



Universidad de Valladolid



MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)

Caracterización de una línea celular reportera para estudiar el mecanismo de recombinación homóloga de reparación del DNA

Trabajo Fin de Máster

Memoria del Trabajo de Fin de Máster presentada por **Cristina Peñas Pérez**

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

Cotutora: **Dra. María Simarro Grande**

Valladolid, 5 de Septiembre de 2016

ÍNDICE

ABREVIATURAS	2
1) INTRODUCCIÓN	3
1.1) Terapia génica	3
1.2) Recombinación Homóloga	6
1.3) Enzimas de restricción	8
2) ANTECEDENTES	10
3) OBJETIVOS DEL TRABAJO	12
4) MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1) Prueba Dot Blot	13
▪ Preparación de las muestras	13
4.2) Southern Blot	14
▪ Obtención de la sonda	14
▪ Preparación de las muestras	16
▪ Electroforesis	18
▪ Transferencia	18
▪ Hibridación y detección de ácidos nucleicos	19
4.3) Determinación de la sensibilidad del Southern Blot	20
▪ Obtención de la sonda	21
▪ Preparación de las muestras	21
▪ Electroforesis, Transferencia e Hibridación	21
5) RESULTADOS y DISCUSIÓN	22
5.1) Generación de las sondas	22
5.2) Prueba de especificidad mediante Dot Blot	22
5.3) Southern Blot de la línea reportera	24
5.4) Determinación de la sensibilidad del Southern Blot	26
6) CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO	28
7) BIBLIOGRAFÍA	30

ABREVIATURAS

A: adenina

AAV: *Adeno Associated Virus*, virus adenoasociado

ATS: primer antisense

C: citosina

cDNA: DNA complementario

CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas

DDR: *DNA Damage Response*, respuesta al daño del DNA

DNA: *Deoxyribonucleic Acid*, ácido desoxirribonucleico

dNTPs: *deoxynucleotide triphosphate*, desoxirribonucleótidos trifosfato

DSBs: *Double Strand Breaks*, ruptura de la doble cadena

dUTP: *deoxyuridine triphosphate*, desoxiuridina trifosfato

EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente mejorada

G: guanina

GT: *gene targeting*

h: horas

HCT-116: *Human Colon cancer cell line*, línea celular humana de cáncer de colon

HRP: *Horseradish Peroxidase*, peroxidasa de rábano picante

ITRs: *Inverted Terminal Repeats*, regiones terminales invertidas

Kb: kilobases

Max. r.p.m.: máximas revoluciones por minuto

min: minutos

µl: microlitro

mM: milimolar

mRNA: *messenger Ribonucleic Acid*, ácido ribonucleico mensajero

NHEJ: *non-homologous end joining*, recombinación no-homóloga

O/N: *over night*, toda la noche

ORFs: *Open Reading Frames*, marcos de lectura abierta

pb: pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

rAAV: virus adenoasociado recombinante

RCL: *Reporter Cell Line*, línea celular reportera

RH: recombinación homóloga

seg: segundos

SEN: primer sens

SSBs: *Single Strand Breaks*, ruptura de hebra sencilla

T: timina

T^a: temperatura

TALENs: *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*, nucleasas activadoras de la transcripción

TE: Tris EDTA buffer

TG: terapia génica

V: voltios

V_{final}: volumen final

ZNFs: *Zinc Finger Nucleases*, nucleasas con dedos de zinc

1) INTRODUCCIÓN

1.1) TERAPIA GÉNICA

La **terapia génica** (TG) es un campo de la biomedicina que consiste en el empleo de diferentes técnicas orientadas a la cura de enfermedades, causadas por errores en el genoma, mediante la introducción de genes o material genético corrector en la célula diana, en la cuál se integra y corrige el fallo o mutación que causa la enfermedad. Se realiza sobre células germinales o somáticas.¹

En **células germinales** todavía no es viable puesto que aún no es una técnica segura ni fiable. Es peligrosa porque conlleva alterar el genoma humano permanentemente. En este caso, las modificaciones serían transmitidas a la descendencia y sería la forma más eficaz de corregir enfermedades congénitas. En cambio, la modificación de **células somáticas** es la empleada actualmente, puesto que no supone ningún conflicto ético. No se transmite a la descendencia.^{1,2}

En un principio, la TG fue ideada **como tratamiento de las enfermedades monogénicas** (producidas por alteraciones en la secuencia del DNA de un único gen, causante de la patología), en las que los tratamientos clásicos no funcionan o si lo hacen, no actúan de forma efectiva. Cabe citar que en estas enfermedades, el gen defectuoso se encuentra en todas las células del organismo. La introducción de una copia del gen funcional y su expresión durante un tiempo determinado ayudará a paliar la enfermedad. La posibilidad de administrar al paciente la proteína deficiente se ve condicionada por la naturaleza de la proteína y la necesidad de que ésta llegue al sitio diana para realizar su acción. La cura completa de la enfermedad, sólo se dará si el gen mutado es corregido, cosa que la terapia génica puede conseguir. En muchos casos, existe un número limitado de tejidos en los que se expresa el gen y por tanto, sólo se necesitaría introducir la copia normal en ellos y no en todas las células del organismo.^{1,2}

Los criterios que permiten considerar una enfermedad humana tratable por TG, fueron definidos por **Gamundi** en 2002 y son:^{1,2}

- ❖ La enfermedad ha de amenazar gravemente la vida del paciente.
- ❖ Los órganos afectados por la enfermedad deben estar caracterizados, es decir, debe saberse qué tipos celulares y tejidos se afectan en la enfermedad.
- ❖ El gen normal debe haber sido aislado, caracterizado y clonado.
- ❖ El gen terapéutico ha de poder ser introducido de forma cuantitativa en las células del tejido enfermo, o bien, a través de los tejidos más accesibles.
- ❖ La proteína normal ha de ser producida en las cantidades que se esperan de una expresión normal del gen.

A finales de los 80 se consideraban alteraciones idóneas para ser objeto de tratamiento génico la enfermedad de **Lesch-Nyhan** (provocada por la ausencia de la enzima HPRT-hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa, que provoca grave deficiencia mental y tendencia compulsiva al automutilamiento) e inmunodeficiencias por déficit de **PNP**, provocada por la carencia de una purina nucleósido fosforilasa) y la deficiencia **ADA** (la que padecen los "niños burbuja", en los que la falta de enzima adenosin desaminasa les deja absolutamente indefensos contra cualquier agente patógeno, obligándoles a vivir en un ambiente absolutamente estéril).³

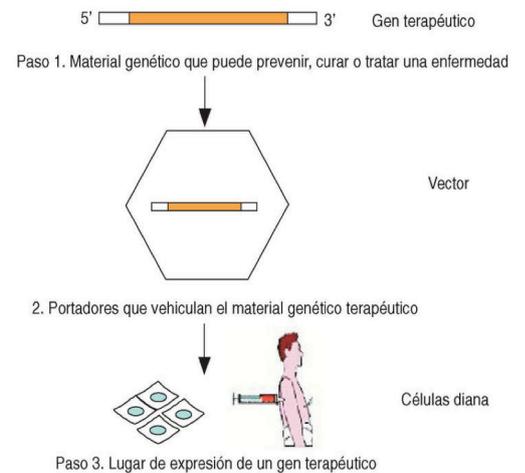


Figura 1: Introducción de un gen terapéutico en una célula diana

Según la manera en que actúa el material genético exógeno al ingresar en la célula diana, la TG puede llevarse a cabo mediante las técnicas:

- **Inserción génica:** se introduce una versión normal del gen defectuoso, sin modificar el gen endógeno. Se realiza con el fin de expresar la proteína deficiente en el paciente, la cual debe alcanzar los niveles necesarios para revertir el fenotipo en la enfermedad.
- **Modificación génica:** el gen defectuoso es normalizado/reparado por mutagénesis dirigida (produce mutaciones puntuales en el DNA).
- **Sustitución génica:** el gen defectuoso es sustituido por su versión normal mediante recombinación homóloga.

Dependiendo de la estrategia que se aplique para llevar a cabo la TG, ésta puede ser: **in vivo**, sobre las propias células, donde se introduce el material genético de manera directa sin manipulación *in vitro*. Supone un proceso sencillo pero tiene menor eficiencia a la hora de llegar al tejido y al reproducir y aumentar el número de células transformadas; o **ex vivo**, donde se extraen células del paciente, se les realiza una transferencia de material genético *in vitro*, y luego se vuelven a introducir al paciente. Tiene la ventaja de que las células que se introducen al paciente son previamente seleccionadas y por tanto, son aquellas en las que se ha realizado una transferencia génica exitosa. Permiten mejorar las carencias de la TG *in vivo* pero presenta la imposibilidad de manipular ciertos tipos de células, posibles contaminaciones y costes muy elevados.²

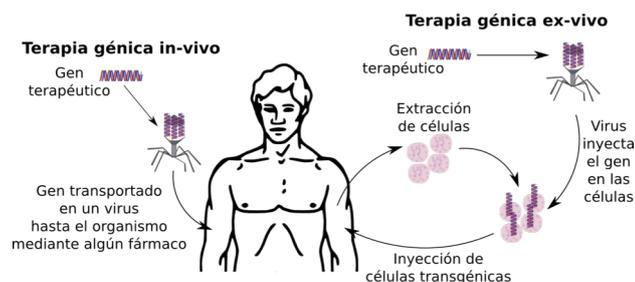


Figura 2: Terapia génica *in vivo* y *ex vivo*

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. Una vez dentro del núcleo, el gen puede integrarse permanentemente en el genoma celular o temporalmente. La integración del gen permite la perpetuación de la corrección a las sucesivas generaciones de forma rápida. Sin embargo, la inserción dentro del genoma no garantiza el éxito de la TG, dado que ésta se hace de forma aleatoria y la proteína puede que no se exprese porque se integra en zonas muy condensadas, o bien la célula aceptora acaba muriendo por inserción en un gen crucial. Más grave es la aparición de cáncer por la activación de un oncogén o por la inactivación de un gen supresor de tumores al realizar la inserción.

La transferencia del material genético al interior de la célula se realiza mediante promotores específicos que aseguran la expresión del gen. Para realizarla con elevada eficiencia, es importante contar con un sistema de vehiculización: los **vectores**, que pueden ser transferidos mediante un método de transducción (vectores virales) o de transfección (vectores no virales). Las propiedades de un vector ideal varían dependiendo de las necesidades aunque actualmente no se dispone del vector ideal que pueda adaptarse a todas las situaciones clínicas y experimentales; sin embargo, existe una gran cantidad de vectores que pueden ser utilizados.

Los **métodos de transfección físico-químicos** (vectores no virales) permiten transferir moléculas de gran tamaño, ya que el DNA exógeno está integrado en un plásmido, que actúa como vehículo introductor de la secuencia génica de interés y la transfiere dentro de la célula. Exhiben tres elementos característicos en su

conformación más básica: “polylinker” (sólo en los plásmidos artificiales, región con sitios de restricción únicos que se pueden utilizar para la inserción del gen de interés), gen de resistencia a un determinado antibiótico y una región esencial que contiene los genes involucrados en la replicación y su control. Son sencillos, económicos, no tóxicos ni inmunogénicos.

Los **métodos químicos** (liposomas, calcio, DEAE-DEXTRANO) y **físicos** (electroporación, micro-inyección, biolística) tienen baja frecuencia de transferencia y son poco específicos, por ello, el método más empleado en la integración del material genético en la célula, son los vectores virales. Cabe destacar el desarrollo, durante los últimos años, de una técnica basada en la enzima meganucleasa, capaz de reconocer largas secuencias de DNA y realizar cortes específicos que promoverán el *gene targeting*.

Por otro lado, están los **vectores virales** (Retrovirus, Adenovirus, Lentivirus, Virus adenoasociados y Virus del Herpes Simplex) que permiten la inserción del gen terapéutico en él a la vez que se neutraliza la capacidad del virus de replicarse (no la de infectar). El tamaño del inserto se ve condicionado al tipo de vector que se emplee y la eficacia de la transducción es muy elevada (en ocasiones alcanza el 100% de las células diana). Como desventaja, éstos vectores pueden inducir respuesta inmune por parte del huésped tras realizarse la TG. Con excepción de los virus adenoasociados, que se integran específicamente en el cromosoma 19, y del Virus del Herpes Simplex, que no se inserta en el genoma, los demás pueden insertarse al azar en el genoma del huésped y puede incorporar varias copias del mismo. Como resultado, pueden aparecer mutaciones en el genoma que lleven a la transformación maligna de las células o a la muerte celular. Esto podría evitarse mediante manipulación génica dirigida o *gene targeting*.

El **gene targeting** (GT) se desarrolla a través del proceso de recombinación homóloga (RH): el vector únicamente al encontrar su secuencia homóloga en el gen diana, induce la recombinación.

