



## **Sincronización del ciclo celular en una línea celular modelo para ensayo de *gene targeting***

Alumno: Miguel Velázquez Gómez  
Tutor: Miguel A. de la Fuente García  
Máster en Investigación Biomédica del IBGM



# Índice

<i>Glosario de acrónimos y anglicismos</i>	<b>3</b>
<i>Introducción</i>	<b>4</b>
Sobre la terapia génica dirigida	4
Sobre el ciclo celular y recombinación homóloga	5
TALEN	13
Métodos químicos de sincronización celular: doble bloqueo con timidina	13
Objetivos	14
<i>Materiales</i>	<b>16</b>
1. Para el protocolo de sincronización del ciclo celular en G1/S	16
2. Para el análisis por citometría de flujo	16
3. Línea reportera <i>RCL-HCT-116-GFPtrunc</i>	17
4. Para el ensayo de recombinación homóloga	17
<i>Métodos</i>	<b>17</b>
1. Protocolo de sincronización del ciclo celular en G1/S	17
2. Análisis por citometría de flujo	18
3. Transfección simultánea de tres vectores (un vector GFP donante y dos vectores para las TALEN 5' y 3')	19
4. Ensayos realizados	20
<i>Resultados</i>	<b>21</b>
1. Detención del ciclo celular y sincronización de células HCT-116. Análisis por citometría de flujo	21
2. Uso del donante MCS y de TALEN junto con el bloqueo de timidina. Mejora de la tasa de recombinación homóloga	24
<i>Discusión de los resultados</i>	<b>24</b>
<i>Conclusiones</i>	<b>25</b>
<i>Bibliografía</i>	<b>26</b>

## Glosario de acrónimos y anglicismos

DNA, RNA: siglas inglesas para ADN y ARN.

DBS: *double-strand break*, o rotura de la doble hélice de ADN.

NER: *nucleotide excision repair*, o reparación por escisión de nucleótido.

BER: *base excision repair*, o reparación por escisión de base.

HR: *homologous recombination*, o recombinación homóloga.

NHEJ: *non homologous end joining*, o unión de extremos no homólogos.

Gene conversion: conversión génica, fruto de la recombinación homóloga.

Holiday junction structure: estructura de unión de Holiday. Modelo de Holiday para la recombinación homóloga.

dsDNA: *double-strand DNA*, o ADN de doble cadena.

DSBR: *double-strand break repair*, modelo de reparación del ADN inducido por una DBS.

TALEN: *transcription activator-like effectors nuclease*, o nucleasa efectora activadora de la transcripción.

RCL: *reporter cell line*, línea celular reportera.

GFP: *green fluorescent protein*

MCS: *multiple cloning site*.

## INTRODUCCIÓN

### Sobre la terapia génica dirigida:

La terapia génica es un campo de la biomedicina que incluye distintas técnicas orientadas a la cura de enfermedades basadas en errores en el genoma, ya sea por ausencia del gen o por pérdida de su función, a través del envío del material genético corrector (RNA, DNA) al interior de células diana, en las cuales se integra y corrige el fallo.

La terapia génica puede orientarse al tratamiento de células germinales o somáticas. La modificación genética de células destinadas a generar espermatozoides y óvulos, pese a significar la erradicación de las enfermedades congénitas de raíz, no parece una vía alcanzable; la razón se encuentra en que aún no es una técnica segura ni fiable por completo, así como en el peligro que conlleva alterar el genoma humano de forma permanente, y que la práctica de la eugenesia (positiva y negativa) no es, a priori, permisible éticamente (Ronchera-Oms, González, 2002).

La modificación de células somáticas es la empleada actualmente, pues su desarrollo no suscita ningún tipo de conflicto ético, y se orienta a la cura de la enfermedad que el individuo porta.

En función de la estrategia seguida a la hora de manipular y modificar las células, la terapia génica se divide en *in vivo* y *ex vivo*. Las primeras, llevadas a cabo sobre las propias células del organismo, suponen un proceso más sencillo de llevar a cabo que, sin embargo, conlleva una menor eficiencia tanto a la hora de llegar al tejido específico como a la hora de reproducir y aumentar el número de células transformadas, así como para el control del proceso global como tal. Las segundas permiten mejorar todas estas carencias, pues consisten en extraer del organismo/paciente una muestra de tejido, seleccionar las células que desean transducirse, y realizar la integración del material genético, tras lo cual se da la expansión de la línea celular y su introducción en el sujeto. No obstante, esta terapia *ex vivo* adolece de imposibilidad de manipular ciertos tipos de células, posibles contaminaciones derivadas de la manipulación en el exterior, y costes asociados muy elevados.

Para que se dé el efecto terapéutico en la célula diana, es necesario que el material genético sea introducido en ella y ocurra la expresión de la proteína adecuada. Una vez dentro del núcleo, el gen puede integrarse permanentemente en el genoma celular, o puede permanecer asociado a él temporalmente en forma de episoma. La integración del gen permite la perpetuación de la corrección a las sucesivas generaciones de una forma rápida y, si se da en células madre del tejido, muy eficiente. No obstante, y dado que la inserción del gen se hace de forma aleatoria, a menudo la proteína no se expresa, o bien la célula aceptora acaba muriendo por inserción en un gen crucial. Más grave aún es la aparición de cáncer impulsada por la activación de un oncogén o por la inactivación de un gen supresor de tumores y/o proapoptótico al realizar la inserción. En el caso de que la expresión de la proteína terapéutica no necesite ser permanente, se realiza la introducción del gen de forma transitoria, episomalmente. Un buen ejemplo de este tipo de tratamientos es el empleado en células cancerosas, que una vez neutralizadas dejan de requerir esa expresión.

La transferencia del material genético al interior de la célula diana se realiza mediante un sistema de introducción determinado que, junto con los promotores específicos que aseguran la expresión del gen deseado, garantiza la eficiencia del proceso. Esta transducción o transfección puede realizarse mediante métodos físico-químicos o a través de vectores virales.

Los métodos de transfección físico-químicos emplean plásmidos como el vehículo introductor de la secuencia génica de interés y son sencillos, económicos y no tóxicos ni inmunogénicos, a la par que no limitan el tamaño del inserto. No obstante, la eficiencia de la transducción conseguida es baja. Por ello, el método más empleado para conseguir una buena eficacia en la integración del material genético en la célula diana son los vectores virales. Estos vehículos se consiguen eliminando ciertos genes del genoma vírico, de modo que se permite la inserción del gen terapéutico en él a la vez que se neutraliza la capacidad del virus de replicarse (que no la de infectar). El tamaño del inserto se ve así fuertemente condicionado al tipo de vector que se emplee y, si bien la eficacia de la transducción es muy elevada (en ocasiones alcanza el 100% de las células diana), siempre existen riesgos asociados a la transferencia y expresión del genoma vírico. Esto es, transferencia del virus original sin alterar, reacción inmunológica contra el virus en el organismo huésped, o activación de oncogenes o virus patógenos por recombinación con el genoma del receptor.

En un principio, la terapia génica fue ideada como tratamiento de las enfermedades monogénicas, en las que un único gen es el causante de la patología, por ausencia (sea total o sea por síntesis errónea) de la proteína para la cual codifica. En función del papel que dicha proteína tenga en el organismo, la patología puede ser desde muy grave a leve. Son enfermedades en las que los tratamientos clásicos no funcionan o, si funcionan, no lo hacen de una forma efectiva totalmente y sí con complicaciones adicionales.

Cabe citar que en este tipo de enfermedades el gen defectuoso se encuentra en todas las células del organismo, si bien su expresión diferenciada en los distintos tejidos permite que la terapia génica sea perfectamente plausible si se dirige a ellos. La introducción de una copia del gen funcional en estos tejidos y su expresión durante un tiempo determinado ayudará a paliar la enfermedad. La cura completa de la misma sólo se dará si el gen mutado es corregido, cosa que la terapia génica puede realizar introduciendo el gen normal en el organismo.

Los criterios que permiten considerar una enfermedad (humana) como tratable a través de terapia génica son:

- La vida del paciente debe estar siendo amenazada por la enfermedad.
- Debe tenerse bien caracterizados los órganos afectados por la enfermedad, así como sus tejidos y la tipología de sus células.
- El gen normal debe haber sido caracterizado y clonado.
- El gen terapéutico puede ser introducido de forma cuantitativa (y válida para el tratamiento) en las células del tejido enfermo, o bien, a través de su introducción en tejidos más accesibles como la médula ósea, mejorar la sintomatología.
- La proteína normal ha de ser producida en las cantidades que se esperan de una expresión normal del gen.

### **Sobre el ciclo celular y recombinación homóloga:**

Tanto los organismos procariotas como los eucariotas basan su existencia y supervivencia en el fenómeno de la reproducción celular, a través del cual se replica el material genético específico del individuo y se garantiza así su perduración en el tiempo y espacio, en otro espécimen derivado del primero, o hijo, y con mínimas pero a veces significativas variaciones en su genoma.

En los organismos eucariotas la división se da de un modo distinto a los procariotas, y puede ser mitótica o meiótica. La primera está diseñada y orientada al recambio de células muertas o en vías de desaparición, para el mantenimiento de los distintos tejidos y sus

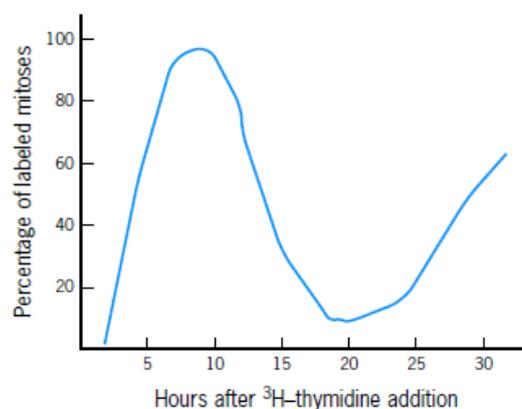
funciones en el organismo. La segunda existe para garantizar la transmisión correcta de la información genética de padres a hijos, y hacer posible no sólo la supervivencia de las especies, sino su constante evolución hacia formas de vida más complejas y/o adaptadas al medio.

