

# Trabajo Fin de Grado

Estudio del papel en la proliferación celular y en el metabolismo celular de la isoforma mitocondrial de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK-M) mediante edición genómica con CRISPR-Cas9

Study of the role in cell proliferation and metabolism of the mitochondrial isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) by genomic editing with CRISPR-Cas9

Autora

Guayente Latorre Pastor

Directores

José Alberto Carrodeguas Villar

Pedro Latorre Muro

Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2017

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	1
2.1. Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa .....	1
2.2. Técnica CRISPR-Cas9.....	2
3. OBJETIVOS .....	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
4.1. Líneas celulares .....	6
4.1.2. Establecimiento y mantenimiento de las líneas celulares .....	6
4.1.3. Criopreservación de las líneas celulares y obtención de <i>pellets</i> .....	6
4.2. Clonaje.....	7
4.2.1. Plásmido pX335 .....	7
4.2.2. Diseño de oligonucleótidos .....	8
4.2.3. Obtención del plásmido pX335 purificado .....	9
4.2.4. Digestión del DNA plasmídico puro.....	9
4.2.5. Hibridación de oligos .....	10
4.2.6. Ligación del vector con el inserto.....	10
4.2.7. Transformación y selección de colonias.....	10
4.3. Obtención de la línea celular estable .....	12
4.3.1. Co-transfección .....	12
4.3.2. Selección de clones positivos .....	12
4.3.2.1. PCR.....	13
4.3.2.2. Secuenciación .....	14
4.3.2.3. Western-blot.....	14
4.4. Ensayo de producción glucosa .....	15
4.5. Ensayo de Bradford .....	16
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
5.1. Purificación del plásmido pX335 .....	16
5.2. Digestión del DNA plasmídico .....	16
5.3. Transformación y selección de colonias.....	17
5.4. Selección de clones positivos .....	19
5.5. Ensayo de producción de glucosa y Bradford .....	22
6. CONCLUSIONES .....	24
BIBLIOGRAFÍA .....	24
ANEXOS .....	26
Anexo I.....	26
Anexo II.....	28
Anexo III.....	30

## 1. RESUMEN

La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa es una proteína clave del metabolismo celular al catalizar la reacción limitante de la gluconeogénesis. Cuenta con dos isoformas, citosólica y mitocondrial. El papel de esta última en el organismo no se conoce todavía en profundidad, por lo que su estudio resulta muy interesante. Una aproximación adecuada para tratar de elucidar su función es silenciarla mediante la técnica CRISPR-Cas9, una potente y novedosa herramienta de edición genética, dirigida específicamente a producir una delección en el primer exón del gen que codifica para la proteína. Por una parte, los resultados muestran que la eficiencia de la técnica no ha sido muy buena, ya que de todos los clones seleccionados, solo dos muestran evidencias de delección. Por otra parte, los efectos fenotípicos observados en el metabolismo no son muy significativos, al no haber grandes diferencias en la producción de glucosa en los clones silenciados con respecto al silvestre. Asimismo, no ha sido posible correlacionar el silenciamiento de la proteína con una proliferación celular alterada, ya que los clones positivos han resultado ser de crecimiento tanto rápido como lento, del mismo modo que clones negativos tenían bien crecimiento rápido, bien lento.

### Abstract

Phosphoenolpyruvate carboxykinase is a key protein in the cellular metabolism since it catalyzes the rate-limiting reaction of the gluconeogenesis. It has two isoforms, a cytosolic one and a mitochondrial one. The role in the organism of the latter is yet not known in depth, so that its study is very interesting. An appropriate approach to try to elucidate its function is to silence it using the CRISPR-Cas9 technique, a powerful and novel genetic-editing tool, specifically targeted to produce a deletion in the first exon of the gene that encodes the protein. On the one hand, the results show that the efficiency of the technique has not been very good being that, of all selected clones, only two of them show evidence of deletion. On the other hand, the phenotypic effects observed in the metabolism are not very significant because there are no large differences in glucose production in silenced clones compared to the wildtype. Likewise it has not been possible to correlate protein silencing with altered cell proliferation, since positive clones have been found to be both fast and slow growing, in the same way that negative clones were either fast or slow growing.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) es una enzima que participa en la gluconeogénesis catalizando la conversión del oxalacetato (OAA) en fosfoenolpiruvato (PEP), que es el paso limitante de esta ruta metabólica <sup>[1]</sup>.

Su acción metabólica requiere de GTP, además del oxalacetato, como sustrato; así como el cofactor Mn<sup>2+</sup><sup>[1]</sup>.



La PEPCK tiene dos isoformas, una citosólica (PCK1 o PEPCK-C) y otra mitocondrial (en adelante, PEPCK-M, aunque también se la conoce como PCK2), que aunque catalizan la misma reacción, están codificadas por distintos genes <sup>[17]</sup>. Ambas participan activamente en gluconeogénesis en el tejido renal y hepático, y en gliceroneogénesis en el hígado y el tejido adiposo <sup>[17]</sup>.

El gen de la **PEPCK-M** se encuentra, en humanos, en el cromosoma 14, concretamente en el locus 14q11.2-q12<sup>[2]</sup>. La forma canónica de la proteína cuenta con 640 aminoácidos, de los cuales los 32 primeros constituyen un péptido de tránsito a la mitocondria. Actúa como un monómero<sup>[1]</sup>.

Mientras que la expresión de PEPCK-C está más restringida a hígado, intestino delgado, córtex del riñón y tejido adiposo, tejidos gluconeogénicos<sup>[3]</sup>; la PEPCK-M tiene una alta expresión en células no gluconeogénicas como células  $\beta$  pancreáticas o fibroblastos<sup>[19]</sup>. De manera más minoritaria, se expresa en linfocitos T y B<sup>[3]</sup>, cerebro, corazón y placenta<sup>[19]</sup>. Además, la expresión, no solo depende del tejido, sino también de la etapa de desarrollo. Así, se ha visto que en mamíferos, antes del nacimiento, solo se expresa PEPCK-M<sup>[18]</sup>.

Curiosamente, y al contrario que la PEPCK-C, que está regulada por una gran variedad de estímulos hormonales como glucagón (que induce la expresión) o insulina (que la inhibe al antagonizar al glucagón); la PEPCK-M parece expresarse de manera constitutiva<sup>[19]</sup>.

En cuanto al papel metabólico de la PEPCK-M, hasta ahora ha permanecido bastante desconocido. Sin embargo, hallazgos recientes parecen mostrar que hay una interacción compleja con la isoforma citosólica en la gluconeogénesis hepática<sup>[3]</sup>, de manera que ejercen una función cataplerótica retirando los intermediarios del ciclo de Krebs. Paralelamente, se ha visto que tiene propiedades anapleróticas ya que sintetiza oxalacetato, realimentando por tanto el ciclo de Krebs<sup>[17]</sup>.

Por otra parte, la PEPCK-M se ha asociado con la secreción de insulina mediada por glucosa en las células  $\beta$  pancreáticas. En estas células, el metabolismo de glucosa conduce a la producción de GTP mitocondrial por medio de la enzima succinil-CoA sintetasa en el ciclo de Krebs. El GTP, debido a que no tiene un transportador específico, queda atrapado en la mitocondria; de manera que la PEPCK-M lo utiliza para convertir el oxalacetato en fosfoenolpiruvato. Este último sale de la mitocondria para convertirse en piruvato en el citosol, desencadenando, por mecanismos todavía desconocidos, la liberación de insulina<sup>[18]</sup>.

La PEPCK-M regula por tanto la secreción de insulina y la gluconeogénesis. Como un elevado flujo gluconeogénico contribuye a aumentar los niveles de glucosa plasmática en ayunas, lo cual se asocia con diabetes mellitus tipo 2; la PEPCK-M podría ser un factor importante en la diabetes e incluso una diana terapéutica viable en humanos<sup>[18]</sup>.

Asimismo se ha visto que el gen de la PEPCK-M constituye un mecanismo de supervivencia bajo condiciones de estrés, ya que en varios tumores humanos se da una expresión diferencial de PEPCK-M inducida por señales de la respuesta integrada a estrés (ISR), como inductores químicos de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) y de la respuesta a aminoácidos (AAR)<sup>[3]</sup>. Por ello, dirigir fármacos contra esta podría permitir matar células tumorales al eliminar su principal elemento de adaptación a un ambiente hostil<sup>[20]</sup>.

Debido a que hay aspectos de la PEPCK-M que no se conocen, el silenciamiento de la misma puede contribuir a entender su función biológica.

## 2.2. Técnica CRISPR-Cas9

La edición genética por nucleasas permite realizar manipulaciones sitio-específicas, y al contrario que las herramientas de terapia génica disponibles previamente, las nucleasas no solo introducen DNA

exógeno en la célula diana, sino que permiten corregir alteraciones genéticas, lo que las hace preferibles para terapia génica <sup>[9]</sup>.

Las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) y las nucleasas de efectores de tipo activador de transcripción (TALEN) se basan en la fusión de un módulo de reconocimiento específico de DNA con una nucleasa inespecífica que produce un corte de cadena simple. Con la combinación de pares de proteínas específicas, se inducen cortes de doble cadena en el DNA, de manera que se activan los sistemas de reparación celular, dando lugar a modificaciones genéticas <sup>[21]</sup>.

Sin embargo, y aunque el uso de estas ya ha permitido hacer modificaciones genéticas dirigidas, todavía hay necesidad de nuevas tecnologías más escalables y asequibles, y de fácil manipulación <sup>[7]</sup>. Así, CRISPR ha simplificado mucho la edición genética, ya que no requiere modificar pares de proteínas específicas para cada sitio diana <sup>[8]</sup>. Además, se presenta como una herramienta con gran capacidad para producir modificaciones dirigidas en cualquier organismo <sup>[5]</sup>.

El sistema CRISPR (*Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats* o Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas) es un sistema inmune adaptativo procariota <sup>[5]</sup> que otorga protección contra virus y otros elementos genéticos móviles <sup>[6]</sup>.

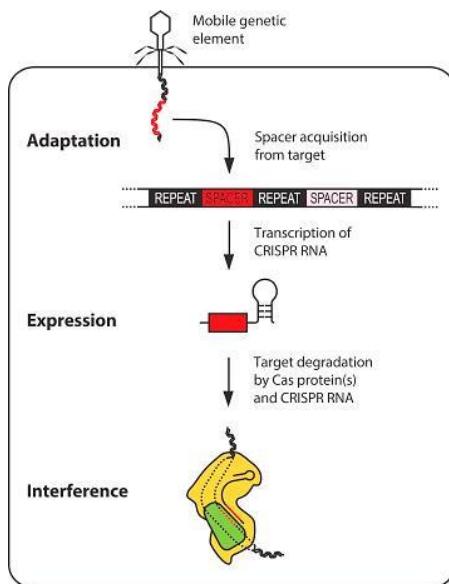
El **locus CRISPR**, observado por primera vez en *Escherichia coli*, está presente en un 84% de las arqueas y un 45% de las bacterias. Es una agrupación de secuencias palindrómicas repetidas cortas separadas por espaciadores con secuencias únicas que se puede encontrar tanto en el cromosoma como en el DNA plasmídico de los procariotas. Los espaciadores derivan de ácidos nucleicos de virus y plásmidos, de manera que son usados como elementos de reconocimiento para destruir a estos agentes. La actividad de CRISPR requiere además la acción de las nucleasas Cas, que normalmente se encuentran adyacentes al locus CRISPR (*Figura 1*) <sup>[6]</sup>.

El proceso de defensa mediada por CRISPR-Cas se divide en tres etapas (*Figura 1*) <sup>[6]</sup>, que se detallan a continuación:

En la primera etapa, adaptación, como consecuencia de una primera infección, el genoma del agente infeccioso se fragmenta y se incorpora al locus CRISPR como un nuevo espaciador. Esto permite que en el propio locus se genere un registro cronológico de las infecciones que ese organismo y sus antepasados han padecido, dado que como el genoma se modifica con la adquisición de los espaciadores, los descendientes pueden heredar la protección <sup>[6]</sup>.

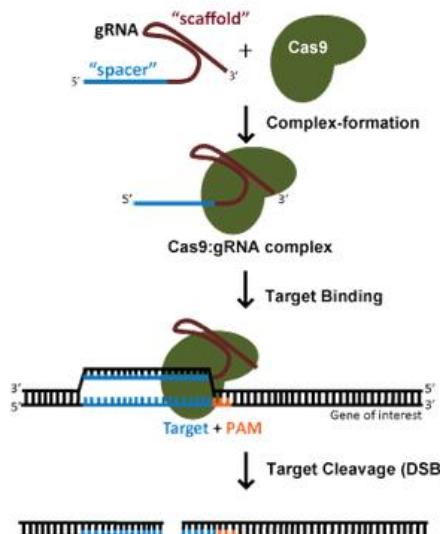
En la segunda etapa, expresión, el sistema se prepara para actuar por medio de la expresión de los genes Cas y la transcripción del locus CRISPR en un precursor llamado pre-CRISPR RNA (pre-crRNA), cuyo distinto procesado dará lugar a los distintos tipos de CRISPR. En el tipo I, el pre-crRNA es procesado por Cas5 o Cas6; mientras que el tipo II usa una RNasa III y un crRNA trans-activador (tracrRNA), junto con un factor adicional desconocido que produce un corte en 5'. El tipo III también usa, como el tipo I, Cas6, además de un factor adicional que produce un corte en 3' <sup>[6]</sup>.

Finalmente, en la tercera etapa, interferencia, como consecuencia de una segunda infección por un mismo agente, el ácido nucleico es reconocido y degradado por la acción combinada del crRNA y las nucleasas Cas <sup>[6]</sup>.



