



**Universidad de Valladolid**



# **Generación de un modelo celular de Síndrome PAPA utilizando la técnica CRISPR/Cas9.**

**Máster en investigación biomédica**

**Alumno: Celia García Cortés**

**Tutor: Dr. Miguel Ángel de la Fuente García**

# Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	3
<b>Introducción</b> .....	4
1.    El síndrome PAPA .....	4
2.    Modificación génica dirigida .....	8
<b>Objetivos</b> .....	14
<b>Material y métodos</b> .....	15
1.    Construcción del vector CRISPR .....	15
2.    Construcción del vector donante .....	17
3.    Inserción de plásmidos en las células .....	19
<b>Resultados</b> .....	20
1.    Obtención de vectores .....	20
2.    Selección de células positivas .....	22
<b>Discusión</b> .....	24
<b>Conclusiones</b> .....	26
<b>Bibliografía</b> .....	27

# Abreviaturas

**AD:** autosómico dominante.

**AR:** autosómico recesivo.

**Arm:** Brazo de homología.

**bp:** Par de bases (*base pair*).

**Cas:** Proteínas asociadas a CRISPR (*CRISPR-associated proteins*).

**CD2BP1:** *CD2 binding-protein 1*.

**CRISPR:** Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*).

**crRNA:** CRISPR RNA.

**DSBs:** Roturas de doble cadena en el DNA (*Double Strand Break*).

**HR:** Recombinación homóloga (*Homologous Recombination*).

**MCS:** Sitio de clonación múltiple (*Multiple Cloning Site*).

**NHEJ:** Recombinación no homóloga (*Non-Homologous End Joining*).

**PAM:** Motivo adyacente al protoespaciador (*Protospacer Adjacent Motif*).

**PAPA:** Artritis piogénica estéril, pioderma gangrenoso y acné (*Pyogenic Arthritis, Pyoderma gangrenosum and Acne*).

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

**PSTPIP1:** *Proline-Serine-Threonine Phosphatase-Interacting Protein 1*.

**tracr-RNA:** Trans-activador de crRNA (*Trans-activating crRNA*).

# Introducción

## 1. El síndrome PAPA.

### 1.1 Enfermedades autoinflamatorias.

Los desórdenes autoinmunes plantean un problema significativo en la salud pública, afectando a un 3-5% de la población. Aunque el término autoinmunidad se define mediante diferentes criterios, en general las consecuencias de los procesos autoinmunes tienen como resultado la destrucción de los propios tejidos del individuo mediado por la acción de linfocitos T y/o anticuerpos dirigidos contra antígenos propios. Los desórdenes autoinmunes se clasifican en dos tipos: enfermedades organoespecíficas, en las que se ve afectado un órgano en particular, y enfermedades sistémicas, en las que participan antígenos no específicos, localizados en más de un órgano del cuerpo.

Un grupo diferente pero potencialmente relacionado con los desórdenes autoinmunes son las llamadas enfermedades autoinflamatorias (tabla 1). En ellas ocurren procesos inflamatorios agudos, recurrentes o persistentes, y en las que no se evidencian causas autoinmunitarias, infecciosas o neoplásicas, es decir, no se encuentran marcadores de una respuesta autoinmune (autoanticuerpos a títulos elevados o células T específicas de antígenos propios).

Tipo de enfermedad autoinflamatoria	Nombre de la enfermedad	Clasificación de enfermedades	Nombre del gen implicado
Síndromes hereditarios de fiebre periódica	Fiebre mediterránea familiar- FMF		Gen MEFV-AR
	Síndrome periódico asociado al receptor del TNF-TRAPS		Gen TNFRSF1A-AD
	Síndrome de hiper-IgD y fiebre periódica-HIDS		Gen MVK-AR
Enfermedades autoinflamatorias persistentes	Criopirinopatías o síndromes periódicos asociados a la criopirina (CAPS)	Síndrome autoinflamatorio familiar inducido por el frío-FCAS	Gen NLRP3(CIAS1)-AD
		Síndrome de Muckle-wells	
		Síndrome CINCA-NOMID	
	Artritis Granulomatosa Pediátrica	Síndrome de Blau	Gen NOD2-AD
		Sarcoidosis de inicio precoz	
Síndrome de artritis piogénica estéril, pioderma gangrenoso y acné quístico-PAPA		Gen CD2BP1-AD	

**Tabla 1. Clasificación de las enfermedades autoinflamatorias sistémicas hereditarias, genes responsables y tipo de herencia.** Esta tabla muestra las distintas enfermedades autoinflamatorias descritas y clasificadas hasta ahora. Las siglas AD significan herencia autosómica dominante, y AR, herencia autosómica recesiva. (Aróstegui, J.I., 2011). Señalada en rojo la enfermedad que concierne al trabajo realizado.

Ambos tipos de desórdenes presentan orígenes genéticos, con un patrón de herencia Mendeliana. La identificación de sus bases moleculares permite emplear los estudios genéticos para alcanzar un diagnóstico definitivo, así como para instaurar un tratamiento adecuado, basado en la fisiopatología de la enfermedad.

## **1.2 Características generales del síndrome PAPA.**

Una de estas enfermedades autoinflamatorias sistémicas es el síndrome PAPA, principal objeto de nuestro estudio.

El síndrome PAPA (acrónimo de artritis piógena estéril, pioderma gangrenoso y acné) es una enfermedad autoinflamatoria sistémica con patrón de herencia autosómico dominante, penetrancia incompleta y expresividad variable (*Demidowich et al, 2012*). Al tener una prevalencia baja, con una frecuencia de aparición de 1 entre 1000000 individuos, se ha clasificado como enfermedad rara. La sintomatología del síndrome se presenta como episodios inflamatorios que llevan a la acumulación de material estéril, piogénico y con alta concentración de neutrófilos.

Los síntomas se pueden agrupar en: manifestaciones articulares, que son las más frecuentes, y manifestaciones cutáneas, como son el pioderma gangrenoso, lesiones quísticas crónicas estériles, y acné quístico grave. (*Aróstegui et al, 2008*).

Las manifestaciones articulares comienzan con artritis intermitente, migratoria, destructiva, mono u oligoarticular que con frecuencia afecta a grandes articulaciones. La característica principal de esta artritis es la presencia de un intenso infiltrado polimorfonuclear en el tejido sinovial, así como de un líquido sinovial purulento y estéril, como consecuencia de la acumulación y muerte local de gran cantidad de polimorfonucleares. (fig.1)

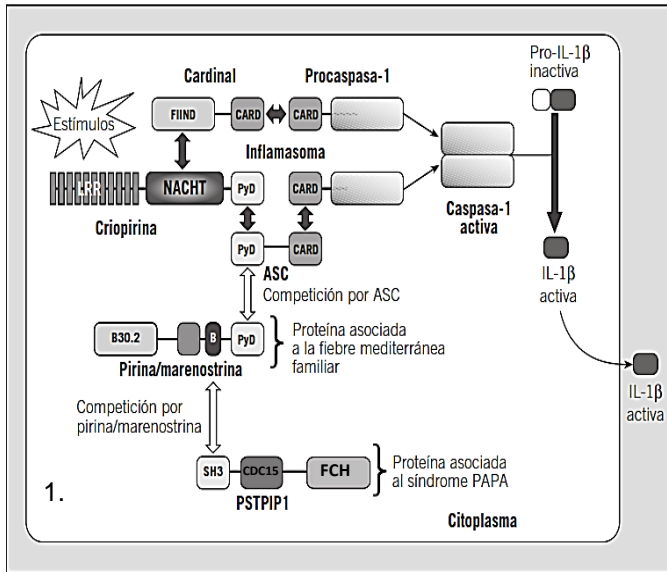
Las manifestaciones cutáneas pueden dividirse en dos tipos de afectación. El que primero se desarrolla es el pioderma gangrenoso, que consiste en múltiples lesiones papulares eritematosas (lesiones que se elevan sobre la superficie cutánea y son de color rojizo), ligeramente quísticas, que se localizan preferentemente en las extremidades inferiores. Conforme evolucionan en el tiempo, dichas lesiones se ulceran y cronifican. A partir de la adolescencia debido a los cambios hormonales, los pacientes con el síndrome PAPA desarrollan acné quístico grave que estará presente durante la edad adulta y que suele afectar a áreas corporales extensas. Dichas lesiones tienden a cronificarse formando lesiones quísticas deformantes que añaden a la enfermedad un problema social y psicológico. (fig.1)



**Figura 1. Síntomas principales del síndrome PAPA.** Esta imagen muestra las afectaciones principales del síndrome PAPA: a) Artritis piógena estéril en rodillas, con acumulación de líquido sinovial (Smith et al, 2010), b) Pioderma gangrenoso en antebrazo, mostrando la imagen múltiples lesiones eritematosas (Demidowich et al, 2012), c) y d) acné quístico en rostro y espalda (Zeeli et al, 2015).

