 pAAVS1 sgRNA/Cas9	17
4.1.4 Estrategia de clonaje de <i>Syt1</i> en vectores para el Knock-in y el Knock-out: DONOR- <i>Syt1</i> y DONOR- <i>Syt1</i> reverse	19
4.2 Subclonaje de <i>Syt1</i> en pCRII: Generación de pCRII-<i>Syt1</i> reverse	21
4.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo final (PCR)	22
4.2.2 Electroforesis y purificación	22
4.2.3 Regeneración de la adenina en 3'	23
4.2.4 Ligación de <i>Syt1</i> con el vector pCRII	23
4.2.5 Transformación de <i>E. coli</i> competentes con la reacción de ligación	24
4.2.6 Verificación de la inserción génica en pCRII- <i>Syt1</i> reverse	24
4.3 Clonaje de <i>Syt1</i> en DONOR: Generación de DONOR-<i>Syt1</i>	25
4.3.1 Digestión de pCRII- <i>Syt1</i> reverse y DONOR	26
4.3.2 Ligación de extremos cohesivos de DONOR y <i>Syt1</i>	27
4.3.3 Transformación, selección bacteriana y extracción del DNA plasmídico	27
4.3.4 Verificación de la inserción génica en DONOR- <i>Syt1</i>	27

4.4 Verificación funcional de DONOR-<i>Syt1</i> en HepG2	28
4.4.1 Extracción de RNA celular	28
4.4.2 Purificación del RNA	29
4.4.3 Retrotranscripción a DNA complementario	29
4.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR)	30
4.5 Clonaje de <i>Syt1</i> reverse en <i>DONOR</i>: Generación de DONOR-<i>Syt1</i> reverse	31
4.5.1 Clonaje por recombinación: In-Fusion HD Cloning	31
4.5.1.1 Diseño cebadores y linealización de DONOR	31
4.5.1.2 In-Fusion PCR de <i>Syt1</i> reverse	32
4.5.1.3 Recombinación de <i>Syt1</i> reverse con DONOR linealizado	33
4.5.2 Transformación, selección bacteriana y extracción del DNA plasmídico	33
4.5.3 Verificación de la inserción génica en DONOR- <i>Syt1</i> reverse	34
4.6 Cultivo celular	35
4.6.1 Manejo y condiciones de cultivo	35
4.6.2 Mantenimiento de la línea celular HepG2	35
4.6.3 Tripsinización de los cultivos	35
4.6.4 Transfección de DONOR- <i>Syt1</i> , DONOR- <i>Syt1</i> reverse y pAAVS1 sgRNA/Cas9	36
4.6.5 Selección con puromicina	37
4.7 Herramientas bioinformáticas	37
5. RESULTADOS	39
5.1 Subclonaje de <i>Syt1</i> en pCRII: Generación de pCRII-<i>Syt1</i> reverse	39
5.2 Clonaje de <i>Syt1</i> en <i>DONOR</i>: Generación de DONOR-<i>Syt1</i>	40
5.3 Verificación funcional de DONOR-<i>Syt1</i> en HepG2	42
5.4 Clonaje de <i>Syt1</i> reverse en <i>DONOR</i>: Generación de DONOR-<i>Syt1</i> reverse	42
5.5 Verificación de la inserción genómica de <i>Syt1</i> y <i>Syt1</i> reverse	44
6. DISCUSIÓN	46
6.1 Clonaje clásico vs clonaje por recombinación	46
6.2 Perspectivas futuras: estudio Funcional de SYT1	46
6.3 Células HepG2: limitaciones y alternativas	47

7. CONCLUSIONES	49
8. AGRADECIMIENTOS	50
9. BIBLIOGRAFÍA	51

1. RESUMEN

El sistema de edición génica CRISPR/Cas9 ha originado una revolución en el ámbito científico en los últimos años, compuesto por la nucleasa Cas9 y una guía RNA de 20 nucleótidos, produce un corte de doble hebra dirigido en el DNA de cualquier organismo.

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es la forma más común de las enfermedades hepáticas, llegando a tener una prevalencia superior a un 25% en algunos grupos étnicos en la sociedad occidental. A pesar de que su prevalencia va en aumento, los mecanismos moleculares desencadenantes por los cuales el hígado se vuelve esteatósico siguen sin aclararse. Miembros del grupo encontraron asociación entre la expresión de *Sinaptotagmina 1 (Syt1)*, una proteína vesicular involucrada en procesos de endo/exocitosis en tejidos neuroendocrinos y la esteatosis hepática.

En el presente trabajo se emplea el sistema CRISPR/Cas9 para generar dos poblaciones diferenciadas a partir de las células hepáticas cancerígenas humanas HepG2. La primera población presenta una sobreexpresión de *Syt1*, gracias a la co-transfección de los plásmidos DONOR-*Syt1* y AAVS1 sgRNA/Cas9. La segunda población expresa un silenciamiento génico de *SYT1*, originado por la co-transfección de los plásmidos DONOR-*Syt1* reverse y AAVS1 sgRNA/Cas9. Se siguieron diferentes métodos para el diseño de ambas construcciones plasmídicas, usando correspondientemente la técnica de clonaje clásica y el clonaje por recombinación. Los exámenes fenotípicos de las poblaciones resultantes de este trabajo servirán para dar un paso más en el camino hacia la comprensión de los mecanismos moleculares de la EHGNA.

1. ABSTRACT

CRISPR/Cas9 genome editing system has been a revolution in the scientific world in the last years, composed by the nuclease Cas9 and a single guide RNA produces a specific double strand break in any organism.

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common form of liver disease, reaching a prevalence of over 25% in some ethnic groups in western society. Although its prevalence is increasing, the molecular mechanisms that cause the liver to become steatotic remain unclear. Members of the group found an association between the expression of *Sinaptotagmin 1 (Syt1)*, a vesicular protein involved in endo / exocytosis processes in neuroendocrine tissues and hepatic steatosis.

In this study, the CRISPR / Cas9 system is used to generate two differentiated populations from HepG2 human cancer hepatic cells. The first population presents an overexpression of *Syt1*, thanks to the co-transfection of the plasmids DONOR-*Syt1* and AAVS1 sgRNA / Cas9. The

second population expresses a gene silencing of SYT1, originated by the co-transfection of the plasmids DONOR-Syt1 reverse and AAVS1 sgRNA / Cas9. Different methods for the design of both plasmid constructions were followed, using the classical cloning technique and recombination cloning. The phenotypic examinations of the populations resulting from this work will go a step further in the understanding of the molecular mechanisms of NAFLD.

2. INTRODUCCIÓN

El sistema de edición génica CRISPR/Cas9 ha originado una revolución en el ámbito científico en los últimos años. Gracias a la simpleza y especificidad de su complejo de corte, esta herramienta molecular se ha convertido en la técnica de edición genética más eficaz, barata, específica y fácil de utilizar jamás creada. Compuesto por la nucleasa Cas9 y una guía RNA de 20 nucleótidos, produce un corte de doble hebra dirigido en el DNA de cualquier organismo.

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) se ha convertido en la enfermedad hepática más frecuente tanto en adultos como en niños, llegando a tener una prevalencia superior a un 25% en algunos grupos étnicos en la sociedad occidental [1]. Aunque su prevalencia va en aumento, todavía siguen sin aclararse los mecanismos por los cuales el hígado se vuelve esteatósico [2]. Usando modelos nutricionales y genéticos de esteatosis hepática en ratones, junto con el análisis de microarray y su confirmación por qPCR, miembros del grupo encontraron asociación entre la expresión de *Sinaptotagmina 1* (*Syt1*), una proteína vesicular involucrada en procesos de endo/exocitosis en tejidos neuroendocrinos [3, 4], y la esteatosis hepática [5].

El presente trabajo se sirve de la herramienta molecular CRISPR/Cas9 para profundizar en el estudio funcional de *Syt1* hepático a nivel molecular y celular. Esto es posible gracias a miembros anteriores del grupo, que lograron caracterizar la *Sinaptotagmina 1* hepática de ratón y clonar de su secuencia codificante en un vector de expresión [6], y que pusieron a punto la mencionada herramienta de edición génica en el grupo [7].

Empleando el sistema de edición genética CRISPR/Cas9 se han generado dos poblaciones diferenciadas a partir de las células hepáticas cancerígenas humanas HepG2: la primera con sobreexpresión de *Syt1* hepático de ratón, y la segunda con silenciamiento génico de *SYT1*. Al presentar el *SYT1* humano y el *Syt1* de ratón alta homología (90%), los exámenes fenotípicos realizados en las poblaciones resultantes de este trabajo servirán como estudios para aclarar el papel de este gen en la esteatosis hepática humana. Este trabajo servirá para dar un paso más en el camino hacia la comprensión de los mecanismos moleculares y la fisiopatología de la EHGNA, enfermedad cada vez más importante en la sociedad occidental actual.

2.1 Antecedentes en la manipulación genética

La capacidad para la manipulación del DNA ha sido un paso verdaderamente importante para la comunidad científica. Desde la sobreexpresión o inhibición específica de genes hasta la modificación a antojo de su secuencia, la manipulación del genoma puede proporcionar nuevos modelos de enfermedades, identificar nuevas dianas para tratamientos médicos, facilitar una mayor comprensión del genoma y sus mecanismos, o aumentar la rentabilidad de la producción

animal, vegetal o microbiana. Sin embargo, conseguir cambios específicos en el genoma ha sido uno de los mayores retos de la genética [8].

Durante décadas, la mayor parte de las modificaciones genéticas se basaban en enfoques estocásticos, en las cuales el transgén se podía integrar aleatoriamente dentro del genoma hospedador, dando lugar en muchos casos una expresión génica poco eficiente [9]. Esto cambio en 1989, cuando Oliver Smithies, Mario R.Capecchi y Martin Evans crearon el primer ratón knockout gracias a la recombinación genética homóloga en células madre embrionarias (ES) [10, 11]. Esta técnica proporcionaba una solución para el problema de la inserción aleatoria, pero el uso de células ES estuvo limitado durante muchos años para ratón [12]. No fue hasta el desarrollo de la transferencia nuclear de células somáticas a embriones enucleados (SCNT) que fue posible alterar directamente locis en otras especies [13], realizando mediante esta técnica la primera clonación en mamíferos en 1996 con la oveja Dolly [14]. Sin embargo, estas dos técnicas requerían largos y laboriosos protocolos únicamente al alcance de laboratorios de referencia.

La introducción de las nucleasas de edición-genética produjo un gran avance en este campo, la primera fue la nucleasa de dedos de zinc, ZFN. Con el uso de los ZFNs se pudo editar correctamente genes específicos por recombinación homóloga en varios organismos [15] incluso corregir la mutación en humanos de un gen causante de la Inmunodeficiencia combinada grave (SCID) [16]. Pero el trabajo con estas nucleasas resultaba demasiado lento y meticuloso para ser rentable. La nueva propuesta que surgió en 2009 eran unas proteínas efectoras de tipo activador transcripcional fusionadas a nucleasas (TALENs) (17). Pero a pesar de su alta efectividad [18] la técnica requería de excesivo trabajo, necesitando sintetizar una nueva proteína para cada gen diana. En 2012 aparece la última herramienta molecular de edición genética conocida, CRISPR/Cas9. Consiste en cortas repeticiones palindrómicas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) asociada con la nucleasa Cas9 [19, 20]. Este sistema resultó ser una técnica excelente para dirigir cualquier modificación genética, permitiendo alterar genes de forma específica, eficaz, sencilla y económica. Semejante descubrimiento revolucionó el mundo de la ingeniería genética en particular y el de la ciencia en general, permitiendo el acceso de la modificación genética a casi cualquier grupo de investigación del mundo, antiguamente reservado tan solo a los grupos más punteros.

2.2 Breve historia del sistema CRISPR/Cas9

La primera mención a CRISPR, que consiste en secuencias de DNA presentes en muchos microorganismos, tuvo lugar en 1987, cuando el grupo japonés de Nataka las encontró por azar mientras descifraba el genoma de una de las bacterias más comunes, *Escherichia coli* [21]. Sin embargo, apenas les dieron importancia.

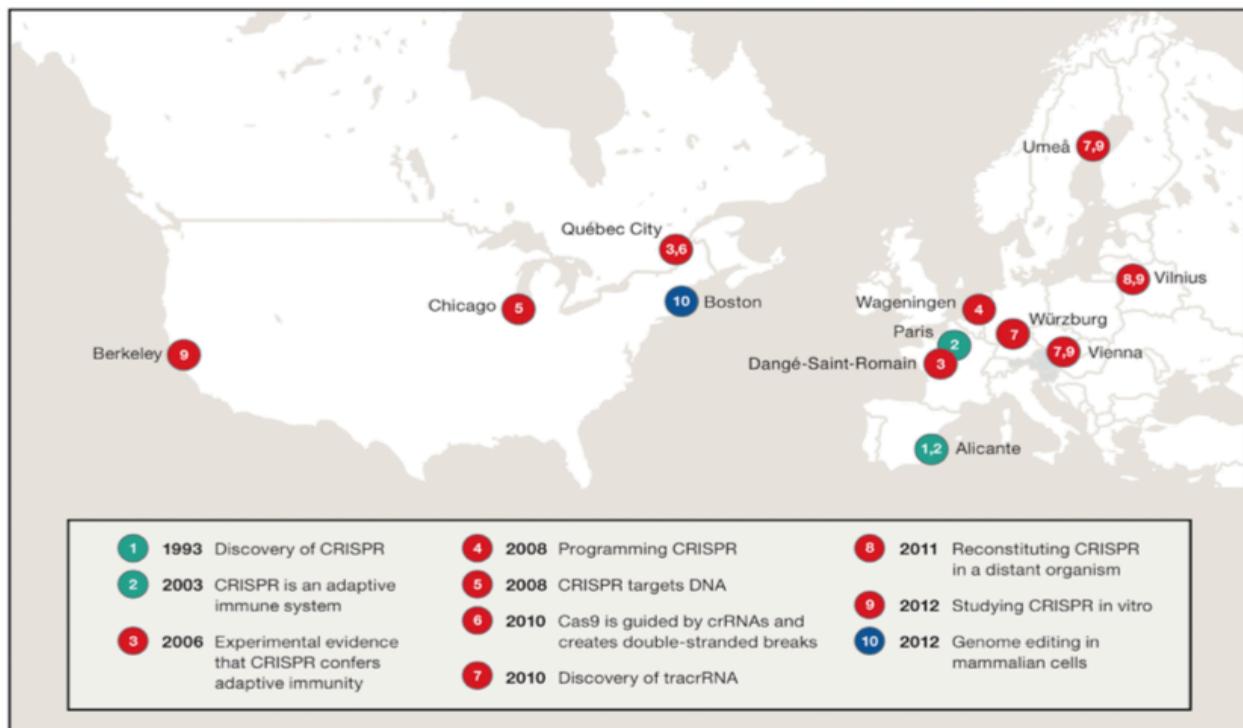


Figura 1. Historia del CRISPR a través de 20 años y 12 ciudades en 9 países diferentes. Fuente: [22]

En 1993 Francis Mojica las volvió a encontrar mientras analizaba el genoma de la arquea *Haloferax mediterranei* para comprender los mecanismos evolutivos que le habían permitido adaptarse a la alta salinidad en las salinas de Santa Pola (Alicante). A partir de entonces fue encontrando elementos similares de repetición en otras arqueas y bacterias, y en el año 2000 identificó estas cortas repeticiones procariotas, designándolas como SRSR (Repeticiones cortas regularmente espaciadas o Short Regularly Spaced Repeats) [23]. Usando rudimentarios análisis bioinformáticos para estas secuencias SRSR encontró que eran parcialmente palindrómicas y se agrupaban en clusters, intercalados regularmente mediante unas secuencias espaciadoras y únicas, de longitud constante, similares a la de las repeticiones. En 2002 un equipo de microbiólogos holandeses aceptó la propuesta enviada por el grupo de Mojica para nombrar estas secuencias como CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas o clustered regularly interspaced short palindromic repeats) [24]. Sin embargo, todavía no había evidencia de la función de estas secuencias.

En 2003 Mojica encontró en estas secuencias el fragmento de DNA de un bacteriófago, y se comprobó que las bacterias que portaban secuencias homólogas a fagos eran resistentes a su infección, descubriendo su función immunológica. Las revistas científicas achacan insuficiente novedad e importancia al descubrimiento, por lo que no pudo publicarse hasta dos años después [25]. El mismo problema se le presentó a Gilles Vergnaud, genetista francés que llegó a la misma conclusión que Mojica, recibiendo hasta cuatro rechazos antes de poder publicar el hallazgo [26]. En 2006 el doctorando Philippe Horvath demostró que la resistencia a la infección por

bacteriófagos podía ser desarrollada en cepas sensibles a través de la adquisición de secuencias espaciadoras homólogas al genoma viral. Así, se confirmó experimentalmente que CRISPR confiere inmunidad adaptativa [27].

En 2008 se caracterizó el sistema CRISPR, encontrando 5 complejos de proteínas Cas y una gran cantidad de pequeños CRISPR RNAs o crRNA. Mediante arrays de CRISPR realizados en procariotas se reveló el papel crucial en la defensa antiviral de estos crRNA [28]. Posteriormente el doctorando Luciano Marraffini comprobó que el sistema CRISPR podía interferir con la transferencia horizontal de plásmidos a través del reconocimiento de este DNA extraño [29-30]. Marraffini modificó la secuencia intrónica de CRISPR y demostró que la diana del CRISPR era el DNA y no el mRNA como otros pensaban, siendo el primero en proponer este sistema como herramienta de edición génica.

En 2010 estudiando la interferencia de plásmidos en *Streptococcus Thermophilus* donde CRISPR solo proporcionaba parcial protección contra los plásmidos transformados por electroporación, descubrieron que el corte dependía de la nucleasa Cas9 y la importancia de los motivos PAM (protoespaciadores de motivos adyacentes o protospacers adjacent motifs) [31]. Estas secuencias que se encontraban upstream o en 5' de las secuencias espaciadoras ya se habían caracterizado en publicaciones anteriores (32, 33), y demostraron ser los sitios preferenciales de las Cas, permitiendo al sistema discernir entre DNA propio y extraño. Estos resultados ayudaron a demostrar definitivamente que la nucleasa Cas9 era la responsable de causar cortes de doble hebra (DSB) en el DNA, en posiciones precisas guiada por la secuencia específica de los crRNAs (34).

Ese mismo año, mediante la secuenciación masiva, Emmanuelle Charpentier y Jörg Vogel encontraron un nuevo y pequeño RNA, cuya secuencia estaba contigua al locus CRISPR, y tenía 25 bases complementarias a las repeticiones del CRISPR. Experimentos con delecciones genéticas mostraron que este RNA era esencial para procesar crRNAs y para la función del CRISPR, por lo que le nombraron tracrRNA, RNA trans-activador del CRISPR o trans-activating CRISPR RNA [35]. Charpentier y Jennifer Doudna demostraron posteriormente que el tracrRNA era esencial para la funcionalidad de la nucleasa Cas9 [36].