**Figura 1.** CRISPR-Cas9 como un sistema inmune adaptativo en bacterias <sup>[6]</sup>.

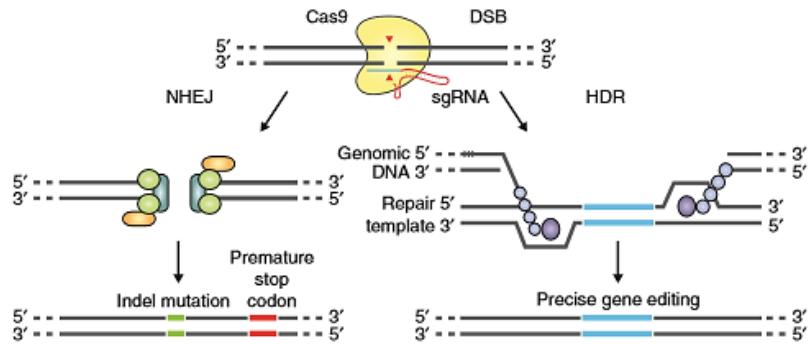
Un tiempo después de su descubrimiento, se demostró que el sistema CRISPR-Cas tipo II facilita el corte sitio-específico guiado por RNA <sup>[7]</sup>. Este sistema, de manera típica, funciona mediante la interacción de dos RNAs: el crRNA, que reconoce el DNA diana, y el tracrRNA, que une y estabiliza la Cas9 <sup>[4]</sup>. Así, el dúplex de RNA en presencia de un protoespaciador llamado PAM (motivo adyacente al protoespaciador), en la hebra contraria y específico de organismo <sup>[9]</sup>, se encarga de dirigir el corte de la nucleasa Cas9 a una distancia de unas 3 pb de la secuencia PAM (*Figura 2*) <sup>[10]</sup>. En la práctica, el dúplex de RNA se puede reemplazar por un único RNA guía (sgRNA) <sup>[8]</sup>.



**Figura 1.** Representación esquemática del mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas9. Las Cas9 (verde) es guiada al DNA diana por un gRNA formado por el crRNA (*spacer*), que dirige el corte y un tracrRNA que une y estabiliza la Cas9 (*scaffold*) <sup>[11] [4]</sup>.

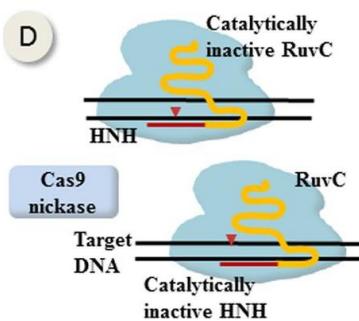
Tras el corte por Cas9, existen dos sistemas para reparar el DNA (*Figura 3*). En ausencia de plantilla de reparación, los cortes se reparan por el proceso propenso a errores NHEJ (*Non-homologous end joining*), por el cual se producen mutaciones de tipo indel ( inserción/delección). Se puede aprovechar de esta manera para inducir silenciamientos, al producirse cambios en el patrón de lectura y llegada prematura a codones STOP. El otro sistema, HDR (*Homology-directed repair*), se da en presencia

de una plantilla exógena con brazos de homología con el lugar de inserción, permitiendo de esta manera la entrada del DNA exógeno. A diferencia del NHEJ, el HDR es generalmente activo solo en células en división y se suele producir a frecuencias más bajas y variables<sup>[10]</sup>.



**Figura 3.** Reparación de los cortes de doble hebra inducidos por Cas9. Puede ocurrir por NHEJ, resultando en mutaciones de tipo indel, que pueden crear un codón stop prematuro, generando un silenciamiento. Alternativamente, la reparación por HDR en presencia de un molde permite una edición fiel y precisa<sup>[10]</sup>.

La técnica CRISPR-Cas9 es muy específica cuando los gRNAs se diseñan correctamente, pero la especificidad es todavía un problema importante. El gRNA ideal debería tener homología perfecta con el DNA diana y con ninguna otra región del genoma; pero en realidad, un gRNA dado tendrá sitios diana adicionales con homología parcial. Estos sitios se llaman *off-targets* y hay considerarlos a la hora de diseñar el experimento. Para mejorar la especificidad se pueden hacer modificaciones en la Cas9. Esta nucleasa genera roturas en la doble hebra gracias a la actividad combinada de dos dominios catalíticos, RuvC y HNH. Por tanto, la inactivación de uno de estos dominios, generando lo que se conoce como Cas9 nickasa, implicará que no se produzca un corte de doble cadena, sino de cadena simple (*Figura 4*). Esto aumenta mucho la especificidad, dado que se requieren dos nickasas dirigidas contra hebras opuestas para permitir la eliminación del DNA entre ambos puntos de corte, y es poco probable que dos sitios *off-target* estén a la distancia adecuada<sup>[11]</sup>.



**Figura 4.** Conversión de la Cas9 en una nickasa por inactivación de su dominio RuvC o HNH (nCas9), de manera que produce mellas en un sola cadena<sup>[9]</sup>.

El sistema CRISPR-Cas9 está teniendo mucho impacto en genómica funcional. Su aplicación en estudios de genoma completo permitirá el cribado a gran escala de dianas de fármacos y otros fenotipos, y facilitará la generación de modelos animales que ayudarán a la comprensión de enfermedades humanas. Por otra parte, las aplicaciones de CRISPR-Cas9 también prometen cambiar el ritmo y el curso de la investigación agrícola<sup>[4]</sup>.

Por todo esto, la técnica CRISPR-Cas9 es una buena aproximación para los objetivos que nos planteamos en el trabajo.

### **3. OBJETIVOS**

Partiendo de la importancia metabólica de la PEPCK-M y del escaso conocimiento que se tiene de la misma hasta la fecha, el objetivo es generar una línea celular HEK293T deficiente en PEPCK-M, actuando a nivel del gen que la codifica (PCK2) mediante la técnica CRISPR-Cas9 con la Cas9 modificada para actuar como una nickasa, para así tratar de determinar el efecto de la proteína en el metabolismo y en la proliferación celular.

### **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1. Líneas celulares**

Las células elegidas para utilizar la técnica de CRISPR son las HEK293T, que derivan de células embrionarias de riñón humanas <sup>[13]</sup>, ya que expresan bien la PEPCK-M.

Tienen una morfología de tipo epitelial y son células semi-adherentes que crecen en monocapa <sup>[14]</sup>.

#### **4.1.2. Establecimiento y mantenimiento de las líneas celulares**

Para establecer los cultivos, se descongelaron las alícuotas, almacenadas en nitrógeno líquido, en un baño termostatizado a 37°C. El 1 ml descongelado se transfirió a un tubo tipo Falcon de 15 ml. Se le añadieron al menos 5 ml de medio completo y se centrifugó 5 minutos a 500 xg. El sobrenadante se retiró y seguidamente el *pellet* se resuspendió en 1 ml de medio DMEM completo (*PAN-Biotech*) nuevo (DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino, 5% de penicilina-estreptomicina y 5% de glutamina). De esta forma se eliminó el DMSO que se había usado como crioprotector y que resulta tóxico para las células a partir de una determinada concentración, que depende de la línea celular. Este 1 ml nuevo se transfirió a un frasco de 25 cm<sup>2</sup> y se completó hasta 5 ml con medio DMEM completo para establecer así el cultivo.

Las células se manipularon en condiciones de esterilidad en campanas de flujo laminar vertical (*Telstar PV-30/70*). Una vez establecidos, los cultivos se mantuvieron en un incubador (*CO<sub>2</sub> Incubator Barnstead Lab-Line*) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Las células se observaron a diario al microscopio para evaluar su correcto crecimiento. Conforme alcanzaban la confluencia, se hacían pases, bien a frascos de 25 cm<sup>2</sup>, bien de 75 cm<sup>2</sup>.

Para pasar las células, se tripsinizó con tripsina-EDTA (*PAN-Biotech*) con 2 ml para los frascos de 25 cm<sup>2</sup>, y con 5 ml para los frascos de 75 cm<sup>2</sup>. Una vez despegadas y resuspendidas las células, se tomó la cantidad necesaria para hacer un pase 1:10 en el nuevo frasco. En el caso de los de 25 cm<sup>2</sup>, se tomó 0,5 ml y se completó hasta 5 ml (4,5 ml) con medio DMEM completo. Para los de 75 cm<sup>2</sup>, 1,5 ml de células tripsinizadas, completando hasta 15 ml (13,5 ml) con DMEM completo.

Para la determinación de la cantidad de células, se usó un contador celular portátil, *Scepter* <sup>TM</sup> (*Millipore*), a partir de alícuotas de 1 ml procedentes del cultivo original, diluidas previamente en caso necesario.

#### **4.1.3. Criopreservación de las líneas celulares y obtención de *pellets***

Con el objetivo de tener células almacenadas, se realizaron diversas criopreservaciones en nitrógeno líquido a lo largo del proceso. Asimismo, se recogieron *pellets* celulares para el aislamiento de DNA para su análisis por PCR, y para el análisis de las proteínas mediante Western-blot.

Los frascos de 75 cm<sup>2</sup> se tripsinizaron del modo habitual (5 ml de tripsina). Una vez despegadas las células, se pasaron a un tubo tipo Falcon de 15 ml, al que se añadieron 13 ml de medio DMEM completo para inactivar la tripsina. A continuación, se centrifugaron 5 minutos a 500 xg y se retiró el sobrenadante. Seguidamente, el *pellet* se resuspendió en 3 ml de medio nuevo.

Para la obtención de *pellets*, se tomó 1 ml de los 3 ml y se pasó a un tubo. De ese 1 ml, 800 µl se pasaron a otro tubo de 1,5 ml Eppendorf para destinarlos al aislamiento de DNA para su análisis por PCR y los 200 µl restantes para Western-blot. A continuación se volvió a centrifugar para obtener los *pellets*, que hasta su uso se mantuvieron congelados a -20°C.

Para la preservación en nitrógeno líquido, a los 2 ml de cultivo sobrantes del paso anterior, todavía en el tubo tipo Falcon, se añadió DMSO (*Sigma-Aldrich*) a una concentración final del 10% (110 µl/1 ml), dejando resbalar poco a poco por la pared del tubo mientras este se agitaba para dispersar rápidamente el DMSO y minimizar así su toxicidad sobre las células. El cultivo con el DMSO se pasó entonces a un criotubo, el cual se depositó en un recipiente con isopropanol a temperatura ambiente, que a continuación se introdujo en un congelador a -80°C. Esto permite que la congelación ocurra despacio, aproximadamente a 1°C por minuto, para que así las células no sufran mucho daño por la formación de cristales de hielo. Pasadas 24 horas se traspasó a un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento a largo plazo.

## 4.2. Clonaje

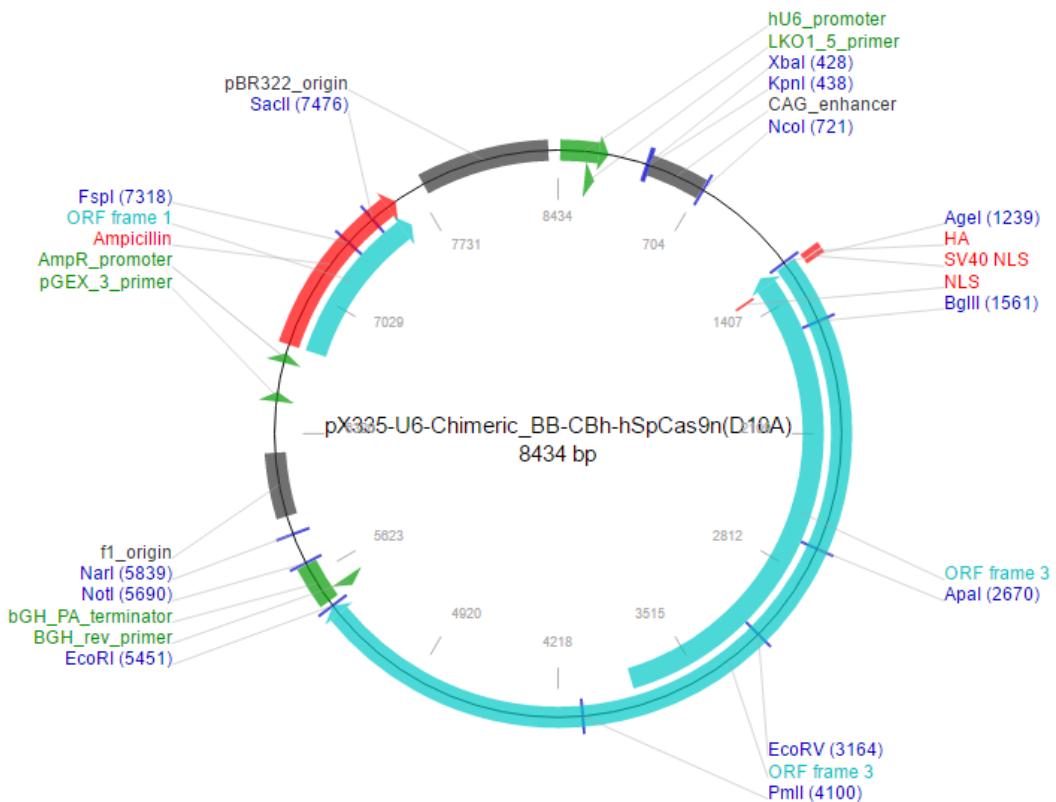
Con el fin de suprimir la expresión de PEPCK-M en las células HEK293T mediante el sistema CRISPR-Cas9 reconvertido a nickasa, es necesario el diseño de cuatro de oligonucleótidos (en adelante, oligos) de cadena sencilla (fw y rv), complementarios dos a dos. Estos, previamente anillados para generar dos oligos de doble cadena (UP, porque codifica un RNA guía para el extremo *upstream* de la delección; y DWN, porque codifica un RNA guía del extremo *downstream*), se clonaron de manera independiente en el plásmido que contiene la Cas9 nickasa, generando así dos vectores distintos, uno con cada oligo de cadena doble. Posteriormente, con ambos vectores se transformaron bacterias para obtener un alto número de copias de ambos vectores, para a continuación co-transfectarlos a las células HEK293T.

### 4.2.1. Plásmido pX335

El plásmido pX335 (*Addgene plasmid # 42335*) ha sido optimizado para realizar el CRISPR en humanos. Se trata de un vector de expresión en mamíferos con un alto número de copias en bacterias cultivadas a 37°C.