### 1.3 Bases genéticas del síndrome PAPA.

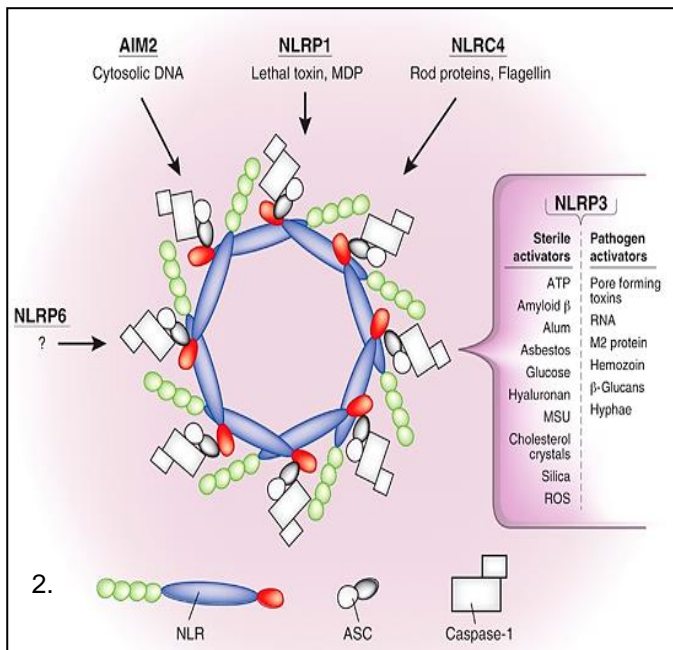
La aparición de la enfermedad se ha relacionado con mutaciones en el gen *CD2BP1*, localizado en el brazo corto del cromosoma 15. Este gen codifica para la proteína PSTPIP1, acrónimo de *proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1*. PSTPIP1 es una proteína adaptadora asociada al citoesqueleto, que se encuentra principalmente en células hematopoyéticas. Su función es modular la activación de células T y controlar la maduración de la interleuquina-1 $\beta$  por interacción con la proteína pirina/marenostrina, un regulador negativo del inflamasoma. (fig.2). Cabe destacar que las mutaciones que inducen la enfermedad son dominantes negativas, es decir, la mutación da lugar a una proteína anormal que funcionalmente, tiene un efecto dominante sobre la proteína silvestre. Esto significa que con poseer el paciente una mutación en un alelo, ya es suficiente para padecer el síndrome.



**Figura 2. Regulación y estructura del inflamasoma.**

1. Este esquema presenta la regulación de la actividad del inflamasoma mediada por pirina/marenostrina, a su vez regulada por la proteína PSTPIP1. En condiciones normales, la proteína PSTPIP1 compete con la proteína ASC (apoptosis-associated speck-like protein) del inflamasoma, por la pirina/marenostrina. Si la pirina no se une a PSTPIP1, ésta se une a la proteína ASC, regulando negativamente el inflamasoma y evitando la liberación de interleucina 1-β. Si por el contrario la pirina es secuestrada por PSTPIP1, el inflamasoma no está regulado negativamente, y se induce su activación, liberando interleucina 1-β activa. (Aróstegui *et al*, 2008).

2. La imagen representa la estructura del inflamasoma. Se trata de un complejo multiproteico formado por NLRs (Nod-like receptors), proteínas adaptadoras ASC (apoptosis-associated speck-like protein) y pro-caspasa-1. Este complejo se encuentra en células mieloides y es responsable de la respuesta inmune innata. Se encarga de la liberación de citoquinas proinflamatorias maduras en respuesta a estímulos antigénicos captados por diferentes receptores pertenecientes al complejo, como pueden ser flagelina captada por el receptor NLRC4, o β-glucanos reconocidos por el receptor NLRP3, entre otros muchos. (Elinav *et al*. 2013).

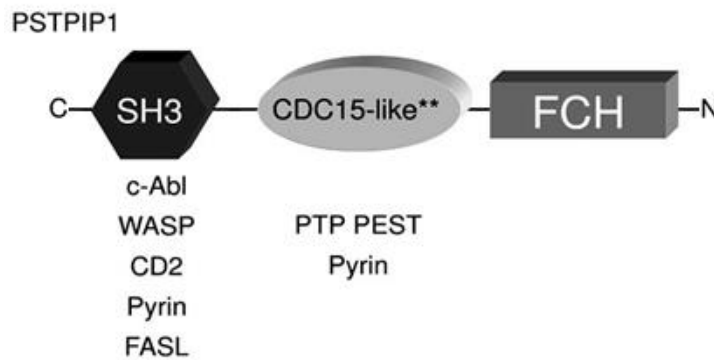


Desde un punto de vista estructural, la proteína PSTPIP1 presenta un dominio de homología a Fer-CIP4 (FCH) en el extremo N-terminal, un dominio CDC-15 tipo *coiled-coil* (hélice superenrollada), y una región SH3 en el extremo carboxilo terminal (fig.3). La proteína es regulada por la tirosina fosfatasa PTP-PEST, que se une al dominio CDC15 y lo defosforila. Esta defosforilación impide la unión de PSTPIP1 con la proteína pirina/marenostrina, de manera que queda libre y puede unirse al inflamasoma, inactivándolo, e inhibiendo la producción de interleucina-1β.

Estudios moleculares han determinado que mutaciones con cambio de sentido (también conocidas como mutaciones contrasentido o *missense*) en el dominio CDC15 de la proteína PSTPIP1 provocan una disrupción en la unión con la tirosina fosfatasa PTP-PEST, conduciendo a una hiperfosforilación del dominio CDC15. Esto conduce a un secuestro permanente de la pirina/marenostrina por parte de PSTPIP1. En este caso, la pirina/marenostrina no regula negativamente el inflamasoma, lo cual conlleva

una activación descontrolada de IL-1 $\beta$  (Wise et al, 2002).

Hasta el momento se han descrito cuatro mutaciones diferentes asociadas al síndrome PAPA, localizadas todas ellas en la región funcional de la proteína (dominio CDC15), pero en diferentes exones del gen CD2BP1. Las más recurrentes se encuentran en el exón 10, descrita como c688G>A (A230T) y en el exón 11, descrita como c.748G>A (E250Q).



**Figura 3. Estructura de la proteína PSTPIP1.** Esta representación esquemática de la proteína PSTPIP1 muestra un dominio SH3 en el extremo C-terminal, un dominio CDC15 *coiled-coil* y un dominio FCH (*Fer/CIP4 homology*) en el extremo N-terminal. Las proteínas que interactúan con los dominios de PSTPIP1 se muestran bajo los mismos. Los asteriscos denotan la posición relativa de las mutaciones más recurrentes en este síndrome. (Smith et al, 2010)

## 2. Modificación génica dirigida.

### 2.1 Definición.

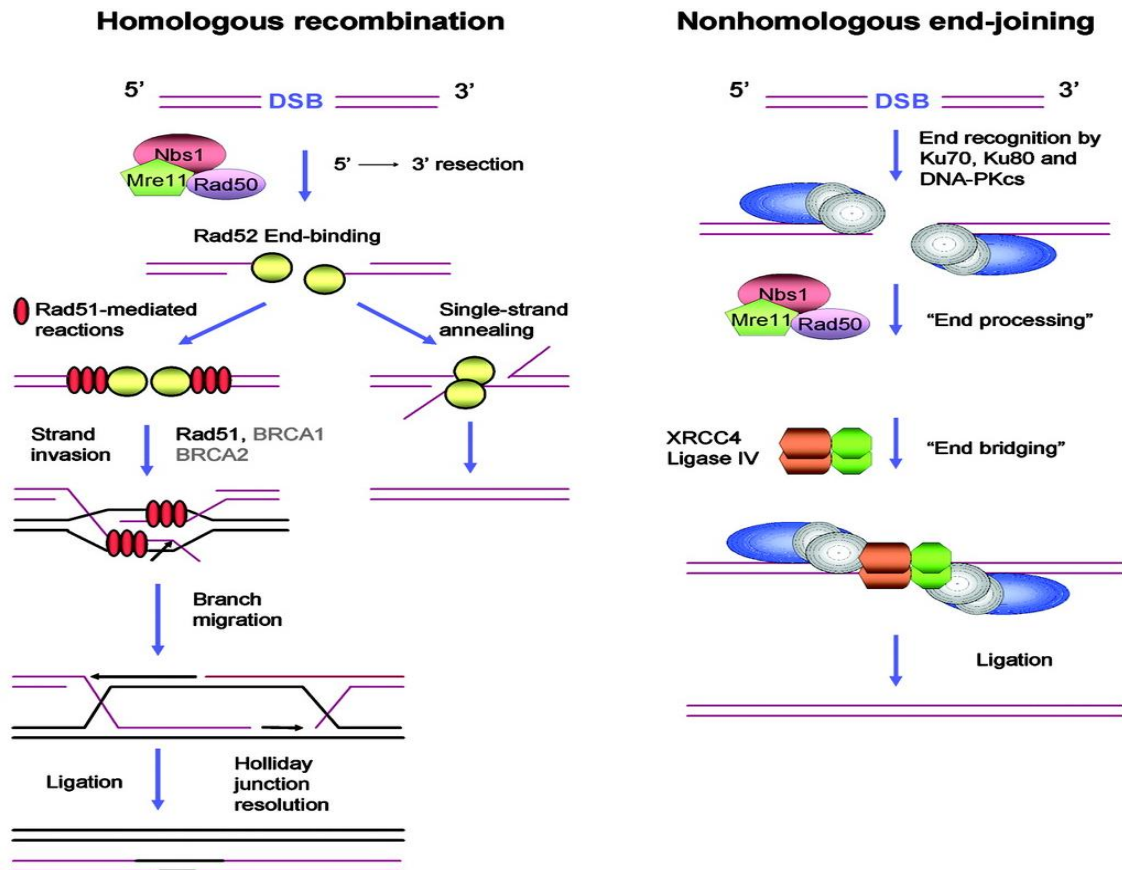
La capacidad de modificar el genoma de manera precisa y dirigida, es crucial para entender las contribuciones de la genética en la biología y la enfermedad. La ingeniería genética aplicada a líneas celulares o modelos animales ha sido tradicionalmente llevada a cabo a través de mutagénesis al azar o por *gene targeting* (manipulación génica dirigida) de baja eficiencia. Comúnmente se conoce como modificación génica a la producción de mutaciones sobre el DNA.

