

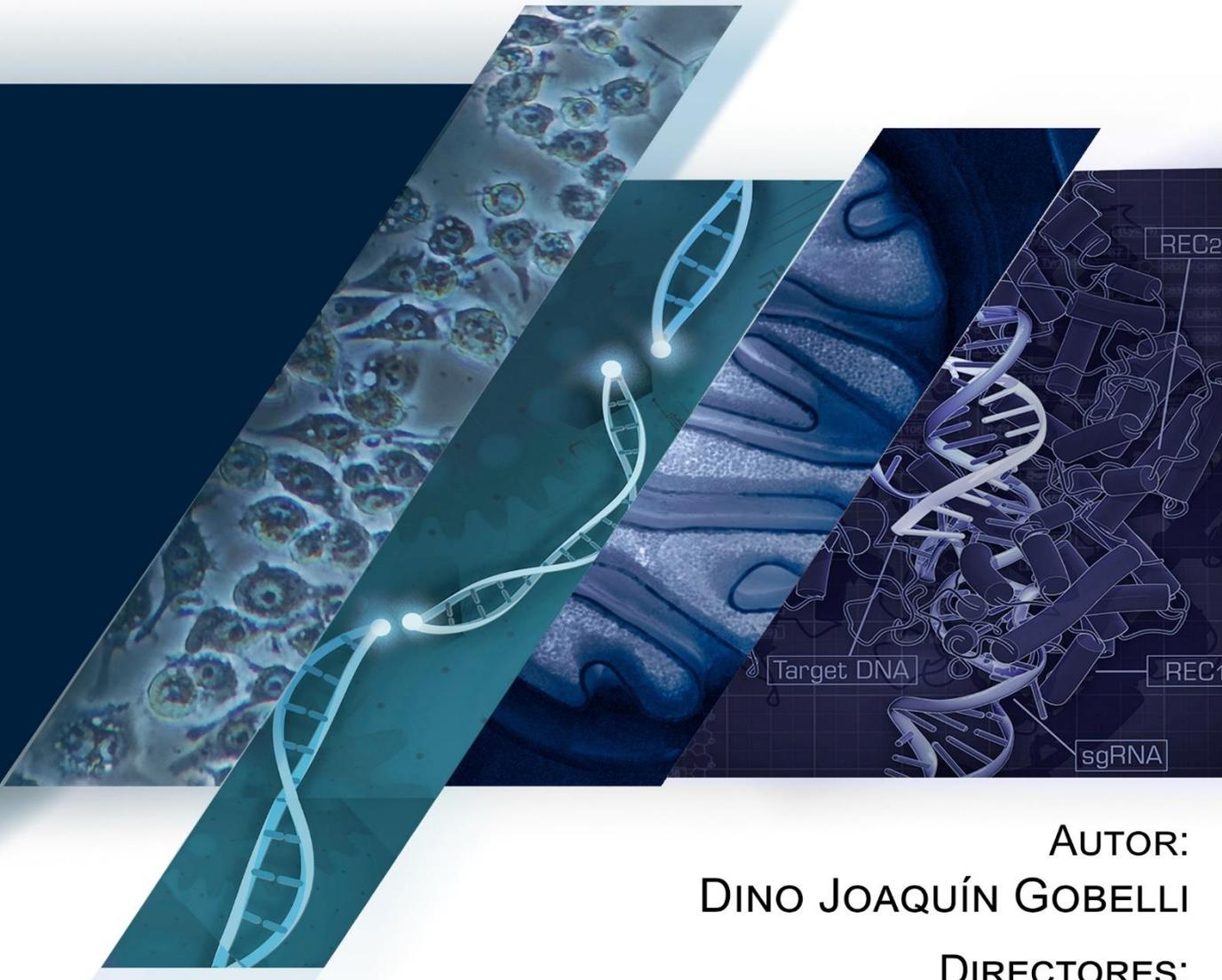


Universidad de Valladolid

MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

**GENERACIÓN DE MODELOS CELULARES PARA EL
ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA MITOCONDRIA EN
LA RESPUESTA INMUNE INNATA**

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER



AUTOR:

DINO JOAQUÍN GOBELLI

DIRECTORES:

DR. MIGUEL ÁNGEL DE LA FUENTE GARCÍA

DRA. MARÍA SIMARRO GRANDE

VALLADOLID, JULIO DE 2018

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
LA MITOCONDRIA.....	1
<i>Cadena respiratoria</i>	1
<i>Otras funciones de la mitocondria</i>	2
MACRÓFAGOS E INMUNOMETABOLISMO.....	2
MODELOS CELULARES Y MODIFICACIÓN GÉNICA DIRIGIDA.....	4
<i>Sistema CRISPR/Cas9</i>	4
<i>Edición génica mediante CRISPR/Cas9</i>	5
<i>CRISPR/Cas9 HITI</i>	6
OBJETIVOS	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
1. GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS.....	8
1.1. <i>Plásmido pX330+gRNA</i>	8
1.2. <i>Plásmido pBsBlast+gRNA</i>	9
1.3. <i>Transformación y amplificación de plásmidos</i>	10
2. LÍNEA CELULAR RAW 264.7	11
3. MODIFICACIÓN GÉNICA DE CÉLULAS RAW 264.7 MEDIANTE CRISPR/CAS9 HITI	12
3.1 <i>Transfección</i>	12
3.2 <i>Análisis de clones</i>	13
4. PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN CÉLULAS RAW 264.7 KO.....	14
RESULTADOS	16
1. OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS PARA LA EDICIÓN GÉNICA DE CÉLULAS RAW 264.7	16
1.1. <i>pX330+gRNAs</i>	16
1.2. <i>pBsBlast+gRNA</i>	17
2. GENERACIÓN DE CÉLULAS RAW 264.7 KO PARA <i>NDUFS4</i> Y <i>SDHB</i>	19
3. PERFIL DE CITOQUINAS FRENTE A BACTERIAS EN LAS CÉLULAS KO	24
3.1 <i>Niveles relativos de expresión de citoquinas mediante qPCR</i>	24
3.2 <i>Cuantificación de la secreción de citoquinas</i>	25
DISCUSIÓN	28
GENERACIÓN DE MODELOS CELULARES.....	28
IMPACTO DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES EN EL PERFIL DE CITOQUINAS	29
CONCLUSIONES	30
REFERENCIAS	31

INTRODUCCIÓN

La mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos que están presentes en el citoplasma de las células eucariotas y cuya principal función es proveer de energía en forma de ATP, aunque también están involucradas en diferentes vías metabólicas [1]. Las mitocondrias proporcionan energía a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), produciendo la mayoría del ATP en las células. Esto se logra a través de cuatro complejos proteicos de la cadena de transporte de electrones (CTE) designados complejos I-IV. Durante la respiración mitocondrial, gracias a la CTE se establece un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Un quinto complejo de la cadena respiratoria, el complejo V, usa este gradiente de protones para convertir ADP en ATP.

Estructuralmente, las mitocondrias son orgánulos compuestos por dos membranas funcionalmente diferentes: la membrana mitocondrial externa que separa el espacio intermembrana del citosol, y la membrana mitocondrial interna que separa la matriz mitocondrial del espacio intermembrana. En la matriz mitocondrial se encuentran las enzimas del ciclo del ácido cítrico (TCA, TriCarboxylic Acid) y de la β -oxidación de los ácidos grasos, el genoma mitocondrial y los ribosomas mitocondriales. La membrana interna está plegada en numerosas crestas, que incrementan considerablemente su superficie total y contiene proteínas con tres tipos de funciones distintas: las que llevan a cabo las reacciones de oxidación de la CTE (complejos I-IV); la ATP sintasa que produce ATP en la matriz (complejo V), y proteínas transportadoras que permiten el paso de metabolitos hacia la matriz y hacia el exterior.

Cadena respiratoria

La CTE está formada por: La NADH deshidrogenasa como Complejo I (CI), la succinato deshidrogenasa como Complejo II (CII), la ubiquinona-citocromo-c oxidorreductasa como Complejo III (CIII) y la citocromo-c oxidasa como Complejo IV (CIV) (Figura 1) [2].

Los ácidos grasos y el piruvato se oxidan en acetil-CoA por la β -oxidación de ácidos grasos o por la piruvato deshidrogenasa (PDH), respectivamente. A continuación, el ciclo TCA es iniciado por la enzima citrato sintasa que cataliza la reacción de condensación de acetil-CoA con oxalacetato para generar citrato. El ciclo TCA genera equivalentes reductores NADH y $FADH_2$ que proporcionan electrones a la cadena de transporte de electrones. El CI, con más de 40 subunidades, es el complejo más grande de la CTE y representa un punto de entrada de electrones, ya que cataliza la transferencia de electrones del NADH a la coenzima Q10 (coQ o ubiquinona). Este transporte está acoplado al bombeo de protones de la matriz al espacio intermembrana.

Por otra parte, los electrones del $FADH_2$ son aceptados por el CII. Este complejo consta de cuatro subunidades proteicas altamente conservadas codificadas en el núcleo, SDHA, SDHB, SDHC y SDHD [3], [4]. SDHC y SDHD están embebidas en la membrana mitocondrial interna y se unen a la proteína SDHB, esta última se une además a la subunidad SDHA en la matriz mitocondrial [5]. SDHA posee como cofactor una molécula de FAD covalentemente unida que interviene en la oxidación de succinato [6]. Los dos electrones que resultan de la oxidación de succinato se canalizan a través de SDHB por coQ al CIII, en este caso sin bombeo de protones [5].

El CIII cataliza la reducción del citocromo c mediante la oxidación de la coQ mientras bombea protones al espacio intermembrana. El citocromo c libera electrones al CIV que los transfiere a una molécula de oxígeno molecular, dando lugar a 2 moléculas de

agua. Este complejo también funciona como una bomba de protones aumentando el gradiente transmembrana [7]. Finalmente, el complejo V utiliza este gradiente electroquímico, translocando protones a la matriz, para capturar energía a través de la fosforilación de ADP.

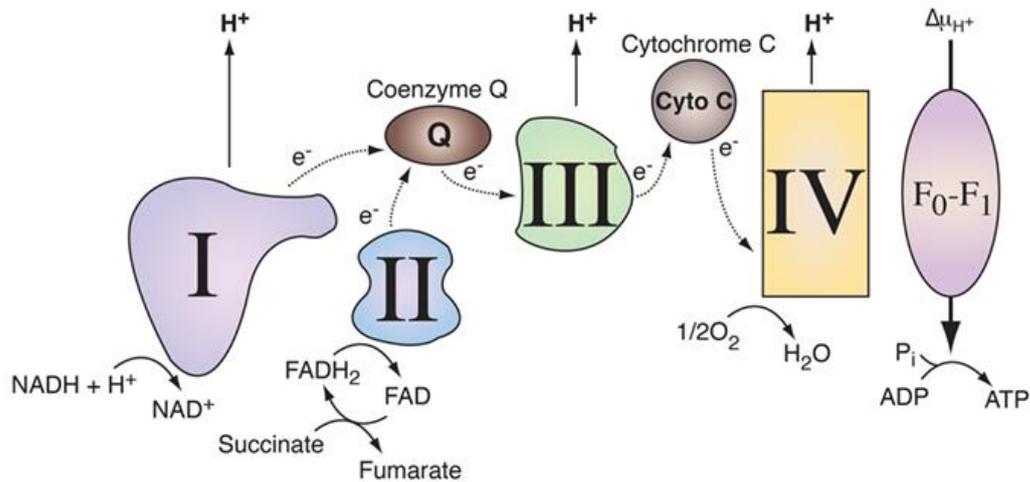


Figura 1: Esquema de la cadena respiratoria. Editada de Sancho, 2017.

Otras funciones de la mitocondria

A pesar de que se le atribuye la producción de energía como su principal función, la mitocondria está involucrada en diversas funciones muy importantes como son su participación en la apoptosis y la proliferación celular, la termogénesis, la regulación del estado redox, la producción de metabolitos intermediarios para la producción de macromoléculas y la señalización, ejercida por una lista creciente de moléculas que incluyen Ca^{2+} , varios metabolitos y especies reactivas de oxígeno (ROS) [8]–[10]. En los últimos años se han descrito nuevos elementos sobre los mecanismos que conectan la respuesta inmune innata y las funciones metabólicas mitocondriales, que sugieren que las mitocondrias regulan su flujo de electrones como adaptación a señales inmunitarias. Un ejemplo de las consecuencias metabólicas inducidas por la señal inmune innata es la estimulación de los macrófagos de ratón con agonistas para los receptores tipo Toll (TLRs, Toll-Like Receptors) o para el receptor de β -glucano, que dan como resultado un aumento de la glicólisis que permite la generación de manera rápida de la energía [11]–[13].

Macrófagos e inmunometabolismo

Los macrófagos son células especializadas que forman parte del sistema inmune con un papel esencial en la respuesta innata a patógenos, así como en el mantenimiento de la homeostasis tisular, inflamación e inmunidad [14]. Estos permanecen inactivos en los tejidos y pueden activarse tras reconocer estímulos como el lipopolisacárido de la pared de bacterias Gram negativas (LPS) o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns), a través de los receptores TLRs, desencadenando así la respuesta inmunitaria. Los macrófagos son células dinámicas cuya principal función es la fagocitosis, eliminando microorganismos invasores, células extrañas, y tejido muerto. Por otra parte, los macrófagos, también son células secretoras de mediadores como las citoquinas (IL-1, IL-10, TNF- α), que modulan la respuesta inflamatoria [15].

El metabolismo de los macrófagos es un tema de interés desde hace mucho tiempo, siendo los primeros trabajos de los años 80 [16]. Los datos actuales sugieren que la mayoría de los agonistas inflamatorios para receptores de reconocimiento de patrones

(PRR, Pattern Recognition Receptor) involucran adaptaciones metabólicas similares. Como se ha mencionado anteriormente, la principal característica de la reprogramación metabólica tras la activación de receptores del sistema inmune innato es una fuerte inducción de la glucólisis incluso en presencia sustancial de oxígeno [11]–[13]. A pesar del bajo rendimiento energético de la glucólisis en comparación con la oxidación completa, cada vez hay más evidencias que indican que este viraje en el metabolismo de la glucosa es necesario para una respuesta más eficaz ante los patógenos ya que proporciona energía de manera rápida, participa en la polarización de los macrófagos hacia el tipo pro-inflamatorio M1 y genera metabolitos intermedios que podrían alimentar otras rutas metabólicas y servir a la síntesis de macromoléculas [17], [18].

El mecanismo molecular que subyace a este cambio en el perfil metabólico se ha propuesto que está mediado por una reducción transitoria de la actividad y del ensamblaje del CI y de su interacción con otros complejos en las mitocondrias de los macrófagos [19]. Varios trabajos han revelado que el CI desempeña un papel clave en la respuesta inflamatoria mediada por los macrófagos. Por un lado, se ha observado que la inhibición por métodos genéticos de CI promueve la polarización de los macrófagos hacia un marcado fenotipo pro-inflamatorio [20]. Por el contrario, la inhibición farmacológica del CI en macrófagos disminuye la secreción de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 β en presencia de LPS y aumenta la secreción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 [21]. Estos datos aparentemente contradictorios delatan que el CI tiene un papel clave en el fino equilibrio entre el estado pro- y anti-inflamatorio. Se ha descrito que esta reducción transitoria en la actividad del CI en los macrófagos activados promueve el incremento de la actividad del CII. Este aumento transitorio en la actividad del CII se ha propuesto que es necesario para la generación de citoquinas pro-inflamatorias que favorecen la respuesta inmune anti-bacteriana [19]. En este sentido se ha descrito que la inhibición del CII mediante el uso del ácido 3-nitropropionico y de dimetilmalonato provoca un aumento de la secreción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 y una disminución en la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias TNF α e IL-1 β [11]. Sin embargo, el succinato, sustrato del CII, se ha demostrado que estabiliza y activa el factor de transcripción HIF-1 α , que a su vez es responsable de la inducción de IL-1 β [22]. Tomados en conjunto, estos estudios demuestran el gran potencial del metabolismo mitocondrial para la regulación de la transcripción, la producción de citoquinas y la polarización de macrófagos que pueden explotarse para el desarrollo de nuevas terapias anti-bacterianas. Sin embargo, llama la atención las aparentes contradicciones en los hallazgos relativos a la función de los CI y CII en la respuesta inflamatoria de los macrófagos, así como la ausencia de estudios que analicen de forma sistemática la función de cada uno de los complejos de la CTE en la respuesta inflamatoria de los macrófagos.