Más tarde reconstruyeron el sistema CRISPR/Cas9 de *S. thermophilus* completamente funcional en otro microbio muy distante a este, *E. coli*, probando que Cas9 es la única proteína requerida para la interferencia de DNA, y que sus dominios RuvC- y HNH- son esenciales para la interferencia genómica (Fig. 2) [37]. Esto permitió en 2012 reproducir *in vitro* el sistema CRISPR/Cas9 de *Streptococcus. pyogenes* con tan solo la nucleasa Cas9, el crRNA y el tracrRNA, consiguiendo dirigir el complejo para realizar un corte DSB en una región DNA específica, homóloga a la secuencia espaciadora de crRNA [38]. El mismo estudio mostró como el tracrRNA y crRNA (Fig. 2.A) pueden ser fusionados en una única molécula sgRNA, RNA guía única o single guide RNA (Fig. 2.B), un RNA sintético y químérico que mantiene las propiedades

de los dos originales RNAs. Este hallazgo simplificaba aún más el mecanismo y el uso de esta nucleasa RNA-dirigida como una herramienta programable para la edición genómica

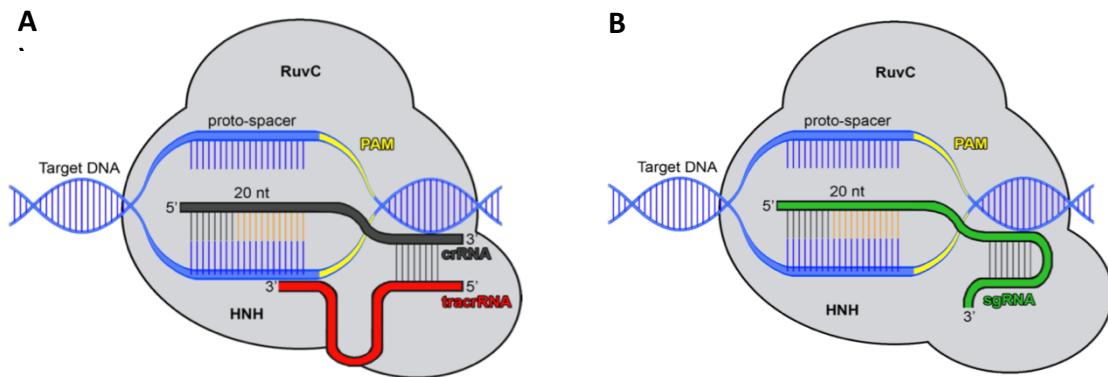


Fig. 2. Modelos de CRISPR/Cas como A) sistema inmunitario procariota. Cas9 (gris) es activada por crRNA (negro) y tracrRNA (rojo). La Cas9 se dirige al sitio de escisión específico del DNA diana, guiado por el crRNA. Cuando la secuencia específica del crRNA se complementa con el DNA guía, este invade la zona entre el crRNA y el proto-espaciador en presencia de la secuencia PAM adyacente (amarillo). El dominio HNH- y RuvC se unirá al DNA guía, destruyendo así el DNA guía. B) sistema eucariota de edición genética. Cas9 (gris) es programada con un sgRNA (verde), que cumple el mismo mecanismo que el crRNA y el tracrRNA en el sistema procariota. Imágenes modificadas de [39]

Ya se había optimizado el sistema de edición génica para su uso en procariotas, pero para poder usarla en mamíferos, era necesario mejorar la nucleasa Cas9, optimizando sus codones y su señal de localización nuclear para un uso adecuado en la célula eucariota. De esto se encargó el investigador Feng Zhang, optimizando la Cas9 derivada de *S. Pyogenes* y consiguiendo manipular con éxito el genoma mamífero en 2012 [40]. Desde ese momento y gracias a la distribución de sus reactivos por la organización sin ánimo de lucro Addgene a más de 25.000 peticiones en tres años, aumentaron y mejoraron los casos de edición génica en células humanas. Ya sea con recombinación homóloga o no homóloga [41], en una diana genómica [42] o en varias [43], pero siempre con un porcentaje poco eficaz de cortes DSB. Keith Joung volvió a optimizar el sistema usando sgRNA de larga longitud, produciendo eficientes delecciones en la línea germinal del pez cebra [44]. Finalmente, gracias al sistema CRISPR/Cas9 optimizado, se pudo editar con éxito el genoma de varios organismos como la mosca de la fruta, pez cebra, ratón o mono en menos de un año. El sistema de edición genética CRISPR/Cas9 había llegado.

Este mecanismo de inmunidad procariota descubierto por el microbiólogo alicantino Francis Mojica en 2003 se ha convertido en la técnica de edición genética más eficaz, barata, específica y fácil de utilizar jamás creada. El perfeccionamiento de la técnica a lo largo de 20 años y diversos investigadores, ha permitido la aplicación de esta herramienta molecular en innumerables y diversos campos. Un ejemplo es la modificación genética mediante CIRPSR/Cas9 de los linfocitos T de un paciente con cáncer de pulmón con aparente reversión tumoral [45], o la modificación de embriones humanos viables con cardiomiopatía hipertrófica, revertiendo la

mutación del gen MYBPC3, causante de esta patología [46]. También se ha usado el sistema CRISPR/cas9 para el estudio del genoma y sus mecanismos, pudiendo analizar con relativa facilidad grandes fragmentos del genoma que se creían inservibles como los RNA largos no codificantes, descubriendo su importancia biológica [47]. O incluso para intentar devolver a la vida a especies animales extintas, como anunció desde Harvard uno de los investigadores que contribuyó a la optimización del sistema CRISPR, George Church, para “des-extinguir” el mamut lanudo de aquí a dos años [48]. Se abre un potencial tan extraordinario para el sistema CRISPR/Cas9, que solo el futuro podrá esclarecer.

2.3 CRISPR/CaS 9 como sistema de edición genética

Tres sistemas CRISPR han sido identificados en bacterias: tipo I, II y III. El sistema CRISPR tipo II, debido a su relativa sencillez, fue el que terminó siendo adaptado para ser usado como herramienta de edición genética. Está compuesto por cuatro genes *cas* (proteína asociada a CRISPR), la agrupación de locis CRISPR y una zona de codificación para el tracrRNA. Como se ha descrito anteriormente, se optimizaron los codones de la nucleasa Cas9 y se creó el sgRNA, simplificando el sistema para poder reunirlo en un mismo plásmido y transfectarlo en células eucariotas (Fig. 3).

La capacidad de unión específica del complejo Cas9-sgRNA al DNA, permite dirigir el corte a la secuencia deseada y producir un DSB. Este es reparado por mecanismos celulares, a través de la ruta predeterminada de unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la ruta de reparación homóloga directa (HDR). Al añadir moléculas adicionales de DNA cuyas secuencias sean idénticas a la región próxima al DSB, se aumenta significativamente la posibilidad de HDR en comparación con la recombinación homóloga realizada hace años, permitiendo añadir un inserto en el sitio deseado (Knock-in). La inserción de un gen también puede producir un Knock-down del gen reverso, o incluso un Knock-out para otro gen. Cuando estas secuencias adicionales homólogas no están presentes, se inicia la ruta HDR, resultando en inserciones o delecciones (indels) que rompen el marco de lectura del gen, inhibiendo su transcripción y su función (Knock-out) (Fig. 4).

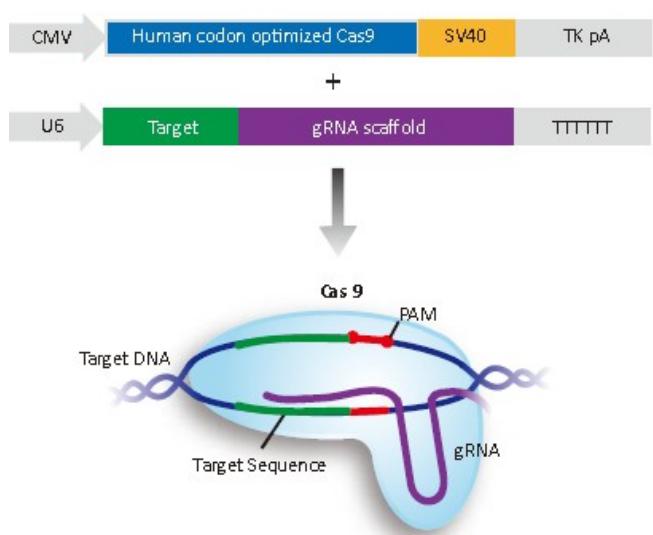


Fig. 3: Componentes del sistema CRISPR/Cas de edición genética. Contiene dos elementos que pueden ser transfectados en un mismo plásmido: la nucleasa Cas9 con codones optimizados y el sgRNA. Fuente [7]

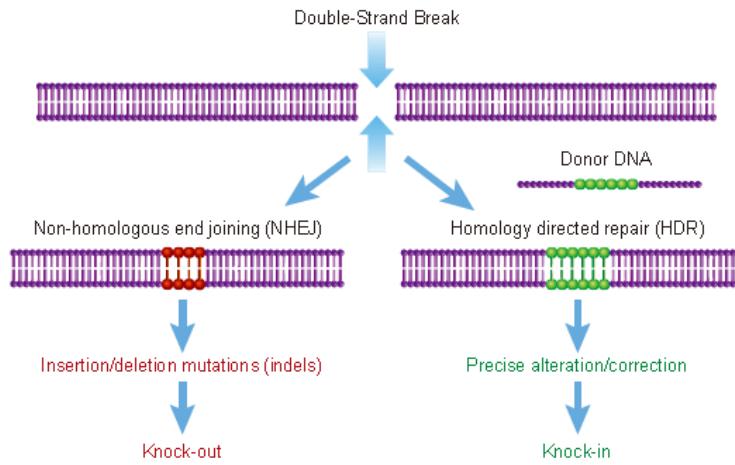


Fig. 4: Esquema de los mecanismos celulares de reparación de un DSB. El mecanismo NHEJ produce la inserción o delección de nucleótidos (indels), produciendo un Knock-out del gen. La reparación por HDR, en presencia de DNA homólogo a las secuencias que flanquean el DSB, lleva a cabo la reparación introduciendo secuencias exógenas, produciendo un Knock-in del gen. Fuente [7]

2.4 Sobreexpresión Génica

La sobreexpresión génica consiste en un aumento de la expresión de un gen. Puede causar fenotipos mutantes, proporcionando una útil herramienta para identificar mecanismos indetectables mediante el análisis tradicional de pérdida de función o Knock-out [49]. Uno de los mecanismos más frecuentes para realizar una sobreexpresión consiste en la inserción del gen en el genoma, llamado Knock-in. Las aplicaciones de la sobreexpresión génica para detectar interacciones y nuevas rutas biológicas se basan en su simplicidad, en la sobreexpresión de un gen normal en un fondo genético normal.

Los estudios de sobreexpresión tienen varias implicaciones para la salud humana ayudando a comprender las causas y tratamientos de las enfermedades. Existen numerosos ejemplos en los que las enfermedades humanas son causadas directamente por el aumento de la expresión génica [50], destacando la importancia de comprender los mecanismos por los que la sobreexpresión puede causar fenotipos mutantes. Incluso cuando la sobreexpresión no causa enfermedades manifiestas, los cambios en los patrones de expresión de genes pueden contribuir a la variación fenotípica, la diversidad y la evolución [51]. La comprensión de que la sobreexpresión puede causar fenotipos mutantes, incluyendo enfermedades en los seres humanos, acentúa la importancia de establecer niveles correctos de expresión en estrategias de terapia génica [52].

2.5 Silenciamiento Génico

El silenciamiento génico o Knock-down consiste en la reducción de la expresión de un gen, a nivel transcripcional (TGS) o post-transcripcional (PTGS) [53]. Mediante esta regulación epigenética, se reduce la expresión de un gen específico sin llegar a la inhibición completa como en el caso del Knock-out. El silenciamiento génico es útil para estudiar genes esenciales cuyo Knock-out es incompatible con la vida, o estudiar enfermedades asociadas con la reducción de la expresión de ciertos genes. También es una herramienta útil en el estudio genómico funcional al compararlo con un control o una sobreexpresión génica, permitiendo medir la función del gen de estudio a varios niveles.

El mecanismo de silenciamiento génico más frecuente a nivel TGS es la metilación de DNA, y a nivel PTGS, la interferencia por iRNA (RNA interferente) o siRNA (RNA interferente pequeño) [54]. La interferencia por iRNA consiste en generar o introducir RNA de doble hebra (dsRNA) en una célula. Esta lo reconoce y le conecta a una endorribonucleasa llamada Dicer. El dsRNA es cortado por la RNasa Dicer, resultando fragmentos de unos 20 nucleótidos llamados siRNAs. Estos reducidos siRNAs se incorporan en un complejo con múltiples componentes, denominado RISC (Complejo de silenciamiento inducido por RNA). El complejo RISC tiene que ser activado (RISC*) a partir de una forma latente, mediante el desapareamiento de las dos hebras de los siRNAs. RISC* utiliza la hebra antisentido del siRNA como guía para seleccionar su diana, el mRNA complementario de la hebra de siRNA presente en el complejo. A continuación, RISC* promueve el corte y posterior destrucción del mRNA blanco, provocando la disminución de la expresión del gen diana [54].

2.6 Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) se define como una acumulación excesiva de grasa en el citoplasma de los hepatocitos en forma de triglicéridos. La causa es un desequilibrio entre la síntesis y la secreción de lípidos al torrente sanguíneo [55]. La EHGNA es una condición crónica e incluye un espectro de patologías desde la esteatosis hepática simple (acumulación de grasa hepática superior al 5,5% medido por resonancia magnética [56] o superior al 5% de la masa total del hígado valorado por biopsia [57] hasta la esteatosis con inflamación (esteatohepatitis o EHNA o NASH), la cirrosis y, finalmente, el carcinoma hepatocelular [58].

La prevalencia de la enfermedad de hígado graso no alcohólico oscila en un rango entre 9-36,9% de la población en diferentes partes del mundo [59, 60]. La EHGNA es la forma más común de las enfermedades hepáticas en la sociedad occidental, la prevalencia en la población occidental general se estima en un 20-30% llegando a ser del 90-95% en pacientes obesos [61]. En los Estados Unidos el 20% de la población sufre esta patología y su prevalencia va en aumento

[62], llegando a ser superior a un 25% en la población hispana [63]. La sobrealimentación, la baja actividad física, la resistencia a la insulina y los factores genéticos son los principales factores de riesgo de una enfermedad cuya prevalencia va en aumento y donde los mecanismos moleculares desencadenantes por los cuales el hígado se vuelve esteatósico siguen sin aclararse [2].

Usando modelos nutricionales (dieta occidental enriquecida con los isómeros c9, t11-CLA o t10, c12-CLA o dietas normales suplementadas con un 10% de aceite de oliva) y genéticos de esteatosis hepática en ratones (ratones *Apoe*- y *Cbs*-deficientes, estos últimos hiperhomocisteinémicos), junto con el análisis de microarray y su confirmación por técnicas de qPCR, miembros del grupo encontraron asociación entre la expresión de *Sinaptotagmina 1* (*Syt1*), una proteína vesicular involucrada en procesos de endo/exocitosis en tejidos neuroendocrinos [3, 4], y la esteatosis hepática [5].

2.7 Sinaptotagmina 1 (SYT1)

Las sinaptotagminas (SYTs) constituyen una familia de proteínas participes en el tráfico en las membranas [64], caracterizadas por un grupo amino (N) terminal, una región variable central y dos dominios carboxilo (C) terminales, C2A y C2B [65], destinados a unir Ca^{2+} y fosfolípidos [3], con una gran similitud estructural al dominio C2 de la proteína quinasa C [66]. La familia de las SYTs participa en el acoplamiento y la fusión de membranas de vesículas en células neuronales y no neuronales como macrófagos [67], células β secretoras de insulina [68], osteoblastos y osteoclastos [69], y células caliciformes secretoras de mucina de las vías respiratorias [70].

Sinaptotagmina 1 (SYT1) fue identificada por primera vez usando un anticuerpo monoclonal para la detección de proteínas sinápticas [71]. Es una proteína integral de membrana de 65 kDa, asociada a balsas lipídicas [72] a través de su dominio transmembrana palmitoilado

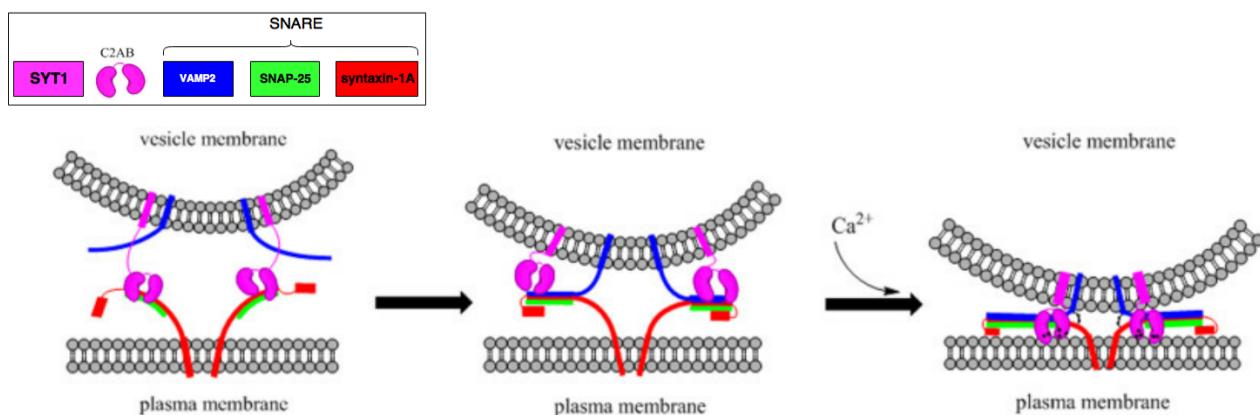


Fig. 5: Esquema del papel de SYT1 en la fusión de vesículas durante la sinápsis. Durante la exocitosis, sinaptotagmina 1 interactúa con el complejo proteico SNARE, mediando la fusión de la vesícula con la membrana presináptica en presencia de Ca^{2+} gracias a sus dominios C2AB.. Adaptada de [80].

[73] en vesículas sinápticas y gránulos secretores. SYT1 es una de las proteínas más ampliamente estudiadas en las neuronas por la función que desempeña actuando como sensor de calcio durante la exocitosis de las vesículas sinápticas [74], su importancia radica en que el calcio desencadena la fusión rápida de las vesículas [75-77]. Además, está involucrada en endocitosis, interactuando con el complejo proteico AP2, a través de su dominio C2B [78, 79] antes de la internalización de las membranas.

En la última década se ha visto que SYT1 podría estar jugando un papel importante en tejidos no neuronales. Mediante análisis por qPCR de la expresión en mRNA de *Syt1* en ratón, miembros del grupo demostraron que *Syt1* se expresa en la totalidad de los tejidos que fueron examinados. Los valores más altos corresponden a cerebro, seguidos del hígado, bazo, grasa abdominal, intestino y músculo esquelético [6]. Otros autores descubrieron diferentes funciones de SYT1 en los otros tejidos, como regular el transportador $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ (NHE3) en la membrana apical [81], siendo necesario para la endocitosis en las células epiteliales intestinales [82], o participando en la regulación homeostática en células renales [83]. Estos resultados muestran que *SYT1* presenta funciones específicas dependientes del tejido donde se expresa, y al tener una distribución tan amplia, sugiere un papel esencial en otra función biológica.

Como se ha explicado anteriormente, se encontró que la expresión de *Syt1* hepático está asociada a esteatosis hepática [5]. Se identificó y secuenció el mRNA de *Syt1* hepático de ratón [6], llevando a cabo una caracterización completa del transcripto hepático (número de acceso del European Nucleotide Archive (ENA): FR827897). El marco de lectura abierto de 1266 pb codifica una proteína de 421 aminoácidos, idéntica a la del cerebro, y altamente conservada en diferentes especies. Al resultar la proteína codificada idéntica a la del cerebro, se sugirió algún tipo de modificación postraduccional. El descubrimiento y caracterización de *Syt1* hepático puede proporcionar nuevos conocimientos sobre el metabolismo hepático, pero se requieren de estudios adicionales para establecer su importancia.