Los métodos de mutagénesis dirigida se basan en el estudio de los procesos naturales de reparación celular frente a cortes en la doble cadena de DNA (DSBs). La reparación puede llevarse a cabo por dos vías principales: la vía de la recombinación no homóloga (NHEJ, *non-homologous end-joining*) y la vía de la recombinación homóloga (RH) (Fig. 4). La NHEJ es un mecanismo fisiológico eficiente de reparación, y representa la vía de reparación predominante en mamíferos, ocurriendo en una relación de 1000:1 con respecto a la RH. En ella, tras un corte de doble cadena, los extremos del DNA son procesados y finalmente ligados. La NHEJ es un sistema muy eficiente de reparación de DNA pero su naturaleza imprecisa puede causar pequeñas inserciones y deleciones. Por su parte la RH está considerada como un mecanismo libre de errores, ya que utiliza principalmente la presencia de una secuencia homóloga para producir reparación. Sin embargo, la reparación de daños en el DNA por recombinación homóloga en células de mamíferos ocurre con una frecuencia muy baja, alrededor de una de cada  $10^5$ - $10^7$  células (Vasquez et al., 2001).

Con el fin de facilitar la manipulación génica, también llamada edición génica, se han



desarrollado tecnologías que permiten la modificación génica dirigida de alta eficiencia, basadas en la reparación del DNA únicamente por recombinación homóloga en el gen diana a partir de un vector donante con la mutación deseada. Esto provoca una modificación específica en el locus determinado, y sin alterar la regulación transcripcional del gen. Estas técnicas permiten modificar el genoma induciendo inserciones, deleciones y sustituciones con el fin de estudiar cambios en la actividad de una proteína mutada.



**Figura 4: Mecanismos de reparación de roturas de doble cadena (DBS) de DNA.** Las roturas de doble cadena de DNA se reparan a través de dos métodos, recombinación homóloga (HR) y recombinación no homóloga (NHEJ). En la recombinación homóloga se puede producir el anillamiento de una cadena simple, o producirse el intermediario *Holliday*, donde ocurre la unión covalente de los dúplex de recombinación mediante intercambios genéticos de las cadenas sencillas. Al final del proceso las resolvasas separan los dúplex formados. La recombinación no homóloga (NHEJ) se lleva a cabo en cuatro etapas: reconocimiento de los extremos, procesamiento, unión de los extremos y ligación. (*Sancar et al, 2004*).

## 2.2 Sistemas de endonucleasas.

Los métodos más eficientes para inducir mutaciones dirigidas en el genoma se basan en el uso de diferentes tipos de endonucleasas. Las más utilizadas hasta el momento son:

- Nucleasas de dedos de zinc (ZFN, *Zinc Finger Nucleases*), La estrategia se basa en utilizar los dedos de zinc unidos a nucleasas. Al ser introducidos en la célula, los

dedos de zinc son capaces de unirse al DNA en zonas cerca de la mutación y las nucleasas cortan la hebra de DNA. (*Mani et al, 2005*).

- Nucleasas TALE (*Transcription activator-like effector nuclease*), que surgen de combinar un dominio con una señal de localización nuclear, otro dominio compuesto de repeticiones en tándem de TALE que permiten el reconocimiento de secuencias específicas de DNA, y por último, un dominio correspondiente a la endonucleasa que corta el DNA de manera específica. (*Christian et al, 2010*).

- Sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated*), consistente en endonucleasas Cas9 guiadas por RNA (*Ran et al, 2013*).

### 2.3 Sistema CRISPR/Cas9.

El método de endonucleasas descubierto más recientemente y más efectivo hasta el momento es el Sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas9 (*CRISPR-associated*). Este sistema fue descubierto como un mecanismo inmune adaptativo de bacterias y arqueas, las cuales incorporan a su genoma fragmentos de DNA exógeno tras una invasión patógena. De esta manera crean una memoria inmune y son capaces de degradar a través de nucleasas, elementos genéticos perjudiciales evitando así una segunda invasión patógena. Además, al tratarse un mecanismo heredable, es posible transmitir la inmunidad adquirida a la descendencia (*Bhaya et al, 2011*).

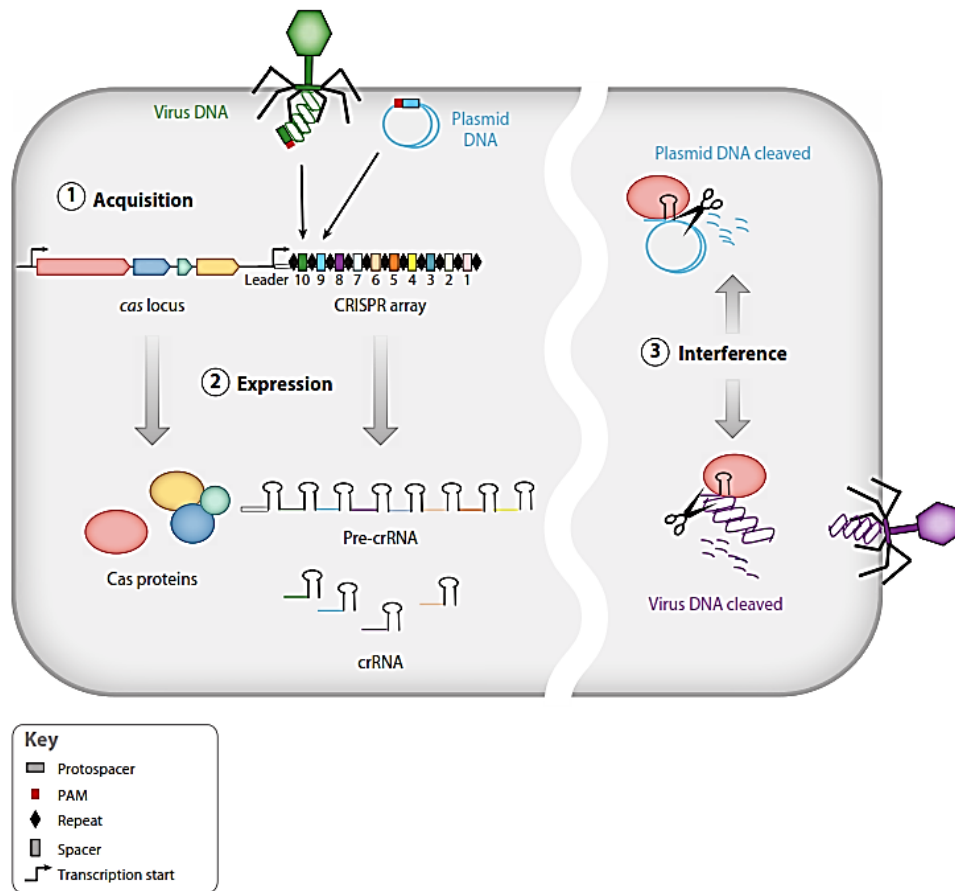
Las CRISPR se componen de secuencias repetidas de DNA separadas por secuencias altamente variables de longitud similar denominadas espaciadores, que son las que derivan del DNA exógeno de organismos patógenos.

Por su parte, las endonucleasas Cas complementan a las CRISPR cortando los DNAs exógenos que coinciden con estos espaciadores previamente incluidos en el genoma del procarionta.

El mecanismo es el siguiente:

- Tras la invasión de un patógeno, el organismo procarionta incorpora en su genoma un fragmento del DNA invasor, y lo almacena flanqueado por secuencias repetidas de DNA.
- Estas secuencias son transcritas y procesadas en RNA CRISPR (crRNAs). Este crRNA se complementa con un RNA auxiliar llamado tracrRNA, que interviene en la maduración del crRNA. Ambos RNAs forman una estructura de doble cadena conocida como sgRNA, que a su vez reconoce a la endonucleasa Cas9.
- Una vez se ha formado el complejo, el sgRNA guía a la endonucleasa Cas9 hacia un DNA exógeno denominado protoespaciador, que es complementario a la secuencia nucleotídica del sgRNA.
- La nucleasa Cas9 realizará entonces una escisión de doble cadena en el DNA invasor siempre que ésta vaya seguida de una secuencia específica de unos pocos nucleótidos que recibe el nombre de PAM (*protospacer adjacent motif*).

