

Estudio del fenotipo de una línea celular HeLa-FASTK-KO

Trabajo de Fin de Máster.

Dirigido por Miguel Ángel de la Fuente García y María Simarro Grande.
Máster en Investigación Biomédica.

Curso 2015-2016

IBGM-Facultad de Medicina

CSIC-Universidad de Valladolid

María A. Espinaco García
5 de septiembre del 2016

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Miguel Ángel de la Fuente García y a la Dra. María Simarro Grande, tutores y directores de este trabajo, la orientación, el seguimiento y la supervisión continuada del mismo, así como toda la paciencia que han demostrado. Del mismo modo también quiero agradecer a mis compañeros María Zornoza y Gonzalo Molpeceres toda la ayuda prestada

A todos ellos, muchas gracias.

Índice

1. Introducción	1
FASTK	2
DNA recombinante	4
Lentivirus	5
Técnica CRISPR/Cas9n para la creación de HeLa KO	6
Objetivos	8
2. Métodos y materiales	8
Miniprep: Producción y purificación de plásmidos a pequeña escala	8
Midiprep: Producción y purificación de plásmidos a mediana escala	9
Diseño de los plásmidos pFAST FL – Flag-HA – Kanamycin y pFAST M35 – Flag-HA – Kanamycin	10
Diseño de los vectores lentivirales con el correspondiente marcaje	13
Obtención de los lentivirus	16
Transducción lentiviral: Infección de células HeLa-FASTK-KO	18
3. Resultados	19
Obtención de los plásmidos pFAST FL – Flag-HA – Kanamycin y pFAST M35 – Flag-HA – Kanamycin	19
Obtención de los plásmidos lentivirales con el correspondiente marcaje	21
Estudio del cambio fenotípico de la línea celular HeLa – FASTK – KO infectada por lentivirus	22
4. Discusión	24
5. Conclusión	26
6. Bibliografía	27

1. Introducción

El DNA, *deoxyribonucleic acid*, es un polinucleótido con una secuencia específica de unidades de desoxirribonucleótidos unidos covalentemente mediante enlaces 3', 5' – fosfodiéster (1). La conformación natural del DNA es la estructura de doble hélice, en la cual dos cadenas de DNA antiparalelas y complementarias interactúan mediante dos enlaces de hidrógeno entre las bases púricas adenina y las bases pirimídicas timina y mediante tres enlaces de hidrógeno entre las bases púricas guanina y las bases pirimídicas citosina.

Esta biomolécula es la portadora de la información genética, es decir, tiene codificadas las instrucciones para asegurar la continuidad de las estructuras y funciones celulares y, con ello, asegurar la vida y la continuidad en la existencia de cualquier especie biológica. Cada una de estas instrucciones es un gen, el cual es un segmento definido del DNA que codifica una sola cadena polipeptídica funcional o molécula de RNA, con función estructural o catalítica.

El conjunto de genes de un ser vivo, es decir, toda la información genética de éste, se denomina genoma (2). En función del ambiente en el que se encuentra el organismo, se expresan unos genes u otros, determinando el fenotipo de éste. Por lo tanto, el fenotipo es el conjunto de caracteres detectables de un organismo como consecuencia de la expresión de unos genes determinados.

El genoma, y por lo tanto el fenotipo, puede ser modificado utilizando métodos de modificación genética dirigida, que permiten la delección, adición y modificación de uno o varios genes. Además, la tecnología de DNA recombinante permite la construcción de vectores que albergan genes de interés mediante el uso de enzimas de restricción y DNA ligasas.

Dicho conjunto de métodos han sido utilizados durante el desarrollo de este trabajo para lograr su objetivo final: El análisis de los cambios fenotípicos y funcionales en células que no poseen el gen FASTK.

FASTK

Fas-Activated Serine/Threonine Phosphoprotein Kinase, FASTK, también conocido como FAST, es el miembro fundador de la familia de proteínas FAST, formada por el mismo FAST y sus cinco homólogos (FASTKD1 – 5). Todas estas proteínas son intramitocondriales, ya que tienen una señal de localización mitocondrial en su extremo amino terminal que permite su traslocación a la mitocondria.

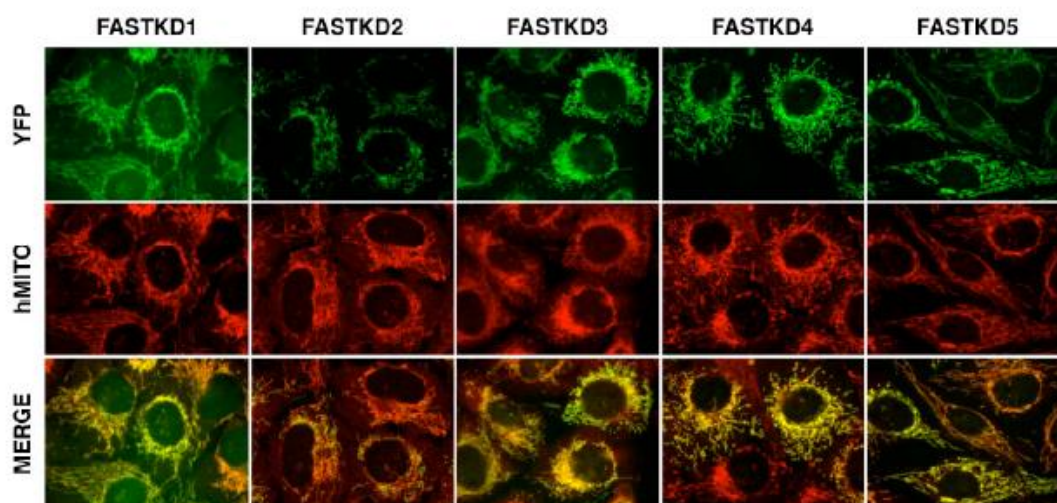


Figura 1. Localización de FASTKD1 – 5 en mitocondria (3).

Por otro lado, algunos de estos homólogos también se localizan en el núcleo además de la mitocondria (3). Dicha señal de localización no es lo único que tienen en común todos los miembros de la familia FAST, también poseen, en común, tres dominios carboxílicos terminales conservados llamados FAST_1, FAST_2 y RAP. El dominio RAP es un dominio putativo de unión al RNA (4) que está implicado en alguna de las funciones de las proteínas de la familia FAST.

FAST es el miembro fundador. Fue descrito, por primera vez, en 1995 (5) y desde entonces ha sido definido de muchas maneras diferentes. En un principio, se creía que FAST se encontraba en la membrana externa mitocondrial, no en la matriz mitocondrial. También se creía que interactuaba con BCL-X_L, de modo que regulaba la apoptosis actuando como quinasa (5, 6, 7). Sin embargo se demostró que todo esto no era cierto. Actualmente se sabe que FAST no es una proteína quinasa, a pesar de seguir llamándose FASTK, que no es antiapoptótica y que no se encuentra en la membrana externa mitocondrial.

Ahora se sabe que FAST es una proteína multifuncional que existe con dos isoformas diferentes en función de la metionina que se utilice como inicio de la traducción. Cuando se utiliza la primera metionina, FAST se encuentra en el núcleo y en el citoplasma, mientras que si se usa la segunda metionina (que se encuentra 35 aminoácidos después del extremo 3') se produce una proteína intramitocondrial. (8). De este modo, FAST se encuentra tanto en el núcleo como en las mitocondrias y en el citoplasma, en esta última localización formando parte de los llamados gránulos de estrés (9). En el citoplasma actúa como antagonista de TIA-1, el cual es un represor intracelular de células T que inhibe la producción de mediadores pro-inflamatorios, de modo que FAST está involucrado en diferentes enfermedades autoinmunes, como son la atopía, el asma, la diabetes tipo I, entre otras. Esto ha llevado al estudio de su papel en la inmunidad mediante la creación de ratones FAST KO, demostrándose que FAST regula el reclutamiento de neutrófilos tanto en la inflamación pulmonar que es consecuencia de un proceso alérgico como en aquella que es consecuencia de un daño agudo (10).

Por otro lado, además de participar en el sistema inmunológico, FAST interacciona con diferentes factores de *splicing*, participando en el *splicing* alternativo, tanto con su isoforma que tiene la metionina en la posición 1 como con la isoforma de la metionina en la posición 35 (8).

Además, la isoforma de FAST que se localiza en la mitocondria está involucrada en la regulación de la respiración oxidativa a través del complejo I, al unirse con el mRNA precursor de ND6, componente imprescindible de dicho complejo I (11). FAST permite el desarrollo de la forma madura del mRNA ND6 al protegerlo de la acción del degradosoma, presente en los gránulos mitocondriales de RNA (12). Este hecho es importante, ya que se ha descubierto que el complejo I mitocondrial y su actividad pueden regular la capacidad metastásica de células de cáncer de mama, de modo que el buen funcionamiento del complejo I podría inhibir las metástasis en este tipo de tumores. (13).