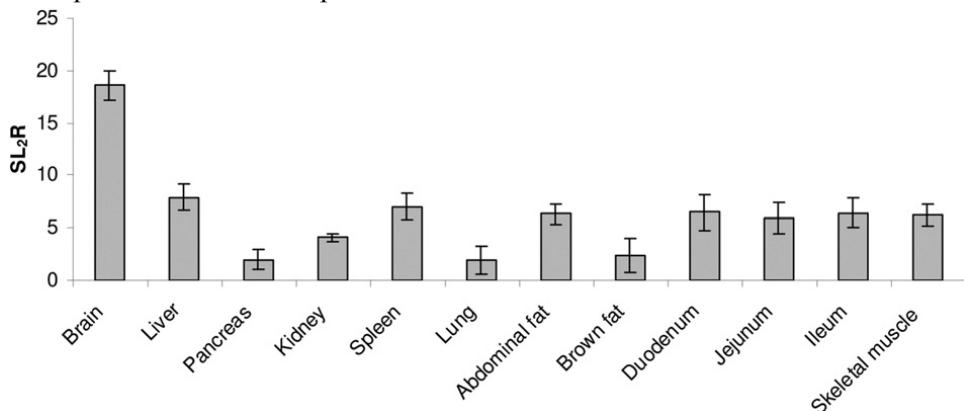


Fig. 6. Análisis cuantitativo por reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real de la expresión de *Syt1* mRNA en varios tejidos. Los datos se expresan como una relación logarítmica de la expresión (SL2R, eje vertical) de los cambios de expresión de *Syt1* de cada tejido normalizado con gen normalizador de expresión ciclofilina B (eje horizontal) y utilizando la expresión de *Syt1* en corazón como referencia. Fuente [6]

2.8 Modelos celulares de estudio: Células HepG2

La línea celular HepG2, derivada de hepatoblastoma humano, es un modelo de estudio *in vitro* comúnmente empleado [84], ya que en las células persisten una gran parte de las funciones celulares de los hepatocitos normales [85], como la expresión de receptores de superficie celular específicos del hepatocito y la síntesis y secreción de proteínas plasmáticas [86, 87]. Además, se ha demostrado recientemente que el transcriptoma hepático humano tiene una gran correlación ($r= 0,791$) con el de las células HepG2 [88]. Son células adherentes, que crecen en monocapa y en pequeños agregados.

3. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes y resultados obtenidos por miembros del grupo, los objetivos del presente trabajo fueron los siguientes:

1. Construir los plásmidos DONOR-*Syt1* y DONOR-*Syt1* reverse.
2. Crear una población de células HepG2 con un Knock-in de *Syt1* para sobre-expresar SYT1.
3. Crear una población de células HepG2 con un Knock-down de *SYT1* para reducir la expresión de SYT1.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Plásmidos

Un plásmido es una molécula de DNA extracromosómico circular de doble hebra, que se replica y transmite independientemente del DNA cromosómico. Usados como vectores, los plásmidos nos permiten clonar fragmentos de DNA exógeno para transfectarlos posteriormente en células. En este trabajo se utilizarán los plásmidos como herramienta para clonar y amplificar los genes deseados: el gen de estudio *Syt1*, y los genes necesarios para el sistema CRISPR/Cas9, la Cas9 y los sgRNA, para finalmente transfectar las células diana HepG2.

4.1.1 pCRII

Para clonar un gen en un vector, el primer paso será amplificar el gen por PCR e insertarlo en el plásmido. Para simplificar este paso, se realizará un subclonaje en el plásmido pCRII, diseñado para incorporar directamente el producto de una PCR sin necesidad de enzimas de restricción. Contenido en el kit de INVITROGEN “TA cloning kit”, se basa en el fundamento de la adición de una deoxiadenosina (A) al extremo 3' de los productos de PCR por una Taq polimerasa. El vector linealizado del kit presenta residuos 3' desoxitimidina (T), permitiendo una ligación directa y eficiente de los insertos de PCR con el vector (Fig. 7).

Además de los residuos deoxinucleosídicos, el plásmido pCRII presenta genes de resistencia a kanamicina y ampicilina para la selección bacteriana (Fig. 8).

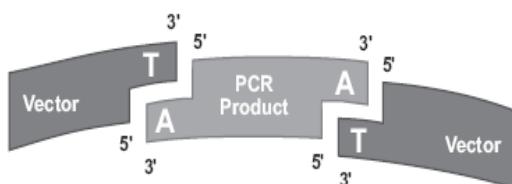


Fig. 7. Diagrama del concepto en el que se basa el kit TA cloning. Fuente: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/tadual_man.pdf

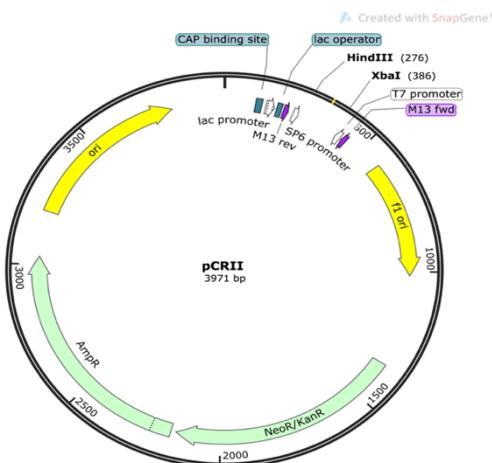


Fig. 8. Mapa del plásmido pCRII. Se muestra las enzimas de restricción usadas en este trabajo en su posición de corte, el gen de resistencia a ampicilina (AmpR) y otros componentes del plásmido como los promotores Lac, T7 y Sp6, o el punto de replicación independiente (ori).

4.1.2 pAAVS1 Donor Vector (DONOR)

Para introducir el gen en las células diana se necesitará un vector de expresión, como el plásmido pAAVS1 Donor Vector. Este vector (llamado en adelante DONOR) se encuentra dentro del kit de Genecopoeia “Genome-CRISPR™ Human AAVS1 Safe Harbor Gene Knock-in Kit”. Este kit está diseñado para la realización de Knock-in, inserción de un gen de interés junto con dos marcadores de selección, la proteína fluorescente verde (GFP) y un gen de resistencia al antibiótico puromicina (PuroR). El gen de resistencia a la ampicilina (AmpR) servirá para la selección bacteriana. El gen de estudio ligado al plásmido se inserta en la región AAVS1 “safe harbor”, región del DNA genómico en las cuales el DNA insertado no causa efectos secundarios y permite una buena expresión de los genes transfectados. La región AAVS1, o sitio de integración de los virus adenoasociados (AAV) 1, se localiza en el cromosoma 19 (posición 19q13.42) y fue identificada como un sitio de integración de AAV en líneas celulares humanas infectadas *in vitro* [89].

El plásmido DONOR presenta dos brazos de homología (AAVS1 HA Left y AAVS1 HA Right) con el sitio AAVS1, que permitirán la correcta recombinación e inserción génica en dicha zona genómica. Los genes PuroR y GFP se encuentran separados por la secuencia T2A, un sitio de corte autocatalítico que permite expresar varias proteínas con un único promotor, el promotor cytomegalovirus (CMV), y la cola poli A, producida por la secuencia de poliadelinlación de la hormona de crecimiento bovina (bGH-poly (A) signal). El marco abierto de lectura (ORF) permite el clonaje y la expresión constitutiva de un gen de estudio. El promotor CMV y la bgh-poly (A) permitirán la traducción en tandem de los genes GFP, PuroR y el gen de estudio, produciendo un mismo mRNA policistrónico en la célula transfectada. (Fig.9).

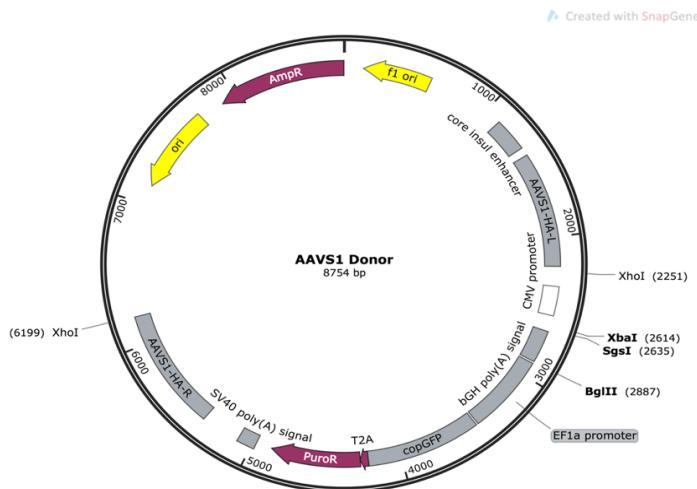


Fig. 9. Mapa del plásmido AAVS1 Donor Vector. Se muestra las enzimas de restricción usadas en este trabajo en su posición de corte, el gen GFP (copGFP), los genes de resistencia a ampicilina y puromicina (AmpR y PuroR), los brazos de homología para la región AAVS1 (AAVS1-HA-R y AAVS1-HA-L) y la secuencia T2A (promotor CMV y bGH poly(a) signal).

Para aislar las células que han incorporado el inserto, se puede hacer selección con el gen de resistencia a la puromicina, y con el gen GFP. En una concentración adecuada, el antibiótico añadido en el medio de cultivo causará la muerte celular de las células que no lleven el inserto en su genoma [7], de forma que las células que sobrevivan serán las que han sufrido la recombinación y portan el inserto. También hay posibilidad de usar el gen GFP, ya que la proteína GFP confiere fluorescencia a la célula que porta el inserto. Usando una estación de fluorescencia o un citómetro de flujo separador o sorter, se diferenciarán dos poblaciones celulares: con o sin fluorescencia. La población que presenta fluorescencia habrá incorporado el inserto en su genoma.

Para realizar un Knock-in con este kit hay que ejecutar una cotransfección de dos plásmidos: DONOR con el gen de interés insertado (*Syt1*) + AAVS1 sgRNA/Cas9. El primero aporta el gen que se va a sobreexpresar, y el segundo los sgRNA y la Cas9 necesarios para el sistema CRISPR/Cas9. Para realizar un Knock-down se debe realizar la misma operación, pero el gen insertado en el DONOR deberá ser “anti-sense”, para desencadenar el mecanismo de interferencia por iRNA (ver apartado 2.5 *Silenciamiento génico*).

4.1.3 pAAVS1 sgRNA/Cas9

El plásmido AAVS1 sgRNA/Cas9 contiene las herramientas necesarias para formar el complejo de corte del sistema CRISPR/Cas9: la nucleasa Cas9 y el sgRNA específico de AAVS1. Contenido también en el kit “Genome-CRISPR™ Human AAVS1 Safe Harbor Gene

Knock-in Kit”, tiene características similares al DONOR, como un gen de resistencia a ampicilina (AmpR) para la selección bacteriana. La nucleasa Cas9 tiene el promotor constitutivo CBh, una cola poli (A) producida por la bGH poly (a) signal y dos péptido señal de localización nuclear (NLS) en 3' y 5', por último, el sgRNA se expresará por el promotor de pequeños RNA “U6” (Fig. 10).

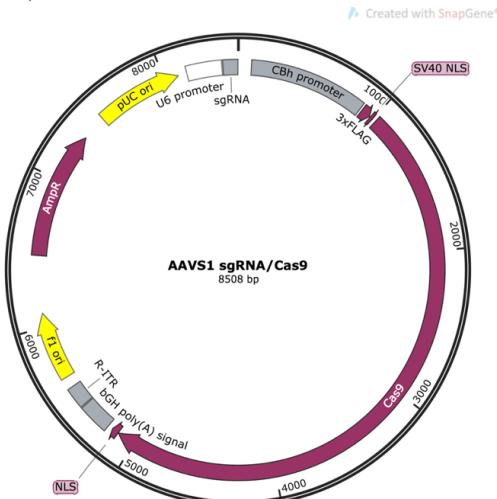


Fig. 10. Mapa del plásmido AAVS1 sgRNA/Cas9. Se muestra el origen de replicación bacteriano (pUC ori); el sgRNA específico de AAVS1 con su promotor U6; el gen Cas9, con su promotor CBh y la cola poliA bGH y el gen de resistencia a ampicilina (AmpR).

Al transfectar este plásmido se expresarán la nucleasa Cas9 y el sgRNA específico de la región AAVS1, formándose el complejo de corte, realizando un corte DSB en el locus AAVS1. Una vez producido el DSB, en las células que también se haya introducido el plásmido DONOR se realizará la reparación por la ruta HDR, integrando en el genoma por recombinación homóloga (HR) las secuencias que se encuentren entre los brazos de homología del plásmido DONOR (Fig. 11)

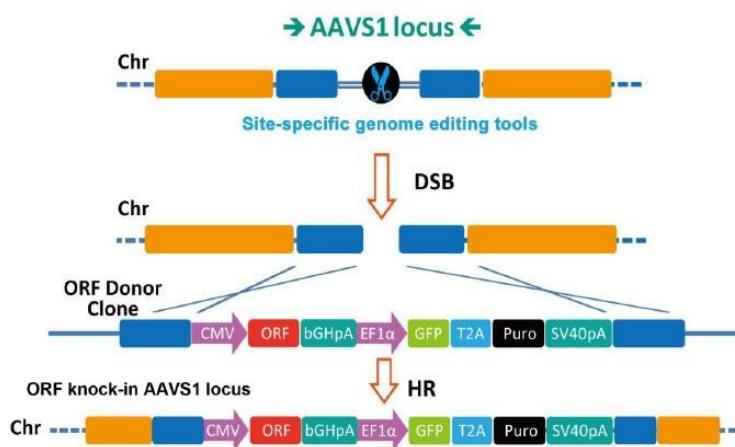


Figura 11: Ilustración del proceso de integración genómica en el locus AAVS1 usando el Kit “Genome-CRISPR™ Human AAVS1 Safe Harbor Gene Knock-in. Imagen modificada de: <http://www.genecopoeia.com/wp-content/uploads/2015/12/CRISPR-Human-AAVS1-safe-harbor-User-Manual.pdf>

4.1.4 Estrategia de clonaje de *Syt1* en vectores para el Knock-in y el Knock-down:

DONOR-*Syt1* y DONOR-*Syt1* reverse

Para realizar el Knock-in de *Syt1* y el Knock-down de *SYT1* en la línea celular HepG2, es necesario diseñar los vectores correspondientes, siendo DONOR el vector de expresión seleccionado por sus características previamente explicadas (apartado 4.1.2 *AAVS1 Donor Vector (DONOR)*). Para la realización del Knock-in se diseña el plásmido DONOR-*Syt1*, resultante de la inserción del gen *Syt1* en el vector DONOR. Este se insertará en la región genómica AAVS1, produciendo una sobreexpresión del gen. Para el Knock-down se diseña DONOR-*Syt1* reverse, proveniente de la inserción del gen antisentido *Syt1* reverse en el plásmido DONOR. Cuando los mecanismos celulares traduzcan este gen, se sintetizará un mRNA complementario en un 90% al mRNA del *SYT1* propio de la célula, acoplándose ambos en un dsRNA. Esto iniciará el mecanismo de interferencia por RNA descrito anteriormente (apartado 2.5 *Silenciamiento génico*), silenciando el gen *SYT1*. Para un conocimiento más integrado de la manipulación génica, se siguieron diferentes métodos para el diseño de ambas construcciones plasmídicas, DONOR-*Syt1* y DONOR-*Syt1* reverse, usando correspondientemente la técnica de clonaje clásica y una de las más actuales del sector, el clonaje por recombinación.

Para el diseño y creación de DONOR-*Syt1* se realiza la técnica tradicional de clonaje de genes en plásmidos basado en los cortes con enzimas de restricción, ligaciones con DNA ligasa y subclonaje en el plásmido intermediario pCRII (Fig. 12.A). Este método comienza con una amplificación del gen por PCR del plásmido pLIVEluc-*Syt1* (Fig. 12.1), plásmido resultante de estudios anteriores del grupo [6] que contiene *Syt1*. En esta amplificación se añaden a los extremos flanqueantes del amplicón las secuencias de los sitios de restricción de las enzimas *XbaI* y *SgsI*. Estas secuencias flanqueantes permitirán la digestión e inserción direccional del inserto en el vector DONOR, ya que presenta los dos mismos sitios de restricción en su secuencia. Tras la verificación de la PCR por gel de agarosa y purificación del DNA por método de columnas de silicio, se realiza una ligación de *Syt1* y el plásmido linealizado pCRII (Fig. 12.2). La posterior transformación bacteriana, selección de transformantes y extracción del DNA plasmídico permite la obtención de los plásmidos pCRII-*Syt1* y/o pCRII-*Syt1* reverse. Estos son los resultantes de la inserción en el plásmido pCRII de *Syt1* y *Syt1* reverse correspondientemente. Tras aislar cualquiera de los dos plásmidos anteriores (únicamente se verificó la obtención de pCRII-*Syt1* reverse) se procede a la digestión del plásmido para y ligación de *Syt1* y del vector DONOR (Fig. 12.3). Se escogieron las enzimas de restricción *XbaI* y *SgsI* para un corte cohesivo, necesario para una ligación direccional. Tras la ligación, la transformación y selección bacteriana, se realiza la extracción de DONOR-*Syt1*. Se lleva a cabo la verificación de la inserción genómica con diferentes diseños de digestiones enzimáticas, y si son correctas se procede a la secuenciación del plásmido. Tras verificar la correcta secuencia del vector DONOR-*Syt1*, se realiza una transfección

únicamente con DONOR-*Syt1* para verificar que las células HepG2 son capaces de expresar correctamente el gen con ese promotor CMV en el plásmido elegido. Al existir una expresión transitoria de los plásmidos los primeros días tras la transfección, no es necesario el sistema CRISPR/Cas9 para que las células puedan expresar el gen de interés insertado en un vector de expresión. Tras la extracción, purificación y retrotranscripción del RNA celular, se verifica la expresión génica por qPCR. Al asegurarnos del correcto funcionamiento del gen y del plásmido en las células HepG2, se realiza una doble transfección de este plásmido y de AAVS1 sgRNA/Cas9 (Fig. 12.4) en la línea celular HepG2, resultando en un Knock-in de *Syt1* (Fig. 12.5).

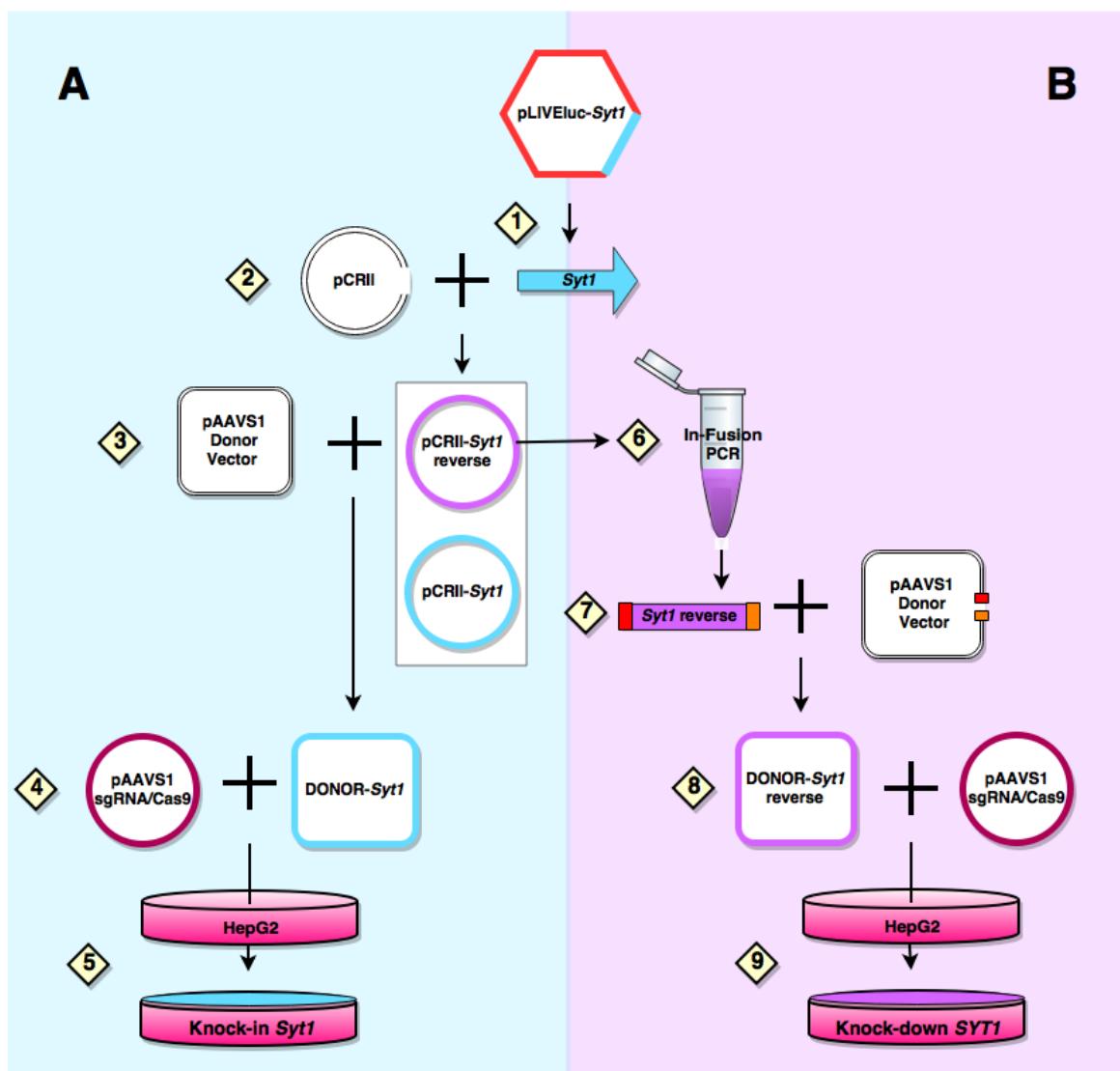


Fig. 12. Estrategia de clonaje de *Syt1* para generar un Knock-In de *Syt1* y un Knock-Down de *SYT1* en la línea celular HepG2. Diseño de A) Knock-in de *Syt1*: amplificación de *Syt1* de pLIVEluc-*Syt1* por PCR (1), ligación del amplicón al pCRII linealizado (2) para obtener pCRII-*Syt1* y/o pCRII-*Syt1* reverse, digestión enzimática de uno de los dos plásmidos y ligación de extremos cohesivos con DONOR (3) para obtener DONOR-*Syt1* y transfectarlo junto a AAVS1 sgRNA/Cas9 (4) en células HepG2 para producir un Knock-in de *Syt1*(5); B) Knock-down de *SYT1*: In-Fusion PCR del pCRII-*Syt1* reverse (6) para amplificación de *Syt1* reverse con extremos complementarios a los extremos del DONOR linealizado, recombinación del amplicón con DONOR linealizado (7) para obtener DONOR-*Syt1* reverse, y transfectarlo junto a AAVS1 sgRNA/Cas9 (8) en células HepG2 para producir el Knock-down de *SYT1*(9).