Por todo lo anterior nosotros nos hemos propuesto generar líneas celulares macrófágicas deficientes en subunidades proteicas clave en la actividad de cada uno de los complejos CTE (del I al IV), para comparar y analizar en un mismo modelo celular la contribución de cada uno de ellos en la respuesta inflamatoria de los macrófagos. Hemos empleado la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 que representa una línea celular estándar en este tipo de estudios.

Aunque, como ya he mencionado anteriormente, la idea es obtener modelos para los cuatro complejos de la CTE, pero por limitaciones de tiempo, este trabajo describe solamente los resultados obtenidos en células RAW en las que se han editado los genes *Ndufs4* y *Sdhb* que codifican para subunidades esenciales de los complejos I y II, respectivamente. Estos dos complejos mitocondriales son la vía de entrada de los electrones a la CTE, siendo el CI una bomba de protones a diferencia del CII. El CII por otra parte, es el único complejo de la CTE que interviene en el ciclo de TCA oxidando el succinato a fumarato.

Hay una serie de mutaciones conocidas en los genes de las subunidades del CI que están asociadas con la disfunción mitocondrial [23], [24]. El gen *Ndufs4*, codificado por el genoma nuclear, está asociado con enfermedades mitocondriales para las que se conocen diversas mutaciones, y ha sido utilizado con éxito como diana para la creación de ratones knock-out y knock-in mutantes [25], [26]. El *Ndufs4* tiene un dominio C-terminal muy conservado que contiene un sitio canónico para la fosforilación por PKA [27]. Este gen codifica para la subunidad NADH-ubiquinona oxidoreductasa 18 kDa que desempeña un papel en el ensamblaje de CI, ya que las mutaciones en el gen *NDUFS4* afectan el ensamblaje y la actividad del CI [28].

En cuanto al CII, sus mutaciones están asociadas a enfermedades mitocondriales y a diversos tipos de cáncer [4], [29]–[31]. Estudios de *Sdhb* knock-out han demostrado que es una subunidad necesaria para el ensamblaje y la actividad del CII pero su ausencia no afecta al funcionamiento de otros complejos de la respiración mitocondrial [32].

Modelos celulares y modificación génica dirigida.

El desarrollo de modelos celulares con una disfunción de estos complejos, basada en la anulación de genes clave para su funcionamiento, ofrece la posibilidad de explorar el papel de cada complejo en la respuesta inmune de manera más específica.

Con el avance de la biología molecular y la aparición de la ingeniería genética se han desarrollado cada vez más estrategias que permiten manipular el material genético, es decir, realizar mutaciones en los genes de una forma dirigida y obtener el cambio deseado en una determinada secuencia [33]. Esto permite el estudio tanto a nivel de estructura, organización y función, como de regulación, expresión y evolución de los genes.

Basándose en las rutas de reparación del DNA se han desarrollado diversas estrategias que pueden ser utilizadas para alterar los genes de los mamíferos. Estas técnicas se basan, en su mayoría, en el uso de nucleasas programables que generan una rotura de doble cadena (DSB, Double Strand Breaks) en un sitio específico del genoma que, tras ser reparada por mecanismos celulares intrínsecos, permiten modificaciones dirigidas en el genoma [34].

Existen diferentes tipo de nucleasas que se han utilizado en una amplia variedad de organismos para alterar su genoma como son las meganucleasas, nucleasas con dedos de zinc (ZFNs), nucleasas efectoras tipo activación de la transcripción (TALENs) [35], [36] y, más recientemente desarrollada, el sistema CRISPR/Cas9 combinando los fundamentos de las nucleasas y el reconocimiento específico de secuencias de DNA mediante secuencias de RNA [37].

Sistema CRISPR/Cas9

Las siglas de CRISPR provienen de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) y Cas9 es una de las proteínas de la familia de las nucleasas que está asociada a CRISPR (Crispr Asociated System) [38]. Estos elementos constituyen un sistema inmune adaptativo en procariontes para prevenir infecciones virales o invasiones de elementos de DNA móviles como plásmidos no replicativos[39]–[41].

En bacterias, el sistema CRISPR/Cas9 consta de una secuencia líder parcialmente conservada a la que le sigue en el extremo 3' un conjunto de varias repeticiones cortas conservadas separadas por secuencias de DNA denominada espaciador (Figura 2); estas secuencias son utilizadas posteriormente como molde para generar pequeñas moléculas de RNA no codificantes (crRNA, RNA CRISPR) que contienen 20 nucleótidos complementarios a los del DNA diana y, en el extremo 3' de estos, una

secuencia que se aparea con otro constituyente del sistema CRISPR, la molécula de crRNA transactivador (tracrRNA), formando el RNA guía. El heteroduplex crRNA:tracrRNA adopta una estructura característica con varias horquillas que permite la unión del RNA guía con la enzima Cas9 (Figura 2) [42].

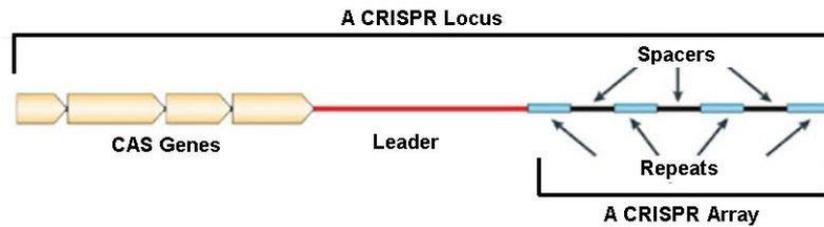


Figura 2: Esquema de locus de CRISPR

La proteína Cas9 tiene una arquitectura bilobular en la que un lóbulo (REC) es responsable del reconocimiento del DNA diana y el otro (NUC) tiene actividad nucleasa [43]. Este último se compone a su vez de los dominios nucleasa RuvC y HNH, y un tercer dominio (PI) de reconocimiento de la secuencia PAM. La secuencia PAM, cuyas siglas derivan de los términos en inglés Protospacer Adjacent Motif, se compone de una serie de nucleótidos localizados en la región 3' de la hebra de DNA diana que no se une al RNA guía y permite a Cas9 distinguir el DNA foráneo de las secuencias espaciadoras del sistema CRISPR.

El sistema de defensa con los elementos CRISPR/Cas de las bacterias funciona como un proceso de múltiples etapas. Primero se detectan pequeños fragmentos de ácidos nucleicos exógenos que provienen de la infección con fagos o plásmidos que contengan adyacente una secuencia PAM. Estos se cortan, y se incorporan, en el locus CRISPR en el extremo 5' tras la secuencia líder y una de las repeticiones. Posteriormente, estas secuencias se transcriben en pequeños fragmentos de crRNA, y junto con proteínas Cas del huésped, reconocen por complementariedad de bases la secuencia previamente adquirida y cortan el elemento genético externo cuando se producen futuras invasiones [44]. Todos estos sucesos permiten al microorganismo identificar como diana de corte a elementos extraños portadores de material genético y así neutralizarlos [39].

Edición génica mediante CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR/Cas9 ha sido optimizado y adaptado para su utilización como herramienta de edición génica dirigida en células eucariotas y requiere únicamente dos componentes: la proteína Cas9 y el RNA guía. Esto se logró fusionando las dos estructuras de RNA del sistema (crRNA y tracrRNA) como una única molécula quimérica, denominada RNA guía (gRNA), permitiendo la expresión simultánea junto con la proteína Cas9 (Figura 3). Este gRNA mantiene las dos funciones de las moléculas de tracrRNA y crRNA: adoptar una estructura secundaria específica en el extremo 3' para unirse a Cas9 y dirigir el apareamiento a la secuencia de DNA diana mediante la secuencia de 20 nucleótidos en el extremo 5'. Esto permite que el sistema CRISPR/Cas pueda ser rediseñado de forma sencilla mediante la modificación del extremo 5' del gRNA según la diana de interés [42].

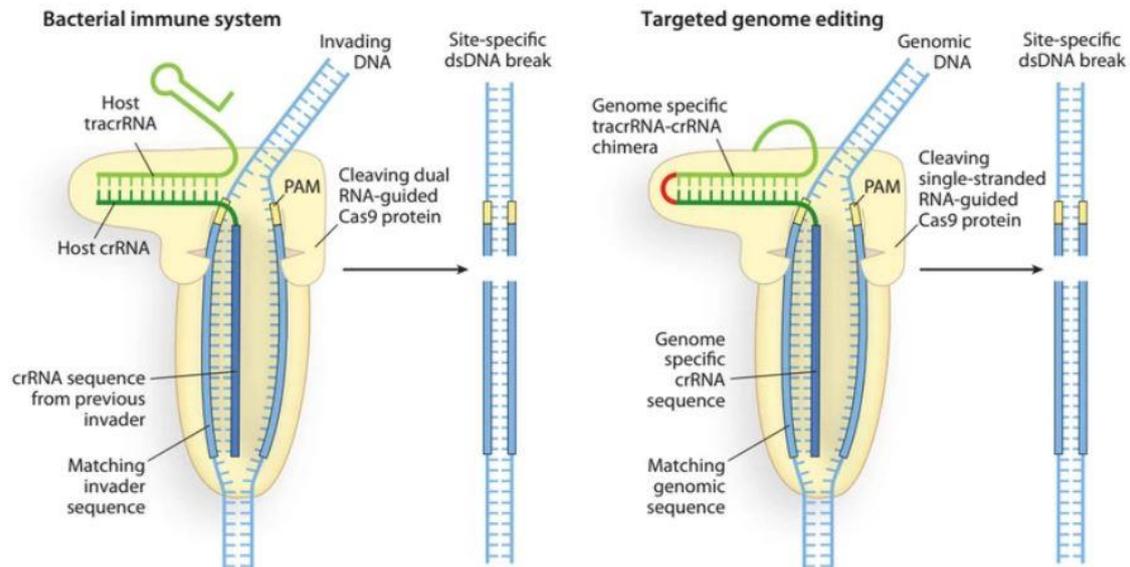


Figura 3: Diagrama comparativo de cómo funciona CRISPR en el sistema inmune bacteriano (izquierda) y cómo funciona el sistema de edición génica CRISPR/Cas9. Imagen de H. Adam Steinberg.

Dependiendo del mecanismo por el que se reparen los DSB, se producirán diferentes tipos de modificaciones en el sitio de corte. En las células el DNA es reparado mediante dos mecanismos principales: a) la reparación dirigida por homología (HDR, *Homology-Directed Repair*) o b) la unión de extremos no homólogos (NHEJ, *Non Homologous End Joining*) [45]–[48]. La HDR es considerada un mecanismo más preciso de reparación de la DSB, ya que utiliza como molde otra hebra que contenga regiones de homología. Este mecanismo sólo ocurre en células proliferativas ya que tiene lugar sólo en las fases S y G₂, cuando las cromátidas hermanas están disponibles para ser usadas como molde. El mecanismo permite insertar un transgén mediante un vector con regiones homólogas al gen diana. Por otra parte, la vía NHEJ promueve durante la reparación de la DSB mutaciones por inserción o deleción que generan, por un cambio en la pauta de lectura o por aparición de un codón de terminación, una disrupción del gen. Este es un mecanismo activo tanto en células replicativas como en células en reposo, que no se dividen.

CRISPR/Cas9 HITI

Debido a la necesidad en terapia génica de introducir transgenes en células no replicativas se desarrolló un nuevo sistema de edición basado en NHEJ y la tecnología CRISPR/Cas denominado integración dirigida independiente de homología (HITI, *Homology-Independent Targeted Integration*) [49]. Este sistema se basa en transfectar las células con un plásmido portador de Cas9 y gRNA y un plásmido con la secuencia de DNA donante flanqueada por el sitio diana para gRNA. Por lo tanto, Cas9 genera DSB tanto en el sitio diana del genoma como en el plásmido donante, produciendo extremos romos en ambos. El inserto liberado del plásmido donante será usado por la maquinaria celular para reparar mediante la vía NHEJ la DSB del genoma, lo que podría dar lugar a la integración de dicho inserto en el sitio diana (Figura 4) [50]. Una vez incorporado en el genoma, el DNA del donante que se inserta en la orientación deseada interrumpe la secuencia diana de Cas9 y se evita que Cas9 corte nuevamente. Si el DSB genómico se une vía libre de errores sin la inserción de DNA del donante, la secuencia diana de Cas9 permanecerá intacta y se producirá una segunda ronda de corte de Cas9.

Aunque originalmente diseñado para generar knock-in y restaurar la función de genes defectuosos, este método permite la obtención de knock-out (KO) mediante la escisión

de un gen de interés y la inserción de una secuencia donante que lo interrumpa. Además, como secuencia donante puede utilizarse un gen marcador que facilite la posterior selección de las células editadas.

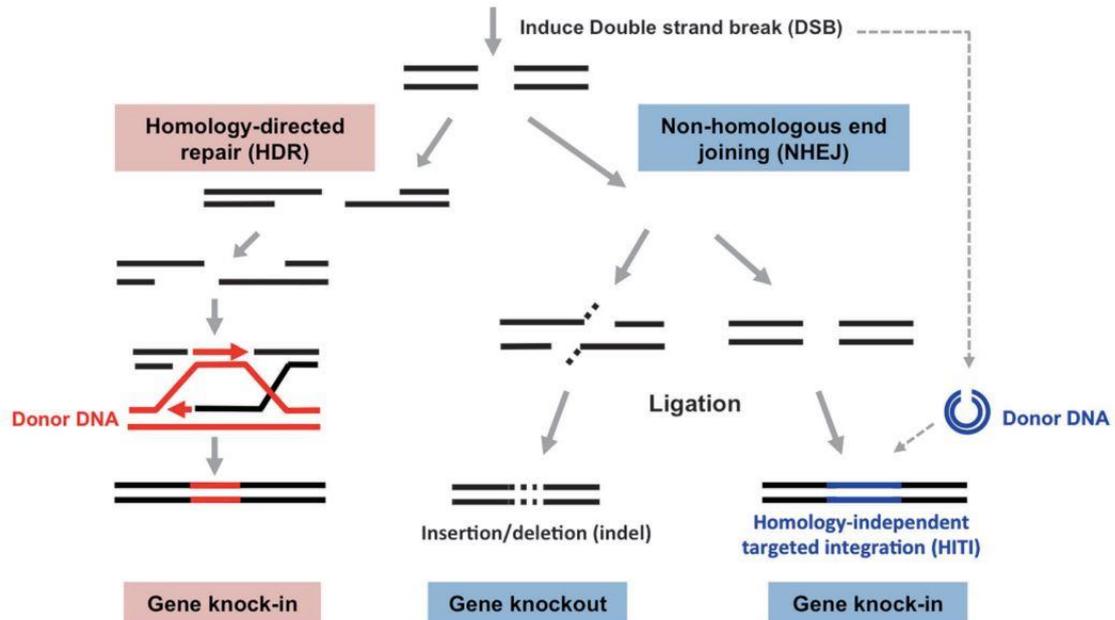


Figura 4: Representación de la reparación de la DSB, mediante las diferentes vías. Imagen de Suzuki, 2018.

OBJETIVOS

El aumento de la glucólisis es una característica clásicamente descrita en los macrófagos expuestos a bacterias. Esta reprogramación metabólica es necesaria para una respuesta más eficaz ante los patógenos y el mejor conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a este fenómeno, permitirá el diseño de nuevas terapias antibacterianas y la generación de vacunas más eficientes.