FASTKD1 es el homólogo de FAST menos estudiado. Se sabe que está sobreexpresado en el cáncer de endometrio (14), pero se desconoce su función y su localización mitocondrial exacta.

FASTKD2 ha sido localizada en la membrana interna mitocondrial (15) y en los gránulos mitocondriales de RNA (16). Se han observado mutaciones en FASTKD2 en un tipo de encefalopatía infantil (15), así como que su expresión está disminuida en pacientes de Alzheimer (17). También se ha analizado la posibilidad de que FASTKD2 pudiera inducir la apoptosis de células de cáncer de mamá y de próstata (18).

FASTKD3 es una proteína con una secuencia de localización mitocondrial en su extremo N-terminal. La ausencia de esta proteína provoca la disminución de las actividades de los complejos mitocondriales y una disminución del mtDNA. También se ha demostrado que FASTKD3 forma parte de un complejo de proteínas involucradas en el procesamiento del RNA y la traducción, y que interacciona con distintas enzimas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos. Por otro lado se plantea que esta proteína pueda participar en el procesamiento y la traducción de elementos de la cadena respiratoria (3, 9).

FASTKD4 es una proteína mitocondrial que también regula la respiración mitocondrial, sin embargo esto lo hace mediante la regulación de la expresión de COX2, componente del complejo IV (20).

FASTKD5 se encuentra en gránulos de RNA junto con FASTKD2. Estudios basados en el silenciamiento de FASTKD5 dan como resultado el bloqueo de la proliferación celular y una acumulación de precursores de mRNAs que no se traducirán adecuadamente. Por otro lado, también se ha observado que FASTKD5 está relacionado con la expresión de las proteínas del complejo IV (16).

DNA recombinante

El DNA recombinante es aquel que se sintetiza al unir dos o más genes, o partes de genes, diferentes y de distintos orígenes (1). La finalidad de este DNA es ser introducido en una célula huésped para estudiar posibles cambios fenotípicos.

Construir dicho DNA recombinante requiere del uso de enzimas de restricción que cortan a cada uno de los genes de interés por un lugar determinado, dando lugar a los extremos cohesivos, los cuales deben ser iguales para que la DNA ligasa pueda unirlos covalentemente, formando el plásmido que se quiere introducir en la células huésped para su estudio.

Los genes de interés pueden clonarse en plásmidos, que generalmente se caracterizan por tener un gen de resistencia, es decir, un gen que expresa una proteína que hace que la células sea resistente a un antibiótico concreto. De este modo se pueden seleccionar las células que contengan el DNA recombinante de interés.

En este trabajo se sintetiza DNA recombinante en dos etapas diferentes:

Primero se sintetizan los vectores que contienen el gen FASTK correspondiente, ya sea con la metionina en la posición 1 (a partir de ahora FAST *full length* o FAST FL) o el gen FASTK con la metionina en la posición 35 (a partir de ahora FAST M35) con dos marcajes o “etiquetas” diferentes para cada uno: Un marcaje es visual, se trata de la proteína fluorescente YFP, mientras que el otro marcaje es detectado mediante inmunodetección, se trata del epitopo Flag-HA.

De este modo se tienen cuatro DNA recombinantes distintos, que servirán para la construcción de vectores lentivirales que permitan la producción de partículas víricas que se integren de forma estable en las células de interés:

- FAST FL-YFP
- FAST FL-Flag HA
- FAST M35-YFP
- FAST M35-Flag HA.

Lentivirus

Los lentivirus son virus pertenecientes a la familia *Retroviridae* utilizados como vectores virales en la modificación genética dirigida.

Los virus son microorganismos que viven como parásitos obligados y que están formados por una envoltura proteica (cápside) y por un material genético, ya sea DNA o RNA. Esta forma de supervivencia, como parásitos obligados, es posible gracias a su capacidad para introducir e insertar su material genético en el genoma de una célula huésped, de modo que esta sea la responsable de la reproducción del virus (21).

Un vector viral es un virus modificado, de modo que carece de todas las propiedades que le hacen infeccioso y patógeno, y que se utiliza para introducir material genético exógeno en una célula huésped en el fenómeno denominado transducción (22). Con este fin son utilizados los lentivirus en este trabajo.

Como ya se dijo antes, un lentivirus es un retrovirus. Esto quiere decir que su genoma está constituido por dos cadenas de RNA monocatenario, rodeado por una cápside fosfolipídica y una envuelta de glicoproteínas, y que son capaces de replicar su material a través de DNA bicatenario a partir de dicho RNA monocatenario, proceso en el cual participa la retrotranscriptasa. De este modo, el RNA del genoma de este virus se retrotranscribe a DNA que se inserta en el genoma de la célula huésped. Para ello, antes debe ocurrir la infección de la célula, la cual es posible gracias a la interacción de las glicoproteínas de la envuelta con los receptores presentes en la membrana de la célula hospedadora, fusionándose las membranas, e internalizándose el lentivirus en el citoplasma, donde ocurre la retrotranscripción y se produce el DNA (23) que es importado al núcleo a través de los poros nucleares (24) y se insertará en el genoma del hospedador.

Para la producción de partículas lentivirales se utilizan las llamadas células empaquetadoras que se transfectan, simultáneamente, con un vector que lleva el gen de interés y con otros que codifican los genes *gag*, para las proteínas de la cápside, y los genes *pol*, que codifican las enzimas necesarias para el ciclo viral, es decir, a las retrotranscriptasas, las proteasas y las integrasas (25).

Dichos vectores lentivirales son capaces de transducir tanto células que se dividen como células que no lo hacen, y el tamaño de los insertos que albergan es de hasta aproximadamente 8 – 10 kb. Un vector lentiviral muy efectivo es el que deriva del VIH de tipo 1, que es, además, inmunogénico (26).

Técnica CRISPR/Cas9n para la creación de HeLa KO

CRISPR es el acrónimo de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, que en español significa “Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas”, mientras que Cas (*CRISPR associated protein*) es un conjunto de genes que expresan enzimas nucleasas asociadas a las CRISPR.

La agrupación CRISPR/Cas es esencial para el sistema inmunológico de eubacterias y de arqueobacterias contra bacteriofagos y plásmidos, ya que dicha asociación es capaz de reconocer, eliminar o silenciar con alta precisión el DNA que sea diferente al suyo propio. Esto es posible porque los elementos espaciadores de las CRISPR contienen secuencias homólogas a las de los bacteriófagos y plásmidos (27).

De este modo, el sistema que forma CRISPR/Cas representa una nueva herramienta para la modificación genética de alta precisión y eficacia (28).

Actualmente se conocen diez tipos CRISPR/Cas, que se diferencian entre ellos en las secuencias de CRISPR y de Cas que contienen. Estos diez sistemas se clasifican en tres categorías. La asociación CRISPR/Cas9n que ha sido utilizada en este trabajo pertenece a la categoría de tipo II. El elemento característico de esta categoría es Cas9, que es una proteína multidominio con dos dominios con actividad nucleasa (el dominio de tipo RuvC, cerca del extremo amino terminal, que corta a las secuencias en el sentido 5' → 3' y el dominio de tipo HNH, en medio de la proteína, que corta a las secuencias en sentido 3' → 5'). Dicha proteína forma un complejo ternario con la molécula crRNA (CRISPR RNA) y tracrRNA (transactivador de crRNA). En este complejo, crRNA sirve como guía de la nucleasa Cas9 hacia una secuencia específica de la que es complementario. Esta función la realiza junto con tracrRNA, que complementa parcialmente a crRNA, es necesario para su maduración y permite el corte realizado por la nucleasa Cas9 hacia el DNA diana (29).

El lugar en el que se produce la rotura de la doble cadena del DNA diana (DSB, *double strand DNA*), llamado protoespaciador, además de estar compuesto por la secuencia complementaria al crRNA también está constituido por una secuencia corta conocida como motivo adyacente al protoespaciador (PAM, *protospacer adjacent motif*). Ambas secuencias son imprescindibles para que se produzca la DSB por Cas9.

Así, para que el sistema CRISPR/Cas9 funcione sólo es necesario modificar el crRNA de modo que tenga una secuencia homóloga al DNA diana (28, 30).

Sin embargo, dicho sistema sigue teniendo una debilidad, y es la posibilidad de que el sitio donde se ha producido la DSB sea reparado, pudiéndose producir posibles mutaciones. Para evitar esto, se ha desarrollado una Cas9 mutante en la que se ha mutado el dominio RuvC, de modo que éste deja de ser funcional y únicamente se

consigue el corte de la cadena en sentido 3' → 5', así Cas9 actúa como una nickasa (Cas9n), disminuyéndose, notablemente, el riesgo de mutagénesis (31).

