

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

APLICACIÓN DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 PARA LA OBTENCIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DE LA ENFERMEDAD DE BATTEN

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA
CURSO 2015-2016

ALUMNA: Alba Insa Ibars
CODIRECTORES: Dra. Carmen Aguado Muñoz (CIPF)
Dr. Rafael Vázquez Manrique (IIS La Fe)
TUTORA: Dra. Lynne Yenush (UPV)

VALENCIA, 19 de septiembre de 2016

TÍTULO: APLICACIÓN DEL SISTEMA CRISPR/CAS9 PARA LA OBTENCIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DE LA ENFERMEDAD DE BATTEN

Resumen: Las lipofuscinosis ceroides neuronales (NCL) son un grupo de trastornos metabólicos neurodegenerativos. Hasta el momento se han descrito 14 variantes diferentes de NCL con características patológicas similares aunque causadas por mutaciones en diferentes genes. De entre todas, la variante juvenil (JNCL, CLN3 o enfermedad de Batten) es junto a la forma infantil tardía, la más prevalente. En la enfermedad de Batten, la mutación más frecuente en el gen *CLN3* es una delección de 1,02 kb, que afecta a los exones 7 y 8 y que determina que la traducción se detenga de forma prematura.

Actualmente, el laboratorio dispone para el estudio de la enfermedad de Batten de diversas muestras de pacientes con la delección anterior. Aunque se dispone de dos líneas de linfoblastos, solo se dispone de una de fibroblastos. Para aumentar el número de modelos celulares disponibles para el estudio de la enfermedad, en este trabajo, se modificaron genéticamente células HEK293T y SH-SY5Y utilizando la tecnología CRISPR/Cas9, para producir la delección de 1,02 kb en el gen *CLN3*.

Palabras clave: lipofuscinosis ceroides neuronales, enfermedad de Batten, gen *CLN3*, CRISPR/Cas9, sgRNA, HEK293T, SH-SY5Y.

Autor: Alba Insa Ibars

Localidad y fecha: Valencia, septiembre de 2016

Codirectores: Dra. Carmen Aguado Muñoz
Dr. Rafael Vázquez Manrique

Tutora Académica: Dra. Lynne Yenush

TITLE: APPLICATION OF THE CRISPR/CAS9 SYSTEM TO OBTAIN A CELL LINE IN BATTEN DISEASE

Abstract: Neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL) are a group of neurodegenerative metabolic disorders. Until now, have been described 14 different variants of NCL with similar pathological features caused by mutations in different genes. Among all, the juvenile variant (JNCL, CLN3 or Batten disease) together with late infantile variant, is the most prevalent form. In Batten disease, the most common mutation in the *CLN3* gene is a 1.02 kb deletion that affects exons 7 and 8 and stops translation prematurely.

Currently, the laboratory has samples from patients with the previous deletion for the study of Batten disease. Although there are two lines of lymphoblasts, it only has a line of fibroblasts. To increase the number of cell models available for the study of disease, in this work, HEK293T and SH-SY5Y was genetically modified using CRISPR/Cas9 technology to produce the 1.02 kb deletion in *CLN3* gene.

Keywords: neuronal ceroid lipofuscinosis, Batten Disease, gene *CLN3*, CRISPR/Cas9, sgRNA, HEK293T, SH-SY5Y.

Author: Alba Insa Ibars

Locality and date: Valencia, September 2016

Co-directors: Dra. Carmen Aguado Muñoz
Dr. Rafael Vázquez Manrique

Academic tutor: Dra. Lynne Yenush

AGRADECIMIENTOS

En este apartado quisiera dar las gracias a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización del presente trabajo.

Al Dr. Erwin Knecht, por ofrecerme la oportunidad de realizar el trabajo en su laboratorio, así como por su inestimable ayuda y experiencia. A la Dra. Carmen Aguado, que como directora de este trabajo ha sido un gran apoyo en todo momento, por su gran dedicación y cariño. Por todo lo aprendido, por recibirme cada día en el laboratorio con una sonrisa y hacerme sentir tan a gusto en el trabajo.

En general, al Centro de Investigación Príncipe Felipe y, en especial, a los miembros del laboratorio I-11, Mari Paz, Marcos y Ali, por permitirme trabajar y aprender de ellos y hacer que todo fuera más fácil. A los miembros del laboratorio I-08, M^a Eugenia, Magda, Salva, y Rachid, siempre dispuestos a resolver mis dudas.

Quisiera agradecer igualmente al Dr. Rafael Vázquez del Grupo de Investigación en Biomedicina Molecular, Celular y Genómica del IIS La Fe todo el apoyo y gran interés mostrado en el trabajo.

En lo académico, dar las gracias a la Universitat Politècnica de València y, en concreto, a mi tutora, la Dra. Lynne Yenush, por toda la ayuda prestada a lo largo del trabajo, por su interés y predisposición.

