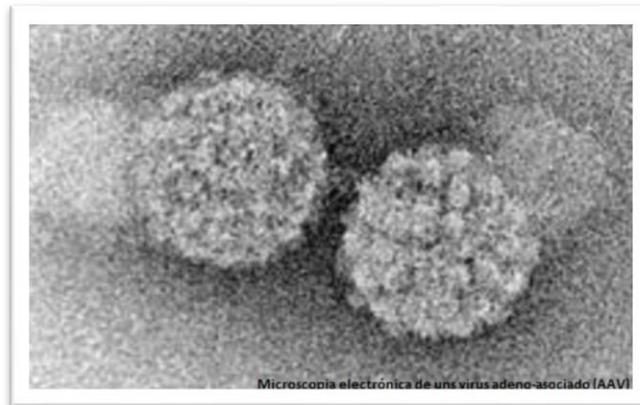


MÉTODOS
DE
GENE TARGETING
EN
CÉLULAS HUMANAS



MEMORIA DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
PRESENTADA POR MARÍA ALEJANDRA BERNARDI

Tutor: Miguel Ángel de la Fuente García

Valladolid, Julio de 2012

INDICE

Introducción	3
Los virus adenoasociados (AAV)	4
Proteínas de fusión. Cre recombinasa y ScRad52	7
Cre recombinasa	8
ScRad52	9
Materiales y métodos	11
Diseño del vector AAV2-ATOH1-GFP	11
Obtención de los rAAV	12
Cuantificación del título viral	14
Infección de células HCT116	14
Construcción de un plásmido para la obtención de proteínas de fusión: Cre recombinasa y ScRad52	15
Expresión y purificación de Cre recombinasa y ScRad52	15
SDS/PAGE y Western Blot	16
Prueba funcional de Cre recombinasa	17
Prueba funcional de ScRad52	17
Resultados	18
Generación de células HCT116 ATOH1-GFP mediante gene targeting	18
Producción de proteínas de fusión. Cre recombinasa y ScRad52	21
Ensayos funcionales in vitro e in vivo de las proteínas de fusión obtenidas:	
Cre recombinasa	23
ScRad52	24
Discusión	25
Conclusión	27
Bibliografía	28

INTRODUCCIÓN

La terapia génica es la introducción de genes en la célula, con fines terapéuticos. Puede ser llevada a cabo a través de inserción génica (donde se introduce una versión normal del gen defectuoso, sin modificar el gen endógeno), modificación génica (donde el gen defectuoso es normalizado por mutagénesis dirigida), o mediante sustitución génica (donde el gen defectuoso es sustituido por su versión normal mediante recombinación homóloga). Para ello, son utilizados vectores que introducen el material genético en las células, los cuales pueden provenir de virus modificados (vectores virales) o pueden ser formulaciones fisicoquímicas (vectores no virales). Las propiedades de un vector ideal pueden variar en función de las necesidades concretas pero, en cualquier caso, éstas condicionarán enormemente el éxito del proceso. Actualmente no se dispone del vector ideal que pueda ser tan versátil como para adaptarse a las numerosas situaciones tanto clínicas como experimentales, sin embargo, existe un amplio abanico de vectores que pueden ser utilizados en transferencia génica. Por un lado, existen numerosos métodos de transferencia génica basados en vectores no virales (métodos químicos: liposomas, calcio, DEAE-dextran, y métodos físicos: electroporación, micro-inyección, biolística), que permiten transferir moléculas de gran tamaño pero que tienen la desventaja de una baja frecuencia de transferencia, y de ser poco específicos. Cabe destacar el desarrollo, durante los últimos años, de una técnica basada en la enzima meganucleasa, la cual es capaz de reconocer largas secuencias de DNA y realizar cortes específicos, los cuales posteriormente, promoverán el gene targeting mediante recombinación homóloga. Por otro lado, se encuentran los vectores virales: Retrovirus, Adenovirus, Lentivirus, Virus adeno-asociados y Herpes Simplex Virus. Con excepción de los virus adeno-asociados, que se integran específicamente en el cromosoma 19, y del Herpes Simplex Virus, que no se inserta en el genoma, los demás tienen la desventaja tanto, de insertarse al azar en el genoma del huésped, como también la capacidad de insertar varias copias del mismo. A consecuencia de esto pueden aparecer mutaciones en el genoma que lleven a la transformación maligna de ciertas células o a la muerte celular. Todo esto podría evitarse mediante manipulación génica dirigida, también llamada gene targeting (GT). El gene targeting se desarrolla a través del proceso de recombinación homóloga (HR), según el cual el vector, sólo al encontrar su secuencia homóloga en el gen diana, induce la recombinación. Las ventajas del GT, sobre los métodos que adicionan genes, son: A) capacidad de modificar secuencias específicas, B) se preserva la regulación transcripcional del gen, y C) disminuyen los riesgos de mutagénesis de inserción y de activación de oncogenes debido a integración aleatoria. Sin embargo, este proceso de recombinación homóloga tiene un gran problema, y es la baja frecuencia con la que ocurre en los mamíferos, particularmente en humanos, en comparación con otras especies.¹ En este trabajo nos hemos planteado como objetivo aumentar la frecuencia de gene targeting, utilizando diferentes condiciones que favorezcan la HR. Dentro de estas condiciones se encuentran el uso de virus adenoasociados recombinantes (rAAV), la expresión de proteínas que aumentan la

frecuencia de HR, y la reducción en la expresión de proteínas que intervienen en la vía de reparación del DNA por la vía de la recombinación no-homóloga (NHEJ).

Los virus adenoasociados (AAV).

Los virus adeno-asociados (AAV) se encuentran actualmente entre los vectores virales más utilizados en terapia génica. Al día de hoy se conocen, 12 serotipos humanos de AAV y más de 100 no humanos. Históricamente, los AAV no han sido de gran interés médico debido a que no se han asociado a patogenicidad. Es por esto, por su persistencia, y por la cantidad de serotipos diferentes que ha aumentado el potencial de estos virus para su utilización en terapia génica.

Los virus adeno-asociados son virus pequeños, sin envoltura que contienen en su genoma, una cadena de DNA sencilla y lineal. Pertenecen a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus*, debido a que la infección por AAV ocurre sólo en presencia de un virus helper, ya sea un adenovirus o un virus herpes. En ausencia de este virus helper, AAV2 puede establecer latencia integrándose en el cromosoma 19.²

El genoma del AAV2 es lineal, compuesto por una cadena sencilla de DNA de 4.7 kb y se caracteriza por poseer secuencias invertidas de 145 pares de bases, denominadas ITRs (Inverted Terminal Repeats, regiones terminales invertidas). Los primeros 125 nucleótidos de cada una de las ITRs son palíndromos que se pliegan sobre sí mismos para maximizar el apareamiento de bases, y forman así una estructura de horquilla en forma de T. Las restantes 20 bases, conocidas como la secuencia D, se mantienen sin aparearse. En ITR se origina la replicación, y sirve como cebador para la síntesis de una segunda cadena de DNA, mediante una DNA-polimerasa. La ITR es también esencial para el empaquetamiento del genoma viral, su transcripción, su regulación negativa en condiciones adversas y su integración sitio-específica. Entre ambas ITRs se encuentran dos secuencias ORFs (Open Reading Frames, marco de lectura abierta). Uno de los ORF, contiene el gen Rep. Este gen produce cuatro proteínas: Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40. Rep78 y Rep68 son producidas a partir del mismo transcrito, el cual puede o no sufrir splicing, al igual que ocurre con Rep52 y Rep40. Las dos primeras, son importantes proteínas regulatorias que actúan en *trans* en todas las fases del ciclo de vida del AAV. Mientras que Rep52 y Rep40, están involucradas en la acumulación de cadenas simples de DNA viral utilizadas durante el empaquetamiento de los AAV. Las cuatro proteínas Rep, poseen actividad tanto de helicasa como de ATPasa, y además, Rep78 y Rep68 poseen actividad endonucleasa y tienen la capacidad de unirse a DNA en un sitio específico. El otro ORF, contiene el gen Cap, el cual produce tres proteínas pertenecientes a la cápside del virus: VP1, VP2 y VP3. Las tres son producidas a partir del mismo transcrito, si embargo, para obtener VP2 y VP3, este ha debido de sufrir del proceso de splicing, así mismo, VP2 es producida a partir de un codón de inicio no-conventional: ACG (treonina), mientras que VP3, lo hace a partir del codón codificante para metionina, como es habitual.³

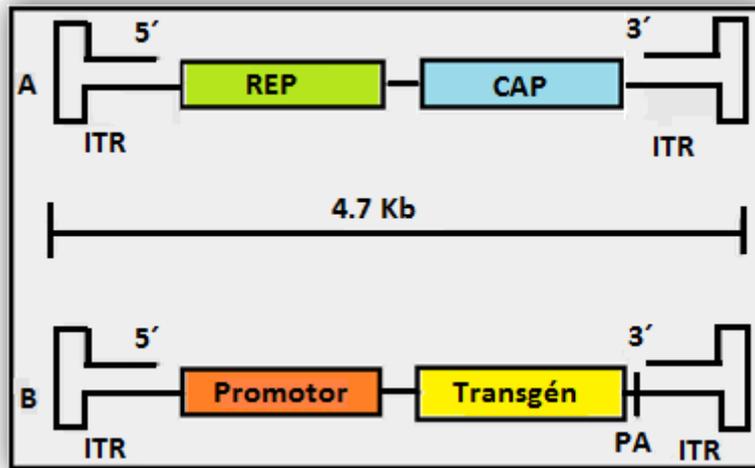


Figura 1: Esquema de un vector rAAV. A) Esquema del vector wild type con los genes originales REP y CAP. B) Esquema del vector recombinante donde se han sustituido los genes originales por un promotor y el transgén a introducir en la célula huésped.