Esta técnica ha sido empleada para obtener a la línea celular HeLa – FASTK – KO que se utiliza en este trabajo. Estas son células a las que se les ha deleccionado el gen FASTK.

Objetivos

El objetivo final de este trabajo es estudiar los cambios fenotípicos y funcionales en la línea celular HeLa-FASTK-KO cuando en ésta se introducen los genes FASTK FL y FASTK M35 con dos marcajes de detección diferentes.

Este objetivo es alcanzado a través de tres objetivos intermedios:

- Creación de los plásmidos con el gen y su marcaje de detección.
- Creación de los vectores lentivirales marcados anteriormente.
- Transducción de la línea celular HeLa-FASTK-KO.

Actualmente en el laboratorio donde se ha realizado mi trabajo se están haciendo estudios fenotípicos en estas células, sobre todo en relación con la función mitocondrial. La reintroducción del gen que fue eliminado debería ocasionar la recuperación de los posibles fenotipos observados. Esto sería una prueba de que dichos fenotipos son específicos

2. Materiales y métodos

Miniprep: Producción y purificación de plásmidos a pequeña escala

La miniprep es un proceso por el cual se logra extraer un plásmido de un cultivo bacteriano, el cual se ha realizado con el fin de clonar dicho plásmido

En primer lugar se toman las colonias bacterianas aisladas que previamente se han cultivado durante 24h a 37 °C en una placa de LB agar en presencia del antibiótico de

selección correspondiente y se cultivan durante otras 24h a 37 °C y con agitación en 5 ml de medio LB líquido con el mismo antibiótico de selección. Una vez han pasado estas últimas veinticuatro horas se centrifugan 4 ml del cultivo (se deja 1 ml para hacer una posible midiprep). El *pellet* bacteriano obtenido tras la centrifugación se resuspende en *buffer* de resuspensión (50 mM Tris y 10 mM EDTA, pH 8,0). A continuación, se añaden 100 µl de *buffer* de lisis (0,1 NaOH y 1% SDS), con el fin de hacer una lisis alcalina de las bacterias. La disolución se mezcla por inversión y se incuba durante 4 minutos a temperatura ambiente. Después, se añaden 100 µl de *buffer* neutralizador (1,5 M de acetato potásico, pH 5,5). Se mezcla con agitación y se centrifuga durante 5 minutos a 15 000 rpm. El sobrenadante que se obtiene se recoge en un tubo eppendorf nuevo en el que se añade 900 µl de etanol 100% para precipitar el DNA. Se mezcla la disolución por inversión y se incuba a -20 °C durante 15 minutos. Tras este tiempo, se centrifuga el tubo eppendorf a 15 000 rpm durante 10 minutos, se retira el sobrenadante y se lava el *pellet* con etanol 70%. Se vuelve a centrifugar a 15 000 rpm pero durante 5 minutos esta vez. Se retira el sobrenadante y el *pellet* se deja secar al aire, a temperatura ambiente, durante unos 5 minutos. Finalmente, se resuspende el DNA en 50 µl de TE 1X y se cuantifica su concentración con el espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop de Thermo Fisher.

Midiprep: Producción y purificación de plásmidos a mediana escala

La midiprep tiene la misma finalidad que la miniprep, extraer DNA de un cultivo bacteriano para clonar dicho plásmido y aumentar su concentración, con la diferencia de que el cultivo bacteriano en esta técnica es más grande que el usado en la miniprep, y por lo tanto la concentración de DNA obtenida es mucho mayor.

Esta técnica se realiza utilizando el kit comercial *PureLink HiPure Plasmid Filter Midiprep* de Invitrogen. Este kit se basa en la lisis alcalina de las bacterias y en la purificación del DNA en columnas por absorción en una membrana de sílica, de modo que se separa el DNA del resto de la muestra.

En primer lugar se toman 200 µl del cultivo bacteriano preparado para hacer la miniprep y se cultivan en 100 ml de LB líquido durante 24 h, a 37 °C y con agitación. Pasadas estas veinticuatro horas, se centrifuga el cultivo a 4000 g, durante 10 min y a 4 °C. Tras la centrifugación, se retira el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 10

ml de *buffer* R3 (*buffer* de resuspensión). Se utiliza agitación con vortex hasta que el *pellet* esté totalmente mezclado. Después se añaden 10 ml de *buffer* L7 (*buffer* de lisis alcalina) y se mezcla por inversión. Se deja reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 10 ml de *buffer* N3 (*buffer* neutralizador) y se mezcla por inversión hasta que la mezcla quede homogénea. Entonces, se hace pasar el precipitado por la columna con la membrana de sílica, que previamente ha sido equilibrada con 15 ml de *buffer* EQ1 (*buffer* equilibrador). La mezcla cae por gravedad. Cuando se observa que la columna no gotea más se lava ésta con 20 ml de *buffer* W8 (*buffer* de lavado). Luego, se cambia la columna a un falcón de 50 ml y se añade a ésta el *buffer* E4 (*buffer* de elución), con el fin de eluir el DNA. Cuando se ve que la columna deja de gotear se descarta la columna y se añaden 3,5 ml de isopropanol. Esta disolución se incuba durante 10 minutos a -20 °C. Pasado este tiempo, se centrifuga la mezcla a 4000 rpm, durante 30 minutos y a 4 °C. Tras la centrifugación, se quita casi todo el sobrenadante, dejando 1 ml con el cual se resuspende el *pellet*. Una vez resuspendido se pasa a un tubo eppendorf. Éste se centrifuga a 15 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descarta y el *pellet* se lava con 1 ml de etanol 70%. Se centrifuga la mezcla a 15 000 rpm, durante 5 minutos a 4 °C. Se quita el sobrenadante y se deja secar el *pellet* al aire, durante 10 minutos aproximadamente y a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspende este *pellet* en 100 µl del TE que proporciona el kit y se cuantifica su concentración con el Nanodrop de Thermo Fisher.

Diseño de los plásmidos pFAST FL – Flag-HA – Kanamycin y pFAST M35 – Flag-HA – Kanamycin

Los vectores que contienen los genes FAST FL y FAST M35 con el marcaje fluorescente YFP (pFAST FL- YFP y pFAST M35-YFP) ya están contruidos. A partir de estos plásmidos se obtienen los genes FAST FL y FAST M35 con sus correspondientes extremos cohesivos de modo que se puedan ligar al vector de clonaje, el cual va a contener el gen de marcaje Flag-HA y que se obtiene a partir del vector pFASTKD3 – Kanamycin – Flag-HA. Para ello se usan enzimas de restricción que proporcionen los correspondientes extremos cohesivos.

Primero se realiza la transformación de bacterias DH5α con los plásmidos pFAST FL – YFP, pFAST M35 – YFP y pFASTKD3 – Kanamycin – FlagHA con el fin de obtener

una mayor cantidad de reactivo. Al día siguiente, teniendo ya las clonas bacterianas, se realizan minipreps de éstas y se cultivan más bacterias transformadas para hacer midipreps al día siguiente. Las minipreps realizadas se purifican con el kit de purificación de Promega “*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit*” con el fin de utilizar el DNA en la reacción de digestión. Al día siguiente, con las clonas bacterianas suficientemente cultivadas, se realizan las midipreps para obtener una cantidad considerable de reactivo.

Una vez se obtiene el reactivo purificado, se procede a realizar las digestiones de los plásmidos para obtener los genes y vectores de clonación de interés con los correspondientes extremos cohesivos. Se realizan cuatro dobles digestiones:

El plásmido pFAST FL – YFP se digiere con las enzimas de restricción HindIII y Agel de modo que se obtienen dos insertos con el gen de interés HindIII – FAST FL – Agel y Agel – FAST FL – Agel, cuyo tamaño es de unas 700 pb y 900 pb, respectivamente.

El plásmido pFAST M35 – YFP se digiere con HindIII y con SacII, obteniéndose el inserto HindIII – FAST M35 – SacII, con un tamaño aproximado de 1600 pb.

Finalmente, el plásmido pFASTKD3 – Kanamycin – FlagHA se digiere tanto con HindIII/Agel como con HindIII/SacII, obteniéndose dos vectores de clonación de 4000 pb, aproximadamente, cada uno.

El resto de DNA de partida que no es utilizado en las dobles digestiones es almacenado a – 20 °C.

Los productos de interés obtenidos tras estas digestiones se purifican con el kit de Promega “*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit*” y se cuantifican con el NanoDrop.