Con 8.434 pb, contiene el esqueleto del vector pUC y resistencia a ampicilina, así como el gen de la Cas9 nickasa (D10A) humanizada de *Streptococcus pyogenes*. Es decir, la Cas9 de *S. pyogenes* con los codones adaptados para maximizar la expresión en humanos. Asimismo contiene el promotor U6, que permitirá la expresión del RNA guía, y el primer LK01, que servirá para la secuenciación. Adyacente al promotor U6, contiene el sitio de clonaje *BbsI* (*Figuras 5 y 6*)<sup>[7]</sup>.

Se recibió de *Addgene* en bacterias sembradas en agar. Como tiene resistencia a ampicilina, las bacterias se crecieron en presencia de este antibiótico para seleccionarlas frente a las que no lo tienen.



**Figura 5.** Mapa del plásmido pX335<sup>[11]</sup>.

#### 4.2.2. Diseño de oligonucleótidos

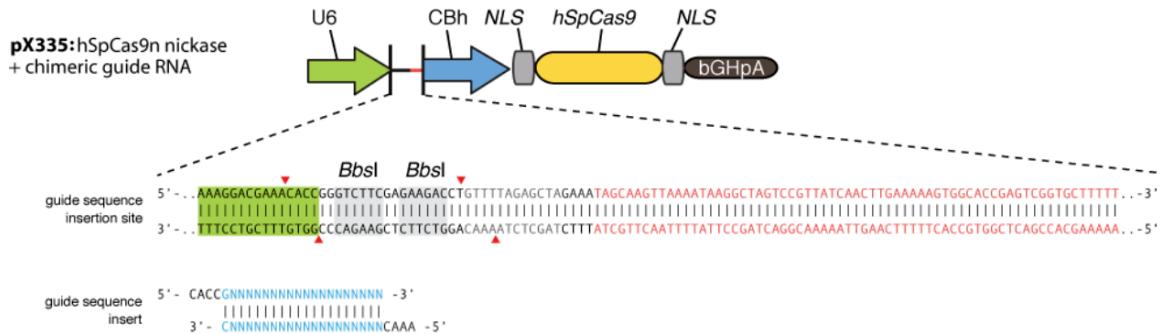
Para el diseño de los oligos que dirigirán la modificación de la PEPCK-M, se decidió que la secuencia diana incluiría el ATG iniciador del primer exón, para evitar la síntesis de fragmentos de la proteína que pudieran tener alguna actividad residual.

Como se ha mencionado, el plásmido usado codifica una nickasa en lugar de una Cas9 convencional. De esta manera, teniendo en cuenta la secuencia del exón 1, se diseñaron dos conjuntos de oligos en los extremos (subrayado) de una secuencia de 59 pares de bases (negrita) en cuyo centro más o menos se encuentra el ATG iniciador (rojo), y que está flanqueada por la secuencia PAM NGG (en amarillo), imprescindible para el corte con la Cas9 de *S. pyogenes* que contiene el plásmido<sup>[10]</sup>. De esta manera, se producirá un corte de cadena sencilla a cada extremo de esa región de 59 pares de bases, pero en cadenas opuestas, de forma que se escindirá ese fragmento de DNA.

#### SECUENCIA EXÓN 1 (NG\_008162.2)<sup>[2]</sup>

TGGGTTTGGCGGTTTGGAGGCAGGGTTGGGGCGGCCGCTGGCTGACCTGGAGCCTGGAGCCCCGGGGCCGAGG  
GAGCTGGCCTGCCAGCGGGCGGAGGAAGCTAGTGCCAGCCCTACCAGGTCCGCCCGCGCTGCCCTCCCTCCCCGCCCTCCATACCT  
CTTTTAAGCGCCTCCGCCAGCCTCTGCTGTGGCTCGCTCGCCGCTCCCTCCCTCCCCGCCCTCCATACCT  
CCCCGGCT**CCGCTCGGTTCCCTGGCCACCCCGCAGCCCCGCCAGGTGCC****ATG****GCCGCATTGTACCGCCC**  
**TGG**CCTGCG

Puesto que la enzima de restricción *Bbs*I no corta en la secuencia específica que reconoce, sino a unos pocos nucleótidos, independientemente de la secuencia de los mismos, los dos sitios de corte de *Bbs*I presentes en pX335 se han diseñado con secuencias distintas. Por tanto, para favorecer la posterior clonación direccional de los oligos en el vector, es necesario añadir cuatro nucleótidos en el extremo, CACC para el oligo fw y CAAA para el rv, de manera que se genera complementariedad con los extremos que quedarán en el plásmido al digerirlo con la *Bbs*I (*Figura 6*).



**Figura 6.** Detalle del sitio de clonaje del plásmido pX335 <sup>[11]</sup>.

3'       GAG     CCAAGGACCGGUGGGG 5'  
 5' **CCG**CTC / GGTTCCTGGCCACCCCGCAGCCCTGCCAGGTGCC**ATG**GCCGCATTGTACCGCCC**TGG** 3'  
 ----- **espaciador PAM** -----  
 3' **GGC**GAGCCAAGGACCGGTGGGCGTCGGGACGGTCCACGGTACCGCGTAACATGGC / **GGGACC** 5'  
 5' AUGGCCGCAUUGUACCG CCC 3'

KO-PCK2-UPfw: 5' **CACCGGGGTGGCCAGGAACCGAG** 3'  
 KO-PCK2-UPrv: 3'            CCCCCACCGGTCTTGGCTC**CAAA** 5'

KO-PCK2-DWNfw: 5' **CACCGTGGCCGATTGTACCGCCC** 3'  
 KO-PCK2-DWNrv: 3'            CACCGCGTAACATGGC**GGGCAAA** 5'

Los oligos se encargaron a *Invitrogen*.

#### 4.2.3. Obtención del plásmido pX335 purificado

Las bacterias que contenían el plásmido se crecieron en 10 ml de LB con 50 µg/ml de ampicilina durante toda la noche a 37°C y 200 rpm en un incubador orbital.

A continuación, se extrajo el DNA plasmídico de un *pellet* equivalente a 3 ml del cultivo con el *Plasmid DNA Extraction Mini Kit* de *Favorgen* y luego se cuantificó y determinó la pureza del DNA utilizando un espectrofotómetro, *Nanovue plus*.

#### 4.2.4. Digestión del DNA plasmídico puro

El DNA plasmídico puro se digirió con la enzima *BbsI* (*Thermo Scientific*) para permitir la posterior ligación con los oligos que codifican los RNAs guía que dirigirán el corte de la Cas9.

El volumen total de la preparación fue de 90 µl, ya que según la cuantificación, había muy poca concentración de DNA, de manera que se pusieron 75 µl de DNA, 9 µl de tampón Tango 10X (*Thermo Scientific*), 1 µl de enzima *BbsI* y 5 µl de agua estéril para completar el volumen. Una vez hecha la mezcla, se incubó 2 horas a 37°C.

Al terminar, se hizo una comprobación mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, con Sybr-Safe (*Invitrogen*) a una dilución 1:30.000 para poner de manifiesto la presencia del DNA utilizando una lámpara de luz azul (*GeneFlash Syngene Bio Imaging*). Se cargaron 10 µl de muestras con 2 µl de tampón 6X LB, y 10 µl de patrón de peso molecular 1 kb. Se corrió durante 30 minutos a 80V en tampón TBE 1X (*Anexo III*).

A continuación, mediante el *NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kit* de *Macherey-Nagel*, se purificó el DNA digerido del gel de agarosa para usarlo en ligaciones.

#### 4.2.5. Hibridación de oligos

Dado que los oligos se encargaron en forma de cadena simple, hubo que anillar los complementarios (fw y rv) para dar lugar a los dos oligos de cadena doble, UP y DWN, con extremos cohesivos complementarios a los extremos generados por la enzima *BbsI* en el vector.

KO-PCK2-UP: **CACCGGGGGTGGCCAGGAACCGAG**  
CCCCCACCGGTCTTGGCTC**AAAA**

KO-PCK2-DWN: **CACCGTGGCCGCATTGTACCGCCC**  
CACCGGCGTAACATGGCGGG**AAAA**

Para ello, para cada una de las dos hibridaciones, se mezclaron 3 µl de cada uno de los dos oligos de cadena simple (fw y rv) a una concentración de 100 µM y 44 µl de NaCl 50 mM en TE (*Anexo III*). El tubo con esta solución se introdujo, utilizando un flotador, en un vaso de precipitados con agua que previamente se había llevado a ebullición. Se tapó el vaso de precipitados con varias capas de papel de aluminio para mantener el aire dentro lo más caliente posible y minimizar así la condensación de agua en la tapa del tubo, evitando de esta manera que se concentrase la muestra y se alterase el anillamiento. Finalmente, se dejó enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

#### 4.2.6. Ligación del vector con el inserto

Como ya se ha mencionado, fue necesario construir dos vectores independientes, uno con el oligo UP y otro con el DWN. Así se hicieron dos mezclas de ligación, además de una control en la que se incluyó agua estéril en lugar de inserto (*Tabla 1*).

Control	pGLP1	pGLP2
5 µl vector digerido	5 µl vector digerido	5 µl vector digerido
4 µl tampón ligasa 5X ( <i>Invitrogen</i> )	4 µl tampón ligasa 5X	4 µl tampón ligasa 5X ( <i>Invitrogen</i> )
1 µl ligasa ( <i>Invitrogen</i> )	1 µl ligasa	1 µl ligasa
10 µl agua estéril	8 µl agua estéril	8 µl agua estéril
	2 µl oligo UP	2 µl oligo DWN

**Tabla 1.** Mezclas de ligación inserto-vector.

Para terminar, se dejó en la cámara fría a 4°C.

#### 4.2.7. Transformación y selección de colonias

Con los productos de ligación se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5α, al tratarse de una cepa que produce un alto número de copias de plásmidos. Una vez purificado el plásmido de las colonias bacterianas con el *Plasmid DNA Extraction Mini Kit* de Favorgen, se sometió a una doble digestión enzimática para confirmar el correcto clonaje del inserto.

En tres tubos con 200 µl de las bacterias se añadieron 5 µl de la correspondiente mezcla de ligación (pGLP, pGLP1 o pGLP2), se mezcló y se dejó en hielo 30 minutos. A continuación se le dio un choque térmico a 42°C durante 1 minuto y seguidamente se puso otros dos minutos en hielo. Finalmente, se añadió 1ml de LB, se mezcló bien y se incubó 1 hora a 37°C en el incubador orbital.

Tras ese tiempo, se centrifugó durante 2 minutos a 2.500 rpm. Así se obtuvo el *pellet* y se retiró sobrenadante hasta que quedó un volumen de 200 µl. En esterilidad, se resuspendió y se pipetearon 150 µl de la correspondiente mezcla en distintas placas con 150 µg/ml ampicilina para seleccionar

aquellas bacterias que habían introducido el plásmido. Las placas se incubaron durante una noche a 37°C.

Al día siguiente, se seleccionaron 5 colonias de la placa pGLP1 (nombradas como pGLP1-1, pGLP1-2, pGLP1-3, pGLP1-4 y pGLP1-5) y otras 5 de la placa pGLP2 (nombradas como pGLP2-1, pGLP2-2, pGLP2-3, pGLP2-4 y pGLP2-5). Estas se crecieron en 4 ml de medio líquido LB con 50 µg/ml ampicilina durante toda la noche a 37°C en un incubador orbital. A partir de ese cultivo, se tomaron 3 ml para hacer una extracción del DNA plasmídico con *Plasmid DNA Extraction Mini Kit* de Favorgen.

Seguidamente, para comprobar si el inserto se había introducido correctamente, se digirió el DNA plasmídico de cada colonia seleccionada con la enzima *BbsI* y con la *EcoRI High Fidelity* del grupo de investigación de Ramón Hurtado (BIFI, Universidad de Zaragoza), para evitar cortes no específicos. Para la digestión se usó el tampón NEBuffer 2.1 (*New England Biolabs*), para el cual las dos enzimas tienen una efectividad del 100% (*Tabla 2*)<sup>[16]</sup>.

Control	Muestras
0,25 µl <i>BbsI</i>	0,25 µl <i>BbsI</i>
0,25 µl <i>EcoRI</i>	0,25 µl <i>EcoRI</i>
2 µl tampón NE 2.1	2 µl tampón NE 2.1
17,1 µl agua estéril	12,1 µl agua estéril
0,4 µl plásmido vacío	5 µl plásmido extraído de la colonia correspondiente

**Tabla 2.** Mezclas de digestión del DNA plasmídico para la selección de colonias con un correcto clonaje de las placas pGLP1 (colonias pGLP1-1, pGLP1-2, pGLP1-3, pGLP1-4 y pGLP1-5) y pGLP2 (colonias pGLP2-1, pGLP2-2, pGLP2-3, pGLP2-4 y pGLP2-5). En paralelo se digirió plásmido vacío como control.

A continuación se incubó 1h a 37°C y seguidamente se comprobó el resultado con una electroforesis en gel de agarosa al 1% usando el mismo procedimiento que en el apartado 4.2.4. *Digestión del DNA plasmídico puro*. La digestión y la electroforesis se repitieron para las colonias que parecían correctas, pero con menos cantidad de DNA (*Tabla 3*).

Control	Muestras
0,25 µl <i>BbsI</i>	0,25 µl <i>BbsI</i>
0,25 µl <i>EcoRI</i>	0,25 µl <i>EcoRI</i>
2 µl tampón NE 2.1	2 µl tampón NE 2.1
17,1 µl agua estéril	17 µl agua estéril
0,4 µl plásmido vacío	0,5 µl plásmido extraído de la colonia correspondiente

**Tabla 3.** Repetición de las mezclas de digestión del DNA plasmídico para la selección de colonias con un correcto clonaje, digiriendo las que en el paso anterior parecían positivas. En paralelo se digirió plásmido vacío como control.

Para confirmar que los clones eran correctos, se aisló del gel el DNA plasmídico de cada colonia que según las digestiones parecía correcta, con *NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kit* de Macherey-Nagel, y se mandó a secuenciar a Sistemas Genómicos de Paterna (Valencia), usando como cebador de la secuenciación el oligo LK01 (5' GACTATCATATGCTTACCGT 3'), también encargado a *Invitrogen*.

La mezcla, con un volumen final de 19 µl, contenía 3,5 µl de primer LK01 1 µM, 3 µl de DNA 50 ng/µl y 12,5 µl de agua para completar volumen.