El ciclo de infección de los AAV se basa en los siguientes pasos: fijación a la membrana celular, utilizando receptores y co-receptores propios de la célula y endocitosis en vesículas de clatrina, circulación por el endosoma, liberación del endosoma, migración al núcleo (de manera aun no conocida), formación de la doble hebra de DNA, expresión de los genes REP y replicación, expresión de los genes CAP, síntesis y ensamblaje de partículas víricas completas, y finalmente, liberación de la célula infectada. La replicación de los AAV puede variar según el tipo de célula y según la fase del ciclo celular en la que esta se encuentre.⁴ El ciclo de vida de los AAV, luego de una exitosa infección, puede pasar por dos fases, una fase lítica y una lisogénica. En presencia de un virus helper, predomina el ciclo lítico. Durante este período, el AAV lleva a cabo una infección productiva caracterizada por replicación del genoma, expresión de genes virales y producción de viriones. Los genes adenovirales que constituyen la función helper son, E1a, E1b, E2a, E4 y VA RNA. Mientras que los genes pertenecientes al herpes virus, expresan polimerasa y helicasas, así como también genes involucrados en la fase temprana de la transcripción. Aunque los genes provistos por ambos virus son diferentes, ambos regulan la expresión de genes de la célula proporcionando un medio intracelular permisivo, favorable para una infección productiva. En ausencia de un virus helper, la replicación del AAV es limitada, la expresión génica es reprimida y el genoma puede entrar en una fase de latencia, mediante integración en una región específica de 4 kb en el cromosoma 19, la región AAVS1. Esta región, forma un complejo con AP1, una secuencia de unión que se encuentra en la horquilla del virus, es decir, en las ITRs (en *cis*), y junto con las proteínas Rep68 y Rep78 (en *trans*), una helicasa y una endonucleasa, respectivamente, facilitan la recombinación que permite llevar a cabo de manera eficiente, la integración del virus al genoma del huésped.⁵ Sin embargo, debido a la delección del gen Rep, los AAV recombinantes (rAAV) no se integran específicamente en el sitio AAVS1. Por ello, la persistencia del rAAV ha sido atribuida, tanto a la integración

aleatoria, como a la episomal. Se ha demostrado la existencia de genomas de rAAV circulares en músculo, y su persistencia episomal ha sido correlacionada con la expresión del transgén a largo plazo. Estos genomas circulares parecen originarse a través de una circularización monomérica, proceso que lleva a la formación de genomas circulares que se unen cabeza con cola. Sin embargo con el tiempo, disminuyen los monómeros circulares intermedios en favor estructuras circulares de alto peso molecular, denominados concatámeros.⁶

Los virus adeno-asociados recombinantes pueden introducir cambios en secuencias definidas, con elevada fidelidad. Mutaciones puntuales, inserciones, deleciones e inserciones de marcadores de selección han sido introducidos en diversos tipos de células humanas. Así mismo, los AAV han sido utilizados con gran eficacia para modificaciones génicas en células humanas tales como, fibroblastos, queratinocitos, células madres pluripotentes inducidas, entre otras. Recientemente, estos vectores virales también se han utilizado para introducir nuevos epítomos (TAGS) en una amplia variedad de líneas celulares, permitiendo así el estudio de proteínas cuando son expresadas en su ubicación cromosómica original. Las posibilidades de que una célula se lleven a cabo una inserción aleatoria junto con una inserción específica, es mínima cuando se utilizan vectores AAV.⁷ A pesar de todo, es aún desconocido el mecanismo por el cual los virus adeno-asociados inducen modificación génica dirigida o gene targeting en las células hospederas.

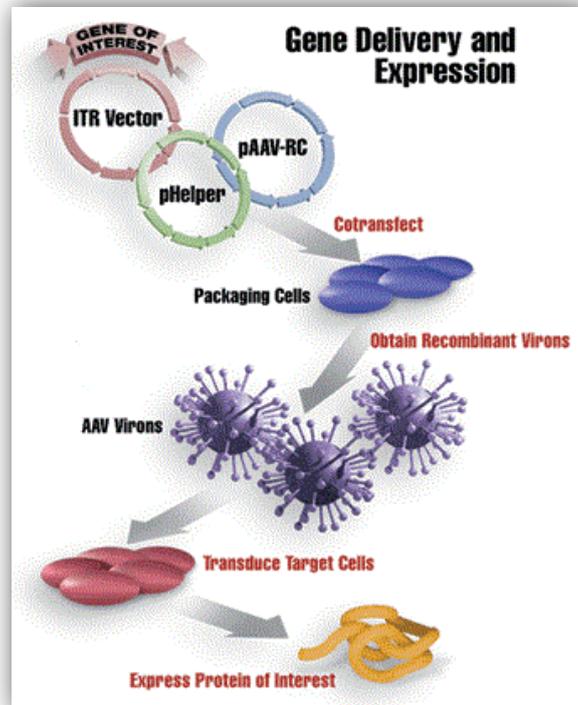


Figura 2: Esquema de la infección con un vector rAAV y posterior expresión en un determinado tipo celular. Se transfectan los plásmidos: pMCS (con el gen de interés), pHelper y p-RC en las células empaquetadoras. Se obtienen así, los virus recombinantes que luego son utilizados para infectar las células target, y obtener de esta manera, la expresión de la proteína de interés.

En nuestro caso particular, sintetizaremos un vector rAAV2 cuyos brazos de homología se corresponden con el gen ATOH1 y en el cual insertaremos una secuencia correspondiente a la proteína fluorescente verde GFP. ATOH1 es un gen que codifica para una proteína denominada, en inglés Protein atonal homolog 1, de allí sus siglas Atoh1. Esta proteína pertenece a una familia de factores de transcripción⁸, y se ha demostrado que es esencial para la formación de las neuronas granulares del cerebelo, células ciliadas del oído interno, interneuronas de la médula espinal, células de Merkel de la piel y células secretoras intestinales. Atoh también ha sido implicado en algunos cánceres del cerebro, incluyendo el meduloblastoma, el tumor pediátrico más común del sistema nervioso.⁹

Proteínas de fusión. Cre recombinasa y ScRad52.

Las proteínas de fusión son proteínas híbridas elaboradas a partir de un gen de fusión que se crea al unir partes de dos o más genes diferentes. Estas pueden presentarse de manera natural en el cuerpo, como por ejemplo el gen BCR-ABL, que causa ciertos tipos de leucemia, o pueden producirse en el laboratorio combinando diferentes genes o partes de genes, ya sean éstos del mismo organismo o de organismos diferentes.

Parte del trabajo realizado en esta etapa se basó en construir y expresar dos proteínas de fusión, 6HIS-TAT-NLS-Cre y 6HIS-TAT-NLS-ScRad52.

Tanto Cre, como ScRad52, fueron construidas de manera similar mediante la adición de tres segmentos funcionales: His-Tag, TAT y NLS.

La secuencia His-Tag, es una secuencia simple que codifica para, al menos, cinco residuos de histidinas que estarán presentes en la proteína de fusión. El número final de His presentes en la proteína de fusión puede variar, y en nuestro caso será de seis. La presencia de esta cola de histidinas permite que la proteína pueda ser reconocida por un anticuerpo dirigido contra ella pero, principalmente permite la posterior purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a níquel. El níquel se une a través de sus enlaces a las colas de histidinas presentes en las cadenas polipeptídicas, lo que permite la separación de las proteínas de interés, de las restantes proteínas no deseadas del lisado bacteriano.

En 1988 Green y Frankel descubrieron, de manera independiente, que la proteína TAT del HIV es capaz de cruzar la membrana celular. En 1994, Fawell et al. demostraron que existe un dominio de 36 aminoácidos de esta proteína que se entrelaza químicamente con proteínas heterólogas, lo que le confiere la habilidad de introducir estas proteínas externas dentro de la célula.¹⁰ TAT penetra la membrana plasmática desde la superficie celular. El segmento responsable de la penetración a través de la membrana (el PTD, el dominio de transducción de proteína), es un segmento de entre 11 y 34 aminoácidos, rico en aminoácidos básicos (argininas y lisinas), los cuales se cree que están involucradas en el contacto con las cargas negativas de los lípidos y en la penetración a través de la membrana. Los PTDs también sirven como elementos trans que facilitan la penetración de proteínas heterogéneas y oligonucleótidos. Por lo

tanto, el rol más importante de los PTDs parece ser la desestabilización de la bicapa lipídica.¹¹

La señal de localización nuclear (NLS, Nuclear Localization Signal) es una secuencia de aminoácidos que marcan una proteína para su importación al núcleo celular. Típicamente, esta señal se compone de una o más secuencias cortas de lisinas o argininas cargadas positivamente, expuestas en la superficie de la proteína. Diferentes proteínas pueden compartir la misma NLS.

Cre recombinasa.

Proveniente del bacteriófago P1, Cre es una recombinasa sitio-específico de 38 kDa capaz de reconocer y recombinar el sitio loxP.¹² Este sitio posee 34 pares de bases de las cuales, 13 son repeticiones invertidas en cada uno de los extremos, que son quienes le dan la especificidad, y las restantes 8 se encuentran en el centro. LoxP puede ser reconocido tanto en CIS como en TRANS, y el proceso puede ocurrir, tanto in vivo como in vitro. Tras la unión a las repeticiones invertidas, Cre escinde el DNA en la región espaciadora para iniciar la recombinación homóloga con otro sitio loxP. No son necesarios factores adicionales para la recombinación.¹³

La recombinasa sitio-específico Cre puede ser utilizada para recombinar alelos loxP, modificados bajo control temporal y espacial. La recombinación es llevada a cabo con elevada eficiencia y depende de la concentración de la proteína y del tiempo en que esta se utilice. En cultivos celulares, la recombinación mediada por Cre se encuentra limitada por la toxicidad de la propia proteína y por la eficiencia de la transfección, siendo este último el principal factor limitante del uso del sistema Cre/loxP. Esta limitación ha sido reducida mediante la adición de las secuencias TAT, que facilita el paso de la proteína a través de la membrana citoplasmática y, NLS, que facilita la translocación al interior nuclear, donde la proteína debe ejercer su función.¹⁴

Como se ha mencionado anteriormente, los sitios loxP representan los sitios de reconocimiento por parte de Cre y pueden ser utilizados para eliminar el segmento génico que se sitúa entre ambos. Para ello, dos monómeros de Cre se unen cada uno, a un sitio de sinapsis y recombinación del DNA a través de interacciones proteína-proteína. Durante la escisión, la Tyr324 de la Cre se une covalentemente al fosfato 3', mientras que el grupo hidroxilo liberado en 5' ataca a las fosfotirosinas de los sustratos asociados. Con una segunda escisión y el intercambio de cadenas, se completa el proceso de recombinación.¹⁵

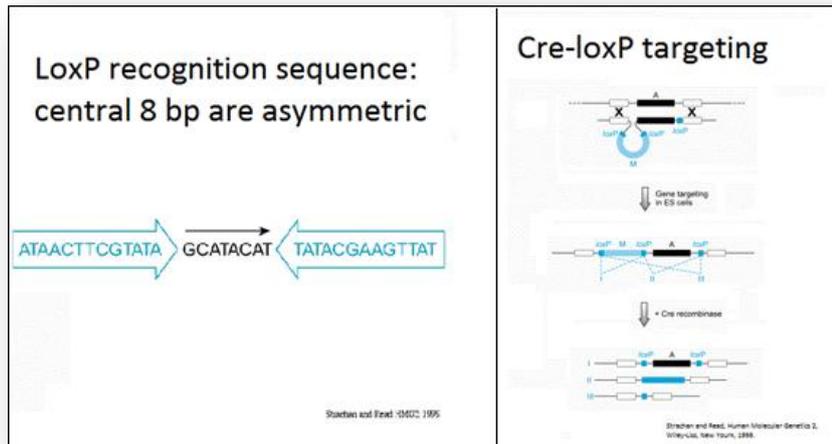


Figura 3: Sistema Cre-loxP. En la mitad izquierda de la figura se puede ver el sitio de reconocimiento de la enzima Cre recombinasa: el loxP, secuencia de 34 pares de bases, de las cuales las 13 iniciales y las 13 finales son repeticiones invertidas, mientras que las 8 intermedias son asimétricas. En la mitad derecha podemos ver la función de la Cre como recombinasa y, según los loxP que existan en la secuencia, los resultados obtenidos.