Los complejos I y II de la cadena transportadora de electrones, juegan un papel clave en la reprogramación metabólica y el fino equilibrio entre el estado pro- y anti-inflamatorio. Sin embargo, llama la atención las aparentes contradicciones en los hallazgos relativos a la función de estos complejos en la respuesta inflamatoria de los macrófagos.

El objetivo de este proyecto es diseccionar y esclarecer la función de los complejos I y II en la respuesta inflamatoria de los macrófagos en un mismo tipo celular mediante la generación de líneas celulares macrofágicas RAW 264.7 deficientes en subunidades proteicas clave en las actividades de los complejos I y II.

Los objetivos específicos son:

- (1) Generación de líneas macrofágicas RAW 264.7 knock-out en las subunidades claves en las actividades de los complejos I (*Ndufs4*) y II (*Sdhb*) mediante la tecnología de edición génica CRISPR/Cas9 HITI.
- (2) Análisis del perfil de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en las líneas macrofágicas *Ndufs4*^{-/-} y *Sdhb*^{-/-} tras la exposición a bacterias mediante PCR cuantitativa y ELISA.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Generación de plásmidos

Para llevar a cabo la edición génica de los genes *Ndufs4* o *Sdhb* mediante la técnica de CRISPR/Cas9 HITI en células RAW 264.7 se utilizaron dos plásmidos: a) pX330+gRNA, portador del gen de la nucleasa Cas9 y del RNA guía (gRNA) específico para cada uno de los genes a anular y b) pBsBlast+gRNA, que se utilizará como donante del inserto que interrumpirá el gen de interés, y que contiene el gen de resistencia a blasticidina como gen reportero flanqueado por la secuencia diana del gRNA correspondiente.

1.1. Plásmido pX330+gRNA

Como plásmido de partida se utilizó el plásmido pX330 (donado por Feng Zhang, depositado en Addgene con la referencia #42230)[51]. Este vector de 8506 pb contiene el gen de la nucleasa de *Streptococcus pyogenes* Cas9 bajo el promotor híbrido CBh (del inglés chicken β -actin hybrid) y, precedido por el promotor U6, un cassette que contiene la secuencia de gRNA scaffold y sitios de restricción de BbsI para la inserción del gRNA (Figura 5). El plásmido también cuenta con el gen de resistencia a ampicilina, para su propagación en bacterias.

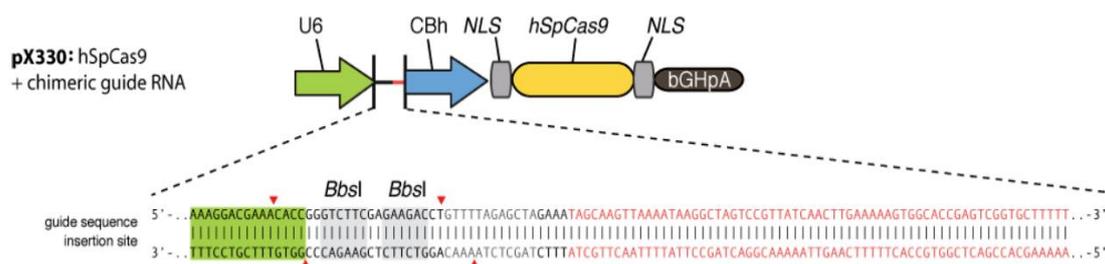


Figura 5: Esquema parcial del vector pX330.

Diseño del gRNA. La elección de la secuencia utilizada como gRNA se realizó mediante el software online *CRISPR Design Tool* (Zhang Lab, MIT 2013). Se eligió para ambos genes a anular (*Ndufs4* o *Sdhb*) una secuencia de 20 nucleótidos que estuviese seguida por una secuencia PAM (NGG) dentro del primer exón del gen. Luego de la elección de la secuencia guía, se diseñaron los dos oligonucleótidos correspondientes a cada hebra de la guía y en el extremo 5' de cada uno de ellos se agregaron cuatro nucleótidos complementarios a los nucleótidos de los extremos sobresalientes que deja la enzima de restricción BbsI para la posterior ligación con el vector (Tabla 1).

	Nombre	Secuencia 5'-3'
P1	gRNA <i>Ndufs4</i> SEN	CACCGCGCTGAGACAGGCGATGTTA
P2	gRNA <i>Ndufs4</i> ATS	AAACTAACATCGCCTGTCTCAGCGC
P3	gRNA <i>Sdhb</i> SEN	CACCGAGCCGGAAGCCGCGCTTCA
P4	gRNA <i>Sdhb</i> ATS	AAACTGAAGCGCGGCTTCCCGGCTC

Tabla 1: Oligonucleótidos precursores de gRNA. Negro: Secuencias de gRNA específica de genoma. Rojo: secuencia de nucleótidos complementarios a los nucleótidos de los extremos sobresalientes que deja la enzima de restricción BbsI.

Anillamiento de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se fosforilaron mediante la enzima Polinucleótido Quinasa T4 (PNK) para obtener extremos aptos para la ligación. Para ello se añadieron 10 U de PNK a cada mezcla de oligonucleótidos

complementarios (5 μ M de cada uno) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Una vez fosforilados los extremos se realizó el anillamiento de los oligonucleótidos para generar fragmentos de doble cadena (Figura 6). Esto se hizo añadiendo a 40 μ L de la mezcla de oligonucleótidos fosforilados, NaCl a concentración final de 50 mM e incubando a 95 °C durante 3 minutos para desnaturalizar el DNA para después dejar enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente.



Figura 6: Esquema de diseño del inserto de gRNA.

Ligación al vector. Para generar el plásmido pX330+gRNA se digirió primero el plásmido pX330 con la enzima BbsI. La reacción contenía 1 μ g de plásmido pX330 y 5 U de la enzima BbsI. Se incubó a 37°C durante 20 minutos y se analizó en un gel de agarosa al 1% (a 100 V durante 30 minutos). La banda correspondiente al vector linealizado pX330/BbsI (8488 bp) se cortó del gel y se purificó utilizando el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EEUU). Las reacciones de ligación entre pX330/BbsI y cada uno de los gRNA se realizaron con una relación molar vector:inserto de 1:3 empleando T4 DNA ligasa (Invitrogen, EEUU). Las reacciones se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se transformaron 50 μ l de bacterias competentes *E. coli* DH5 α con 10 μ l de la reacción de ligación y se sembraron en placas de ampicilina para selección de recombinantes.

1.2. Plásmido pBsBlast+gRNA

Se utilizó como plásmido inicial el vector pBsBlast de 4516 pb. Este plásmido generado en el laboratorio contiene el cassette de resistencia a blasticidina que servirá como gen reportero de la edición génica en las células. El cassette está flanqueado por los sitios de corte de Sall y BamHI. El plásmido también contiene el gen de resistencia a ampicilina para propagación en bacterias.

Como estrategia para incorporar a ambos lados del cassette de blasticidina la secuencia reconocida por el gRNA se diseñó una pareja de primers formados por una secuencia complementaria a la región 5' o 3' del cassette, la secuencia reconocida por gRNA (secuencia gRNA más la secuencia PAM) y el sitio de corte para las enzimas Sall o BamHI según corresponda al extremo 5' o 3', respectivamente (Tabla 2). Además, al primer correspondiente al extremo 5' del cassette se le incorporó una región correspondiente a codones stop ubicados en distintos marcos de lectura para asegurar la interrupción de la expresión del gen cuando se inserte. Estos primers se utilizaron para realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) obteniendo como producto de reacción el cassette de resistencia a blasticidina más la secuencia reconocida por gRNA y los sitios de corte para Sall y BamHI, que permitirían la posterior clonación en el vector correspondiente. Las condiciones de PCR fueron: 10 ng de pBsBlast, 0,2 mM de dNTPs, 1 U de DNA polimerasa Phusion™ Hot Start II (Thermo Scientific, EEUU), y 0,15 μ M de cada uno de los oligonucleótidos. El programa de PCR constaba de una desnaturalización inicial a 98°C durante 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 10 segundos a 66 °C, 1 minuto a 72°C y un paso de extensión final durante 5 minutos a 72°C.

El producto de PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 voltios durante 30 minutos. La banda correspondiente al fragmento de interés (1668 bp) se cortó del gel y se extrajo el DNA mediante purificación en columna con kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EEUU). Se cuantificó la concentración de DNA utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo

Scientific, EEUU). El producto obtenido se digirió con BamHI y Sall para obtener extremos cohesivos. La digestión se realizó con 2 µg de fragmento de DNA más 10 U de la enzima Sall y 15 U de la enzima BamHI en un buffer compatible con ambas enzimas (buffer O de Thermo Scientific, EEUU), y se incubó a 37°C por 1 h.

	Nombre	Secuencia 5'-3'
P5	SdhBLASSAL SEN	TAA <u>GTCGAC</u> AGCCGGGAAGCCGCGCTTCA <u>AGG</u> TAG ATAGTTAGCGACAATCCCGGGTCTCCGCG
P6	SdhBLASBAMH ATS	ATTGGAT <u>CCTTGAAGCGCGGCTTCCCGGCTGGCTG</u> CAGGAATTCGATCTGGG
P7	NdufsBLASSAL SEN	TAA <u>GTCGAC</u> TCGCTGAGACAGGCGATGTTAGG <u>TAG</u> ATAGTTAGCGACAATCCCGGGTCTCCGCG
P8	Ndufs4BLASBAMH ATS	ATTGGAT <u>CCTAACATCGCCTGTCTCAGCGAGGCTGC</u> AGGAATTCGATCTGGG

Tabla 2: Primers diseñados para el clonaje de las secuencias dianas de gRNA en el vector pBsBlast. Negro: secuencia reconocida por gRNA, subrayada secuencia PAM. Rojo: sitios de reconocimiento de Sall o BamHI. Amarillo: secuencia codificante para codones stop. Azul: secuencia que hibrida con pBsBlast.

Ligación al vector. Para obtener el vector se realizó la digestión del plásmido pBsBlast con las enzimas de restricción Sall y BamHI. La digestión se realizó con 3 µg de plásmido pBsBlast más 20 U de la enzima Sall y 30 U de la enzima BamHI en un buffer compatible para ambas enzimas (buffer O), y se incubó a 37°C por 1 h, añadiéndose luego 1,5 U de fosfatasa alcalina (SAP, Shrimp Alkaline Phosphatase, Sigma-Aldrich) durante otros 30 minutos. El producto de digestión se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y la banda correspondiente al vector sin el cassette de blasticidina (2916 pb) se cortó del gel y se extrajo el DNA mediante purificación en columna con kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EEUU).

La ligación entre el vector vacío y el cassette de blasticidina flanqueado por gRNA se llevó a cabo utilizando la T4 DNA ligasa de Invitrogen. Se hizo una mezcla de reacción con una relación molar de vector-inserto 1:3, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. El mismo procedimiento se realizó en una muestra sin inserto como control negativo.

1.3. Transformación y amplificación de plásmidos.

La amplificación de los nuevos plásmidos se realizó en bacterias competentes *E. coli* DH10β mediante transformación por shock térmico. Se añadió 10 µL del producto de reacción de ligación a 50 µL de bacterias *E. coli* DH10β competentes. Se incubó en hielo durante 20 minutos, se realizó un shock térmico a 42 °C durante 45 segundos y se incubó en hielo otros 3 minutos. Luego se añadieron 800 µL de caldo LB y se incubó a 37 °C en agitación durante 1 hora. Las bacterias transformadas se centrifugaron a 10.000 xg durante 2 minutos, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet de bacterias en 100 µL de medio LB y se sembraron en placas de LB agar con 100 µg/mL de ampicilina. Las placas se incubaron durante toda la noche en una estufa a 37 °C. El mismo procedimiento se realizó con las mezclas de ligación sin inserto como control negativo.

Purificación a pequeña escala y comprobación de la ligación del plásmido. Se seleccionaron colonias de bacterias transformadas y se cultivaron en 3 ml de caldo LB con ampicilina 100 µg/mL a 37 °C durante toda la noche en agitación. Se tomó 1,5 mL del cultivo para la extracción de DNA plasmídico mediante el método de la lisis alcalina

usando los buffers comerciales P1, P2 y P3 (Qiagen, Alemania). Se centrifugó el cultivo a 10.000 xg durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 150 µL del buffer de resuspensión P1 más RNAsa a 50 µg/mL, después se añadieron 150 µL de buffer de lisis P2 y se incubó la suspensión durante 3 minutos. Finalmente se detuvo la reacción mediante la adición de otros 150 µL de buffer de neutralización P3. El DNA plasmídico se precipitó con la adición de 900 µL etanol absoluto, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en TE. Finalmente se comprobó el éxito de la clonación mediante PCR.

En el caso de pX330+gRNA se utilizó como primer uno de los oligonucleótidos del gRNA (P2 para *Ndufs4* y P4 para *Sdhb*) y como segundo primer un oligonucleótido complementario a una secuencia del plásmido a 90 pb de distancia (pX330sec (P9) 5'-ACTATCATATGCTTACCGTA-3'). Las condiciones de PCR fueron: 10 ng/µL de plásmido, 0,2 mM de dNTPs, 1 unidad de DNA polimerasa *Phusion™ Hot Start II* (Thermo Scientific, EEUU), 0,4 µM de cada uno de los oligonucleótidos. El programa de ciclado correspondió a una desnaturalización inicial de 2 minutos a 98 °C, seguida de 40 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 20 segundos a 60 °C, 1 minuto a 72°C y una extensión final 5 minutos a 72°C. El producto de PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 voltios durante 30 minutos.

Para comprobar la ligación de pBsBlast+gRNA se utilizaron los mismos primers utilizados para amplificar el cassette de resistencia a blasticidina (P7 y P8 para *Ndufs4* y P5 y P6 para *Sdhb*). Las condiciones de PCR fueron: 10 ng/µL de plásmido, 0,2 mM de dNTPs, 1 unidad de DNA polimerasa *Phusion™ Hot Start II* (Thermo Scientific, EEUU), 0,4 µM de cada uno de los oligonucleótidos. El programa de ciclado correspondió a una desnaturalización inicial 2 minutos a 98 °C, seguido de 40 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 20 segundos a 66 °C, 1 minuto a 72°C y una extensión final 5 minutos a 72°C. El producto de PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 voltios durante 30 minutos.

Purificación de plásmido a gran escala. Una vez comprobado mediante PCR la correcta ligación del plásmido se procedió a inocular con las bacterias transformadas 75 mL de caldo LB con ampicilina 100 µg/mL y se incubó a 37 °C en agitación durante 16 h. Este cultivo se utilizó para realizar la extracción a gran escala del DNA plasmídico mediante el kit *Pure Link Hi Pure Plasmid Midiprep* (Invitrogen, EEUU). Los plásmidos obtenidos se secuenciaron mediante un Servicio de Secuenciación Sanger (Unidad de Genómica, C.A.I. de Genómica y Proteómica, Universidad Complutense de Madrid).

2. Línea celular RAW 264.7

Como modelo celular se utilizó la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC TIB-71) que fue establecida desde un tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abselon. Esta línea en cultivo crece adherida al sustrato y para su mantenimiento se utiliza medio *Dulbecco's modified Eagle's médium* (DMEM) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS), 1 % aminoácidos no esenciales (Gibco, EEUU), 1 mM de piruvato sódico, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/mL estreptomycin en incubación a 37°C al 5% de CO₂. Para la división y siembra de las células se retira el medio de cultivo de la placa o pocillo y se hace un lavado con PBS. Después, se procede a la disgregación celular, empleando tripsina-EDTA (0,05% y 0,02%, respectivamente). Se deja actuar durante aproximadamente 5 minutos. Pasado este tiempo, se añade medio DMEM completo con el fin de inactivar la tripsina. Se recoge la suspensión celular, se centrifuga a 900 rpm durante 3 minutos y después, se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet con el mismo medio usado anteriormente. A continuación, se cuenta el número de células presentes por

mililitro de suspensión celular mediante cámara de Neubauer, y se puede proceder a sembrar las células en placas de cultivo.