Después, se hace una ligación entre el inserto HindIII - FAST M35 - SacII y el vector de clonación HindIII – Flag-HA – Kanamycin – SacII, y una triple ligación con los insertos HindIII – FAST FL – Agel, Agel – FAST FL – Agel y con el vector HindIII – Flag-HA – Kanamycin – Agel. Las ligaciones se realizan usando la ligasa de DNA T4, con su correspondiente tampón, de la marca Invitrogen. De este modo se quieren obtener los plásmidos pFAST FL – Flag-HA – Kanamycin y pFAST M35 – Flag-HA – Kanamycin. Las dos reacciones de ligación son utilizadas para transformar bacterias DH5 α , las cuales se cultivan a 37 °C.

Al día siguiente, se realizan minipreps con una de las clonas bacterianas transformadas con el supuesto plásmido pFAST M35 – Flag-HA – Kanamycin y diez minipreps con las transformadas con el supuesto pFAST FL – Flag-HA – Kanamycin. Todas estas minipreps se utilizan a continuación para hacer dobles digestiones con el fin de verificar que las ligaciones han ocurrido correctamente y que, por lo tanto, las bacterias han incluido el inserto de interés en el sentido adecuado.

Para comprobar que el supuesto plásmido pFAST M35 – Flag-HA – Kanamycin es el correcto se utilizan las enzimas de restricción HindIII/SacII, de modo que se obtengan dos fragmentos de unas 1600 pb y 4000 pb cada uno.

Por otro lado, para comprobar que los dos insertos de FAST – FL se han ligado con el vector que contiene los genes Flag-HA – Kanamycin se utilizan las enzimas de restricción HindIII/Agel, de modo que se obtengan tres fragmentos de unas 700 pb, 900 pb y de unas 4000 pb respectivamente. Habiéndose comprobado que el gen FAST FL se ha ligado con el vector es necesario confirmar que lo haya hecho en el sentido adecuado. Para ello se utilizan las enzimas HindIII/SacII, de modo que se deben obtener dos fragmentos de unas 1600 pb y de unas 4000 pb, respectivamente.

Las minipreps de los plásmidos que se han verificado y de los cuales se sabe que son los deseados son utilizadas para hacer midipreps.

Todos los resultados son almacenados a -20 °C.

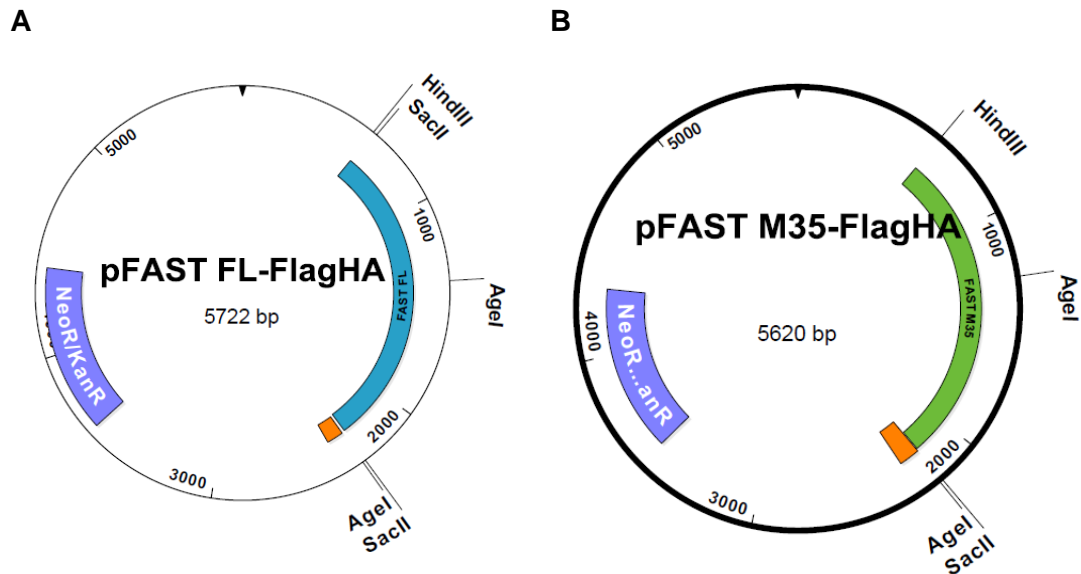


Figura 2. Esquema de los plásmidos pFAST FL – Flag-HA (A) y pFAST M35 – Flag-HA(B) construidos.

Diseño de los vectores lentivirales con el correspondiente marcaje

Los plásmidos obtenidos en la primera etapa con los genes FAST FL y FAST M35, con sus correspondientes marcajes, son utilizados para obtener los insertos con los cuales se van a crear los vectores lentivirales. Por otro lado, el vector lentiviral de clonación se obtiene a partir del plásmido pSin – EF2 – OCT4 – Puromycin, que además contiene una resistencia a Ampicilina.

Los plásmidos pFAST FL – Flag-HA – Kanamycin, pFAST FL – Flag-HA – Kanamycin, pFAST M35 – YFP – Kanamycin y pFAST M35 – YFP – Kanamycin son digeridos con las enzimas de restricción NheI y MfeI, mientras que el plásmido pSin – EF2 – OCT4 – Puromycin es digerido con las enzimas SpeI y EcoRI, que crean extremos cohesivos complementarios a los creados por las enzimas NheI y MfeI (SpeI y NheI dejan extremos compatibles entre sí para la ligación; lo mismo sucede con EcoRI y MfeI).

De este modo, el inserto que se obtiene a partir del plásmido pFAST FL – Flag-HA – Kanamycin mide unas 1900 pb, el inserto del pFAST M35 – Flag-HA – Kanamycin tiene un tamaño de unas 1800 pb, el inserto del pFAST FL – YFP – Kanamycin es de unas 2500 pb y el inserto del plásmido pFAST M35 – YFP – Kanamycin mide 2400 pb

aproximadamente. Por otro lado, el vector de clonación conseguido a partir del plásmido pSin – EF2 – OCT4 – Puromycin tiene un tamaño aproximado de 7600 pb.

Los fragmentos de interés que se han obtenido tras estas dobles digestiones se purifican con el kit de Promega “*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit*” y se cuantifican con el NanoDrop.

A continuación, se realizan cuatro ligaciones, para lo cual se usan los insertos NfeI – FAST FL – Flag-HA – MheI, NfeI – FAST FL – YFP – MheI, NfeI – FAST M35 – YFP – MheI y NfeI – FAST M35 – YFP – MheI y el vector de clonación SpeI – Sin – EF2 – OCT4 – Ampicillin – EcoRI, que es común para todas las ligaciones. Las ligaciones se realizan usando la ligasa de DNA T4, con su correspondiente tampón, de la marca Invitrogen. De este modo se quieren obtener los plásmidos pSin - FAST FL – Flag-HA – Ampicillin, pSin - FAST FL - YFP – Ampicillin, pSin - FAST M35 – Flag-HA – Ampicillin y pSin - FAST M35 – YFP – Ampicillin. Las cuatro reacciones de ligación son utilizadas para transformar bacterias DH5 α .

Al día siguiente, se realizan minipreps con dos de las clonas bacterianas transformadas con cada uno de los supuestos plásmidos construidos, las cuales son escogidas al azar. Todas estas minipreps se utilizan para hacer digestiones de comprobación, con el fin de verificar que las ligaciones han ocurrido correctamente y que, por lo tanto, se ha construido el vector lentiviral.

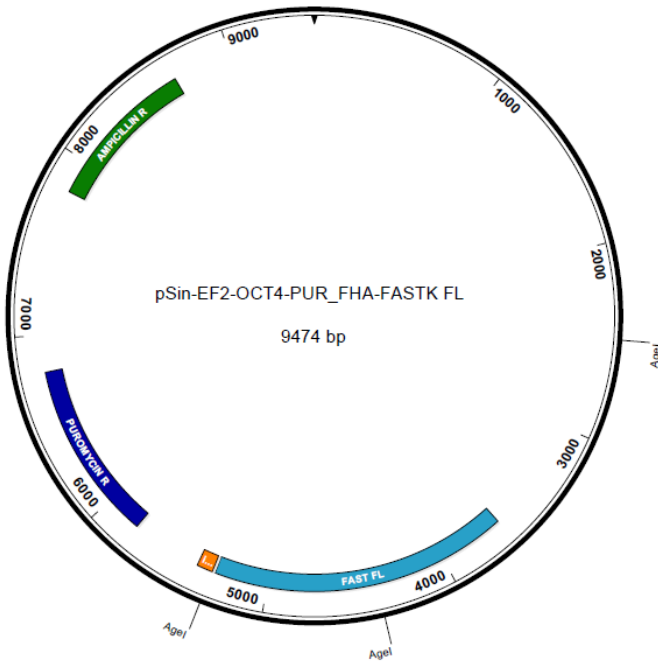
Dichas comprobaciones se realizan mediante una digestión sencilla, utilizando la enzima de restricción AgeI.