### 4.3. Obtención de la línea celular estable

Con el fin de generar una línea estable de células HEK293T con la PEPCK-M silenciada, estas se co-transfectaron con los dos vectores construidos, pGLP1 y pGLP2, para conseguir que ambos RNAs guía se expresasen simultáneamente en una misma célula, condición necesaria para que se produzca el corte por Cas9. Tras esto, las células se sometieron a un proceso de selección para determinar cuáles habían sufrido la delección.

#### 4.3.1. Co-transfección

Se realizaron dos métodos distintos de co-transfección, ambos en placas de 24 pocillos a partir de un cultivo de células HEK293T *wildtype* en un frasco de  $75\text{ cm}^2$ , y mediante *GeneJuice Transfection Reagent* de Novagen. Se siguió el protocolo del fabricante para células adherentes, usando OptiMem de Gibco by Life Technologies, y añadiendo 250 ng de cada construcción, pGLP1-5 y pGLP2-1 (500 ng en total), al ser estas las que, según las comprobaciones, tenían una secuencia correcta.

Por una parte, se hizo una co-transfección reversa, ya que se ha visto que tiene mayor eficiencia, con 200.000 células/pocillo. Esta consiste en que las células se siembran sobre la mezcla de transfección ya preparada, de modo que integran el DNA exógeno conforme se adhieren.

$200.000 \text{ células} \cdot \frac{\text{mL}}{6,2 \cdot 10^5 \text{ células}} = 0,333 \text{ mL} = 333 \mu\text{L}$  de células *wildtype*. A estas se les añadieron 167  $\mu\text{l}$  de DMEM completo.

Por otra parte, se hizo una co-transfección convencional sembrando por duplicado las siguientes cantidades en la placa de 24 pocillos.

250  $\mu\text{l}$  células + 250  $\mu\text{l}$  DMEM    125  $\mu\text{l}$  células+ 375  $\mu\text{l}$  DMEM    62,5  $\mu\text{l}$  células+ 437,5  $\mu\text{l}$  DMEM

Al día siguiente se realizó la transfección en el pocillo de concentración intermedia (125  $\mu\text{l}$  células + 375  $\mu\text{l}$  DMEM).

Cuando alcanzaron confluencia, las células transfectadas se tripsinizaron con 100  $\mu\text{l}$  de tripsina y una vez despegadas se pasaron a un frasco de  $25\text{ cm}^2$  con 5 ml de medio DMEM completo.

#### 4.3.2. Selección de clones positivos

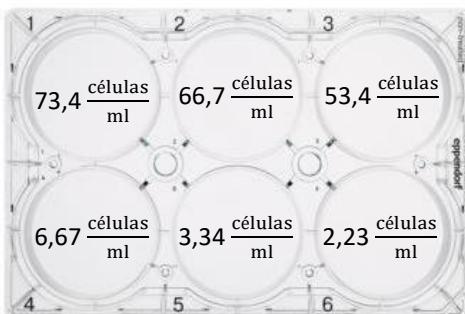
Para la selección de clones positivos, las células confluentes en los frascos de  $25\text{ cm}^2$  se pasaron a placas de Petri (100 mm de diámetro) y a placas de 6 pocillos a muy baja concentración. Así se consiguió que quedasen células aisladas, lo suficientemente separadas como para que a partir de una única célula se formase una colonia. De esta manera, si el CRISPR había funcionado en la célula que originariamente había dado lugar a la colonia, se daría una modificación indel concreta que se transmitiría a todas las células hijas de la colonia, dando lugar a un clon positivo.

Para empezar, se cuantificaron las células para calcular la cantidad necesaria a pipetejar para conseguir dos placas de Petri con 100 células por placa en un volumen final de 15 mL/placa ( $\frac{200 \text{ células}}{30 \text{ mL}} = 6,67 \frac{\text{células}}{\text{mL}}$ ).

$200 \text{ células} \cdot \frac{\text{mL}}{3,2 \cdot 10^5 \text{ células}} = 0,000625 \text{ mL} = 0,625 \mu\text{L}$  de la transfección no reversa

$200 \text{ células} \cdot \frac{\text{mL}}{4,65 \cdot 10^5 \text{ células}} = 0,00043 \text{ mL} = 0,43 \mu\text{L}$  de la transfección reversa

A esta misma concentración se sembró el cuarto pocillo de una placa de 6 pocillos, mientras que los pocillos de arriba se sembraron a mayor concentración, y los de la derecha a menor (*Figura 7*). Así, se trataba de encontrar la concentración adecuada de células para la selección.



**Figura 7.** Concentraciones de siembra celular para la selección de clones positivos.

Cuando se obtuvieron colonias de un tamaño adecuado para su aislamiento (unos pocos mm de diámetro), se utilizaron cilindros de clonaje (*Sigma-Aldrich*) para aislar y pasar clones a frascos de 25 cm<sup>2</sup>.

Para ello, se eligieron 18 colonias, 9 de cada transfección, de distinto aspecto. Se marcó su posición con rotulador en el lado exterior de la placa y a continuación, en cabina de cultivo, se les colocó un cilindro encima (con silicona en su lado inferior para adherirse a la placa y formar una barrera impermeable), de forma que la colonia quedó rodeada por el cilindro. A continuación se añadieron en cada cilindro 50 µl de tripsina-EDTA para despegar las células. Tras resuspender bien, esos 50 µl se pasaron a frascos de 25 cm<sup>2</sup>, a los que se añadieron 5 ml de medio DMEM completo. Se nombraron con números del 1 al 18, siendo los 9 primeros de la transfección reversa y los otros 9 de la convencional, y se introdujeron en el incubador. Conforme alcanzaron la confluencia, se pasaron a frascos de 75 cm<sup>2</sup> y seguidamente se hicieron las comprobaciones de la eficacia del CRISPR. Los clones 2 y 7 tenían un crecimiento más lento, por lo que la comprobación se hizo más adelante.

#### 4.3.2. 1. PCR

Por una parte, para la determinación de la eficacia de CRISPR se realizó una PCR del DNA genómico extraído de los distintos clones. Se usaron dos oligos, diseñados específicamente a partir de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la PEPCK-M (*Anexo I*), de manera que el DNA diana del CRISPR-Cas9 quedó contenido en el producto de PCR. Se encargaron a *Invitrogen*.

PCK2CRISPFor: 5' GGGTTTGGCGGTTGGAGGC 3'  
PCK2CRISPRev: 5' TGCCCTCCCAAGAGACGCGC 3'

Con el *pellet* obtenido de las células transfectadas en cultivo (4.1.3. *Criopreservación de las líneas celulares y obtención de pellets*), se hizo la extracción del DNA genómico con *Genomic DNA Extraction Blood DNA Kit* de *Favorgen*.

La mezcla de PCR, con un volumen final de 25 µl, contaba con 5 µl de *Taq Master Mix 5X* de *Bioron*, un 5% de DMSO (1,25 µl), 12,75 µl de H<sub>2</sub>O, 0,5 µl de cada primer 10 µM (PCK2CRISPFor y PCK2CRISPRev) y 5 µl de DNA 500 µg/ml genómico extraído correspondiente.

Estas preparaciones de PCR se pusieron en un termociclador *Minicycler MJ Research*, con el programa que sigue:

Desnaturalización inicial 2 min a 94°C

40 ciclos de:

Desnaturalización 10s a 94°C

Anillamiento 20s a 54°C

Elongación 45s a 72°C

Una vez finalizada, se hizo una electroforesis en un gel de 2% de agarosa usando los mismos parámetros que en el apartado 4.2.4. *Digestión del DNA plasmídico puro*.

Después, la PCR y la electroforesis se repitieron en las mismas condiciones para los clones que parecían delecionados y a continuación se purificó el DNA con *NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kit* de *Macherey-Nagel* para mandar a secuenciar.

#### 4.3.2.2. Secuenciación

Aquellos clones que en la PCR parecían ser positivos se mandaron a secuenciar a Sistemas Genómicos de Paterna (Valencia), con el fin de comprobar que en efecto eran correctos. Para ello, cada uno de los clones y el silvestre se secuenció por duplicado; para así tener una mayor seguridad en el resultado de la secuenciación. En un caso el cebador fue el oligo PCK2CRISPFor, y en el otro el PCK2CRISPRRev.

La mezcla de secuenciación tenía un volumen final de 19 µl, con 3,5 µl de oligo correspondiente 1 µM, 3 µl de DNA 10 ng/µl y 12,5 µl de agua para completar volumen.

#### 4.3.2.3. Western-blot

Una vez confirmado el corte mediante PCR y secuenciación, con los *pellets* restantes de los clones positivos (4.1.3. *Criopreservación de las líneas celulares y obtención de pellets*) se hizo un Western-blot para estudiar la expresión de la PEPCK-M.

En primer lugar, se prepararon las muestras para hacer una electroforesis vertical de proteínas en un gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para ello, se rompieron las células en presencia de 200 µl de tampón de carga 2X SLB (*Anexo III*). Para romper el DNA se sonicó con el siguiente ciclo: 5 minutos sonicando, 5 minutos de descanso, y finalmente otros 5 minutos sonicando. Una vez terminado, se comprobó si la muestra estaba viscosa como consecuencia de la liberación del DNA. En los casos en los que seguía viscosa, se repitió la sonicación durante 10 minutos más. En el momento en que ya no estuvieron viscosos, se sometieron a un hervido de 5 minutos a 100°C.

A continuación, se cargaron en el gel 5 µl de patrones de peso molecular, y 10 µl del silvestre y cada clon positivo. La electroforesis se corrió 50 minutos a 180V en tampón Tris-glicina-SDS.

Los geles de poliacrilamida constan de dos partes. La parte superior tiene poliacrilamida al 4% (concentrador o *stacking*), mientras que en la inferior está al 10% (separador o *running*), concentración adecuada para separar la PEPCK-M al tener esta un peso molecular de unos 70 kDa<sup>[1]</sup>.

Una vez hubo finalizado, se realizó la transferencia. Para ello, se colocó en un soporte una esponja, dos papeles Whatman para mejorar el contacto con el gel, el gel, y sobre él la membrana de PVDF para transferir, activada previamente con metanol. Sobre esta se añadieron otros dos papeles Whatman y una esponja. Finalmente el soporte se cerró, se colocó en una cubeta con tampón de

transferencia (*Anexo III*) y hielo, y se dejó transferir durante 70 minutos a 100 V en la cámara fría con un agitador magnético para homogenizar la temperatura.

Tras la transferencia, se bloqueó la membrana durante una hora con 3 ml de PBST (*Anexo III*) al 5% BSA (*Sigma-Aldrich*) para evitar que el anticuerpo se uniese inespecíficamente a la membrana. Después, se eliminó el líquido y se añadieron 3 ml de PBST al 5% BSA con los anticuerpos primarios: por una parte, un anticuerpo primario de cabra contra PEPCK-M (*Everest Biotech*), que era la proteína que queríamos detectar, a una dilución de 1:3.000. Por otra, un anticuerpo de conejo anti-actina (*Sigma-Aldrich*) que actuó como control de carga, a una dilución 1:10.000. Se dejaron toda la noche incubando en un balancín en la cámara fría a 4°C.

Al día siguiente, se hicieron tres lavados con PBST de 10 minutos para retirar el anticuerpo primario no unido. Seguidamente, se añadieron los anticuerpos secundarios también en PBST al 5% BSA, ambos a una concentración 1:10.000. Por una parte, anti-cabra (*Millipore*) y por otra anti-conejo (*Cell Signalling Technology*). Se dejaron incubando durante 1 hora en un balancín a temperatura ambiente, tras lo cual se hicieron otros tres lavados con PBST de 8 minutos para retirar el anticuerpo secundario no unido.

El revelado se hizo con el *kit* de ECL *Inmobilon Western* (*Millipore*), que se basa en la emisión de luz cuando la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario se pone en contacto con el peróxido y el luminol del *kit*. Esta luz es luego captada por una película fotográfica (*GE Healthcare*), poniendo de manifiesto las bandas tras su revelado con métodos convencionales en cuarto oscuro.

#### **4.4. Ensayo de producción glucosa**

Para ver el efecto que el silenciamiento tiene sobre el metabolismo celular, se realizaron tres ensayos, independientes pero iguales, de producción de glucosa.

Para ello, se sembraron 700.000 células/pocillo, por duplicado, de cada clón positivo y de la línea celular silvestre, en una placa de 6 pocillos. Anteriormente, y para evitar que las células se despegasen en pasos posteriores, los pocillos se habían incubado durante 1 hora a 37°C con 1 ml de poli-lisina.

Cada pocillo se sometió a una transfección reversa. Así, uno de los dos pocillos de la cepa silvestre y de los clones positivos se transfeció con un plásmido que contenía la PEPCK-M (*pcDNA-Myc PCK2*) para ver el efecto de la sobreexpresión de la misma en el caso del silvestre, o de la reversión del fenotipo en el caso de los clones silenciados. El otro pocillo de cada muestra fue sometido a una falsa transfección, es decir, solo con los reactivos pero sin DNA, como control para determinar el posible efecto del proceso de transfección sobre las células.

A los dos días de cultivo, se retiró el medio completo y se añadieron 2 ml de medio de producción de glucosa: DMEM puro (*Gibco by Life Technologies*) con 2 mM de piruvato y 20 mM de lactato (*Sigma-Aldrich*). Esto se mantuvo durante media hora en incubación a 37°C para conseguir que los gránulos de glucógeno se movilizasen. Pasado este tiempo, se retiró el medio y se puso 1 ml nuevo durante 3 horas a 37°C para estimular la producción de glucosa. Tras ello, se recogieron los medios de cultivo de cada pocillo y se realizó el ensayo colorimétrico con *Glucose (GO) Assay kit* (*Sigma-Aldrich*), que se basa en la aparición de color al reaccionar la glucosa de la muestra con la glucosa oxidasa y la peroxidasa del *kit*.