Determinación de la sensibilidad a Blastidina. Se determinó la concentración mínima efectiva de blastidina requerida para eliminar las células no transfectadas. Para esto, se sembraron aproximadamente 10.000 células/mL en placa de 96 pocillos con medio DMEM completo con concentraciones crecientes de blastidina (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 µg/mL). Cada concentración de blastidina se probó por duplicado. Las células se incubaron a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂ por un total de 5 días. La concentración mínima efectiva de blastidina fue determinada por observación microscópica periódica de los cultivos tratados.

3. Modificación génica de células RAW 264.7 mediante CRISPR/Cas9

HITI

3.1 Transfección

La transfección de los plásmidos en las células RAW 264.7 se realizó con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, EEUU). Se sembraron 200.000 células/pocillo en placa de 24 pocillos y se incubó a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂ para obtener una confluencia del 90%. Después de 24 h se cambió el medio de cultivo por DMEM completo sin antibiótico. Por otro lado, se preparó una solución con 50 µL de medio Opti-MEM y 7 µL de lipofectamina 2000. Por separado se preparó también en 50 µL de medio Opti-MEM una mezcla de 0,5 µg de plásmido pBsBlast y 3 µg de pX330 para obtener una relación molar 1:3. Las soluciones de lipofectamina y de plásmidos se mezclaron y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se añadieron los 100 µL de la mezcla en los pocillos de cultivos de células RAW y se incubó 37 °C con 5% de CO₂. A las 24 h de incubación se cambió el medio por DMEM completo y a las 48 h nuevamente por DMEM completo suplementado con blastidina 2 µg/mL con el fin de seleccionar las células que hayan incorporado el cassette de blastidina.

Pasados 4 días desde la transfección se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS. Se trataron las células con tripsina, se recogieron en un tubo y se centrifugaron a 10.000 xg durante 3 segundos. Una vez sedimentadas las células, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 400 µL de medio DMEM completo. De esta suspensión celular se utilizaron 50 µL para realizar diluciones seriadas con el objetivo de obtener clones únicos. Primero se diluyeron los 50 µL de la suspensión celular concentrada en 12 ml de medio DMEM completo. Posteriormente se le realizaron 3 diluciones consecutivas 1:3 en medio DMEM completo. Cada dilución se distribuyó en media placa de 96 pocillos, 100 µL en cada pocillo. A estos se les añadió DMEM completo suplementado con blastidina 4 µg/mL para obtener una concentración final de blastidina de 2 µg/mL. Las placas se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante 15 días.

Los pocillos se analizaron al microscopio y se seleccionaron aquellos en los cuales había crecimiento de una sola colonia celular. A los pocillos seleccionados se les retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y se trató con tripsina para disgregar las células. Se añadió 150 µL de DMEM con blastidina 2 µg/mL y la suspensión de células se sembró por duplicado dos placas de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ hasta la obtener crecimiento confluyente de células. Una de las placas se destinó a la obtención de DNA genómico y la otra para la congelación de los clones.

3.2 Análisis de clones

Extracción de DNA genómico. Al cultivo celular de cada clon se le retiró el medio de cultivo y se agregaron 200 µl de buffer de lisis (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS) más proteinasa K (200 µg/mL), se incubó durante 4 horas y se trasvasó a un tubo eppendorf. Al lisado se le añadieron 600 µl de etanol absoluto, 20 µl de 5M CINA y 2 µl de 20 mg/mL glucógeno. Se incubó a -20 °C para favorecer la precipitación del DNA y se centrifugó por 15 minutos a 10.000 xg. Una vez obtenido el pellet de DNA se retiró el sobrenadante y se lavó con etanol 70%. Se dejó secar el pellet durante 5 minutos y se resuspendió en buffer TE con RNAsa 80 µg/mL. La concentración de DNA se cuantificó utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific, EEUU).

PCR. El análisis de los clones se realizó mediante PCR para comprobar si tuvo lugar la edición génica en el sitio de interés, es decir si se había modificado el gen *Ndufs4* o *Sdhd* dando lugar a la inserción del casete de blastidina donante. Para ello se diseñaron primers específicos en la región adyacente a la secuencia reconocida por gRNA en el genoma y primers específicos del cassette de blastidina que interrumpe el gen de *Ndufs4* o *Sdhd* (Tabla 3). Se utilizaron diferentes combinaciones de estos para confirmar la edición del gen de interés. Las condiciones de PCR fueron: 30-50 ng de DNA genómico, 0,2 mM de dNTPs, 1 unidad de DNA polimerasa *Phusion™ Hot Start II* (Thermo Scientific, EEUU) y 0,4 µM de cada uno de los oligonucleótidos. El programa de ciclado correspondió a una desnaturalización inicial 4 minutos a 98 °C, seguida de 40 ciclos de 10 segundos a 98 °C, 20 segundos a 63 °C, 45 segundos a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C. El producto de PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

	Nombre	Secuencia 5'-3'
P10	Ndufs CIGen SEN	GGGCTTCTCAGCCTCAATGT
P11	Ndufs CIGen ATS	GAGCCACGATCCAGTTCACA
P12	Sdhd CIGen SEN	TGTACCGACGTGACGTTTCAT
P13	Sdhd CIGen ATS	AGGCCTCCCTTTCACACAAG
P14	Insert blast5' SEN	TAAGGCATAGGCATCAGGGG
P15	Insert blast3' ATS	GCAGGCGTTACATAACTTACGG

Tabla 3: Primers utilizados para el análisis de clones.

Extracción de RNA y síntesis de cDNA. Para la extracción de RNA se realizó un cultivo de 700.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos con células RAW 264.7 sin editar (WT, Wild Type) y de los clones KO resultado de la edición génica para cada gen. Se incubaron las células toda la noche y, tras retirar el medio de cultivo, se lisaron añadiendo 1 mL de Trizol (*TRI Reagent* de Sigma, EEUU). Pasados 15 minutos de incubación, se recogió el sobrenadante en un tubo eppendorf, se agregaron 200 µL de cloroformo, se mezcló bien y se centrifugó a 10.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. La fase acuosa se transvasó a un nuevo tubo, se precipitó el RNA con 500 µL de isopropanol y nuevamente se centrifugó a 10.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. El pellet de RNA se lavó con etanol 70% y se resuspendió en agua libre de RNAsa. La concentración de RNA se cuantificó utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific, EEUU)

A partir del RNA extraído se sintetizó el DNA complementario (cDNA) mediante la transcriptasa reversa. Para ello se utilizó el kit *iScript cDNA Synthesis* (Bio-Rad, EEUU). Siguiendo las recomendaciones de la casa comercial se añadieron los reactivos: 0.8 µg de RNA y 1 µL de iScript transcriptasa reversa en el buffer *mix iScript*

reaction. Para hacer la PCR transcriptasa reversa (RT-PCR) las condiciones de reacción fueron: 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C y finalmente 5 minutos a 85°C. El cDNA se mantuvo a -20°C.

Análisis de expresión relativa de mRNA por PCR cuantitativa. La expresión de los genes *Ndufs4* y *Sdhd* se analizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) con el objetivo de evaluar el contenido de mRNAs respectivos en los diferentes clones resistentes a blasticidina. El cDNA se amplificó mediante qPCR utilizando *PowerUp SYBR Green master mix* (Applied Biosystems, EEUU) en el termociclador *LightCycler® 480 II* (Roche, Suiza). La expresión relativa de los genes fue determinada utilizando cebadores que hibridan en el cDNA de *Ndufs4* y *Sdhd* en regiones correspondientes a exones diferentes (Tabla 4). Como gen constitutivo para realizar la normalización se utilizó el gen de la β -actina murina. El programa de PCR constaba de una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguida de 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, 45 segundos a 72 °C y un paso de extensión final durante 5 minutos a 72°C. La expresión relativa de cada gen se comparó con la línea WT de RAW 264.7 utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [52].

	Nombre	Secuencia 5'-3'
P16	<i>Ndufs4</i> ClqPCR SEN	TTCCTGCTCGCAATAACATGC
P17	<i>Ndufs4</i> ClqPCR ATS	CATGTTGGAGAGGGGGTCAG
P18	<i>Sdhd</i> ClqPCR SEN	CTGAATAAGTGCGGACCTATGG
P19	<i>Sdhd</i> ClqPCR ATS	AGTATTGCCTCCGTTGATGTTT
P20	b-actin qPCR SEN	GACATGGAGAAGATCTGGCA
P21	b-actin qPCR ATS	GGTCTCAAACATGATCTGGGT

Tabla 4: Primers para análisis de expresión de *Ndufs4* y *Sdhd* por qPCR.

4. Producción de citoquinas en células RAW 264.7 KO

Estimulación. Para el ensayo de estimulación se utilizaron células RAW 264.7 WT y los clones KO obtenidos para *Ndufs4* y *Sdhd*. Para el ensayo se sembraron 700.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos y se incubaron las células toda la noche hasta su adhesión al pocillo. Al día siguiente, se cambió el medio de cultivo por DMEM completo para eliminar restos y metabolitos celulares. A cada pocillo se añadieron bacterias *E. coli* DH5 α , inactivadas por calor, a una relación bacterias:células de 50:1 y se incubaron durante 0, 4, 8 y 24 horas. Tras la cinética, se recogió el sobrenadante para detección de citoquinas mediante ELISA y se lisaron las células con 1 mL de Trizol para la extracción de RNA y síntesis de cDNA. El ensayo se realizó por triplicado.

Niveles de mRNA por qPCR. Se determinó mediante qPCR la expresión relativa de los genes de las citoquinas IL-1, IL-10 y TNF- α en la línea RAW 264.7 y las líneas KO para *Ndufs4* o *Sdhd* a los distintos tiempos de estimulación. El cDNA se amplificó mediante qPCR utilizando *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, EEUU) en el termociclador *LightCycler® 480 II* (Roche, Suiza). La expresión relativa de los genes fue determinada utilizando los cebadores de la Tabla 5. Los niveles de expresión se normalizaron al gen constitutivo murino de la β -actina. El programa de PCR constaba de una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguida de 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, 45 segundos a 72°C y un paso de extensión final durante 5 minutos a 72°C. La expresión relativa de cada gen se comparó con la línea WT de RAW 264,7 sin estimular (0 horas) utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [52].

	Nombre	Secuencia 5'-3'
P22	IL-10 qPCR SEN	ACAGCCGGGAAGACAATAAC
P23	IL-10 qPCR ATS	CAGCTGGTCCTTTGTTTGAAAG
P24	TNF- α qPCR SEN	AGCCGATGGGTTGTACCTTGTCTA
P25	TNF- α qPCR ATS	TGAGATAGCAAATCGGCTGACGGT
P26	IL-1 β qPCR SEN	TGCCTCATCCTGGAAGGTC
P27	IL-1 β qPCR ATS	TGTGAAATGCCACCTTTTGA
P20	b-actin qPCR SEN	GACATGGAGAAGATCTGGCA
P21	b-actin qPCR ATS	GGTCTCAAACATGATCTGGGT

Tabla 5: Primers para análisis de expresión de los genes de IL-1, IL-10 y TNF- α por qPCR.

Niveles de citoquinas por ELISA. La secreción de IL-1 β , IL-10 y TNF- α se determinó mediante ELISA usando los kits comerciales “*Mouse IL-1 β ELISA Kit*”, “*Mouse IL-10 ELISA Kit*” y “*Mouse Tumor Necrosis Factor α ELISA Kit*” (Sigma-Aldrich, EEUU) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Se analizaron los sobrenadantes de células RAW 264.7 y de los clones KO para *Ndufs4* y *Sdhb* después del tratamiento con *E. coli* durante 8 y 24 h y se midió la absorbancia a 450 nm. La concentración de cada proteína se determinó mediante regresión lineal con estándares conocidos de cada citoquina.

RESULTADOS

En este trabajo se ha aplicado el método de edición génica CRISPR/Cas9 HITI con objeto de generar líneas celulares RAW 264.7 KO para *Ndufs4* y *Sdhb*, claves para la función del complejo I y II de la CTE, respectivamente. Se estudia asimismo la repercusión funcional que la ausencia de estas proteínas tiene en la respuesta a la estimulación de los macrófagos con bacterias.

1. Obtención de los plásmidos para la edición génica de células

RAW 264.7

1.1. pX330+gRNAs

Una vez llevado a cabo los pasos de anillamiento y ligación del gRNA con el vector pX330 para la construcción del plásmido pX330+gRNA, se comprobó si se había producido correctamente la inserción. Para ello, y con el fin de poder seleccionar que colonias de *E. coli* DH10 β son las que se han transformado correctamente con el plásmido portador de los sgRNA se llevó a cabo una PCR de los plásmidos purificados utilizando el primer P9 específico del vector y un oligonucleótido específico a la secuencia guía para cada gen específico (P2 para *Ndufs4* y P4 para *Sdhb*). Tras separar las muestras en el gel de agarosa, se puede observar que las colonias seleccionadas habían sido transformadas correctamente con los plásmidos pX330+gRNAs, puesto que presentaban una única banda de 90 bp (Figura 7). Además, se puede corroborar que el producto es específico ya que no se observa banda en los controles negativos. Como control negativo se utilizaron como DNA molde para la PCR el plásmido pX330 original y un plásmido pX330+gRNA correspondiente al gen contrario al del primer utilizado, es decir pX330+gRNA de *Ndufs4* con el primer P4 (gRNA *Sdhb* ATS) y viceversa.

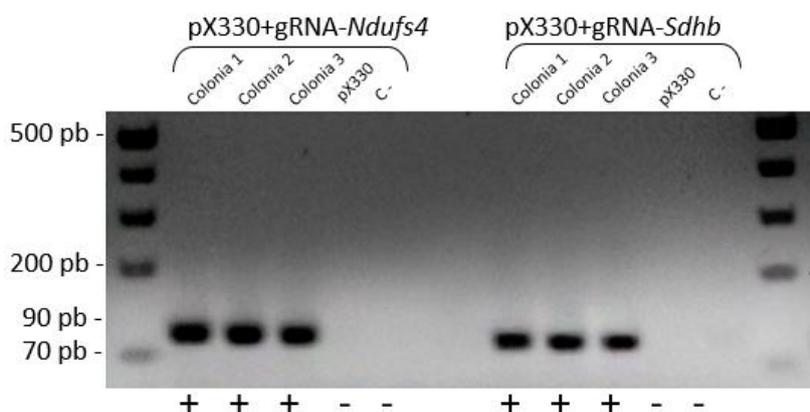


Figura 7: Resultados de la PCR de comprobación de los plásmidos pX330+gRNA.

Para ratificar que los plásmidos estaban correctamente ligados se secuenciaron (Secuenciación Sanger). El resultado de la secuenciación confirmó la secuencia esperada y que esta no presentaba mutaciones (Figura 8).

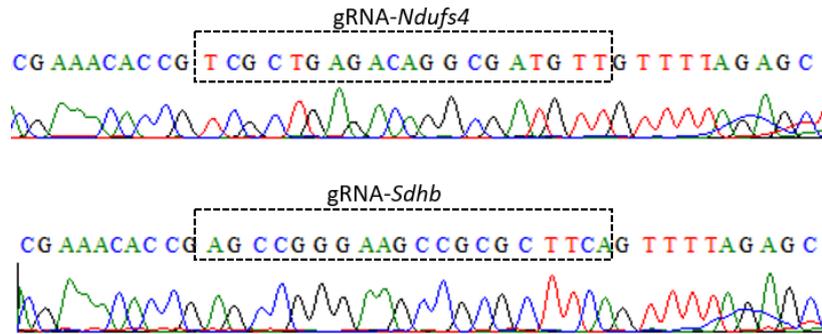


Figura 8: Resultados de la secuenciación del plásmido *pBsBlast+gRNA*.