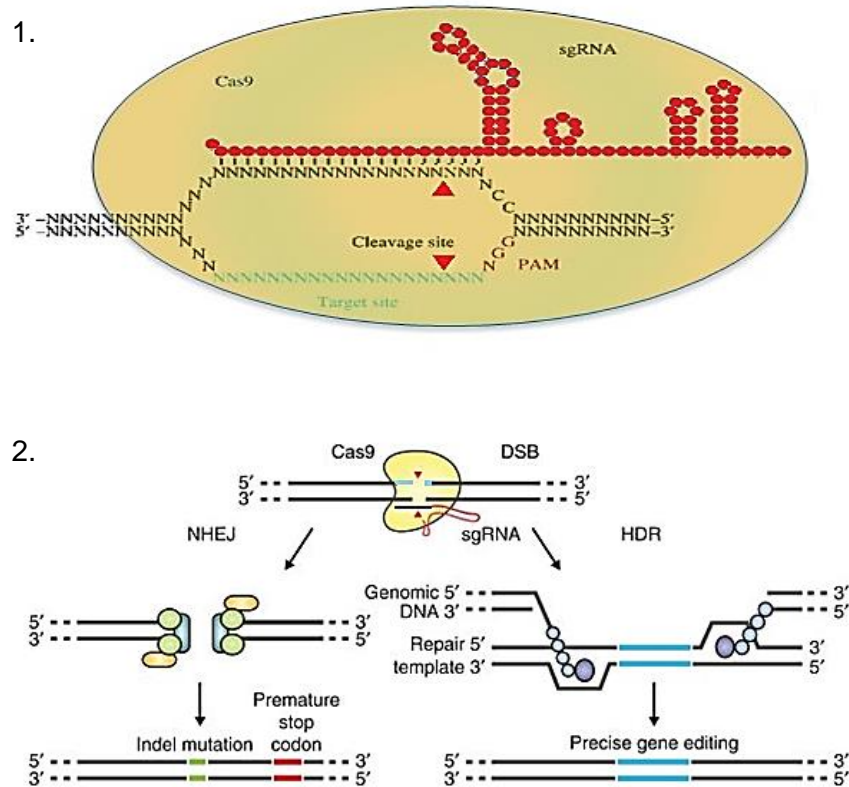
Este motivo PAM sólo está presente en el DNA diana, y la endonucleasa efectuará el corte tres pares de bases antes de ella.



**Figura 5. El sistema CRISPR como mecanismo inmune adaptativo en procariontes.**

1) El DNA invasivo se introduce en el organismo huésped. Éste almacena un fragmento de este material génico en su propio genoma, formando el array de CRISPR, consistente en espaciadores únicos (cajas coloreadas, numeradas en función al orden en que se han incorporado al array) e interespaciadores que son repeticiones palindrómicas que separan a los espaciadores (rombos negros). El gen que codifica para la proteína Cas se encuentra cerca del array de CRISPR. 2) El DNA almacenado se transcribe formando CRISPR RNAs (crRNAs). El gen Cas se traduce en proteínas Cas. 3) Esos RNAs transcritos se asocian a la endonucleasa Cas y evitan una segunda invasión de los patógenos reconociendo su secuencia génica a través del crRNA y cortando el material génico mediante la endonucleasa asociada. (*Bhaya et al, 2011*).

El sistema de CRISPR/Cas9 ha surgido como una nueva herramienta de ingeniería genética, y representa un sistema fácil de diseñar, con una alta eficiencia (*Ran et al., 2013*). Se basa en la introducción en la célula diana del gen de la nucleasa Cas9, de un DNA que genera sgRNAs específicos de la secuencia diana, y de un DNA donante que contenga la mutación deseada y que se usará como molde para la reparación del corte generado por la nucleasa, gracias a la maquinaria de recombinación homóloga presente en la célula. La especificidad del corte dependerá de la secuencia guía de 20 nucleótidos del sgRNA. La secuencia diana debe estar seguida de la secuencia PAM (que en el sistema CRISPR que nosotros utilizamos es 5'-NGG).

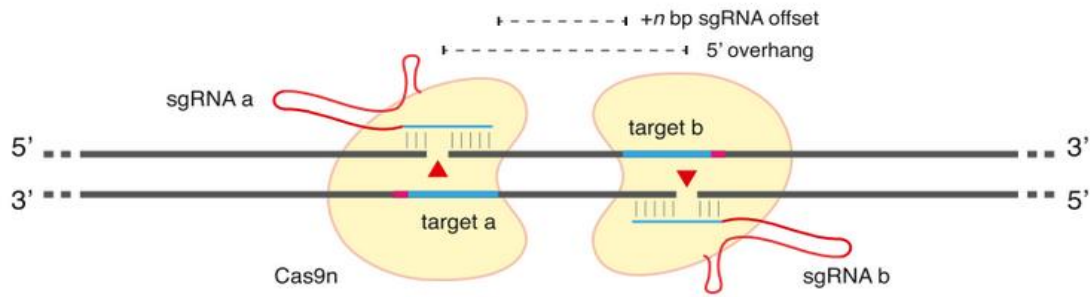


**Figura 6. Proceso de edición génica utilizando el sistema CRISPR/Cas9.**

1. La proteína Cas9 (amarillo) se asocia al RNA guía (sgRNA, rojo) y reconoce una secuencia complementaria de 20 pares de bases en el DNA diana. El corte requiere un motivo adyacente proto espaciador o secuencia PAM (NGG, granate) en el DNA diana, que no aparece en el sgRNA. El corte de la doble cadena se realiza tres pares de bases antes de la secuencia PAM en el DNA (sitio de corte, triángulos rojos). (*Bassett et al, 2013*).

2. Los cortes en la doble cadena (DSB) inducidos por Cas9, pueden ser reparados de dos maneras: por recombinación no homóloga (NHEJ), donde los extremos producidos tras DSB se unen de nuevo, lo cual puede provocar mutaciones aleatorias en el lugar de unión (fragmento verde). Estas mutaciones pueden dar lugar a cambios en el marco de lectura y la creación de codones stop prematuros (fragmento rojo), lo cual resulta en un knock-out del gen. Alternativamente, la utilización de un DNA molde (fragmento azul) puede aumentar las probabilidades de reparación a través de recombinación homóloga (HDR), (*Ran et al, 2013*).

Una de las ventajas de este sistema es la posibilidad de aumentar de manera sencilla la proporción de recombinación homóloga frente a recombinación no homóloga en el DNA diana. Para incrementar las posibilidades de reparación por RH, se ha generado una endonucleasa Cas9 mutante (*Ran et al., 2013*) en la que se anula la funcionalidad de uno de sus dominios, impidiendo la unión de Cas9 con una de las cadenas del DNA diana. De esta manera, Cas9 actúa como una *nickasa* de DNA, es decir, sólo corta una de las dos cadenas de DNA (fig.7), y utilizando dos sgRNA distintos y dos *nickasas* Cas9, se obtienen cortes en ambas cadenas pero en diferentes dianas, lo que es normalmente reparado con alta fidelidad mediante el proceso de RH, minimizando las posibilidades de reparación por NHEJ.



**Figura 7. Las nucleasas Cas9 *nickasas* facilitan la edición génica en células humanas.** Esquema ilustrativo de cortes de cadena sencilla en DNA de doble cadena utilizando sgRNA como guía de las *nickasas* Cas9 (Cas9n, amarillo). Esta mutación en Cas9 permite realizar un corte únicamente en una de las cadenas complementarias al sgRNA, y utilizando dos sgRNAs se pueden cortar las dos cadenas al mismo tiempo en sitios diferentes. (*Ran et al, 2013*).

Dados los avances en el conocimiento de la manipulación genética, y la accesibilidad de las nuevas herramientas desarrolladas, nos propusimos poner a punto un modelo celular de enfermedad genética, como es el síndrome PAPA.

# Objetivos

Con los datos proporcionados previamente, podemos definir como objetivo del trabajo la obtención de un modelo celular del síndrome PAPA, analizando los efectos a pequeña escala de las mutaciones que provocan la enfermedad, usando una línea celular de estirpe monocítica.

Para ello se seleccionan las dos mutaciones más recurrentes encontradas en pacientes con el síndrome PAPA (A230T y E250Q), y se introducen en una línea celular humana a través del sistema de endonucleasas CRISPR/Cas9.

Para este fin, se plantean los siguientes objetivos:

- Construcción de vectores que contengan el gen de la nucleasa Cas9 *nickasa* y las secuencias guía específicas, con el fin de obtener cortes de cadena simple en lugares específicos del genoma en el gen *CD2BP1* en las células diana.
- Construcción de dos plásmidos donantes que contengan parte del gen *CD2BP1* con sendas mutaciones que causan el síndrome PAPA.
- Introducción de los plásmidos CRISPR junto con los plásmidos donantes en células THP-1 mediante nucleofección.
- Selección de los clones celulares modificados que incorporan la mutación mediante PCR y dilución límite.

# Material y métodos

## 1. Construcción del vector CRISPR/Cas9.

### 1.1 Alineación de los oligonucleótidos.

Para la clonación y obtención de CRISPR/Cas9 se empleó el plásmido pX335-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9n(D10A), un vector de expresión bacteriana de 8.434 bp con un cassette de resistencia a ampicilina, que codifica para la nucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. Este plásmido contiene una mutación que da lugar a una proteína Cas9 con actividad *nickasa*, la cual realizará el corte en una sola hebra.