Para el diseño y creación del DONOR-*Syt1* reverse se siguió la técnica de clonaje por recombinación, con el procedimiento de Takara, In-Fusion HD Cloning (Fig. 12.B). Esta técnica supuestamente ahorra tiempo y material al realizar directamente la inserción direccional del inserto en el vector final, con un éxito en la transformación bacteriana rondando el 100%, mientras que otros métodos de clonaje por PCR alcanzan como máximo un 50-75% de éxito [90, 91]. Consiste en el diseño de unos cebadores para la amplificación por PCR del inserto (Fig. 12.6), añadiendo dos extensiones de 15 pares de bases (bp) homólogas a los extremos de un plásmido determinado, previamente linealizado por una enzima de restricción. Gracias a estos segmentos homólogos del plásmido y del inserto amplificado, en una recombinación de tan solo 30 minutos (Fig. 12.7) se consigue la construcción plasmídica final. Una vez transformado en bacterias y aislado, se verifica la correcta inserción genómica del plásmido DONOR-*Syt1* reverse con diferentes digestiones enzimáticas y mediante secuenciación. En este caso no es necesario transfectar primero el DONOR-*Syt1* reverse para verificar la correcta expresión del plásmido, ya que una supresión génica en un 5% de la población celular (porcentaje de eficacia de la técnica de transfección usada) es imperceptible mediante una qPCR. Tras la verificación de la correcta construcción del plásmido, se realiza una doble transfección de DONOR-*Syt1* reverse y AAVS1 sgRNA/Cas9 (Fig. 12.8) en la línea celular HepG2, resultando en un Knock-down de *SYT1* (Fig. 12.9).

4.2 Subclonaje de *Syt1* en pCRII: Generación de pCRII-*Syt1* reverse

4.2.1 Subclonaje de *Syt1* en pCRII

Para clonar el fragmento de DNA de interés en pCRII se debe generar primero un producto de PCR añadiendo los sitios de restricción para *Xba*I y *Sgs*I en las regiones flanqueantes del amplicón (Fig. 13.1-2), purificarlo, ligar el amplicón con el plásmido pCRII (Fig. 13.3) y transformar bacterias *Escherichia coli* competentes (Fig. 13.4). Por último, se extrae el plásmido de las bacterias, se verifica la presencia del inserto y se aísla pCRII-*Syt1* reverse (Fig. 13.5).

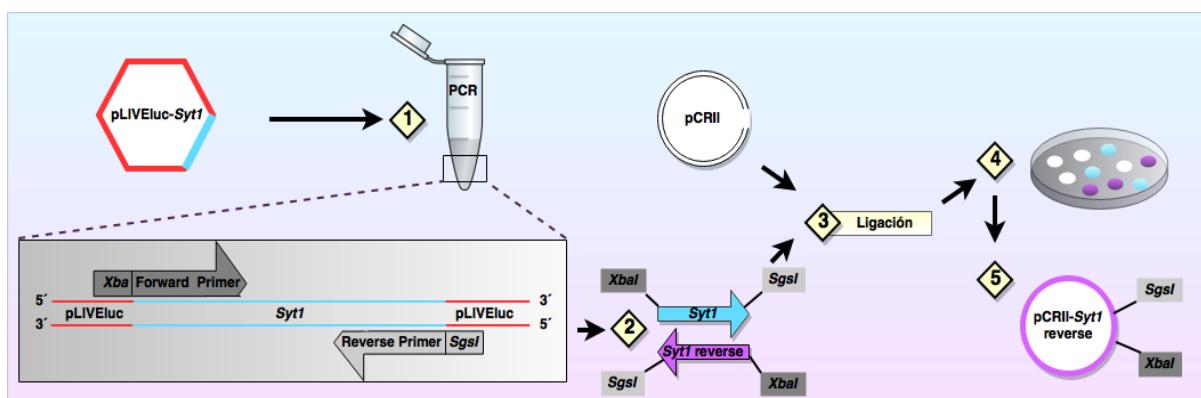


Fig. 13. Esquema del clonaje de *Syt1* en pCRII. Amplificación por PCR de *Syt1* del plásmido pLIVE-luc-*Syt1* (1), obtención de *Syt1* con las enzimas de restricción (2), ligación de este con pCRII (3), transformación bacteriana (4) y extracción de pCRII-*Syt1* reverse (5)

4.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo final (PCR)

Reactivos:

- 1 μ l (20 ng) DNA
- 2,5 μ l de tampón 10X TrueStartTM *Taq*
- 0,25 μ l dNTP Mix 25 mM
- 0,5 μ l cebador directo 100 nM
- 0,5 μ l cebador reverso 100 nM
- 2 μ l de MgCl₂ 25 mM
- 0,15 μ l de la enzima TrueStartTM *Taq* DNA Polymerase (5 U/ μ l)
- Hasta 25 μ l de agua estéril libre de nucleasas (18,1 μ l)

Para la amplificación de *Syt1* se empleó la PCR a tiempo final partiendo del plásmido pLIVE-*Syt1*, plásmido diseñado en estudios anteriores del grupo. A los cebadores usados (Tabla 1) se les añadió la secuencia de dos enzimas de restricción para crear los sitios de restricción en el amplicón, ya presentes en el vector final DONOR, para facilitar el corte e inserción direccional del inserto. Se le añadió *Xba*I al cebador directo y *Sgs*I al cebador reverso (Fig. 13.1-2).

El proceso se llevó a cabo con el Kit de Fermentas TrueStartTM *Taq* DNA Polymerase, se utilizó 1 μ l (20 ng) de pLIVE-*Syt1* y 24 μ l del mix anterior. La PCR se realizó en un termociclador PTC-100TM Programmable Thermal Controller cycler, el programa utilizado fue 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 40 segundos a 95 °C, 1 minuto de hibridación a 60 °C y una fase de extensión a 72 °C durante 2 minutos, seguido de una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Tabla 1: Secuencias de los cebadores usados en la PCR de *Syt1*.

	Secuencia
Cebador directo	5'- TCTAGAAACTGTGTGCAGTCTGTGTTTC-3'
Cebador reverso	5'- GGCGCGCCTATGTGGGCAGACGCAGAAA-3'

4.2.2 Electroforesis y purificación

Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de DNA previsto, se emplean técnicas de electroforesis. El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. La electroforesis de los productos de PCR fue realizada con bromuro de etidio en un gel de agarosa al 1%, y los resultados fueron visualizados con el transiluminador “Gel Doc Xr+ System”, y el programa “Quantity One 1-D Analysis Software”. (Ver apartado 5.1 Subclonaje de *Syt1* en pCRII: Generación de pCRII-*Syt1 reverse*). El fragmento de *Syt1* obtenido por PCR, se purifica del resto de componentes del mix

de reacción, para evitar que enzima y demás componentes interfieran en reacciones posteriores, cortando con un bisturí directamente del gel de agarosa al 1% (Fig. 17.B). Para extraer el DNA de la agarosa se utilizó el kit “GeneJET Gel Extraction kit”. El sistema combina la tecnología de las columnas de sílice con las propiedades selectivas de unión del DNA a estas partículas

4.2.3 Regeneración de la adenina en 3'

Reactivos:

- 0,25 µl dNTP Mix 25 mM
- 2 µl de MgCl₂ 25 mM
- 1 µl de la enzima TrueStartTM *Taq* DNA Polymerase (1 U/µl)
- 23 µl de fenol-cloroformo
- 10 µl de cloruro sódico 5 M
- 22 µl de etanol puro
- 20 µl tampón TE
-

Para ligaciones eficientes se recomienda usar productos de PCR frescos, con menos de un día, ya que los residuos 3' A en los productos de PCR se degradan con el tiempo reduciendo la eficiencia de la ligación. Como la muestra estuvo almacenada durante varios días, es necesario la adenilación, o adición del residuo de adenina.

Tras añadir los dNTP y el MgCl₂, el vial con 20 µl de amplicón se enfriá en hielo para la adición de la Taq Polimerasa. Posteriormente se incuba a 72 °C 10 minutos, y se transfiere inmediatamente de vuelta al hielo. Se realiza una extracción añadiendo el mismo volumen de fenol-cloroformo, centrifugando 5 minutos a 13000 rpm, para recoger la fase superior de la muestra bifásica. Tras añadir el cloruro sódico y el etanol, se centrifuga 5 minutos a máxima velocidad (18000 rpm) para precipitar el DNA en un pellet. Se retira el etanol, se deja secar al aire, y se resuspende el pellet en el volumen inicial de tampón TE. Su concentración se determinó mediante medida de absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (*ThermoScientific*)

4.2.4 Ligación de *Syt1* con el vector pCRII

Reactivos:

- 0.6 µl (16,25 ng) del inserto
- 2 µl (50 ng) del vector
- 2 µl 10X tampón T4 DNA Ligase
- 1 µl 50% PEG 4000 solution

- 1 μ l T4 DNA Ligase (4.0 Weiss units)
- Hasta 20 μ l de agua estéril libre de nucleasas (13,4 μ l)

Se incubó la anterior reacción de ligación una hora a 22 °C.

4.2.5 Transformación de *E. coli* competentes con la reacción de ligación

El vector ligado con el inserto se transformó por choque térmico en células competentes *E. coli* en un ambiente estéril. Se descongeló un vial de 50 μ l de One Shot® Competent Cells para la transformación. Se pipeteó 2,5 μ l de la reacción de ligación en un eppendorf con 25 μ l de bacterias competentes, y 2,5 μ l de pCRII vacío como control negativo en otros 25 μ l de bacterias. Se mezcló suavemente con la pipeta y se incubaron los viales en hielo durante 30 minutos. Se sometieron a las células a un choque de calor durante 1 minuto y medio a 42 °C sin agitar. Inmediatamente se transfirieron los viales al hielo y se añadió 300 μ l de medio S.O.C. (Caldo super optimizado con represor de catabolitos) atemperado a cada vial. Los viales se incubaron a 37 °C durante 45 minutos a 225 rpm en un incubador-agitador. Se extendieron 20 μ l, diluidos en 180 μ l de agua estéril, y 200 μ l de cada vial de transformación en placas de LB agar que contenían 100 μ g/ml ampicilina y se incubaron las placas toda la noche a 37 °C.

En las placas de agar con ampicilina sólo crecen aquellas bacterias que tienen el plásmido que les otorga la resistencia al antibiótico. De entre las bacterias resistentes se seleccionan las colonias aisladas blancas de 2-3 mm de diámetro, resultando un total de 24 colonias. Se crecieron las colonias en una placa de seguridad, y se incubó toda la noche a 37°C.

4.2.6 Verificación de inserción génica en pCRII-Syt1 reverse

Reactivos extracción:

- 30 μ l STE
- 10 μ l fenol
- 10 μ l CIA (24:1 cloroformo:alcohol isoamílico)
- 1 μ l RNAsa A 50 μ g/ml

Reactivos digestión:

- 1 μ g total DNA
- 2 μ l tampón E
- 0,4 μ l de *HindIII*
- Agua hasta 20 μ l (16,6 μ l)

Para una verificación preliminar de la inserción genómica en el plásmido, se realizó una extracción de DNA basada en el método cloroformo-fenol. Se aislaron cada una de las 24 colonias en 30 μ l de STE, se añadieron 20 μ l de fenol-CIA, y se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm. Se recogió la fase superior de la muestra bifásica, que es donde se encuentra el DNA

plasmídico. Por último se añadió la RNAsa para limpiar la muestra de RNA y se incubó 30 minutos a 55 °C.

Se diseñó una estrategia de digestión con *HindIII* para diferenciar las colonias que verdaderamente presentan el fragmento *Syt1* en sus plásmidos. Se llevó al cabo la digestión con *HindIII* con el mix anterior, se incubó a 37 °C durante una hora y se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El plásmido vacío (Fig. 2) presenta un único sitio de corte para la enzima escogida, por lo que se linealizaría (3971 bp). Los plásmidos pCRII-*Syt1* y pcRII-*Syt1* reverse presentan dos sitios de corte para *HindIII* por lo que los fragmentos resultantes de la digestión serían 4798 + 538 bp y 4395 + 941 bp respectivamente. Al examinar por electroforesis los fragmentos grandes resultantes de la digestión en un gel de agarosa al 1%, se observa que solo tres colonias (1, 9 y 16) de las veinticuatro analizadas parecen presentar *Syt1* en sus plásmidos.

Para aislar los plásmidos de las colonias 1, 9 y 16, se crece cada colonia en 10 ml de medio LB Agar líquido con una concentración de ampicilina (100 µg/ml) en un incubador-agitador a 37°C y 180 rpm durante 16/24 horas. Se usa el kit comercial “GeneJET Plasmid Miniprep” de Thermo Fisher, que utiliza una tecnología de membrana de sílice en forma de columna de centrifugación que permite recuperar de forma selectiva el DNA plasmídico con una alta pureza. Las bacterias recombinantes sufren un proceso de lisis alcalina con SDS seguido por la adsorción del DNA en la columna de sílice en presencia de una alta concentración de sales. Todo aquello que no es DNA plasmídico es eliminado por centrifugación con un lavado de la columna. Finalmente es eluido con agua. Una vez aislados los plásmidos su concentración se determinó mediante medida de absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (*ThermoScientific*).

Se llevó a cabo una segunda digestión enzimática con *HindIII* con las mismas condiciones que la primera, pero con el triple de cantidad de plásmido, para diferenciar el sentido directo o reverso de *Syt1*. Esto es posible al analizar los fragmentos pequeños antes imperceptibles por la escasa cantidad de muestra. Tras correr los resultados de la digestión en un gel de agarosa al 1%, se identificó el plásmido de la colonia 9 como pCRII-*Syt1* reverse.

4.3 Clonaje de *Syt1* en DONOR: Generación de DONOR-*Syt1*

Partiendo del pCRII-*Syt1* reverse aislado de la colonia 9, se realiza una digestión *XbaI/SgsI*, resultando el fragmento de *Syt1* flanqueado por los extremos cohesivos resultantes de la digestión (Fig. 14.1) gracias a los sitios de restricción de *XbaI* y *SgsI* añadidos previamente (ver apartado 4.2.1 *Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo final (PCRF)*). Para insertar el gen se realiza la misma digestión en el vector DONOR (Fig. 14.2), produciendo los mismos extremos cohesivos y permitiendo una ligación direccional (Fig. 14.3). Se

transforman bacterias *E. coli* competentes con el resultado de la ligación (Fig. 14.4) y se aísla el plásmido DONOR-*Syt1* (Fig. 14.5). Finalmente, el plásmido estará listo para transfectarse en células competentes junto al plásmido pAAVS1 sgRNA/Cas9 para producir el Knock-in de *Syt1* en células HepG2.

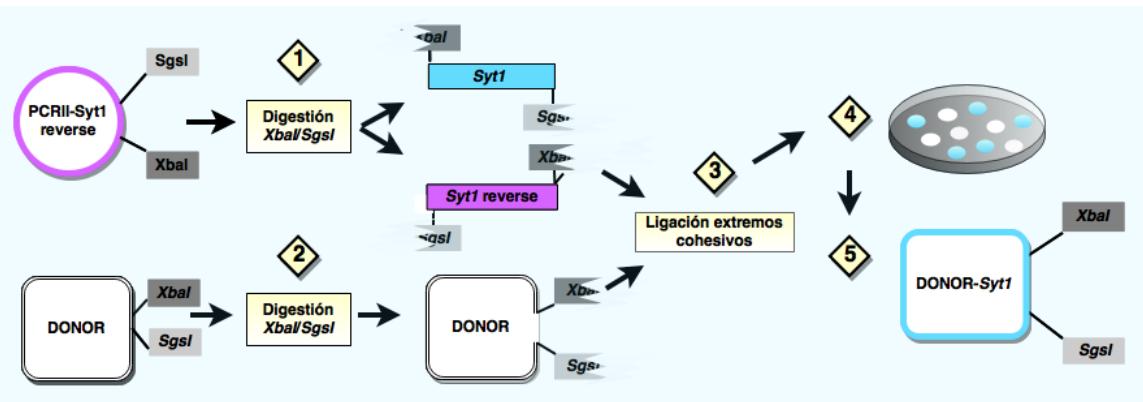


Fig. 14. Esquema del clonaje de *Syt1* en DONOR. Digestión XbaI/SgsI de pCRII-*Syt1* reverse (1) y de DONOR (2), y ligación direccional por extremos cohesivos de ambos (3). Transformación bacteriana (4) y aislamiento de DONOR-*Syt1* (5).

4.3.1 Digestión de pCRII-*Syt1* reverse y DONOR

Reactivos digestión pCRII-*Syt1* reverse

- 5,45 μ l (1 μ g) DNA
- 2 μ l tampón Tango
- 0,2 μ l de *XbaI*
- 0,2 μ l de *SgsI*
- Agua hasta 20 μ l (12,15 μ l)

Reactivos digestión DONOR

- 5 μ l (2 μ g) DNA
- 2 μ l tampón Tango
- 0,4 μ l de *XbaI*
- 0,4 μ l de *SgsI*
- Agua hasta 20 μ l (12,2 μ l)

Se llevaron a cabo las digestiones con las mezclas anteriores, se incubaron a 37 °C durante una hora y se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% para su purificación según el método descrito anteriormente. Al resultar el Nanodrop poco fiable para la cuantificación de fragmentos demasiado pequeños de ácidos nucleicos, se realiza una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para una cuantificación densitométrica de *Syt1* y de DONOR gracias al programa bioinformático ImageJ.