Antes de pasar a describir los mecanismos por los cuales se da esta variabilidad que explica los fenómenos tanto de la reparación del DNA como de la selección natural, conviene hacer un pequeño repaso del ciclo que una célula atraviesa durante su vida, y los actores y actrices que en él intervienen.

La reproducción celular o división comprende varias etapas que se repiten de forma continua y cíclica, independientemente del tejido, hasta que la célula en cuestión envejece y deja de poder reproducirse. Otros tipos de células más altamente diferenciadas a linajes más especializados no sufren división, o si la sufren, es sólo bajo determinadas condiciones o estímulos de cara a realizar la síntesis del DNA. Estas fases por las que las células pasan son, a grandes rasgos, **la interfase y la mitosis**.

La mitosis, gran conocida, supone la separación interna del material genético en dos núcleos, por un lado, y la separación del material citoplasmático en dos células hija con sus respectivos núcleos, después.

En la interfase, la célula recién dividida comienza su crecimiento y desarrollo normal (G1) hasta alcanzar el punto en el que se favorece y permite la síntesis de nuevo DNA a partir del parental (fase S). La duración de esta replicación del material genético puede determinarse de forma directa como el porcentaje (aproximado) de células que se encuentran en esa fase en un momento determinado, y en un cultivo asíncrono. A continuación, la célula atraviesa una fase previa a la división mitótica (G2) cuya existencia y duración se pueden demostrar mediante marcaje con timidina tritiada (Karp, 2011):



**Resultados experimentales que demuestran que la replicación ocurre durante un periodo concreto del ciclo celular.** Se cultivaron células HeLa durante 30 minutos en un medio marcado con timidina tritiada y después incubadas durante distintos tiempos en medio sin marcar y apto para autorradiografía. En cada cultivo se buscaron células que en el momento de la fijación estuvieran en mitosis, y el porcentaje de ellas se incluyó en la gráfica. Extraído de *Cell and molecular biology: concepts and experiments*. Gerald Karp, 7th edition. John Wiley and Sons, Inc.

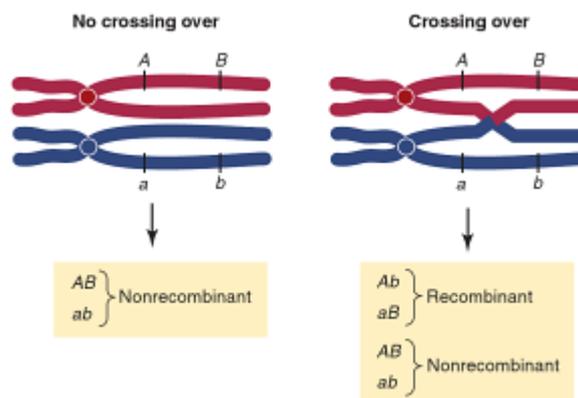
No cabe aquí profundizar en la complejidad del proceso mitótico, pues el objetivo marcado en el trabajo de laboratorio que esta memoria contiene queda fuera de esa etapa, más concretamente en la interfase. En mitad de ella, tal y como se ha citado, tiene lugar la replicación del DNA, cuyo modelo aceptado actualmente es el semiconservativo, planteado por Watson y Crick en su ya mítico artículo, y corroborado por Meselson y Stahl más tarde.

El proceso de replicación está impulsado por las enzimas DNA polimerasas, que poseen tanto actividad de síntesis (en ambas hebras, a través de distintos mecanismos) como funciones de desenrollamiento del DNA, ligación de fragmentos separados, etc.

Junto a esta vital etapa, cuya regulación es seguida de forma estricta por toda la maquinaria de replicación implicada, se da la reparación del DNA. El DNA se encuentra muy expuesto a la alteración por las condiciones del medio, sean radiaciones ionizantes, altas temperaturas, etc., las cuales generan cambios en su estructura que a su vez pueden afectar a la función de la proteína que codifican. Estos cambios son errores que aceleran el envejecimiento de la célula, la transforman en una tumoral, y/o se transmiten a las generaciones siguientes, perpetuando el fallo genómico. Dada la alta tasa de mutaciones que el ácido desoxirribonucleico sufre, es clara la necesidad de existencia de mecanismos que pongan remedio a la mayor parte de estos errores y eviten, así, la aparición de patologías que pueden alterar gravemente la homeostasis celular. El conjunto de estos mecanismos implicados en la reparación del DNA abarca desde la escisión de nucleótidos y su reparación (NER) hasta el arreglo de las roturas de la doble cadena (DSB), pasando por la escisión y sustitución de bases (BER) y la reparación de uniones deficientes que alteran la geometría de la molécula de DNA (Karp, 2011).

Es precisamente la segunda vía de reparación citada la que atañe a este trabajo, y se explica necesaria por la existencia y actuación de partículas y radiaciones de alta energía (también algunos compuestos químicos) que atraviesan la materia (el DNA, en este caso), alterando sus enlaces y fragmentándolos. En el caso del presente trabajo, dichas roturas son inducidas a través de nucleasas especialmente diseñadas para ello, las TALEN, de las que se hablará con brevedad más adelante. Los modos que la célula tiene de reparar esta rotura de la doble cadena helicoidal son la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la **recombinación homóloga (HR)**, la piedra angular y punto de partida del presente trabajo, y de la cual se hace a continuación una breve reseña histórica.

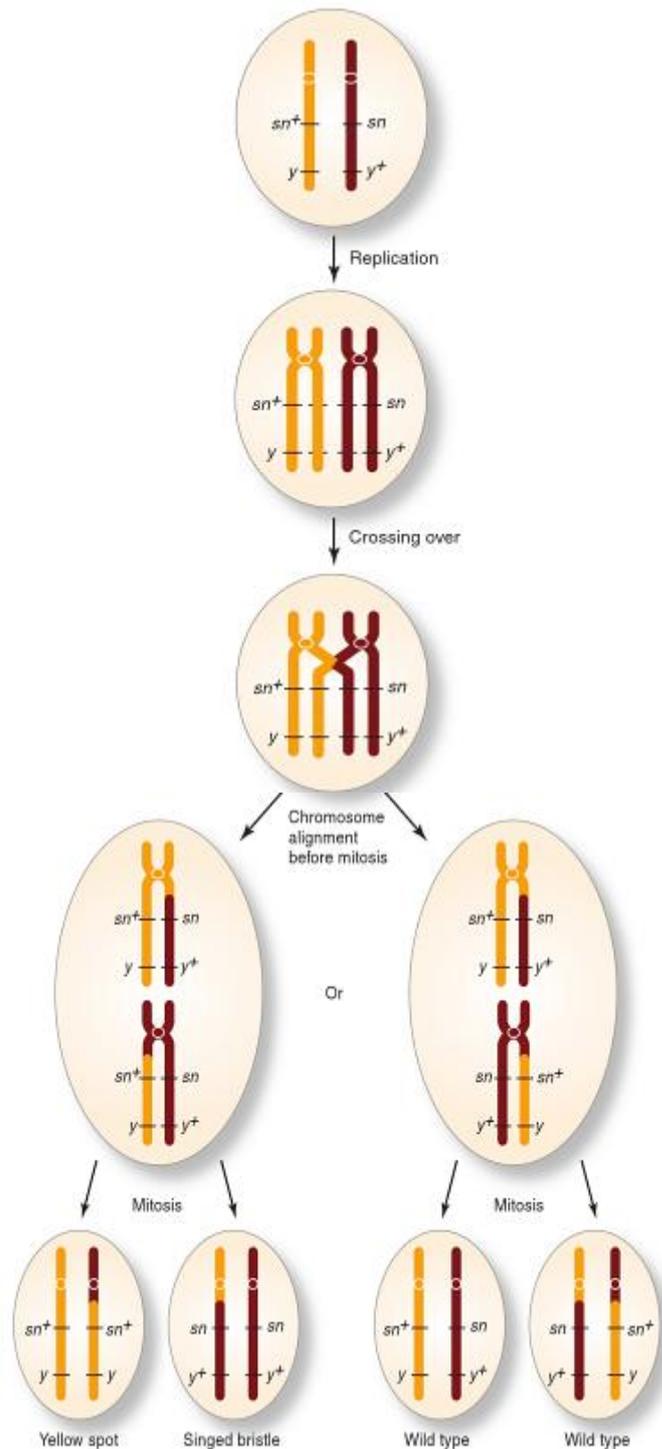
Los pioneros estudios de Gregor Johann Mendel acerca de la independencia de la herencia de los caracteres hereditarios removieron y resituaron, tras su redescubrimiento, los cimientos del mundo de la biología. Sin embargo, estudios posteriores demostraron la existencia de excepciones a esta tercera ley de Mendel (William Bateson, Edith Rebecca Saunders y Reginald C. Punnett), y localizaron la causa de esa herencia conjunta de caracteres físicos distintos (Thomas Hunt Morgan). Se concretó así que existía un *entrecruzamiento* o *crossing over* mediante el cual los cromosomas intercambiaban fragmentos durante la etapa de recombinación meiótica, dando lugar a gametos de mayor diversidad génica (Tropp, 2011).



**Genes no ligados y ligados.** (a) El no entrecruzamiento de los genes A y B genera únicamente gametos no recombinantes. (b) El entrecruzamiento de los genes A y B genera los gametos recombinantes Ab y aB, además de los no recombinantes.

Extraído de *Molecular Biology: genes to proteins*. Burton E. Tropp.

Morgan también sugirió que la distancia entre los fragmentos intercambiados influía en la frecuencia de dicha recombinación, cosa que quedó corroborada al construir Alfred H. Sturtevant un mapa de conexiones que relacionaba esa frecuencia y mostraba más claramente el orden y espaciado de los genes en el cromosoma X de la *Drosophila melanogaster*. Curt Stern demostró que también durante la mitosis tenía lugar esta recombinación entre fragmentos homólogos de distintos cromosomas (no cromátidas hermanas), pues se generaban células somáticas de distintos genotipos (Tropp, 2011).