Para la localización del sitio de corte, es necesario una secuencia guía (sgRNA). Para ello, utilizando la secuencia del gen *CD2BP1*, se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos, y se llevaron a cabo dos reacciones de anillamiento por separado con los oligonucleótidos correspondientes. El anillamiento se realizó en termociclador con el siguiente programa: un ciclo de 30 minutos a 37°C y un ciclo con dos pasos: 5 minutos a 95°C y una rampa de disminución de la temperatura hasta 23°C.

<b>PSTPIP1 sgRNA1 sense</b>	CACC gCTTACTGAGCCCAACCTGCT
<b>PSTPIP1 sgRNA1 antisense</b>	Aaac AGCAGGTTGGGCTCAGTAAGC
<b>PSTPIP1 sgRNA2 sense</b>	CACC GTAAGGGGAACCAGGACACCC
<b>PSTPIP1 sgRNA2 antisense</b>	Aaac GGGTGCCTGGTCCCCTTAC

**Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para la construcción del sgRNA.** Los primers se muestran en dirección 5'→3'. El sgRNA1 sense y el sgRNA1 antisense son complementarias, al igual que el sgRNA2 sense y antisense.

### 1.2 Ligación de las secuencias guía con el vector.

Una vez anillados, se procedió a su ligación por separado en el vector pX335. Para ello fue necesaria una previa digestión del vector con la enzima de restricción BbsI. La reacción de ligación se llevó a cabo diluyendo los oligos alineados 1/200 en Tris-EDTA, y se utilizaron 2µl por reacción de los mismos, 1,5µl del vector pX335 digerido, 2µl de buffer 5X y agua RNAsa Free hasta completar 10µl, seguido de 10 µl de buffer 2X y 1µl de ligasa. Para esta reacción se utilizó un kit de ligación (*Rapid DNA Dephos & Ligation Kit; Roche*). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos.

### 1.3 Transformación de la ligación.

Posteriormente, los productos de ligación fueron transformados en bacterias competentes DH5 $\alpha$  (*Stratagene*). Se mezclaron 3  $\mu$ l del resultado de la ligación y 50  $\mu$ l de bacterias, y se incubaron 20 minutos en hielo, tras lo cual se sometieron a un choque térmico a 43°C durante 45 segundos. A continuación se enfriaron 2 minutos en hielo y se añadió 1 mL de medio de cultivo LB sin antibiótico. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 37° en agitación a 550rpm en el baño. Transcurrido ese tiempo se centrifugan 3 minutos a 15000rpm. El *pellet* resultante se resuspende en 150  $\mu$ l de LB y se siembra en placas con antibiótico (ampicilina) correspondiente al cassette de resistencia del plásmido pX335. Estas placas se incuban 16 horas a 37°.

### 1.4. Obtención de colonias aisladas.

Al día siguiente de la transformación, se picaron colonias aisladas de cada placa y se crecieron en 3ml de medio LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) durante 16 horas en agitación a 1200 rpm y 37°C de temperatura.

### 1.5 Extracción de DNA a partir de bacterias.

El DNA de las bacterias fue aislado mediante un protocolo de miniprep. El pellet obtenido mediante centrifugación del cultivo bacteriano, se resuspendió en 100  $\mu$ L de tampón de resuspensión (50 mM Tris / 10 mM EDTA / RNAsa 50  $\mu$ g/mL / pH=8.0). Luego, se añadieron 100  $\mu$ L de tampón de lisis (0,1 M NaOH / 1% SDS), se mezclaron las soluciones por inversión y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadieron 100  $\mu$ L de tampón neutralizador (1,5 M de acetato potásico / pH=5,5), se mezcló nuevamente por inversión y se centrifugó 5 minutos a 15.000 rpm. Se recogió el sobrenadante y se añadieron 900  $\mu$ L de etanol absoluto (100%) para precipitar el DNA plasmídico. Se invirtieron los viales para mezclar las soluciones y se incubaron durante 10 minutos a -20°C. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 15.000 rpm durante 10 minutos, tras lo cual se retiró el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 700  $\mu$ L de etanol al 70%. Las muestras se centrifugaron una vez más a 15.000 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se dejó secar al aire el *pellet* durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último, se resuspendió el DNA plasmídico en 50  $\mu$ L de TE 1X y se utilizó el espectrofotómetro de microvolúmenes NanoDrop (*Thermo Fisher*) para su cuantificación.

### 1.6 Comprobación de la ligación.

Para comprobar si se ha producido correctamente la ligación, los DNAs obtenidos de las miniprep conteniendo las secuencias guía se digieren con la enzima de restricción NdeI, y como control negativo se utiliza el vector pX335 vacío, y también digerido con NdeI. Al no poseer DNA guía éste último, la banda visualizada tras la digestión tendrá un tamaño menor.

La digestión se llevó a cabo utilizando 1,5  $\mu$ l de DNA, 4  $\mu$ l de buffer 0 10X, 2  $\mu$ l de



enzima de restricción NdeI y completado con agua RNAsa Free hasta 40 µl. La reacción se incubó dos horas a 37°, y posteriormente se comprobó en un gel de agarosa a 2X de concentración.

## 2. Construcción del vector donante.

### 2.1 Extracción de DNA genómico de un cultivo celular.

Este experimento se realizará en células THP-1 (línea celular monocítica derivada de un paciente con leucemia monocítica aguda), y por ello utilizamos DNA genómico extraído de estas células. Para extraer DNA de cultivos celulares, se recogen las células, se centrifugan para eliminar el sobrenadante y se añade tampón de lisis (50 mM Tris-HCl. pH 8 / 100 mM NaCl / 10 mM EDTA / 0,5% SDS / 300 µg/mL proteinasa K), tras lo cual se incuba a 56°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se añaden 600 µL de etanol absoluto, un 10% del volumen inicial de NaCl 5 M y 2 µL de glucógeno (20 mg/mL), y se incuba durante 20 minutos a -20°C, para precipitar el DNA. Una vez cumplido este tiempo, se centrifuga a 12.000 rpm durante otros 20 minutos. Se retira completamente el sobrenadante y se añaden 600 µL de etanol 70% y se centrifuga nuevamente, durante 10 minutos. Se retira una vez más el sobrenadante, y se deja secar el *pellet* al aire. Finalmente se resuspende en tampón Tris-EDTA que contiene RNAsa a 50 µg/mL.

### 2.2 Amplificación y obtención de los brazos de homología.

Para la construcción de un vector donante, primero se deben amplificar dos fragmentos de ese DNA que son brazos de homología (de ahora en adelante los llamaremos simplemente brazos).

Se diseñaron primers específicos para amplificar los brazos en el gen *CD2BP1*, primers a los que se añade un sitio de corte para una enzima de restricción para la clonación posterior (tabla 3). La reacción de PCR consistió en utilizar 2µg de DNA (equivalente a 3µl), 20µmoles (2 µl) de cada primer según el brazo que se amplificaba, 10 µl de buffer HF 5X, 1 µl de dNTPs, 2,5 µl DMSO, y 0,5 µl de Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (*Thermo Scientific*). Esta amplificación se realizó en el termociclador utilizando siguiente programa: 98°C durante 1 minuto, 40 ciclos de [98°C 15 segundos, 60°C 20 segundos, 72°C 40 segundos] y 1 ciclo a 72°C 5 minutos.

Tras esta PCR, se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1X para comprobar la eficiencia de la reacción, y seguidamente se cortaron las bandas correspondientes a los brazos amplificados. Esas bandas se purificaron con el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system* (*Promega*) y se cuantificaron en NanoDrop.

<b>PST Arm1 NotI Sense</b>	AAT <b>GCGGCCGC</b> CAATCCCTACTCCAGCTGC
<b>PST Arm1 Sall antisense</b>	ATAG <b>TCCGAC</b> AGCGAGAATGCAGCACAGGGACACCCTGGAGATGTG
<b>PST Arm2 EcoRI sense</b>	AAT <b>GAATTC</b> ACTTCCTCCTTATGCCTCAGGAGCTCTGTGGATGGATGC
<b>PST Arm2 NotI antisense</b>	ATT <b>GCGGCCGC</b> ACCAGATACAGACACATAGTAGG

**Tabla 3. Primers utilizados para la amplificación los brazos de homología.** Los primers se muestran en dirección 5'→3'. Destacan en rojo las dianas de restricción diseñadas necesarias para la posterior clonación de los brazos de homología en el vector.

### 2.3 Ligación.

Una vez obtuvimos los brazos, se procedió a su digestión con enzimas de restricción. El brazo 1 se digirió con NotI y Sall, mientras que el brazo 2 se digirió con EcoRI y NotI.

En paralelo, para llevar a cabo la construcción de dos vectores que contengan los brazos 1 y 2 por separado, se utilizó el plásmido pBluescript II KS +/-, que es un vector de clonación de 2961 bp. Contiene un cassette de resistencia a ampicilina y también un sitio de clonación múltiple (*Stratagene*). Este vector fue digerido, bien con NotI/Sall, o con EcoRI/NotI.

Una vez las digestiones finalizaron, se procedió a la ligación del brazo 1 con pBluescript NotI/Sall y del brazo 2 con pBluescript EcoRI/NotI.