Se preparó un blanco con 250 µl de agua, una referencia con 250 µl de glucosa a 50 µg/mL, y finalmente, las muestras con 250 µl del medio de cultivo correspondiente. A estos se les añadió 500 µl del reactivo del ensayo de glucosa del *kit* y se dejó la reacción durante 30 minutos a 37°C. Para detenerla, se añadieron 500 µl de ácido sulfúrico. La aparición de color se midió a continuación con un espectrofotómetro (*Cary 100 Bio UV-Visible Spectrophotometer*) a 540 nm.

#### 4.5. Ensayo de Bradford

Las células cultivadas para el ensayo de glucosa se lisaron para hacer una cuantificación de proteína total mediante un ensayo de Bradford en placas de 96 pocillos.

Para ello, se hizo inicialmente un lavado con 500 µl de PBS. Después se despegaron las células con 1 ml de PBS, del cual se tomaron 500 µl para centrifugar y obtener un *pellet*. Este se resuspendió en 500 µl de tampón de lisis (PBS 1% Tritón) para obtener el lisado celular.

A continuación, se prepararon las mezclas para el ensayo. Todas ellas se prepararon con 99 µl del reactivo de Bradford (*Bio-Rad*). Para el blanco se añadió 1 µl de agua, para la referencia 1 µl de BSA a 1 mg/ml, y para cada muestra 1 µl del lisado celular correspondiente. Se pipeteó bien, se esperó unos segundos a la aparición de color azul y seguidamente se midió la absorbancia en un lector de placas (*Biotek Synergy HT*) a 595 nm.

### 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

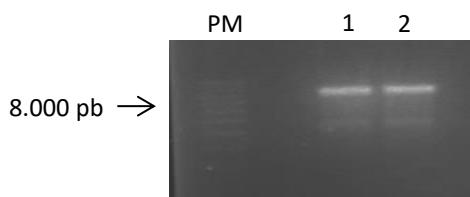
#### 5.1. Purificación del plásmido pX335

Tras la obtención del plásmido puro (4.2.3. *Obtención del plásmido pX335 purificado*), se midió mediante espectrofotómetro la concentración y la pureza del mismo. La relación Abs260/Abs280 se encontraba dentro de los márgenes normales, entre 1,8 y 2, por lo que se podía decir que no había contaminación por RNA, el cual absorbe a 280, frente al DNA que absorbe a 260. Asimismo, el valor de la relación Abs260/Abs230 también era adecuado, por lo que se concluyó que tampoco había contaminación por proteínas ni compuestos fenólicos.

La concentración obtenida era sin embargo muy baja, de 6,85 µg/ml, por lo que el rendimiento de la obtención había sido muy malo. Esto podría dar problemas en los pasos posteriores ante la necesidad de poner una alta cantidad del eluído. Aun así, se consideró que como inicio era suficiente y se prosiguió con los experimentos.

#### 5.2. Digestión del DNA plasmídico

El plásmido puro se digirió con la enzima de restricción *BbsI* y posteriormente se analizó mediante electroforesis en agarosa, poniéndose de manifiesto que la digestión había sido efectiva ya que como se ve en la *Figura 8*, había una única banda correspondiente a un tamaño de unas 8.000 pb, que se corresponde con el tamaño del plásmido completo linearizado.



**Figura 8.** Digestión del plásmido pX335 con la enzima de restricción *BbsI* en presencia de tampón Tango 10X para la posterior ligación con el inserto. En el primer carril se encuentran los patrones de peso molecular (PM), y en los dos siguientes (1 y 2) muestras iguales del plásmido digerido con *BbsI*. A la izquierda se indica la posición del marcador de 8 kb.

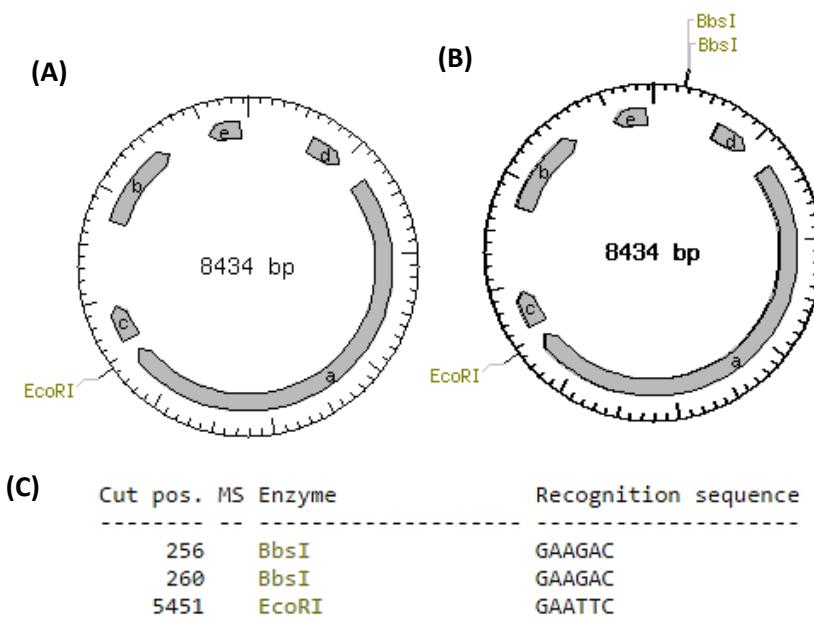
Si no se hubiese digerido, podría observarse más de una banda ya que una parte del plásmido estaría en una conformación circular superenrollada, que habría migrado menos. Para confirmarlo, habría sido mejor correr el plásmido no digerido en paralelo.

### 5.3. Transformación y selección de colonias

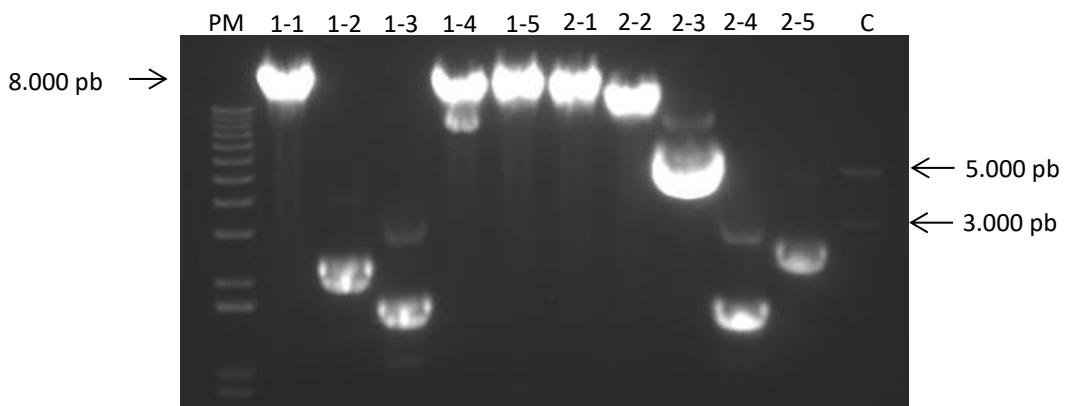
El DNA digerido se usó en una ligación con los oligos anillados, dando dos vectores distintos que luego se usaron para transformar bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  que se sembraron en placas de agar con ampicilina para así obtener una gran cantidad de ambos vectores.

Al observar las placas, se vio que el control tenía más o menos las mismas colonias que pGLP1 y pGLP2. Esto no es lo esperado, ya que en el control debería haber menos colonias porque como los dos sitios de corte por *BbsI* son distintos, el plásmido no se debería circularizar y por tanto no existiría resistencia a ampicilina. Además, las colonias presentes en estas placas eran más pequeñas, lo que en este caso no está justificado. Se veía asimismo una alta presencia de colonias satélite, lo que indica que tal vez la concentración de antibiótico era demasiado baja.

A continuación, se extrajo el DNA plasmídico de 5 colonias de cada placa y se sometió a la digestión por dos enzimas, *BbsI* y *EcoRI*. Esto permitió distinguir los clones que habían introducido el vector con el inserto, de aquellos en los que se había introducido el vector sin inserto, recircularizado consecuencia de una digestión parcial; gracias a la aparición de un distinto patrón de bandas en la electroforesis tras la digestión (*Figuras 10 y 11*). En los clones en los que se había introducido el vector con el inserto, el sitio *BbsI* se había perdido, de manera que solo se produjo el corte por *EcoRI*, dando lugar a una banda de un tamaño de 8.434 pb. Por el contrario, en los clones que habían introducido el plásmido circularizado sin inserto, el sitio *BbsI* se había reconstruido, de manera que se podían apreciar dos bandas de distinto tamaño, una a 5.451 pb y otra a 2.983 pb, derivadas del corte por ambas enzimas (*Figura 9*).

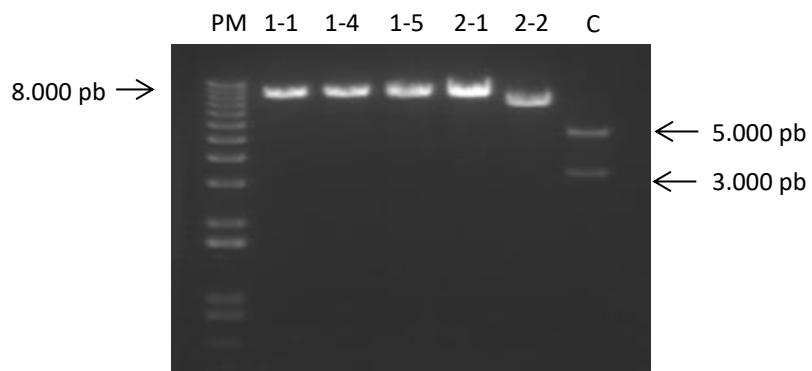


**Figura 9.** Mapa de digestión del plásmido pX335 con *EcoRI* y con *BbsI*, obtenido con la herramienta NEBCutter a partir de la secuencia de nucleótidos del plásmido en Addgene. En (A), el resultado de cortar con *EcoRI* (clones positivos, plásmido completo linearizado). En (B), el resultado de cortar con *EcoRI* y *BbsI* (clones negativos), de manera que se generan dos fragmentos, de 5.451 pb y 2.983 pb. Abajo (C), la lista con los sitios de corte de ambas enzimas.



**Figura 10.** Digestión con *BbsI* y *EcoRI* del DNA plasmídico en presencia de tampón NEBuffer 2.1 para la comprobación de la integración del inserto. En el primer carril se encuentran los patrones de peso molecular (PM). Los carriles siguientes, nombrados como 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 2-1, 2-2, 2-3, 2-4 y 2-5, contienen el DNA plasmídico digerido de los clones de mismo nombre. En el último carril, hay un control (C) de plásmido digerido con ambas enzimas. A la izquierda se indica la posición del marcador de 8 kb, y a la derecha las posiciones de las bandas de 5 kb y 3kb.

Sin embargo, como la digestión y la electroforesis se hicieron sin previa cuantificación, se vio que había un exceso un DNA, lo que estaba distorsionando las bandas. Así, se repitió el proceso, pero con menos cantidad de DNA, con aquellos clones que parecían positivos, es decir, 1-1, 1-4, 1-5, 2-1 y 2-2; ya que era en estos en los que se veía una única banda de 8.000 pb (*Figura 11*).



**Figura 11.** Repetición de la digestión con *BbsI* y *EcoRI* con una menor cantidad de DNA. En el primer carril se encuentran los patrones de peso molecular (PM). Los carriles siguientes, nombrados como 1-1, 1-2, 1-4, 1-5, 2-1, 2-2 contienen el DNA digerido de los clones de mismo nombre. En el último carril, hay un control (C) de plásmido digerido con ambas enzimas. A la izquierda se indica la posición del marcador de 8 kb, y a la derecha las posiciones de las bandas de 5 kb y 3 kb.

Todos los clones, salvo el 2-2, tenían el comportamiento esperado para un plásmido que contiene el inserto, ya que como se observa en la *Figura 11*, había una única banda a 8.000 pb. Sin embargo, la muestra 2-2 migraba más, por lo que decidimos obviar este clon ya que puede que la secuencia hubiese sufrido alguna modificación no deseada.

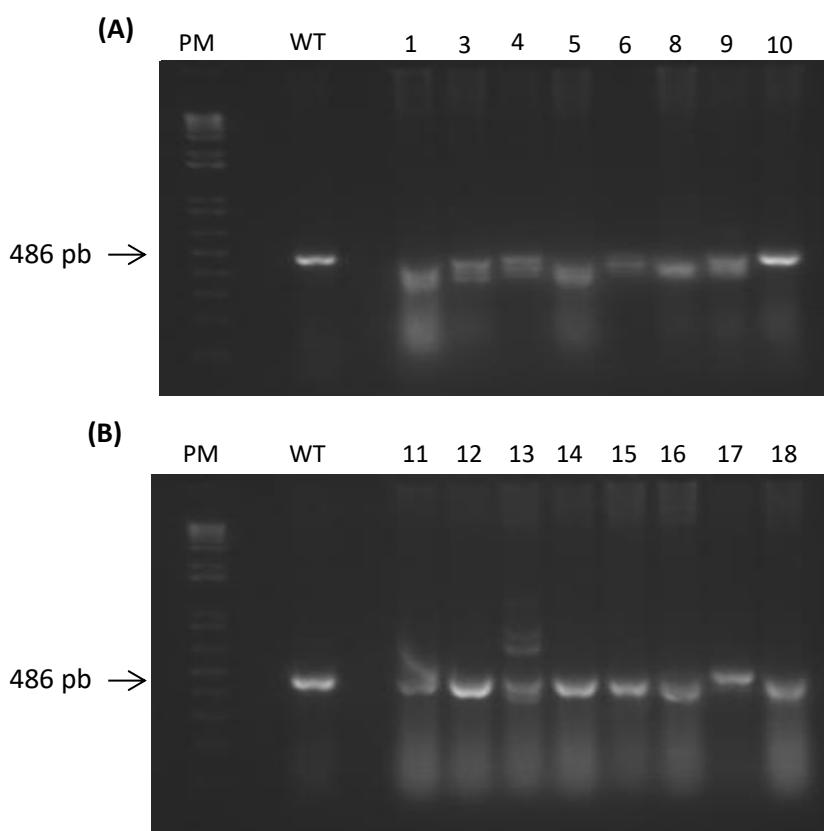
En base a los problemas tenidos, y de cara a la secuenciación, se cuantificó la concentración de DNA de la purificación de cada clon, obteniendo los siguientes resultados: GLP11: 329 ng/μl, GLP14: 331,5 ng/μl, GLP15: 339,0 ng/μl y GLP21: 302,5 ng/μl. Los valores de Abs<sub>260/280</sub> y Abs<sub>230/260</sub> eran adecuados, por lo que se concluyó que la purificación había producido DNA de buena calidad y pureza.