El bromuro de etidio (BrEt) es uno de los colorantes más usados para teñir las muestras de DNA. Este agente intercalante emite luz cuando se expone a luz ultravioleta, 20 veces más intensa si se ha unido a una cadena de DNA, que luego se recoge en el transiluminador GelDoc XR+ System. La intensidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de BrEt, siendo este proporcional a la cantidad de DNA presente en la muestra. Al conocer exactamente la cantidad

de DNA presente en cada banda del marcador, se puede realizar una comparación de intensidades lumínicas con el programa ImageJ entre las bandas del marcador y las bandas de las muestras, resultando una medición precisa de la cantidad de DNA de *SytI* y DONOR para realizar su ligación.

4.3.2 Ligación de extremos cohesivos de DONOR y *SytI*

Reactivos:

- 0,61 μ l (16,25 ng) del inserto
- 0,54 μ l (50 ng) del vector
- 2 μ l 10X tampón T4 DNA Ligase
- 1 μ l T4 DNA Ligase (4.0 Weiss units)
- Hasta 20 μ l de agua estéril libre de nucleasas (15,85 μ l)

Se incubó la anterior reacción de ligación de extremos cohesivos diez minutos a 22 °C.

4.3.3 Transformación, selección bacteriana y extracción del DNA plasmídico

El producto de la ligación se transformó en bacterias competentes según lo descrito anteriormente, se realizó la selección bacteriana en placas de medio LB Agar líquido con una concentración de ampicilina (100 μ g/ml), y se aisló el plásmido de las 15 colonias seleccionadas mediante el kit comercial “GeneJET Plasmid Miniprep” de Thermo Fisher. Finalmente se determinó la concentración y calidad de los plásmidos mediante medida de absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (*ThermoScientific*).

4.3.4 Verificación de inserción génica en DONOR-*SytI*

Reactivos digestión <i>HindIII</i>	Reactivos digestión <i>XbaI/BglII</i>	Reactivos digestión <i>XhoI</i>
<ul style="list-style-type: none"> • 1 μg total DNA • 2 μl tampón Tango • 0,2 μl de <i>XbaI</i> • 0,2 μl de <i>SgsI</i> • Agua hasta 20 μl 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 μg total DNA • 2 μl tampón Tango • 0,2 μl de <i>XbaI</i> • 0,2 μl de <i>SgsI</i> • Agua hasta 20 μl 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 μg total DNA • 2 μl tampón Tango • 0,2 μl de <i>XbaI</i> • 0,2 μl de <i>SgsI</i> • Agua hasta 20 μl

Se diseñaron diferentes estrategias de verificación mediante digestiones enzimáticas en las cuatro colonias con mejores parámetros de concentración y calidad, antes de secuenciar el plásmido como verificación final. Basándose en el mapa del plásmido DONOR-Syt1 creado en *SnapGene Viewer* (Fig. 12) se seleccionaron las digestiones con *HindIII*, *XbaI/BglII* y *XhoI*. La digestión con *HindIII* se realizó incubando el mix anterior junto al DNA plasmídico de las cuatro colonias seleccionadas a 37°C durante una hora, y todas mostraron el patrón de digestión de DONOR-Syt1. Se realizaron entonces digestiones de solo dos colonias con *XbaI/BglII* (Fig. 13.B) y *XhoI* (Fig. 13.C) incubando las mezclas anteriores en las mismas condiciones. Ambas colonias muestran el patrón de digestión esperado en las dos digestiones (ver apartado *Verificación DONOR-Syt1*).

Como verificación final, se envió uno de estos dos plásmidos, el C4, a secuenciar al Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) (ver apartado 5.3 *Clonaje de Syt1 en DONOR: Generación de DONOR-Syt1*).

Tabla 2: Secuencias de los cebadores usados en la secuenciación de DONOR-Syt1

	Secuencia
Cebador directo	5'- GGTGGGAGGTCTATATAAGCAG-3'
Cebador reverso	5'- AGACGAAGAGGGAGGCGATGCA-3'

4.4 Verificación funcional de DONOR-Syt1 en HepG2

Tras la transfección de DONOR-Syt1 en células HepG2 (ver apartado 4.6.4 *transfección de DONOR-Syt1, DONOR-Syt1 reverse y pAAVSI sgRNA/Cas9*) se procede a verificar la correcta expresión del plásmido en las células, gracias a la expresión transitoria de plásmidos.

4.4.1 Extracción de RNA celular

La extracción de RNA se llevó a cabo con material estéril libre de RNasas y sobre nieve carbónica, manteniendo las células congeladas, con el fin de evitar la degradación del RNA.

Tras lavar las células con PBS, se añade 1 ml del reactivo Tri-reagent a los tres pocillos de la placa de siembra directamente, en las células transfectadas con DONOR-Syt1. A los 5 minutos de incubación a temperatura ambiente se recoge el contenido en un tubo Eppendorf. Se añadieron 200 µl de cloroformo a cada tubo, se agitó la muestra por inversión, y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 4 °C durante 15 minutos a 10.000 g, y la fase superior acuosa se transfirió a un nuevo tubo, al que se añadieron 0,5 ml de isopropanol. Se mezclaron vigorosamente por inversión, se incubaron a temperatura ambiente

durante 10 minutos, pasados los cuales se centrifugó durante 8 minutos a 10.000 g y 4 °C. Se decantó el sobrenadante, y el precipitado obtenido se lavó con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a continuación a 7.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se decantó de nuevo el sobrenadante y, tras dejar secar el precipitado brevemente, se disolvió en agua tratada con DEPC.

Seguidamente se midió la concentración del RNA en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 UV/Vis por absorbancia a 260 y 280 nm. Se comprobó que la relación entre las dos longitudes de onda se encontrase entre 1.8 y 2.0. Una ratio inferior puede indicar presencia de contaminantes, lo que podría disminuir la eficiencia de la reacción, mientras que una ratio superior indica la presencia de RNA degradado o un exceso de nucleótidos libres.

4.4.2 Purificación del RNA

Reactivos

- 1 µl de Turbo Dnase AMBION (2 U/µl)
- 5 µl de Turbo Dnase Buffer 10x
- 5 µl de Dnase Inactivation Reagent
- Agua libre de RNasas

Para eliminar la potencial contaminación por DNA genómico que podría interferir en las determinaciones posteriores, las muestras de RNA extraídas se trajeron con el kit Turbo DNA-Free AM1907 de Ambion. Para ello se incubaron 5 µg de RNA de las tres muestras con 1 µl de la enzima DNasa y 5 µl de tampón de reacción en un volumen final de 45 µl que se completó con agua libre de RNasas. Se homogeneizaron las mezclas y se incubaron en el termociclador durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se añadieron 5 µl del agente inactivador de la DNasa, se mezcló y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugó la muestra a 10.000 g durante 90 segundos. Se transfirió el sobrenadante que contenía el RNA libre de DNA a un tubo estéril, con cuidado de no arrastrar restos del precipitado, que contiene el DNA precipitado y otros cationes divalentes tales como el magnesio y el calcio, que podrían interferir en etapas posteriores. La concentración del RNA purificado se cuantificó en el Nanodrop.

4.4.3 Retrotranscripción a DNA complementario

La retrotranscripción es el proceso empleado para generar DNA complementario o cDNA a partir del RNA purificado. Este proceso se llevó a cabo con el kit commercial SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen).

4.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR)

Reactivos:

- 1 μ l (20 ng) DNA
- 2,5 μ l de tampón 10X TrueStartTM *Taq*
- 0,25 μ l dNTP Mix 25 mM
- 0,5 μ l cebador directo 100 nM
- 0,5 μ l cebador reverso 100 nM
- 2 μ l de MgCl₂ 25 mM
- 0,15 μ l de la enzima TrueStartTM *Taq* DNA Polymerase (5 U/ μ l)
- Hasta 25 μ l de agua estéril libre de nucleasas (18,1 μ l)

Se utilizó como gen normalizador de expresión ciclofilina B (Ppib) a una concentración de 100nM. De esa forma, fue posible comparar los niveles de expresión sin la necesidad de conocer su valor absoluto. Las especificaciones de los cebadores y normalizadores usados en la qPCR se encuentran en la Tabla 3. El programa de amplificación fue 50 °C, 2min>95 °C, 10 min>40 ciclos (95 °C, 15s>60 °C, 1min)>95 °C, 15s>60 °C, 20s>95 °C, 15s.

Tabla 3: Especificaciones de los cebadores y normalizadores usados en la qPCR de *Syt1*: cebadores directo (PrD) y reverso (PrR) así como los normalizadores directo (PpibD) y reverso (PpibR). Se muestra su número de registro del NCBI, su secuencia, el tamaño del amplicón generado y su eficiencia.

	Número NCBI	Secuencia	Tamaño amplicón	Eficiencia
PrD	FR827897	5'-GTGGATTTGGCCACGTCAC-3' 5'-CGGAGGGAGAAGCAGATGTC-3'	95	102%
PrR				
PpibD	NM_011149	5'-GGAGATGGCACAGGAGGAA-3' 5'-TAGTTGCTTCAGCTGAAGTTCTCAT-3'	71	97%
PpibR				

4.5 Clonaje de *Syt1* reverse en DONOR: Generación de DONOR-*Syt1* reverse

4.5.1 Clonaje por recombinación: In-Fusion HD Cloning

Para comenzar con la técnica de clonaje por recombinación de Takara, In-Fusion HD Cloning, se diseñaron los cebadores para los extremos de 15 bp homólogos al DONOR linealizado por *XbaI* en la página web de Clontech (Takara). Estos permiten amplificar el *Syt1* reverse en una In-Fusion PCR, a partir del pCRII-*Syt1* reverse, añadiendo los fragmentos de 15 bp a cada extremo del amplicón (Fig. 15.1). Una vez digerido el DONOR con *XbaI* (Fig. 15.2), y amplificado el *Syt1* reverse con ambos extremos de 15 bp, se recombinaron con la enzima In-Fusion (Fig. 15.3). Tras la transformación bacteriana (Fig. 15.4) se realiza la selección y extracción de DONOR-*Syt1* reverse (Fig. 15.5), y se verifica la correcta inserción genómica con diferentes digestiones enzimáticas y secuenciación (Fig. 15.6). Finalmente se realiza una co-transfección del vector DONOR-*Syt1* reverse con AAVS1 sgRNA/Cas9 en la línea celular HepG2, produciendo un Knock-down de *SYT1*.

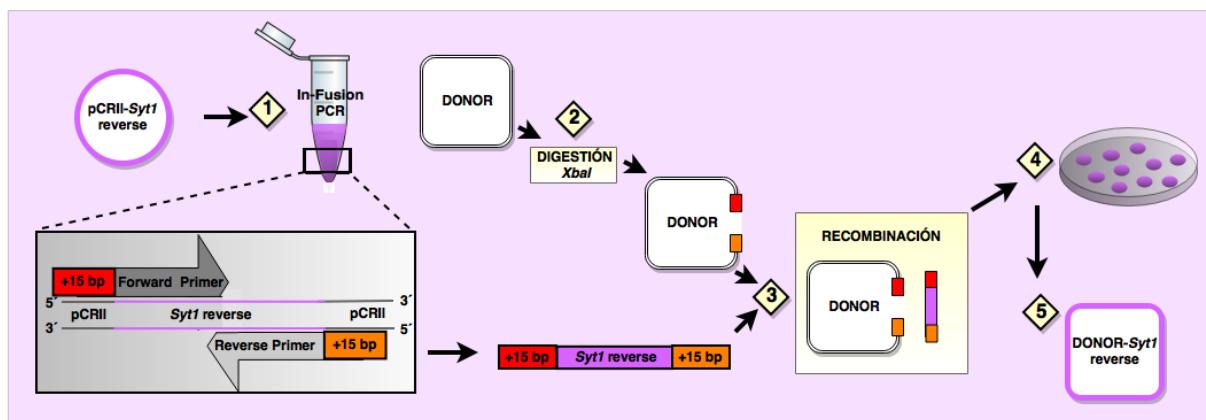


Fig. 15. Esquema del clonaje de *Syt1* reverse en DONOR. Amplificación por In-Fusion PCR de *Syt1* reverse (1) a partir de pCRII-*Syt1* reverse, con la adición en cada extremo del amplicón de 15 bp homólogos a los extremos de DONOR linealizado. Digestión con *XbaI* de DONOR (2), y recombinación con el amplicón de la PCR (3). Transformación bacteriana (4), y aislamiento de DONOR-*Syt1* reverse (5).

4.5.1.1 Diseño cebadores y linealización de DONOR

Reactivos digestión *XbaI*

- 14,65 µl (2 µg) DNA
- 4 µl tampón Tango
- 0,4 µl de *XbaI*
- Agua hasta 40 µl (20,95 µl)

Para el diseño de cebadores se utilizó las herramientas In-Fusion online de la página web de Clontech (Takara). Basta con añadir la secuencia del gen y del plásmido, indicando que enzima de restricción se usará para linealizarlo, y el programa diseña los cebadores con los extremos homólogos al plásmido linealizado automáticamente (Fig. 16, Tabla 4)

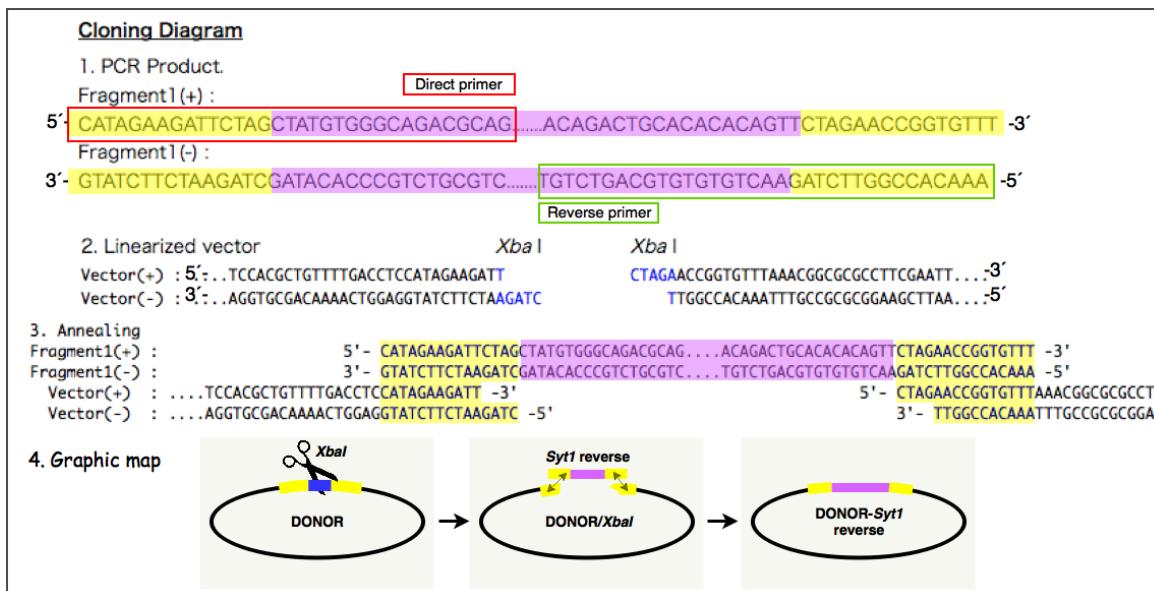


Fig. 16. Diagrama de clonaje de *Syt1* reverse en **DONOR-Syt1 reverse.** 1) Se muestra la secuencia del amplicón de la In-Fusion PCR. *Syt1* reverse en púrpura, fragmentos de 15 bp homólogos a los extremos del plásmido linealizado en amarillo, cebador directo en rojo, cebador reverso en verde. 2) Secuencia del vector DONOR linealizado con la secuencia de corte de *XbaI* en azul. 3) El alineamiento de ambas secuencias. 4) Mapa gráfico del alineamiento. Imagen modificada procedente de Takara Bio USA, Inc.

Una vez diseñados los cebadores, se procede a la linealización de DONOR con *XbaI*, incubando el mix anterior a 37°C durante una hora. Tras la digestión, el plásmido linealizado se purifica y repurifica según los métodos descritos anteriormente (ver apartado 4.2.2 *Electroforesis y purificación*).

4.5.1.2 In-Fusion PCR de *Syt1* reverse

Reactivos:

- 2,10 µl (1 ng) DNA
- 1,2 µl cebador directo 300 nM
- 1,2 µl cebador reverso 300 nM
- 10 µl CloneAmp HiFi PCR Premix
- Agua hasta 20 µl (5,5 µl)

Para amplificar el *Syt1* reverse, se partió del plásmido pCRII-*Syt1* reverse aislado de la colonia 9 (ver apartado 5.1 *Subclonaje de *Syt1* en pCRII: Generación de pCRII-*Syt1* reverse*). La

PCR se realizó incubando el mix anterior en un termociclador S1000 ThermoCycler, el programa utilizado fue 5 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 40 segundos a 95 °C, 1 minuto de hibridación a 58 °C y una fase de extensión a 72 °C durante 2 minutos, seguido de una extensión final de 5 minutos a 72 °C. Se realiza una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para verificar la PCR y cuantificar densitometricamente el amplicón junto al DONOR, mediante el programa ImageJ. Posteriormente, se purifica el resultado de la PCR según el método descrito anteriormente (ver apartado 4.2.2 *Electroforesis y purificación*).

Tabla 4: Secuencias de los cebadores usados en la In-Fusion PCR de *Syt1* reverse.

	Secuencia
Cebador directo	5'-CATAGAAGATTCTAGCTATGTGGGCAGACGCAG-3'
Cebador reverso	5'-AACACCCGGTTCTAGAACTGTGTGCAGTCTGT-3'

4.5.1.3 Recombinación de *Syt1* reverse con DONOR linealizado

Reactivos:

- 4 µl 5X In-Fusion HD Enzyme Premix
- 1,19 µl (15 ng) amplicón purificado
- 9,55 µl (70 ng) vector linealizado repurificado
- Agua hasta 20 µl (5,26 µl)

Una vez conocidas las concentraciones, se procede a realizar la recombinación, incubando la mezcla anterior a 50°C durante treinta minutos y trasladándolo a hielo inmediatamente. Gracias a los extremos de 15 bp homólogos, los fragmentos de *Syt1* reverse y DONOR linealizado se recombinan, resultando el plásmido DONOR-*Syt1* reverse.

4.5.2 Transformación, selección bacteriana y extracción del DNA plasmídico

El producto de la recombinación se transformó por choque térmico en células competentes *E. coli* en un ambiente estéril. Se descongeló un vial de 25 µl de Stellar ® Competent Cells para la transformación. Se pipeteó 2 µl del mix en un eppendorf con 25 µl de bacterias competentes. Se mezcló suavemente con la pipeta y se incubó en hielo durante 30 minutos. Se sometieron a las células a un choque de calor durante 1 minuto a 42 °C sin agitar, e inmediatamente se transfirió el vial al hielo y se añadió 300 µl de medio S.O.C. atemperado. Más tarde se incubó a 37 °C durante 15 minutos a 225 rpm en un incubador-agitador. Se extendieron 200 µl del vial de transformación en placas de LB agar que contenían 100 µg/ml ampicilina y se incubaron las placas toda la noche a 37 °C. Se resembraron 12 colonias en una placa de seguridad con misma

concentración de ampicilina, y se aíslo el plásmido de 4 colonias seleccionadas mediante el kit comercial “GeneJET Plasmid Miniprep” de Thermo Fisher. Finalmente se determinó la concentración y calidad de los plásmidos mediante medida de absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000* (*ThermoScientific*).