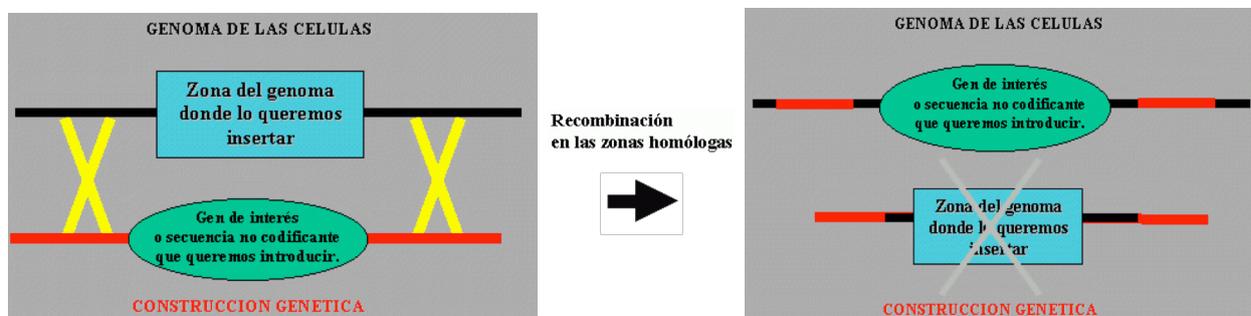


Figura 3: Proceso de recombinación homóloga

Las **ventajas** del GT sobre los métodos que adicionan genes son: capacidad de modificar secuencias específicas, se preserva la regulación transcripcional del gen y disminuyen los riesgos de mutagénesis de inserción y de activación de oncogenes debido a la integración aleatoria. Sin embargo, tiene un gran **problema**: la baja frecuencia con la que ocurre la RH en los mamíferos, particularmente en humanos (1 de cada 10^5 - 10^7 células).^{4,5} La inducción de recombinación entre fragmentos homólogos permite realizar deleciones génicas (*knock-out*), inserciones (*knock-in*) mediante integración dirigida, y correcciones génicas.

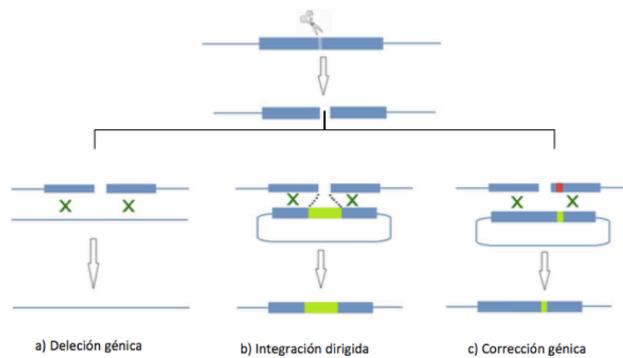


Figura 4: Delecciones génicas, integraciones dirigidas y correcciones génicas inducidas por la recombinación homóloga

En este trabajo utilizamos líneas celulares con frecuencia de GT alta ya que se generaron bajo condiciones que favorecían la RH: usando virus adenoasociados recombinantes (rAAV), expresión de proteínas que aumentan la frecuencia de RH y reducción en la expresión de proteínas que intervienen en la vía de reparación del DNA por la vía de la recombinación no-homóloga (NHEJ).

1.2) RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA (RH)

Las células deben mantener y copiar con precisión su DNA para garantizar la transmisión fiel del material genético a la siguiente generación.^{6,7} El DNA está continuamente expuesto a una gran variedad de **factores endógenos y exógenos**, como la luz UV, rayos X y γ , o productos químicos genotóxicos, que producen daños. Los procesos fisiológicos habituales también contribuyen a generar daños en el DNA, como el metabolismo celular, en el que se producen especies reactivas del oxígeno (ROS). Las consecuencias biológicas que pueden tener estos agentes van a depender de la naturaleza química de la alteración y la toxicidad o mutagénesis del daño va a depender de la eficiencia de los mecanismos celulares implicados en la detección, reconocimiento y eliminación de este daño, y de su precisión al reparar las lesiones. Para hacer frente al constante asalto de la integridad del genoma, las células han desarrollado una forma de responder a este daño, mediante **DDR** (*DNA damage response*, respuesta al DNA dañado). DDR detecta las lesiones producidas en el DNA y activa las vías de reparación.^{8,9} En los mamíferos, se ha estimado que cada célula está sujeta a >15000 lesiones cada 24 h, que suelen surgir de fuentes endógenas.^{6,7} Cuando la cantidad de DNA dañado supera la capacidad de reparación de DDR, las quinasas y ubiquitin ligasas que forman parte de la DDR, detienen el ciclo celular y entonces se activa la senescencia o apoptosis celular.¹⁰ Frecuentemente, los defectos en la reparación del DNA son observados en enfermedades como el cáncer. Se ha contemplado que la modulación de la RH en células tumorales puede ser una manera más efectiva que la quimioterapia para tratar este tipo de enfermedades.

Entre los diversos tipos de **lesiones** del DNA, prevalece la ruptura de hebra sencilla (*single strand breaks*, SSBs). Si las SSBs no se reparan, pueden dar lugar a la ruptura de la doble cadena (*double strand breaks*, DSBs), que son más citotóxicas que las anteriores.⁸ Las DSBs pueden ser generadas de manera espontánea durante la síntesis del DNA, cuando la horquilla de replicación se encuentra con un DNA molde dañado y, también, durante procesos celulares específicos, como la recombinación V(D)J que ocurre en las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, o como en la meiosis. La reparación errónea o la ausencia de reparación pueden conducir a graves alteraciones en el genoma (translocaciones, deleciones, muerte celular...)¹¹, por lo que la adecuada reparación es fundamental para mantener la integridad del genoma.

Las células están equipadas con dos vías diferentes de reparación: *non-homologous end-joining* (**NHEJ**) y *homologous recombination* (**RH**).

NHEJ sucede durante todo el ciclo celular (es más activa en las fases G₀, G₁ y S temprana), el DNA se liga de forma no conservadora, y la reparación puede ser mutagénica mientras que la RH sucede sólo entre las fases S tardía (Síntesis: replicación del DNA) y M (Mitosis o Meiosis: repartición del material genético nuclear) del ciclo celular, el DNA se liga de forma conservativa y la reparación no es mutagénica.^{12,13} Que predomine una u otra vía dependerá de la especie, tipo de célula, estado del ciclo celular y del daño del DNA. La resección del extremo del DNA es el punto crítico para utilizar NHEJ o RH en la reparación y está controlada por las Cdk.⁸

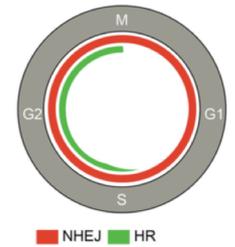


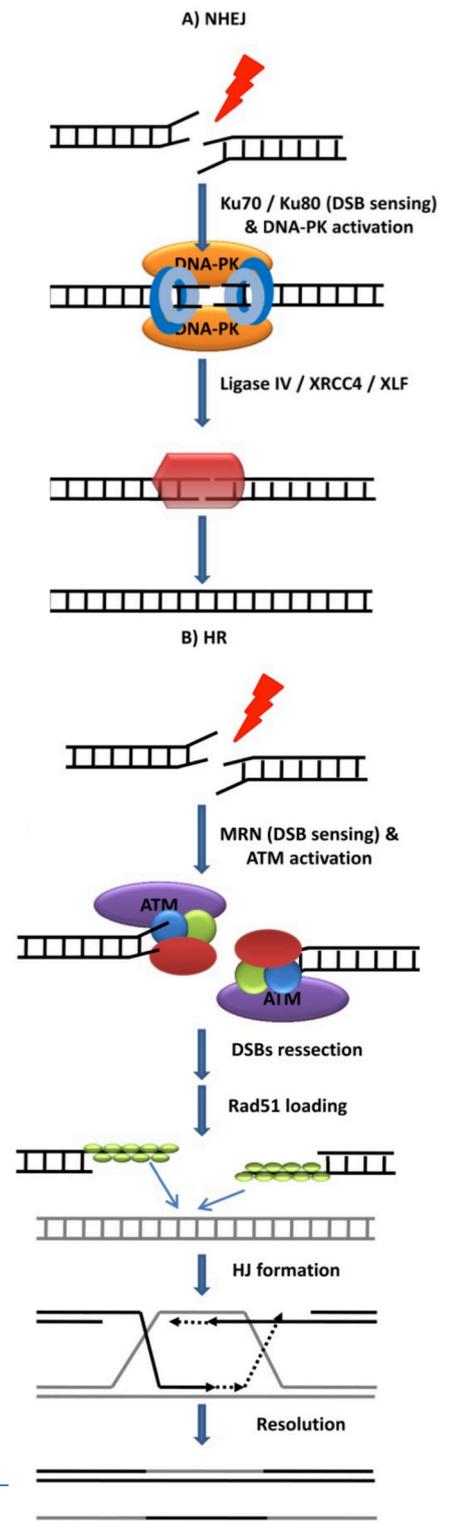
Figura 5: Vías de reparación del DSBs en el contexto de la regulación

La RH es la principal vía de reparación de roturas en la doble cadena del DNA en levaduras y procariontas, a diferencia de lo que ocurre en eucariotas superiores, en los que es el mecanismo de NHEJ el que predomina en la reparación de estas lesiones (relación 1000:1 con respecto a la RH).

La **NHEJ** es un proceso dinámico que no requiere homología de secuencia como en la RH, en el que se unen los extremos de DNA originados tras la rotura. Durante la NHEJ, los extremos del DNA que ha sufrido una DSB son reconocidos, capturados y atraídos por el complejo **Ku70-Ku80** (también conocido como complejo **Ku**), al cuál se unen con elevada afinidad. Ku recluta a otras proteínas: **DNA-PKcs** (subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de DNA o *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) con actividad serina/treonina quinasa sólo cuando forma complejo con Ku, codificada en humanos por el gen PRKDC; **Artemis**, con actividad exonucleasa 5'→3', únicamente cuando forma un complejo con la DNA-PKcs, codificada en humanos por el gen DCLRE1C; y **XRCC4-DNA ligasa IV**, complejo que interactúa con las dos proteínas mencionadas anteriormente permitiendo la ligación entre los extremos del DNA.¹⁴ Después, los extremos de DNA son procesados y ligados, completándose la reparación mediante NHEJ.

Dado que puede conducir a la unión de extremos incorrectos (su naturaleza imprecisa puede causar inserciones y deleciones), NHEJ es una vía propensa a errores.¹²

La **RH** es cualquier proceso en el que tenga lugar la formación de un nuevo DNA a partir de moléculas distintas ya existentes, de manera que la información genética procedente de cada molécula de DNA original estará presente en las nuevas. Las secuencias homólogas son empleadas como molde para la reparación del daño. Sucede en la meiosis de células eucariotas. La RH permite la reorganización de genes dentro/entre cromosomas y es una potente fuerza evolutiva que promueve la diversidad genética y la conservación de la identidad genética entre generaciones y durante el desarrollo ontogénico. Una célula humana diploide necesita mantener 6x10⁹ pb en la secuencia y organización cromosómica correcta, una tarea formidable que por lo general se lleva a cabo sin errores entre generaciones.¹⁵ La RH sucede en tres etapas: **presinapsis** (el DNA dañado se extiende como ssDNA y se une la proteína RPA), **sinapsis** (intercambio de cadenas homólogas, Rad51 busca la homología) y **postsinapsis** (recuperación de la integridad del cromosoma). La RH se inicia cuando el complejo Mre11-Rad50-Nbs1/Xrs2 o **MRN** reconoce los extremos generados durante la DSB y se une a ellos, seguido por la unión



del cofactor CtPI, lo cual termina por producir la resección de los extremos en sentido 5'→3', gracias a la exonucleasa humana I (**hExol**), para producir los extremos 3' libres de cadena sencilla (ssDNA). La proteína de replicación A (RPA, *replication protein A*) se une al extremo 3' ssDNA generado en la resección, antes de que **Rad51** comience la búsqueda de homología y catalice el intercambio de cadenas para permitir la reparación de la DSB.

Se considera que la RH es un mecanismo libre de errores por utilizar la secuencia homóloga para producir reparación. A pesar de todo ello, en células de mamíferos las reparaciones se realizan mayoritariamente por NHEJ.¹⁴

La RH acelera la evolución a través de la generación de diversidad adicional, pero también puede conducir a reordenamientos potencialmente letales, por lo que debe estar regulado. La RH está regulada positiva y negativamente.^{15,16}

Actualmente, existen evidencias de que la **manipulación** del equilibrio entre NHEJ y RH (con inhibición de la primera y potenciación de la segunda) mediante diferentes formas, puede incrementar la frecuencia de RH. Por ejemplo, los cambios de expresión de Ku pueden modificar la frecuencia de RH en diferentes hongos: la delección de Ku70 y Ku86 en *Neurospora crassa* produce un aumento de 5 veces la frecuencia de RH. En humanos, la disminución de los niveles de Ku70 en líneas HCT-116 hemicigotas Ku70 (Ku70 +/-), la RH aumentó entre 5-10 veces frente a células normales. También se ha demostrado que el knockdown de Ku70 y XRCC4 por siRNA en células humanas HCT-116 produce un aumento de 30 veces la frecuencia de RH del locus HPRT.¹⁷ También se ha intentado conseguir aumentar la frecuencia de RH sobreexpresando proteínas clave en dicha vía: la expresión forzada de RAD51 aumenta más del doble la frecuencia de RH en células HT1080 en dos *loci* diferentes (HRPT y 6-16).¹⁸ Ciertos compuestos químicos han demostrado producir cambios en la frecuencia de RH: RS-1 ((3-[(benzilamino)sulfonil]-4-bromo-N-(4-bromofenil)-benzamida) provoca un cambio alostérico en el filamento de RAD51 y aumenta la RH en fibroblastos humanos sin efectos nocivos para la viabilidad celular.¹⁹

1.3) ENZIMAS O ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

La manipulación génica dirigida se desarrolla a través de la RH. Las ventajas de la manipulación génica dirigida sobre los métodos que adicionan genes son:

- ❖ Capacidad de modificar secuencias específicas.
- ❖ Preservación de la regulación transcripcional del gen.
- ❖ Disminución de los riesgos de mutagénesis insercional y de activación de oncogenes debido a integración aleatoria.