1.2. *pBsBlast+gRNA*

Utilizando solo el sistema CRISPR/Cas se puede generar con relativa facilidad un KO de un gen determinado cuando se producen mutaciones en la DSB mediante la vía de reparación NHEJ. La desventaja de este sistema es que no permite realizar una selección de las células que han sufrido la mutación, ya que solo produce la pérdida de expresión del gen diana, haciendo complejo el aislamiento de clones KO del resto de células no editadas. Por ello se utilizó una variante del sistema CRISPR/Cas9 clásica llamada sistema de integración dirigida independiente de homología (HITI), como estrategia para generar la inserción del gen de resistencia a blasticidina interrumpiendo los genes diana, *Ndufs4* y *Sdhb*. De esta forma, la resistencia adquirida facilita la selección de las células transformadas.

Como se menciona en el apartado Materiales y métodos, para llevar a cabo la edición mediante el sistema HITI se necesitó un segundo plásmido con el gen de resistencia a la blasticidina flanqueado por la secuencia diana de gRNA, el cual se generó previamente mediante PCR. El fragmento, que servirá como inserto en la reparación de la DSB producida por la proteína Cas9, se generó mediante el uso de dos primers de 52 y 64 bp. Como se muestra en la figura 9, ambos hibridan en su extremo 3' con las regiones flanqueantes del cassette de resistencia a blasticidina. Las bases restantes de la secuencia de los primers corresponden a la secuencia diana de la gRNA (en uno de los casos del gen *Ndufs4* y en el otro *Sdhb*), el sitio de corte para las enzimas *Sall* o *BamHI*, y en los primers correspondiente al extremo 5' del cassette una región correspondiente a codones de terminación ubicados en distintos marcos de lectura.

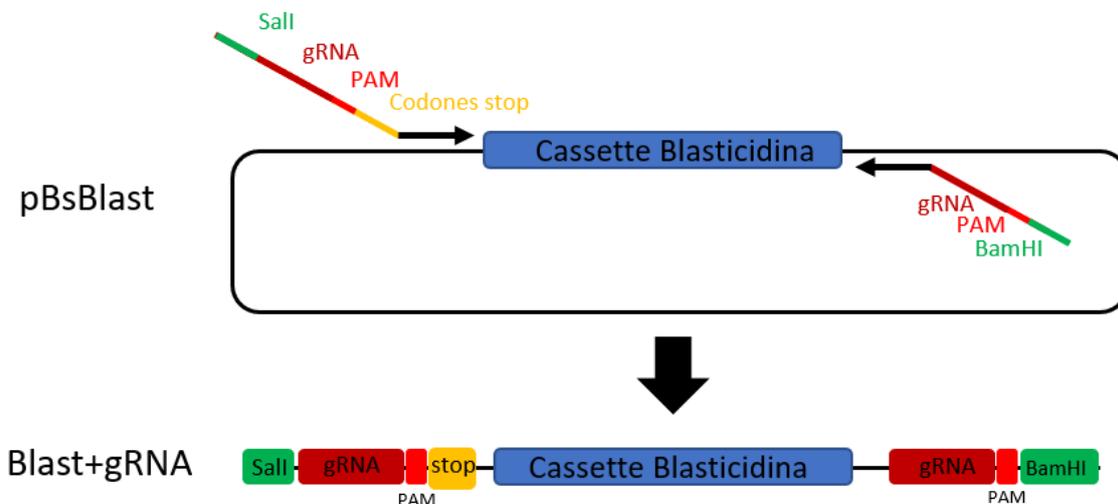


Figura 9: Esquema de PCR para la generación del cassette de blasticidina flanqueado por la secuencia diana.

Los productos de las diferentes PCRs se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 10). Se puede observar que se ha amplificado un único fragmento y que los productos resultantes presentan un tamaño adecuado de 1668 bp, correspondiente al cassette de blasticidina flanqueado por la secuencia de los primers.

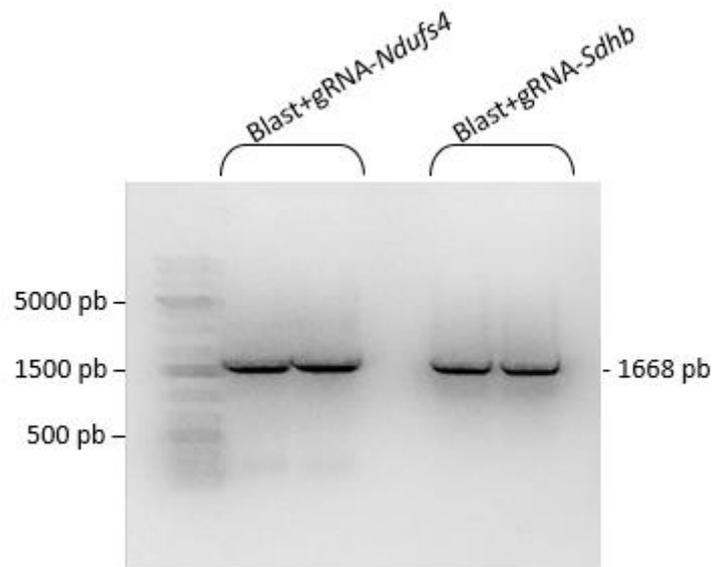


Figura 10: Resultados de la PCR para la generación del cassette de blasticidina flanqueado por la secuencia diana.

Una vez purificado el fragmento se procedió a ligarlo al vector y amplificarlo para obtener los plásmidos pBsBlast+gRNA correspondientes. Al igual que con el plásmido pX330+gRNA se seleccionaron las colonias positivas mediante comprobación por PCR. En este caso se utilizaron los primers utilizados previamente para obtener el fragmento ya que las bacterias que hubiesen incorporado solo el vector vacío no contendrían estas secuencias. El resultado obtenido tras la electroforesis en gel de agarosa muestra que todas las colonias seleccionadas contenían el plásmido recombinante de interés, observándose nuevamente la banda de 1668 bp correspondiente al cassette de blasticidina flanqueado por la secuencia de los primers (Figura 11).

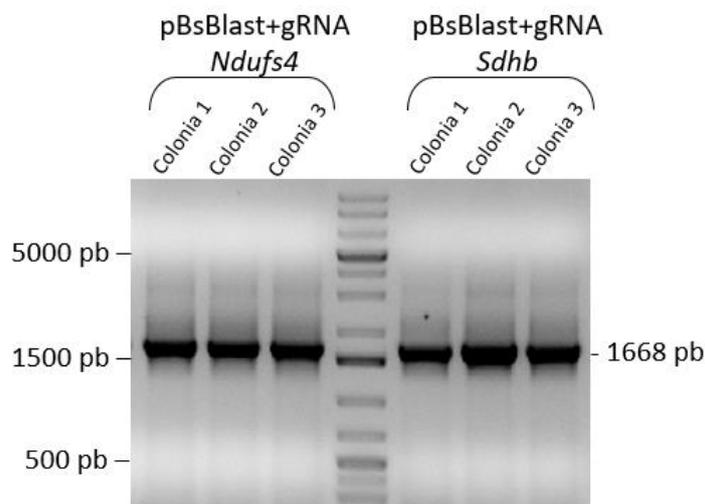


Figura 11: Resultados de la PCR de comprobación de los plásmidos pBsBlast+gRNA.

Después de purificar el plásmido, se corroboró por secuenciación Sanger la correcta incorporación de las secuencias dianas de Cas9/gRNA en los extremos del cassette de blasticidina. Como se observa en la figura 12, todos los extremos contienen la secuencia de gRNA y la secuencia PAM.

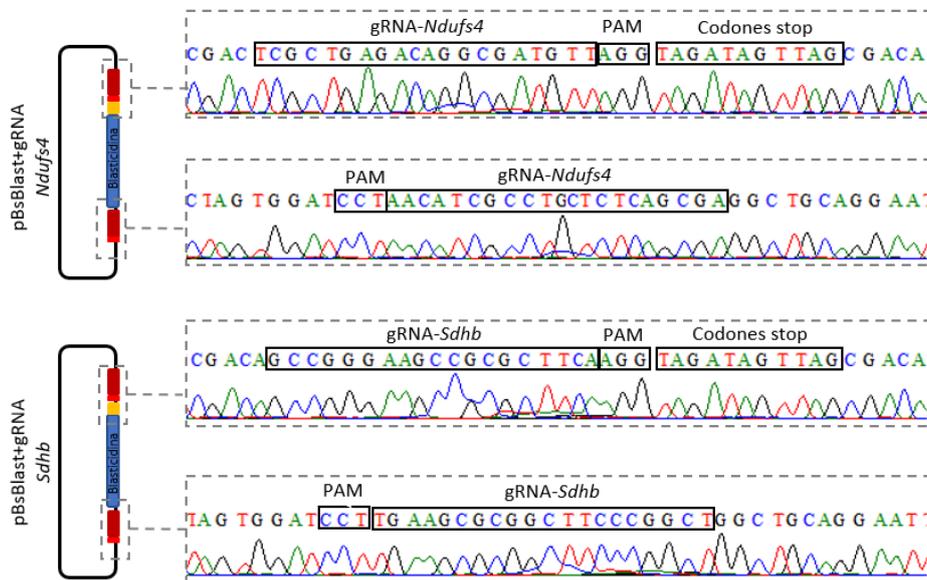


Figura 12: Resultados de la secuenciación del plásmido pBsBlast+gRNA.

2. Generación de células RAW 264.7 KO para *Ndufs4* y *Sdhb*

Una vez se obtuvieron los dos componentes del sistema CRISPR/Cas HITI, esto es, los plásmidos pBsBlast+gRNA y pX330+gRNA (Figura 13), se procedió a la cotransfección de ambos en las células RAW 264.7 mediante lipofección. Como se mencionó anteriormente las células que incorporaron el plásmido de selección se seleccionaron con blasticidina.

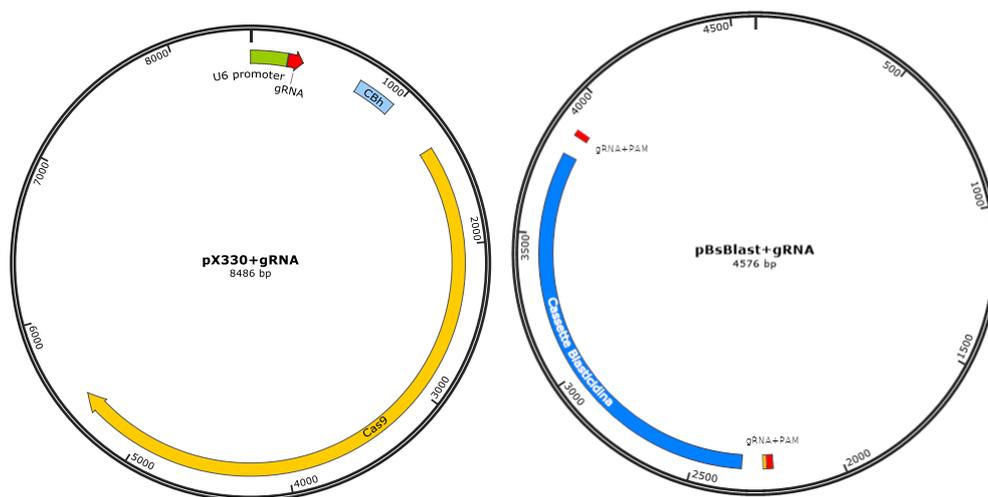


Figura 13: Esquema de los plásmidos pBsBlast+gRNA y pX330+gRNA utilizados en el sistema CRISPR/Cas9 HITI.

La concentración de blasticidina utilizada para la selección se determinó anteriormente mediante una curva de resistencia a diferentes concentraciones del antibiótico. Tras una observación diaria a través del microscopio se pudo concluir que la concentración

mínima de blasticidina para la muerte del 100% de las células al quinto día era 2 µg/mL, por lo que se decidió aplicar esta concentración tras la transfección.

Tras la transfección y realización de la dilución límite, se esperó alrededor de dos semanas y se seleccionaron aquellos pocillos en los cuales había crecimiento de una sola colonia celular (Figura 14). Estos clones se cultivaron hasta que las células estuvieron a una confluencia suficiente para llevar a cabo la extracción de DNA.



Figura 14: Fotografía de pocillos con crecimiento de una sola colonia celular.

Con el objetivo de comprobar si había tenido lugar la modificación génica en el locus de interés o, por el contrario, la inserción se había producido al azar, se seleccionaron un total de 46 clones para *Ndufs4* y 41 clones para *Sdhb* para su análisis mediante PCR.

En un primer análisis se estudió la incorporación de los insertos utilizando los primers específicos de las regiones genómicas cercanas a la secuencia diana. Esta pareja permite distinguir si se ha producido una inserción en el sitio de corte de la Cas9. En caso del gen *Ndufs4* sin modificar la distancia entre los primers es de 600 bp, mientras que, si se ha producido la inserción del cassette de blasticidina la distancia es de 2230 bp (Figura 15). En cuanto al gen *Sdhb* la distancia entre los primers en el gen WT es de 880 bp y de 2500 si se ha insertado el cassette de blasticidina (Figura 16).

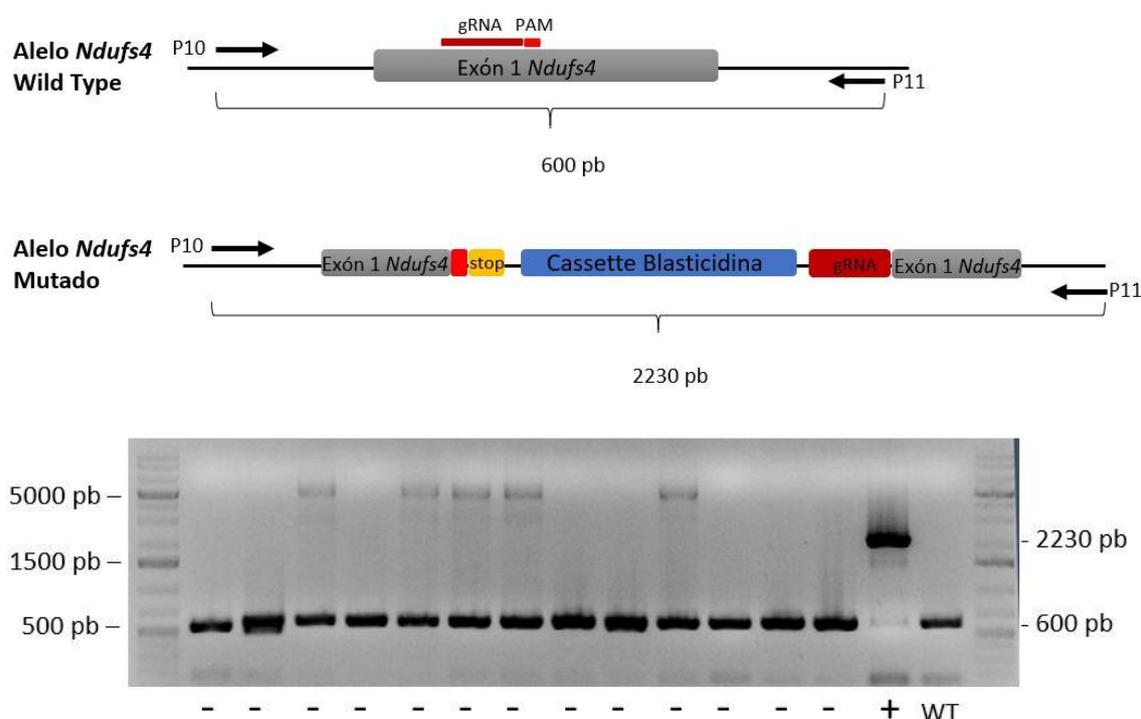


Figura 15: Esquema del locus del gen *Ndufs4* WT y modificado con el vector donante. Ubicación de los primers empleados en la PCR para análisis de clones y los tamaños correspondientes a las amplificaciones.