Esta ligación se transformó en bacterias competentes DH5 $\alpha$ , y se sembraron en placas con ampicilina. Al día siguiente se picaron las colonias. De esas colonias se realizó una mini-prep y se comprobó en gel de agarosa 1X llevando a cabo previamente una digestión con enzimas de restricción para separar los brazos y el plásmido pBluescript.

### 2.4 Mutagénesis dirigida.

Para inducir mutaciones puntuales en los brazos, se procedió a aplicar un protocolo de mutagénesis dirigida, utilizando el kit comercial *QuickChange II (Agilent Technologies)*. Para llevar a cabo la mutagénesis se utiliza como DNA molde el plásmido obtenido anteriormente, y dos *primers* complementarios que contienen la mutación (tabla 4). Este proceso requiere un programa determinado en el termociclador: 1 ciclo de 30 segundos a 95°C y 16 ciclos de [30 segundos a 95°C, 1 minuto a 58°C y 6 minutos a 68°C]. Una vez finalizada la reacción, el producto de amplificación, fue tratado con DpnI (10 U/ $\mu$ L) durante 1 hora a 37°C. Esta enzima tiene la función de digerir, específicamente, el DNA metilado del plásmido utilizado como molde y que, por tanto, no contiene la mutación.

Seguidamente se transformó en bacterias DH5 $\alpha$  en placas de agar con ampicilina. Las colonias crecidas fueron incubadas para preparar una miniprep. El DNA extraído fue mandado a secuenciar para comprobar si contenían la mutación.

<b>Mutación A230T</b>	<b>Primer Sense</b>	CCATTCTCCGCAACACCCCTGTGGGTGCAC
	<b>Primer Antisense</b>	GTGCACCCACAGGGTGTTCGGAGAATGG
<b>Mutación E250Q</b>	<b>Primer Sense</b>	GCCCCAGCTCTACAAGGAAGTGCGGCT
	<b>Primer Antisense</b>	AGCCGCACTTCCTGTAGAGCTGGGGC

**Tabla 4. Primers diseñados para la mutagénesis dirigida.** Los nucleótidos señalados en rojo corresponden a las mutaciones a inducir en el DNA. Tanto para la mutación A230T como para la mutación E250Q se sustituirá guanina por adenina en la hebra sense. La mutación A230T se inducirá en el brazo 1, ya que corresponde al exón 10, mientras que la mutación E250Q será inducida en el brazo 2, dado que se sitúa en el exón 11.

## 2.5 Construcción del plásmido definitivo.

Para construir el plásmido definitivo, el vector pMCS digerido con NotI y desfosforilado en los extremos con SAP para evitar recircularización. Este vector será utilizado para una cuádruple ligación, con los brazos 1 y 2 y además un cassette de resistencia a blasticidina, necesario para la selección positiva de las células. Para esta ligación utilizamos 30ng de cada fragmento de DNA, mezclado con los reactivos necesarios para la ligación relatados anteriormente.

2µl de esta ligación se transformaron en bacterias competentes DH5α, y se incubaron overnight. Al día siguiente se picó la colonia que apareció y se creció en LB. La miniprep realizada de esta colonia dio positiva para la cuádruple ligación.

## 3. Inserción de plásmidos en las células.

### 3.1 Nucleofección.

La transfección del vector en las células THP-1 se realizó a través del método de nucleofección, usando el kit comercial *Amaxa Cell Line Nucleofector Kit (Lonza)*. Para ello el paso previo consiste en plaquear  $10^5$  células tres días antes de la nucleofección. Pasado ese tiempo se contaron en cámara de Newbawer y se recogieron  $2 \times 10^5$  células.

Paralelamente se añadieron en 2 pocillos de una placa de 24, 1,5 mL de medio completo (*Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM*, suplementado con 1X de Glutamax (concentración final 2 mM), 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina (concentración final de 100U/mL y 100 µg/mL, respectivamente) y 1X de piruvato (concentración final 1mM)). Esta placa se incubó durante todo el proceso a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células ya contadas se centrifugaron a 200xg durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante, y el *pellet* se resuspendió en 100µL de solución de nucleofección, y se le añadieron 0,5 µg de cada uno de los plásmidos necesarios, es decir, del vector donante (MCS-A1-BSD-A2) y de los dos vectores CRISPR. Se llevó a cabo la nucleofección en el nucleofector y seguidamente se plaquearon las células en los dos pocillos con medio incubados previamente. A las 48 horas se sembraron las células en placas de 96 pocillos y se les añadió medio completo + blasticidina (5µg/ml), como método de selección para las células que han incorporado el vector. Las células se mantuvieron bajo las condiciones pertinentes y se realizó un seguimiento de su crecimiento.

Debido a un problema de contaminación de las placas, y sin tiempo suficiente para repetir todo el procedimiento, tuvimos que paralizar el experimento.

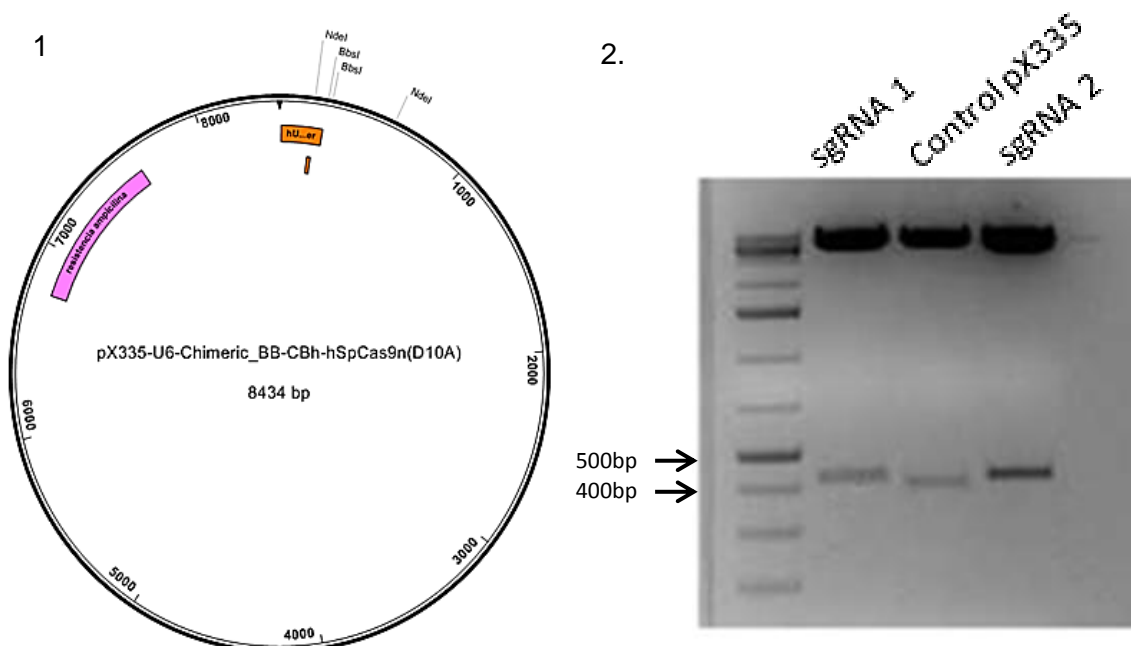
# Resultados

## 1. Obtención de vectores.

### 1.1 Obtención del vector CRISPR/Cas9.

En primer lugar, se sintetizaron los dos RNA guía (sgRNA). Para ello, se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos a partir de la secuencia del gen *CD2BP1* (tabla 2 material y métodos). Estas parejas de oligonucleótidos se alinearon para dar lugar a las secuencias de doble cadena de 20 pares de bases, que conoceremos a partir de ahora por sgRNA 1 y sgRNA 2. Estas secuencias sgRNA 1 y 2 se ligaron por separado al vector pX335-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9n(D10A) que contiene la secuencia codificante para la nucleasa Cas9 *nickasa*. Para proceder a la ligación primero fue necesaria la digestión del vector con la enzima de restricción BbsI (Fig. 7).

La correcta ligación del vector pX335 con las secuencias alineadas se comprobó a través de digestión con la enzima de restricción NdeI. Se analizaron dos vectores, uno por secuencia guía, y como control negativo una muestra del vector pX335 sin secuencia guía. Al correr las muestras digeridas en un gel de agarosa, la diferencia de bandas observada sería de 20 pares de bases, dado que los vectores con secuencia guía en su interior tendrían 20 pares de bases más que el vector pX335 vacío (Fig. 7)



**Figura 7. Estructura del plásmido pX335-U6-Chimeric\_BB-CBh-hSpCas9n(D10A) y comprobación del vector CRISPR.** 1. En esta representación del vector pX335 están marcados los sitios de restricción utilizados para los experimentos realizados. Los sitios BbsI se digirieron para la inserción de los sgRNA en el plásmido. La enzima NdeI fue utilizada para comprobar la correcta construcción del vector. 2. El gel de agarosa muestra la correcta ligación de los sgRNAs al vector pX335. Se aprecia una diferencia de tamaño de las bandas entre los sgRNAs y el control negativo, correspondiente a 20 pares de bases.