ScRad52.

El gen RAD52 codifica para una proteína que se ha demostrado importante en el proceso de reparación de roturas del DNA mediante recombinación homóloga. La proteína Rad52 une, preferentemente, DNA de cadena sencilla y promueve la hibridación con su hebra complementaria. En presencia de RPA (proteína de replicación A), esta proteína es capaz de unir grandes moléculas, mientras que no es necesaria la presencia de RPA para unir pequeñas moléculas u oligonucleótidos. RPA cumple un rol esencial en la replicación del DNA, mediante la remoción de estructuras secundarias en el DNA de cadena sencilla para permitir así, la acción de las proteínas Rad. Por sí sola RPA inhibe la hibridación, lo cual es superado en presencia de Rad52, quien interactúa no sólo con ésta, a través de su extremo N-terminal, sino también con Rad51, con la cual lo hace a través de su extremo C-terminal. Rad51 forma filamentos helicoidales, estimulada por RPA, uniéndose con gran afinidad a los extremos de cadena simple ricos en GT del DNA de doble cadena. Una vez montado el filamento nucleoproteico y en presencia de Rad52, Rad51 es capaz de interactuar con una segunda molécula de DNA, ya sea de doble o simple hebra, e iniciar así el intercambio de cadenas, facilitado por la helicasa Rad54 entre otras proteínas.¹⁶

La proteína humana de Rad52, HsRad52, es heptamérica y forma una estructura anular que, sin embargo, comparte muy poca homología con la proteína presente en *Saccharomyces cerevisiae* (ScRad52). Uno de los residuos identificados como más importante para la unión del DNA, es una arginina, cuya posición depende de la especie de la cual provenga la proteína, pero cuya importancia en la función de ésta ha quedado demostrada in vivo.

Las diferencias estructurales entre HsRad52 y ScRad52, pueden explicar el hecho de que la proteína de levadura favorezca más la recombinación homóloga que la proteína humana. Esta propiedad puede ser utilizada para superar las limitaciones que se presentan en terapia génica, en cuanto a la baja frecuencia de recombinación homóloga en células humanas, ya que mediante la sobreexpresión de ScRad52 en dichas células, esta frecuencia podría verse considerablemente incrementada, lo que representa un efecto remarcable, particularmente comparado con el pequeño aumento obtenido mediante la sobreexpresión de otras proteínas de la familia, como por ejemplo HsRad51. Así mismo, ScRad52 posee una mayor afinidad por las hebras de DNA simple que la proteína humana y, por ende, es más eficiente a la hora de promover el intercambio de cadenas.¹⁷ ScRad52 parece ser entonces, un factor esencial para la recombinación homóloga ya que puede promover el intercambio de cadenas de DNA, de manera dependiente o independiente de la proteína Rad51.

El importante incremento en la frecuencia de recombinación homóloga inducido por ScRad52, junto con la reducción de la vía no-homóloga de reparación del DNA, se corresponde con la idea de que ambas vías de reparación son alternativas y competitivas entre sí. Se ha visto que en cepas de levaduras con mutaciones en los genes RAD52, en los cuales la proteína es nula, la vía de la recombinación homóloga es defectiva y, por lo tanto, estas acumulan mutaciones y aberraciones, además de mostrar una incrementada sensibilidad a los agentes que dañan el DNA. A su vez, ScRad52 también podría unirse a Ku, un complejo implicado en la unión temprana a roturas del DNA y en la vía de la recombinación no-homóloga, explicando así la disminución de las inserciones al azar.¹⁸

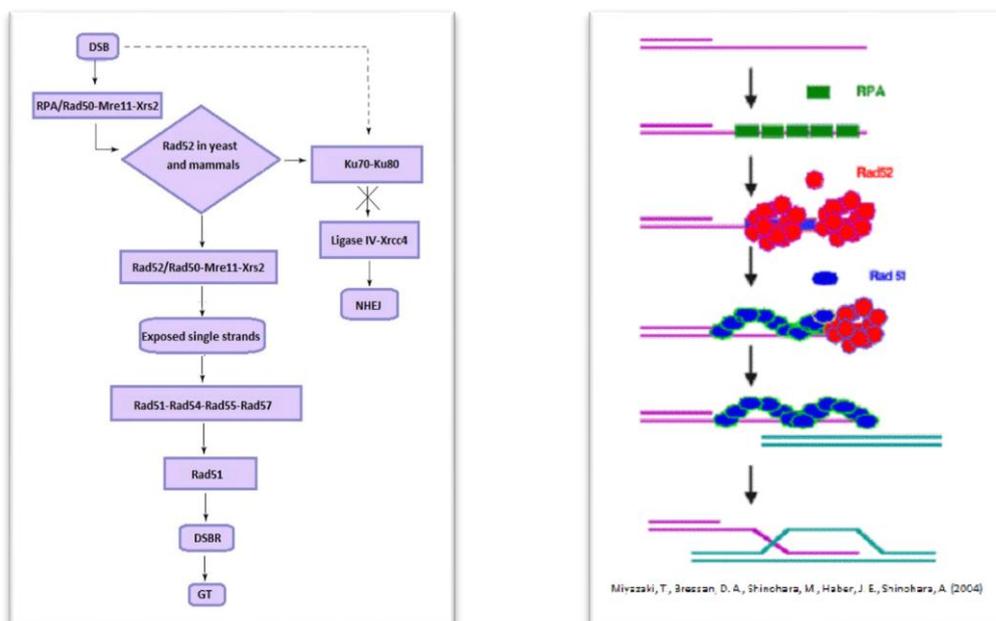


Figura 4: En la figura de la izquierda, se ve qué sucede cuando existe una ruptura de la doble cadena (DSB: Double Strand Break), si se repara por gene targeting (GT) y recombinación homóloga o, si lo hace por recombinación no-homóloga (NHEJ: Non Homologous End Joining). En la figura de la derecha, podemos ver que cuando se decide por la HR, ésta estará mediada por proteínas como RPA, Rad52, Rad51 y otras proteínas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del vector AAV2-ATOH1-eGFP

El primer paso que hemos llevado a cabo, fue el de extraer DNA genómico de la línea celular HCT116.

Luego, se construyeron los brazos de homología con las secuencias complementarias a las del gen con el cual pretendemos hacer el gene targeting, mediante primers que incorporan sitios de corte para determinados enzimas de restricción. Se obtuvieron así, el brazo de homología 1: NotI-Arm1-Sall, de unos 1200 pares de bases, y el brazo de homología 2: EcoRI-Arm2-NotI, de unos 1100 pares de bases. Se digirieron ambos con los correspondientes enzimas y se purificaron por columnas pertenecientes al kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Se cuantificaron mediante NanoDrop y se guardaron a -20°C hasta su posterior uso.

Por otro lado se amplificó la secuencia GFP con primers específicos, a partir del plásmido p-EGFP-C1, para obtener el fragmento Sall-GFP-XhoI que se ha digerido, purificado y cuantificado como en el caso anterior. Luego, se subclonó el fragmento obtenido en el vector pBS-Blasticidin, previamente digerido con Sall, y se seleccionaron los clones en los que el inserto se introdujo en la orientación deseada. Se liberó, posteriormente, el inserto Sall-GFP-Blasticidin-EcoRI, de unos 2300 pares de bases. El casete de blasticidina, denominado también marcador de selección, permitirá la selección positiva de clonas que hayan integrado el virus.

Una vez obtenidos los cuatro fragmentos se llevó a cabo una cuádruple ligación, utilizando el kit Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (Roche), para obtener el plásmido final: pAAV-MCS (digerido con NotI), NotI-Arm1-Sall, Sall-GFP-Blasticidin-EcoRI y EcoRI-Arm2-NotI. Esta reacción fue utilizada, posteriormente, para transformar bacterias XL10 gold.

Al día siguiente, con las clonas bacterianas obtenidas, se procedió a realizar minipreps y, a continuación, digestiones para verificar si las bacterias habían incorporado el inserto, y si lo habían hecho, para saber si éste se introdujo de la manera correcta. Para esto se utilizó 1 µg de DNA en un volumen final de reacción de 50 µl. Las digestiones realizadas fueron cuatro: una digestión simple con NotI; y otras tres digestiones dobles con las siguientes parejas: NotI/EcoRI, NotI/Sal I y Eco RI/Sal I.

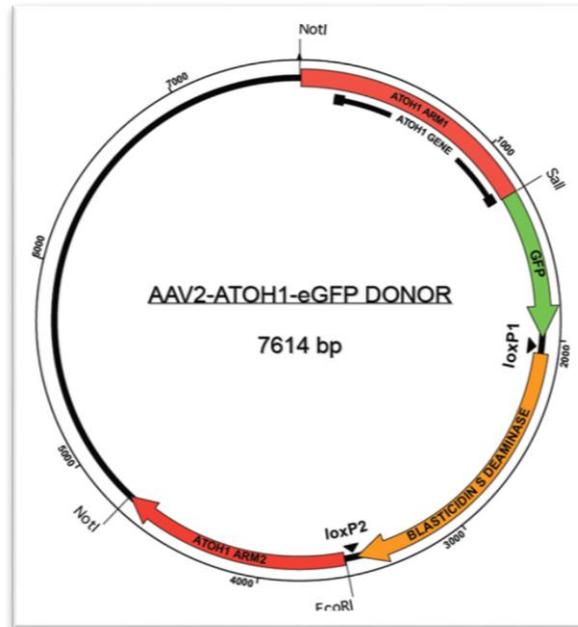


Figura 5: Esquema del vector AAV2-ATOH1-eGFP donador, construido para realizar el GT. Este vector fue construido con el brazo de homología 1 (Arm1), el cual se corresponde con el gen ATOH, se ha añadido la secuencia codificante de la proteína GFP, un casete de resistencia a blastidicina como marcador de selección, flanqueado por dos sitios loxP, y finalmente, el segundo brazo de homología (Arm2).