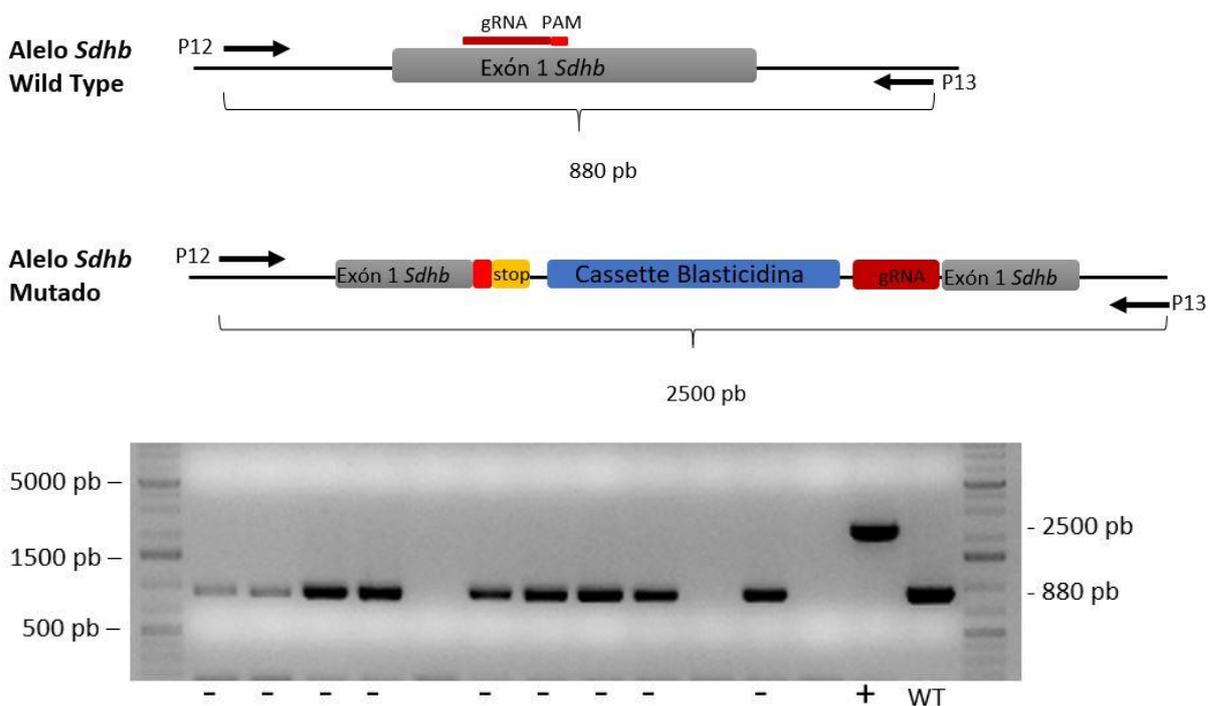


Figura 16: Esquema del locus del gen *Sdhb* WT y modificado con el vector donante. Ubicación de los primers empleados en la PCR para análisis de clones y los tamaños correspondientes a las amplificaciones.

Tras observar los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa se encontró que, para cada gen, uno de los clones tenía el perfil de banda de un KO (Figuras 15 y 16).

Cabe destacar que la edición del gen puede tener lugar tanto en un solo alelo (mutación heterocigota) como en los dos (mutación homocigota). Con las condiciones utilizadas para realizar la PCR la banda de mayor peso, correspondiente al gen con el inserto, en células heterocigotas no aparece. Esto se debe a que la secuencia no llega a amplificarse, teniendo preferencia la amplificación de las secuencias más pequeñas. De este modo, el método permite distinguir solo entre células WT y células con la mutación homocigota. Por lo que se corroboró la presencia de heterocigotos mediante una PCR con 3 primers. Se utilizó en este caso la pareja de primer mencionados en la PCR anterior y, además, un tercer primer específico del cassette de blasticidina (P 14).

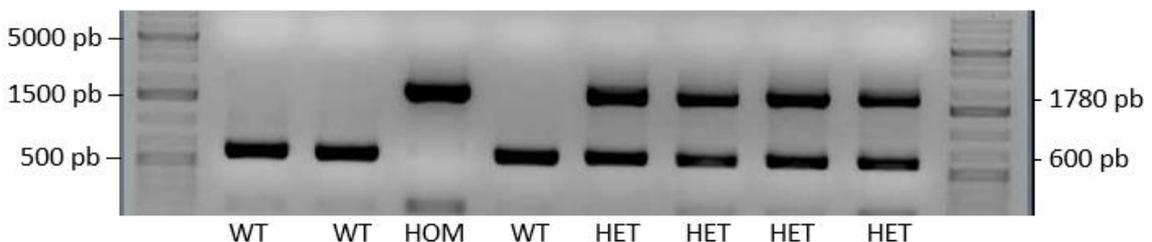


Figura 17: Resultados de la PCR para el análisis de clones heterocigotos.

Al analizar los resultados de la PCR se pueden observar los tres tipos de genotipos esperados, es decir: WT, heterocigotos y homocigotos (Figura 17). Al igual que en el caso anterior las células que no hayan sufrido edición génica en el gen diana solo presentarán una banda de menor tamaño correspondiente al producto de los primers genómicos. En el caso de células heterocigotas se observa esta misma,

correspondiente al producto del alelo WT, y también una segunda banda correspondiente al producto entre el nuevo primer, hibridando en el cassette de blasticidina, y el primer genómico que le corresponde. En las células que han sufrido la edición en los dos alelos la banda inferior no se observa. Si bien el objetivo principal de este trabajo fue obtener solo líneas KO, este método permite diferenciar entre los tres genotipos y demuestra la alta eficiencia de edición del sistema, siendo el porcentaje de clones heterocigotos obtenidos para *Ndufs4* de 17% y para *Sdhb* de 58% respecto a los clones analizados.

Una vez seleccionados los dos clones con el perfil de genotipo KO para cada molécula, para corroborar que el inserto estaba interrumpiendo el gen y también dilucidar su orientación se realizó una nueva PCR utilizando diferentes combinaciones de primers entre dos correspondientes al gen de interés y dos correspondientes al cassette de blasticidina (P14 y P15). Como se esquematiza en las figuras 18 y 19, la presencia de producto de PCR con distintas combinaciones de primers depende de la orientación con la que se haya integrado el inserto.

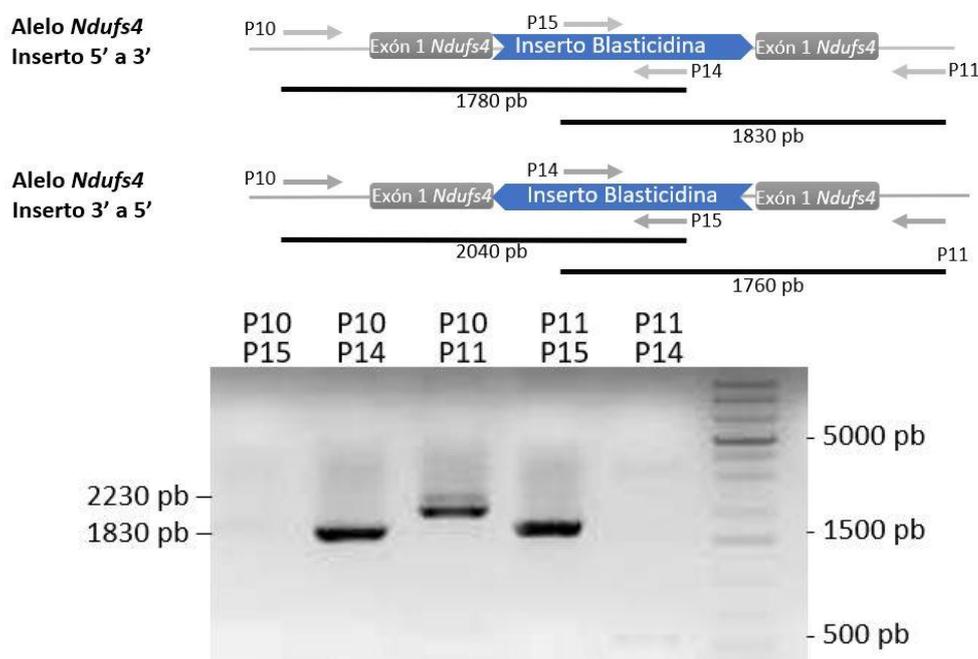


Figura 18: Esquema del locus del gen *Ndufs4* modificado con el vector donante. Ubicación de los primers empleados en la PCR y los tamaños correspondientes a las amplificaciones.

En el caso del gen *Nfus4* podemos ver que la PCR fue positiva en las dos combinaciones de primers en las que se espera producto si el inserto se ha integrado en sentido 5' a 3' (P10-P14 y P11-P15), y no en las que el inserto se encuentra en 3' a 5', es decir, la dirección opuesta (P10-P15 y P11-P14) (Figura18). Esto indicaría que ambos alelos del clon han incorporado el cassette de blasticidina el mismo sentido. Además, se corrobora la banda de 2230 bp que corresponde a los primers complementarios al genoma (P10 y P11) mencionada anteriormente.

Cuando se analiza el gen *Sdhb* (Figura 19), en el clon correspondiente, podemos observar que en esta ocasión solo en una de las combinaciones se encontró producto esperado (P13-P14), además de la pareja de primers del genoma en donde se observa la banda de 2500 bp correspondiente (P12-P13). Esto hace suponer que nuevamente el inserto se incorporó en una misma dirección en los dos alelos, en este caso de 3' a 5', si bien era esperable que dada esta orientación la pareja de primers P12-P15 también hubiera amplificado. Estos supuestos están pendientes de confirmación mediante la secuenciación de los loci correspondientes.

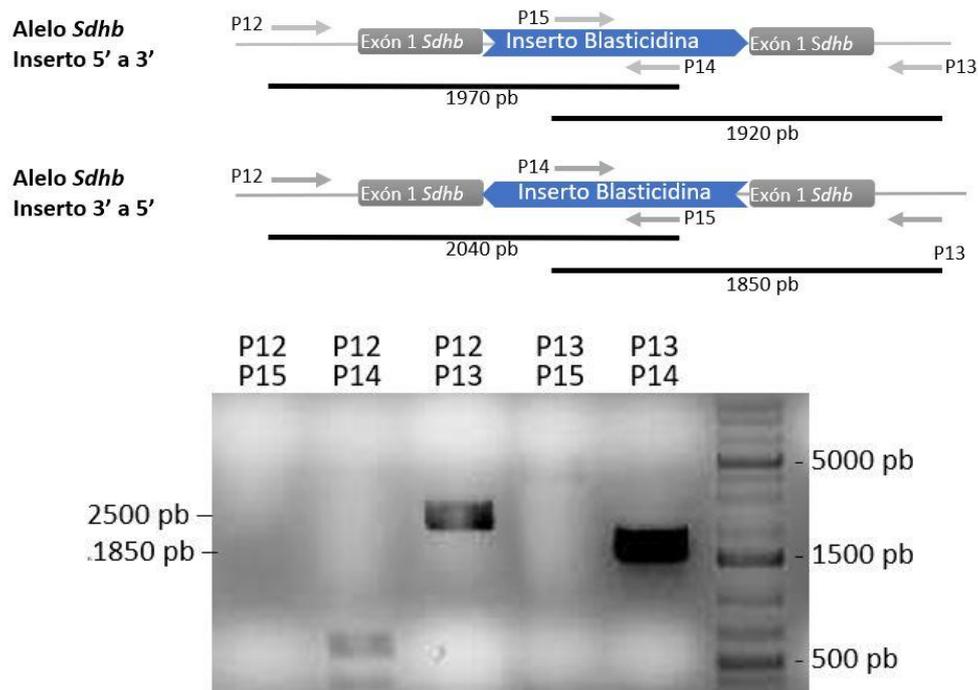


Figura 19: Esquema del locus del gen *Sdhb* modificado con el vector donante. Ubicación de los primers empleados en la PCR y los tamaños correspondientes a las amplificaciones.

También se realizó un ensayo mediante qPCR para determinar la expresión relativa de mRNA de los genes en los clones homocigotos seleccionados. La expresión de cada gen se comparó con la expresión en la línea celular WT y en un clon heterocigoto, utilizando el gen de β -actina como normalizador. El método de cuantificación utilizado fue $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

En la figura 20 se observa que la expresión de *Ndufs4* en el clon seleccionado fue prácticamente nula en comparación a las células WT (73299 veces menor), mientras que para *Sdhb* se observó una disminución de la expresión de aproximadamente el 92% en el clon seleccionado respecto al WT. Como era de esperar, ya que poseen solo uno de los alelos modificado, los clones heterocigotos presentan un nivel de expresión intermedio entre el WT y el KO.

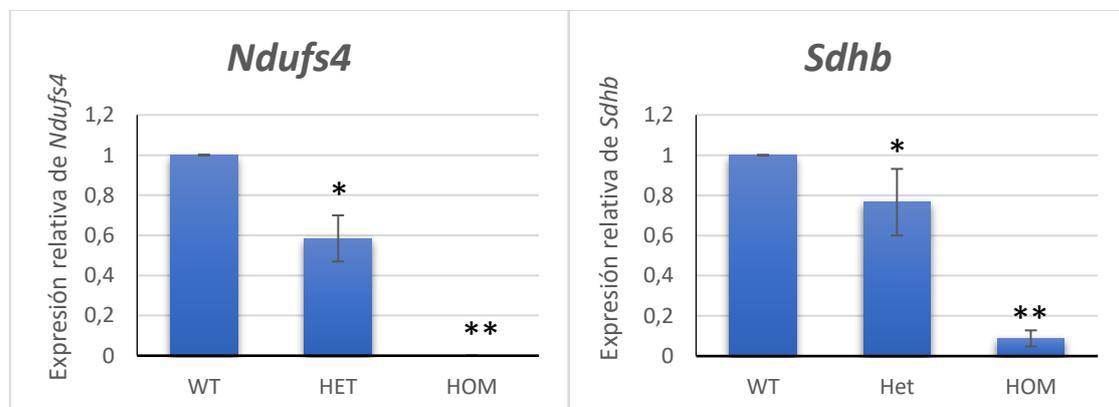


Figura 20: Expresión relativa de *Ndufs4* y *Sdhb* obtenida mediante qPCR en clones seleccionados. Los asteriscos indican diferencias significativas comparando entre líneas celulares.

3. Perfil de citoquinas frente a bacterias en las células KO

Una vez comprobado que los clones seleccionados eran KO para los genes *Ndufs4* y *Sdhb*, se evaluó el perfil de citoquinas frente a un estímulo con bacterias *E. coli* inactivadas por calor. Para ello se determinaron los niveles de expresión relativos de mRNA de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α y IL-1 β y la citoquina anti-inflamatoria IL-10 mediante qPCR y la cantidad de proteínas correspondientes secretadas al medio de cultivo celular mediante ELISA.

3.1 Niveles relativos de expresión de citoquinas mediante qPCR

El nivel de expresión relativo de citoquinas se determinó en las líneas celulares a diferentes tiempos tras su estimulación con bacterias, utilizando el método de cuantificación $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La expresión de cada gen en las diferentes muestras se refirió a la de las células WT a tiempo cero. Como gen normalizador se utilizó el gen de β -actina.

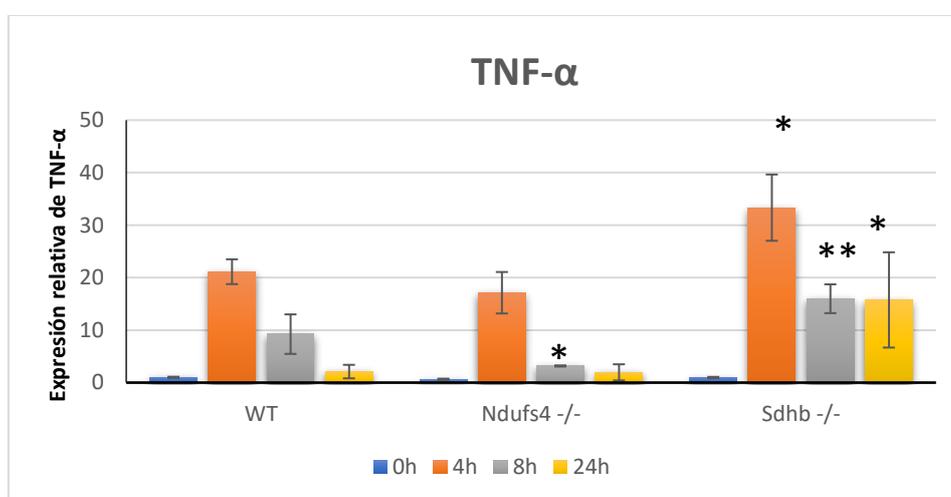


Figura 21: Expresión relativa de TNF- α obtenida mediante qPCR. El asterisco indica diferencias significativas comparando entre líneas celulares a igual tiempo.