Para solucionar la baja frecuencia con la que la RH ocurre en los mamíferos, nacieron las primeras herramientas para modificar un locus endógeno: secuencias de unión al DNA ligadas a un dominio nucleasa que escinde el DNA, generando su ruptura en lugares concretos. El descubrimiento de las **enzimas de restricción** ha permitido a los investigadores manipular segmentos específicos de DNA, facilitando enormemente el estudio de ésta molécula de gran tamaño. Las enzimas de restricción reconocen secuencias de bases específicas en el DNA (4-8 pb), hidrolizan un enlace fosfodiéster y cortan en lugares concretos ambas hebras del dúplex que contienen las secuencias reconocidas. Estas enzimas fueron obtenidas a partir de una gran variedad de procariontes. Su función biológica consiste en eliminar DNA foráneo. El DNA del propio microorganismo no se destruye porque los sitios reconocidos por las enzimas se encuentran metilados. Una característica notable de los sitios de corte es que, en muchos casos, son palíndromos y están dispuestos simétricamente. Los cortes con estas enzimas pueden ocurrir en el mismo punto de ambas hebras de DNA (extremos "**romos**") o corrido una hebra respecto a la otra (extremos "**cohesivos**").

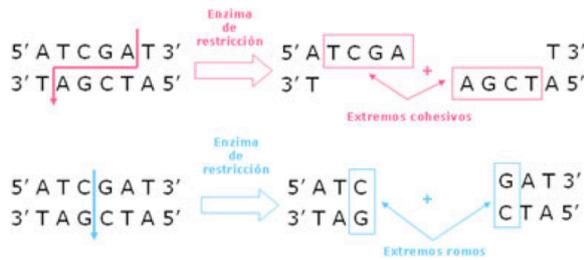


Figura 6: Extremos cohesivos y romos provocados por los cortes de las enzimas de restricción

Las enzimas de restricción se utilizan para cortar moléculas de DNA y proporcionar fragmentos específicos que se pueden analizar y manipular con más facilidad que la molécula original. La cantidad de fragmentos obtenidos tras el corte con la enzima, dependerá de la frecuencia de corte de dicha enzima ya que si su secuencia de reconocimiento se encuentra muchas veces repetida en el DNA, se generarán muchos fragmentos de restricción de diferentes tamaños. A medida que el sitio de restricción de una enzima tenga mayor número de pb, la frecuencia de corte será menor, ya que es menos probable que se combinen dichas pb para formar la secuencia de reconocimiento y encontrarla en el DNA.

Las **nucleasas** son enzimas hidrolasa del tipo esterasa que degradan ácidos nucleicos y producen la rotura de los enlaces fosfodiéster de la cadena. La vida media para el enlace fosfodiéster en el DNA a pH 7 y 24°C se ha estimado en 130000 años. También existen **nucleasas quiméricas**. Las más empleadas son ZNFs, TALENs y CRISPR. Permiten un amplio rango de modificaciones génicas induciendo cortes en el DNA, mediante lo cual se activa la maquinaria de reparación celular. Las **Zinc Finger Nucleases** (ZFNs) son proteínas compuestas por un dominio de unión al DNA de tipo dedo de zinc y una nucleasa convencional (frecuentemente FokI). Son los motivos de unión al DNA más habituales encontrados en eucariotas y es el segundo dominio de proteína codificado más frecuente en el genoma humano. Se trata de un motivo que se repite varias veces. Cada dedo posee una longitud de 30 aminoácidos e interacciona específicamente con un triplete de bases del DNA. Lo interesante de las ZFNs, de las que existen muchas variantes, es que poseen diversas funciones importantes: estabilizar la estructura de las proteínas y, sobre todo, interaccionar específicamente con DNA y RNA. Las ventajas de las ZFN son que reparan la secuencia del gen sin integrar ninguna secuencia en el genoma, la eficiencia es muy alta y no es necesario mantener la expresión de un gen a lo largo del tiempo. Sin embargo, también presentan inconvenientes, puesto que probablemente sólo puedan aplicarse a terapias *ex vivo*, tienen alto poder inmunogénico y pueden producir efectos secundarios, ya que aún queda por demostrar su inocuidad. La obtención de ZFNs es costosa, por lo que estas proteínas se vieron rápidamente superadas por un nuevo tipo, las TALENs. Las **transcription activator-like (TAL) effector nucleases** son proteínas formadas por un dominio nucleasa (de nuevo, habitualmente FokI) y un dominio de unión al DNA derivado de unos factores de transcripción que permiten a la bacteria reprogramar específicamente la transcripción de las células de una planta infectada (*Xanthomonas*). Están formadas por repeticiones de 33-35 aminoácidos y reconocen el DNA mediante unos dominios que siguen un código simple entre tres residuos proteicos específicos para cada nucleótido. Sin embargo, ZNFs y TALENs se han visto superadas rápidamente por las **CRISPR/Cas** (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), proceso usado por algunas bacterias para eliminar virus o plásmidos invasivos. El dominio de unión al DNA que dirige a la nucleasa no es un dominio proteico sino un RNA guía. Esto convierte al sistema CRISPR/Cas en un método altamente flexible y fácil de adaptar con el que se puede cortar específicamente cualquier secuencia sintetizando un RNA guía complementario.²⁰

Cuando las rupturas causadas por nucleasas son reparadas por NHEJ, pueden generarse pequeñas inserciones o deleciones en el sitio diana, y con ello, producir el silenciamiento de un gen, se pueden inducir deleciones más largas, inversiones o translocaciones. También se pueden realizar deleciones e inserciones de manera dirigida.

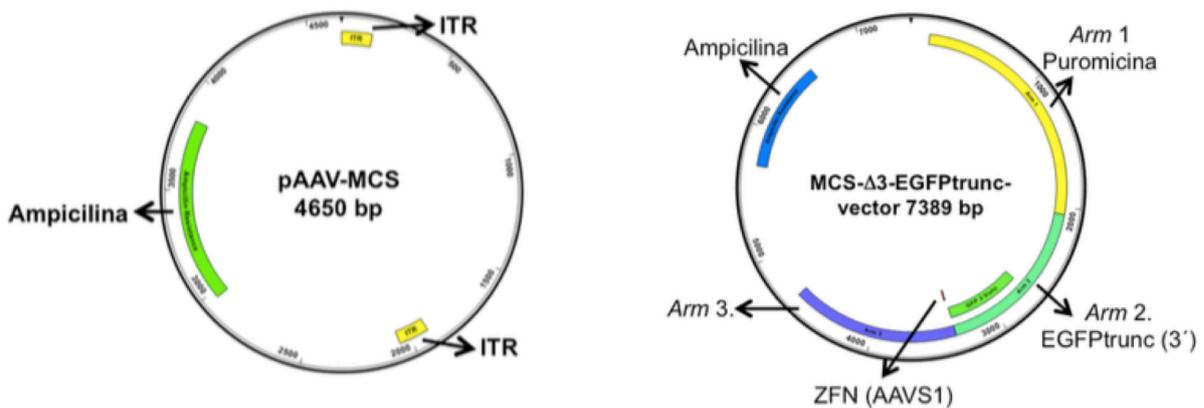
2) ANTECEDENTES

Este trabajo es la continuación del desarrollado por la Dra. María Alejandra Bernardi, que había generado una línea celular reportera (RCL) que poseía el gen EGFP truncado en el extremo 3', sin funcionalidad.

En su trabajo, se propuso generar la línea celular reportera (RCL) para evaluar cambios en la frecuencia de RH en distintas condiciones experimentales. Para ello, primero construyó un vector de homología que permitiera la introducción de un cDNA truncado de EGFP en el sitio AAVS1 del cromosoma 19: **MCS-Δ3-EGFPtrunc-vector**. La construcción se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR de 3 fragmentos génicos:

- el primero fue amplificado a partir de pAAV-CAGGS-EGFP (comercial), que contiene una secuencia homóloga al sitio de inserción de los AAVs (AAVS1) y el casete de resistencia a puromicina.
- el segundo fragmento, se obtuvo a partir del pEGFP-C1 (comercial), que permitió la amplificación de EGFP, con una delección de los últimos 73 pb (extremo 3') lo que hace que la proteína resultante no sea funcional, es decir, no emite fluorescencia verde.
- el último inserto se obtuvo a partir de DNA genómico de células HCT-116, amplificándose un fragmento cuya secuencia es homóloga al sitio AAVS1 en el cromosoma 19.

Estos fragmentos fueron digeridos con diferentes enzimas (NotI/Sall, Sall/EcoRI y EcoRI/NotI) y se insertaron en el vector pAAV-MCS.



Mapa del vector pAAV-MCS y del plásmido construido MCS-Δ3-EGFPtrunc

Al analizar el patrón de restricción obtenido, observó la presencia de colonias bacterianas que incorporaron los 3 insertos ligados correctamente. Este plásmido fue nucleofectado en células HCT-116 junto con dos mRNAs que codificaban para una pareja de ZFNs (de muy alta eficiencia para producir un corte en el DNA endógeno y permitir la incorporación del DNA exógeno en el sitio del corte), que reconocen específicamente la secuencia AAVS1 en el intrón 1 del gen PPP1R12C (cromosoma 19).

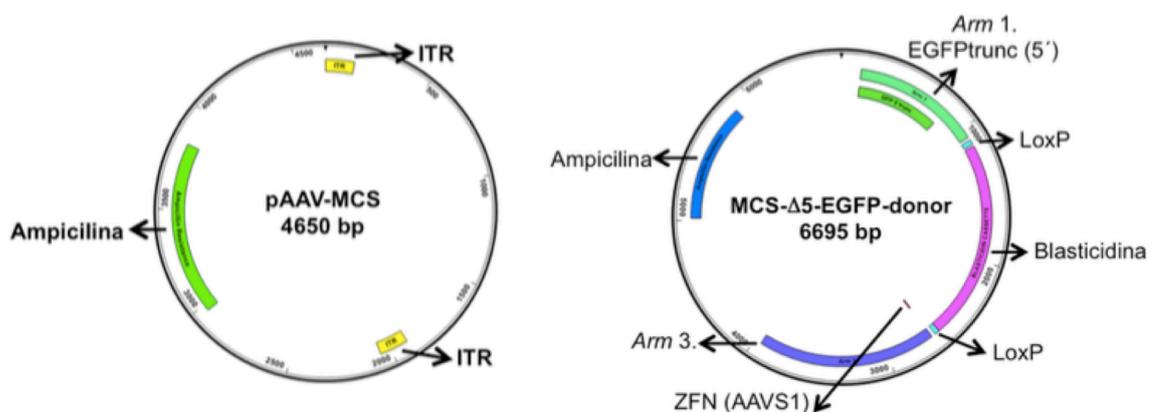
Al transfectar, se observa que las células no dan fluorescencia. Tras extraer el DNA, realizó PCRs de comprobación para verificar la correcta inserción de los extremos 5' y 3'.

Una vez generada la RCL, para poner a punto los ensayos de RH, utilizó un vector donante (**AAV-Δ5-EGFP-donor**) que contiene la secuencia necesaria para corregir genéticamente la función de la EGFP endógena cuando ocurre RH entre el genoma de

la RCL y el genoma del rAAV, con la consecuente recuperación de la fluorescencia verde. Este vector se construyó, también, con 3 fragmentos diferentes:

- el fragmento 1 contiene un fragmento EGFP carente de los 38 pb del extremo 5', se obtuvo mediante amplificación por PCR del pEGFP-N1. Dentro de esas 38 pb, se encuentra la ATG y, por lo tanto, la proteína no se produce y no hay emisión de fluorescencia verde.
- el fragmento 2 se obtuvo directamente mediante digestión con las enzimas Sall/EcoRI del plásmido pBS-Blasticidin, construido en el laboratorio, el cual contiene el casete de resistencia a blasticidina (antibiótico de selección) que nos permitirá seleccionar las células verdes recombinantes.
- el fragmento 3 es común al utilizado anteriormente en la generación del MCS-Δ3-EGFPtrunc-vector.

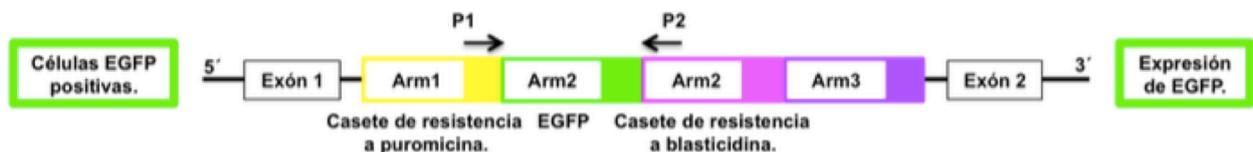
Una vez obtenidos los tres fragmentos, se ligaron al vector pAAV-MCS.



Mapa del vector pAAV-MCS y del plásmido construido MCS-Δ5-EGFPtrunc anterior

Por último, se realizó la transfección de las RCL con el vector donante AAV-Δ5-EGFP-donor, bajo diferentes condiciones que favorecieran la recombinación homóloga, para comprobar si el sistema funcionaba adecuadamente.

Se pudieron observar las células verdes, lo que permitió asegurar que la RCL construida funciona de manera correcta y también el vector donante, ya que de otra manera no se hubieran obtenido células verdes recombinantes.