## 1.2 Obtención del vector donante.

El siguiente paso consistió en la construcción del vector donante que funcionara como molde para reparar el DNA tras los cortes con la nucleasa Cas9n. Nuestro objetivo inicial era obtener dos modelos celulares, con dos mutaciones diferentes en el gen *CD2BP1*: una en el exón 10, descrita como c688G>A (A230T) y otra en el exón 11, descrita como c.748G>A (E250Q). Así pues tratamos de construir dos vectores donantes, uno con la mutación A230T y otro con la mutación E250Q.

Para ello en primer lugar se amplificaron a partir del DNA *wild-type*, dos brazos de homología, denominados Arm 1 y Arm2. Estos brazos incluyen el exón 10 y el exón 11 respectivamente. Seguidamente los brazos se ligaron por separado al plásmido pBluescript II KS +/-.

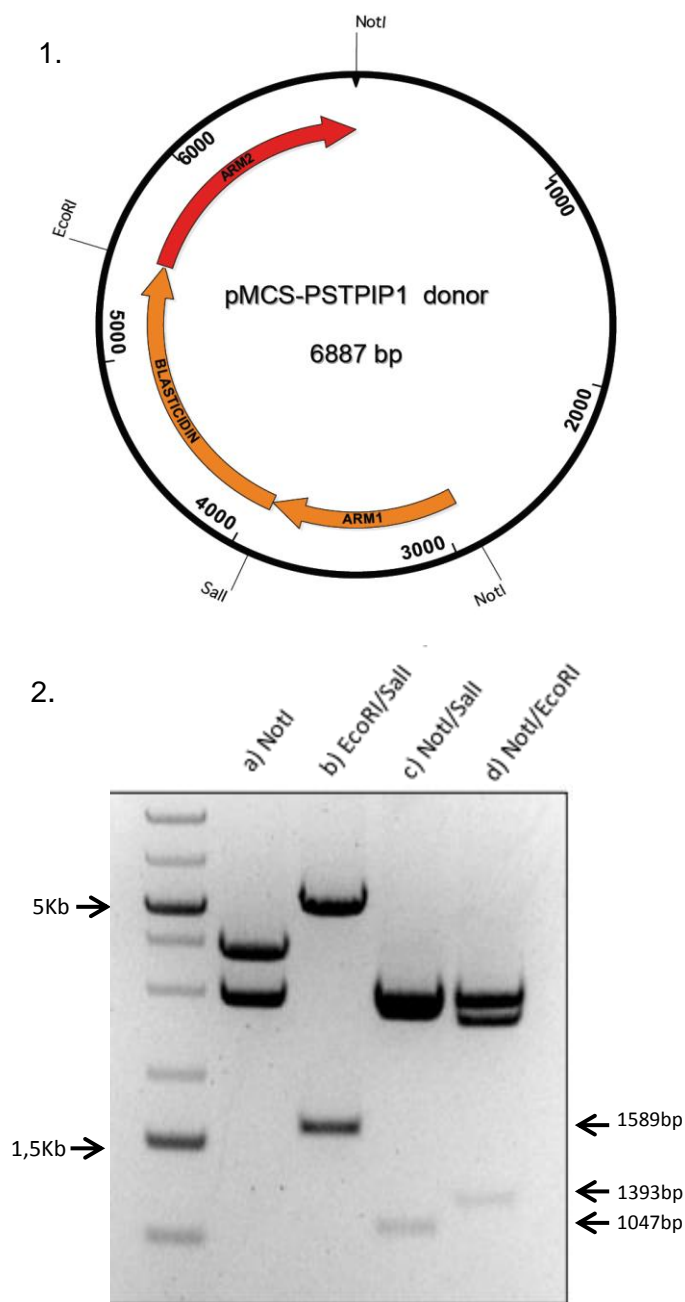
Una vez comprobada la correcta construcción de los plásmidos pBluescript-Arm1 y pBluescript-Arm2, se llevó a cabo la mutagénesis dirigida, es decir, la inducción de las mutaciones puntuales descritas anteriormente en los brazos amplificados y ligados. Este proceso requiere la construcción de primers que contengan la mutación a inducir en el DNA (tabla 4 material y métodos).

Con el fin de verificar la eficacia de la mutagénesis, los plásmidos fueron secuenciados, y descubrimos que solamente una de las dos mutagénesis había funcionado correctamente, la correspondiente al exón 11 (mutación E250Q). Dado el escaso tiempo del que disponíamos, decidimos continuar el trabajo con esta mutación únicamente.

El vector donante final debía estar compuesto por: el Arm1 no mutado, el Arm2 mutado obtenido anteriormente, y un cassette de resistencia a antibiótico (blasticidina) necesario para la selección de células que incorporaran el plásmido. Estos componentes se sometieron junto con el vector de clonación MCS a una cuádruple ligación, la cual se llevó a cabo de la siguiente manera:

- El vector MCS se encuentra digerido con la enzima de restricción NotI, y tratado con fosfatasa para impedir su religación.
- Se llevó a cabo la digestión del Arm1 con las enzimas NotI, y Sall.
- El cassette de resistencia a blasticidina se digirió con Sall y EcoRI,
- Por último el Arm 2 se digirió con las enzimas EcoRI y NotI.

Al llevar a cabo la cuádruple ligación se produciría un vector MCS-A1-Blasticidina-A2, dado que al digerir los componentes hemos creados extremos cohesivos entre las partes de manera que sólo puedan ligarse en ese orden, y crear así un vector con homología al gen diana. Además este procedimiento nos permitió realizar una comprobación muy sencilla de la eficacia de la ligación, haciendo digestiones simples y dobles digestiones con las enzimas NotI, Sall y EcoRI, y analizando los tamaños de las bandas obtenidas mediante un gel de agarosa (Fig.8).



**Figura 8. Estructura del vector donante MCS-A1-Blasticidina-A2, y comprobación de su correcta construcción.**

1. Representación gráfica de la estructura del vector donante tras la cuádruple ligación. En ella están marcados los sitios de restricción necesarios tanto para la ligación como para la comprobación de la misma.

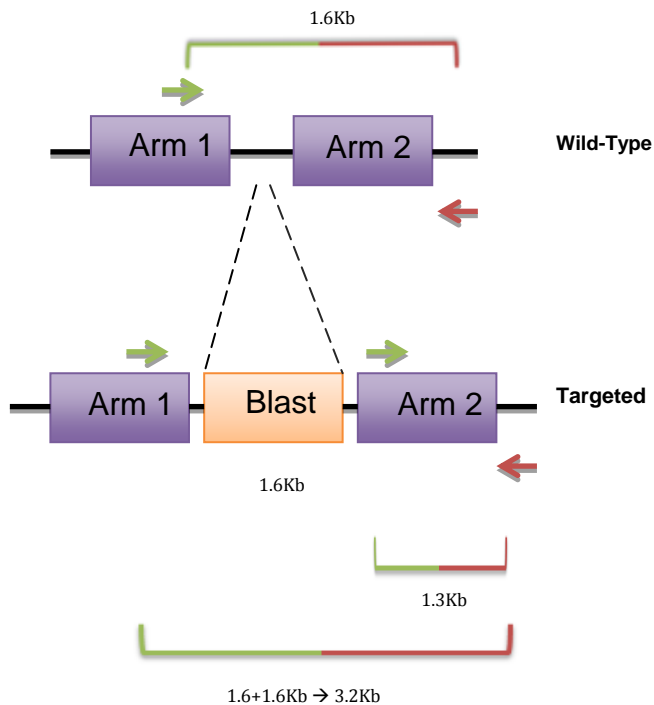
2. Comprobación de la cuádruple ligación del vector donante. a) La primera digestión con NotI muestra las bandas correspondientes al vector MCS (3Kb) y al constructo A1-Bsd-A2 (4Kb). b) La doble digestión EcoRI/SalI muestra bandas de 5Kb (A2-MCS-A1) y una de 1,6Kb (cassette de Blasticidina). c) La digestión NotI/SalI libera por un lado el vector MCS (3Kb) y además separa A1 (1Kb) del constructo A2-Bsd (3Kb). De ahí que parezca que sólo hay una banda en 3Kb, habiendo en realidad dos bandas. d) Por último la digestión NotI/EcoRI libera el vector MCS (3Kb), y el Arm 2 (1,4Kb) del constructo A1-Bsd (2,6Kb).

## 2. Selección de células positivas.

Los dos vectores construidos fueron nucleofectados en las células THP-1. Seguidamente y durante las tres semanas siguientes, las células fueron tratadas con el antibiótico blasticidina, con el fin de seleccionar aquéllas que poseyeran el vector con el cassette de resistencia.

A causa de un problema de contaminación de la placa, el experimento no pudo seguir adelante. Sin embargo, se podían observar clones de células vivas que podrían haber sido analizadas de no ser por esta contaminación.

En cualquier caso el siguiente paso habría consistido en extraer el DNA de los pocillos con clones vivos de células, y realizar PCRs para comprobar que efectivamente, los brazos de homología se habían insertado en el genoma de la célula por recombinación homóloga (fig.9).