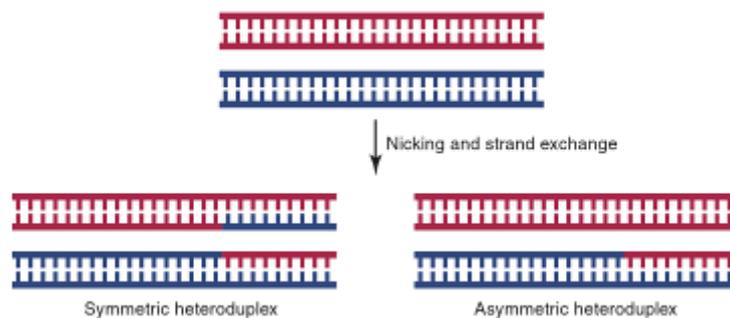
**Entrecruzamiento mitótico.** Los cromosomas homólogos en profase se muestran en amarillo y granate. Un raro entrecruzamiento de dos cromátidas no hermanas puede llevar a la homocigosis de los genes recesivos *y* (amarillo) y *sn* (granate). Esto genera una célula hija homocigótica recesiva para *sn* (*sn/sn*).  
 Extraído de *Molecular biology: genes to proteins*. Burton E. Tropp, 4th edition. Jones & Bartlett Learning, LCC.

En la levadura y otros muchos hongos se observa, para mayor apoyo a todos esos estudios, cómo la frecuencia del genotipo generado en sus esporas a través de la meiosis, varía a menudo, en una segregación irregular conocida como *conversión génica*.

Este concepto, acuñado por Hans Winkler, permitió más tarde diseñar modelos que explicasen la recombinación homóloga, en la cual tiene su origen.

El primero de estos modelos fue el propuesto por Robin Holiday (1964) para explicar la recombinación homóloga durante la meiosis. Supone que una endonucleasa realiza sendas incisiones simétricas en dos cadenas de un par de cromosomas homólogos pero con cierta divergencia en la secuencia de DNA. Tras esto, se genera un entrecruzamiento de las hebras de ambos cromosomas y la ligación de esas uniones, generándose la llamada *estructura de unión de Holiday*, una intersección de las distintas cadenas que tiene cuatro grados de libertad y puede moverse en un proceso conocido como *migración de la bifurcación* o *branch migration*. El movimiento de este nudo puede, además, sufrir isomerización, de modo que la resolución en dirección este-oeste no genera recombinación génica, mientras que el movimiento del empalme en dirección norte-sur implica la alteración del genotipo original. En cualquier caso, dicho desplazamiento amplía la zona de heterodúplex generada al darse el entrecruzamiento de Holiday, y genera (o no) entrecruzamientos génicos en los cromosomas (Tropp, 2011).

Este modelo falla al explicar las recombinaciones no simétricas que tienen lugar en algunos casos, en las que el intercambio del fragmento se da sólo por participación de uno de los dúplex de DNA, generándose un único heterodúplex asimétrico que se explica mediante otro modelo, el de la *invasión de hebra*, descrito por Matthew Meselson y Charles Radding (1975).



**Heterodúplex de DNA simétricos y asimétricos.** Los heterodúplex de DNA que están localizados en la misma región de dos cromátidas hermanas se denominan simétricos, mientras que los que ocupan esa región en una única cromátida se llaman asimétricos. Ambos pueden formarse durante la recombinación homóloga. La migración de la bifurcación también puede originar heterodúplex simétricos. Los asimétricos se forman sólo en uno de los dos dúplex participantes, y se forman por invasión de hebra.

Extraído de *Molecular biology: gens to proteins*. Burton E. Tropp, 4th edition. Jones & Bartlett Learning, LLC.

En este modelo, que mantiene cierta analogía con el anterior, se introduce un único corte en uno de los homodúplex de DNA. El extremo 3' crece por acción de la DNA polimerasa, lo cual provoca el desplazamiento del extremo 5' (al otro lado del corte) y la invasión del mismo en el otro homodúplex de DNA, por su homología. Esto genera un *lazo-D* en este segundo dsDNA. Este lazo es procesado y eliminado, quedando los dos dúplex de DNA unidos por una hebra única, y habiéndose generado sólo un heterodúplex como consecuencia de la invasión de la hebra (he aquí la asimetría). La ligación de la cadena en crecimiento por la DNA polimerasa con la hebra restante de la segunda dsDNA genera la *intersección de Holiday* antes introducida, que puede migrar tal y como se vio. Este modelo permite explicar tanto la formación de heterodúplex simétricos como asimétricos, de modo que tiene una mayor aplicabilidad a más tipos de organismos.

No obstante, este modelo no explica cómo las DSBs son reparadas por la recombinación homóloga (que se sabe que es favorecida por este tipo de roturas), y sugiere que la cadena rota actúa como donador de la información genética, cuando está demostrado que su función es la de receptora. Además, se ha comprobado que el extremo de la hebra invasora es 3'-OH, y no 5'-P, como este último modelo afirma (Tropp, 2011).

Estas incongruencias llevaron al desarrollo de nuevos modelos basados en la iniciación de la recombinación homóloga como consecuencia de la aparición de una rotura de la doble cadena de DNA. Dichos modelos se basaron en experiencias en las que la inclusión de un plásmido con genes determinados de levadura (pero sin maquinaria de replicación) se integraban en el DNA cromosómico de levaduras, y lo hacían en mayor proporción si se realizaban DSBs en sus secuencias.

Así pues, el modelo se denominó (Jack Szostak et al., 1983) de *reparación de la rotura de la doble cadena* (DSBR), y es el que de entrada se asumió como paradigma en el estudio que aquí se detalla. El modelo supone que la rotura de la doble hebra de DNA y el posterior procesamiento de sus extremos (*resección*) genera dos hebras únicas con extremos 3'-OH. Uno de estos extremos invade la región homóloga de la otra doble cadena de DNA, generándose el *lazo D* y el heterodúplex correspondiente. La DNA polimerasa elonga la cadena de DNA desde ese extremo 3'. El lazo D alcanza la otra hebra única con un extremo 3'-OH libre y se alinea con él. Se da la síntesis de DNA desde dicho 3' y la ligación de los fragmentos de DNA. Se generan, así, dos intersecciones de Holiday, que se resuelven independientemente dando o no entrecruzamiento. El éxito de este modelo se refleja en su concordancia tanto en los modelos meióticos como mitóticos, en los que más tarde fue comprobado, en efecto, que la rotura de la doble cadena del DNA es la iniciadora de la recombinación homóloga.

Pero, ¿cómo se incorpora el fenómeno de la recombinación homóloga —y la *unión de extremos no homólogos* (NHEJ)— en el ciclo celular? Se ha visto la vital importancia que estos mecanismos tienen a la hora de preservar la integridad del genoma celular, pero no se ha hecho aún referencia al punto del ciclo celular en el que cada uno actúa y a qué factores llevan a la elección de un mecanismo u otro.

Así pues, para que la recombinación homóloga tenga lugar, dos factores han de coincidir en el tiempo y espacio (Tropp, 2011):

- Debe darse un evento iniciador del proceso, típicamente una rotura de la doble hebra de DNA o el colapso de la horquilla de replicación.
- Debe existir un dúplex de DNA homólogo al fragmento de DNA dañado que sirva como elemento donador en la recombinación que tendrá lugar.

En primer lugar, es necesario apuntar la baja frecuencia con que las roturas de la doble hebra del DNA se dan en el genoma de un modo espontáneo (en levaduras, menos de un evento por ciclo), si bien puede aumentar en presencia de un entorno ionizante o ante el ya citado colapso de la horquilla de replicación.

En segundo lugar, cabe añadir que la disponibilidad de un fragmento de DNA homólogo que permita que se lleve a cabo la recombinación varía con la etapa del ciclo celular y con la ploidía de la célula en cuestión. Otros factores, como la compartimentación del núcleo, la estructura de la cromatina en el instante y la cercanía de las regiones donante y receptora, también influyen.

Los dos mecanismos de reparación se diferencian en la eficiencia con que actúan a la hora de reparar el material genético y en el patrón que requieren. NHEJ modifica los extremos del DNA fracturado y los une con una mínima o inexistente homología, lo cual genera inserciones

o deleciones en la cadena. HR emplea una secuencia de DNA homóloga a la original (la de la cromátida hermana o cromosoma homólogo) para restaurar completamente el material genético alterado. Así, la elección de una u otra vía determina la fidelidad de la reparación, y con ella el envejecimiento y/o la tumorigénesis en la célula.

Si bien se desconoce el mecanismo exacto por el cual se da la elección entre estas dos vías de reparación, se sabe que en parte está determinada por la fase del ciclo celular. Esta dependencia se observó por vez primera al analizar la sensibilidad de células de gallina *DT40*, deficientes en factores de NHEJ o HR, a radiación ionizante (Takata, Sasaki, Sonoda, Morrison, Hashimoto, Utsumi, et al. 1998). Los carentes de factores de NHEJ se mostraron muy sensibles en las fases G1 y S temprana, mientras que los carentes de factores de HR desarrollaban sensibilidad en S/G2. Posteriores estudios en líneas celulares *CHO* de hámster con mutaciones en los genes encargados de reparar las DSBs mostraron una disminución generalizada de la reparación en todas las fases del ciclo, en el caso de las células deficientes en NHEJ (Hinz, Yamada, Salazar, Tebbs, Thompson, 2005). Las deficientes en HR mostraron este error en las fases S, G2 y M. De aquí se dedujo que NHEJ predomina en G1, mientras que en S, G2 y M actúan ambos.