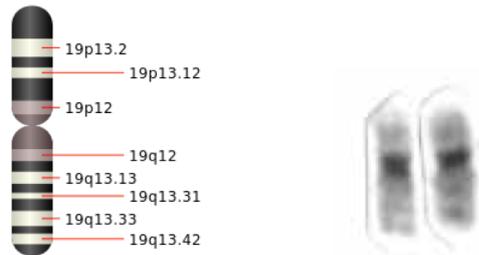


Esquema del DNA de la RCL verdes una vez nucleofectadas con el plásmido MCS-Δ3-EGFPtrunc-vector y, posteriormente, transducida con el AAV-Δ5-EGFP-donor

3) OBJETIVOS DEL TRABAJO

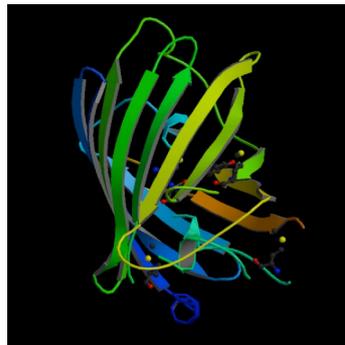
El **objetivo general** de éste trabajo es contribuir a caracterizar una línea celular reportera (RCL) que se usará en ensayos de recombinación homóloga (RH).

Como **objetivos específicos**, en el trabajo se plantea ver si se ha incorporado en esta línea celular reportera (RCL) una sola vez (una única copia) el gen EGFP ("*Enhanced Green Fluorescent Protein*"), en el lugar correcto y comprobar si hay inserciones en otros *loci* aparte del sitio AAVS1 (localizado en el brazo largo del cromosoma 19: 19q13).



Cromátida del cromosoma 19 y Par de cromosomas 19

RCL es una línea celular reportera derivada de las células HCT-116 (carcinoma colorrectal) que expresa la proteína EGFP truncada-



Estructura de la proteína EGFP

Otros objetivos del trabajo han sido:

- ❖ Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares adherentes HCT-116, RCL y Fluorescentes (RCL post recombinación homóloga).
- ❖ Extracción y posterior digestión y precipitación del DNA de las líneas celulares mencionadas anteriormente.
- ❖ Obtener una sonda específica para la secuencia del gen EGFP mediante la técnica PCR y marcarla con biotina-11-dUTP.
- ❖ Conseguir la hibridación de la sonda a los DNA fijados en una membrana de nylon.
- ❖ Poner a punto la detección del gen EGFP mediante la técnica de Southern Blot.

4) MATERIALES Y MÉTODOS

4.1) MATERIALES Y MÉTODOS PARA LA PRUEBA DOT BLOT

El Dot Blot es una técnica empleada en biología molecular para detectar biomoléculas (como el DNA). Se trata de una simplificación del método de Southern Blot (E. M. Southern, 1975), en la cual, el DNA no se separa por electroforesis en gel de agarosa, sino que se deposita directamente sobre una membrana de nylon. Esto es seguido por la detección con sondas, en nuestro caso marcadas con biotina (quimioluminiscencia). Las sondas son complementarias a las secuencias de DNA que buscamos. Solamente las muestras que presentan la región complementaria a la secuencia de la sonda, darán señal tras el revelado. La señal será más intensa cuanto mayor cantidad de DNA haya.

Ofrece importante ahorro de tiempo pero no proporciona información sobre el tamaño de la biomolécula objeto de estudio.

Realizaremos esta prueba para ver si el plásmido pEGFP-N3 es específico y para ver si las células RCL dan señal. Utilizaremos para la prueba una sonda de 242 pb.

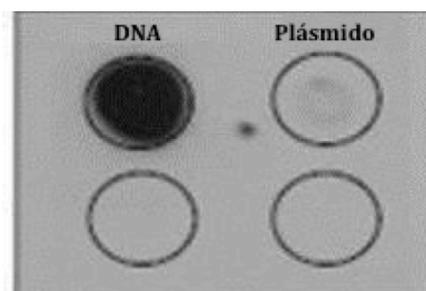
❖ PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Tras la descongelación y extracción del DNA de las células RCL, se procederá a la digestión de las mismas con las enzimas **EcoRI** y **BglII**, en un volumen final de 400 µl y a su posterior resuspensión en 40 µl de TE 1x *Buffer*. También se necesitará el DNA de las células RCL sin digerir.

A continuación, se preparará el plásmido con secuencia EGFP que se va a usar en la técnica Southern Blot (**pEGFP-N3**) y un plásmido cualquiera que no tenga secuencia EGFP en su genoma (**pCI Neo**). De esta forma, dispondremos de un control positivo (el plásmido con EGFP dará señal cuando se hibride la sonda, puesto que la sonda diseñada es específica y se hibridará a una parte de la secuencia EGFP diana) y un control negativo (el plásmido sin EGFP no dará señal ya que no se hibridará la sonda debido a que el plásmido no tiene secuencia EGFP diana).

Una vez que se dispone de DNA genómico de las células RCL sin digerir y digerido, y de los DNA plasmídicos, se procede a desnaturalizarlos, calentándolos a 100°C en un baño seco (*Thermomixer confort*), para que la hibridación con la sonda tenga lugar más tarde. Después, en una membrana de nylon previamente humedecida en TE 1x *Buffer*, cada muestra se coloca en un punto determinado. Se fija el DNA a la membrana con el *UV Stratalinker 1800* (realizar 2 *crosslinks*) y posteriormente, se realizará la hibridación y detección de ácidos nucleicos, es decir, tendrá lugar la hibridación de los DNA con la sonda (preparación de la misma detallada en las pág 14-16), empleando el kit comercial **North2South® Chemiluminescent Hybridization and Detection** (nº de catálogo 17097) de Thermo Scientific, que se describirá en el siguiente apartado (pág 19-20).

Ejemplo de cómo se depositarían en la membrana de nylon los DNA digerido y sin digerir de las células de interés y los plásmidos control



4.2) MATERIALES Y MÉTODOS DEL SOUTHERN BLOT

❖ OBTENCIÓN DE LA SONDA

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Mediante la técnica PCR, ideada por K. Mullis (1984) para amplificar secuencias específicas de DNA, obtenemos la sonda que queremos. Nosotros generamos dos sondas: de 241 pb (“pequeña”) y de 533 pb (“grande”). En un tubo de PCR mezclar:

- Agua RNasa free para alcanzar el volumen final deseado (**50 µl**).
- Tampón de reacción para que haya un ambiente idóneo en la digestión y para que la enzima pueda trabajar. Utilizamos *Buffer 0 HF 5x* (**10 µl**).
- Primers 10 µM (las madres están a 100 µM) para delimitar la región de DNA a amplificar.

Sonda de 241 pb: **2 µl** de cada primer serán suficientes.

Sens EGFP 234: CAT GAA GCA GCA GCA CGA CTT CT

Ats EGFP 475: CTG CTT GTC GGC CAT GAT ATA G

Sonda de 533 pb: **2,5 µl** de cada primer serán suficientes.

Sen EGFP 126: GCT GAC CCT GAA GTT CAT CTG

Ats EGFP 659: CCA TGT GAT CGC GCT TCT

- dNTPs 10 mM necesarios para generar las nuevas hebras de DNA (**1 µl**).
- Phusion Hot Start II (ThermoFisher Scientific) que es la polimerasa. **0,5 µl** (para la sonda grande) y **0,4 µl** (para la sonda pequeña).
- DNA, la cantidad que necesitemos: 100 ng en **2 µl**.

Tras preparar la mezcla, introducir el programa en el termociclador. La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones:

- 1 ciclo 1 min a 98°C (1ª desnaturalización)
- 40 ciclos:
 - 15 seg a 96°C (2ª desnaturalización)
 - 15 seg a 62°C (anillamiento, depende de los primers, consultar web)
 - 15 seg a 72°C (extensión, depende de la polimerasa que se emplee)
- 1 ciclo 5 min a 72°C (extensión final)
- 1 ciclo ∞ a 4°C



Termociclador

En la PCR, por ser una técnica cíclica, la 2ª desnaturalización, el anillamiento y la extensión se repiten 40 veces.

Electroforesis de la sonda

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica que permite separar y comprobar el aspecto y tamaño de los fragmentos de DNA procedentes de una purificación de un plásmido, de los fragmentos resultantes de una digestión con enzimas de restricción o de las amplificaciones obtenidas en una PCR. Según el tamaño de los fragmentos de DNA, se emplean geles a distintas concentraciones en tampón TAE 1x.

Preparar un **gel de agarosa al 1%** con TAE *Buffer* 1x. Calentar la mezcla hasta que se disuelva la agarosa, sin llegar a que hierva y después se enfría. Añadir el colorante **Simply safe** (2,6 µl) y agitar para que se mezcle homogéneamente en el gel.

Montar la cubeta horizontal de electroforesis, colocar el peine que formará los pocillos y añadir el gel. Tras eliminar las posibles burbujas



Cubeta horizontal de electroforesis

que puedan haber quedado en la base de los pocillos, dejar que el gel solidifique y después retirar el peine.

Cargar las muestras: **marcador** de pares de bases *Gene Ruler* de ThermoFisher Scientific (15 µl) y productos de **PCRs** (50 µl de producto PCR + 10 µl del *loading buffer*).

El gel se pondrá a correr (**150 V, 30 min**). Observar el gel por UV, y ver los fragmentos de DNA amplificados. Tendría que aparecer banda a **533 pb** (en el caso de la sonda grande) o a **241 pb** (para la sonda pequeña).

Purificación de bandas en gel de agarosa

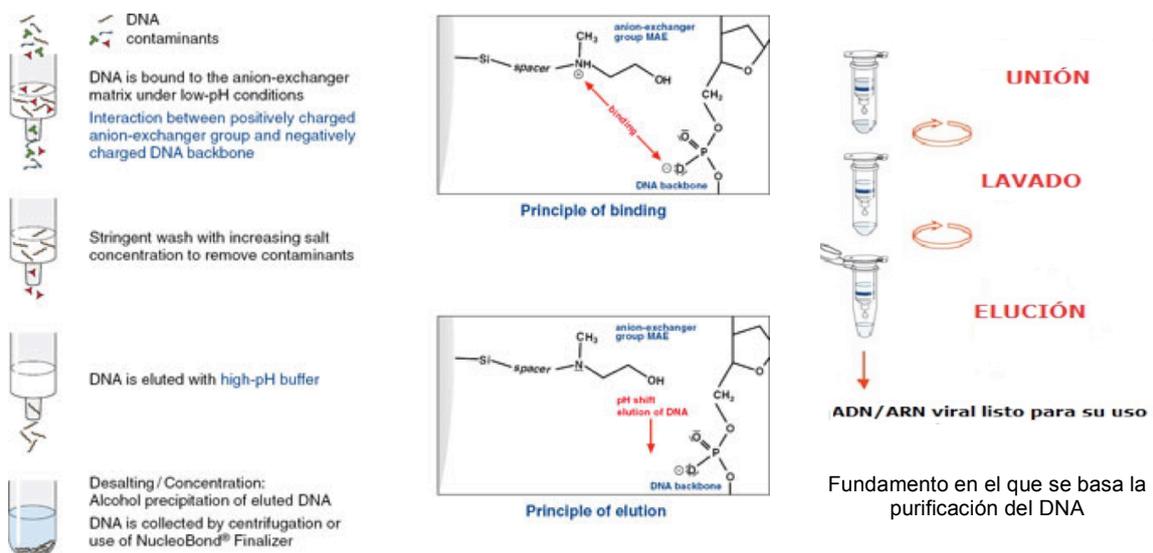
Lo primero es cortar la banda del gel con una cuchilla, procurando extraer la mínima cantidad de agarosa que no tenga producto. Después, pasar el trozo de agarosa a un eppendorf pesado y calcular el peso del fragmento de gel. A continuación, el tratamiento de la banda, dependerá del kit empleado para llevar a cabo este proceso de purificación. Usamos diferentes kits siguiendo el protocolo establecido por las casas comerciales:

- **Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System** (nº de catálogo A9282) de Promega.
- **GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit** (nº de catálogo K0832) de ThermoFisher Scientific
- **PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo kit** (nº de catálogo K220001) de Invitrogen



Diferentes kits de purificación empleados: Promega, ThermoFisher Scientific e Invitrogen

Todos estos kits se basan en el empleo de: **Membrane Binding/Extraction/Solubilization Buffer**, para disolver el gel de agarosa y poder extraer de él el DNA que queremos purificar, y **Wash Buffer** con el cuál se realizan diferentes lavados del DNA. Entre la extracción y los lavados que tienen lugar, se realizan varias centrifugaciones a máxima velocidad para conseguir que el DNA quede atrapado en la membrana de una columna en ausencia del gel de agarosa, el cual, pasará a través de esta membrana y quedará atrapado en el colector de la columna como sobrenadante.



Cuantificar con Nanodrop 2000 el fragmento extraído.



Nanodrop 2000

Marcaje de la sonda

Empleamos diferentes kits siguiendo el correspondiente protocolo.

Primero probamos con el **kit North2South™ Biotin Random Prime Labeling** de Thermo Scientific (nº de catálogo 17075). Se basa en una reacción de marcaje de ≈100 ng de DNA lineal de la sonda (previamente desnaturalizada) con: **agua nuclease-free** del kit (V_{final} 24 μl), mix de **heptanucleótidos** (10 μl), mix **dNTPS 5x** (10 μl), **Reaction Buffer 10x** (5 μl) y **Klenow fragment** (1 μl). Tras incubar la sonda (60 min, 37°C), se para la reacción con **EDTA 500 mM pH 8.0** (2 μl , función de quelación), que inactiva la enzima. Después, se realiza una precipitación con etanol para eliminar los nucleótidos no incorporados y finalmente, se resuspende la sonda marcada en **agua nuclease-free** del kit (25 μl).