Obtención de los rAAV

Para la obtención de los virus adeno-asociados recombinantes (rAAV) hemos utilizado células AAV-293, las cuales derivan de la línea celular HEK293, células renales embrionarias humanas, ya que ambas permiten la producción de partículas víricas infecciosas cuando son co-transfectadas con los tres plásmidos necesarios: pAAV-MCS (plásmido que contiene el gen de interés), pAAV-RC (plásmido que aporta los genes REP y CAP) y pHelper (plásmido que contiene el subconjunto de los genes de adenovirus necesarios para la producción de un alto título: VA, E2A y E4). Las proteínas E1A y E1B que también son necesarias para la producción de AAV2, son aportadas por las células AAV-293.

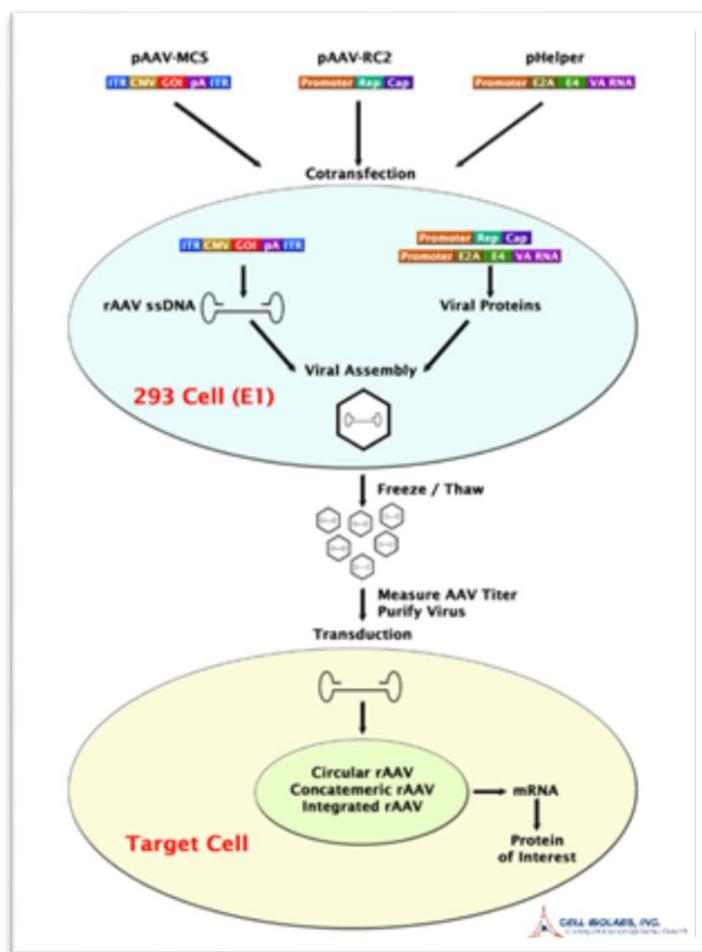


Figura 6: Proceso completo de obtención de rAAV y posterior transducción a células target para obtención de proteínas de interés. El proceso se basa en la transfección de 3 plásmidos que permiten la formación de los rAAV dentro de la célula empaquetadora. Luego, por congelación y descongelación se obtienen las partículas virales, las cuales se cuantifican y se utilizan, posteriormente, para realizar la transducción en las células target para obtener, finalmente, la proteína de interés.

Las células AAV 293 se cultivaron en medio DMEM (Gibco), con suplemento de penicilina- estreptomicina 100 U/ ml-100 µg/ml, glutamina 2 mM y suero bovino fetal (SFB - Invitrogen) a 37°C. Cuarenta y ocho horas antes de realizar la transfección, se sembraron 1×10^6 células en placas cultivo de 10 cm con 15 ml de medio de cultivo sin antibióticos. Las células fueron incubadas durante 48 horas a 37°C y 5% de CO₂, tiempo en el que habitualmente las células alcanzan una confluencia entre 80% y 90%. Media hora antes de la transfección, el medio de cultivo se cambió por 12 ml de DMEM, libre de antibióticos y sin suero fetal bovino. La transfección se realizó empleando la mezcla de liposomas catiónicos Lipofectamine 2000® (Invitrogen), de la siguiente manera: en un tubo estéril de 15 ml se mezclaron los plásmidos AAV-recombinante con los plásmidos AAV-RC y AAV-helper, usando 10 µg de cada uno y se diluyó la mezcla en 1,5 ml de medio de cultivo libre de suero: Opti-MEM®I (Invitrogen). En otro tubo, se diluyeron 90 µg de Lipofectamine 2000® con 1,5 ml de Opti-MEM®I. La mezcla se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se mezclaron las dos soluciones y se incubaron durante 20

minutos a temperatura ambiente, para permitir que los liposomas incorporaran el ADN. Pasados los 20 minutos, la solución DNA-Lipofectamine 2000® se adicionó a los cultivos de células AAV293, mezclando con suavidad, por rotación, para permitir que los complejos se distribuyeran uniformemente. Las células transfectadas se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C. Transcurridas 24 horas de la transfección, el medio se reemplazó con DMEM fresco con antibiótico y se continuó con la incubación en las mismas condiciones descritas durante 48 horas más, momento en el que se retiró el medio de las células y se lavó con 10 ml de PBS. Se pasaron las células mediante raspado de la superficie a tubos que se centrifugaron a 4°C, 1100 rpm y durante 5 minutos. Las células se lisaron mediante cuatro ciclos de congelación/descongelación, incubando durante 10 minutos en baño de hielo seco con etanol, seguido de incubación por otros 10 minutos en baño a 37°C. Finalmente, la suspensión se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante así obtenido, contiene la solución viral primaria, la cual se almacenó a -80°C para su posterior cuantificación.

Cuantificación del título viral

Se realizaron diluciones de los lisados: 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵, para cuantificar mediante PCR a tiempo real el título viral obtenido:

- 10⁻²: 990 µl PBS con 10 µl solución del virus preparado o madre.
- 10⁻³: 900 µl PBS con 100 µl solución 10⁻².
- 10⁻⁴: 900 µl PBS con 100 µl solución 10⁻³.
- 10⁻⁵: 900 µl PBS con 100 µl solución 10⁻⁴.

Para cada una de las diluciones se realizó la reacción por duplicado, utilizando 5 µl de DNA de dilución viral. En paralelo se ha realizado una curva patrón, utilizando diferentes diluciones de un plásmido que contiene ITRs de concentración conocida, para luego inferir según los valores obtenidos en la qPCR, la concentración de cada una de las diluciones de la muestra problema. Esto pudo realizarse debido a que los primers que hemos utilizado se encuentran dentro de las regiones ITRs, lo cual hace factible la comparación ya que estas regiones son las mismas en todos los AAV. Los primers utilizados son: un primer ITR forward (5'-GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3') y un primer ITR reverse (5'-CGGCCTCAGTGAGCGA-3'), con los que se obtiene un amplicón de 62 pares de bases.¹⁹

Infección de células HTC116

Una vez obtenido el título viral se procedió a infectar la línea celular HTC116 (cáncer de colon), con 10³ MOI (*Multiplicity Of Infection*, término que se refiere a la cantidad de partículas virales usadas por célula a infectar). Estas células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos, en medio completo durante las 48 horas previas a la infección a 37°C y 5% de CO₂, tiempo necesario para conseguir una confluencia de entre 70% y 80%.

Unos 20 minutos antes de iniciar la infección se retiró el medio y se añadió 1 ml de Opti-MEM. Transcurrido este tiempo, se separaron 500 µl del mismo, y se añadieron 500 µl de lisado viral, tras lo cual se incubó nuevamente, en las mismas condiciones durante 24 horas, tras las cuales se añadieron 2 ml de medio completo. El siguiente paso fue, tripsinizar las células para pasarlas a una placa de 96 pocillos, a cada uno de los cuales se añadieron 200 µl de DMEM con una concentración de blasticidina de 10 µg/ml, para permitir la selección de aquellas clonas resistentes a dicho antibiótico. Una vez que se observa que las clonas están lo suficientemente crecidas, se procede a la extracción de su DNA, con el cual se llevan a cabo las correspondientes PCRs con el fin de conocer si la inserción del vector ha tenido lugar en el sitio correcto del genoma o si, por el contrario, la inserción se ha realizado de manera aleatoria. Para ello, se han utilizado primers que se encuentren por fuera de la secuencia insertada y que nos permitan reconocer de qué manera es que se ha llevado a cabo dicha inserción.

Construcción de un plásmido para la obtención de proteínas de fusión: Cre recombinasa y ScRad52.

A partir de un plásmido comercial, y realizando los subclonajes correspondientes se realizaron los constructos de ambas proteínas en el vector de expresión bacteriana pET-15b. En este se insertó, en el extremo C-terminal un tag de 6 histidinas, seguido por la secuencia TAT y finalmente, la secuencia de localización nuclear NLS, quedando en ambos casos conformado el inserto de la siguiente manera:



Figura 7: Esquema de los insertos construidos para Cre recombinasa y ScRad52, respectivamente. Para ambas proteínas se diseñaron los insertos de manera que la secuencia de la proteína esté precedida por las histidinas, la secuencia TAT y la de localización nuclear, para permitir así, tanto la purificación por columnas de afinidad, como la internalización de la proteína al núcleo, respectivamente.