La tasa de eficiencia de un mecanismo u otro en las distintas etapas del ciclo celular se ha comprobado en fibroblastos humanos inmortalizados (mantienen intacto el ciclo celular y su regulación). El resultado de este estudio (Mao, Bozzella, Seluanov, Gorbunova, 2008) fue contrastar fuertemente con la creencia hasta el momento vigente de que la recombinación homóloga (HR) predominaba en las fases S, G2 y M, pues se concluyó que la unión de extremos no homólogos (NHEJ) es la predominante en esta estirpe celular en cualquier fase del ciclo. La HR adopta una tasa de eficiencia más elevada (por debajo de la de NHEJ, aun así) en la fase S.

Se tienen pues una serie de requerimientos básicos para que la reparación de las roturas de la doble cadena de DNA tenga lugar, a los cuales hay que sumar la regulación en cada etapa del ciclo celular, que permite una **recombinación homóloga más eficiente en S**, y su supresión y disminución de la efectividad en las **fases G1 y G2, respectivamente, momento en el que se da la unión de extremos no homólogos** en mayor proporción.

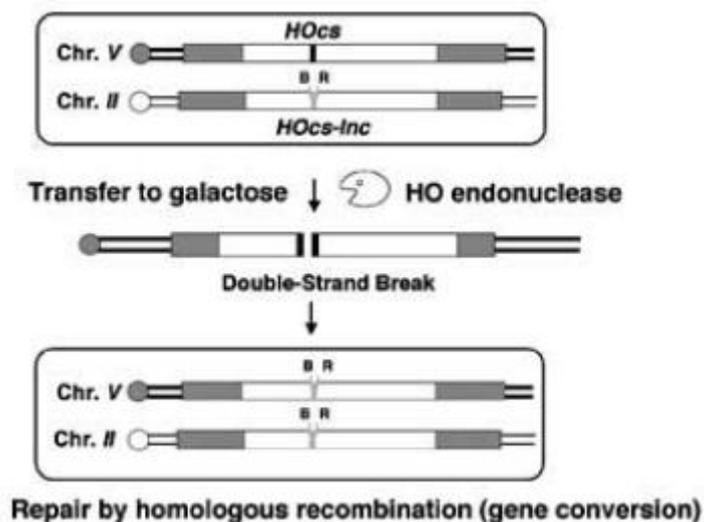
Otro buen modelo para el estudio de la regulación de la recombinación homóloga en el ciclo celular es la levadura. En ella, y en general en cualquier ciclo celular, el paso por cada fase está fuertemente regulado por las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). En la levadura, la Cdc28 es la que mayor peso tiene en esta regulación, y sus niveles son altos y constantes durante todo el ciclo. El control de la actividad catalítica de esta proteína está determinado por su afinidad y unión a las ciclinas (hasta 9 clases, tres de G1 y 6 de tipo B), unas inestables proteínas cuyos niveles transcripcionales y de proteína sí fluctúan fuertemente a lo largo del ciclo celular.

Ahora bien, ¿dónde está la relación de esta regulación del ciclo celular con el fenómeno de la recombinación homóloga?

Estudios (Mathiasen, Lisby, 2014) realizados con mutantes condicionales de Cdc28 muestran cómo una ausencia o defecto de esta proteína conllevan defectos en la estabilidad de los cromosomas mitóticos y en la transmisión del DNA mitocondrial, así como sensibilidad aumentada a la radiación, error al tratar de realizar la resección de las roturas en la doble hebra de DNA (y por ende activación de la recombinación homóloga) y, en general, una mayor sensibilidad a sufrir daños crónicos en el DNA. Se sugiere así un rol de Cdc28 en la reparación del DNA controlada por el ciclo celular.

Para ilustrar y corroborar esta relación, es interesante acudir a un estudio del departamento de microbiología molecular y biotecnología de la Universidad de Tel Aviv en el que se encontró una clara conexión entre la reparación de DSBs mediante una u otra vía y la etapa del ciclo celular (Aylon, Liefshitz, Kupiec, 2004).

Se diseñaron cepas haploides de *Saccharomyces cerevisiae* en las que existen dos copias del gen *URA3*. Las copias se localizaron en el cromosoma V (portando el sitio de reconocimiento específico para la endonucleasa *ura3-HOcs*) y en el cromosoma II (aquí el gen estaba flanqueado por dos sitios de restricción, y poseía también una mutación puntual de base, *ura3-HOcs-inc*, que evita el reconocimiento de la enzima). En este planteamiento, el gen de la endonucleasa se encuentra bajo el control transcripcional de un promotor inducible por galactosa, de modo que al colocar un medio rico en este monosacárido se genera en cada célula del cultivo una ruptura de la doble cadena de DNA (DSB) en el gen V. Es entonces cuando la recombinación homóloga entra en juego, y se encarga de reparar el DSB usando como modelo de homología el gen *URA3* del cromosoma II, intacto aún. Durante este proceso se copian tanto los sitios de restricción como la mutación *ura3-HOcs-inc*, dándose la típica *conversión génica* de la recombinación homóloga antes citada.



Además, y dado que la secuencia que sirve como molde para la recombinación se encuentra presente en la célula durante todo el ciclo celular (cromosoma II), se procede a investigar cómo afecta cada fase del ciclo al proceso de reparación. Esto es, se detiene en G1 o G2 (con factor alfa o nocodazol, respectivamente) y se induce la DSB en galactosa. Una vez realizado el corte, se puede mantener el bloqueo, o dejar a las células detenidas en G1 que avancen sincronizadas hacia S, G2, etc, con vistas a observar la cinética de la reparación.

Se observa a través de Southern blot cómo las células sincronizadas en G1 y las detenidas en G2, tras sufrir la DSB, comienzan a recuperar rápidamente la cantidad inicial de cromosoma V intacto, a la par que las bandas correspondientes a la rotura desaparecen con el tiempo. Por el contrario, las células detenidas en G1 permanecen con el cromosoma V defectuoso a lo largo de todo el experimento, si bien un porcentaje nada despreciable de ellas se observa intacto, lo cual sugiere la existencia de otro mecanismo de reparación del daño en el DNA. Sólo una pequeña proporción de estas células detenidas en G1 muestran conversión génica (existe siempre la posibilidad de que escapen algunas al bloqueo).

Puede cuantificarse la porción de células que han sufrido (o no) la recombinación homóloga en función de si portan (o no) los sitios de restricción característicos del cromosoma II, pero en el V.

Se observa además que un medio rico en glucosa que inactiva a la endonucleasa lleva a la reparación, en el caso de las células bloqueadas en G1, por simple unión de los extremos cortados del cromosoma V.

Otra conclusión del trabajo es que los extremos de la DSB no sufren procesamiento en la fase G1, lo cual indica que la resección y por tanto el comienzo de la recombinación homóloga no se da en dicha fase. Esto entra en concordancia con lo anteriormente expuesto.

Podrían enunciarse más relaciones sobre la integración de los mecanismos de reparación del DNA (y en concreto de la recombinación homóloga) en el ciclo celular, y tratarlas de un modo más complejo. Sin embargo, el hecho que interesa a la hora de plantear el trabajo de laboratorio realizado es en esencia la base explicada en esta introducción. Dicho punto de partida puede resumirse en lo siguiente:

1. Existen pruebas fehacientes de que la recombinación homóloga se da en su práctica totalidad en la fase S/G2 del ciclo celular.
2. La recombinación homóloga se activa en respuesta a daños en la doble cadena de DNA, como las DSBs, sean espontáneos o inducidos por radiaciones o enzimas externos.

El instrumento elegido en el laboratorio para realizar ese corte de la doble hebra de un modo controlado son las nucleasas TALE (TALENs).

Las proteínas TAL (*transcription activator-like effectors*) son secretadas por la bacteria *Xanthomonas* cuando infecta plantas. Estas proteínas pueden activar la expresión de genes de la planta mediante el reconocimiento y ligación a secuencias promotoras en el vegetal huésped, a través de un dominio central de repetición que consiste en un número variable de aproximadamente 34 aminoácidos repetidos. Los residuos en las posiciones duodécima y trigésima de cada repetición son hipervariables. Hay una conexión uno a uno entre estos dos aminoácidos en cada repetición y cada base de DNA en la secuencia objetivo.

Los efectores TAL han sido utilizados para crear herramientas de edición genómica específicas de sitio mediante la fusión de dichos efectores específicos de secuencia objetivo a nucleasas (TALENs), factores de transcripción (TALE-TFs) y otros dominios funcionales. Estas proteínas de fusión pueden reconocer y unirse a secuencias concretas de un cromosoma con alta especificidad. Una vez unidas, llevan a cabo sus funciones de edición genómica, tales como *knockout*, *knockin* (necesario un plásmido donante, como para el caso tratado en este trabajo), modificación, activación, represión, etc. Los dominios efectores TAL reconocen nucleótidos aislados, lo cual permite la investigación orientada a secuencias concretas deseadas, sean cuales sean (extraído de GeneCopoeia, [genecopoeia.com/product/talen-tal-effector](http://genecopoeia.com/product/talen-tal-effector)).

Las nucleasas TAL pueden combinarse con un método de sincronización del ciclo celular, y es precisamente éste el objetivo del trabajo. La sincronización de una población de células en una fase concreta del ciclo celular es útil en la investigación de eventos celulares característicos de dicha fase o en la extracción de factores cuya expresión depende de esa etapa concreta. Así, las células sincronizadas son “obligadas” a seguir el ciclo celular de forma homogénea, al contrario de lo que su naturaleza asíncrona dictaría. En este aspecto, pueden diferenciarse el bloqueo de células en un determinado estadio del ciclo (la población celular es mayoritariamente homogénea, si bien puede conllevar la muerte celular) y la sincronización como tal (genera una población enriquecida en una única fase del ciclo celular, y permite a las células continuar ciclando una vez se retira el agente sincronizador, y tras un tiempo concreto).