Después decidimos utilizar el **kit Biotin DecaLabel DNA Labeling** de Thermo Scientific (nº de catálogo K0651), ya que el protocolo a seguir es más rápido que el anterior y utiliza los mismos componentes. La única diferencia es que emplea decanucleótidos en lugar del mix de heptanucleótidos. Se utiliza en este caso 100 ng - 1 μg de DNA de la sonda y se marca con un mix de decanucleótidos en 5x **Reaction Buffer** (10 μl), **agua nuclease-free** (V_{final} 24 μl), mix de **Biotin Labeling** (5 μl) y fragmento **Klenow** (1 μl). Al igual que con el kit anterior, la reacción de marcaje se para añadiendo **EDTA 500 mM pH 8.0** (1 μl) tras haber incubado la sonda (60 min, 37°C).



Kits empleados en el marcaje de la sonda

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Descongelación de las líneas celulares

Coger del congelador (-80°C) los viales con las células (HCT-116, RCL y Fluorescentes). Descongelarlas rápidamente en un baño (37°C, 1 min). Preparar tubos cónicos de 15 ml con medio de cultivo para posteriormente añadir las células recién descongeladas.

Centrifugar (1200 r.p.m., 5 min, 20°C) y retirar el sobrenadante. Resuspender las células en medio de cultivo (así conseguimos diluir el DMSO, crioprotector, en el que estaban congeladas las células). Plaques en un frasco de cultivo e incubar (5% CO₂, 37°C).

Extracción del DNA

Preparación de las muestras

Centrifugar las células cultivadas (1200 r.p.m., 3 seg) y añadir **DNAzol Reagent** (800 μl) de Invitrogen (nº de catálogo 10503-027). Lisar las células pipeteando varias veces.



DNAzol Reagent

Aislamiento del DNA

⇒ Precipitación del DNA:

- 1) Utilizar 500 μl de **etanol 100%** por cada ml empleado de DNAzol Reagent. En nuestro caso son 400 μl .
- 2) Agitar manualmente el tubo eppendorf para que se mezcle bien el etanol con las células lisadas. Incubar 3 min a T^a ambiente. El DNA quedará precipitado.
- 3) Con mucho cuidado, trasladar la hebra de DNA a otro eppendorf nuevo y depositarlo en la pared del mismo, de manera que el etanol que quede impregnado en el DNA, vaya cayendo al fondo.

⇒ Lavar DNA:

- 1) Añadir **etanol 75%** (1 ml). El DNA tiene que quedar inmerso. Agitar manualmente para que se lave el pellet y dejar reposar durante 60 seg. Retirar el sobrenadante y volver a repetir el lavado una vez.
- 2) Dejar secar el DNA manteniendo el eppendorf abierto durante 30 seg tras haber retirado el etanol.

⇒ Resuspensión del DNA:

Resuspender en una disolución de **NaOH 8 mM**. Primero probar a resuspender el DNA en 200 μl y sino, hacerlo en 300 μl .

⇒ Ajuste de pH:

Se hace añadiendo el tampón **HEPES 1M pH=7,3**. En nuestro caso, queremos llegar a un pH final de 7,2 así que por cada ml de 8 mM NaOH empleado para resuspender el DNA, habrá que utilizar 23 μl de HEPES.

Cuantificar con Nanodrop 2000 el DNA extraído.

Digestión del DNA: Corte con enzimas de restricción

Una vez extraído el DNA de las células **HCT-116**, **RCL** y **Fluorescentes**, se procederá a realizar la digestión de las mismas. En eppendorfs de 1,5 ml de capacidad añadir:

- Agua RNasa free para enrasar hasta el volumen deseado. En nuestro caso, será un volumen final de **600 μl** .
- Buffer para que haya un ambiente idóneo en la digestión y para que las enzimas a utilizar sean activas y puedan actuar. Gracias a un programa de ordenador, sabemos que el *buffer* adecuado en nuestra reacción es el **Buffer 0**, del que utilizaremos **60 μl** .
- DNA a digerir, dependiendo de para qué queramos la reacción se tomará una cantidad u otra. Nosotros utilizaremos **40 μg de DNA**.
- Enzima para que suceda la reacción, se suele usar 1 unidad/ μg de DNA y no debe sobrepasar el 10% del V_{final} de reacción. Trabajamos con dos enzimas: **EcoRI** y **BglII**. Como queremos obtener un $V_{\text{final}}= 600 \mu\text{l}$, y no se puede sobrepasar el 10% del mismo en enzimas, utilizaremos **30 μl** de cada enzima.

Mezclar el contenido del eppendorf pipeteando suavemente y con cuidado para no dañar el DNA. Incubar O/N a 37°C la reacción en un baño seco (*Thermomixer confort*).

Cuantificar con Nanodrop 2000 el DNA obtenido.

Precipitación del DNA

Se precipitará, ya que el volumen obtenido en la digestión, es demasiado grande para introducirle en el gel del Southern Blot. El tratamiento a seguir es el mismo para el DNA digerido de las HCT-116, RCL y Fluorescentes.



Thermomixer confort

Utilizaremos **Etanol 100%** (1 ml) para precipitar el DNA y **NaCl 5M** (20 μ l) para mejorar la precipitación. Resuspender la mezcla e incubarla en un baño de hielo 30 min. Después se centrifuga (1200 r.p.m., 15 min, 4°C) y se retira el sobrenadante.

Lavar con **Etanol 70%** (750 μ l) y seguidamente, centrifugar (1200 r.p.m., 15 min, 4°C) y retirar el sobrenadante. Dejar abiertos los eppendorf para que se termine de evaporar el sobrenadante (30 seg) y resuspender el DNA en **TE 1x Buffer** (50 μ l).

Cuantificar con Nanodrop 2000 el DNA precipitado.

❖ ELECTROFORESIS DEL DNA

Se sigue el mismo proceso de electroforesis que el del apartado “*Obtención de la sonda*” (pág 14).

Cargar las muestras: **marcador** de pares de bases *Gene Ruler* de ThermoFisher Scientific (5 μ g del marcador que corresponden a 10 μ l + 2 μ l de *loading buffer*); **HCT-116**, **RCL** y **Fluorescentes** (50 μ l del correspondiente DNA + 10 μ l del *loading buffer*).

El gel se pondrá a correr (**30 V, 6 h**). Observar el gel por UV y ver las digestiones.

Nota: otra opción que probamos fue la de teñir el gel con el colorante tras la electroforesis, antes de la transferencia.

❖ TRANSFERENCIA

Primero probamos a realizar la transferencia en condiciones alcalinas:

Preparación del gel y la membrana de nylon

- 1) Lo primero es teñir el gel obtenido en la electroforesis con **bromuro de etidio** (15 μ l en 150 ml de TAE 1x, aprox. 20-30 min) si no se añadió el mismo en el gel. Mantenerlo en agitación. Comprobamos que el gel se ha teñido mediante exposición a luz UV. Hacer una señal para saber en qué lado del gel está el DNA.
- 2) Realizar dos lavados del gel de Southern Blot (15-20 min, T^a ambiente, agitación) con el **Buffer de transferencia alcalino**, formado por: 0,4 M NaOH + 1 M NaCl,
- 3) Cortar una **membrana de nylon** con las mismas dimensiones del gel y hacer la misma señal. Humedecerla con H₂O miliQ y luego lavarla con el **Buffer de transferencia alcalino** (mínimo 5 min, agitación).

Preparación de la transferencia

- 1) En una bandeja, colocar un soporte de dimensiones mayores del gel y la membrana. Encima, poner dos tiras de papel de filtro Whatman que lleguen a la base de la bandeja y mojar con el **Buffer de transferencia alcalino**.
- 2) Quitar las burbujas que puedan haber quedado en la superficie del soporte haciendo rodar una pipeta. Preparar una ventana con parafilm y volver a quitar las burbujas. Sobre la ventana, colocar el gel con el DNA hacia abajo alineándolo. Mojarlo con el **Buffer** anterior y quitar de nuevo las burbujas. Hacer lo mismo con la membrana de nylon.
- 3) Colocar dos papeles de filtro Whatman humedecidos en el **Buffer**, eliminar las burbujas, y por último, colocar una torre de papeles de filtro Whatman secos (8 cm de altura). Sobre éstos, poner algo que haga peso.
- 4) Llenar la bandeja con el **Buffer de transferencia alcalino**. Comenzará la transferencia, que durará aproximadamente 12 h.

Fijación del DNA a la membrana

Lavar la membrana de nylon con **TrisHCl 0,5 M pH 7,2 + NaCl 1M** (15 min, T^a ambiente, agitación). Fijar la membrana haciendo *crosslink* (utilizando la opción de *Auto Cross Link*, 1200 µJ x100) con el *UV Stratalinker 1800* dos veces consecutivas.

Probamos a realizar la transferencia pero bajo condiciones neutras ya que bajo las condiciones alcalinas, tras el revelado, la película tenía mucho fondo:

Preparación del gel y la membrana de nylon

- 1) Teñir el gel obtenido en la electroforesis con **bromuro de etidio** (15 µl en 150 ml de TAE 1x, aprox. 20-30 min) si no se añadió el mismo en el gel. Mantenerlo en agitación. Comprobamos que el gel se ha teñido mediante exposición a luz UV. Señalizar en qué lado del gel está el DNA.
- 2) Desnaturalizar el gel con el **Buffer de desnaturalización**: 1,5 M NaCl + 0,5 N NaOH (45 min, agitación).
- 3) Enjuagar el gel con miliQ y neutralizar con el **Buffer de neutralización**: 1 M Tris pH 7,4 + 1,5 M NaCl (30 min, agitación). Repetir el lavado (15 min, agitación).
- 4) Preparar la membrana de nylon: humedecer en agua miliQ y lavarla en **Buffer 10X SSC** (al menos 5 min, agitación).

Preparación de la transferencia

Transferir el DNA del gel a la membrana por capilaridad.

- 1) En una bandeja, colocar un soporte y encima, poner dos tiras de papel de filtro Whatman que lleguen a la base de la bandeja y mojar con el **Buffer 10X SSC**.
- 2) Quitar las burbujas que puedan haber quedado en la superficie del soporte haciendo rodar una pipeta. Hacer una ventana con parafilm y volver a quitar las burbujas. Sobre la ventana, alinear el gel con el DNA hacia abajo. Mojarlo con el **Buffer 10X SSC** y quitar de nuevo las burbujas. Hacer lo mismo con la membrana de nylon.
- 5) Colocar dos papeles de filtro Whatman humedecidos en el **Buffer 2X SSC**, eliminar las burbujas, y por último, colocar una torre de papeles de filtro Whatman secos. Sobre éstos, poner algo que haga de peso.
- 6) Llenar la bandeja con el **Buffer 10X SSC**. Comenzará la transferencia, que durará aproximadamente 12 h.

Fijación del DNA a la membrana

Lavar la membrana de nylon con **Buffer 6X SSC** (30 min, T^a ambiente, agitación). Fijar la membrana haciendo *crosslink* (utilizando la opción *Auto Cross Link*, 1200 µJ x100) con el *UV Stratalinker 1800* dos veces consecutivas.



UV Stratalinker 1800

❖ HIBRIDACIÓN Y DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Empleamos el kit **North2South[®] Chemiluminescent Hybridization and Detection** (nº de catálogo 17097) de Thermo Scientific.

Prehibridación e hibridación

- 1) Calentar el *Hybridization Buffer* (55°C).
- 2) Colocar la membrana con el DNA hacia arriba en un tubo cónico de 50 ml con 20 ml de **Hybridization Buffer** (55°C). El *buffer* debe cubrir completamente la

- membrana. Meter el tubo cónico de 50 ml en las botellas de hibridación. Así se produce la prehibridación en el horno *Biometra OV2* (55°C, rotación, 30 min).
- 3) Mientras, desnaturalizar la sonda calentándola (10 min, 100°C) en un baño seco (*Thermomixer confort*), dar un pulso y enfriarla en hielo (5 min, 4°C).
 - 4) Añadir aproximadamente 30 ng de sonda por ml de *Hybridization Buffer* (en nuestro caso se corresponde con 600 ng de sonda). Para evitar que la sonda quede fijada en una zona concreta de la membrana, lo que hacemos será retirar a un tubo nuevo parte del *Hybridization Buffer* que está en el tubo con la membrana, y añadir ahí la sonda o pasar parte del *buffer* al eppendorf donde está la sonda y de ahí, añadirla al tubo cónico tipo Falcon que contiene la membrana.
 - 5) Incubar O/N con rotación (55 °C) en el horno *Biometra OV2*.

Lavados Stringency

- 1) Atemperar y luego calentar ***Hybridization Stringency Wash Buffer 2x*** (55°C). Diluirlo a 1x.
- 2) Lavar la membrana 3 veces con esta dilución (20 min, 55°C, agitación).