Expresión y purificación de Cre y ScRad52

El plásmido construido fue utilizado para transformar bacterias *Escherichia coli* BL21 (DE3). Esta cepa tiene la ventaja de ser deficiente en proteasas, las cuales podrían degradar la proteína en cualquier momento del proceso de producción y purificación. Así mismo, DE3 indica que el huésped es un lisógeno del bacteriófago λDE3, y por lo tanto, lleva una copia cromosómica del gen de la RNA polimerasa, T7, bajo control del promotor lacUV5. Es por esto que esta cepa bacteriana es adecuada para la expresión de elevados niveles de proteínas, por inducción con IPTG. Se utilizó medio LB (Luria Bertani) con 100 µg/ml de ampicilina (ya que el plásmido utilizado para generar el constructo que forma la proteína de fusión, posee un casete de resistencia a ampicilina

que codifica para una enzima denominada β -lactamasa, la cual es capaz de degradar el anillo β -lactámico del antibiótico) para inocular cultivos overnight. Al día siguiente se realizó una dilución 1:20 de este mismo, incubando por 2 horas a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a añadir isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG) para inducir la expresión de la proteína. El IPTG fue añadido a una concentración final de 1 mM, e incubando nuevamente a 37°C por 3 horas más. Las células fueron recogidas por centrifugación, y congeladas a -80°C hasta el día siguiente. El pellet así obtenido fue luego tratado con el buffer B-PER (Bacterial Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific): 4 ml/g de pellet, DNAsa: 20 U/g de pellet, lisozima: 400 μ l/g de pellet y 24 μ l de inhibidor de proteasas (SIGMA-ALDRICH), por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó por 10 minutos a 11.000g a 4°C. Una vez obtenido el sobrenadante, se procedió a purificar, para lo cual se utilizaron bolas Ni Sepharose[®] High Performance (GE Healthcare). Se tomaron 1,4 ml de la suspensión de bolas en 20% de etanol, por litro de cultivo inducido. Esos 1,4 ml de suspensión, fueron lavados previamente con 3 porciones de 2 ml de agua milliQ y otras 3 veces con 2 ml de tampón de unión (20 mM Tris-HCl (pH= 7.9)/500 mM NaCl/5 mM imidazol). Se añadió luego, el lisado obtenido de centrifugar la muestra con B-PER y se dejó en agitación a 4°C durante 1 hora. Pasado este tiempo, se centrifugó y lavó dos veces con 4 ml del mismo tampón de unión utilizado anteriormente, y luego otros cuatro lavados con 4 ml de tampón de lavado (20 mM Tris-HCl (pH= 7.9)/500 mM NaCl/100 mM imidazol, para Cre; y 20 mM Tris-HCl (pH= 7.9)/500 mM NaCl/50 mM imidazol, para ScRad52). La proteína fue eluida en tres porciones de 1 ml cada una, con tampón de elución (20 mM Tris-HCl (pH= 7.9)/500 mM NaCl/500 mM imidazol), permitiendo que éste actuara durante 15 minutos antes de eluir la siguiente fracción. Se recogen todas las fracciones juntas y se pasa por una columna PD-10 (GE Healthcare) para intercambiar el tampón de elución por un tampón de glicerol (50% de glicerol/20 mM HEPES (PH=7.4)/500mM NaCl). Luego se concentró utilizando columnas Amicon[®] Ultra-4 (Millipore), según indicaciones del fabricante. Una vez realizado esto, se midió la concentración utilizando el reactivo de Bradford (Sigma) y se estimó la pureza de la proteína eluida mediante gel de poliacrilamida.

SDS/PAGE y Western Blot

La proteína eluida fue posteriormente cargada en dos geles de poliacrilamida para comprobar la purificación. El gel utilizado para realizar la electroforesis de Cre, fue del 8%, mientras que él se utilizó para ScRad52 fue del 10%. Una vez que la electroforesis se llevó a cabo, uno de los geles se coloreó 10 minutos con azul de Comassie y luego, decoloró con solución decolorante (metanol/ácido acético/agua).

Con el otro gel se realizó una transferencia a membrana de PVDF, la cual fue primero tratada con solución de bloqueo (TTBS con 5% de leche en polvo), durante toda la noche a 4°C. Como anticuerpo primario se usó un monoclonal de ratón Anti-polyHistidine (SIGMA-ALDRICH), a una dilución 1:2,000 en solución de bloqueo. Como anticuerpo secundario, se utilizó un anti-mouse 1:5,000 marcado con peroxidasa de rábano, incubado también en solución de bloqueo. Luego de la incubación con cada

uno de los anticuerpos, se realizaron tres lavados, de 10 minutos cada uno, con TTBS. Al final, se hace la detección por quimioluminiscencia, para lo cual se sumerge la membrana en una solución equimolecular de ambos reactivos que conforman el kit Pierce ECL Western Blotting Substrate, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto, tras lo cual se procede a realizar el revelado. Este se llevó a cabo, enfrentando la película fotográfica y la membrana durante 30 segundos.

Prueba funcional de Cre

Se comparó la actividad *in vitro* de la Cre que he producido en el laboratorio con una de origen comercial (Clontech Laboratories, Inc.). Para ello, se utilizaron 100 ng de un vector que contenía el casete de blasticidina (en este caso, AAV-COOH-CHN2 #3), 1X de Cre Reaction Buffer, 1X de BSA y 3 μ l de Cre Recombinasa (un tubo para la Cre comercial y otro para la que hemos obtenido), en un volumen final de 20 μ l. Las mezclas se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente, deteniendo luego la reacción a 70°C por 5 minutos, y transformando posteriormente en bacterias DH5 α con la mezcla de reacción. Al día siguiente se picaron las colonias que crecieron, y se incubaron hasta el próximo día a 37°C, luego de lo cual se realizaron minipreps y digestión con Sal I y Sgs I. La doble digestión se dejó a 37°C durante 3 horas. Posteriormente se corrió en un gel de agarosa al 1% para comprobar la liberación del casete de blasticidina.

También se estudió el comportamiento *in vivo* de Cre. Para ello, se utilizaron células HCT116 a las que se les había introducido mediante gene targeting un tag-GFP in frame en el extremo C-terminal del gen ATOH1. Estas células fueron lavadas previamente con PBS para quitar cualquier resto de SBF que quedase remanente del medio anterior, luego se añadió Opti-MEM y se dejó a 37°C por media hora. Una vez atemperadas las células, se procedió a añadir la proteína obtenida, en una concentración final de 50 μ g/ml, y se dejó nuevamente a 37°C por 1 hora. Transcurrido este tiempo, se agregó medio completo al pocillo que contenía las células. Al día siguiente se cambió todo el medio por medio completo, DMEM y se hizo dilución límite en placa de 96 pocillos, con objeto de aislar clonas individuales. Pasados 7-10 días, se extrajo el DNA y se analizó por PCR, utilizando un primer localizado al final de ARM1 del constructo ATOH1-eGFP, y otro ubicado después del ARM2. Luego se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar si ocurrió la delección del casete de blasticidina.

Prueba funcional de Rad52

DNA mobility shift assay en gel de agarosa (ensayo de cambio de movilidad del DNA). Para este ensayo, se utilizó un ssDNA circular del virión ϕ X174 (New England Biolabs) que se incubó con diferentes cantidades de proteína ScRad52 (1, 5, 10 y 20 μ l), en 10 μ l de buffer de reacción (35 mM K-MOPS, pH 7.2, 1 mM DTT, 100 μ g/ml BSA, 2.5 mM ATP y 3 mM de MgCl₂). La mezcla de reacción fue incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, y luego, mezclada con tampón de carga (0.1% Orange G en 30 mM de Tris-HCl, pH 7.5, conteniendo 50% de glicerol) y, posteriormente, cargada en un gel de

agarosa al 0.9% y, separada por electroforesis a 100 mA en TAE, hasta que el frente de corrida avanzó unos 4 cm, aproximadamente. Una vez finalizada la electroforesis, se tiñó el gel con bromuro de etidio al 1%.

RESULTADOS

Generación de células HCT116 ATOH1-GFP mediante gene targeting.

Una vez realizados los subclonajes correspondientes para obtener los brazos de homología 1 y 2, el casete de blasticidina y la secuencia de la eGFP, se realizó una ligación que permitió unir todos los fragmentos, y se transformó, posteriormente, en bacterias XL10 gold sembrándose las bacterias en placas de LB-agar con ampicilina. Al día siguiente, las bacterias que crecieron son aquellas que adquirieron el plásmido ligado a los restantes insertos, lo que queda demostrado con su crecimiento en ampicilina, ya que el plásmido lleva inserto un casete de resistencia a dicho antibiótico. De las bacterias así obtenidas, se ha aislado el DNA, el cual fue luego tratado con diferentes enzimas de restricción. Estas digestiones se han corrido en un gel de agarosa que nos ha permitido comprobar cuáles fueron las clonas que, no sólo insertaron el vector, sino que, además, han insertado exactamente los fragmentos de interés. La digestión realizada con las enzimas NotI/Sall, corta el vector en tres, obteniéndose bandas de 3,400, 3,000 y 1,200 pares de bases, al igual que la que se llevó a cabo con NotI/EcoRI, donde se obtuvieron banda de 3,500, 3,000 y 1,100 pares de bases. Mientras que la digestión con Sall/EcoRI, corta al vector dos veces, por lo que se obtuvieron bandas de 5,300 y 2,300 pares de bases, de igual manera que NotI, donde se observan dos bandas de 4,700 y 2,900 pares de bases. Sin embargo, al observar la figura podemos apreciar que las digestiones llevadas a cabo por NotI/Sall y Sall/EcoRI, han sido digestiones parciales, quedando parte del vector sin digerir.

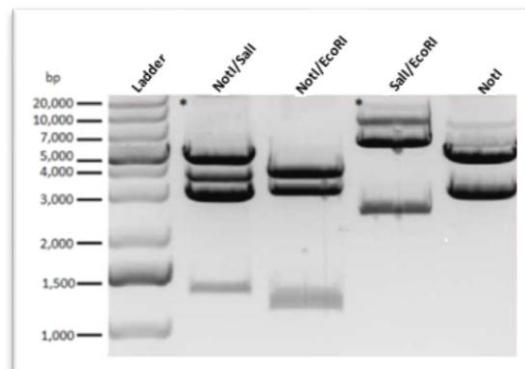


Figura 8: Comprobación del vector mediante enzimas de restricción. Para comprobar que el diseño del vector se haya llevado a cabo correctamente, se han hecho cuatro digestiones, indicadas en la figura, las cuales han dado las bandas esperadas. Sin embargo, con NotI/Sall (*) y Sall/EcoRI (*) la digestión del vector ha sido parcial.

Tras infectar las células empaquetadoras AAV293 con los tres vectores (AAV-MCS diseñado según el gen de interés, p-RC y pHelper), fue posible estudiar los cambios morfológicos sufridos por las células debido a la replicación del virus (efecto citopático). Lo primero que se vio fue el cambio de color del medio, de rojo a naranja casi amarillo y, paulatinamente, las células fueron presentando cambios de forma con aparición de vesículas en la membrana plasmática y muchas de ellas se despegaron total o parcialmente del plástico.