Existen métodos químicos que permiten la sincronización del ciclo en fases como G1, S y M. Emplean técnicas cuya metodología radica en la bioquímica y biología de la célula

eucariota, tales como la depleción selectiva de nutrientes, la adición de un exceso de nutrientes, el uso de un agente químico bloqueador (lovastatina, mimosina, nocodazol) o el de diferencias morfológicas (agitación de células adherentes en fase mitótica).

Los agentes químicos que inhiben la progresión a lo largo del ciclo celular son efectivos en una gran variedad de tipos celulares y con un mínimo de requerimientos, por lo que se emplean principalmente como métodos de sincronización celular. Sin embargo, poseen el inconveniente de que el tratamiento químico puede generar cierta disrupción del ciclo celular normal (Jackman, O'Connor, 1998).

De los posibles métodos que conllevan el uso de agentes químicos para la detención del ciclo en la fase G1 (en la cual conviene tener a las células para la observación del fenómeno de la recombinación homóloga), se decide emplear el del doble bloqueo de timidina por ser, en comparación con el resto (aficolidina, hidroxurea, lovastatina, mimosina) menos tóxico y más asumible económicamente. Además, este agente químico detiene a las células en la frontera entre G1 y S (como la aficolidina y la hidroxurea), lo cual optimiza el tiempo que habrá de pasar entre la liberación del bloqueo y el comienzo del ciclo celular de forma homogénea para observar fenómenos de recombinación homóloga.

Así pues, el método del doble bloqueo de timidina supone dos exposiciones a altos niveles de timidina, alternadas con un tiempo de recuperación del primer bloqueo. Tras la sincronización y liberación del segundo bloqueo, las células comienzan a ciclar de modo sincrónico, si bien esta homogeneidad no se extiende más allá de un pase del ciclo. El único requerimiento para el uso de este método es que el tipo celular posea un periodo de duplicación de la población de menos de 24-30 horas. El funcionamiento del bloqueo doble con timidina se entiende en el punto de la síntesis del DNA: un exceso de timidina implica una retroinhibición de la síntesis de nucleótidos.

Con este trasfondo, puede plantearse una hipótesis de partida y un plan de trabajo que se oriente a unos objetivos concretos. Estos son:

#### **OBJETIVOS:**

- Cultivo y mantenimiento de líneas celulares adherentes; uso del citómetro de flujo *Gallios* para el seguimiento de los resultados experimentales; manejo y correcto desarrollo del proceso de transfección celular empleando la técnica de liposomas catiónicos (*TurboFect*).
- Conseguir un bloqueo eficaz y fiable de la población de células *RCL-HCT-116-GFPtrunc* (línea celular reportera) mediante un protocolo de bloqueo con timidina. Para ello, es necesario un protocolo de sincronización del ciclo celular en G1/S, que permitirá detener a la gran mayoría de las células en esa fase previa a G2. Al liberar el medio de la sustancia bloqueadora y sustituirlo por medio fresco, las células seguirán libremente a través del ciclo, pero al mismo tiempo, lo cual aumentará en gran medida la porción de células que incorporen el gen de interés por recombinación. La sincronización y los tiempos de liberación de la misma serán seguidas como ya se ha indicado a través de citometría de flujo.
- Conseguir, a través de la introducción efectiva del DNA homólogo en las células *RCL-HCT-116-GFPtrunc*, combinada con las nucleasas TALEN y el bloqueo con timidina, la expresión aumentada de la proteína fluorescente de la proteína GFP, hasta el momento ausente. Dicho aumento se espera respecto del no uso de TALENs o el bloqueo de timidina.
- El objetivo es, pues, realizar un bloqueo del ciclo celular en una población de células en la fase G1/S para, junto con la creación de una DSB a través de nucleasas específicas

de sitio, aumentar la tasa de recombinación homóloga y, con ello, facilitar y mejorar la integración de DNA exógeno que permita reparar defectos en zonas de homología del DNA genómico celular.

## MATERIALES

### 1. PARA EL PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN DEL CICLO CELULAR EN G1/S:

a) **Línea celular HCT-116** de cáncer de colon humano, con un período de duplicación de la población de 21h. Se cultivan en medio **DMEM** (Lonza) suplementado con los siguientes reactivos:

- 1% de **Glutamax** (GIBCO).
- 10% de suero fetal bovino (**FBS**, Lonza).
- 1% de **penicilina** y 1% de **estreptomicina** al 1% w/v (GIBCO).
- 1% de **piruvato** (GIBCO).

b) **Azul de Tripán** (HyClone, ThermoScientific) filtrado en 0,2  $\mu\text{m}$ . Este colorante de exclusión que solo penetra al interior celular en células no viables se utiliza para cuantificar la mortalidad celular de los cultivos.

c) **Tripsina-EDTA** al 0,05% (1X, GIBCO). Se usa para recoger células adherentes en cultivo. Las células **HCT-116** crecen adheridas al plástico, de modo que se tratan con esta solución cuando se necesita pasarlas a un nuevo cultivo. El tratamiento se hace durante aproximadamente 5 minutos comprobando de vez en cuando al microscopio que las células se van separando del plástico (ya que un exceso en el tiempo de tripsinización puede producir elevada mortalidad celular).

d) Se usaron frascos de cultivo (ThermoScientific) de 75  $\text{cm}^2$  y placas de cultivo de 12 y 24 pocillos (ThermoScientific). Todo el material de plástico posee un grado A de esterilización. Las condiciones de la incubadora fueron de 37°C y 5 % de  $\text{CO}_2$ .

e) **Timidina. Solución madre a 100mM** (Sigma-Aldrich); solución de trabajo a 2mM, es la concentración adecuada para el bloqueo del ciclo celular. La preparación de la disolución se hace en PBS estéril, y se conserva a -20°C.

f) **Tampón fosfato salino** (PBS, *phosphate-buffered saline*) estéril de Lonza sin calcio ni magnesio.

### 2. PARA EL ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO:

a) **Alcohol etílico absoluto** (*Davila Villalobos, S.L.*) Se prepara una solución al 80% en agua para fijar las muestras

b) **Tampón fosfato salino** (PBS, *phosphate-buffered saline*) estéril de Lonza sin calcio ni magnesio.

c) **TRITÓN X-100** (Sigma-Aldrich). Solución madre al 10% en agua.

d) **Yoduro de propidio** (IP, Sigma-Aldrich)  $\geq 94.0\%$ .

e) **RNAasa** (Sigma-Aldrich) 100 mg/mL.

e) **Citómetro de flujo Gallios** (Beckman Coulter).

### 3. LÍNEA REPORTERA RCL-HCT-116-GFPtrunc:

a) **Línea celular HCT-116 modificada** para albergar un gen de GFP truncado no funcional. Se mantiene en medio completo con las características antes citadas y con puromicina 1µg/mL como antibiótico de selección. La línea celular se generó con anterioridad en el laboratorio B4 por Alejandra Bernardi.

b) Microscopio óptico con lámpara ultravioleta que permita visualizar la fluorescencia de GFP (Nikon Eclipse TS100).

#### 4. PARA EL ENSAYO DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA:

a) Opti-MEM (1X), Reduced Serum Medium, GIBCO.

b) Plásmido que contiene un fragmento del gen GFP como donante de la recombinación. La construcción del plásmido se llevó a cabo con anterioridad en el laboratorio B4 por Alejandra Bernardi.

c) Dos plásmidos que codifican para una nucleasa TAL 5' y otra nucleasa TAL 3', respectivamente. La construcción de los plásmidos se llevó a cabo con anterioridad en el laboratorio B4.

d) Agente de transfección TurboFect (ThermoScientific).

e) Medio completo descrito antes, pero sin antibiótico.

## MÉTODOS

### 1. PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN DEL CICLO CELULAR EN G1/S:

El método aquí descrito fue optimizado para obtener una mayor eficiencia de sincronización celular en los distintos experimentos y se basa en el tiempo de duplicación de las células HCT-116. Es una modificación del descrito por Jackman y O'Connor (2001) en "Methods for Synchronizing Cells at Specific Stages of the Cell Cycle".

1. Plaqueo de dos pocillos con 600.000 células *RCL-HCT-116-GFPtrunc* por pocillo en placa de seis. Se usa medio completo (MC) y medio completo suplementado con timidina 2mM (MC/thy). El volumen total de cada pocillo es de 3 mL. Se incuba durante 12 horas.
2. Se retira el MC/thy y se tripsiniza durante 5 minutos a 37°C, y realiza el conteo de las células en cada pocillo. Se toma una muestra para el análisis en el citómetro del **efecto conseguido por este primer choque de timidina** (la preparación de la misma se detalla en el correspondiente protocolo más adelante).

3. Se plaquean 50.000 células por pocillo en una placa de veinticuatro pocillos (tres controles negativos y tres muestras tratadas) con un volumen final de 1 mL por pocillo. Se incuban en mc durante 19 horas.
4. PASADO ESTE TIEMPO se sustituye el MC por MC/thy, que se añade lentamente sobre la pared del pocillo para no levantar las células adheridas. Se incuban durante 16 horas.
5. Se retira el MC/thy y se sustituye por MC. Al mismo tiempo, se toma una pequeña muestra para posterior análisis de ciclo celular y para observar el grado de bloqueo obtenido **por el segundo bloqueo de timidina, a tiempo cero.**

Una vez liberado el bloqueo las células entrarán en ciclo de nuevo. Se analizarán entonces a diferentes tiempos tal y como se detalla en el correspondiente protocolo. Los tiempos elegidos son, a parte del **tiempo cero** (nada más retirar el MC/thy), **1,5 y 3 horas**. Esta recogida periódica tiene como objeto seguir el desbloqueo de las células en G1/S y corroborar el momento en el que se liberan y comienzan a ciclar sincronizadas. La elección de estos tiempos se ha hecho de acuerdo a la bibliografía consultada.