Así, la digestión de comprobación del plásmido pSin - FAST FL – Flag-HA – Ampicillin debe proporcionar tres fragmentos con un tamaño aproximado a las 900 pb, las 1900 pb y a las 6600 pb, respectivamente. En la digestión de comprobación de pSin - FAST FL - YFP – Ampicillin debe obtenerse tres fragmento de unas 900 pb, unas 1900 pb y de unas 7300 pb, respectivamente. La comprobación de pSin - FAST M35 – Flag-HA – Ampicillin debe producir tres fragmentos de aproximadamente 900 pb, 1800 pb y 8450 pb cada uno. Finalmente, en la comprobación del plásmido pSin - FAST M35 – YFP – Ampicillin se deben obtener tres fragmentos de unas 900 pb, 1800 pb y de unas 7300 pb, respectivamente.

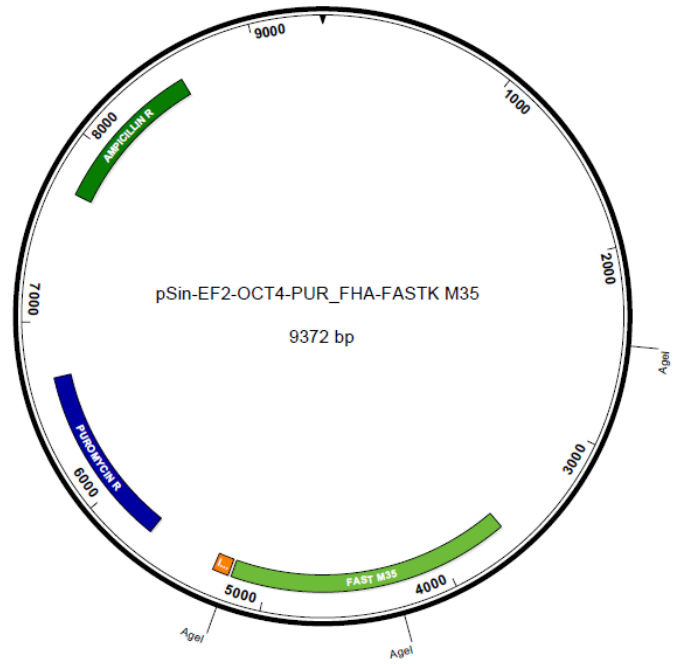
Las minipreps de los plásmidos que se han verificado y de los cuales se sabe que son los deseados son utilizadas para hacer midipreps.

Todos los resultados son almacenados a -20 °C.

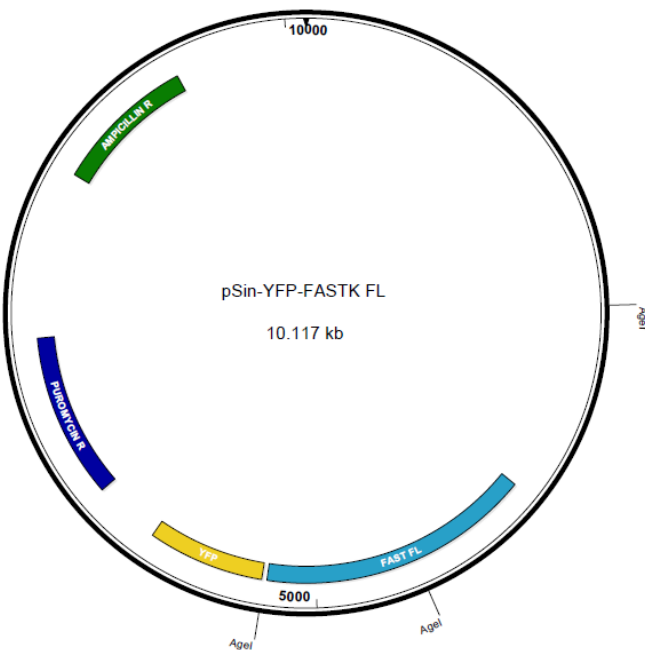
A



B



C



D

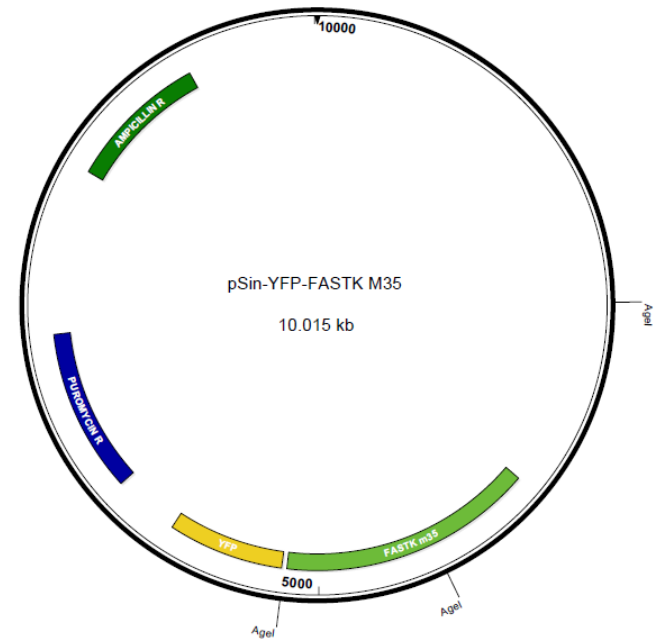


Figura 3. Esquema de los plásmidos pSin - FAST FL – Flag-HA – Ampicillin **(A)**, pSin - FAST FL - YFP – Ampicillin **(B)**, pSin - FAST M35 – Flag-HA – Ampicillin **(C)** y pSin - FAST M35 – YFP –Ampicillin **(D)** construidos.

Obtención de los lentivirus

La obtención de los lentivirus se ha realizado utilizando células empaquetadoras 293FT, las cuales permiten la producción de lentivirus que se liberan al sobrenadante.

En primer lugar se descongelan las células y se cultivan con medio DMEM completo (de Gibco), con penicilina – estreptomina 100 U/ml-100 µg/ml, con glutamina 2 mM y con suero bovino fetal (SFB), junto con aminoácidos no esenciales (NEAA).

Tras veinticuatro horas, se cultivan 1×10^6 células 293FT a 37 °C y en atmósfera del 5% de CO₂, en una placa de seis pocillos, ocupando cuatro de ellos. El cultivo se realiza con medio DMEM completo, junto con NEAA y geneticina 500 µg/ml. Las células son cultivadas durante 48 h, de modo que alcanzan una confluencia que oscila entre el 80% y el 90%. Tras estas cuarenta y ocho horas, se prepara el cultivo para la transducción. Para ello, treinta minutos antes de realizar el proceso se cambia el medio de cultivo por medio DMEM sin antibióticos y sin suero fetal bovino.

La transducción se realiza usando la mezcla de liposomas catiónicos *Lipofectamine 2000*, de Invitrogen. Esto se realiza utilizando un total de ocho tubos estériles.

En primer lugar se preparan cuatro tubos, uno por cada plásmido lentiviral, que se corresponden con la “mezcla 1”. Cada una de estas “mezclas 1” está compuesta por 100 µl de medio de cultivo libre de suero OPTI-MEM, de Invitrogen, con 500 ng del plásmido correspondiente, con 1000 ng del plásmido llamado ps-PAX2, que contiene los genes *pol* y *gag*, y con 500 ng del plásmido ps-MD2g, que contiene el gen que expresa al receptor que permite la transducción del lentivirus a células murinas y a células humanas.

Los otros cuatro tubos contienen la “mezcla 2”. Cada uno de ellos contiene 100 µl de medio de cultivo libre de suero OPTI-MEM (Invitrogen) junto con 6 µl de *Lipofectamine 2000*.

Las ocho mezclas se agitan suavemente y se cultivan durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añade un tubo de la “mezcla 2” a un tubo de la “mezcla 1”, mezclándose las disoluciones. Una vez mezcladas se realiza una incubación de 20 minutos exactos, a temperatura ambiente, de modo que se formen los complejos de DNA que contengan el plásmido de interés correspondiente.

A continuación, se añade cada mezcla para la transducción a los cultivos celulares 293FT correspondientes, debidamente etiquetados. Dicha adición se realiza gota a gota por toda la placa, y se homogeneiza suavemente.

Las células transfectadas se incuban a 37 °C con atmósfera del 5% de CO₂ durante 24h. Pasado este tiempo, el medio se reemplaza por medio DMEM completo con antibiótico, y se continua con el cultivo durante hasta el día siguiente, en las mismas condiciones ya descritas.

Al día siguiente se recoge el medio sobrenadante (que son 2 ml) en un falcón de 15 ml etiquetado previamente con el nombre del lentivirus correspondiente en función del plásmido que contenga. Nada más recoger el medio se añade más medio DMEM completo con antibiótico a las células y se incuban durante otras 24h a 37 °C y en atmósfera del 5% de CO₂. El medio sobrenadante recogido se almacena a -20 °C.