Para confirmar que el inserto sí se había introducido correctamente, se secuenciaron los clones que en la electroforesis parecían positivos. Una vez obtenida la secuenciación, esta se alineó con la secuencia que tendría que tener el plásmido con el oligo insertado. Así, se comprobó que solo pGLP1-5 y pGLP2-1 eran correctas porque eran las únicas en las que no había discordancia con la referencia (*Anexo II*).

#### 5.4. Selección de clones positivos

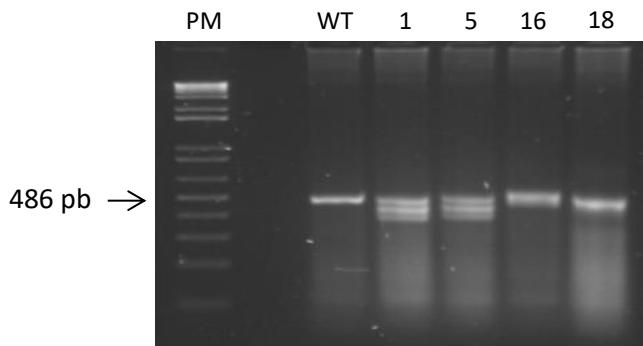
Una vez se hubieron obtenido los dos vectores necesarios para guiar el corte con Cas9, pGLP1-5 y pGLP2-1, con estos se co-transfектaron células HEK293T para obtener la línea. Estas se pasaron entonces a placas de Petri y a placas de 6 pocillos para la selección de clones positivos. A los 6 días de cultivo en las placas, ya era posible ver colonias aisladas de un tamaño considerable como para aislarlas en cultivos diferenciados mediante cilindros de clonaje.

Así, cuando los clones aislados crecieron, se realizó una extracción de DNA genómico para realizar una PCR y posteriormente una electroforesis que permitió comprobar si el corte con la Cas9 había sido efectivo (*Figura 12*). En los clones positivos esperaríamos ver una banda que hubiese migrado más que la cepa silvestre, ya que el sistema produce dos cortes con 59 nucleótidos de separación, de manera que el DNA entre ambos se pierde. Sin embargo, el fragmento eliminado puede variar ligeramente de tamaño de unos clones a otros, ya que el sistema de reparación celular, que habrá actuado de manera diferente en cada clon, puede eliminar nucleótidos adicionales.



**Figura 12.** PCR del DNA genómico con *Taq Master Mix* para la comprobación de la efectividad del corte con CRISPR-Cas9. Tanto en (A) como en (B), el primer carril se corresponde con los patrones de peso molecular (PM) y el segundo con la amplificación del DNA de la cepa silvestre (WT). En (A) los carriles nombrados como 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9 y 10; y en (B) los carriles 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18 se corresponden con la amplificación del DNA genómico de los clones del mismo nombre. A la izquierda se indica la posición del tamaño del amplificado del WT, 486 pb.

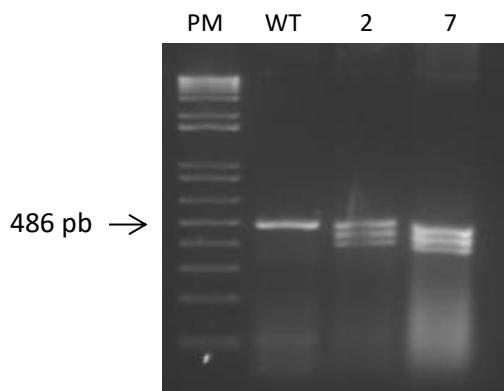
Los más probables candidatos a estar silenciados eran los clones 1, 5, 16 y 18; ya que como se observa en la *Figura 12*, en estos se daba una mayor migración. Los clones aparentemente positivos se analizaron de nuevo, para mayor seguridad, mediante PCR con *Taq Master Mix*, seguido de electroforesis en agarosa (*Figura 13*).



**Figura 13.** Repetición de PCR de los clones 1, 5, 16 y 18 con *Taq Master Mix*. En el primer carril se encuentran los patrones de peso molecular (PM). A continuación, el carril nombrado como WT es el correspondiente con la cepa silvestre. Finalmente, los carriles 1, 5, 16 y 18 son las amplificaciones de los clones del mismo nombre. A la izquierda, se indica la posición del tamaño del amplificado del WT, 486 pb.

Como puede verse en la *Figura 13*, el clon 16 claramente no está deletoriamente ya que la banda se encuentra a la misma altura que la del silvestre. La banda del 18, por otra parte, sí ha migrado un poco más, de manera que eso nos podría indicar que sí se ha deletoriamente el fragmento de 59 nucleótidos y por tanto el CRISPR sí ha funcionado. Los clones 1 y 5 son confusos porque se pueden apreciar perfectamente tres bandas, una de las cuales está a la altura del silvestre. Esto podría indicar que bien tenemos poblaciones mixtas, es decir, que el clon seleccionado partía inicialmente de más de una célula (células distintas que se han quedado en la placa muy cerca unas de otras); o bien que al ser las células HEK293T trisómicas (tres copias de algunos cromosomas)<sup>[13]</sup>, ha habido una modificación solo en alguno de los alelos.

Más tarde, se hizo la PCR de dos clones que habían tenido un crecimiento más lento, el 2 y el 7 (*Figura 14*).

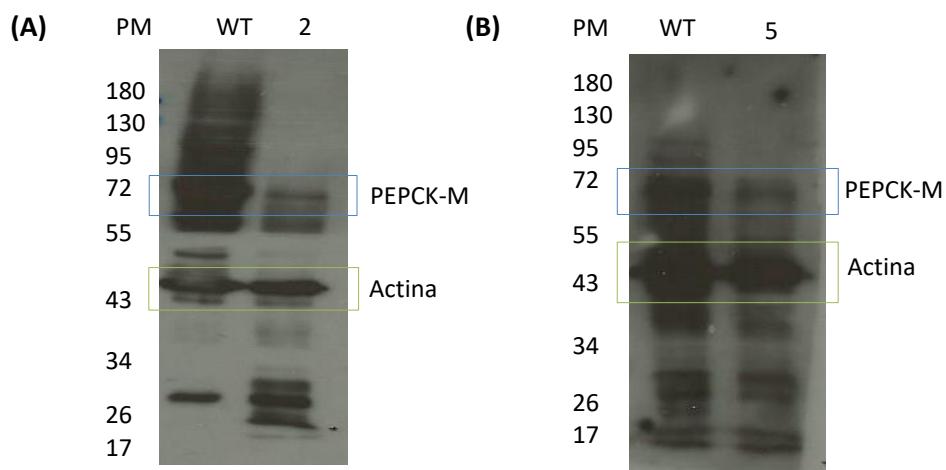


**Figura 14.** PCR del DNA genómico con *Taq Master Mix* para la comprobación de la efectividad del corte con CRISPR-Cas9. El primer carril se corresponde con los patrones de peso molecular (PM). El segundo carril es la amplificación del DNA de la cepa silvestre (WT), mientras que los carriles nombrados como 2 y 7 se corresponden con la amplificación del DNA genómico de los clones del mismo nombre. A la izquierda se indica la posición del tamaño del amplificado del WT, 486 pb.

De nuevo en la *Figura 14* se observan varias bandas en los dos clones, por lo que nos encontraríamos otra vez en la tesisura de que sean poblaciones mixtas o que presenten distintas modificaciones en cada uno de los alelos de las células HEK293T.

Para un mayor control, se realizó una secuenciación de los clones 1, 5, 18, 2 y 7. El alineamiento de la secuenciación con la secuencia del gen como referencia, puso de manifiesto que los clones 1 y 18 eran poblaciones mixtas, mientras que el clon 5 había sido delecionado completamente (*Anexo II*). Esto parecía estar en contradicción con lo que habíamos observado en la PCR, así que hicimos un Western-blot para confirmar que en efecto el gen se había silenciado y por tanto no había expresión de la PEPCK-M (*Figura 15 (B)*). Paralelamente, la secuenciación de los clones 2 y 7 mostró que el clon 2 se había delecionado (*Anexo II*), mientras que en el 7 la secuenciación no funcionó. La expresión en este clon también se comprobó mediante Western-blot (*Figura 15 (A)*).

En un principio se especuló con la posibilidad de que fueran los clones de crecimiento más lento en los que el CRISPR-Cas había sido efectivo, ya que el silenciamiento de la PEPCK-M podría suponer una desventaja metabólica y de crecimiento. Sin embargo, como hemos visto, los resultados de PCR y secuenciación demostraron que no había una correlación directa entre velocidad de crecimiento y silenciamiento de la proteína, ya que de los clones silenciados, uno era de crecimiento rápido y otro de crecimiento lento. Lo que sí es destacable, es que ambos clones pertenecían a la co-transfección reversa, de manera que esta sí fue en efecto más efectiva.



**Figura 15.** Western-blot del clon 2 (A) y del clon 5 (B). Se analizó la expresión de PEPCK-M (azul) de extractos celulares enteros de césped silvestre (WT) y de los clones por separado (2 y 5). En ambos casos, se usó actina como control de carga (verde). El tamaño de los marcadores de peso molecular, corridos en paralelo, se indica a la izquierda de cada panel, en kDa.

La banda de unos 72 kDa indica la presencia de la PEPCK-M, ya que 70 kDa es su peso molecular<sup>[1]</sup>, mientras que la banda a unos 41 kDa se corresponde con la actina<sup>[15]</sup>.

En ambos Western-blots se ve mucho ruido de fondo, así como unión inespecífica de los anticuerpos (bandas adicionales a las esperadas), lo cual no fue posible mejorar con distintos Western-blots. Se asumió que se debió a la calidad del anticuerpo primario anti-PEPCK-M, ya que debido a un fallo en el congelador en el que estaba almacenado, sufrió una descongelación.

Asimismo, se puede decir que en los dos Western-blots las bandas de actina de la cepa silvestre y el clon (2 o 5) son del mismo tamaño, de manera que las diferencias observadas en cuanto al tamaño

de la banda correspondiente a la PEPCK-M se debe al silenciamiento, y no a la presencia de una menor cantidad de proteínas en el gel de los clones silenciados.

En cuanto a la expresión de PEPCK-M, tanto para el clon 2 como para el 5 era mucho menor, pero como se ve en la *Figura 15*, había una pequeña banda. De esta manera, se puede concluir que o bien es efecto del alto ruido de fondo, o bien porque se haya dado un silenciamiento parcial. Sería por tanto interesante repetir los Western-blots con otro anticuerpo anti-PEPCK-M para mejorar la calidad, intentando conseguir imágenes más limpias, sin tanto ruido de fondo y con menos unión inespecífica para poder así determinar con mayor seguridad y certeza la expresión de PEPCK-M.

## 5.5. Ensayo de producción de glucosa y Bradford

Puesto que un par de clones tenían claramente disminuidos los niveles de PEPCK-M, decidimos determinar cómo podría afectar esto a la función principal de esta proteína, la síntesis de glucosa. Para determinar los niveles de glucosa producidos por estos clones en comparación con las células silvestres, realizamos tres ensayos colorimétricos de producción de glucosa, aunque de los tres, solo se vio coloración en uno.

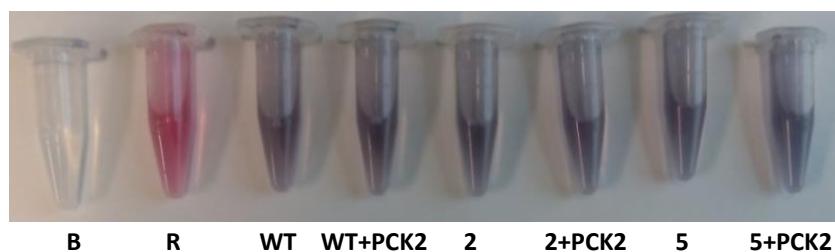
De esta manera, esperaríamos que los clones silenciados produjeran una menor cantidad de glucosa que la cepa silvestre, y que la sobreexpresión de PEPCK-M revirtiera el fenotipo.

La aparición de color producida por la reacción se midió por absorbancia en espectrofotómetro, usando una muestra con agua como blanco para hacer la línea base. Dado que se incluyó una referencia con concentración conocida, se calculó la concentración de glucosa de todas las muestras a partir de esta (*Tabla 4*):

$$\text{Concentración glucosa } \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Abs}_{540} \text{ Muestra}}{\text{Abs}_{540} \text{ Referencia}} \cdot \text{Concentración referencia } \left( \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right)$$

	B	R	WT	WT+PCK2	2	2+PCK2	5	5+PCK2
Abs		0,8285	0,705	0,7058	0,6839	0,6581	0,7024	0,7636
Concentración de glucosa ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		50	42,55	42,59	41,27	39,72	42,39	46,08

**Tabla 4.** Resultados de absorbancia (Abs) y concentración en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del ensayo de glucosa. La concentración de las muestras ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), tanto de las no transfectadas (WT, 2 y 5), como de las transfectadas con PCK2 (WT+PCK2, 2+PCK2 y 5+PCK2), se calculó a partir de la concentración conocida de la referencia (R) de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La muestra B, blanco, se hizo con agua para establecer la línea base.



**Figura 16.** Coloración de los tubos tras el ensayo de glucosa, donde una coloración rosa, como la de la referencia (R), implica una mayor concentración de glucosa que una coloración morada, como la de las muestras, tanto las transfectadas con PCK2 (WT, 2+PCK2 y 5+PCK2) como las no transfectadas (WT, 2 y 5). La falta de coloración se corresponde con la ausencia de glucosa en el blanco (B).