Detección de la sonda

- 1) Retirar el *buffer* anterior y añadir suficiente cantidad de ***Blocking Buffer*** para que cubra la membrana (15 ml). Realizar lavado (15 min, agitación). Mientras, determinar la cantidad de **estreptavidina-peroxidasa de rábano picante** necesaria para una dilución 1:300 (en nuestro caso son 50 µl). Al igual que antes, para evitar que la estreptavidina-HRP se fije en una zona concreta de la membrana, retirar un poco del *buffer* en un tubo cónico tipo Falcon y añadir la estreptavidina-HRP. Mezclar y añadir a la membrana (15 min, agitación).
- 2) Diluir ***Wash Buffer 4x*** a 1x. Lavar la membrana 4 veces (5 min, agitación). Pasar la membrana a otro contenedor tras realizar el último lavado con *Wash Buffer*.
- 3) Lavar la membrana con ***Substrate Equilibration Buffer*** (5 min, agitación). Añadir cantidad suficiente para que cubra la membrana.

Desarrollo del sustrato

- 1) Preparar ***Substrate Working Solution*** mezclando volúmenes iguales de **Luminol/Enhancer** y **Stable Peroxide Solution** (20 ml de cada reactivo). Mientras ocurre la reacción, se tapa (5 min, agitación).
- 2) Escurrir el sustrato de la superficie de la membrana (pero que permanezca húmeda) y colocarla en un *cassette* de autorradiografía. Quitar las burbujas que puedan haber quedado entre la membrana y el plástico, pasando por encima una pipeta.
- 3) Ya en la sala de revelado, exponer la membrana a una película de revelado. Probar con distintos tiempos de exposición.



Kit de hibridación y detección

4.3) MATERIALES Y MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN

DE LA SENSIBILIDAD DEL SOUTHERN BLOT

Para ver si el plásmido da señal en el Southern Blot y si la sonda es específica para el plásmido, realizaremos la prueba, la cual permite ver la sensibilidad de la técnica mediante el uso de plásmidos.

❖ OBTENCIÓN DE LA SONDA

Para obtener la sonda seguimos el protocolo correspondiente al apartado de “Materiales y métodos del Southern Blot” (pág 14-16). En la PCR, cambiamos las cantidades de algunos reactivos. Mantuvimos las cantidades de *Buffer* 0 HF 5x y dNTPS y cambiamos las de: primers (**2,5 µl**), Phusion Hot Start II (**0,5 µl**), DNA (**2 µl**) y agua *RNasa free* (**32 µl**). El volumen final siguió siendo de **50 µl**.

En cuanto al marcaje de la sonda, tras su purificación, empleamos el kit **Biotin DecaLabel DNA Labeling** de **Thermo Scientific** (nº de catálogo K0651) de Thermo Scientific.

❖ PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Digestión del DNA: Corte con enzimas de restricción

En un eppendorf, realizar la digestión del plásmido **pEGFP-N3**. Utilizar:

- Agua RNasa free para enrasar hasta el volumen deseado. Será un V_{final} de **75 µl**.
- Buffer: **Buffer 0 10x (7,5 µl)**.
- DNA a digerir. Nosotros utilizaremos **4 µg de DNA**.
- Enzima: trabajamos con **EcoRI** y **NotI**. Utilizaremos **3 µl** de cada enzima.

Mezclar el contenido del eppendorf. Incubar a 37°C durante 3 h en un baño seco (*Thermomixer confort*).

Preparación de las diluciones del plásmido

Tras realizar la digestión, preparar las diluciones seriadas adecuadas para conseguir diferentes cantidades de plásmido que se usarán posteriormente para realizar la transferencia y comprobar la sensibilidad de la técnica Southern Blot.

❖ ELECTROFORESIS DEL DNA PLASMÍDICO, TRANSFERENCIA

E HIBRIDACIÓN Y DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

El proceso a seguir es el mismo que el del apartado “Materiales y métodos del Southern Blot” (pág 18-20).

Respecto a la electroforesis, se cargan las muestras: **marcador** de pares de bases *Gene Ruler* de ThermoFisher Scientific (20 µl) y **diluciones** del plásmido (30 µl de la correspondiente dilución + 5 µl de *loading buffer*). El gel se pondrá a correr (**30 V, 20 min**). Tendría que observarse una banda a **769 pb** para asegurarnos que la digestión ocurrió correctamente.

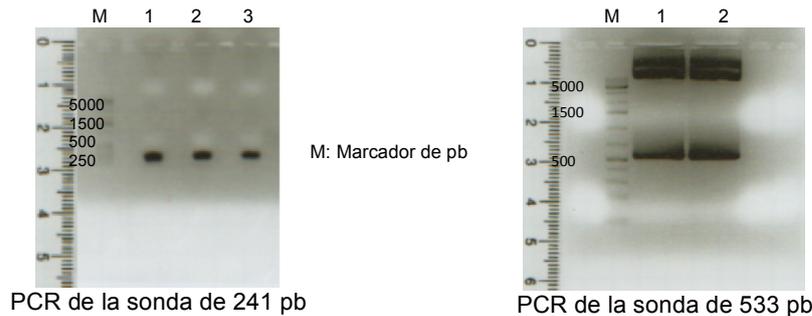
Para la transferencia, se sigue el procedimiento de la transferencia bajo condiciones neutras del apartado “Materiales y métodos del Southern Blot” (pág 19).

En cuanto a la hibridación y detección de ácidos nucleicos, se sigue usando el kit **North2South® Chemiluminescent Hybridization and Detection** (nº de catálogo 17097) de Thermo Scientific. Es el mismo que empleamos en la hibridación y detección de ácidos nucleicos en el apartado “Materiales y métodos del Southern Blot” (pág 19-20).

5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1) GENERACIÓN DE LAS SONDAS

Lo primero que hicimos fue generar las sondas. Analizando la secuencia del gen EGFP mediante el programa de ordenador **SeqBuilder**, encontramos que había dos posibles secuencias adecuadas para generar una sonda que hibridara correctamente a la EGFP de las células RCL y Fluorescentes. Las sondas tenían un tamaño de 241 pb y de 533 pb. Mediante la técnica PCR obtuvimos ambas sondas:



En ambos casos, conseguimos generar sonda, tal y como se puede apreciar en las imágenes anteriores. Se observa que tras la electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos en la PCR, aparece producto amplificado a 241 pb y a 533 pb, respectivamente. Posteriormente, se purificaron y cuantificaron las sondas.

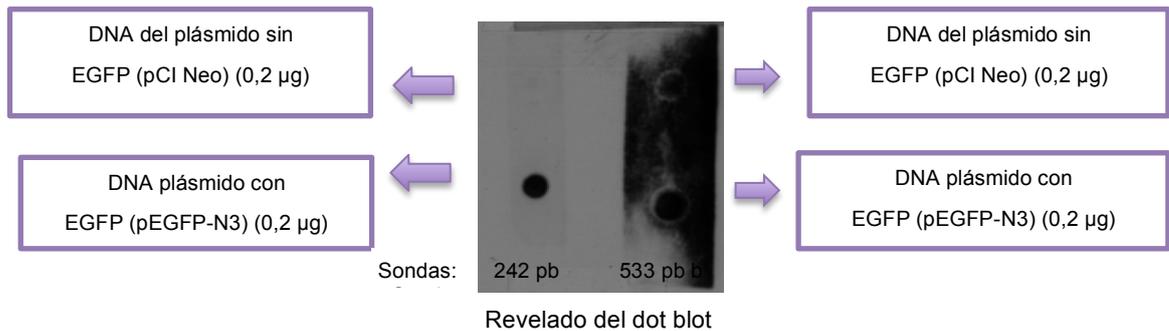
5.2) PRUEBA DE ESPECIFICIDAD MEDIANTE DOT BLOT

Realizamos el Dot Blot puesto que es un ensayo cualitativo que permite detectar biomoléculas. En nuestro caso, la biomolécula de interés es el DNA. Es una prueba que supone una simplificación enorme del método Southern Blot, el cual constituye la técnica que desarrollamos a lo largo del presente Trabajo de Fin de Máster.

La llevamos a cabo por ser una técnica del campo de la biología molecular, que resulta ser económica, de fácil ejecución, sensible y específica, no requiere el empleo de un equipo sofisticado para su realización y también, supone un importante ahorro de tiempo. Permite averiguar si la sonda generada y que, posteriormente emplearemos en el Southern Blot, es específica o no, es decir, si la sonda reconoce exclusivamente la secuencia de la proteína para la que se generó (en nuestro caso EGFP) y al reconocerla, da señal quimioluminiscente y no reconoce un DNA sin EGFP.

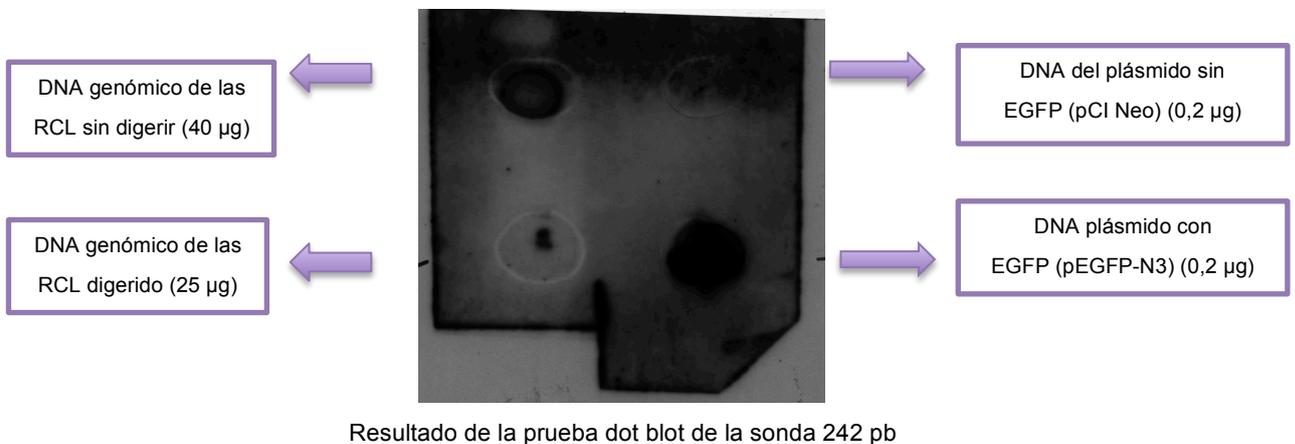
También posibilita comprobar si el plásmido que elegimos para realizar el Southern Blot, sólo da señal de quimioluminiscencia debida, precisamente, a la secuencia EGFP que debe reconocer la sonda.

Decidimos realizar la prueba empleando dos plásmidos: **pCI Neo** (sin EGFP) en la parte superior del dot blot y **pEGFP-N3** (con EGFP), en la parte inferior. Tras realizar la prueba de Dot blot varias veces con ambas sondas, tras el revelado de la película obtuvimos el siguiente resultado:



Se observó que la sonda de 242 pb presentaba menos fondo tras el revelado y que era más específica que la sonda de 533 pb, puesto que ésta última, daba señal con DNA del plásmido pCI Neo, el cuál no tiene secuencia EGFP y por lo tanto, la sonda no se puede hibridar ni dar señal.

Decidimos hacer el Dot Blot empleando la línea celular de interés, que es la RCL (*Reporter Cell Line*), utilizando sólo la sonda específica (**242 pb**).



Otro miembro del laboratorio realizó el mismo Dot Blot con la sonda, obteniéndose resultados similares.

Tras el revelado de la membrana, tal y como se observa en la imagen anterior, la zona de la izquierda, en la que depositamos gotas del DNA de las células de la línea reportera de interés (RCL) sin digerir (parte superior izquierda) y digeridas (parte inferior izquierda), ambas dan señal de quimioluminiscencia. Se observa que la cantidad de señal del DNA genómico digerido es menor que la de sin digerir, ya que al digerir el DNA genómico y su posterior recuperación mediante precipitación, se pierde mucha cantidad de DNA y la quimioluminiscencia depende, justamente, de la cantidad de DNA que se deposite en la membrana.

El resultado obtenido es el esperado, ya que estas células poseen la secuencia EGFP y al realizar el Dot Blot, la sonda reconoce esta secuencia, se une a ella, y emite quimioluminiscencia. Aparece en la película señal.

En cuanto a la parte derecha de la membrana, la zona en la que depositamos el DNA del plásmido sin secuencia EGFP, pCI Neo (parte superior derecha), no da señal tal y como debe ser. No hay señal puesto que al no poseer el plásmido pCI Neo la secuencia EGFP, la sonda no se hibridará y como consecuencia, no hay quimioluminiscencia.

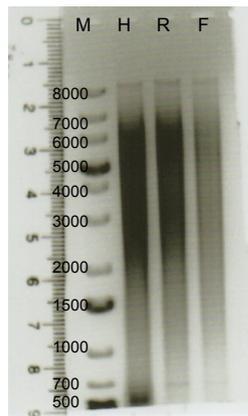
Respecto a la parte inferior derecha, donde se encuentra localizado el DNA del plásmido pEGFP-N3 con la secuencia EGFP, aparece señal en la película, lo que quiere decir que la sonda es específica para la secuencia EGFP, ya que se hibridó correctamente, tal y como podemos observar por el hecho de emitirse señal.

5.3) SOUTHERN BLOT DE LA LÍNEA REPORTERA

Vistos los resultados satisfactorios obtenidos con la prueba del Dot Blot, decidimos llevar a cabo la técnica Southern Blot.

Tras extraer el DNA de las líneas celulares de las que vamos a realizar el estudio (HCT-116, RCL y Fluorescentes), se realizó la digestión de las mismas con las enzimas **EcoRI** y **BglIII**, que cortaban la secuencia EGFP de las células. Posteriormente, se precipitó el DNA digerido para eliminar las enzimas y reducir el volumen de la muestra.