Pasadas las veinticuatro horas se recoge 1ml del medio sobrenadante en el falcón de 15 ml ya usado el día anterior. A continuación, se preparan cuatro nuevos falcón de 15 ml y ocho tubos eppendorf con tapón de rosca (dos tubos de tapón de rosca por cada falcón de 15 ml). Se rotulan todos ellos adecuadamente. Después se prepara una jeringuilla con un filtro con membrana MF-Millipore, de 0,45 µm de diámetro del poro y se bloquea dicho filtro con medio DMEM completo. Esta membrana se utiliza para filtrar los 3 ml de cada uno de los medios sobrenadantes recogidos durante los dos últimos días. El sobrenadante filtrado se recoge en su correspondiente falcón de 15 ml, el cual ha sido etiquetado previamente. Después, los 3 ml filtrados se reparten, de forma equitativa, en los dos tubos eppendorf correspondientes que ya están preparados. Cada uno de estos tubos se almacenan a -80 °C.

Una vez se tiene el lentivirus, se procede a la transducción lentiviral.

Transducción lentiviral: Infección de células HeLa-FASTK-KO

La transducción lentiviral se realiza con células HeLa-FASTK-KO, las cuales se habían generado previamente en el laboratorio mediante edición génica con CRISPR/Cas9n.

Las células HeLa-FASTK-KO se plaquean cuarenta y ocho horas antes de realizar la transducción en cinco pocillos de una placa de veinticuatro, con el fin de que alcancen una confluencia de entre 70% y 80%. Cada uno de estos pocillos se etiqueta adecuadamente, usándose uno como control y los otros cuatro con un lentivirus con un plásmido distinto cada uno. Estas células se cultivan a 37 °C y en atmósfera del 5% de CO₂.

Veinte minutos antes de llevar a cabo la transducción se retira el medio del cultivo celular y se añade 1 ml de medio OPTI-MEM (Invitrogen).

La transducción se realiza utilizando el reactivo *Polybrene*, el cual facilita dicho proceso. De este modo, mientras transcurren esos 20 minutos se prepara una disolución con medio OPTI-MEM (Invitrogen) y con *Polybrene* en una concentración 8 µg/ml. Una vez preparada dicha disolución y pasados los veinte minutos, se retira el medio del cultivo y se añaden 500 µl de la disolución OPTI-MEM – *Polybrene*. A continuación, se añaden 500 µl de la solución lentiviral correspondiente, según como esté etiquetado el pocillo, de modo que la concentración final de *Polybrene* es de 4 µg/ml. Finalmente, se prepara el cultivo control, para lo cual se quita el medio y se sustituye por medio DMEM completo (Gibco). Se incuban las células HeLa-FASTK-KO infectadas durante 24h, a 37 °C y al 5% de CO₂.

Una vez han pasado las veinticuatro horas se añaden 2 ml de medio DMEM completo a los cuatro cultivos infectados.

El siguiente paso es la selección de las clonas celulares que hayan sido infectadas. Para ello se utiliza Puromicina con una concentración de 0,4 µg/ml, ya que el vector lentiviral contiene una resistencia a Puromicina. El antibiótico se mantiene durante al menos cuatro días. Tras este cultivo, las células supervivientes son aquellas que contienen el plásmido pSin - FAST M35 – Flag-HA – Ampicillin y el plásmido pSin - FAST M35 – YFP –Ampicillin. Estas células son cultivadas y cuando el cultivo ha crecido lo suficiente, se realiza su lisado para llevar a cabo el Western – Blot, con el cual se comprueba que el gen de interés etiquetado con el marcaje HA se expresa en

la línea celular HeLa – FASTK – KO. El marcaje HA es una secuencia unida al extremo carboxiterminal del gen introducido que se detecta con el anticuerpo monoclonal y específico anti-HA (de InvivoGen)

3. Resultados

Obtención de los plásmidos pFAST FL – Flag-HA y pFAST M35 – Flag-HA.

Los plásmidos pFAST FL – Flag-HA y pFAST M35 – Flag-HA construidos se obtienen mediante la ligación de los insertos que contienen el gen FAST FL y el gen FAST M35, respectivamente, con el vector de clonación que contiene el gen Flag-HA. Para poder realizar dicha ligación, tanto los insertos como el vector de clonación deben tener extremos cohesivos complementarios, los cuales se han logrado usando las enzimas de restricción adecuadas en las respectivas digestiones dobles.

Estos plásmidos son utilizados para transformar bacterias DH5 α que se siembran en dos placas de LB agar con Kanamicina y que son etiquetadas con el nombre del plásmido que corresponda. Tras 24h de cultivo de las bacterias a 37 °C se toman clonas aisladas de estas bacterias transformadas y se extrae su DNA con el cual se comprueba que la ligación haya ocurrido adecuadamente.

Para la comprobación del plásmido pFAST M35 – Flag-HA se utilizan las enzimas de restricción HindIII/SacII, que deben proporcionar dos fragmentos de unas 1600 pb y de unas 4000 pb, respectivamente. Estos fragmentos son observados en la clona elegida al azar para hacer la comprobación, como se puede observar en la figura 4.

Por otro lado, el plásmido pFAST FL – Flag-HA, que es resultado de una triple ligación, requiere de dos comprobaciones: Una que verifique que el inserto FAST FL está presente en el plásmido y otra con la que se compruebe que el sentido de los insertos es el adecuado. Para comprobar que el inserto está presente en el plásmido se utiliza las enzimas de restricción HindIII/Agel, que debe proporcionar tres fragmentos de 700 pb, 900 pb y 4000 pb respectivamente. Estos fragmentos son observados en dos de las diez clonas elegidas al azar para hacer la comprobación, como se ve en la figura 4.

Las dos clonas que dan resultados positivos en esta comprobación (la clonas 5 y 6) son utilizadas para la siguiente comprobación, en la cual se verifica si el sentido de los insertos es el adecuado. Para ello se utiliza las enzimas de restricción HindIII/SacII, que deben proporcionar dos fragmentos de 1600 pb y de 4000 pb, respectivamente. De nuevo las dos clonas dan resultados positivos en esta comprobación, como se ve en la figura 5

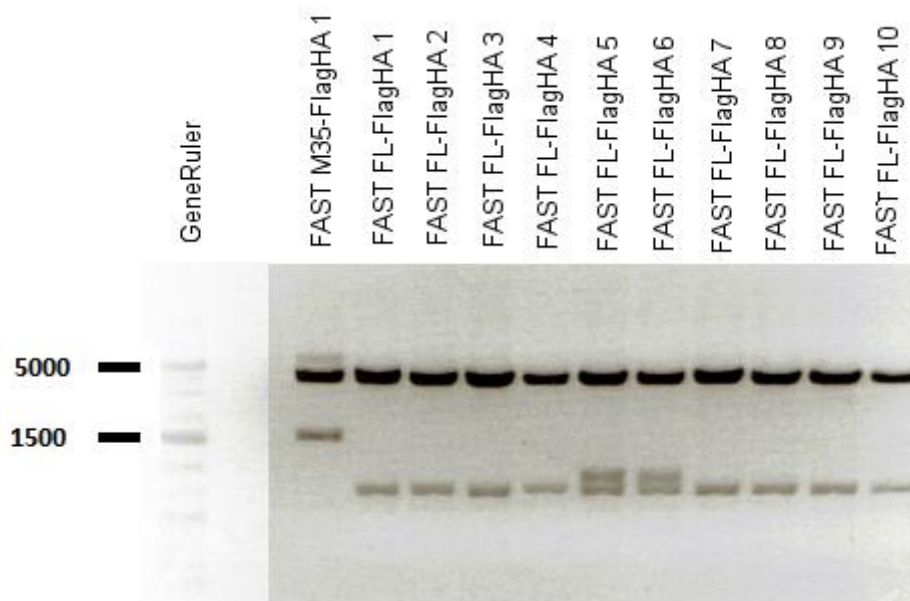


Figura 4. Comprobación de los plásmidos mediante enzimas de restricción con las enzimas HindIII/Agel y HindIII/SacII, respectivamente. Las digestiones son parciales. El marcador de peso molecular es *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder*, de Thermo Fisher.

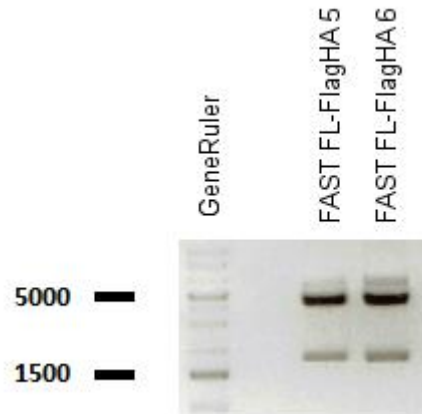


Figura 5. Comprobación del sentido del plásmido pFAST FL – Flag-HA con las enzimas HindIII/SacII. Las digestiones son parciales. El marcador de peso molecular es *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder*, de Thermo Fisher.