A priori, estos resultados no son muy consecuentes con lo que esperaríamos, ya que la concentración en el clon 5 es prácticamente igual que en el silvestre. Además, la transfección con *pcDNA-Myc PCK2* no se corresponde con un aumento de la concentración de glucosa en el clon 2 ni en la cepa silvestre. Sin embargo, estos resultados no son significativos por sí mismos, ya que los diversos cambios de medio, o incluso distintos ritmos de crecimiento, han podido determinar que en unos casos haya más células que en otros, y por tanto la producción sea mayor. Por ello, estos resultados se tienen que referir a una cuantificación de proteína total, la cual correlaciona con el número de células.

Para ello, se realizó un ensayo de Bradford por duplicado. Se hizo la medida entre los duplicados y se restó la absorbancia del blanco para establecer la línea base. A continuación, y como la referencia estaba a 1 mg/ml, se calculó la concentración para cada una de las muestras (*Tabla 5*):

$$\text{Concentración proteína} \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Abs}_{595} \text{ Muestra}}{\text{Abs}_{595} \text{ Referencia}} \cdot \text{Concentración referencia} \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)$$

	B	R	WT	WT+PCK2	2	2+PCK2	5	5+PCK2
<b>Abs1</b>	0,246	0,475	0,894	0,856	0,814	0,773	0,987	0,742
<b>Abs2</b>	0,247	0,477	0,686	0,853	0,825	0,764	0,854	0,906
<b>Media</b>	0,2465	0,476	0,790	0,8545	0,8195	0,7685	0,9205	0,8240
<b>Media - B</b>		0,2295	0,5435	0,608	0,573	0,522	0,674	0,5775
<b>Concentración de proteína (mg/mL)</b>		1	2,368	2,649	2,497	2,275	2,937	2,516

**Tabla 5.** Resultados de absorbancia y concentración en mg/ml del ensayo de Bradford. Se muestra la absorbancia del duplicado (Abs1y Abs2) del blanco (B), la referencia (R) y las muestras, tanto las transfectadas con PCK2 (WT+PCK2, 2+PCK2 Y 5+PCK2), como las no transfectadas (WT, 2 y 5). Asimismo, se muestran la media de absorbancia y la media descontando el blanco (Media - B) para establecer la línea base. Finalmente, la concentración (mg/ml) calculada a partir de la concentración conocida de 1 mg/ml en la referencia.



B R WT WT+PCK2 2 2+PCK2 5 5+PCK2

**Figura 17.** Coloración de los pocillos tras la adición del reactivo de Bradford. El blanco (B) se corresponde con los pocillos de color marrón, sin proteína, mientras que la referencia (R) y las muestras, tanto las transfectadas con PCK2 (WT+PCK2, 2+PCK2 Y 5+PCK2), como las no transfectadas (WT, 2 y 5) presentan color azul, más intenso cuanta mayor concentración de proteína.

A continuación, se refieren los resultados de la glucosa a la cantidad total de proteína. Para ello, se divide la concentración de glucosa de cada muestra entre la concentración de proteína total de la misma (*Tabla 6*):

	WT	WT+PCK2	2	2+PCK2	5	5+PCK2
<b>μg glucosa/mg proteína</b>	17,97	16,08	16,53	17,46	14,43	18,31

**Tabla 6.** Correlación de la concentración de glucosa y de proteína total, en μg glucosa/mg proteína.

Se ve que en general, aquellos datos correspondientes a las células silenciadas son menores que las de las silvestres, especialmente en el clon 5, aunque la diferencia no es muy significativa. Además, en el caso de las silenciadas, la transfección con PCK2 ha sido efectiva, ya que se observa una mayor

producción de glucosa. Sin embargo, en el silvestre, la sobreexpresión no ha funcionado ya que se observa menos producción de glucosa que en el no sobreexpresado. Esto se puede deber a fallos en la preparación de la mezcla de transfección, como una mala mezcla de los componentes.

Estos resultados nos indican que el hecho de silenciar la proteína sí tiene un pequeño efecto en el fenotipo, pero este es poco significativo. Quizá lo que está sucediendo es que el silenciamiento de la PEPCK-M está llevando a un efecto compensatorio por sobreexpresión de la PEPCK-C. Además, como de los tres ensayos de producción de glucosa solo funcionó uno, no podemos estar seguros de los resultados obtenidos.

Dado que los resultados no han sido muy concluyentes, sería necesario repetir el estudio para tratar de encontrar más clones que permitiesen hacer un estudio más profundo y reproducible, no solo del metabolismo de la glucosa, sino también de otras moléculas importantes como lípidos; así como ensayos de proliferación y supervivencia celular. Además, resultaría adecuado estudiar si en efecto se produce una compensación por la PEPCK-C.

## 6. CONCLUSIONES

Para finalizar con el proyecto, a continuación se exponen las conclusiones que se han obtenido de la realización del mismo:

1. La co-transfección con los plásmidos que dirigen el sistema CRISPR-Cas9 no fue muy eficiente para ninguna de las transfecciones, siendo más efectiva la co-transfección reversa.
2. Los efectos sobre la producción de glucosa en las células no son muy significativos, siendo además muy variables entre los dos clones silenciados.
3. El fenotipo se revierte mediante la transfección con un plásmido de expresión que codifica para la PEPCK-M.
4. No se aprecian diferencias en cuanto al ritmo de crecimiento de los clones silenciados con respecto a la cepa silvestre.

### Conclusions

To conclude the project, conclusions obtained from the realization of the same are reported below:

1. The co-transfection with the plasmids that direct the CRISPR-Cas9 system was not very efficient for any of the transfactions, being more effective the reverse co-transfection.
2. The effects on the production of glucose in the cells are not very significant, being very variable between the two silenced clones.
3. The phenotype is reversed by transfection with an expression plasmid that encodes for PEPCK-M.
4. Differences in growth rate of the silenced clones compared to the wildtype are not seen.

## BIBLIOGRAFÍA

[1]. UniProtKB (2017). UniProtKB - Q16822 (PCKGM\_HUMAN) [online]. Disponible en:  
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q16822>

[2]. National Center for Biotechnology Information, Gene (2017). PCK2 phosphoenolpyruvate carboxykinase 2, mitochondrial [Homo sapiens (human)] [online]. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5106>

- [3]. Méndez-Lucas, A. *et al.* (2014) 'Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) is a pro-survival, endoplasmic reticulum (ER) stress response gene involved in tumor cell adaptation to nutrient availability', *The Journal of biological chemistry*, 289(32), pp. 22090–102. doi: 10.1074/jbc.M114.566927.
- [4]. Doudna, J. A. and Charpentier, E. (2014) 'The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9', *Science*, 346(6213), pp. 1258096–1258096. doi: 10.1126/science.1258096.
- [5]. Mojica FJ, Montolui Lluis. (2016) 'On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals', *Cell*, 24 (10), pp. 811-820. doi: 10.1016/j.tim.2016.06.005
- [6]. Devashish R, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. (2015) 'The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications', *Biochimie*, 117, pp. 119-128. doi: 10.1016/j.biochi.2015.03.025.
- [7]. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. (2013) 'Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems', *Science*, 339 (6121), pp. 819-23. doi: 10.1126/science.1231143.
- [8]. Ma Y, Zhang L, Huang X. (2014) 'Genome modification by CRISPR/Cas9', *The Febs Journal*, 281 (23), pp. 5186–5193. doi: 10.1111/febs.13110.
- [9]. Xiao-Jie L, Hui-Ying X, Zun-Ping K, Jin-Lian C, Li-Juan J. (2015) 'CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy', *J Med Genet*, 52 (5), pp. 289-296. Doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102968.
- [10]. Ran, F. A. *et al.* (2013) 'Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system', *Nat Protoc*, 8(11), pp. 2281–2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143.
- [11]. Addgene (2017). CRISPR/Cas9 Guide [online]. Disponible en:  
<https://www.addgene.org/crispr/guide/>
- [13]. Lin, Y.-C. *et al.* (2014) 'Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations', *Nature Communications*, 5, p. 4767. doi: 10.1038/ncomms5767.
- [14]. ATCC (2016). 293 [HEK-293] (ATCC® CRL-1573™) [online]. Disponible en:  
[https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1573.aspx?geo\\_country=es](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1573.aspx?geo_country=es)
- [15]. UniProtKB (2017). UniProtKB - P60709 (ACTB\_HUMAN) [online]. Disponible en:  
<http://www.uniprot.org/uniprot/P60709>
- [16]. New England Biolabs ® Inc. (2017). NEBuffer Activity/Performance Chart with Restriction Enzymes [online]. Disponible en:  
<https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/hebuffer-performance-chart-with-restriction-enzymes>
- [17]. Seenappa V, Das B, Joshi MB and Satyamoorthy K. (2016) 'Context Dependent Regulation of Human Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Isoforms by DNA Promoter Methylation and RNA Stability', *J Cell Biochem*, 117 (11), pp. 2506–20. doi: 10.1002/jcb.25543.
- [18]. Stark, R. and Kibbey, R. G. (2014) 'The mitochondrial isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) and glucose homeostasis: Has it been overlooked?', *Biochim Biophys Acta - General Subjects*, 1840(4); pp. 1313–1330. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.10.033.
- [19]. Modaressi, S. *et al.* (1998) 'Human mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 gene. Structure, chromosomal localization and tissue-specific expression', *Biochem J*, 333, pp. 359–66.
- [20]. Leithner, K. (2015) 'PEPCK in cancer cell starvation', *Oncoscience*, 2 (10), pp. 805–6. doi: 10.18632/oncoscience.252.
- [21]. Gaj, T. (2014) 'ZFN, TALEN and CRISPR/Cas based methods for genome engineering', *Trends Biotechnol*, 31(7), pp. 397–405. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004.ZFN.

ANEXOS

## Anexo I

**Secuencia de nucleótidos del gen PCK2** [2]. Subrayado se indica el lugar de hibridación de los oligos de la PCR, y en rojo y negrita el ATG iniciador.

TGGGTTGGCGGTTGGAGGCAGGGGTGGGGCGGCTGGGCTGACCTGGAGCCTGGAGCCCCGGGGCCGAGG  
GAGCTGGCCTGCCAGCGGGCGGAGGAAGCTAGTGCCTACCAGGTTCCGCCCTCGCCCTCCATACCT  
CTTTTAAGCGCCTCCGCCAGCCTCTGCTGTGGCTCGCTCGCCCTCCCTCCATACCT  
CCCCGGCTCCGCTGGTCTGCCACCCGAGCCCCCTGCCAGGTGCCATGGCAGTGGCAGTGGC  
TGCAGGTGAGTGACCCCCGGCCCAGGGCCCACCCGACCTTCGCTGCCCTGCCAGTGGC  
CTCTCCGCTCTCAGCCTCCGCCAGGTTCCATCTAGGGAGGGCAGCCGGTGTCTCGCTGCCACCTCCCTCTG  
CTCCCGCCGCGCTCTGGAGGGCAGCCGGTGTCTCGCTGCCACCTCCCTCTG  
CTCGCTCGCCTCTGACCGCGCATCTATCTGCACTCTCAGAACTTCTCTCTCGCTCCCTCTG  
AGCCAGGTCTCCGCATATCTCCTTCTTCCCAGATACTCCCTCGGACCTCTAACGGGCTCTCAGCCAGCGCC  
CCAGGGTACTTCGAGAGGCAGCAGGGCCCTGGGACAAGGGTACGTGAGGCCCGGGAGACTAAGCTCAGAGCCCC  
CTAAAGAAGGTGAAAGGTTAAATATCCATTCCGGCTCTCCGGACTGGAGGACTGGAACCTGGCGGGAAAGTC  
CAGAGCAGCCGAGGGACCTGGGCCAGGGAGGGCAAGCAAGGGTGGAGGAGGGCGCCAAGTGTGCTTCGT  
TTCTTACATAGCTGGCTTCTCCTCCGTCAGGCCCTGGAGGCCAGGCTCGTCTGTGCTGCTGCTCT  
TAGTCTCTATTCTCTGAGGCCCTCTTCTCAGCTTGTCCAGAGTCTGAAGGAAAGCTCCACTTAGAGGGCTGCAAGAGGG  
ACAGCCGTTCCACTGGGCAGCCCTGGGAGGGCTCTGAAGGAAACAGTCCACTTAGAGGGCTGCAAGAGGG  
TGTGGGGCTTCACAAGAGATAACGTGAGCCAGGCTCCAGGGAGAGAGAGGGCTGCTCAAGACTGTGCTTGA  
AAACTGATGTCACGGAGAACCTCCCTCTGAGGCAGGAACAGACCCAGGCTCCAGTAGCCCTCCCTCCGCCCC  
TGGGCCACACTGATCATCTATCTGCTTAGCGAAACACCCCCAGCTCTACCCCCAGACAGACTCAAGCTCC  
GTATCCATGCTCTGAGCTTCTCCTCCAGGCTAACACCCCTCTGAGTCTGAGCTGCCAGCAAGCTGCTGTT  
CACCCCTCCACCAAACACAAAGCTCTAGGCATGTGGCCTCTAGGAAGAAGAGCCAGGGGAAGCACGGGTAC  
GTGGTCTGGGTGTGGGGCAGTTCTGATGGCGAGGCCTGTAGAGGAGGAGGAGTAACATCCCTCATGGT  
CTTTGCTCTCGGGTTACTCCACCTGAGTCCAGGCAATCAGAGCAGACGTTGCTCTGTCTCCAGGGC  
CATGAGAGGACAGACAACAGGACGCTGACCTCTGAGAATTAAAGCCATGAACCCAGCCAGTGACACTCATTCC  
CCAGTGGTCAACCTCCGAGGTTAGAAACTTACCCGAGGGCAACATTATGCAACCATTGTTGGTCCAA  
GTGGCAGCAGCAGATCAGGGCTGGAGGCCAGCATCCAGTCACCTATTCTGTGCAAGAGCCCTCATCTAGA  
AACCTGGCACTGGAAAGACTGTGACCTTGCTGGGCTTCATAGTCTTACAGCATAACACACCAGAAGGAAAGA  
ATAAACACAGCTGCCATTAAATTAAAAACTATACTTGAAGGAAATAATGGATGAGGCTTCAAATA  
CCAGACATATGAAATTGTCACCTGGGCCACTTCTGTCTGACACTTGGCCAAAGGCCCTACTCATTCT  
TTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTCTGCTCTGCCCCAGGTGGAGTGCAGTGTCCGAT  
TCGGCTACTGCAACCTCCACCTCCGGTCAAGCGATTCTCCTGCCCTAGCCTCTGAGTAGCTGGACTAGA  
GGCACACGCCACACATCCGCTAATTATTTAGTAGATGGGGTTCACCATGTCCTGAGCTATGGTCT  
TGATCTCTGACCTCATGATCCACCTGCCCTAGCCTCCAAAGTGTGGGATTACAGGCATGAGCCACCGTGCCC  
AGCCATCCCTACTTATTCTAAACGTTGATTAACAGTTAACATGGCATGGCTACACAGGCAGTAACATC  
AGCATGCCATGTATACTTCCACACAGCCAGGCATGTGCTTTTGCTCATTGGCATCTGTCCCTCGC  
TGAGCAGGAGACACCCCTCTCAAGCCTCATAAAGGCTACAAGATACTGTGCTCTGAACACATCCCACACCAA  
CTGCAACCTGCTCTCATGGCCCTGCATGCAGACATGTTAGCAGGCTGCAGCCAAAGCTTCTGTCTCCA  
CCACCTGCTTGCCACTCTCGATGACAGCAACTAGCTCATGCCCTGTTCTCTATAGGCTTAAGGCAT  
GGCTGAGCCCTGGGCTGGCATCATGCCCTAGCATGCCCTAGCAGACCCCTGCCAGTGTCTAGTGGAGATCTGGCCAGC  
TTCCCACTGGCATTGAGATTGAGACAGTGTGGCCCTGTGCCAACAGAGGGCATCCACATCTGTGATG  
GAAGTGGAGGCTGAGAATACTGCCACACTGACCCTGCTGGAGCAGGGCCTCATCGAAAGCTCCCCAAGTACA  
ATAACTGGTAAGCCTGGGCTCCACACCTGCAAGGATAGGTGACTGAGGCCACTTGGGTTACCAAGGCAAA  
TCAACTTAACAGAACATCCAAATGGAATGAACAAGAATGAGAGCTTGGGTAACAGACCCAGAAACTGGGAT  
TTGCTTACGCCATAATCCCAGCACTTGTAGAGGCCAAGGGGGTGGATCACCAGGTGTCGGAGTTGGACCA  
GCCTGACCAACATGGAGAAACCCCGTCTACTGAAAAAAAATACAAAATTAGCCAGCATGGCA  
GCGCATGCCCTGTAATCCCAGCTACTGGGAGGGTGAGGCAGGAGAATCACTAAACCAAGAGGCCAGGTTGCA  
GTGAGCCAAGATCGCGTATGCACTCCAGCCTGGCAATAAGAGCAGACTCTGTCTAAAAAAAAGAAA  
GAAACTGGGATTTTTTTTGAGATGGAGTCTACTGTATCACCAGGCTGGAGTGCAGTGGCATGATT  
CAGCTCACAACACCTCTGCCCTGGGAATTGCTCTCAAGCAATTCTCCTGCCCTAGCCTCCGGAGTAGCTGGGA  
TTACAAGCATGCCACACCCAGCTGATTTGTATTAGTAGAGACAGGGTTCACCATGTTGCCAGG  
TTGGCTCAAACCTCTAACCTCAAGTGTATCCACCCACCTCAGCCTCCAAAGTGTCTGGGATTACAGGCATGAGCC  
ACTGCGCCAGCCTAGTTGTAGTTGTATTAAATTAAATGTTAAAGAAGAGCTGATATAAAAGATCCTT  
TGCTTTTTTTCTCACCAGTTCAGGGAGCTTGCAGGGCAGAGACCCAGAGGGCTGGGACCTTG  
GGGAACACCCCTAGATGGACAAAGCCTGGAGGAAGGGACTGAGATGTGATTGGGAGGAAACATAAGGCCAA  
CAGAAGACCTGGAGTCAAAGTTGGACTGAAAAAGTGGGTCTAGGGACAAGGAAACCTGCTGGCCACCATCTTC