## 2. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO:

El análisis por citometría de flujo requiere la preparación de las muestras en suspensión, el tratamiento con etanol al 80% en agua miliQ (fase de fijación) y tratadas con Tritón X-100, RNAasa, yoduro de propidio (fase de permeabilización y entrada del reactivo de tinción del ADN) y suspendidas en PBS. Este protocolo ha sido modificado y adaptado de la práctica correspondiente del máster en Investigación Biomédica del IBGM y su curso de citometría de flujo.

1. Se retira el MC y se tripsinizan (0,5 mL) las células (4-6 minutos). Se inactiva la tripsina con MC (0,5 mL).
2. Centrifugación 5 minutos a 1000 rpm.
3. Se retira el sobrenadante con cuidado de no eliminar el *pellet*. Se resuspende en 1 mL de PBS.
4. Centrifugación 5 minutos a 1000 rpm.
5. Eliminación del sobrenadante.
6. Resuspensión en 1 mL de etanol al 80% añadido gota a gota con agitación suave en vórtex.
7. Mantenimiento de las células a -20°C hasta EL análisis (se pueden mantener a -20°C hasta un máximo de 30 días de la preparación de la muestra).

El día de la lectura en el citómetro se realiza la tinción según el protocolo siguiente:

1. Se centrifuga la muestra a 800 rpm durante 5 minutos y se descarta el sobrenadante.
2. Resuspensión de las células en 700 µL de PBS 1X.
3. Se añaden 7 µL de yoduro de propidio (que ha estado privado de la luz). La concentración final de yoduro de propidio es de 5 mg/mL.

4. Se añaden 7  $\mu\text{L}$  de RNAasa. Esto es necesario para que el yoduro de propidio se intercale únicamente entre las bases del ADN, y sea éste el único ácido nucleico celular medido. Concentración final de 10 mg/mL.
5. Se añaden 7  $\mu\text{L}$  de Tritón X-100 10%. Concentración final 0,1 %.
6. Incubación de las células 50 minutos-1 hora a 37°C en oscuridad (se cubre el eppendorf con papel de aluminio).
7. Se pasan las células a tubos de citometría y se mantienen a 4°C (si el análisis se va a hacer inmediatamente puede omitirse) hasta el análisis.
8. Lectura de la muestra en el citómetro para determinar la fase del ciclo celular en que se encuentran las células.

### 3. TRANSFECCIÓN SIMULTÁNEA DE TRES VECTORES (UN VECTOR GFP DONANTE Y DOS VECTORES PARA LAS TALEN 5' Y 3'):

1. Se sustituye el medio en el que se encuentran las células por medio completo sin antibiótico.
2. Se incuban a 37°C durante treinta minutos.
3. Durante ese periodo de tiempo, se prepara en *eppendorf* la solución de transfección. Las cantidades de plásmidos y la proporción DNA/liposomas se calcularon de acuerdo a las recomendaciones de la siguiente tabla:

Tissue Culture Vessel	Growth Area, cm <sup>2</sup> /well	Media, mL	Adherent cells to seed the day before transfection*	DNA, $\mu\text{g}$ ( $\mu\text{L}$ ***)	Volume of TurboFect ( $\mu\text{L}$ )**	
					Recommended	Range
96-well plate	0.3	0.2	0.5-1.20 $\times 10^4$	0.2 (20)	0.4	0.3-0.6
48-well plate	0.7	0.5	1.0-3.0 $\times 10^4$	0.5 (50)	1.0	0.5-1.4
24-well plate	2.0	1.0	2.0-6.0 $\times 10^4$	1.0 (100)	2.0	1.0-2.8
12-well plate	4.0	2.0	0.4-1.2 $\times 10^5$	2.0 (200)	4.0	2.0-6.0
6-well plate	9.5	4.0	0.8-2.4 $\times 10^5$	4.0 (400)	6.0	4.0-8.0
60 mm plate	20.0	6.0	2.0-6.3 $\times 10^5$	6.0 (600)	12.0	8.0-16.0

\*These numbers were determined using HeLa cells. Actual value depends on the cell type.

\*\*Amount of DNA and TurboFect™ Transfection Reagent used may require optimization.

\*\*\*The volume of the DNA solution should represent 1/10 of the total volume of the culture medium.

Tabla obtenida de ThermoScientific.

Tal como se observa en la tabla, la cantidad de DNA recomendada para una placa de 24 pocillos es de 1  $\mu\text{g}$ , y como se han de introducir hasta tres plásmidos distintos, la cantidad será de 333 ng de cada uno. Las cantidades y el orden utilizado de adición de cada reactivo se resumen en la siguiente tabla:

Reactivo	Concentración	Cantidad	Volumen (x2)
Opti-MEM	-	-	200 $\mu\text{L}$
GFP Donor (MCS)	600 mg/mL	333 ng	1,11 $\mu\text{L}$
TALEN GFP #1	348,2 mg/mL	333 ng	1,91 $\mu\text{L}$
TALEN GFP #2	229,5 mg/mL	333 ng	2,90 $\mu\text{L}$
TurboFect	-	-	2 $\mu\text{L}$

4. Se incuba la mezcla durante 20 min a temperatura ambiente.
5. A continuación, se reparte el volumen de 100  $\mu$ L en cada pocillo de la placa en el que se desea hacer la transfección.
6. Se incuban a 37°C durante seis horas.
7. Tras ese tiempo, se retira el medio de transfección y se sustituye por medio completo fresco. Si el experimento se ha realizado correctamente se espera que aparezcan “células verdes” a partir de las 48 horas de haber realizado la transfección.

4. SE ENSAYARON 3 SITUACIONES: A) TurboFect SOLO (CONTROL NEGATIVO) B) VECTOR GFP DONANTE SOLO C) VECTOR GFP+ TALENS

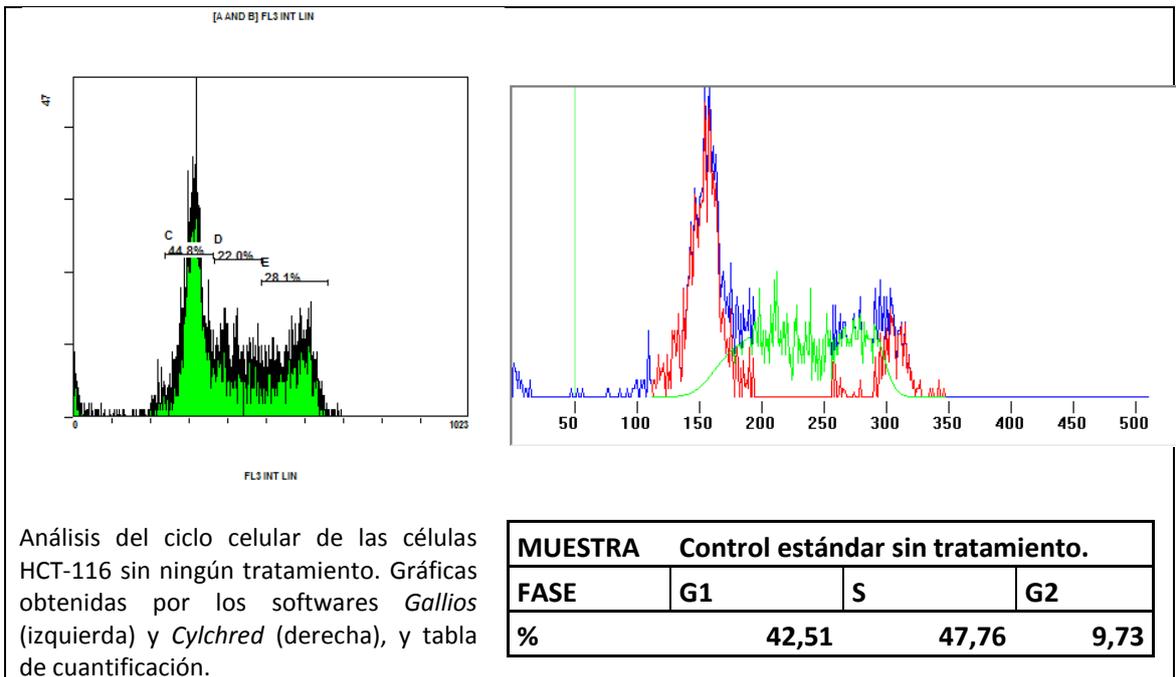
## RESULTADOS

### 1. Detención del ciclo celular y sincronización de células HCT-116. Análisis por citometría de flujo.

El cultivo y mantenimiento de las células HCT-116 es llevado a cabo alcanzando una confluencia del 80-90 % el día de la toma de las células para su sembrado en placa. Las distintas experiencias realizadas se orientaron no sólo a la obtención de una población celular detenida en G1/S, sino también a la comprobación de que la eliminación del medio con timidina permite a las células seguir avanzando en el ciclo, y el tiempo en el que este desbloqueo sucede.