Obtención de los plásmidos lentivirales con el correspondiente marcaje

Los cuatro plásmidos lentivirales pSin - FAST FL – Flag-HA, pSin - FAST FL - YFP, pSin - FAST M35 – Flag-HA y pSin - FAST M35 – YFP son construidos mediante la ligación de los insertos que contienen el gen FAST FL y el gen FAST M35, respectivamente, con los dos marcajes por separado, con el vector de clonación lentiviral. Estas ligaciones se realizan tras haber obtenido los extremos cohesivos complementarios de cada uno de los insertos y del vector de clonación. Estos extremos se logran usando las enzimas de restricción adecuadas en sus respectivas digestiones dobles.

Los plásmidos obtenidos son utilizados para transformar bacterias DH5 α que se siembran en cuatro placas de LB agar con Ampicilina y que son etiquetadas con el nombre del plásmido que corresponda. Tras 24h de cultivo a 37 °C se eligen, al azar, dos clonas aisladas de las bacterias transformadas y se extrae su DNA. Con éste se comprueba que la ligación haya ocurrido adecuadamente.

Para la comprobación se utiliza la enzima de restricción AgeI en una reacción de digestión sencilla. Esta enzima debe proporcionar tres fragmentos en cada plásmido. En la comprobación de pSin - FAST FL – Flag-HA el tamaño aproximado de estos fragmentos debe ser unas 900 pb, unas 1900 pb y unas 6600 pb, respectivamente. En

la comprobación de pSin - FAST FL - YFP los tamaños deben ser de unas 900 pb, de unas 1900 pb y de unas 7300 pb, respectivamente. La comprobación de pSin - FAST M35 – Flag-HA debe proporcionar tres fragmentos de 900 pb, 1800 pb y 8450 pb cada uno. Finalmente, en la comprobación pSin - FAST M35 – YFP se deben obtener tres fragmentos de unas 900 pb, 1800 pb y de unas 7300 pb, respectivamente. Todos estos fragmentos son obtenidos en todas las clonas bacterianas que se eligieron al azar, como se puede ver en la figura 6. De este modo se verifica que la ligación ha ocurrido adecuadamente.



Figura 6. Comprobación de los plásmidos mediante enzimas de restricción con la enzima *Agel*. Las digestiones son parciales. El marcador de peso molecular es *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder*, de Thermo Fisher.

Estudio del cambio fenotípico de la línea celular HeLa – FASTK – KO infectada por lentivirus

El cambio en el fenotipo de la línea celular HeLa – FASTK – KO infectada con el lentivirus creado que contiene el plásmido pSin – FAST M35 – Flag-HA, con el fin de recuperar el gen FASTK, se realiza usando la técnica Western – Blot. Debido a la falta de tiempo, este experimento se realizó cuando el TFM ya se había dado por finalizado, sin embargo, ya que es la conclusión de este proyecto, se ha decidido incluirlo aquí.

Se cultivan las células HeLa - FASTK – KO seleccionadas con la Puromicina, que son las que contienen el plásmido pSin - FAST M35 – Flag-HA y las que contienen el plásmido pSin - FAST M35 – YFP. Este cultivo se realiza durante el tiempo suficiente para poder hacer su lisado y, de este modo, extraer sus proteínas. Durante todo este tiempo de cultivo se observa mediante microscopio de fluorescencia que las células transducidas con pSin – FAST M35 – YFP presentan fluorescencia débil, pero claramente positiva.

La proteína que se espera ver en el revelado de la membrana, tras realizar el Western – Blot, es la correspondiente al cultivo HeLa – FASTK – KO infectado con el plásmido pSin - FAST M35 – Flag-HA, ya que el marcaje detectado por inmunodetección es Flag-HA. Dicha detección se realiza mediante el uso del anticuerpo monoclonal y específico anti – HA de InvivoGen.

La proteína FAST M35 – Flag-HA pesa, aproximadamente, 70 kDa. Esto se calcula utilizando el valor promedio correspondiente a la masa de los aminoácidos, 110 Da. Se sabe que el gen FAST está formado por 515 aminoácidos (8), y que el marcaje Flag-HA está formado en total por 115 aminoácidos (32, 33), de modo que la suma de los tres pesos es, aproximadamente, 70 kDa. Por lo tanto, se debe observar una banda con este valor.

En la imagen revelada (figura 7) se observa lo que se espera, que el cultivo celular HeLa infectado con el plásmido pSin - FAST M35 – Flag-HA es el único que proporciona banda. De hecho, se observan dos bandas, muy próximas entre sí y con un valor próximo a los 72 kDa, el cual se corresponde con la proteína FAST M35 – Flag-HA. El fenómeno de que se observen dos bandas se justifica con el hecho de que la proteína FAST M35 es intramitocondrial, además de nuclear.

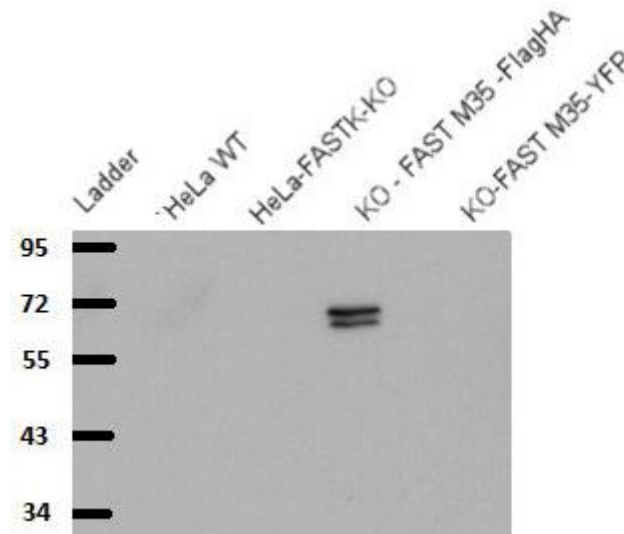


Figura 7. Western - Blot. El marcador de peso molecular es *PageRuler Prestained Protein Ladder*, de Fermentas. Se observan dos bandas. Esto se debe a que FAST M35 es una proteína intramitocondrial codificada en el núcleo, de modo que, al principio, posee una secuencia de localización mitocondrial que la dirige hacia este orgánulo y que pierde cuando FAST M35 es importada dentro de la mitocondria. En la figura, la banda más pesada se corresponde con la proteína que tiene la secuencia de localización, mientras que la banda menos pesada es la proteína intramitocondrial.

4. Discusión

El objetivo de este trabajo es recuperar el gen FASTK en la línea celular mutada HeLa – FASTK – KO. Para lograr este objetivo se generan vectores lentivirales con cuatro plásmidos distintos: Dos con el gen FAST FL y otros dos con el gen FAST M35, utilizando para cada gen dos tipos de marcaje diferente. De este modo se puede observar el cambio fenotípico en las células HeLa – FASTK – KO cuando se reintroduce el gen FASTK de localización nuclear (FAST FL) y cuando se reintroduce el gen FASTK de localización intramitocondrial y nuclear (FAST M35).

Estos vectores han sido diseñados y construidos experimentalmente a través de reacciones de doble digestión con las consecuentes ligaciones de los insertos de

interés en los vectores de clonación obtenidos. Todos los productos de las ligaciones están verificados, de modo que todos los vectores utilizados en la consecución del objetivo final son los diseñados y contienen los genes de interés deseados.

A pesar de haberse construido los cuatro vectores lentivirales, con los dos genes y sus correspondientes marcajes, sólo dos de estos vectores infectan las células HeLa – FASTK – KO. Los plásmidos que han infectado esta línea celular son los que contienen el gen FASTK M35 con sus dos marcajes: El visual, mediante la proteína fluorescente YFP, y el marcaje detectado por inmunodetección, mediante el epitopo HA. El hecho de que solo se consigan líneas estables con el gen FAST M35 y que no se logren con el gen FAST FL puede deberse a la diferente localización de estas proteínas. Mientras que FAST FL es una proteína nuclear, FAST M35 tiene una secuencia de localización intramitocondrial, además de ser nuclear. Esto sugiere que la localización intramitocondrial de FASTK es importante para la recuperación estable del gen en la línea celular mutada HeLa – FASTK – KO.

El marcaje visual con la proteína YFP es utilizado durante todo el trabajo para verificar que tanto la producción del lentivirus como la infección de las células mutantes HeLa han ocurrido.