4.5.3 Verificación de inserción génica en DONOR-*Syt1* reverse

Reactivos digestión *HindIII*

- 5 µl (500 ng) DNA
- 2 µl tampón E
- 0,3 µl de *HindIII*
- Agua hasta 20 µl (12,7 µl)

Reactivos digestión *XbaI/XhoI*

- 5 µl (500 ng) DNA
- 4 µl tampón Tango
- 0,3 µl de *XbaI*
- 0,3 µl de *XhoI*
- Agua hasta 20 µl (10,4 µl)

Al tener la transformación bacteriana del método In-Fusion Cloning HD un supuesto porcentaje de éxito del 100%, realizaremos las digestiones de verificación en tan solo una colonia. Se diseñan dos estrategias de verificación mediante digestiones enzimáticas, basándose en el mapa del plásmido DONOR-*Syt1* reverse creado en *SnapGene Viewer* (Fig.17). De los 4 plásmidos aislados previamente, se selecciona la colonia que mejores parámetros de concentración y calidad ha resultado en la medición del Nanodrop (la colonia 3) y se incuban las mezclas anteriores de digestión con *HindIII* y *XbaI/XhoI* a 37°C durante una hora. Ambas digestiones mostraron el patrón de digestión esperado (ver verificación DONOR-*Syt1* reverse).

Como verificación final, se envió el plásmido a secuenciar al Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) (ver apartado 5.4 *Clonaje de Syt1 reverse en DONOR: Generación de DONOR-Syt1 reverse*).

Tabla 4: Secuencias de los cebadores usados en la secuenciación de DONOR-*Syt1* reverse

	Secuencia
Cebador directo	5' - GGTGGGAGGTCTATATAAGCAG -3'
Cebador reverso	5' - CAGCAGAACATTCCGCTTGA -3'

4.6 Cultivo celular

4.6.1 Manejo y condiciones de cultivo

Todos los trabajos de cultivo celular se llevaron a cabo en campana de flujo laminar y en las más estrictas condiciones de asepsia. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

4.6.2 Mantenimiento de la línea celular HepG2

Reactivos:

- Medio esencial Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glucosa (Gibco Invitrogen, Paisley, Reino Unido)
- SFB: Suero Fetal Bovino (Lonza). Previo a su utilización, se sometió a una temperatura de 56°C durante 30 minutos en un baño termostatizado para inactivar las proteínas del complemento.
- Penicilina (10000 U/ml) (Gibco)
- Estreptomicina (10000 µg/ml) (Gibco)
- L-glutamina 4 mM (Gibco)
- Piruvato de sodio 1 mM (Lonza)
- Aminoácidos no esenciales 10 mM (Gibco)
- Material de cultivo celular estéril (Sarstedt)

La línea celular humana HepG2 se mantuvo en crecimiento a 37 °C y atmósfera de CO₂ al 5% con el medio esencial Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glucosa, suplementado (sDMEM) con suero fetal bovino al 10%, penicilina al 1%, estreptomicina al 1%, L-glutamina 4 mM y aminoácidos no esenciales al 1% en botellas de plástico para cultivos de 25 cm². El medio de cultivo se cambió cuando el medio de color rojo viraba a color amarillento por agotamiento de nutrientes o había gran cantidad de células muertas. Este tiempo varía de un día durante el proceso de selección por puromicina, hasta ocho días en la recuperación de la selección antibiótica.

4.6.3 Tripsinización de los cultivos

Reactivos:

- Medio de cultivo suplementado (sDMEM)

- PBS (pH 7,4) (NaCl 136 mM, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l y KH₂PO₄ 0,24 g/l).
- Agua destilada
- Tripsina 2,5%, 10X (Gibco)
- EDTA 10 mM

Se individualizaron las células cuando alcanzaban alta confluencia (90%). Para ello se aspiró el medio de cultivo y se incubaron durante 5-10 minutos a 37 °C con 1 ml de una solución de tripsina (50 ml de agua destilada; 5,5 ml de PBS 10X; 7,7 ml de tripsina 10X; 7,7 ml de EDTA). Pasado este tiempo, las células se homogeneizaron en 5 ml de medio de cultivo.

4.6.4 Transfección de DONOR-Syt1, DONOR-Syt1 reverse y pAAVS1 sgRNA/Cas9

Se usó el transfectante no liposomal “FuGENE® HD Transfection Reagent” de Sigma (Madison, Wisconsin, USA) que permite transfectar DNA con una baja toxicidad y no requiere eliminar el suero del medio de cultivo. Se sembraron las células HepG2 en frascos de 25cm², a una confluencia del 20% por placa. Tras unos días de crecimiento en el que se alcanzó el 80% de confluencia se cambió el medio y se llevaron a cabo diferentes transfecciones. Primero se realizó una transfección únicamente de DONOR-Syt1, añadiendo en cada un 1 mililitro de la siguiente mezcla:

Transfección DONOR-Syt1:

- . 990 µl de medio sDMEM
- . 4 µl DONOR-Syt1
- . 6 µl FuGENE® HD reagent

En el medio sDMEM se añadió el plásmido correspondiente, y el FuGENE® HD reagent gota a gota, mezclándolo cuidadosamente con la pipeta. Se incubó la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se añadió al frasco celular gota a gota en suave agitación. Tras incubar 10 minutos a temperatura ambiente, se sembraron tres pocillos y se incubaron a 37°C y 5%CO₂. Las células fueron recogidas a las 24 horas de la transfección para probar el funcionamiento y los niveles de expresión del plásmido. Tras este tiempo se aspiró el medio de cultivo, y las células se recogieron con el reactivo Tri-reagent (Ambion, Austin, TX, USA). Tras 5 minutos a temperatura ambiente se procedió a la extracción del RNA celular y la síntesis del DNA complementario para la verificación de la expresión del plásmido en las células HepG2 (ver apartado *4.4 Verificación funcional de DONOR-Syt1 en HepG2*).

Una vez verificada la expresión de los genes integrados en el plásmido en las células HepG2, se realizaron las siguientes transfecciones:

<u>Knock-in <i>Syt1</i>:</u>	<u>Knock-down <i>SYT1</i>:</u>	<u>Control negativo:</u>
. 987,5 μ l de medio sDMEM	. 985,25 μ l sDMEM	. 997 μ l sDMEM
. 4 μ l DONOR- <i>Syt1</i>	. 6,25 μ l DONOR- <i>Syt1</i> reverse	. 3 μ l FuGENE [®] HD reagent
. 2,5 μ l pAAVS1 sgRNA/Cas9	. 2,5 μ l pAAVS1 sgRNA/Cas9	
. 6 μ l FuGENE [®] HD reagent	. 6 μ l FuGENE [®] HD reagent	

En el medio sDMEM se añadieron los plásmidos correspondientes y el FuGENE[®] HD reagent, y se siguió el mismo procedimiento que la primera transfección. Tras incubar 10 minutos a temperatura ambiente, se incubaron los tres frascos a 37°C y 5%CO₂. A las 72 horas se comenzó la selección con puromicina en las tres poblaciones celulares.

4.6.5 Selección con puromicina

Según el protocolo del kit “Genome-CRISPR™ Human AAVS1 Safe Harbor Gene Knock-in Kit” la concentración de puromicina para la selección de resistencia, debe producir la muerte a más del 90% de la población celular. En trabajos anteriores con el grupo [7], se calculó esta concentración mediante ensayos de viabilidad celular, fijando la concentración de puromicina necesaria en 1,5 μ l/ml con un 6,2% de supervivencia celular. A 100 mililitros de sDMEM se le añadió 9 μ l de puromicina a 10 mg/ml, para crear el medio DMEM suplementado con puromicina a 1,5 μ l/ml (psDMEM), y se incubó durante diez días, cambiando el medio a diario.

4.7 Herramientas bioinformáticas

Draw.io: Software gratuito online para la creación de múltiples gráficos, con el que se crearon todos los esquemas de clonaje y la ilustración de la portada. (<https://www.draw.io>)

ImageJ: Programa de procesamiento de imagen digital de dominio público programado en Java desarrollado en el National Institutes of Health. Se utilizó para la cuantificación densitométrica de fragmentos de DNA. (<https://imagej.nih.gov/ij/>)

NCBI BLAST: Permite el alineamiento de secuencias para ver su correlación, útil para comparar SYT humano con el *Syt1* de ratón, o verificar las secuenciaciones (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Para el diseño de cebadores se uso el programa Primer BLAST de la página del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

Online In-fusion Tools – Clontech (Takara): Herramientas Online para el diseño de los cebadores necesarios para realizar una In-Fusion PCR.

(http://www.clontech.com/US/Products/Cloning_and_Competent_Cells/Cloning_Resources/Online_In-Fusion_Tools)

Reverse Complement: Página web que permite obtener secuencias reversas y/o complementarias de una secuencia dada.

(https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)

SnapGene Viewer: Software de libre uso se utilizó para la visualización y diseño de los plásmidos. Permite abrir diferentes tipos de archivos, con los componentes del plásmido ya definidos en el archivo, o únicamente con la secuencia del plásmido y el programa reconoce los componentes más comunes de estos sistemas como promotores, colas poliA, orígenes de replicación o genes de selección. El programa permite modificar la secuencia del plásmido, permitiendo crear diseños de nuevos plásmidos. También ofrece información sobre donde cortan las enzimas de restricción comerciales, el tipo de corte (romo o cohesivo) y filtrarlas en función del número de cortes que realizan, simplificando el diseño de las digestiones enzimáticas. Todos los mapas de plásmidos ilustrados en este trabajo se crearon con el programa *Snapgene viewer*.

(http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/)

5. RESULTADOS

5.1 Subclonaje de *Syt1* en pCRII: Generación de pCRII-*Syt1* reverse

Para obtener el plásmido pCRII-*Syt1* reverse (Fig. 17), el primer paso fue la amplificación por PCR de *Syt1* a partir del plásmido pLIVEluc-*Syt1*, para la adición de los sitios de restricción de *XbaI* y *SgsI*. Estas secuencias flanqueantes del amplicón permitirán la inserción direccional de *Syt1* en el vector DONOR, ya que presenta ambos sitios de restricción en su secuencia. Como se ve en la figura 18.A se verifica la correcta amplificación por PCR de *Syt1* con los sitios de restricción al observar el tamaño esperado del amplicón, 1353 bp. Se purifica su producto (Fig. 18.B) y se liga con el plásmido linealizado pCRII.

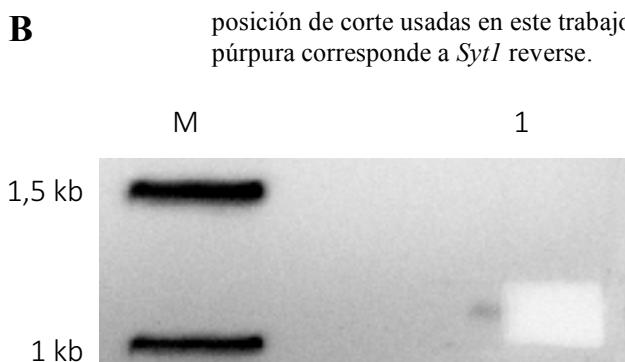
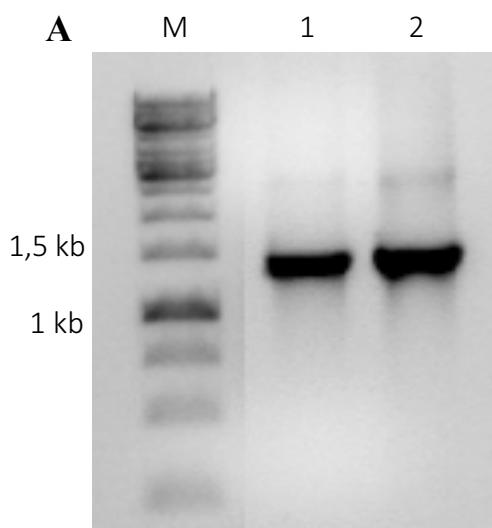


Fig. 18. Geles de agarosa al 1% tras una electroforesis de 90 voltios (V) durante 30 minutos. A) Resultados de la PCR de *Syt1* (1353 bp) por duplicado (calle 1 y 2). B) Corte de *Syt1* (1353 bp) para purificar. Marcador de peso molecular “Gene Ruler™ 1kb DNA ladder, ready-to-use” (calles M).

Para verificar la inserción génica de *Syt1* en el plásmido pCRII se realizó una estrategia de digestión con *HindIII*. Esta digestión nos permite diferenciar de las veinticuatro colonias obtenidas tras la transformación bacteriana, aquellas que han integrado *Syt1* en sus plásmidos (4798 + 538 bp en caso de pCRII-*Syt1*; 4395 + 941 bp en caso de pCRII-*Syt1* reverse) de las que no (3971 bp en caso de pCRII vacío). Como se ve en la figura 19.A, solo tres colonias (la número 1, 9 y 16) parecen presentar *Syt1* en sus plásmidos.

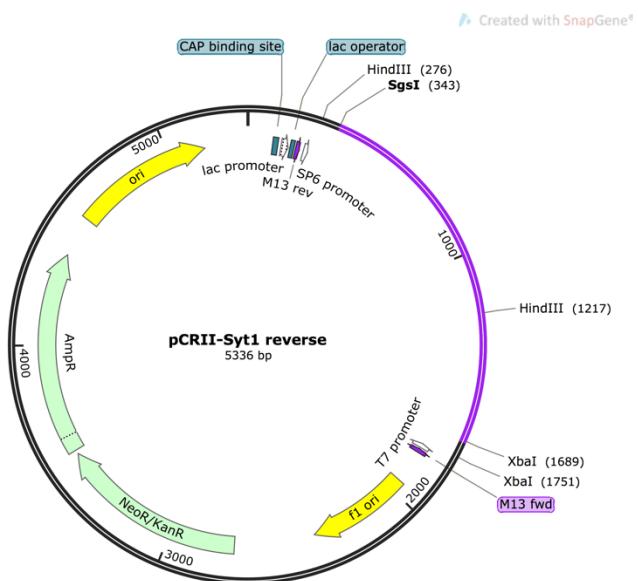


Fig. 17. Mapa del plásmido pCRII-*Syt1* reverse.
Se observan las enzimas de restricción en su posición de corte usadas en este trabajo. La sección púrpura corresponde a *Syt1* reverse.

Se repitió la misma digestión, pero con el triple de cantidad de plásmido, para diferenciar entre los plásmidos pCRII-*Syt1* y pCRII-*Syt1* reverse. Para ello se analizarán los fragmentos pequeños resultantes de la digestión, antes imperceptibles. Como se observa en la figura 19.B, la colonia 9 presenta el plásmido pCRII-*Syt1* reverse.

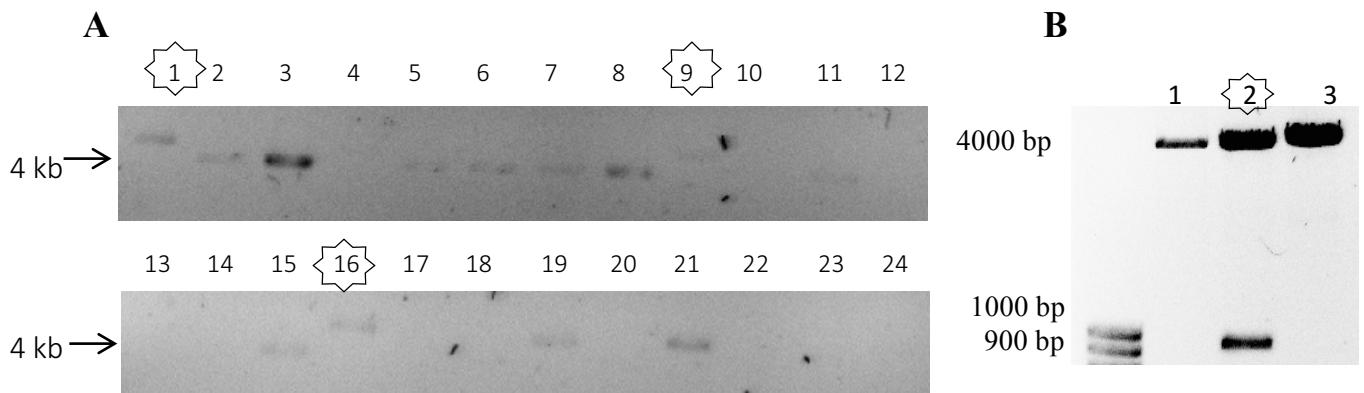


Fig. 19. Geles de agarosa al 1% tras una electroforesis de 90 V durante 40 minutos. Se muestran los resultados de la digestión con *HindIII* de los plásmidos de A) 24 colonias para verificar la presencia de *Syt1* en el plásmido pCRII. Las calles 1, 9 y 16 corresponden a colonias con el inserto (banda >4 kb). El resto de calles presentan ausencia de inserto (banda <4 kb). B) las colonias 1 (calle 1), 9 (calle 2) y 16 (calle 3) para distinguir la dirección del gen. El patrón de digestión de la Colonia 9 muestra la presencia de *Syt1* reverso (4395 + 941 bp). Marcador “Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder, ready-to-use” (Calle M).

5.2 Clonaje de *Syt1* en DONOR: Generación de DONOR-*Syt1*

Para obtener el plásmido DONOR-*Syt1* (Fig. 23) se realiza la digestión *XbaI/SgsI* de pCRII-*Syt1* reverse, procedente de la colonia 9, liberando el fragmento de *Syt1* flanqueado por los extremos cohesivos de *XbaI* y *SgsI* resultantes de la digestión. Tras realizar la misma digestión en el vector DONOR, se realiza una ligación de extremos cohesivos, insertando el gen direccionalmente.

Para confirmar la inserción génica de *Syt1* en el plásmido DONOR se realizaron varias estrategias de digestiones enzimáticas. Primero se realizó una digestión con *HindII*, de los plásmidos de cuatro de las quince colonias C1, C4 y D1). Como vemos en la figura 24.A de DONOR-*Syt1*, 8692 +1387 bp.

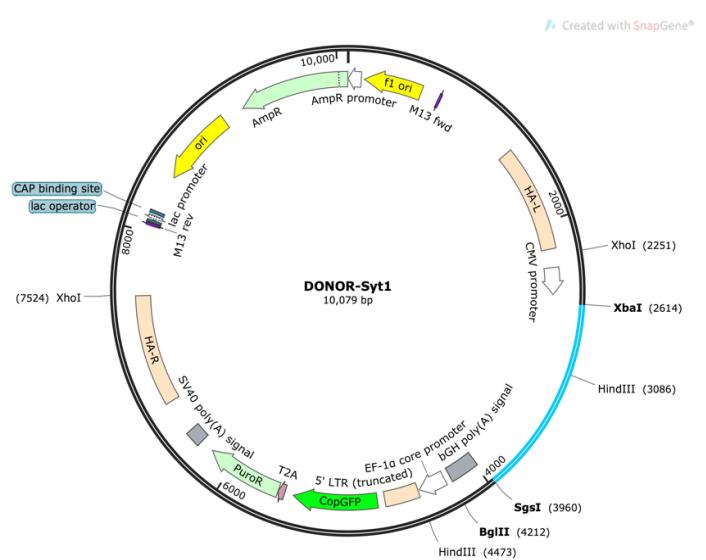


Fig. 23. Mapa del plásmido DONOR-*Syt1* con las enzimas de restricción usadas en este trabajo en su posición de corte. La sección azul corresponde a *Syt1*.

Posteriormente se realizaron las digestiones *XbaI/BglII* y *XhoI* de los plásmidos de dos colonias (B4 y C4) de las cuatro anteriores. Como se observa en la figura 24.B-C, ambas colonias presentan los patrones de digestión esperados, 8481 + 1598 bp para la digestión *XbaI/BglII* y 5273 + 4806 bp en la digestión con *XhoI*. Se envió a secuenciar el plásmido de la colonia C4 al Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA).

Mediante la herramienta BLAST del NCBI, se comprobó que la secuencia obtenida en la secuenciación es idéntica en un 97% a la del plásmido DONOR-*Syt1* creado en el programa bioinformático *SnapGene Viewer*, confirmando así definitivamente la correcta construcción de DONOR-*Syt1*.