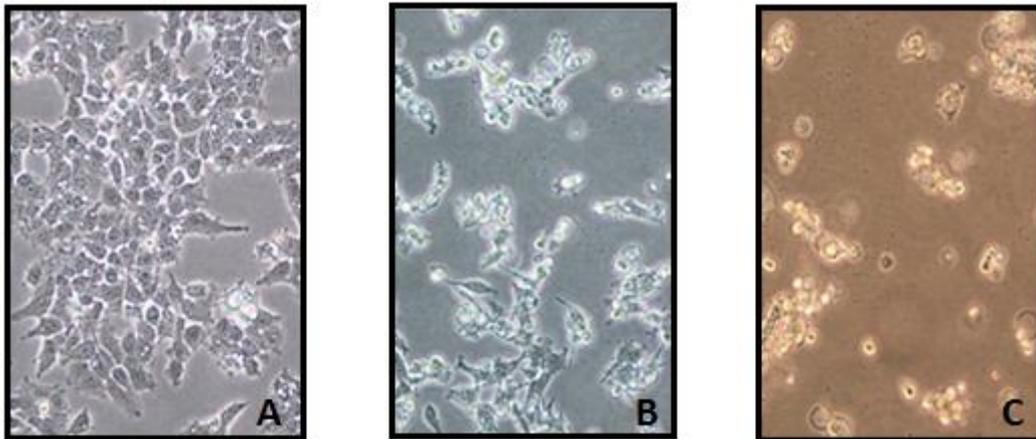


Figura 9: Fotografías obtenidas del cultivo celular de AAV293, antes y después de la transfección con AAV.MCS, p-RC y pHelper. **A:** Antes de realizar la transfección, se observa una confluencia celular de entre 70% y 80%. **B:** 24 horas después de realizada la transfección, se observan cambios en la morfología de las células, y alguna mortalidad. **C:** 48 horas después de realizada la transfección, se observa que el número de células adheridas es muy bajo y, en cambio, la mayoría de las células aparecen flotando en el medio.

Una vez realizado el lisado celular, mediante PCR cuantitativa se calculó el número aproximado de moléculas virales presentes en el lisado viral obtenido. Para determinar el mismo, se realizó una curva de calibración con un plásmido de concentración conocida que contiene secuencias ITRs. De éste modo se utilizaron distintas diluciones del mismo, en paralelo con las diluciones del lisado viral. Tras analizar los resultados obtenidos y, haciendo los ajustes oportunos según la dilución que se sometió a análisis, se obtuvieron títulos que oscilan entre 10^{11} - 10^{12} partículas virales/ml, que se considera óptimo para continuar con los siguientes experimentos.

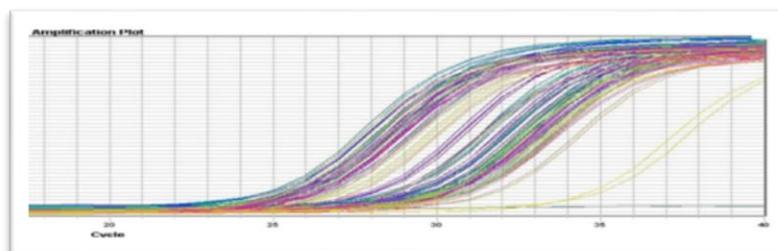


Figura 10: Curva de amplificación de DNA obtenida por RT-PCR.

Tras la infección de las HTC116 con los virus diseñados y al observar el crecimiento de las clonas resistentes a blasticidina y que, por lo tanto, incorporaron el virus en su genoma, se procedió a extraer el DNA de dichas clonas, aproximadamente, unos 7 días luego de la infección. Una vez obtenido el DNA, se comprobó si ocurrió gene targeting mediante PCR o si, por el contrario, ocurrió inserción al azar. Se utilizaron para ello los siguientes primers: un external P1 FORWARD (localizado en el locus del gen de interés, pero externo a la secuencia que se insertó) y un internal P2 REVERSE (localizado en la secuencia que se insertó en las células, situado en dos zonas: una, al comienzo del segundo brazo de homología y la otra, exactamente al finalizar el primer brazo y justo antes de la GFP).

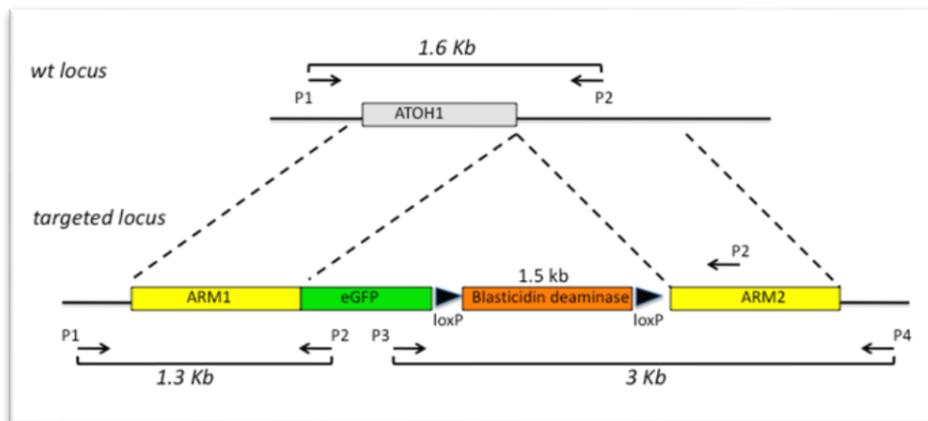


Figura 11: Esquema de los locus, wild type y targeted, pertenecientes al vector, y primers utilizados en la PCR de comprobación. Una vez obtenido el DNA de las células tratadas con las partículas virales, y resistentes a blasticidina, se realizó una PCR con los primers aquí mostrados. P1 y P2 se han utilizado para comprobar la inserción del transgén, mientras que P3 y P4 se han utilizado, luego de uso de Cre recombinasa, para comprobar la eliminación del casete de resistencia.

Con esta pareja de primers se pudo discriminar entre dos tipos celulares:

- *Células en las que tuvo lugar una inserción al azar del virus y que mantienen por lo tanto el genotipo wild type:* Tras la amplificación de la secuencia de bases comprendida entre la pareja de primers citados anteriormente y su visualización en un gel de agarosa, se observó una banda cercana a los 1600 pares de bases correspondiente al genotipo wild type del gen Atoh1. En estas células la inserción no tuvo lugar en el sitio correcto puesto que se amplifica la secuencia de bases correspondiente al genotipo salvaje, es decir, sin corregir con el virus.
- *Células en las que la inserción del virus tuvo lugar en el sitio deseado:* Cuando tiene lugar la recombinación homóloga en el lugar deseado, se observa la aparición de dos bandas. Una de estas bandas tiene alrededor de 1600 pares de bases, y es la wild type mencionada anteriormente, que proviene de la amplificación del alelo no modificado, mientras que la segunda es de unos 1300 pares de bases, y se corresponde al alelo que ha sufrido gene targeting. En estas células, el virus se insertó en el locus correcto del gen. Recordemos que el primer interno está localizado en dos lugares, pero como la secuencia más corta tiene preferencia para

ser amplificada en la reacción de PCR, el proceso finaliza al encontrarse con el primer interno de la nueva secuencia, localizado a una distancia más corta, que el situado en el segundo brazo de homología.

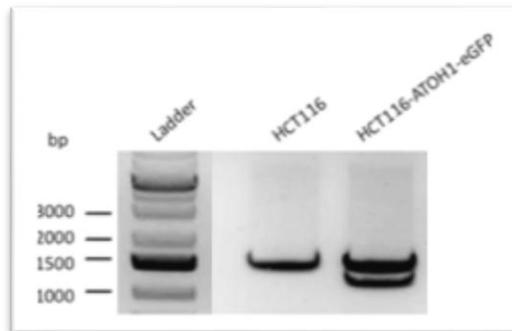


Figura 12: PCR de Atoh1 llevada a cabo con los primers P1 y P2. En las células HCT116 sin tratamiento, se obtiene una banda de unos 1,600 pares de bases, correspondientes, justamente con el wild type. Mientras que en las HCT116-ATOH1-eGFP, además de la banda wild type, se ve otra de 1,300 pares de bases que se corresponde con el alelo que ha sufrido el gene targeting

Producción de proteínas de fusión. Cre recombinasa y ScRad52.

Una vez que hemos obtenido y comprobado los constructos para ambas proteínas se procedió a expresar ambas en bacterias BL-21, tras lo cual se llevó a cabo la inducción con IPTG. Como prueba preliminar se probaron las siguientes condiciones: 2 horas de inducción con 0.2 mM de IPTG A 37°C, frente a una condición control en la cual no se añadió IPTG. El resultado obtenido al finalizar esta prueba es que, si bien ocurría inducción, esta no era suficiente y la banda era muy débil, motivo por el cual hemos decidido probar diferentes tiempos de inducción (2, 3 y 4 horas), diferentes concentraciones de IPTG (0.2 y 1 mM) y diferentes temperaturas (25 y 37°C). El resultado de todos estos ensayos fue que, las condiciones óptimas de inducción para ambas proteínas, consistieron en: 1Mm de IPTG durante 3 horas a 37°C. Una vez que se obtuvieron ambas proteínas, se realizó el fraccionamiento para ver si éstas se encontraban en la fracción soluble o insoluble. El fraccionamiento se realizó mediante sonicación y uso del buffer B-PER (Bacterial Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific). Sin embargo, la utilización de B-PER nos ha permitido una más sencilla manera de extraer las dos proteínas, ya que ambas se presentaban en la fracción soluble, y este reactivo tiene la ventaja de extraer fácilmente proteínas solubles en células bacterianas. Una vez obtenido, por centrifugación, el sobrenadante que contiene las proteínas solubles se procede a la purificación. Para llevar a cabo este paso, hemos utilizado una resina Ni Sepharose[®] High Performance (GE Healthcare). El níquel tiene la capacidad de unir a las proteínas mediante la cola de histidinas que estas poseen, lo cual hace que al pasar la solución proteica con el B-PER, nuestras proteínas de fusión queden retenidas por unirse al metal. La resina está formada por bolas o perlas de agarosa altamente reticulada de 34 µm cada una de ellas, a las cuales se ha acoplado un grupo quelante que ha sido cargado con iones de Ni²⁺. Una vez iniciado el proceso de purificación, para cada proteína se han probado diferentes

condiciones de lavados, con el fin de asegurar la condición óptima para evitar la pérdida de cantidades importantes de las mismas. Las diferentes condiciones se hicieron variando la concentración de imidazol utilizado en el buffer de lavado, que varió desde los 20 mM a los 100 mM, determinando como las mejores condiciones 100 mM para Cre y 50 mM para ScRad52. Posteriormente se realizó la elución para ambas de igual manera, utilizando 500 mM de imidazol en el correspondiente buffer. Una vez obtenidas las proteínas, se realizó el intercambio de buffer para eliminar restos de B-PER, buffers de lavados y elución, y por tanto, imidazol. Las proteínas así obtenidas, ahora en buffer de glicerol, fueron concentradas y cuantificadas, según se indica en la sección materiales y métodos. Hemos obtenido aquí, concentraciones de alrededor de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para ambas proteínas, lo que nos da una cantidad estimada de 25 – 30 mg totales tanto de Cre recombinasa como de ScRad52.