El marcaje con la proteína Flag-HA es utilizado para comprobar, mediante la técnica Western – Blot, que se recupera de forma estable el gen FASTK en la línea celular mutada. Otra posible utilidad de las células que expresan FASTK – Flag-HA es la de poder purificar las proteínas asociadas a esta molécula mediante inmunopurificación con anticuerpos específicos anti-HA.

Aunque el objetivo de este trabajo es recuperar tanto el gen FASTK FL como el gen FASTK M35 en la línea celular mutada y, sin embargo, sólo se logra recuperar el gen FASTK M35 en las células HeLa – FASTK – KO, se demuestra que los lentivirus son capaces de realizar la transducción en células en división y que además son capaces de integrar el gen de interés en el genoma de la célula huésped de modo que éste se exprese de forma continua y estable.

Una continuación de este trabajo consistiría en la construcción de partículas víricas lentivirales para introducir distintos mutantes de FASTK.

5. Conclusión

Se han diseñado y obtenido vectores lentivirales capaces de realizar la transducción de dos de los cuatro plásmidos que se querían integrar en el genoma de las células mutadas HeLa – FASTK – KO. Estos dos plásmidos que los lentivirus logran incorporar al genoma de las células huésped contienen el mismo gen de interés (FASTK M35) pero con un marcaje diferente en cada uno.

Dicha incorporación es consistente, de modo que se logra recuperar el gen FAST en la línea celular mutada de forma estable y, además, con dos marcajes distintos. Esto representa un resultado muy interesante que abre nuevos caminos para continuar con la investigación y para desarrollar estudios de migración y localización del gen FASTK.

6. Bibliografía

1. Lehninger: Principios de Bioquímica. Nelson, D. L. and Cox, M. M. Omega. 2014.
2. What is a genome?. Goldman, A. D., Landweber, L. F. PLoS Genetics. 2016. 12(7)
3. Fast kinase domain-containing protein 3 is a mitochondrial protein essential for cellular respiration. Simarro, M., Gimenez-Cassina, A., Kedersha, N., Lazaro, J-B., Adelmant, G. O., Marto, J. A., Rhee, K., Tisdale, S., Danial, N., Benarafa, C., Orduña, A., Anderson, P. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2010. 401:440-446
4. RAP – a putative RNA-binding domain. Lee, I., Hong, W. Trends in Biochemical Sciences. 2004. 29(11):567-570.
5. Fas – activated serine/threonine kinase (FAST) phosphorylates TIA-1 during Fas-mediated apoptosis. Tian, Q., Taupin, J., Elledge, S., Robertson, M., Anderson, P. J. Exp. Med. 1995. 182(3):865-874.
6. FAST is a BCL-X_L – associated mitochondrial protein. Li, W., Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Lee, G., Anderson, P. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2004. 318:95-102.
7. FAST is a survival protein that senses mitochondrial stress and modulates TIA-1-regulated changes in protein expression. Li, W., Simarro, M., Kedersha, N., Anderson, P. Molecular and Cellular Biology. 2004. 24(24):10718-10732.
8. Fas – activated serine/threonine phosphoprotein (FAST) is a regulator of alternative splicing. Simarro, M., Mauger, D., Rhee, K., Pujana, M. A., Kedersha, N., Yamasaki, S., Cusick, M. E., Vidal, M., Garcia-Blanco, M. A., Anderson, P. PNAS. 2007. 104(27):11370-11375.
9. Stress granules, P-bodies and cancer. Anderson, P., Kedersha, N., Ivanov, P. Biochim. Biophys. Acta. 2015. 1849(7):961-870.
10. Fas – activated serine/threonine phosphoprotein promotes immune-mediated pulmonary inflammation. Simarro, M., Giannattasio, G., De la Fuente, M. A., Benarafa, C., Subramanian, K. K., Ishizawa, R., Balestrieri, B., Andersson, E. M., Luo, H. R., Orduña, A., Boyce, J., Anderson, P. The Journal of Immunology. 2010. 184:5325-5332.

11. A mitochondria-specific isoform of FASTK is present in mitochondrial RNA granules and regulates gene expression and function. Jourdain, A. A., Koppen, M., Rodley, C. D., Maundrell, K., Gueguen, N., Reyneir, P., Guaras, A. M., Enriquez, J. A., Anderson, P., Simarro, M., Martinou, J-C. *Cell Reports*. 2015. 10:1110-1121.
12. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. Anderson, P., Kedersha, N. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2009. 10:430-436.
13. Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. Santidrian, A. F., Matsuno-Yagi, A., Ritland, M., Seo, B. B., LeBoeuf, S. E., Gay, L. J., Yagi, T., Felding-Habermann, B. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014. 123(3):1068-1081.
14. Molecular markers of endometrial carcinoma detected in uterine aspirates. Colas, E., Perez, C., Cabrera, S., Pedrola, N., Monge, M., Castellvi, J., Eyzaguirre, F., Gregorio, J., Ruiz, A., Llaurodo, M., Rigau, M., Garcia, M., Ertekin, T., Montes, M., Lopez-Lopez, R., Carreras, R., Xercavins, J., Ortega, A., Maes, T., Rosell, E., Doll, A., Abal, M., Reventos, J., Gil-Moreno, A. *International Journal of Cancer*. 2011. 129:2435-2444.
15. FASTKD2 nonsense mutation in an infantile mitochondrial encephalomyopathy associated with cytochrome C oxidase deficiency. Ghezzi, D., Saada, A., D'Adamo, P., Fernandez-Vizarra, E., Gasparini, P., Tiranti, V., Elpeleg, O., Zeviani, M. *The American Journal of Human Genetics*. 2008. 83:415-423.
16. Mitochondrial RNA granules are centres for post-transcriptional RNA processing and ribosome biogenesis. Antonicka, H., Shoubridge, E. A. *Cell Report*. 2015. 10:920-932.
17. FASTKD2 and human memory: functional pathways and prospects for novel therapeutic target development for Alzheimer's disease and age-associated memory decline. Ramanan, V. K., Saykin, A. J. *Pharmacogenomics*. 2015. 16(5):429-432.
18. Fas activated serine-threonine kinase domains 2 (FASTKD2) mediates apoptosis of breast and prostate cancer cells through its novel FAST2 domain. Das, S., Yeung, K. T., Mahajan, M. A., Samuels, H. H. *BMC Cancer*. 2014. 14:852.
19. Estudio de la función de FASTKD3 en la mitocondria. Torres-Merino, R. Uva. Facultad de Medicina. Dpto de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología. 2015.
20. Functional genomic analysis of human mitochondrial RNA processing. Wolf, A. R., Mootha, V. K. *Cell Report*. 2014. 7:918-931.
21. Microbiología. Prescott, L. M. McGraw-Hill. 5ª Edición (2004).

22. Biological gene delivery vehicles: Beyond viral vectors. Seow, Y., Wood, M. J. *Molecular Therapy*. 2009. 17(5):767-777.
23. Transcription factor binding sites are genetic determinants of retroviral integration in the human genome. Felice, B., Cattoglio, C., Cittaro, D., Testa, A., Miccio, A., Ferrari, D., Luzi, L., Recchia, A., Mavilio, F. *Plos One*. 2009. 4.
24. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. Gallay, P., Hope, T., Chin, D., Trono, D. *Proc. Natl. Acad. Scic*. 1997. 94:9825-9830.
25. Development of a self-inactivating lentivirus vector. Miyoshi, H., Blömer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., Verma, I. M. *Journal of virology*. 1998. 72(10):8150-8157.
26. Gene therapy of HIV-1 infection using lentiviral vectors expressing anti-HIV-1 genes. Mautino, M. R., Morgan, R. A. *AIDS Patient Care STDS*. 2002. 16(1):11-26.
27. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., Soria, E. *Journal of Molecular Evolution*. 2005. 60(2):174-182.
28. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., Charpentier, E. *Science*. 2012. 337(6096):816-21.
29. TALEN or Cas9 – rapid, efficient and specific choices for genome modifications. Wei, C., Liu, J., Yu, Z., Zhang, B., Gao, G., Jiao, R. *Journal of genetics and genomics*. 2013. 40:281-289.
30. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. 109:E2579-E2586.
31. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas system. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., Zhang, F. *Science*. 2013. 330:819-823.
32. *The HA tag is cleaved and loses immunoreactivity during apoptosis.* Schembri, L., Dalibart, R., Tomasello, F., Legembre, P., Ichas, F., De Giorgi, F. *Nature Methods*. 2007. 4(2):107-108.
33. *A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification.* Hopp, T. P., Prickett, K. S., Price, V. L. Libby, R. T., March, C. J., Pat Cerretti, D., Urdal, D. L., Conlon, P. J. *Bio/Technology*. 1988. 6(10):1204-1210.