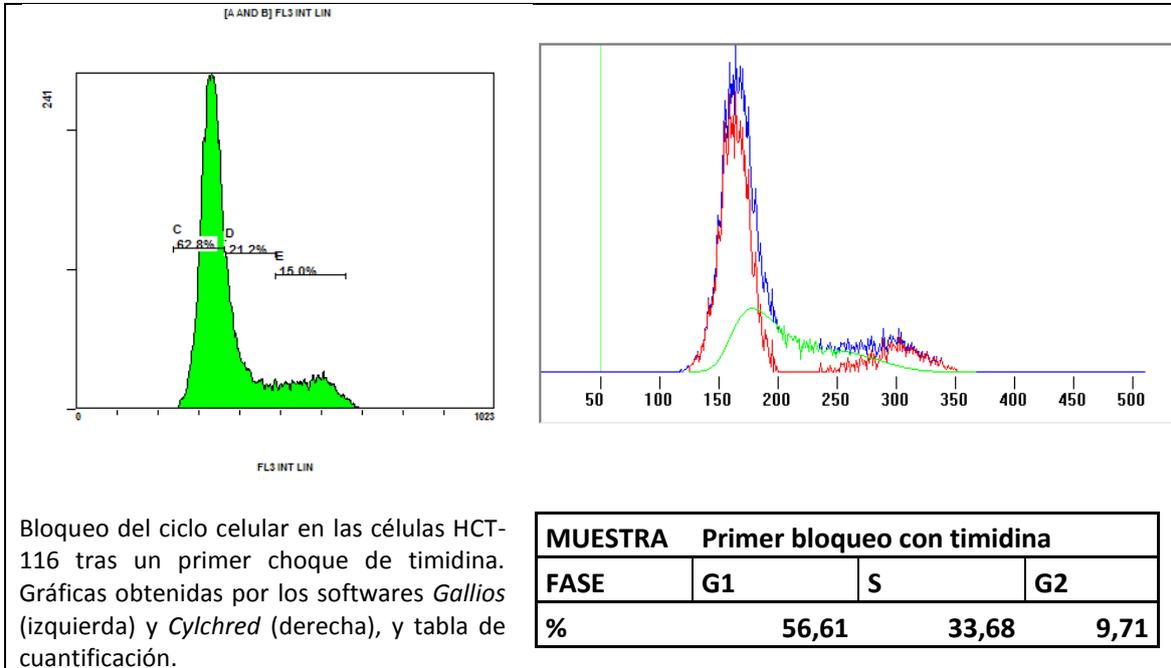
Usando las gráficas y los histogramas proporcionados por el software del citómetro *Gallios*, se cuantificaron los distintos porcentajes de células en una y otra fase del ciclo celular. Dicha cuantificación se hizo a través del software *Cylchred*.

El análisis citométrico de una muestra de células control que no ha sufrido ningún tipo de bloqueo con timidina arroja unos resultados perfectamente comparables con lo esperable de una población celular normal no aneuploide. Esto es, *grosso modo*, un 35-45% en G1, un 45-55% en S y un 10-20% en G2. Puede observarse la variación de unas muestras a otras en las imágenes adjuntas, si bien ésta no supone nunca una desviación de esa gráfica “tipo” que muestra dos picos unidos por la depresión correspondiente a la fase S.

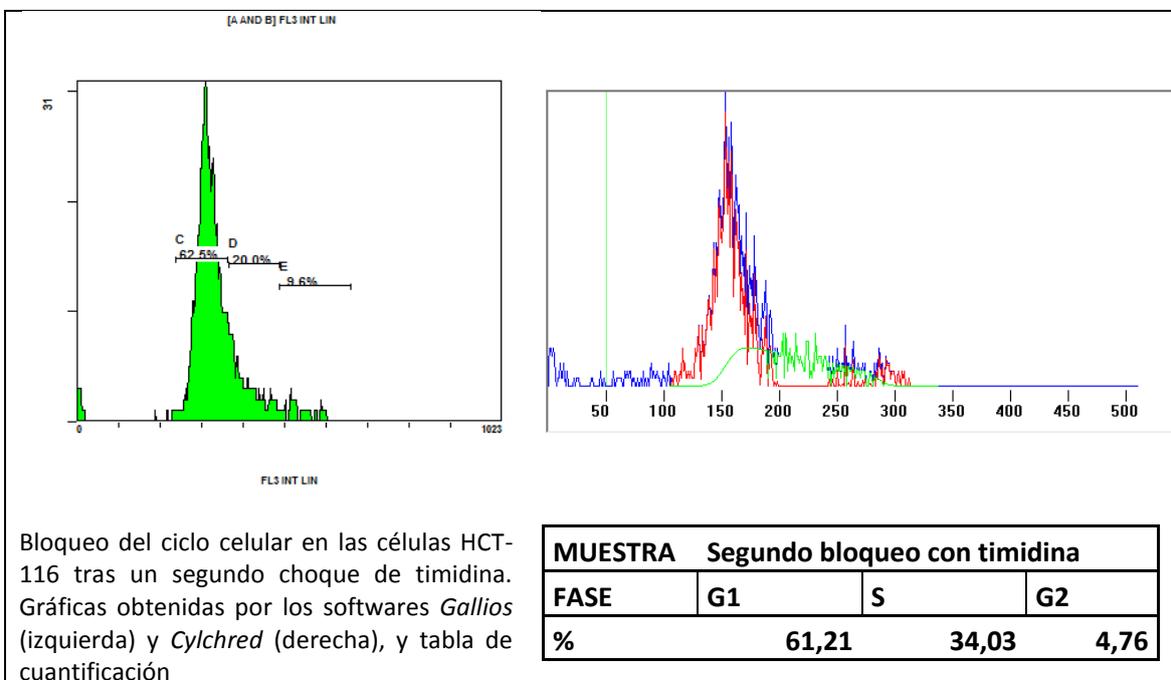


El análisis de las muestras tras recibir uno y dos choques de timidina se realizó del mismo modo, y permitió comprobar la efectividad de dicha molécula a la hora de bloquear el avance en el ciclo celular, si bien la mortalidad debido a su toxicidad también es elevada. Más adelante, se eliminaría del protocolo el segundo choque de timidina para disminuir esa mortalidad y conseguir una población más numerosa y sana de células en G1/S, previa a la transfección (se comprobó que la mortalidad era

muy elevada realizando la transfección tras dos choques de timidina). Esta supresión del segundo bloqueo también encontró apoyo en el hecho de que en los experimentos que sí lo incorporaban no se encontró que se viese aumentado el porcentaje de células en G1/S en gran cuantía, si bien conseguía mantener los niveles conseguidos en el primer choque algo por encima de lo obtenido.

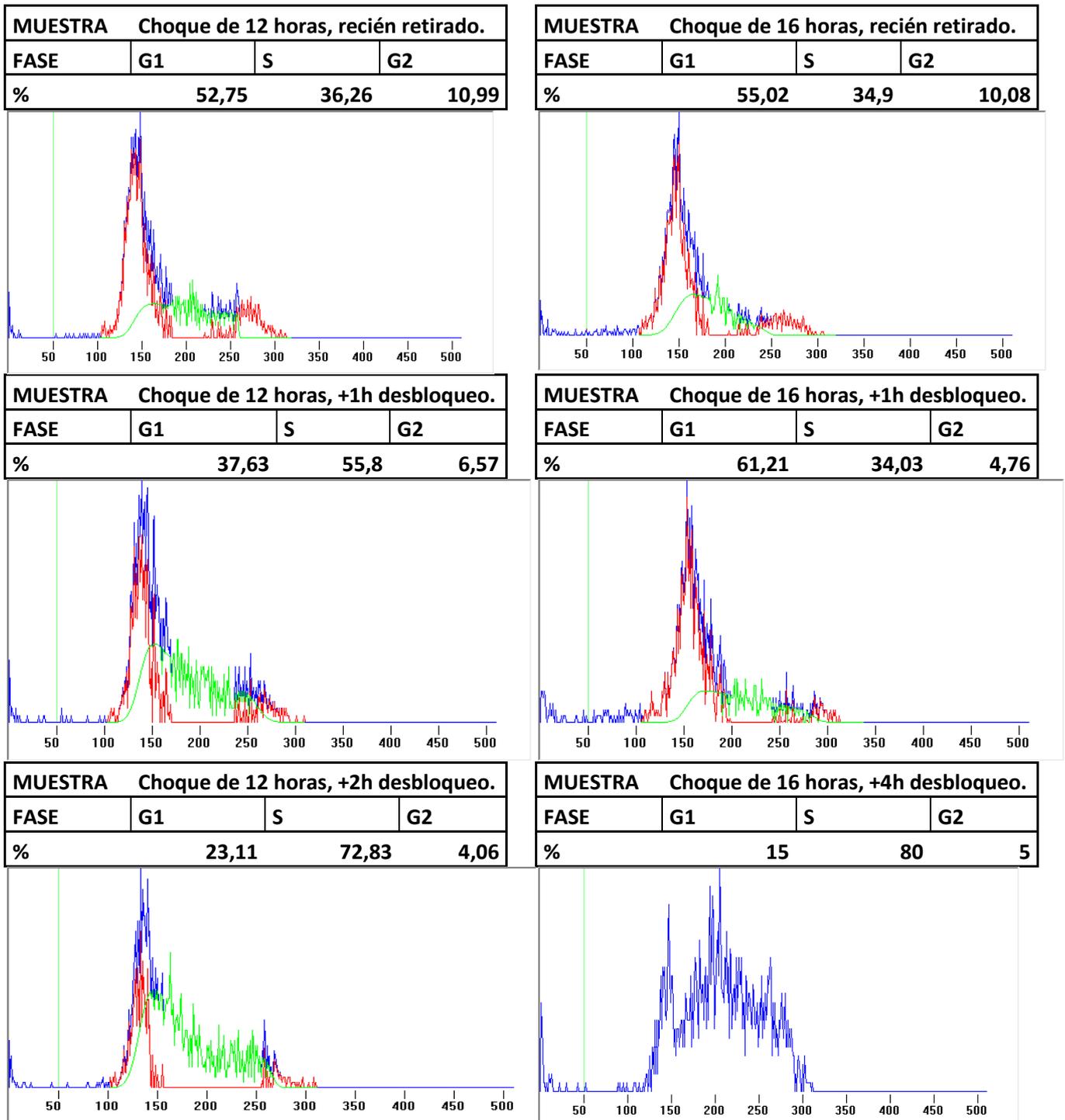


Un segundo choque de timidina proporciona valores, como ya se ha apuntado, algo superiores, tales como el adjunto en la imagen.