Una vez finalizada la obtención, purificación, concentración y cuantificación de las proteínas se realizaron dos geles para cada una de ellas, uno se utilizó para estimar la pureza de las proteínas obtenidas y el otro para Western Blot.

En el primer que se tiñe con Comassie Blue, se aprecia que la Cre obtenida resultó muy pura ya que sólo se ve una banda, lo cual indica que la puesta a punto ha resultado idónea para esta. Sin embargo, en el caso de la ScRad52 no ha sido así. Durante la puesta punto hemos visto que si se aumentaba a más de 50 mM el imidazol, la proteína se perdía con los sucesivos lavados, mientras que si se disminuía, salía contaminada. A pesar de esto, se prefirió usar el método en que la proteína está contaminada, con objeto de obtener una cantidad suficiente que nos permita repurificar ScRad52 en una fase posterior ensayando otros métodos.

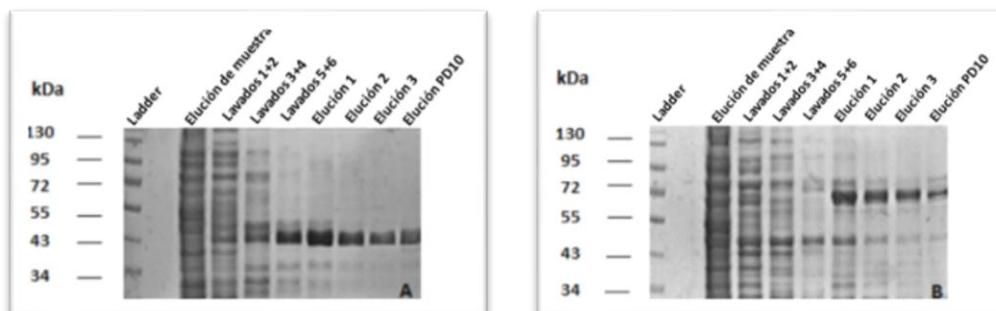


Figura 13: Geles teñidos con Comassie Blue, pertenecientes a la obtención de Cre recombinasa (A) y ScRad52 (B). En ambos casos se ven, en el siguiente orden, marcador de peso molecular, carril vacío, elución de la muestra tras paso por resina perlas de níquel, lavados 1+2, lavados 3+4, lavados 5+6, elución1, elución 2, elución 3 y posterior al intercambio de buffers en PD-10.

Con el gel restante se realizaron los Western Blot, habiendo obtenido las bandas correspondientes al peso molecular tanto de Cre como de ScRad52, lo que termina por confirmar que las proteínas obtenidas se corresponden con lo que esperábamos.

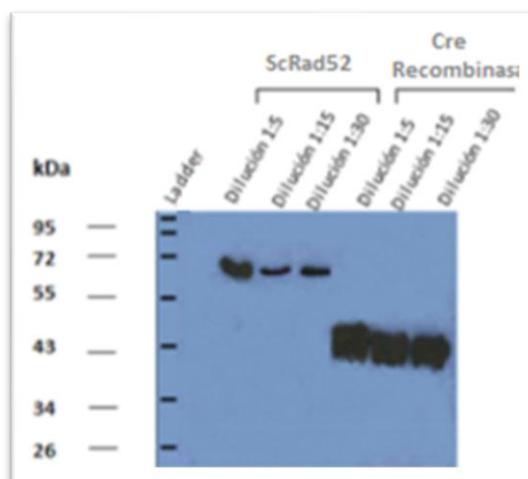


Figura 14: Western Blot. Las primeras 3 bandas se corresponden con ScRad52 y las últimas 3 con Cre recombinasa. En ambas muestras varían, de manera decreciente, las cantidades de proteína cargada en el gel.

Cómo en western blots anteriores hemos visto una señal muy intensa, hemos decidido hacer tres diluciones de la proteína obtenida directamente a partir de la purificación (sin concentrar). Las diluciones realizadas fueron 1:5, 1:15 y 1:30. Incluso habiendo hecho estas diluciones seguimos viendo una intensa señal al revelar.

Ensayos in vitro e in vivo de las proteínas obtenidas.

Cre recombinasa.

In vitro, hemos utilizado diferentes cantidades de la Cre recombinasa obtenida en el laboratorio (2,5 µg/µl): 3 µl y 5 µl. Hemos visto que la mejor cantidad para realizar el experimento es de 3 µl, ya que con 5 µl se ve aumentada la toxicidad de la proteína y esto disminuye drásticamente el número de clonas bacterianas que crecen en la placa.

Se obtuvieron los plásmidos de las clonas crecidas, y se digirieron con Sgs I (Asc I) y Sall durante 3 horas a 37°C, tras los cuales se cargaron las muestras en un gel de agarosa al 1%. El gel se corrió durante una hora a 70 V. Una vez finalizada la electroforesis, se observó el gel con luz UV y se vio que en todos los carriles se obtuvo, una banda superior de unos 7,500 pares de bases que se corresponde con el tamaño del vector utilizado. También aparece en todos una segunda banda inferior que, depende del peso molecular, indica si ha ocurrido delección del casete de blasticidina. En las muestras en que la proteína no ha delecionado el casete se ve una banda de unos 2,300 pares de bases, mientras que en las que ocurrió delección inducida por Cre, la banda de 2,300 pasa a ser de 800 al haberse delecionado el casete de blasticidina.

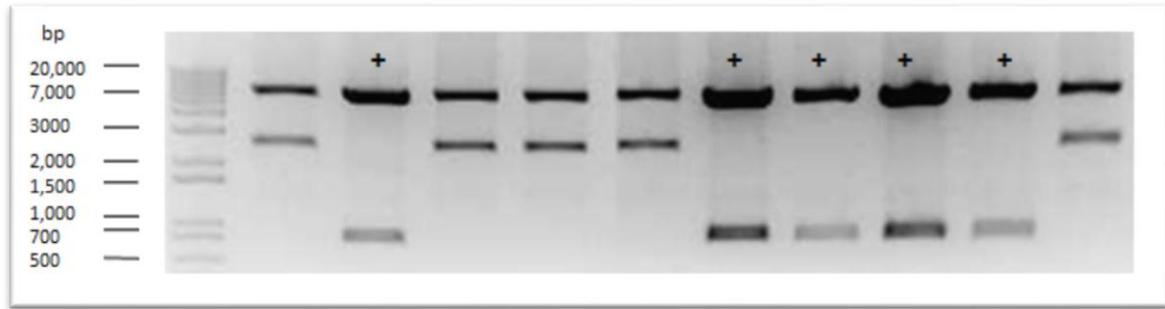


Figura 15: Prueba funcional de Cre recombinasa in vitro frente a AAV-COOH-CHN2. De las clonas obtenidas luego de la transformación, 10 se sometieron a digestión con Sall/Sgsl y se corrieron en un gel. De éstas, la mitad fueron positivas para eliminar el casete de blasticidina.

Por otro lado, hemos probado la funcionalidad de Cre recombinasa in vivo sobre células HCT116. Como se mencionó anteriormente, éstas células fueron previamente infectadas con los virus obtenidos, generando células HCT116-Atoh1-eGFP. Podemos ver que cuando 6HIS-TAT-NLS-Cre se usa a una concentración final de 50 µg/ml, la toxicidad no es demasiado elevada como para matar las células, pero si es lo suficiente como para quitar el casete de resistencia.

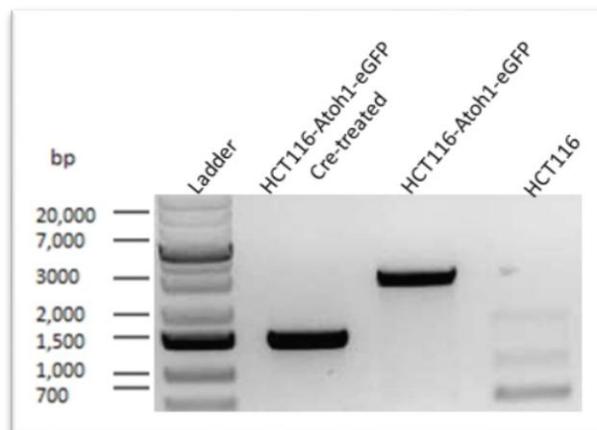


Figura 16: Prueba funcional de Cre recombinasa in vivo frente a HCT116-Atoh1-eGFP. Se probó una de las clonas tratadas con Cre, frente a una no tratada y, a células HCT1196 wild-type. La banda de 1500 pares de bases obtenida posterior al tratamiento con Cre se corresponde con el casete blasticidina flanqueado por los loxP.

ScRad52.

Para probar la funcionalidad de ésta proteína se ha llevado a cabo un Mobility Shift Assay, según el cual la proteína cambiará su movilidad electroforética al unirse a moléculas de DNA. Como hemos mencionado que la ScRad52 se une con elevada afinidad a cadenas sencillas de DNA, enfrentamos la proteína con un DNA circular de cadena simple perteneciente al virión ϕ X174 y hemos visto que la proteína conserva

dicha capacidad de unión al DNA. A su vez, hemos utilizado como control la proteína BSA, la cual no cuenta con capacidad de unión a DNA.