La cinética en los niveles del mRNA de TNF- α en líneas generales se comportó de manera similar en los tres tipos de células, un aumento pronunciado en las primeras 4 horas y luego una disminución de esta (Figura 21). En la línea WT y el clon KO para *Ndufs4* el nivel de expresión es similar disminuyendo casi a niveles basales a las 24 horas. Esto no ocurre en caso de clon KO para *Sdhb*, en el cual a las 4 horas los niveles de mRNA son 1.57 veces mayor que el WT y su decaimiento fue más gradual, permaneciendo a las 24 horas una expresión 10 veces mayor que en las otras líneas celulares.

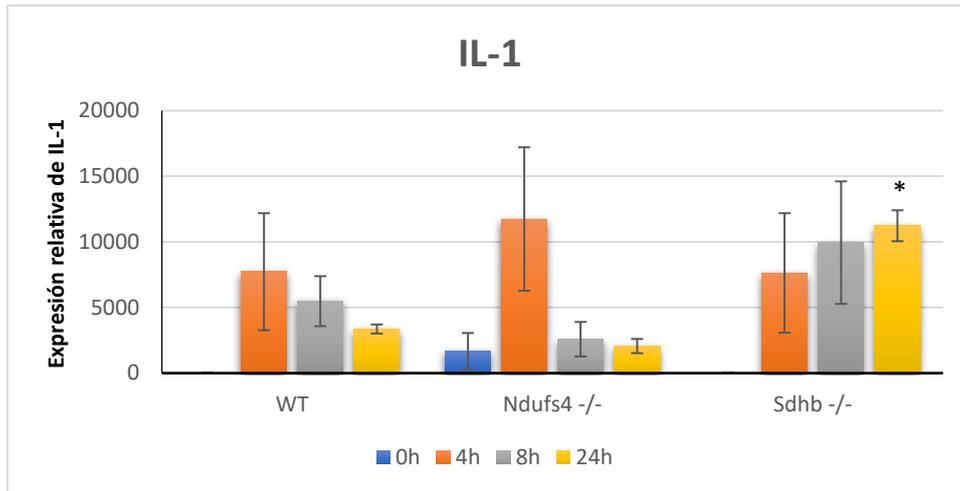


Figura 22: Expresión relativa de IL-1 β obtenida mediante qPCR. El asterisco indica diferencias significativas comparando entre líneas celulares a igual tiempo.

En la figura 22 se puede observar que tras la estimulación con bacterias, a las 4 horas ya se produce un aumento en la expresión de esta citoquina en las tres líneas sin diferencias y luego disminuye en los siguientes tiempos, salvo en el clon KO para *Sdhd* que aumenta significativamente

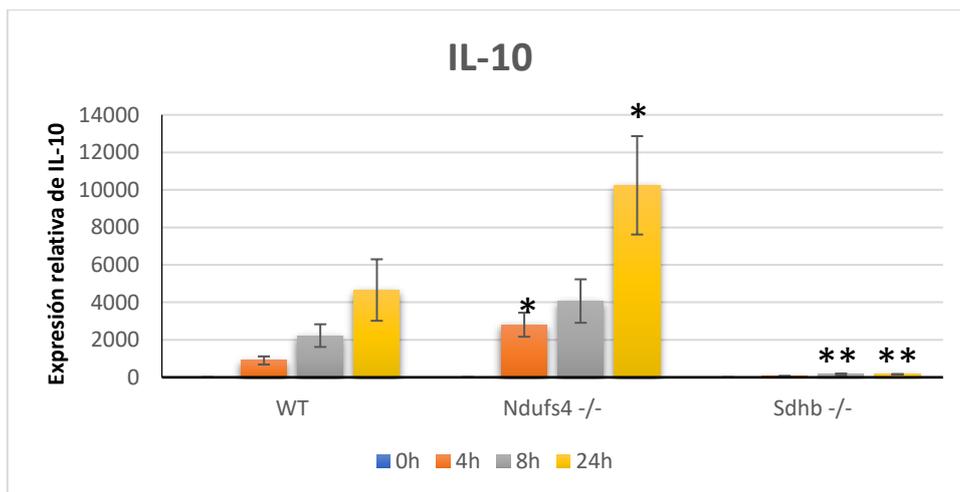


Figura 23: Expresión relativa de IL-10 obtenida mediante qPCR. El asterisco indica diferencias significativas comparando entre líneas celulares a igual tiempo.

Se observa en la figura 23 que a tiempo cero la expresión de los niveles de mRNA de IL-10 transcrito son equivalentes en las tres líneas. Luego de la estimulación con bacterias las líneas WT y el clon KO para *Ndufs4* siguen una cinética similar, exhibiendo una tendencia creciente de expresión a lo largo del tiempo. Sin embargo, la línea KO para *Ndufs4* aumenta con mayor intensidad siendo significativa la diferencia con el WT a las 4 horas (de 3 veces) y a las 24 horas (de 2,5 veces). El clon KO para *Sdhd* muestra un déficit drástico para la inducción del transcrito de IL-10.

3.2 Cuantificación de la secreción de citoquinas

Los niveles de citoquinas también se determinaron midiendo las proteínas correspondientes secretadas en el medio de cultivo mediante ELISA a las 8 y 24 horas tras la estimulación con bacterias inactivadas.

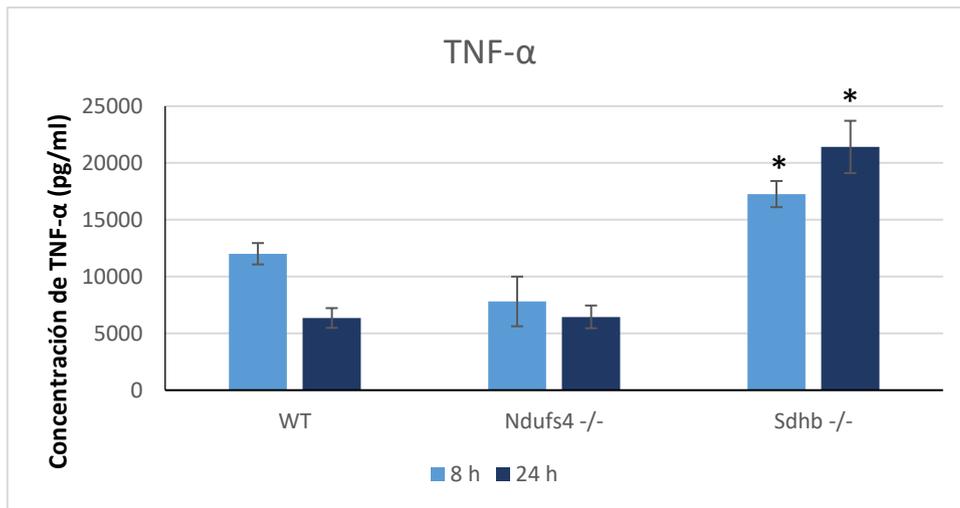


Figura 24: Niveles de proteína TNF- α en medio de cultivo detectada por ELISA. El asterisco indica diferencias significativas comparando entre líneas celulares a igual tiempo.

Como se muestra en la figura 24, a las 8 horas tras la estimulación no existen diferencias significativas de TNF- α en células KO para CI respecto a las WT, pero se detecta un aumento de la citoquina estadísticamente significativo en las células KO para CII siendo la concentración 1.43 veces mayor que en el control. La diferencia significativa entre las líneas celulares se mantiene a las 24 horas, en este caso siendo la concentración 3 veces mayor en el clon KO para CII respecto a la línea WT.

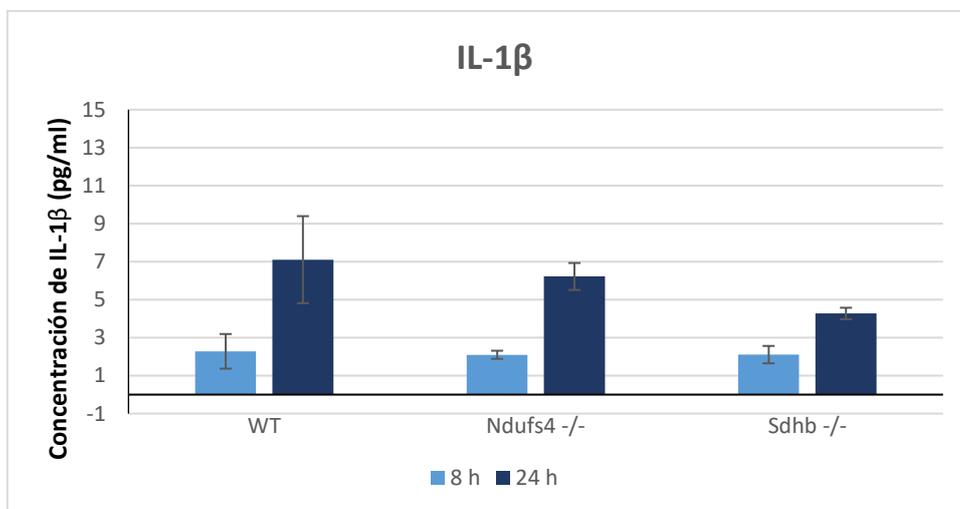


Figura 25: Niveles de proteína IL-1 β en medio de cultivo detectada por ELISA. El asterisco indica diferencias significativas comparando entre líneas celulares a igual tiempo.

La secreción de citoquina IL-1 β fue prácticamente indetectable a 8 horas tras la activación de los macrófagos en las tres líneas celulares, siendo la concentración mínima detectable con el kit 5 pg/ml. A las 24 horas se observa un leve aumento en los tres casos, sin haber diferencias significativas entre ellos (Figura 25).

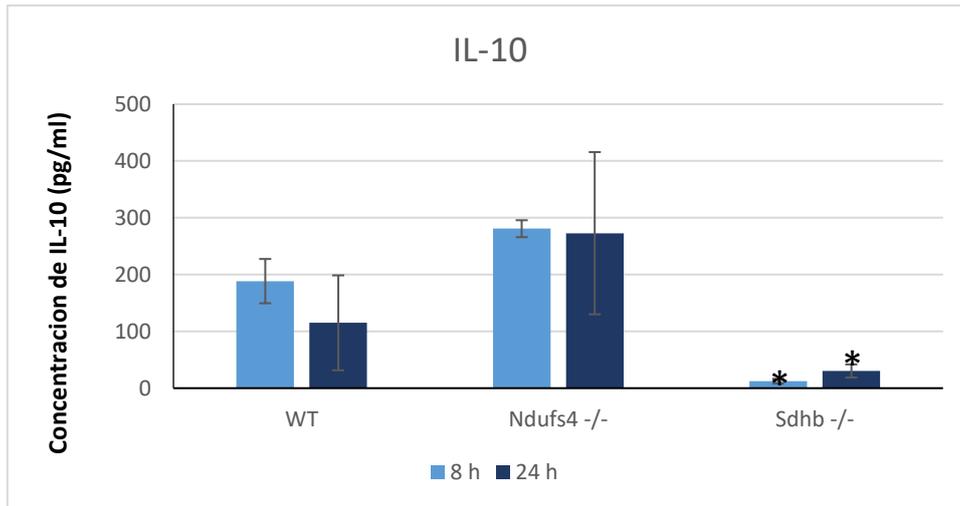


Figura 26: Niveles de proteína IL-10 en medio de cultivo detectada por ELISA. El asterisco indica diferencias significativas comparando entre líneas celulares a igual tiempo.

Las concentraciones de proteína IL-10 encontrados en medio de cultivo fueron mayores para el clon KO de CI respecto a la línea WT a ambos tiempos, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Por otra parte, la cantidad de proteína detectada en los sobrenadantes del clon KO para CII fue inferior al límite de detección del kit (45 pg/ml) tanto a 8 y 24 horas (Figura 26). Lo que corresponde con los niveles prácticamente indetectables de mRNA de IL-10.

DISCUSIÓN

Generación de modelos celulares

Existe cada vez mayor evidencia de la relación entre el metabolismo y la respuesta inmune, y de cómo la mitocondria, más específicamente los complejos de la CTE tienen un papel clave en la regulación de dicha respuesta[19]. Sin embargo, en los estudios descritos hasta la fecha, principalmente centrados en el CI, se han utilizado diferentes métodos y sistemas que hacen difícil la interpretación de los resultados [11], [20], [21], [24]. Por ello, en este trabajo se buscó desarrollar nuevas líneas celulares KO, para genes relevantes de cada complejo, que permitan el estudio de su función en un mismo modelo celular y así esclarecer su papel en la respuesta inmune. Esto implicaría un gran avance y acercamiento a la aplicación médica, ya que las enfermedades que afectan al sistema inmune siguen presentando complicaciones en su tratamiento.

En este trabajo se utilizó, como modelo para generar líneas celulares deficientes de los distintos complejos mitocondriales, la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7, ampliamente utilizada en estudios sobre la respuesta inmune innata. Aunque la idea es obtener modelos para los cuatro complejos de la CTE, por cuestiones de tiempo, me he centrado en la edición de los genes *Ndufs4* y *Sdhb*, que codifican para subunidades esenciales de los complejos I y II, respectivamente.

La edición génica dirigida es una valiosa herramienta para el estudio de los genes y su función. Una de las técnicas más habituales para ello es la interrupción de la expresión del gen de estudio y el posterior análisis del efecto que su ausencia tiene en la célula. El sistema CRISPR/Cas9 proporciona una gran ventaja para la edición génica dirigida, ya que se basa en el uso de pequeños fragmentos de RNA para guiar la escisión de DNA en la diana deseada, haciendo que su diseño sea más rápido y barato. El método utilizado para llevar a cabo la edición génica en este trabajo fue el de CRISPR/Cas9 HITI, una variante del método clásico recientemente publicada por Suzuki [49]. Este método utiliza el sistema CRISPR/Cas9 para generar una DSB en el gen diana y también en un vector donante. Los extremos romos generados pueden repararse entonces por la vía NHEJ y producirse la incorporación de un inserto donante interrumpiendo el gen diana. En este caso el vector llevaba como inserto donante un gen de resistencia a un antibiótico, que permite la posterior selección de las células editadas, lo que representa una ventaja sobre el sistema CRISPR/Cas9 original.

Normalmente, tras la transfección de las células deben llevarse a cabo diferentes procedimientos en etapas sucesivas hasta obtener células editadas homocigotas monoclonales. Primero se debe distribuir y cultivar las células para encontrar aquellos cultivos en donde hay presencia de células editadas. Después, es necesario hacer dilución límite de estos cultivos para aislar los clones deseados. En este trabajo, debido a la alta eficiencia del método, se optó por realizar inmediatamente después de la transfección una dilución límite directamente del cultivo y así simplificar el proceso, con lo cual se pudieron obtener y analizar directamente células monoclonales. También hay que destacar que la elevada tasa de edición del método permitió encontrar clones con mutación homocigota en una misma transfección, evitando tener que repetir el proceso con células heterocigotas. Para demostrar que había ocurrido esta inserción específica se hicieron distintas PCRs. Los productos de las PCRs permitieron, además de confirmar la presencia del inserto, demostrar su orientación. Aunque los resultados aún deben ser confirmados por secuenciación.