Después de la electroforesis en gel de agarosa del DNA digerido y precipitado, se obtuvo:

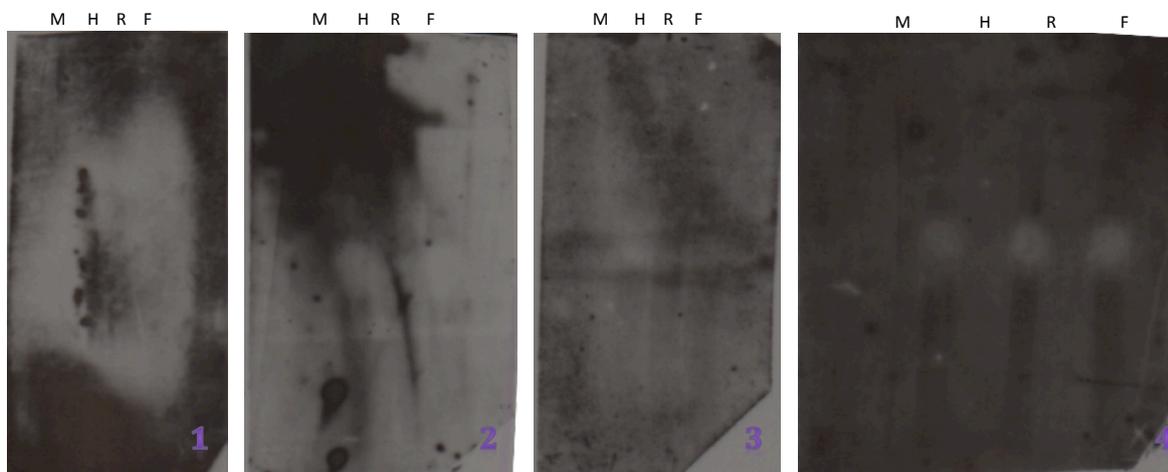


M: Carril marcador de pares de bases
H: HCT-116
R: RCL
F: Fluorescentes

} Líneas celulares

Electroforesis en gel de agarosa del DNA digerido

Los resultados a los que llegamos tras revelar la membrana fueron:



M: Carril marcador de pares de bases
H: HCT-116
R: RCL
F: Fluorescentes

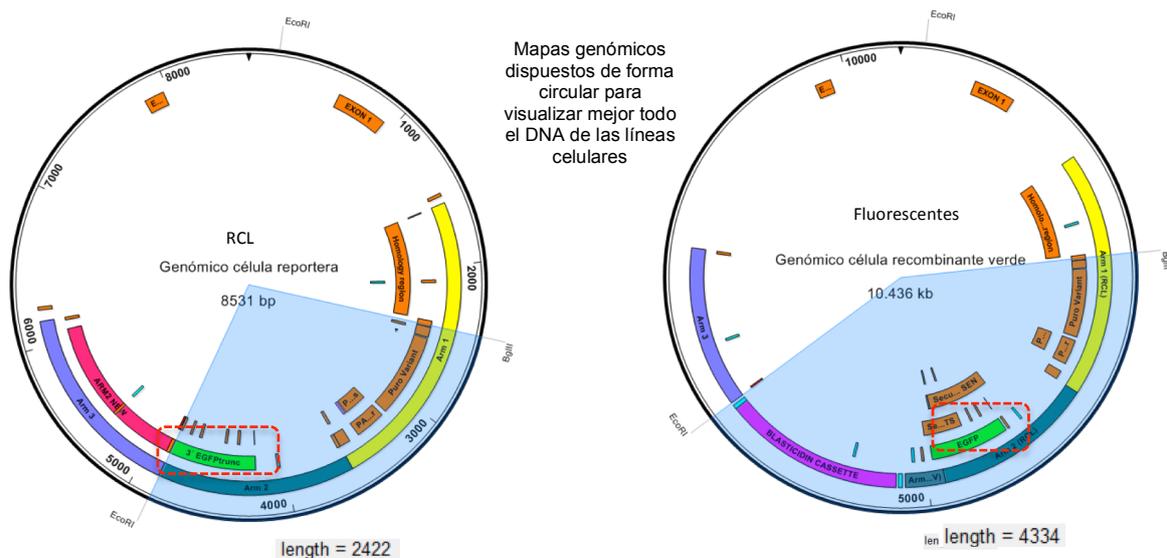
Algunos de los ensayos realizados de la técnica Southern Blot. Membranas reveladas a distintos tiempos de exposición

No se observaba ninguna banda específica. Las membranas aparecían muy sucias, con demasiado fondo. En algunos de estos casos aparecían manchas inespecíficas, de las cuales desconocemos su procedencia.

En la primera imagen, podemos contemplar cómo aparecen distintas manchas negras en el centro de la membrana. En la segunda, hay demasiado fondo en la parte superior izquierda de la membrana e incluso un par de manchas negras en la parte inferior. En ninguno de estos casos, sabemos cuál es la razón de que aparezcan esas manchas. En la tercera y cuarta imagen, se aprecia que hay también bastante fondo pero se visualizan los carriles de las diferentes líneas celulares (HCT-116, RCL y

Fluorescentes, respectivamente). Se percibe en los tres carriles una pequeña mancha blanca a mitad de la membrana, solamente en la zona del DNA (en el resto de la membrana donde no hay DNA, no) precisamente en la región de interés, puesto que es donde deberían aparecer las bandas correspondientes a la hibridación de la sonda con la secuencia EGFP de las células.

No hay ningún indicio de que durante los diferentes ensayos realizados del Southern Blot, la sonda se hubiera hibridado a la secuencia de la proteína EGFP de las células RCL y Fluorescentes, puesto que no aparecían bandas a 2422 pb y a 4334 pb, respectivamente, tal y como se esperaba en el revelado, ni a ninguna otra secuencia del genoma, puesto que no se observaba ninguna banda inespecífica. En el caso de las células HCT-116, la sonda no se hibrida debido a que esta línea celular no posee secuencia EGFP en su genoma.



Mapa del DNA genómico de las células RCL y Fluorescentes respectivamente. Aparecen señalados los cortes que realizan las enzimas de restricción empleadas en la digestión del DNA genómico. En la imagen, aparece resaltado de color azul el tamaño de la banda que aparecería en el revelado de la membrana si la sonda se hibridara correctamente a la secuencia EGFP. Tal y como observamos, el tamaño de la banda para las células RCL es de 2422 pb y para las células Fluorescentes es de 4334 pb.

Tras varios intentos fallidos de la prueba, viendo que no obteníamos resultados al realizar la técnica “al pie de la letra”, tal y como venía indicado en los distintos protocolos de realización de Southern Blot, decidimos hacer algunas modificaciones sobre las condiciones experimentales.

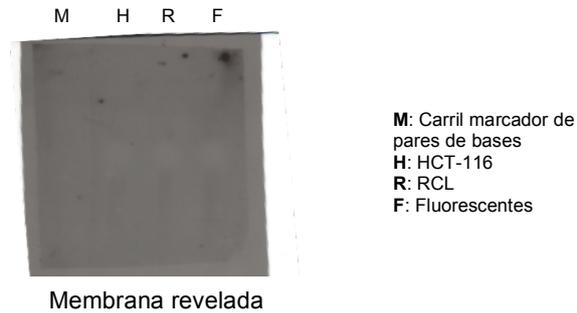
Lo que hicimos fue cambiar las condiciones en las que realizábamos la transferencia del DNA desde el gel a la membrana. Pasamos de utilizar condiciones alcalinas (NaOH + NaCl como *buffer* de transferencia) a neutras (10x SSC *Buffer*), puesto que en las membranas de nylon cargadas positivamente, que son las que empleamos, la transferencia ocurre mejor bajo condiciones neutras. Entonces, decidimos alargar algún tiempo de lavado de la membrana (probamos a alargar brevemente los tiempos de lavado con el *buffer Stringency Washes*) y a modificar el tiempo de incubación con *Blocking Buffer* justo tras la transferencia, en la etapa de hibridación y detección de ácidos nucleicos. Observamos que las membranas, al revelarlas, ya no poseían tanto fondo, pero seguían sin aparecer bandas.

Probamos a realizar modificaciones con la sonda. Cambiamos el kit de purificación (probamos con tres kits de diferentes casas comerciales) y el kit de marcación de la sonda con biotina (empleamos dos kits, obteniendo mejores resultados de marcación con el segundo empleado, **Biotin DecaLabel DNA Labeling**, perteneciente a Thermo Scientific nº de catálogo K0651). Sin embargo, aunque en la



Membrana revelada

membrana no aparecía tanto fondo, no se obtuvieron los resultados buscados; seguían sin visualizarse las bandas.

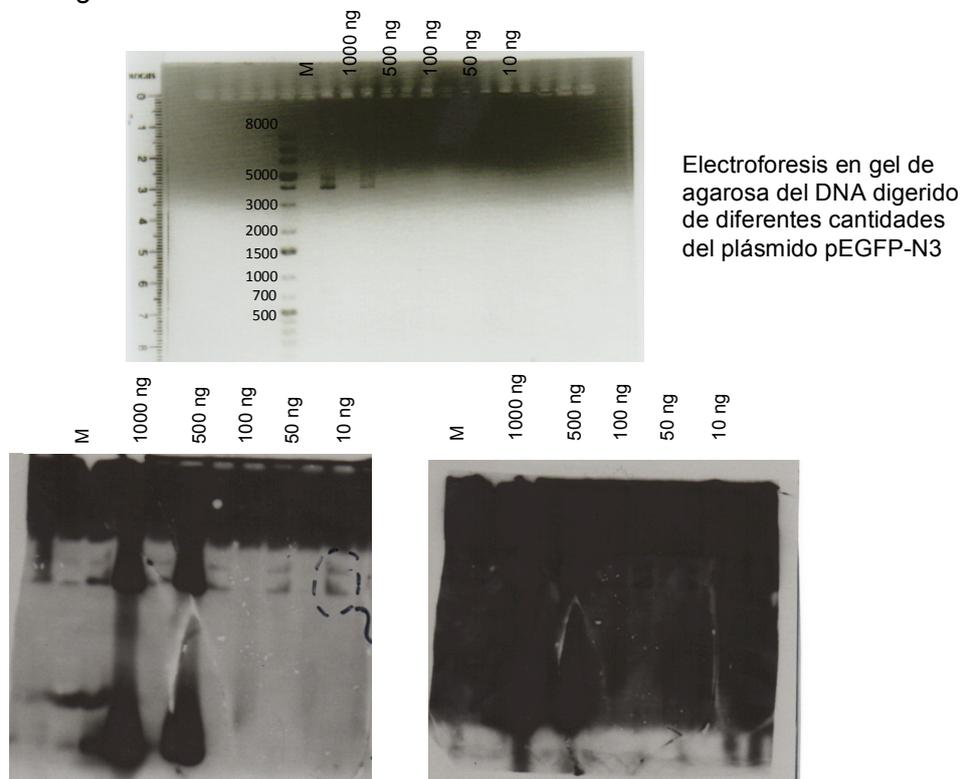


En este momento, nos planteamos que teníamos un problema de sensibilidad y decidimos evaluarla mediante pruebas de Southern Blot con diferentes cantidades de plásmido.

5.4) DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL SOUTHERN BLOT

Se realizó la prueba para ver si al plásmido pEGFP-N3, DNA del cual se había partido para generar las sondas, se hibridaba correctamente la sonda al realizar la técnica de Southern Blot y daba señal quimioluminiscente tras el revelado. Así podríamos ver también la sensibilidad de la técnica.

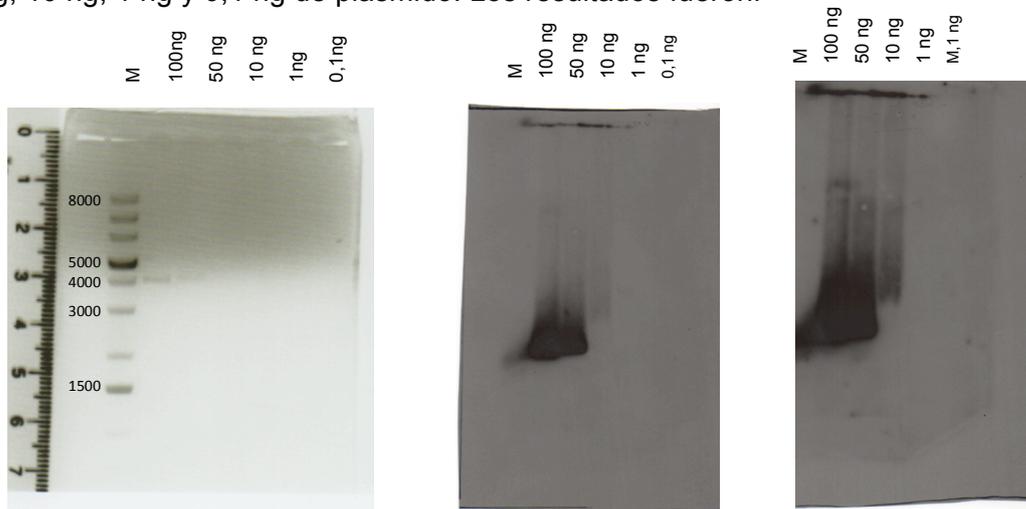
Realizamos la prueba con distintas cantidades de plásmido siguiendo el protocolo del Southern Blot. La primera vez empleamos 1000 ng, 500 ng, 100 ng, 50 ng y 10 ng. Se obtuvieron los siguientes resultados:



Revelado de diferentes cantidades del plásmido pEGFP-N3 a varios tiempos de exposición (1 seg y 5 seg)

Tuvimos un percance durante la transferencia y la zona correspondiente al carril de 100 ng resultó dañada, ya que se rompió el gel.