ACAAGGAGCCCTGTGCACATCCCAACTCTCGATTGTGCCCGCTGCCAGTCCCCCATCATGGACCCAGCCT  
GGGAGGGCCCAGAGGGTGTCCCCATTGACGCCATCATCTTGGTGGCCGCAGACCAAAGGTAAACAACATATGA  
GCTCCATGTTCTGGAAAAGGGCTATCTGTATTAGGGCTACCTCCCTCCCTGATCCAGAGCCTCAGCCT  
GGATCTCACCTTCTCCAGAGTCTCCCTGGTGAATGCAAACATTGGGAGGAGGCAAAGGGCTGAAAATGGGAT  
AGCCGAGGTCTTAGGAGAGAGTACCAAGCTCACCGAGAAGGGCTGGAGTTAGGGTCAAAGAAAAGGGCT  
GCCTGTGACTCTGTCATTGGTGTACTAGGGTACCCCTGGTATACTGAGGCCTTAACCTGGCGTCATGGGGTGT  
TGTGGCAGGCCATGCGCTGTGAGTCCACTGCTGCAGCAGAACACAAAGGTGAGCACCCCTACCATTCCCT  
CTCCTGTGTGCACACAGCACGTCTCTCCCTGAGCCAGACCTCCTTGTCACCCCTGGAGTCTG  
ATATGGCCCCACCTCTCCCACTTCTATCTTTCCCCATCCCTGAAGATATTAGAACCCATAAGCCTTCACAGC  
TTCCCTCCAACGGATGCAAGGGTGCCTTCCCTACCCAGTGAAGAAGGAAGATTCCCTACCCATCTGCTTCCCC  
CCAGGGAAAGATCATCATGCACGACCCATTGCCATGCGCCCTTTTGCTACAACCTCGGGCACTACCTGGAA  
CACTGGCTGAGCATGGAAGGGCGCAAGGGGCCAGCTGCCGTATCTCCATGTCACACTGGTCCGGCGTGC  
GAGGCAGGGCACTCCTGTGCCAGGCTTGGGAGAATGCTCGGGTCTAGACTGGATCTGCCGGCGTAGAG  
GGGGAGGACAGTGCCGAGAGACACCCATTGGCTGGTGCCTGGATCTCAGCGGCCTCAGA  
GCTATAGACACCACTCAGCTTCTCCCTCCCAAGGACTTCTGGAACAGGAGGTCTGTGACATTGGAGCTAC  
CTGACAGAGCAGGTCAACCAGGATCTGCCAAAGAGGTGTTGGCTGAGCTTGAGGCCCTGGAGAGACGTGTGCAC  
AAAATGTGACCTGAGGCCCTAGTCTAGCAAGAGGACATAGCACCCCTCATCTGGGAATAGGGAAAGGCACCTGCA  
AAAATATGAGCAATTGATATTAACATCTCAATGTGCCATAGACCTCCCAAAGACTGTCCAATAATA  
AGAGATGCTTATCTATTTACACAAGA

## Anexo II

**Alineamiento entre la secuencia del clon pGLP1-5 y la secuencia que debería tener el plásmido con el oligo UP:**

```
pGLP1-5 AAGGACGAAACACCAGGGGTGGCCAGGAACCGAGGTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAT  
Ref_pGLP1 aaggacgaaacaccgggggtggccaggaaccgaggttttagagctagaaatagcaagttaaat  
*****
```

pGLP1-5 AAGGCTAGTCCGTTATCAACCTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTGTAGAGCTA  
Ref\_pGLP1 aaggctagtcgttatcaactgaaaaagtggcacccgagtcggtgctttttagagcta  
\*\*\*\*\*

```
pGLP1-5    GAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCGTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATG  
Ref_pGLP1  gaaatagcaagttaaaaataaggctagtccgttttagcgctgcgccaattctgca-----  
*****
```

pGLP1-5 GCTCTAGAGGTACCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCC  
Ref pGLP1 -----

Alineamiento entre la secuencia del clon pGLP2-1 y la secuencia que debería tener el plásmido con el oligo DWN:

pGLP2-1 AAGGACGAAACACCCTGGCCGCATTGTACCGCCCGTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAT  
Ref\_pGLP2 aaggacgaaacaccgtgccgcattgtaccggccgttttagagctagaaatagcaagttaaaat  
\*\*\*\*\*

pGLP2-1 AAGGCTAGTCGTTATCAACTTGGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTGTAGAGCTA  
Ref\_pGLP2 aaggctagtcgttatcaacttggaaaaagtggcacccgagtcggtgcttttgttttagagcta

pGLP2-1 GAAATAGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCGTTTAGCGCGTGCACCAATTCTGCAGACAAATG  
 Ref\_pGLP2 gaaatagcaagtaaaataaggctagtcgttttagcgctgcgccaattctgca-----  
 \*\*\*\*\*

pGLP2-1 GCTCTAGAGGTACCGTTACATAACTTACGGTAAATGCCGCC  
 Ref\_pGLP2 -----

**Alineamiento entre la secuencia del clon pGLP5 amplificada con el oligo PCK2CRISPFor (pGLP5F) y con el oligo PCK2CRISPRRev (pGLP5R) y la secuencia de nucleótidos del gen:**

pGLP5F -----NNNNNNNNNNNNNNNNNNNANCACGTGCCGGGACAG  
 ref -----GGGTTGGCGGTTGGAGGCAGGGGTTGGCTGGCCTGGCTGACCTGGAGCCTGGAG  
 pGLP5R NGTGGGTTGGCGGTTGGAGGCAGGGTCGGGCGGCTGGCTGACCTGGAGCCTGGAG  
 \* \*\*\* \*

pGLP5F CCTGCTTCAGTTGCCACCGCTCTTGAGGAGGGCAATAGGANTNGANTGCNANCCCTACCTG  
 ref CCCCGGGGCCGAGGGAGCTGGCCTGCCAGCGGGCGGAGGAAGCTAGTGCCAGCCCTACCAGG  
 pGLP5R CCCCGGGGCCGAGGGAGGGCTAG-CCAGCGGGCGGAGGAACGTGCCCTCCCTATAAGC  
 \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

pGLP5F TTCCTCCCTTGACCAGGCCACTTGCTTTAAGCGCCTCCGCCAGCCTCTGCTGTGGCTCGC  
 ref TTCCGCCCCCGCGCCTGCCCTCCCTTTAAGCGCCTCCGCCAGCCTCTGCTGTGGCTCGC  
 pGLP5R GCCTCCCCCAGCCTTGCCCCCTCCTTTAAGCGCCTCCGCCAGCCTCTGCCCTCCATACC  
 \*

pGLP5F TTCNCCGCGCTCCCTCCTCCCCGCCTCCATACATCCCCGGCTCCGCACNNTTGCTGCTCTC  
 ref TTCCGCGCGCTCCCTCCTCCCCGCCTCCATACCTCCCCGGCTCCGCTCGTTCTGGCCACC  
 pGLP5R TTCCCCGCTCTCCTT-----  
 \*\*\* \* \* \* \* \* \*

pGLP5F NTNCC-----  
 ref CCGCAGCCCTGCCAGGTGCCATGGCCATTGTACCGCCCTGGCCTGCGTGAGTGACCCCC  
 pGLP5R -----CGTCCCCGGCCACCC

pGLP5F -----  
 ref GGCCCGGGGCCACCGCACCTCCGCTGCGCTGCCCTCGGGCTGCCAGTGGCGCTCTCC  
 pGLP5R GGACCTGGCCCCATCCGCACCTCCGCTGCGCTGCCCTCGGGCTGCCAGTGGCGCTCTCC

pGLP5F -----  
 ref TGCTCTCAGCCTCCGCCAGGTTCCCATCCTAGGCGGAGGGCAGGGGCACTGCTGTGGGT  
 pGLP5R TGCTTCAGCCTCCGCCAGGTTCCCATCCTAGGCGGAGGGCAGGGNGANTGNNGNNNN

pGLP5F -----  
 ref CCAGCCTCCCGCCGCGCTCTTGGAGGGCA  
 pGLP5R NTN>NNNNNNNN-----

**Alineamiento entre la secuencia del clon GLP2 amplificada con el oligo PCK2CRISPFor (GLP2F), ya con el oligo PCK2CRISPRRev no funcionó, y la secuencia de nucleótidos del gen:**

pGLP2R ANNAATAGCGGANGAAAAGGCAGGAATAGACAAAGAAGANNAGTAACAATCCGTGACGAGANA  
 ref -----

pGLP2R ACGGNGCANACCAACAGCCTNNGATTGGNGATTGGAGGCAGGGATGGGGCGGGCTGGGG  
 ref -----GGTTGGCGGTTGGAGGCAGGGTGGGGCGGGCTGG  
 \*

En todos los alineamientos, los asteriscos (\*) indican la coincidencia de la misma base en las secuencias comparadas.

## Anexo III

#### Composición de tampones y disoluciones usados:

LB	Tampón de carga 2X SLB	Gel poliacrilamida 4%	Gel poliacrilamida 10%	Tampón de transferencia	PBST	TBE 1X	TE
10 g triptona	20 % SDS (20%)	3,8 ml H <sub>2</sub> O	4,84 ml H <sub>2</sub> O	12,1 g Tris base	10% PBS 10X	0,5 M Tris base	10 mM Tris-HCl pH 8
5 g extracto de levadura	25% Glicerol (80%)	500 µl Acrilamida (40%)	2,5 ml Acrilamida (40%)	57,6 g Glicina	0,1% Tween	0,5 M Ácido bórico	1 mM EDTA
10 g NaCl	10 % Tris (1M pH 6,8)	625 µl Tris (1M pH 6,8)	2,5 ml Tris (1M pH 8,8)	800 ml Metanol	Hasta 1l H <sub>2</sub> O	10 mM EDTA	
1 ml MgSO <sub>4</sub> 1M	10 % Azul de bromofenol (2%)	25 µl SDS 20%	50 µl SDS (20%)	Hasta 4l H <sub>2</sub> O			
10 ml Tris 1M pH 7,5	30,85 mg/ml ditiotreitol	50 µl APS (10%)	100 µl APS (10%)				
	35 % H <sub>2</sub> O	5 µl TEMED	10 µl TEMED				