**Figura 9. Esquema del locus de una célula wild-type frente al de una célula modificada con el vector donante (targeted).** Las flechas señalan la situación de los primers diseñados para la selección de clones positivos. En rojo, el primer externo, y en verde, el interno, que se encuentra tanto en el Arm 1 del wild-type y del alelo modificado, como en el Arm 2 del alelo modificado. Las bandas amplificadas en el wild-type serán de un tamaño de 1,6Kb en ambos alelos, mientras que en células que hayan insertado el vector donante, aparecerán además de la banda de 1,6Kb correspondiente al alelo sin modificar, otra banda de 1,6Kb+1,6Kb correspondiente a cassette de blastocidina del alelo modificado, es decir, 3,2Kb. Además aparecerá otra banda de 1,3Kb correspondiente al lugar de amplificación insertado en el brazo 2 del alelo modificado.

Una vez localizados los pocillos con clones positivos para el gen mutado, se habría realizado una dilución límite. Dicha técnica se basa en la realización de sucesivas diluciones de la suspensión celular hasta obtener una célula o menos por pocillo, de tal manera que se aíslan aquellos clones positivos para el vector donante de aquellos que no.

Al ser una mutación dominante negativa, simplemente con poseer la mutación en uno de sus alelos, el fenotipo sería óptimo para estudiar esas células como modelo celular de la enfermedad que buscábamos.

# Discusión

El desarrollo de herramientas sencillas de manipulación génica ha permitido aumentar el conocimiento frente a ciertas enfermedades humanas, facilitando la labor de su estudio mediante modelos animales o celulares. Aunque en primera instancia se recurre a modelos animales para el estudio in vivo, en muchas ocasiones la función proteica varía de una especie a otra.

En el trabajo realizado, el objetivo de construir un modelo del síndrome PAPA en células humanas viene determinado por un intento fallido de generar un ratón que padeciera esta misma enfermedad. El modelo animal, knock-out para la proteína PSTPIP-1, no dio el fenotipo esperado, no presentando síntomas de inflamación dérmica como aquellos encontrados en los pacientes con el síndrome (*Wang et al, 2013*).

Para la realización del modelo celular de la enfermedad utilizamos la línea monocítica humana THP-1. Esta línea, que proviene de un paciente con leucemia monocítica aguda, es utilizada frecuentemente para la investigación de enfermedades autoinflamatorias humanas, dado que sintetiza mayor cantidad de algunas proteínas que componen el inflammasoma que otros tipos celulares humanos (entre ellas pro-Caspasa 1).

Por ello el siguiente paso de estudio de la enfermedad utilizando este modelo celular, podría ser el análisis del inflammasoma. Si recordamos, la proteína PSTPIP1 mutada secuestra de forma permanente a la pirina/marenostrina, impidiendo la regulación negativa del inflammasoma y provocando la secreción descontrolada de IL-1 $\beta$ . La maduración de IL-1 $\beta$  a su vez corre a cargo de la Caspasa-1. Una manera sencilla de analizar la actividad funcional del inflammasoma sería realizar un ELISA del sobrenadante de células mutadas para ver la cantidad de IL-1 $\beta$  madura, y seguidamente un Western-Blot de los lisados que proporcionara información acerca de la presencia de IL-1 $\beta$  y Caspasa-1 activas. Ambos ensayos mostrarían la existencia y la cantidad aproximada de IL-1 $\beta$  activa en células mutadas respecto a un control negativo wild-type.

De igual modo, aunque no se haya relacionado su implicación en la enfermedad, con este modelo celular se podría averiguar más acerca de la función que lleva a cabo la proteína PSTPIP1 en la regulación del citoesqueleto de actina. Para ello podría inducirse la diferenciación de los monocitos mutados a macrófagos, utilizando un compuesto denominado forbol miristato (PMA) (*Takashiba et al, 1999*). Este tipo celular permitiría medir la capacidad de migración, y la formación de podosomas en mutantes para el gen *CD2BP1*.

Para completar el estudio acerca de la proteína podrían llevarse a cabo en el modelo celular ensayos de fosforilación ya que, como se ha explicado antes, el secuestro de pirina por PSTPIP1 es consecuencia de una hiperfosforilación de la proteína mutada a causa de la imposibilidad de la fosfatasa PEST de unirse a ella y por tanto, defosforilarla. En la misma línea podrían realizarse ensayos para determinar cómo las mutaciones de la proteína afectan a la interacción con otras proteínas, como son la propia pirina, o la proteína WASp (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*), relacionada también con el citoesqueleto de actina.



Así pues, la obtención de modelos celulares que se corresponden con enfermedades genéticas humanas nos proporciona información acerca de los efectos a nivel basal de las mutaciones encontradas en los pacientes, permitiendo un estudio más exhaustivo de la función proteica y de las consecuencias a pequeña escala de la enfermedad.

En última instancia esto puede conducir a la resolución de manera más concreta y efectiva de los síntomas que provoca la mutación, paliando sus efectos negativos desde la base.

# Conclusiones

Las conclusiones que se derivan de nuestro trabajo son:

- Se han construido con éxito dos vectores de expresión de nucleasas CRISPR tipo *nickasas*, específicas de la proteína PSTPIP1.
- Se ha construido un vector donante que contiene una de las mutaciones (E250Q) que causa el síndrome PAPA en humanos para introducir la mutación deseada en células monocíticas humanas (línea celular THP-1).
- Se han transfectado los tres plásmidos (vector donante, y una pareja de *nickasas*) en la línea celular de estirpe monocítica THP-1 mediante nucleofección, y se ha observado crecimiento de células resistentes a blasticidina dos semanas después de la transfección.
- Aunque no hayamos podido concluir el experimento debido a una contaminación de la placa, la observación de los clones resistentes al antibiótico sugiere el éxito de la nucleofección. Actualmente se está repitiendo el experimento con los mismos reactivos y se espera contar con el modelo celular planteado como objetivo en un futuro próximo.

# **Bibliografía**

Aróstegui, J.I. Enfermedades autoinflamatorias sistémicas hereditarias. *Reumatol. Clin.* 2011; 7(1):45–50.

Aróstegui, J.I., Yagüe, J. Enfermedades autoinflamatorias sistémicas hereditarias. Parte II: síndromes periódicos asociados a criopirina, granulomatosis sistémicas pediátricas y síndrome PAPA. *Med Clin (Barc)* 2008; 130(11):429-38

Bassett, A.R, Liu, J-L. CRISPR/Cas9 and Genome Editing in Drosophila. *J. Genet. Genomics* 2013; 41:7–19.

Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatil Small RNAs for Adaptative Defense and Regulation. *Annual Review of Genetics* 2011; 45:273-297.

Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., Voytas, D.F. Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics* 2010; 186(2):757–761.

Demidowich, A.P., Freeman, A. F., Kuhns, D. B., Aksentijevich, I., Gallin, J. I., Turner, M. L., Kastner, D. L., Holland, S. M. Genotype, Phenotype and Clinical Course in Five Patients with PAPA Syndrome (Pyogenic Arthritis, Pyoderma Gangrenosum and Acne). *Arthritis Rheum.* 2012; 64(6):2022-2027.

Elinav, E., Henao-Mejia, J., Flavell, R.A. Integrative inflammasome activity in the regulation of intestinal mucosal immune responses. *Mucosal Immunology* 2013; 6:4–13.

Gaj T, Gersbach CA, Barbas III CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology* 2013; 31:397-405.

Mani, M., Kandavelou, K., Dy, F.J., Durai, S., Chandrasegaran, S. Design, engineering, and characterization of zinc finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 335(2):447-457.

Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F.(2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 2013; 8:2281–2308.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C-Y, Gootenberg, J.S., Konnermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., Zhang, F. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell* 2013; 154:1380–1389.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 2004. 73:39–85.

Smith, E. J., Allantaz, F., Bennett, L., Zhang, D., Gao, X., Wood, G., Kastner, D. L., Punaro, M., Aksentijevich, I., Pascual, V., Wise, C. A. Clinical, Molecular, and Genetic Characteristics of PAPA Syndrome: A Review. *Curr. Gen.* 2010; 11:519-527.

Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research* 2008; 18:134-147.

Takashiba, S., Van Dyke, T. E., Amar, S., Murayama, Y., Soskolne, A.W., Shapira, L. Differentiation of Monocytes to Macrophages Primes Cells for Lipopolysaccharide Stimulation via Accumulation of Cytoplasmic Nuclear Factor  $\kappa$ B. *Infect Immun.* 1999; 67(11):5573–5578.

Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, Wilson JH. Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:8403–8410.

Wang, D., Höing, S., Patterson, H.C., Ahmad, U.M., Rathinam, V.A., Rajewsky, K., Fitzgerald, K. A., Golenblock, D.T. Inflammation in Mice Ectopically Expressing Human Pyogenic Arthritis, Pyoderma Gangrenosum, and Acne (PAPA) Syndrome-associated PSTPIP1 A230T Mutant Proteins. *J. Biol. Chem.* 2013; 288:4594-4601.

Wise, C.A., Gillium, J.D., Seidman, C.E., Lindor, N.M., Veile, R., Bashiardes, S., Lovett, M. Mutations in CD2BP1 disrupt binding to PTP PEST and are responsible for PAPA syndrome, an autoinflammatory. *Hum. Mol. Genet.* 2002; 11:961-969.

Zeeli, T., Padalon-Brauch, G., Ellenbogen, E., Gat, A., Sarig, O., Sprecher, E. Pyoderma gangrenosum, acne and ulcerative colitis in a patient with a novel mutation in the PSTPIP1 gene. *Clin Exp Dermatol* 2015; 40(4):367-372.