Se ve que la técnica Southern Blot es sensible a la hora de detectar el DNA plasmídico. Decidimos entonces volver a realizar la prueba, empleando distintas cantidades decrecientes de plásmido. En el ensayo anterior, en el que sólo utilizábamos plásmido, para el rango comprendido entre 10-100 ng no se observa señal ni en la electroforesis ni tras el revelado de la membrana. Decidimos emplear cantidades de plásmido comprendidas dentro de este intervalo. Utilizamos 100 ng, 50 ng, 10 ng, 1 ng y 0,1 ng de plásmido. Los resultados fueron:



Digestión y revelado de diferentes cantidades del plásmido pEGFP-N3 a varios tiempos de exposición (5 seg y 15 seg)

Esta vez, sí que aparece señal para la cantidad de 10 ng de plásmido, pero para cantidades inferiores no. Esto significa que la técnica Southern Blot presenta una sensibilidad de 10 ng.

De esta forma conseguimos ver que la técnica Southern Blot, empleada para ver el número de copias de EGFP incorporadas en las líneas celulares, es suficientemente sensible para detectar DNA plasmídico pero no lo es para detectar el DNA genómico de las HCT-116, RCL y Fluorescentes. Esta técnica es sensible para el DNA plasmídico porque en él se incorporan muchísimas copias del gen de interés EGFP, entonces, en el genoma del plásmido, habrá mucha cantidad del gen EGFP y podrá detectarse mediante Southern Blot. En cambio, no es capaz de detectar el genómico puesto que, a pesar de haber empelado 40 µg del mismo (mucha más cantidad que de plásmido), la cantidad del gen de interés EGFP se encuentra en muchísima menor proporción en comparación con la cantidad que hay en el DNA plasmídico. Sólo se incorpora una copia, o en su defecto, unas pocas, pero nunca alcanza el gran número de copias que se incorporan en el plásmido.

La técnica de Southern blot que hemos utilizado en este trabajo, con las sondas específicas ensayadas, permite detectar el gen EGFP a partir de por lo menos 10 ng del vector pEGFP-N3. Esto significa que la cantidad mínima de copias de EGFP que puede detectar es de 2×10^9 . Para tener ese número de copias del gen EGFP en el DNA genómico que se carga en el gel, necesitaríamos digerir y correr una cantidad mínima de DNA genómico de 6,5 mg. Nuestra conclusión es que la técnica de Southern blot no es lo suficientemente sensible para detectar el gen EGFP en el DNA genómico de nuestras líneas celulares RCL y Fluorescentes. De forma aproximada, con alguna variación que depende del kit empleado, se considera que los métodos no radiactivos de detección usados en Southern blot son capaces, en teoría, de detectar una copia de un gen de tamaño medio (1 Kb) en 5 µg de DNA genómico. Pensamos que el fracaso de detección en nuestro caso pueda deberse a: que las sondas utilizadas no funcionan adecuadamente y hubiéramos necesitado más tiempo de optimización de la secuencia a utilizar, la longitud de la sonda y la cantidad de sonda por cm^2 .

6) CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

En este trabajo, el principal objetivo era caracterizar una línea celular reportera que posteriormente se iba a utilizar en ensayos de RH. Podemos concluir que no hemos conseguido alcanzar el 100% del objetivo principal planteado al inicio del trabajo. Contemplamos que a lo mejor la sonda creada no era la adecuada. Sin embargo, los resultados obtenidos son muy prometedores, nos animan a continuar investigando sobre el tema. El trabajo realizado no es más que el comienzo de lo que parece ser una vía prometedora para conseguir caracterizar una herramienta capaz de monitorizar la RH. Concretamente, las **conclusiones** que se derivan de nuestro trabajo son:

- ❖ Obtuvimos dos sondas (de 533 pb y de 242 pb), que en principio eran específicas para la secuencia del gen EGFP, mediante la técnica PCR y las marcamos con biotina-11-dUTP.
- ❖ Conseguimos cultivar y mantener las líneas celulares adherentes objeto de estudio (HCT-116, RCL y Fluorescentes o RCL post recombinación homóloga).
- ❖ Logramos extraer, digerir y precipitar sin ningún problema los DNA de las líneas celulares mencionadas anteriormente.
- ❖ Conseguimos la hibridación de las dos sondas (533 pb y 242 pb) a los DNA fijados en una membrana de nylon mediante Dot Blot.

Sin embargo...

- ❖ No conseguimos la hibridación de la sonda, ni la de 533 pb ni la de 242 pb, a los DNA genómicos fijados en una membrana de nylon mediante la técnica Southern Blot.
- ❖ Por lo tanto, no pudimos poner a punto la detección del gen de EGFP mediante la técnica de Southern Blot, pero sí logramos realizar mejoras de las condiciones experimentales (como por ejemplo menos fondo en la película de revelado).

En cuanto a las **perspectivas de futuro**, visto que no logramos poner a punto la técnica, nos planteamos probar a caracterizar las RCL mediante la técnica **FISH** o hibridación fluorescente *in situ*. Esta propuesta se está llevando a cabo en la actualidad, pero no nos dará tiempo a mostrar los resultados obtenidos.

La primera técnica de FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) fue desarrollada por Padue, Gall y John en 1969 pero fue propuesto por Olsen. Es una técnica citogenética de marcaje de los cromosomas mediante la cual, éstos son hibridados con sondas que emiten fluorescencia y permiten la visualización, distinción y estudio de los genes, porciones de los mismos y cromosomas. Es especialmente útil para mapear genes o localizar anomalías cromosómicas. Permite localizar un fragmento de la secuencia de DNA y pone de manifiesto la presencia o ausencia de secuencias génicas específicas.

La técnica FISH puede realizarse a los cromosomas en metafase (visibles los cromosomas) o en interfase (cromatina no condensada). FISH usa segmentos de una única hebra de DNA que son marcados con una sustancia fluorescente que se liga a un cromosoma específico, en nuestro caso, al cromosoma 19; estos segmentos de DNA son las sondas, fragmentos de DNA complementario a la sección que queremos evaluar. Existen muchos tipos de sondas FISH, según su utilidad, tipo de detección que hagan o área clínica sobre la que se apliquen. Al principio, se empleaban sondas de carácter radiactivo, pero se reemplazaron por los fluoróforos (no radiactivos) por mayor seguridad, eficacia, facilidad de detección, no acumulación de residuos radiactivos peligrosos, las sondas se pueden almacenar y presentan tiempos de

exposición más cortos. Para localizar las secuencias de interés, la sonda debe hibridar con la secuencia de DNA de la muestra. Por ello, el primer paso de la técnica consiste en la desnaturalización del DNA para separar la doble hélice. Se realiza aumentando la temperatura o variando el pH para romper los puentes de hidrógeno que mantienen unida la doble hélice. Después, se le añade la sonda marcada fluorescentemente, de manera que se hibrida a las regiones específicas para las que han sido diseñadas. Se debe a la complementariedad de las bases. Después, se tiñen los núcleos con un color de contraste inespecífico (generalmente DAPI). Las sondas de DNA pueden marcarse con moléculas fluorescentes (fluoróforos como biotina, método directo) o no fluorescentes que se detectan con anticuerpos fluorescentes (método indirecto). La sonda se hibrida al DNA complementario y, como están marcadas, permiten localizar las secuencias en las que se encuentran. Por último, se visualiza la muestra preparada bajo un microscopio de fluorescencia. La exactitud y confiabilidad de los resultados obtenidos por FISH depende de lo específica que sea la sonda. Así, FISH permitirá la detección y localización de secuencias específicas de DNA sobre cromosomas.

Comparando FISH y Southern Blot (ambos métodos de detección molecular para divisar cambios en el número de copias de genes):

- FISH es un cariotipo que sirve para ver las aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales, se lleva a cabo sobre cromosomas en interfase o metafase, no se necesita extraer de las células el DNA. Sólo se necesita un microscopio de fluorescencia con filtros apropiados para ver los resultados. En el Southern Blot es necesario extraer el DNA de las células, independientemente de la fase celular en la que se encuentren, hay que emplear enzimas de restricción adecuadas, llevar a cabo la electroforesis en gel de agarosa, transferencia del DNA a una membrana, hibridación con sonda (preparar la sonda y marcarla). La hibridación puede no ser del todo específica puesto que se puede hibridar RNA, proteínas...
- FISH se puede usar *in situ* y es una técnica rápida. El Southern Blot requiere de un largo procedimiento *in vitro* y es una técnica lenta y tediosa.
- FISH es muy sensible (10^{-2} - 10^{-5}), proporciona alta especificidad y resolución (1 millón de pb), se requiere de poca cantidad de DNA, permite estudiar una región más amplia del genoma y se pueden usar varias sondas simultáneamente (hasta 5 fluorocromos). El Southern Blot, a pesar de su alta especificidad y reproducibilidad y baja sensibilidad, precisa de una cantidad alta de DNA y permite estudiar una pequeña región del genoma.
- FISH no permite estudiar las muestras varias veces, no puede ser automatizada y es difícil la diferenciación morfológica entre células normales y malignas. Analiza deleciones grandes (100s-1000s kb) en los cromosomas. El Southern Blot permite estudiar las muestras varias veces y se emplea en deleciones más pequeñas.
- FISH se utiliza para identificar una región de DNA o RNA en preparaciones de cromosomas morfológicamente conservados, células fijadas o secciones de tejido. Southern Blot sólo identifica DNA, el RNA se identifica con una técnica similar, el Northern Blot.
- Southern Blot es para estudiar una determinada región, detecta genes específicos del DNA y el FISH estudia todos los cromosomas.
- En FISH es necesario conocer lo que buscamos.

7) BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ronchera-Oms C.L.; González J.M. *Terapia génica*. **2002**.
- [2] Lazo, P.A. *Terapia génica humana: tendencias y problemas*. *Medicina Clínica*, Barcelona, **1996**, 106, 469-476.
- [3] Moreno, M. *Modelos y presupuestos en la divulgación de los avances en terapias génicas y clonación*, **1997**. <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/genoterapia.html>
- [4] Vasileva, A.; Jessberger, R., *Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting*. **Noviembre 2005**. *Nature Reviews. Microbiology*. 3, 837-847.
- [5] Vasquez K. M.; Marburger K.; Intody Z.; Wilson J. H; *Manipulating the mammalian genome by homologous recombination*, *Proc Natl Acad Sci, USA*, **2001**, 98, 8403-8410.
- [6] Lenhart, J. L.; Schroeder, J. W.; Walsh, B. W.; Simmons, L. A. *DNA repair and genome maintenance in Bacillus subtilis*, Septiembre **2012**, 76 nº3, 530-564.
- [7] Lindahl, T.; Barnes, D. E.; *Repair of endogenous DNA damage*. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **2000**, 65, 127-133.
- [8] Krajewska, M.; Fehrmann, R. S. N.; de Vries, E. G. E.; van Vugt, M. A. T. M.; *Regulators of homologous recombination repair as novel targets for cancer treatment*. Review Marzo **2015**, 96, 6.
- [9] Jackson, S. P.; Bartek, J.; *The DNA-damage response in human biology and disease*. *Nature*. Octubre **2009**, 461 (7267), 1071-1078.
- [10] Ciccia, A.; Elledge, S. J.; *The DNA damage response: Making it safe top lay with knives*. *Mol Cell*, Octubre **2010**, 40 (2), 179-204.
- [11] Hartlerode, A. J.; Scully, R.; *Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells*. *The Biochem journal*, **2009**, 423, 157-68.
- [12] Takata, M.; Sasaki, M.S.; Sonoda, E. et al.; *Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells*. *The EMBO Journal*. **1998**, 17(18), 5497-5508.
- [13] Menon, V.; Povirk, L.; *Involvement of p53 in the repair of DNA double strand breaks: Multifaceted roles of p53 in homologous recombination repair (HRR) and non-homologous end joining (NHEJ)*. *Sub-cellular biochemistry*. **2014**, 85, 321-336.
- [14] Langerak, P.; Russell, P.; *Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological sciences*, **2011**, 366, 3562-71.
- [15] Heyer, W-D; Ehmsen, K. T.; Liu, J.; *Regulation of homologous recombination in eukaryotes*. *Annual review of genetics*. **2010**, 44, 113-139.
- [16] Kuzminov, A.; *Homologous Recombination—Experimental Systems, Analysis and Significance*. *EcoSal Plus*. **2011**, 4(2)
- [17] Bertolini, L. R.; Bertolini, M.; Maga, E.A.; Madden, K. R.; Murray, J.D.; *Increased gene targeting in Ku70 and Xrcc4 transiently deficient human somatic cells*. *Molecular biotechnology*, **2009**, 41, 106-14.
- [18] Yáñez, E. J.; Porter, A. C.; *Gene targeting is enhanced in human cells overexpressing hRad51*. *Gene therapy*, **1999**, 6, 1282-90.
- [19] Jayathilaka, K.; Sheridan, S. D.; Bold, T. D.; Bochenska, K.; Logan, H. L. et al.; *A chemical compound that stimulates the human homologous recombination RAD51*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2008**, 105, 15848-53.
- [20] Gaj, T.; Gersbach, C. A.; Barbas III, C. F.; *ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering*. *Trends in Biotechnology*, **2013**, 31, 397-405.