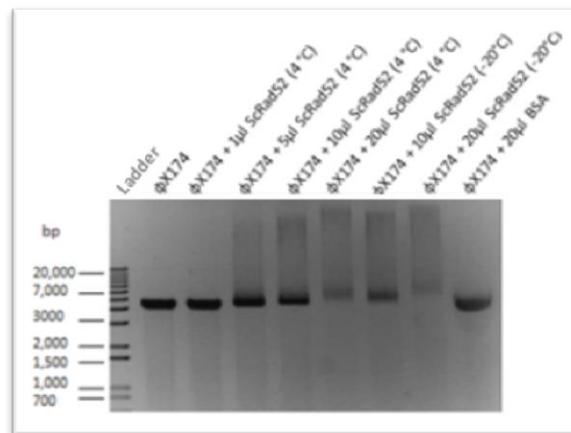


Figura 17: Prueba funcional de ScRad52. Mobility Shift Assay. Este ensayo de movilidad electroforética se llevó a cabo con diferentes cantidades de la proteína. A mayores cantidades de proteína, el DNA corre menos y la banda es incluso menos intensa, lo que se corresponde con la unión de ScRad52 a la cadena simple de DNA del virus. En cuanto a BSA, esta no corre con la misma intensidad y de la misma manera que el virus control.

En la figura observamos que en los primeros siete carriles, en los cuales se ha cargado una cantidad creciente de proteína, la banda de DNA correspondiente al virión es cada vez menos intensa y se ve también que se retrasa su movilidad electroforética debido a la unión de ScRad52. La última banda se corresponde con BSA, una proteína que no tiene capacidad alguna de unión al DNA, por lo cual se ve simplemente la banda correspondiente al DNA del virión sin ningún efecto.

DISCUSIÓN

Durante la realización de este trabajo hemos diseñado y evaluado varios AAV, sin embargo en esta memoria, sólo nos hemos dedicado a uno de ellos, el AAV-Atoh1-eGFP. Diseñado y obtenido de manera experimental, ha sido probado en condiciones de laboratorio, demostrando la capacidad que tienen estos vectores virales de insertarse en el genoma del huésped, en este caso células HCT116, lo que nos lleva a pensar que pueden realmente ser de gran utilidad a la hora de tratar enfermedades monogénicas por terapia génica. A pesar de las ventajas evidentes que tienen los virus adenoasociados, todavía siguen estando presentes las desventajas, y la principal que aquí encontramos es la integración al azar que sucede a menudo con estos vectores. Es por ello, que hemos desarrollado proteínas de fusión que nos permitan aumentar los niveles de recombinación homóloga, como es el caso de ScRad52. Si bien la proteína obtenida se ha comprobado que mantiene su capacidad funcional, hasta el momento solo lo hemos comprobado in vitro, y resta aun, conocer su funcionalidad en condiciones de trabajo in vivo, lo cual es de suma importancia para poder validar la

capacidad de la proteína en cuanto a su capacidad de aumentar la frecuencia de recombinación homóloga. Por otro lado, sí que podemos estar seguros de la capacidad funcional tanto in vitro, como in vivo, de la Cre recombinasa que nos permitirá, eliminar el casete de selección una vez que se hayan llevado a cabo todos los experimentos y puestas a puntos de los mismos. Si bien todos estos son avances en nuestra investigación, seguimos buscando diferentes maneras de aumentar la recombinación homóloga, que nos permita en un futuro llevar a cabo procedimientos de terapia génica. Para ellos, estamos en proceso de utilizar siRNAs que nos permitan disminuir la expresión de proteínas que intervienen en la vía de recombinación no-homóloga lo cual nos favorecerá, como ya hemos mencionado, debido a que estas vías compiten la una con la otra, obteniendo como resultado final un aumento de la recombinación homóloga a expensas de una disminución de la recombinación no-homóloga. A su vez, todos los experimentos que hemos llevado a cabo no son más que el comienzo del camino, ya que el fin principal de la investigación es el de volcar todos estos resultados en la utilización de fibroblastos humanos y otras células primarias como células diana.

Por otro lado, y a pesar de haber comprobado la capacidad de los rAAV para permitir la incorporación de material exógeno en la célula y de poder hacerlo por recombinación homóloga, vemos que hoy en día existen otros métodos que están en auge. Uno de ellos es el de las meganucleasas. Las meganucleasas son enzimas, endonucleasa más específicamente, que reconocen largas secuencias de DNA y que son capaces de generar cortes específicos en el DNA, que promueve el gene targeting mediante recombinación homóloga.²⁰ Sin embargo, estas dependen de secuencias específicas que deben encontrarse en el sitio en el cual quiere llevarse a cabo el gene targeting, lo cual las hace un método menos accesible y más costoso, ya que deben diseñarse dichas enzimas según la secuencia de DNA específica necesaria.²¹

Mediante el uso de PCR se han detectado 2 positivos después de analizar 40 muestras. Teniendo en cuenta que cada muestra contiene ADN de entre 3 y 6 clones, la eficiencia de recombinación oscila ente $1/120$ y $1/240$ de los clones resistentes a blasticidina, frecuencia que se corresponde con la obtenida en publicaciones sobre el tema. Todos los procesos llevados a cabo son importantes porque nos permiten validar el proceso de construcción de vectores y producción de rAAV. Así mismo, el proceso de rastreo de positivos se ha acertado sustancialmente utilizando un casete de resistencia a blasticidina que nos permite seleccionar clonas positivas ya a los 7 días (en comparación con métodos que utilizan geneticina, con los que se necesitan al menos 14 días en crecimiento selectivo).

A su vez, la obtención de Cre recombinasa nos permite quitar, de manera realmente eficiente, el casete de resistencia a blasticidina in vivo. Mientras que sólo nos restaría comprobar que, efectivamente ScRad52 es capaz de aumentar la frecuencia de gene targeting por recombinación homóloga de manera significativa.

CONCLUSIÓN

Hemos diseñado y obtenido vectores virales adenoasociados los cuales son capaces de llevar a cabo gene targeting por recombinación homóloga de una manera consistente, aunque a baja frecuencia.

Hemos diseñado, obtenido y purificado, proteínas de fusión como Cre recombinasa y ScRad52, las cuales son funcionales en ensayos in vitro. Mientras que hemos podido probar la funcionalidad in vivo de Cre recombinasa, no hemos podido hacerlo todavía para ScRad52.

Todos estos resultados obtenidos son muy prometedores y no hacen más que abrirnos camino para continuar la investigación y encontrar la manera más adecuada de realizar gene targeting en células humanas con un aumento realmente significativo de recombinación homóloga y que, por tanto, puedan ser llevados a cabo en terapia génica con mayor seguridad y más eficiencia que los métodos utilizados en la actualidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting. Vasileva, A. and Jessberger, R. 2005. *Nature Reviews. Microbiology*. 837-847.
2. Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. Weitzman, M. D., Kyöstiö, S. R., Kotin, R. M. and Owens, R. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994. 5808–5812.
3. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. Daya, S. and Berns, K. I. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008. 583-593.
4. Primary human cells differ in their susceptibility to rAAV-2-mediated gene transfer and duration of reporter gene expression. Rohr, U. P., Kronenwett, R., Grimm, D., Kleinschmidt, J. and Haas, R. *Journal of Virological Methods*. 2002. 265–75.
5. Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. Weitzman, M. D., Kyöstiö, S. R., Kotin, R. M. and Owens, R. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994. 5808–12.
6. Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination. Yang, J., Zhou, W., Zhang, Y., Zidon, T., Ritchie, T. and Engelhardt, J. F. *Journal of Virology*. 1999. 9468-9477.
7. AAV-mediated gene targeting methods for human cells. Khan, I. F., Hirata, R. K. and Russell, D. W. *Nature Protocols*. 2011. 482-501.
8. HMGB1 interacts with many apparently unrelated proteins by recognizing short amino acids sequences. Dintilhac, A. and Bernués, J. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002. 7021-7028.
9. Deletion of Atoh1 disrupts Sonic Hedgehog signaling in the developing cerebellum and prevents medulloblastoma. Flora, A., Klisch, T. J., Schuster, G. and Zoghbi, H. Y. 2009. 1424-1427.
10. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27^{Kip1} induces cell migration. Nagahara, H. Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A. and Dowdy, S. F. *Nature America*. 1998.
11. Protein Transduction Domain of HIV-1 Tat Protein Promotes Efficient Delivery of DNA into Mammalian Cells. Eguchi, A., Akuta, T., Okuyama, H., Senda, T., Yokoi, H., Inokuchi, H., Fujita, S., Hayakawa, T., Hasegawa, M., and Nakanishi, M. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001. 26204-26210.
12. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. Orban, P. C., Chui, D., & Marth, J. D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992. 6861-6865.
13. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Jr., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L. & Westphal, H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992. 6232-6236.
14. Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: A tool for efficient genetic engineering of mammalian

- genomes. Peitz M., Pfankuche K., Rajewsky K. & Edenhofer F. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002. 4489-4494.
15. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A. & Jonkers, J. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001. 209-214.
 16. Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double Strand Break Repair. Symington, L. S. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002. 630-670.
 17. Enhancement of gene targeting in human cells by intranuclear permeation of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad52 protein. Kalvala, A., Rainaldi, G., Di Primio, C., Liverani, V., Falaschi, A. y Galli, A. Nucleic Acids Research, 2010.
 18. Potentiation of gene targeting in human cells by expression of *Saccharomyces cerevisiae* Rad52. Di Primio, C., Galli, A., Cervelli, T., Zoppè M. and Rainaldi G. 2005. Nucleic Acids Research. 4639-4648.
 19. An universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2 derived inverted terminal repeat sequences. Aurnhammer, C., Haase, M., Muether, N., Hausl, M., Rauschhuber, C., Huber, I., Nitschko, H., Busch, U., Sing, A., Ehrhardt, A. and Baiker, A. Human Gene Therapy. 2011.
 20. Molecular basis of engineered meganucleasa targeting of the endogenous human RAG1 locus. Muñoz, I. G., Prieto J., Subramanian, S., Coloma, J., Redondo, P., Villate, M., Merino, N., Marenchino, M., D'Abramo, M., Gervasio, F. L., Grizot, S., Daboussi, F., Smith, J., Chion-Sotinel, I., Paques, F., Duchateau, P., Alibés, A., Stricher, F., Serrano, L., Blanco, F. J. and Montoya, G. Nucleic Acids Research. 2011. 729 – 743.
 21. A novel engineered meganucleasa induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. Epinat, J. C., Arnould, S., Chames, P., Rochaix, P., Desfontaines, D., Puzin, C., Patin, A., Zanghellini, A., Paques, F. and Lacroix E. Nucleic Acids Research. 2003. 2952 – 2962.