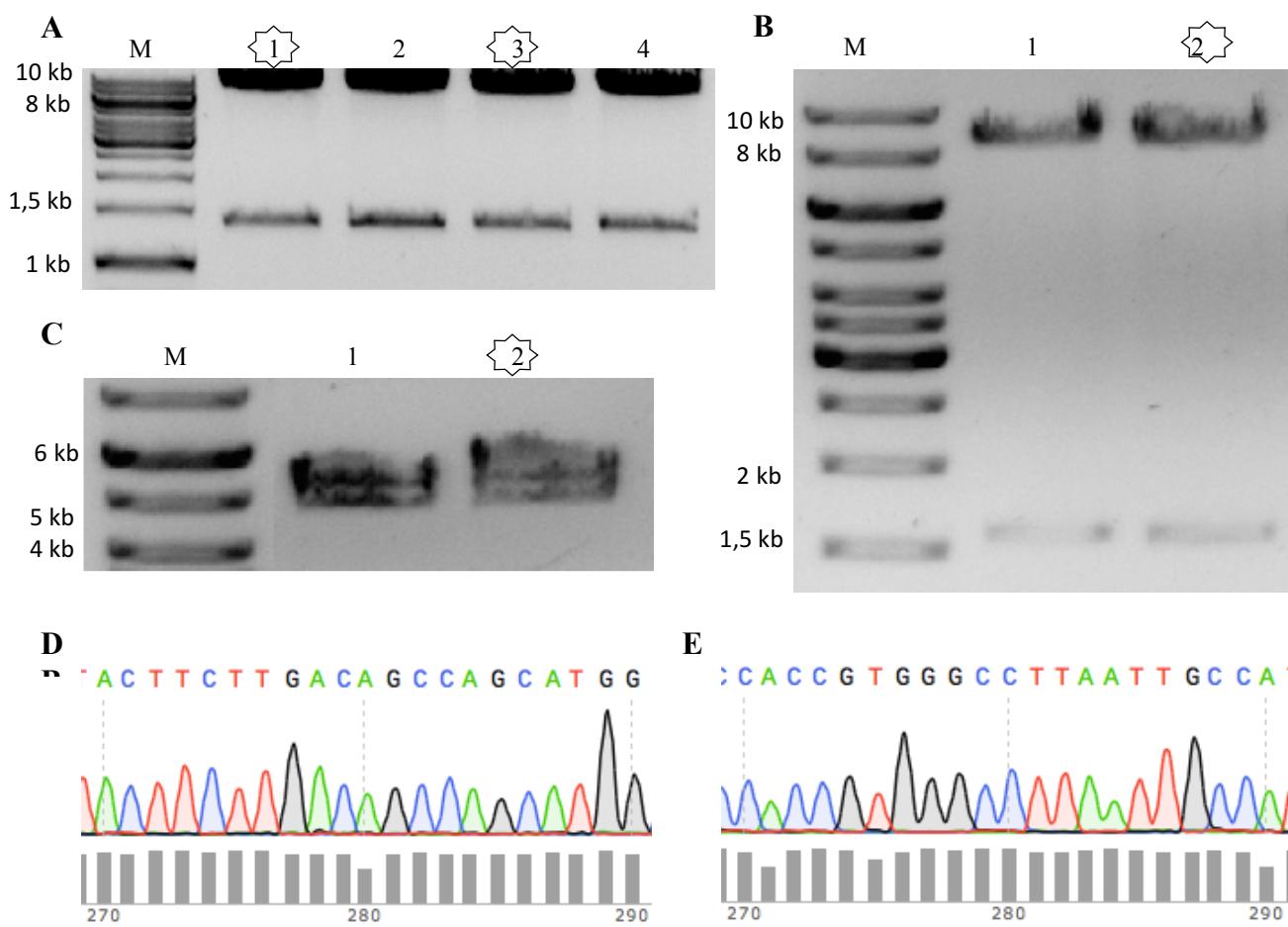


Fig. 24. Verificaciones de DONOR-*Syt1*. Geles de agarosa al 1% tras una electroforesis de 90 V durante 30 minutos de las digestiones A) *HindIII* de las colonias B4 (calle 1), C1 (calle 2), C4 (calle 3) y D1 (calle 4), todas muestran el patrón de digestión de DONOR-*Syt1* (8692 + 1387 bp); B) *XbaI/BglII* de B4 (calle 1) y C4 (calle 2), ambas muestran patrón esperado (8481 + 1598 bp); C) *XhoI* de B4 (calle 1) y C4 (calle 2), ambas muestran patrón esperado (5273 + 4806 bp). Marcador de peso molecular “Gene Ruler™ 1kb DNA ladder, ready-to-use” (calle M). D) Muestra del producto de secuenciacion que se ha obtenido tras la secuenciacion con el cebador directo y E) con el cebador reverso del plásmido de la colonia C4, con la secuencia de nucleótidos en el margen superior y las calidades en el margen inferior.

5.3 Verificación funcional de DONOR-*Syt1* en HepG2

Se realizó una qPCR del cDNA obtenido en la retrotranscripción del RNA extraído de las células HepG2 transfectadas con DONOR-*Syt1*, y de las células HepG2 sin transfección como control. En ambos casos se realizó todo por triplicado. De esta manera se compara la expresión de *Syt1* en las células transfectadas plásmido DONOR-*Syt1* con la expresión de *Syt1* de células control, analizando si las células son capaces de expresar los genes contenidos en el plásmido. Los resultados se muestran en la siguiente figura:

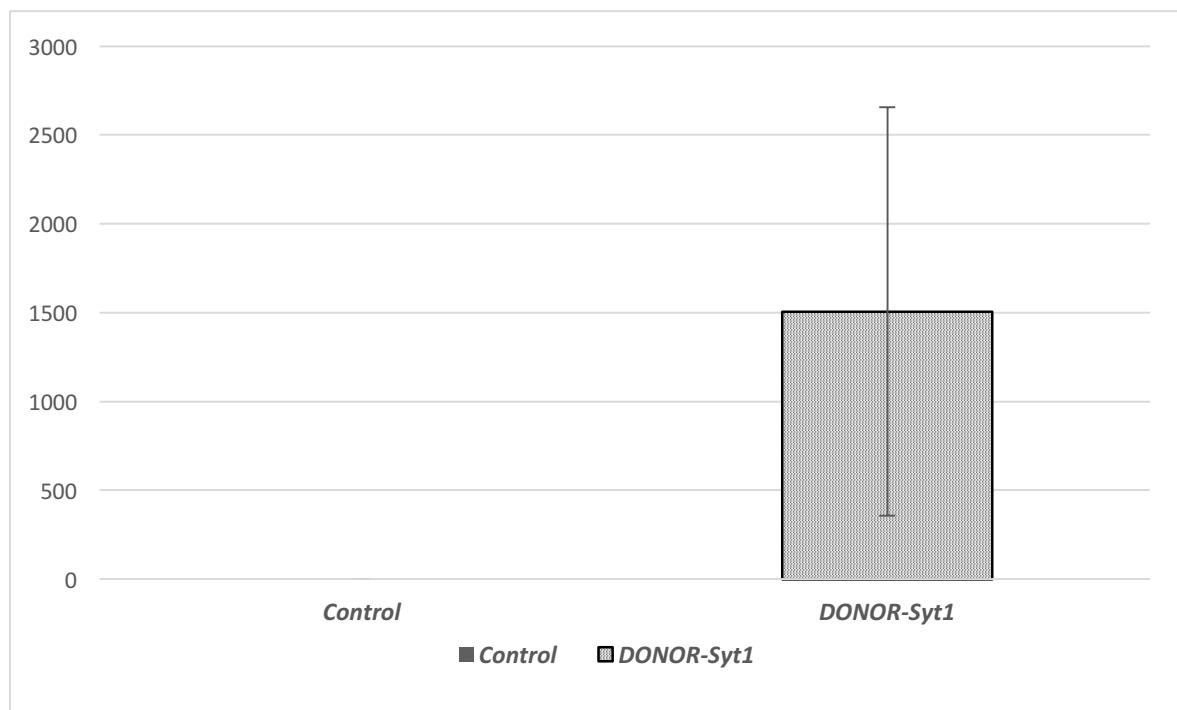


Fig. 25. Comparación de la expresión de *Syt1* en células HepG2 sin transfección (*Control*) y células HepG2 con transfección de DONOR-*Syt1* (*DONOR-Syt1*) obtenido por qPCR del cDNA de las células. Los resultados se expresan como media y desviación estándar de las muestras (n=3), medidas en Unidades Arbitrarias (eje vertical).

Los resultados muestran un claro aumento en la expresión de *Syt1* en las células en las cuales se realizó la transfección del plásmido DONOR-*Syt1*. Estos resultados confirman la correcta expresión de *Syt1* bajo el promotor CMV en las células HepG2.

5.4 Clonaje de *Syt1* reverse en DONOR: Generación de DONOR-*Syt1* reverse

Para obtener el plásmido DONOR-*Syt1* reverse, el primer paso fue la amplificación por In-Fusion PCR de *Syt1* reverse a partir del plásmido pCRII-*Syt1* reverse obtenido de la colonia 9. Con esta técnica se añade al amplicón dos fragmentos flanqueantes de 15 bp homólogos a los

extremos del DONOR linealizado con *XbaI*. Se realiza una electroforesis del amplicón, y se verifica la amplificación de *Syt1* reverse al observar el tamaño esperado del amplicón (1369) en un gel de agarosa al 1%. Se digiere el DONOR con la enzima *XbaI*.

Una vez purificado el amplicón de *Syt1* reverse con los fragmentos complementarios a los extremos del DONOR, y el DONOR linealizado, se recombinan ambos, resultando el plásmido DONOR-*Syt1* reverse.

Se realizan estrategias de verificación mediante digestiones enzimáticas con *HindIII* y *XbaI/XhoI* en una única colonia (colonia 3) de las doce resultantes de la transformación bacteriana. En la figura 27 se observan los patrones de digestión esperados en ambas digestiones, 9092+1005 bp en la digestión con *HindIII*, y 4806+3585+1706 bp en la digestión con *XbaI/XhoI*. Se envió a secuenciar el plásmido de la colonia 3 al Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional del CIBA.

Mediante la herramienta BLAST del NCBI se comprobó que las secuencias obtenidas son idénticas en un 99% a las del plásmido DONOR-*Syt1* reverse creado en el programa bioinformático *SnapGene Viewer*, confirmando definitivamente la correcta construcción del plásmido DONOR-*Syt1* reverse.

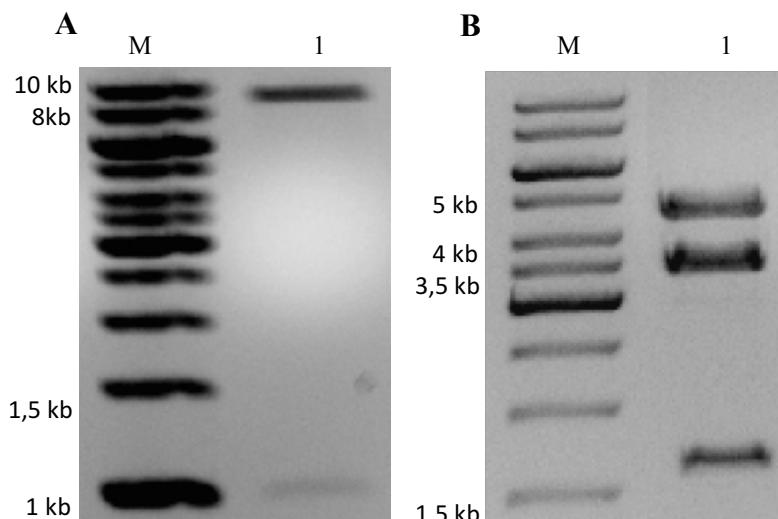


Fig. 27. Verificaciones de DONOR-*Syt1* reverse. A) Gel de agarosa con la digestión con *HindIII* de colonia 3 (calle 1). Muestra tamaños esperados (9092+1005 bp). B) Gel de agarosa con la digestión con *XbaI/XhoI* de colonia 3 (calle 1). Muestra tamaños esperados (4806+3585+1706 bp). Marcador de peso molecular “Gene Ruler™ 1kb DNA ladder, ready-to-use” (calles M).

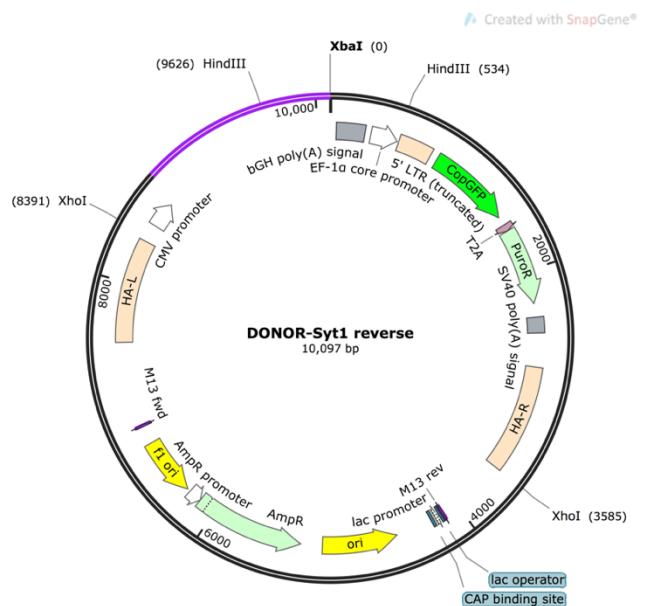
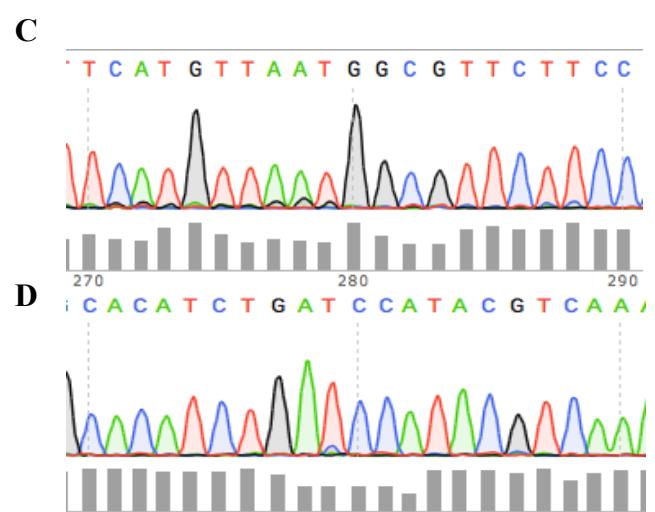


Fig. 26. Mapa del plásmido DONOR-*Syt1* reverse con las enzimas de restricción usadas en este trabajo en su posición de corte. La sección púrpura corresponde a *Syt1* reverse.



5.5 Verificación de la inserción genómica de *Syt1* y *Syt1* reverse

Comprobada la funcionalidad del vector DONOR-*Syt1* en las células HepG2, se realizó la co-transfección de DONOR-*Syt1* y pAAVS1 sgRNA/Cas9 para producir el Knock-in de *Syt1* y la co-transfección de DONOR-*Syt1* reverse y pAAVS1 sgRNA/Cas9 para producir el Knock-down de *SYT1*. Se añadió también el reactivo de transfección a una tercera población control, sin transfectar ningún plásmido. Tras diez días de selección con puromicina en las tres poblaciones, se trasladaron las células a la estación de imágenes de células Evos FLoid de Invitrogen. Este microscopio de fluorescencia captura la luz transmitida y las imágenes fluorescentes de la muestra.

Al utilizar la luz blanca se analiza la supervivencia celular a la selección antibiótica. Se observan células aisladas en las tres poblaciones. La cantidad de puromicina se añadió de manera que sobreviviesen un 6,2% de la población control, y aquellas células que expresan el gen de resistencia a la puromicina presente en los plásmidos DONOR-*Syt1* y DONOR-*Syt1* reverse.

Con el canal de fluorescencia FITC (luz verde) se observan las células supervivientes de las poblaciones resultantes de la transfección. Este canal de fluorescencia captura la luz en la misma longitud de onda que la luz emitida por la proteína del gen GFP presente en los plásmidos mencionados.

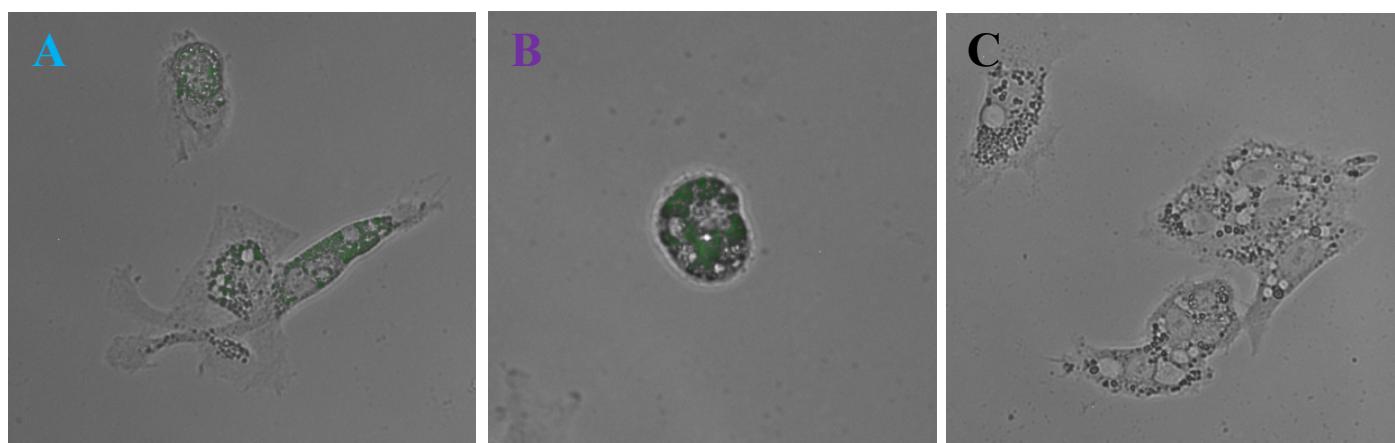


Fig. 28. Fotografías de células HepG2 A) con Knock-in de *Syt1*, B) con Knock-down de *SYT1*, C) control, sin transfección y con selección por puromicina. Imágenes superpuestas de fotografías con luz blanca y con luz verde realizadas por la estación de imágenes celulares Evos FLoid.

Como se observa en la figura anterior, se encontró fluorescencia en varias células del Knock-in de *Syt1* y en las células del Knock-down de *SYT1*, y no se encontró ninguna fluorescencia en la población control. Muestran fluorescencia tan solo aquellas células que expresan el gen GFP presente en los plásmidos DONOR-*Syt1* y DONOR-*Syt1* reverse. Al haber pasado más de siete días, se descarta la posible expresión transitoria del plásmido, y se confirma la inserción genómica y expresión de los genes transfectados.

Los presentes resultados confirman el correcto funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9 al realizar la inserción genómica de los genes marcadores junto a los genes de estudio, *Syt1* en el caso del Knock-in de *Syt1*, y *Syt1* reverse en el caso del Knock-down de *SYT1*. El Knock-in presentará una sobreexpresión de *Syt1*. El Knock-down de *SYT1* presentará un descenso de la expresión de *SYT1*, gracias al mecanismo de interferencia por RNA explicado anteriormente (ver apartado 2.5 *Silenciamiento génico*).

6. DISCUSIÓN

6.1 Clonaje clásico vs clonaje por recombinación

Una vez confirmadas las construcciones plasmídicas finales, se examinan las técnicas de clonaje seguidas, la clásica empleada para DONOR-*Syt1* y la técnica de clonaje por recombinación seguida en el caso de DONOR-*Syt1* reverse. En la vía clásica, se necesitó de un subclonaje en el vector pCRII, diferentes protocolos de ligaciones, un éxito en la transformación bacteriana de pCRII-*Syt1* reverse de 4,16% (solo 1 colonia de 24) y digestiones enzimáticas para distinguir la dirección del inserto cuando la ligación no es de extremos cohesivos. La técnica por recombinación realiza la inserción direccional del inserto, con un único uso de las enzimas de restricción, sin ligaciones ni subclonajes, y con un éxito en la transformación bacteriana del 100%. Comparando la semejanza de los plásmidos secuenciados con las secuencias creadas en el programa bioinformático *SnapGene Viewer*, se observa una eficiencia un 2% mayor en el plásmido creado por recombinación.