La eliminación del segundo choque de timidina se hizo de modo que el choque restante aún vigente en el protocolo compensase en parte la ligera caída de la sincronización que supondría dicha supresión. Para ello, se realizó un experimento de

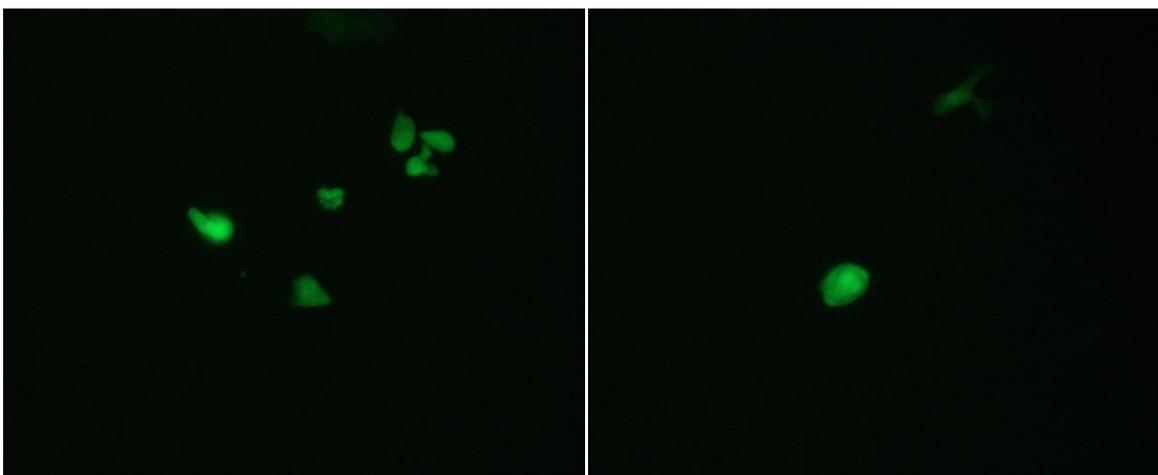
bloqueo con timidina de choque único, pero con dos tiempos diferentes de bloqueo, 12 horas y 16 horas. Los resultados del análisis por citometría mostraron un mayor número de células detenidas en G1/S para el choque de 16 horas frente al de 12 horas. Además, tras la liberación del bloqueo con timidina se observa un rápido descenso del porcentaje de células G1/S, para el choque de 12 horas, mientras que el choque más largo supone, tras la liberación (1 hora después de la misma) una concentración mayor de células en G1/S y un posterior desbloqueo de las mismas y paso a la fase S tras cuatro horas.



## 2. Uso del donante MCS y de TALEN junto con el bloqueo de timidina para llevar a cabo la reparación del gen GFP truncado a uno funcional. Mejora de la tasa de HR frente al no uso del bloqueo celular.

Se diseñaron experimentos en los cuales se usó la línea reportera RCL-HCT-116trunc como células diana para la introducción de ADN homólogo. La metodología empleada fue la detallada en la sección de *Métodos*, y se probaron distintas combinaciones de los ácidos nucleicos (GFP donador –MCS–, TALEN GFP #1, TALEN GFP #2) con el TurboFect, así como con dos choques de timidina entre los cuales se intercala la transfección, o un choque único. Los resultados llevan de nuevo a la necesidad de reducir la toxicidad asociada a la timidina, haciendo un único choque de 17 horas tras el cual se realiza la transfección.

Tras 48 horas, se observan células fluorescentes (GFP funcional) en los distintos pocillos de la placa tratada con timidina y la transfección. El ratio de células fluorescentes fruto del tratamiento con MCS+TALEN frente a las tratadas únicamente con MCS es mayor que la unidad, de lo cual se deduce que la generación de una DSB ha sido beneficiosa para la recombinación homóloga: 90-110 células verdes en el control, y 190-210 en las células tratadas con timidina.



Fotografía superior: células RCL-HCT116 con tratamiento de timidina 2 mM. Fotografía inferior: células control sin tratamiento de timidina.

## DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En la primera parte del trabajo se reproduce y pone a punto un protocolo de sincronización del ciclo celular basado en el tratamiento con timidina. Dada la alta mortalidad observada asociada a dicha sustancia, se procede a seleccionar un tiempo (y concentración) óptimos para la acumulación del mayor porcentaje de células posibles en G1/S: un único choque con timidina 2 mM durante 17 horas. En este choque único se observa que, tras la sustitución del medio con timidina por uno completo normal y fresco, se da la liberación del bloqueo impuesto y algunas de las células que no llegaron a bloquearse en G1/S continúan ciclando hasta acumularse en ese punto. Esto explica el ligero incremento observado una hora después de realizar el desbloqueo.

Este fenómeno está de acuerdo con lo expuesto en la bibliografía consultada para la elaboración del protocolo (Jackman, O'Connor 2001) en el cual se explica cómo las células que no estaban en G1 al inicio del bloqueo, al ser liberadas del medio con timidina siguen ciclando hasta quedar bloqueadas de nuevo en G1/S. Además, el descenso del porcentaje en este choque de mayor duración también se da de modo más paulatino, menos acentuado con el tiempo de desbloqueo. Es por eso por lo que se toma como óptimo el choque de 16 horas (más tarde extendido a 17 horas), y se continúa el estudio con este único choque de timidina.

En la segunda parte del trabajo se lleva a cabo de nuevo el protocolo de sincronización celular, pero se incluye esta vez una transfección de ADN homólogo de GFP y ADN enzimático (TALEN de GFP), tras la liberación del bloqueo. Esto permite comparar el número de células fluorescentes (GFP funcionales) que aparecen tras la introducción del donador de GFP, únicamente, y tras la transfección de dicho donador junto con las TALEN específicas que introducen una DSB. El resultado es óptimo y favorable para esa última combinación, pues se observa un incremento de cerca del 200% del número de células GFP positivas respecto del tratamiento con el donador de GFP solo.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se ha adaptado un protocolo de sincronización celular con timidina al bloqueo del ciclo celular de las células HCT-116 de cáncer de colon humano. La posibilidad de realizarlo con doble bloqueo de dicha sustancia aumenta notablemente la mortalidad asociada a su toxicidad, por lo que se opta por un único tratamiento de mayor duración que asegura un mayor porcentaje de células sincronizadas en G1/S, y una menor caída de dicha población sincronizada con el tiempo de desbloqueo.

A continuación, y en línea con lo establecido antes, se prueba el protocolo de sincronización celular con timidina en un experimento de transfección de ADN homólogo y enzimático orientado a la reparación del gen de GFP truncado existente en la línea celular reportera empleada. La combinación del bloqueo con timidina con la transfección pretende que un mayor número de células lleguen a incluir en su genoma el material homólogo de la GFP que la tornará funcional, y fluorescente al ser expuesta a la radiación ultravioleta. Además, se incluye también el uso de nucleasas TALEN, que demuestran aumentar la eficacia de la recombinación frente a la no inducida por DSB.

El trabajo realizado no es más que el comienzo de lo que parece ser una prometedora vía de reparación cuantitativa de ADN defectuoso, enmarcada en el campo de la terapia génica dirigida. Es, pues, necesaria la repetición y comprobación de los resultados aquí mostrados, y continuar con el estudio del efecto que las TALEN, junto con la sincronización celular, tienen sobre la recombinación homóloga celular.

## Bibliografía

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. General recombination. 2002.
2. Aylon Y, Liefshitz B, Kupiec M. The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J*. 2004. Dec 8;23(24):4868-75.
3. Baudat F, Imai Y, de Massy B. 2013. Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nature Reviews Genetics* 14, 794–806 (2013).
4. Boulay K, Ghram M, Viranaicken W, Trépanier V, Mollet S, Fréchina C, DesGroseillers L. Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(12):7867-83.
5. Choi YE, Pan Y, Park E, Konstantinopoulos P, De S, D'Andrea A, Chowdhury D. MicroRNAs down-regulate homologous recombination in the G1 phase of cycling cells to maintain genomic stability. *eLife* 2014;10.7554/eLife.02445.
6. Conde-Ferrández L. El locus MAT (mating-type) de los ascomicetos: su evolución, estructura y regulación. *Rev Iberoam Micol* 2007; 24: 95-99.
7. Dekanty A, Barrio L, Milán M. Contributions of DNA repair, cell cycle checkpoints and cell death to suppressing the DNA damage-induced tumorigenic behavior of *Drosophila* epithelial cells. *Oncogene*. 2014 Mar 17.
8. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3<sup>rd</sup>. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. 2013 Jul; 31(7): 397-405.
9. Ira G, Pelliccioli A, Balijja A, Wang X, Fiorani S, Carotenuto W, Liberi G, Bressan D, Wan L, Hollingsworth NM, Haber JE, Foiani M. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* (21 October 2004) 431, 1011-1017.
10. Jackman J, O'Connor PM. Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle. *Curr Protoc Cell Biol*. 2001 May;Chapter 8:Unit 8.3.
11. Karp, G. *Biología celular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill, séptima edición 2011.
12. Kufe DW, Advani S and Weichselbaum R. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 5<sup>th</sup> edition. Chapter 66: cancer gene therapy.
13. Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle*. 2008 September 15; 7(18): 2902–2906.
14. Mathiasen DP, Lisby M. 2014. Cell cycle regulation of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews Special Issue: Yeasts as models in cell biology*. Volume 38, Issue 2, pages 172–184, March 2014.

15. Porteus M. Using homologous recombination to manipulate the genome of human somatic cells. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2007. Vol. 24, 195-212.
16. Ronchera-Oms CL, González JM. *Terapia génica*. 2002.
17. Shibata A, Jeggo PA. 2014. DNA Double-strand Break Repair in a Cellular Context. *Clinical Oncology*. Volume 26, Issue 5, May 2014, Pages 243–249.
18. Sun N, Zhao H. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): A highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnology and Bioengineering*. Volume 110, Issue 7, pages 1811–1821, July 2013.
19. Topaloglu O, Hurley PJ, Yildirim O, Civin CI, Bunz F. Improved methods for the generation of human gene knockout and knockin cell lines. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33(18): e158.
20. Tropp BE. 2011. *Molecular Biology: Genes to Proteins*. 4<sup>th</sup> edition. Chapter 13: recombination.
21. Jackman J, O'Connor PM. 2001. UNIT 8.3 Methods for Synchronizing Cells at Specific Stages of the Cell Cycle. *Current Protocols in Cell Biology* 00:8.3:8.3.1–8.3.20.