La interrupción de los genes también se comprobó mediante qPCR, cuantificando la expresión del mRNA específico de cada gen en las dos líneas KO en comparación con las respectivas líneas heterocigotas y las células WT control. Los resultados

demonstraron que en la línea KO del complejo I la expresión del mRNA de *Ndufs4* fue prácticamente nula en comparación con el WT; y la expresión de *Sdhb* en la línea KO del complejo II fue solo de un 8% respecto al WT. Esta pequeña expresión puede deberse a restos de mRNA mutado. Normalmente una mutación que anula un gen da lugar a la aparición de un codón de parada prematuro que lleva a la “degradación del mRNA mediada por mutaciones terminadoras”, más conocida por sus siglas en inglés NMD (Nonsense Mediated Decay), pero podría ocurrir que se generen pequeñas cantidades de mRNA que se pueden detectar por qPCR. Como era de esperar las líneas heterocigotas presentan un nivel de expresión intermedio ya que presentan solo un alelo WT.

Impacto de los complejos mitocondriales en el perfil de citoquinas

Las nuevas líneas celulares, deficientes en subunidades claves para los complejos I y II, se utilizaron para ensayar su perfil de citoquinas en respuesta a un estímulo con bacterias Gram negativas inactivadas. Para ello, se determinaron los niveles de expresión de mRNA por qPCR y de proteína utilizando ELISA tanto de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β como de la anti-inflamatoria IL-10.

Los niveles de expresión relativa de mRNA y de proteína fueron concordantes entre sí, excepto en el caso de la determinación por ELISA de IL-1 β el cual no reflejó los cambios observados en los niveles de mRNA, posiblemente debido a las condiciones del ensayo. Nuestros datos mostraron que el clon deficiente de CI adquiere un fenotipo anti-inflamatorio, aumentando la secreción de IL-10 respecto al WT después de su activación con bacterias. Por el contrario, el clon deficiente de CII presenta un fenotipo claramente pro-inflamatorio propio de macrófagos M1. En esta línea, los niveles de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β son significativamente mayores que en el WT. En contraste, la citoquina antiinflamatoria IL-10 presenta una drástica disminución, siendo su expresión prácticamente nula a pesar del gran incremento observado en las otras líneas celulares.

Z. Jin describe que los macrófagos de ratones KO para CI presentan un fenotipo pro-inflamatorio, contrario a lo observado en nuestro clon KO para CI, donde nosotros demostramos aumento de la secreción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 [20]. nuestros datos concuerdan, sin embargo, con los resultados observados por B. Kelly cuando inhibe farmacológicamente este complejo [21]. Ambos autores describen variaciones en la expresión de IL-1 β ; no obstante, nosotros no vemos cambios significativos para esta citoquina en nuestro trabajo.

Por otra parte, D. Sancho y J. Garaude proponen que CII es necesario para la generación de citoquinas pro-inflamatorias y que la inhibición química de este complejo provoca un aumento de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 y una disminución de TNF- α e IL-1 β [11], [19]. Mientras que en nuestro caso el clon KO de CII tiene un marcado perfil pro-inflamatorio con un aumento significativo de TNF- α y una casi total inhibición en la secreción de IL-10.

Es bien conocido que la disrupción del CII está asociada a un aumento en los niveles de succinato en la célula [20], [53], [54]. Otros autores han demostrado que el succinato es un metabolito pro-inflamatorio que se acumula durante la activación de macrófagos, y cuyos altos niveles afectan la actividad de HIF-1 α , un factor de transcripción clave en la expresión de genes pro-inflamatorios [13]. Estudios en macrófagos pretratados con succinato y estimulados con LPS demostraron que el succinato inhibió la inducción de las citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 en respuesta a LPS; y por otra parte también se observó un aumento de IL-1 β [55]. Estos resultados sugieren que el succinato actúa dentro de la célula para potenciar y mantener la expresión génica pro-inflamatoria mientras que al mismo tiempo inhibe la

expresión génica anti-inflamatoria. Estos estudios respaldarían el genotipo KO de nuestro clon, explicando los niveles de IL-10 observados.

La variabilidad encontrada entre los distintos trabajos demuestra la necesidad de seguir estudiando la función de los complejos en la respuesta inmune en modelos celulares que permitan comparar los resultados y esclarecer los mecanismos involucrados. Siendo necesario para ello, contar con un mayor número de clones KO que posibiliten excluir errores debidos a un posible efecto clonal.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir:

- Se han construido con éxito los plásmidos necesarios para la edición de los genes *Ndufs4* y *Sdhb* mediante el sistema CRISPR/Cas9 HITI.
- El sistema CRISPR/Cas9 HITI ha demostrado ser un método de alta eficiencia para la edición génica dirigida en células RAW 264.7.
- Se han generado líneas macrofágicas RAW 264.7 deficientes en las subunidades claves en las actividades de los complejos I (*Ndufs4*) y II (*SdhB*).
- Las líneas macrofágicas RAW 264.7 generadas *Ndufs4*^{-/-} y *Sdhb*^{-/-} muestran un perfil alterado de citoquinas pro y anti-inflamatorias.
- El déficit en el complejo CII promueve un fenotipo pro-inflamatorio y es llamativa la casi total ausencia de expresión de IL-10 tras la estimulación con bacterias.

REFERENCIAS

- [1] J. M. Shoffner, "Maternal inheritance and the evaluation of oxidative phosphorylation diseases," *Lancet*, vol. 348, no. 9037, pp. 1283–1288, Nov. 1996.
- [2] F. Vedel, É. Lalanne, M. Sabar, P. Chétrit, and R. De Paepe, "The mitochondrial respiratory chain and ATP synthase complexes: Composition, structure and mutational studies," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 37, no. 9, pp. 629–643, Sep. 1999.
- [3] C. Hagerhall, "Succinate: quinone oxidoreductases Variations on a conserved theme," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1320, pp. 107–141, 1997.
- [4] C. Bardella, P. J. Pollard, and I. Tomlinson, "SDH mutations in cancer," 2011.
- [5] F. Sun *et al.*, "Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II," *Cell*, vol. 121, no. 7, pp. 1043–1057, Jul. 2005.
- [6] K. M. Robinson, R. A. Rothery, J. H. Weiner, and B. D. Lemire, "The covalent attachment of FAD to the flavoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase is not necessary for import and assembly into mitochondria.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 222, no. 3, pp. 983–90, Jun. 1994.
- [7] R. Vartak, C. A.-M. Porras, and Y. Bai, "Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly," *Protein Cell*, vol. 4, no. 8, pp. 582–590, Aug. 2013.
- [8] N. S. Chandel, "Evolution of Mitochondria as Signaling Organelles," *Cell Metab.*, vol. 22, no. 2, pp. 204–206, Aug. 2015.
- [9] G. S. Shadel and T. L. Horvath, "Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis," *Cell*, vol. 163, no. 3, pp. 560–569, Oct. 2015.
- [10] P. M. Quirós, A. Mottis, and J. Auwerx, "Mitonuclear communication in homeostasis and stress," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 17, no. 4, pp. 213–226, Apr. 2016.
- [11] J. Garaude *et al.*, "Mitochondrial respiratory-chain adaptations in macrophages contribute to antibacterial host defense," *Nat. Immunol.*, vol. 17, no. 9, pp. 1037–1045, 2016.
- [12] L. A. J. O'Neill and E. J. Pearce, "Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function," *J. Exp. Med.*, 2016.
- [13] G. Tannahill *et al.*, "Succinate is a danger signal that induces IL-1 β via HIF-1 α ." [14] C. Shi and E. G. Pamer, "Monocyte recruitment during infection and inflammation," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 11, pp. 762–774, Nov. 2011.
- [15] T. A. Wynn, A. Chawla, and J. W. Pollard, "Macrophage biology in development, homeostasis and disease," *Nature*, vol. 496, no. 7446, pp. 445–455, Apr. 2013.
- [16] P. Newsholme, R. Curi, S. Gordon, and E. A. Newsholme, "Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages.," *Biochem. J.*, vol. 239, no. 1, pp. 121–5, Oct. 1986.
- [17] R. J. W. Arts *et al.*, "Glutaminolysis and Fumarate Accumulation Integrate Immunometabolic and Epigenetic Programs in Trained Immunity," *Cell Metab.*, vol. 24, no. 6, pp. 807–819, Dec. 2016.
- [18] B. Everts *et al.*, "Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells," *Blood*, vol. 120, no. 7, pp. 1422–1431, Aug. 2012.
- [19] D. Sancho, M. Enamorado, and J. Garaude, "Innate immune function of mitochondrial metabolism," *Frontiers in Immunology*, vol. 8, no. MAY, 2017.
- [20] Z. Jin, W. Wei, M. Yang, Y. Du, and Y. Wan, "Mitochondrial complex I activity suppresses inflammation and enhances bone resorption by shifting macrophage-osteoclast polarization.," *Cell Metab.*, vol. 20, no. 3, pp. 483–98, Sep. 2014.
- [21] B. Kelly, G. M. Tannahill, M. P. Murphy, and L. A. J. O'Neill, "Metformin Inhibits the Production of Reactive Oxygen Species from NADH:Ubiquinone Oxidoreductase to Limit Induction of Interleukin-1 β (IL-1 β) and Boosts Interleukin-10 (IL-10) in Lipopolysaccharide (LPS)-activated Macrophages," *J.*

- Biol. Chem.*, vol. 290, no. 33, pp. 20348–20359, Aug. 2015.
- [22] E. Mills and L. A. J. O'Neill, "Succinate: a metabolic signal in inflammation," *Trends Cell Biol.*, vol. 24, no. 5, pp. 313–320, May 2014.
- [23] S. Koene, P. H. G. M. Willems, P. Roestenberg, W. J. H. Koopman, and J. A. M. Smeitink, "Mouse models for nuclear DNA-encoded mitochondrial complex I deficiency," *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 34, no. 2, pp. 293–307, Apr. 2011.
- [24] M. Mimaki, X. Wang, M. McKenzie, D. R. Thorburn, and M. T. Ryan, "Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1817, no. 6, pp. 851–862, Jun. 2012.
- [25] S. E. Kruse, W. C. Watt, D. J. Marcinek, R. P. Kapur, K. A. Schenkman, and R. D. Palmiter, "Mice with Mitochondrial Complex I Deficiency Develop a Fatal Encephalomyopathy," *Cell Metab.*, vol. 7, no. 4, pp. 312–320, Apr. 2008.
- [26] C. A. Ingraham *et al.*, "NDUFS4: Creation of a mouse model mimicking a Complex I disorder," *Mitochondrion*, vol. 9, no. 3, pp. 204–210, Jun. 2009.
- [27] S. Papa, A. M. Sardanelli, T. Cocco, F. Speranza, S. C. Scacco, and Z. Technikova-Dobrova, "The nuclear-encoded 18 kDa (IP) AQDQ subunit of bovine heart complex I is phosphorylated by the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase.," *FEBS Lett.*, vol. 379, no. 3, pp. 299–301, Feb. 1996.
- [28] S. Scacco *et al.*, "Pathological Mutations of the Human *NDUFS4* Gene of the 18-kDa (AQDQ) Subunit of Complex I Affect the Expression of the Protein and the Assembly and Function of the Complex," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 45, pp. 44161–44167, Nov. 2003.
- [29] P. Gopie, L. Mei, A. C. Faber, S. R. Grossman, S. C. Smith, and S. A. Boikos, "Classification of gastrointestinal stromal tumor syndromes," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 25, no. 2, pp. R49–R58, 2018.
- [30] B. Parfait, D. Chretien, A. Rötig, C. Marsac, A. Munnich, and P. Rustin, "Compound heterozygous mutations in the flavoprotein gene of the respiratory chain complex II in a patient with Leigh syndrome," *Hum. Genet.*, vol. 106, no. 2, pp. 236–243.
- [31] J. Rutter, D. R. Winge, and J. D. Schiffman, "Succinate Dehydrogenase—Assembly, Regulation and Role in Human Disease."
- [32] Y. Zhu *et al.*, "Loss of SDHB reprograms energy metabolisms and inhibits high fat diet induced metabolic syndromes," *bioRxiv*, no. 38, p. 259226, 2018.
- [33] D. A. Jackson, R. H. Symons, and P. Berg, "Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli.*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 69, no. 10, pp. 2904–9, Oct. 1972.
- [34] N. M. Jensen *et al.*, "An update on targeted gene repair in mammalian cells: methods and mechanisms," *J. Biomed. Sci.*, vol. 18, no. 1, p. 10, Feb. 2011.
- [35] F. D. Urnov, E. J. Rebar, M. C. Holmes, H. S. Zhang, and P. D. Gregory, "Genome editing with engineered zinc finger nucleases," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 11, no. 9, pp. 636–646, Sep. 2010.
- [36] A. M. Scharenberg, P. Duchateau, and J. Smith, "Genome engineering with TAL-effector nucleases and alternative modular nuclease technologies.," *Curr. Gene Ther.*, vol. 13, no. 4, pp. 291–303, Aug. 2013.
- [37] P. D. Hsu, E. S. Lander, and F. Zhang, "Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering," *Cell*, vol. 157, no. 6, pp. 1262–1278, Jun. 2014.
- [38] R. Jansen, J. D. A. van Embden, W. Gastra, and L. M. Schouls, "Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.," *Mol. Microbiol.*, vol. 43, no. 6, pp. 1565–75, Mar. 2002.
- [39] D. Bhaya, M. Davison, and R. Barrangou, "CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 45, no. 1, pp. 273–297, Dec. 2011.

- [40] S. Al-Attar, E. R. Westra, J. van der Oost, and S. J. J. Brouns, "Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes.," *Biol. Chem.*, vol. 392, no. 4, pp. 277–89, Apr. 2011.
- [41] B. Wiedenheft, S. H. Sternberg, and J. A. Doudna, "RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea," *Nature*, vol. 482, no. 7385, pp. 331–338, Feb. 2012.
- [42] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier, "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity," *Science (80-.)*, vol. 337, no. 6096, pp. 816–821, Aug. 2012.
- [43] H. Nishimasu *et al.*, "Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA," *Cell*, vol. 156, no. 5, pp. 935–949, Feb. 2014.
- [44] J. E. Garneau *et al.*, "The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA," *Nature*, vol. 468, no. 7320, pp. 67–71, Nov. 2010.
- [45] P. Rouet, F. Smih, and M. Jasin, "Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 14, no. 12, pp. 8096–106, Dec. 1994.
- [46] A. Choulika, A. Perrin, B. Dujon, and J. F. Nicolas, "Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 15, no. 4, pp. 1968–73, Apr. 1995.
- [47] N. Rudin, E. Sugarman, and J. E. Haber, "Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, vol. 122, no. 3, pp. 519–34, Jul. 1989.
- [48] A. Plessis, A. Perrin, J. E. Haber, and B. Dujon, "Site-specific recombination determined by I-SceI, a mitochondrial group I intron-encoded endonuclease expressed in the yeast nucleus.," *Genetics*, vol. 130, no. 3, pp. 451–60, Mar. 1992.
- [49] K. Suzuki *et al.*, "In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration," *Nature*, vol. 540, no. 7631, pp. 144–149, 2016.
- [50] K. Suzuki and J. C. Izpisua Belmonte, "In vivo genome editing via the HITI method as a tool for gene therapy," *J. Hum. Genet.*, vol. 63, no. 2, pp. 157–164, 2018.
- [51] L. Cong *et al.*, "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems," *Science (80-.)*, vol. 339, no. 6121, pp. 819–823, Feb. 2013.
- [52] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001.
- [53] C. Lussey-Lepoutre *et al.*, "Loss of succinate dehydrogenase activity results in dependency on pyruvate carboxylation for cellular anabolism," *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 1, p. 8784, Dec. 2015.
- [54] M. Miettinen *et al.*, "Immunohistochemical loss of succinate dehydrogenase subunit A (SDHA) in gastrointestinal stromal tumors (GISTs) signals SDHA germline mutation.," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 37, no. 2, pp. 234–40, Feb. 2013.
- [55] E. L. Mills *et al.*, "Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages," *Cell*, vol. 167, no. 2, p. 457–470.e13, 2016.