Por estas características, se puede afirmar que la técnica de clonaje por recombinación resulta ser una alternativa más rápida y eficaz que la técnica clásica.

6.2. Perspectivas futuras: estudio funcional de SYT1

En este trabajo se ha confirmado la expresión celular de *Syt1* y la integración genómica de *Syt1* y *Syt1* reverse en las células HepG2. Para continuar el presente trabajo hacia el estudio del papel de SYT1 en la esteatosis hepática humana, lo primero que habrá que hacer es aislar las células con DNA recombinante para obtener una línea monoclonal, de forma que todas las células del linaje habrán sufrido las mismas modificaciones genéticas. De las células resistentes a la selección por puromicina se separarán las células que han mostrado fluorescencia verde con el uso de un separador celular o sorter. Se sembrarán las células individualmente en placas de 96 pocillos, para producir líneas monoclonales.

El siguiente paso será confirmar la integración de los genes en el locus AAVS1. Para comprobar la integración específica en el genoma, se realizará una amplificación por PCR, donde un cebador de la pareja híbrida con el cromosoma 19 y el otro híbrida con el inserto. De esta forma solo se producirá la amplificación del fragmento si hay integración génica en el locus de interés.

Al tener una línea monoclonal con los genes insertados en la región segura del genoma AAVS1, ya se podrán realizar los diferentes exámenes fenotípicos en la línea celular con sobreexpresión de *Syt1*, en la línea con silenciamiento de SYT1 y en una línea de células HepG2 control. Los exámenes fenotípicos se centrarán en analizar la expresión de proteínas mediante análisis de western blot y análisis del medio secretado por las células, particularmente los

lipoproteínas y exosomas secretados. También se realizará la Técnica de Fijación de Membranas (o Patch Clamp) en colaboración con el Dr. Ralf Köhler del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza. Esta técnica permite el estudio individual o múltiple de canales iónicos, pudiendo medir los efectos de la unión de Ca^{2+} a SYT1. Al ser esta su principal implicación en la fusión de membranas en el tejido neuroendocrino, esta técnica proporcionaría una valiosa información, pudiendo estudiar a nivel molecular la función de SYT1 hepático en presencia de Ca^{2+} .

6.3 Células HepG2: limitaciones y alternativas

En un principio este trabajo se planificó para incluir el estudio funcional de SYT1, con los exámenes fenotípicos de las poblaciones celulares modificadas genéticamente. Pero debido a varias dificultades de la línea celular HepG2, el trabajo se limitó a lo expuesto anteriormente. En este apartado se analizan las limitaciones encontradas en las células HepG2, y una serie de alternativas propuestas.

Una de las principales limitaciones es el bajo porcentaje de transfección conseguido. En anteriores trabajos en el grupo, se calculó el éxito de la transfección realizada en idénticas condiciones a las del presente estudio. Haciendo una selección por citometría, las células que mostraron fluorescencia representaron un 5% de la población tras una transfección, y tan solo un 0,6% tras una co-transfección de dos plásmidos [7]. Esto podría deberse a un cúmulo de factores, como una excesiva confluencia en el momento de realizar la transfección. Algunos investigadores defienden que el mayor porcentaje de transfección con HepG2 se consigue al 50% de confluencia, descendiendo significativamente cuanto más aumente la confluencia. También podría deberse a la baja eficiencia del reactivo de transfección usado. Ciertos investigadores defienden que actualmente los reactivos basados en tecnología de nanopartículas lipídicas son los más efectivos para emplear con células más difíciles de transfectar, pudiendo llegar a un 60% de transfección en HepG2. Una última alternativa para aumentar significativamente el porcentaje de células transfectado, sería realizar dos transfecciones en días sucesivos, antes de aplicar la selección.

Otra limitación en este trabajo fue la baja tasa de crecimiento celular. Tras una individualización de la población, y observando las células al microscopio, se observa un alto porcentaje de células flotando en el medio (células muertas), y un bajo porcentaje de células adheridas (células vivas). Esto podría deberse a un problema en la adhesión de las células al material de siembra, a una alta mortalidad celular. Para solucionar el problema de la adhesión, se podría recubrir el fondo del pocillo/frasco/placa con colágeno tipo I antes de añadir las células. Las células se adhieren antes al colágeno que a la superficie de plástico lo que permitiría alcanzar antes una mayor confluencia.

Una alta mortalidad celular podría deberse a varios factores, como exceso o defecto de nutrientes, y la presencia de algún compuesto tóxico para las células. Varios investigadores

afirman que la glucosa a altos niveles es tóxica para las células HepG2, produciendo resistencia a este azúcar. Para considerar este problema, podrían realizarse ensayos de viabilidad con diferentes concentraciones de glucosa añadidas al medio de cultivo DMEM para poder medir su efecto nocivo y su concentración óptima. El marcador GFP también podría presentar efectos citotóxicos, como afirman en un estudio realizado en células HepG2 [92]. En este estudio, encuentran relación entre la expresión de este marcador y la inducción de apoptosis. La solución a este problema sería la elección de otra proteína fluorescente, pudiendo elegir entre muchas disponibles, como la proteína fluorescente roja TagRFP.

7. CONCLUSIONES

1. La técnica de clonación por recombinación es más eficiente que la técnica clásica basada en digestiones enzimáticas y ligaciones.
2. El sistema de edición genética CRISPR/Cas9 permite el desarrollo de células modificadas genéticamente.
3. Es necesario optimizar un protocolo específico para la línea celular HepG2 en varios aspectos como transfección, medio de crecimiento o adherencia.

7. CONCLUSIONS

1. The recombination cloning technique is more efficient than the classical technique based on enzymatic digestions and links.
2. The CRISPR/Cas9 genetic editing system allows the development of genetically modified cells.
3. It is necessary to optimize a specific protocol for the HepG2 cell line in several aspects such as transfection, growth medium or adherence.

8. AGRADECIMIENTOS

Querría agradecer a todos los que me han acompañado haciendo posibles este máster y este trabajo. En primer lugar, como siempre, a mis padres. Por seguir apostando por mí, por creer en mí. Nunca podré agradecerlos como se merece todo lo que habéis (y seguís) haciendo por mí. A todos mis amigos, por aguantar las charlas sobre el CRISPR/Cas9 y mis plásmidos. Gracias por acompañarme durante esta bonita etapa de mi vida.

Agradecer a todos los miembros del grupo, Cris, Santiago, Roberto, Angie. Me he sentido uno más entre vosotros. A mi tutor Luis, el que me ha aguantado (y seguirá un poco más) largas horas en el laboratorio, no sé si te lo he dicho alguna vez, pero lo que has hecho por mí estos años no puedo agradecértelo lo suficiente. Bajo tu látigo has convertido el adolescente que llegó para hacer el TFG. en (casi) un investigador. Recordaré siempre con cariño todo lo que me has enseñado. A MªJesús, por tus exhaustivas correcciones y tu sonrisa ante mi caos. A Jesús, por la paciencia, cariño e infinitos consejos que has tenido conmigo. Profesionalmente he aprendido contigo la cualidad que debe definir al investigador: Constancia. Personalmente, he disfrutado de nuestras charlas, música y buenos ratos compartidos. Puedo decir con orgullo, que mis tutores se han convertido en mis amigos.

Por último, a la que se ha convertido en mi compañera en este viaje que es la vida. Teresa. Gracias por ayudarme tantísimo con este trabajo, y sobretodo, por compartir mis pasiones como si fueran las tuyas propias. Espero que sigas haciéndolo toda la vida.

A todos, muchas gracias de corazón.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Farrell, G.C. and C.Z. Larter, *Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis*. Hepatology, 2006. **43**(2 Suppl 1): p. S99-S112
2. Daly, A.K., et al., *Genetic determinants of susceptibility and severity in nonalcoholic fatty liver disease*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. **5**(2): p. 253-63
3. Südhof, T.C., *A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond*. Nat Med, 2013. **19**(10): p. 1227-31.
4. Kiessling, V., et al., *Rapid fusion of synaptic vesicles with reconstituted target SNARE membranes*. Biophys J, 2013. **104**(9): p. 1950-8.
5. Guillén, N., et al., *Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver*. Physiol Genomics, 2009. **37**(3): p. 187-98
6. Sancho-Knapik, S., *Caracterización y regulación nutricional de la Sinaptotagmina 1 hepática de ratón*. Tesis doctoral, 2015. Universidad de Zaragoza. Zaragoza.
7. Sanchez Marco, J., *Empleo del sistema CRISPR/Cas9 para modificar el genoma de líneas celulares*. Trabajo Fin de Máster, 2016. Universidad de Zaragoza. Zaragoza.
8. Hsu, P. D., Lander, E. S. & Zhang, F. *Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering*. Cell, 2014. **157**: p. 1262-78
9. Montoliu, L., *Gene transfer strategies in animal transgenesis*. Cloning Stem Cells, 2002. **4**: p. 39-46.
10. Capecchi, M. R., *Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century*. Nat. Rev. Genet., 2005. **6**: p. 507-12.
11. Capecchi, M.R., *Altering the genome by homologous recombination*. Science, 1989. **244**(4910): p. 1288-92
12. Martello, G. & Smith, A., *The nature of embryonic stem cells*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 2014. **30**: p. 647-75.
13. McCreath, K. J. et al., *Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells*. Nature, 2000. **405**: p. 1066-9.
14. Campbell, K.H., et al., *Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives*. Theriogenology, 2007. **68** Suppl 1: p. 214-31.
15. Bibikova, M., et al., *Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases*. Science, 2003. **300**: p. 764.
16. Urnov, F.D., et al., *Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases*. Nature, 2005. **435**: p. 646-651.
17. Sommer, D., et al., TALEN-mediated genome engineering to generate targeted mice. Chromosom. Res., 2015. **23**: p. 43-55.
18. Boch, J., et al., *Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors*. Science, 2009. **326**: p. 1509-1512.
19. Barrangou, R., *RNA-mediated programmable DNA cleavage*. Nat. Bio- technol. 2012 **30**: p. 836-838.
20. Carroll, D., *A CRISPR approach to gene targeting*. Mol. Ther., 2012. **20**: p. 1658-1660.
21. Ishino, Y., et al., *Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product*. J. Bacteriol., 1987. **169**: p. 5429-33.
22. Lander E. S., *The Heroes of CRISPR*. Cell, 2016. **164** (1-2): p. 18-28.

23. Mojica, F. J., et al., *Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria*. Mol. Microbiol., 2000. **36**: p. 244–6.
24. Jansen, R., et al., *Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes*. Mol. Microbiol., 2000. **43**: p. 1565–75.
25. Mojica, F.J. et al., *Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements*. J Mol Evol., 2005. **60** (2): p 174-82
26. Pourcel, C., Salvignol, G., and Vergnaud, G. *CRISPR elements in Yersinia pestis acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies*. Microbiology, 2005. **151**: p. 653–663.
27. Barrangou, R. et al., *CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes*. Science, 2007. **315**: p. 1709–12 (2007).
28. Brouns, S. J. J. et al., *Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes*. Science, 2008. **321**: p. 960–4.
29. Marraffini, L. A. & Sontheimer, E. J., *CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA*. Science, 2008. **322**: p. 1843–5.
30. Marraffini, L. A., *CRISPR-Cas immunity in prokaryotes*. Nature, 2015. **526**: p. 55–61.
31. Garneau, J.E., et al., *The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA*. Nature, 2010. **468**: p. 67–71.
32. Horvath, P. et al., *Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in Streptococcus thermophilus*. J. Bacteriol., 2008. **190** : p. 1401–12.
33. Deveau, H. et al., *Phage response to CRISPR-encoded resistance in Streptococcus thermophilus*. J. Bacteriol. 2008. 190 : p. 1390–400.
34. Mali, P. et al., *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. Science, 2013. **339** : p. 823– 6.
35. Deltcheva, E., et al., *CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III*. Nature, 2011. **471**: p. 602–607.
36. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 2012. **337**: p. 816–821.
37. Sapranauskas, R., et al., *The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli*. Nucleic Acids Res., 2011. **39**, 9275–9282.
38. Gasiunas, G., et al., *Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2012. **109**: p. 2579-86.
39. Grimm, W., Korting, H. C. & Stolz, W., *Disseminated herpes zoster in chronic lymphatic leukemia*. Hautarzt, 1989. **40** (9): p. 582-585.
40. Cong, L., et al., *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. Science, 2013. **339**:p. 819–823.
41. Mali, P., et al., *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. Science, 2013. **339**: p. 823–826.
42. Jinek, M., et al., *RNA-programmed genome editing in human cells*. eLife, 2013. **2**: p. 471.
43. Cho, S.W., et al., *Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease*. Nat. Biotechnol., 2013. **31**: p. 230–232.
44. Hwang, W.Y., et al., *Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system*. Nat. Biotechnol., 2013. **31**: p. 227–229.

45. Cyranoski D., *CRISPR gene-editing tested in a person for the first time*. Nature, 2016. **539**: p. 479.
46. Ledford, H., *CRISPR fixes disease gene in viable human embryos*. Nature, 2017. **548** (7665): p. 13-14.
47. Liu, S. J., et al., *CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells*. Science, 2017. **355** (6320).
48. Reardon, S., *Welcome to the CRISPR zoo*. Nature, 2016. **531** (7593): p. 160-163.
49. Prelich, G., *Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation*. Genetics, 2012. **190**(3): p. 841-54.
50. Santarius, T., et al., *A census of amplified and overexpressed human cancer genes*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(1): p. 59-64.
51. Carroll, S.B., *Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution*. Cell, 2008. **134**(1): p. 25-36.
52. Maier, P., C. von Kalle, and S. Laufs, *Retroviral vectors for gene therapy*. Future Microbiol, 2010. **5**(10): p. 1507-23.
53. Mocellin, S. & Provenzano, M., *RNA interference: learning gene knock-down from cell physiology*. J Transl Med, 2004. **2** (1): p. 39.
54. Hannon, G. J., *RNA interference*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 244-251.
55. Goldberg, I.J. and H.N. Ginsberg, *Ins and outs modulating hepatic triglyceride and development of nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2006. **130**(4): p. 1343-6.
56. Browning, J.D. and J.D. Horton, *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury*. J Clin Invest, 2004. **114**(2): p. 147-52.
57. Valenti, L., et al., *Dietary anthocyanins as nutritional therapy for nonalcoholic fatty liver disease*. Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 145421.
58. Day, C.P., *Pathogenesis of steatohepatitis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2002. **16**(5): p. 663-78.
59. Omagari, K., et al., *Fatty liver in non-alcoholic non-overweight Japanese adults: incidence and clinical characteristics*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17**(10): p. 1098-105.
60. Shen, L., et al., *Prevalence of nonalcoholic fatty liver among administrative officers in Shanghai: an epidemiological survey*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(5): p. 1106-10.
61. Bellentani, S., et al., *Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease*. Dig Dis, 2010. **28**(1): p. 155-61.
62. Lazo, M., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study*. Bmj, 2011. **343**: p. d6891.
63. Browning, J.D., et al., *Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity*. Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1387-95.
64. Südhof, T.C., *Synaptotagmins: why so many?* J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 7629-32.
65. Südhof, T.C. and J. Rizo, *Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic*. Neuron, 1996. **17**(3): p. 379-88.
66. Perin, M.S., et al., *Domain structure of synaptotagmin (p65)*. J Biol Chem, 1991. **266**(1): p. 623- 9.
67. Czibener, C., et al., *Ca2+ and synaptotagmin VII-dependent delivery of lysosomal membrane to nascent phagosomes*. J Cell Biol, 2006. **174**(7): p. 997-1007.
68. Hu, Z.T., et al., *Synaptotagmin IV regulates dense core vesicle (DCV) release in*

- LbetaT2 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **371**(4): p. 781-6.
69. Zhao, H., et al., *Synaptotagmin VII regulates bone remodeling by modulating osteoclast and osteoblast secretion*. Dev Cell, 2008. **14**(6): p. 914-25.
70. Davis, C.W. and B.F. Dickey, *Regulated airway goblet cell mucin secretion*. Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 487-512.
71. Matthew, W.D., L. Tsavalier, and L.F. Reichardt, *Identification of a synaptic vesicle-specific membrane protein with a wide distribution in neuronal and neurosecretory tissue*. J Cell Biol, 1981. **91**(1): p. 257-69.
72. Lv, J.H., L. He, and S.F. Sui, *Lipid rafts association of synaptotagmin I on synaptic vesicles*. Biochemistry (Mosc), 2008. **73**(3): p. 283-8.
73. Heindel, U., M.F. Schmidt, and M. Veit, *Palmitoylation sites and processing of synaptotagmin I, the putative calcium sensor for neurosecretion*. FEBS Lett, 2003. **544**(1-3): p. 57-62.
74. Tucker, W.C. and E.R. Chapman, *Role of synaptotagmin in Ca²⁺-triggered exocytosis*. Biochem J, 2002. **366**(Pt 1): p. 1-13.
75. Lynch, K.L., et al., *Synaptotagmin C2A loop 2 mediates Ca²⁺-dependent SNARE interactions essential for Ca²⁺-triggered vesicle exocytosis*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(12): p. 4957-68.
76. Bai, J. and E.R. Chapman, *The C2 domains of synaptotagmin--partners in exocytosis*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(3): p. 143-51.
77. Tucker, W.C., T. Weber, and E.R. Chapman, *Reconstitution of Ca²⁺-regulated membrane fusion by synaptotagmin and SNAREs*. Science, 2004. **304**(5669): p. 435-8.
78. Zhang, J.Z., et al., *Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling*. Cell, 1994. **78**(5): p. 751-60.
79. Jarousse, N. and R.B. Kelly, *The AP2 binding site of synaptotagmin I is not an internalization signal but a regulator of endocytosis*. J Cell Biol, 2001. **154**(4): p. 857-66.
80. Lai, Y., et al., *Synaptotagmin 1 and Ca²⁺ drive trans SNARE zippering*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 4575.
81. Musch, M.W., et al., *Cyclic AMP-mediated endocytosis of intestinal epithelial NHE3 requires binding to synaptotagmin I*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **298**(2): p. G203-11.
82. Musch, M.W., et al., *Synaptotagmin I binds intestinal epithelial NHE3 and mediates cAMP- and Ca²⁺-induced endocytosis by recruitment of AP2 and clathrin*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(6): p. G1549-58.
83. Rastaldi, M.P., et al., *Glomerular podocytes contain neuron-like functional synaptic vesicles*. FASEB J, 2006. **20**(7): p. 976-8.
84. Xia, J.F., et al., *Flavonoids as potential anti-hepatocellular carcinoma agents: recent approaches using HepG2 cell line*. Drug Discov Ther, 2013. **7**(1): p. 1-8.
85. Knowles, B.B., C.C. Howe, and D.P. Aden, *Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen*. Science, 1980. **209**(4455): p. 497-9.
86. Roe, A.L., et al., *HepG2 cells: an in vitro model for P450-dependent metabolism of acetaminophen*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **190**(1): p. 15-9.
87. Dehn, P.F., et al., *Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies*. In Vitro Cell Dev Biol

- Anim, 2004. **40**(5-6): p. 172-82.
- 88. Hart, S.N., et al., *A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues*. Drug Metab Dispos, 2010. **38**(6): p. 988-94.
 - 89. Sadelain, M., Papapetrou, E. P. & Bushman, F. D., *Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome*. Nat. Rev. Cancer, 2011. **12**: p. 51.
 - 90. Superior One-Step Cloning of PCR Fragments into Any Vector with the In-Fusion 2.0 Cloning System. (April 2007) *Clonetechniques* **22**(2):13–15
 - 91. Efficient Cloning of Long PCR Inserts with the In-Fusion PCR Cloning System. (April 2007) *Clonetechniques* **22**(2):16–17
 - 92. Liu, H. S., et al., *Is Green Fluorescent Protein Toxic to the Living Cells?* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260** (3): p. 712–717.