Por último, debo agradecer a mi familia, a mis padres y hermana, a David, amigos y a todas aquellas personas que me han ofrecido su confianza y apoyo incondicional.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	III
ABREVIATURAS.....	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LIPOFUSCINOSIS CEROIDEAS NEURONALES	1
1.2. LIPOFUSCINOSIS CEROIDEA NEURONAL JUVENIL (CLN3)	3
1.3. SISTEMA CRISPR.....	4
1.4. SISTEMA CRISPR/Cas9.....	6
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
3.1. MATERIAL.....	10
3.1.1. Aparatos	10
3.1.2. Líneas celulares.....	10
3.1.3. Medios de cultivo	10
3.1.4. Kits comerciales.....	11
3.1.5. Vector	11
3.1.6. Enzimas.....	11
3.1.7. Otros	12
3.2. MÉTODOS.....	12
3.2.1. Cultivo de células eucariotas	12
3.2.1.1. Condiciones de cultivo de los fibroblastos.....	12
3.2.1.2. Condiciones de cultivo de las células HEK293T.....	12
3.2.1.3. Condiciones de cultivo de las células SH-SY5Y	13
3.2.2. Construcción de los vectores con los sgRNAs específicos.....	13
3.2.2.1. Diseño de los sgRNAs	13
3.2.2.2. Clonación de las secuencias sgRNAs en el vector PX458	13
3.2.2.2.1. Vector de expresión	13
3.2.2.2.2. Digestión del vector	13
3.2.2.2.3. Hibridación de los oligonucleótidos.....	14
3.2.2.2.4. Ligación.....	14
3.2.2.2.5. Transformación y selección de colonias positivas	14
3.2.3. Evaluación de la actividad de las construcciones.....	15
3.2.3.1. Transfección de células HEK293T.....	15

3.2.3.2. Análisis de la delección por PCR	15
3.2.4. Obtención de líneas clonales y análisis de la delección	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1. Diseño de los sgRNAs y clonación en el vector PX458	17
4.2. Evaluación de las construcciones en células HEK293T	19
4.3. Obtención de líneas clonales en HEK293T y SH-SY5Y	22
5. CONCLUSIONES	27
6. BIBLIOGRAFÍA	28
ANEXO I. REGIÓN DEL GEN <i>CLN3</i> EN LA QUE SE ENCUENTRA LA DELECCIÓN	31
ANEXO II. SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LAS sgRNAs Y CEBADORES PARA PCR	32
ANEXO III. SECUENCIACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES CON LOS sgRNAs	33
ANEXO IV. SECUENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS HEK293T	36

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.1. Mutaciones descritas en los 13 genes causantes de las NCL y número de pacientes afectados en cada variante	1
Tabla 1.2. Clasificación de las NCL	2
Figura 1.1. Esquema de la proteína CLN3p humana.....	3
Figura 1.2. Mutación más prevalente del gen <i>CLN3</i>	4
Figura 1.3. Etapas de la inmunidad CRISPR/Cas en procariontas	5
Figura 1.4. Esquema de la nucleasa Cas9 guiada por RNA	6
Figura 1.5. La reparación de DSB promueve la edición de genes.....	7
Figura 1.6. Visión general de la estrategia CRISPR/Cas9 emparejada	8
Figura 3.1. Vector SpCas9(BB)-2A-GFP (PX458).....	11
Tabla 4.1. Secuencias guías de 20 nucleótidos diseñadas para el sistema CRISPR/Cas9	17
Figura 4.1. Representación esquemática de la clonación de la secuencia guía en el vector pSpCas9(BB)-2A-GFP	18
Figura 4.2. Gel cargado con la PCR de las colonias con la construcción del vector PX458 conteniendo la secuencia sgRNA1	19
Figura 4.3. Células HEK293T transfectadas con la construcción de PX458 con las secuencias sgRNAs.....	20
Figura 4.4. Evaluación de la función del sistema CRISPR/Cas9 en células HEK293T	21
Figura 4.5. Esquema de los pasos realizados para la obtención de clones	22
Tabla 4.2. Resultado del análisis de los clones obtenido en HEK293T y en SH-SY5Y	23
Figura 4.6. Esquema de los cebadores empleados en el análisis de los clones por PCR.....	23
Figura 4.7. Imágenes de las células HEK293T	25
Figura 4.8. Imágenes de las células SH-SY5Y.....	26

ABREVIATURAS

ANCL	Lipofuscinosis ceroidea neuronal adulta
ATCC	<i>“American Type Culture Collection”</i>
BSA	Albúmina de suero fetal bovino
<i>Cas</i>	Genes asociados a CRISPR
Cas	Proteínas asociadas a CRISPR
<i>CLN1-CLN14</i>	Genes implicados en cada una de las variantes de NCL
CLN3p	Proteína codificada por el gen CLN3p
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
crRNA	RNA CRISPR
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSB	Cortes de doble cadena
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
FBS	Suero fetal bovino
HDR	Reparación directa por homología
HEK293T	Células embrionarias de riñón humano 293T
INCL	Lipofuscinosis ceroidea neuronal infantil
indels	Mutaciones de inserción o deleción
JNCL	Lipofuscinosis ceroidea neuronal juvenil
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
LB	Medio Luria-Bertani

LINCL	Lipofuscinosis ceroidea neuronal infantil tardía
MEM	Medio mínimo esencial
NCBI	<i>“National Center for Biotechnology Information”</i>
NCL	Lipofuscinosis ceroideas neuronales
NHEJ	Reparación por recombinación no homóloga
OMIM	<i>“Online Mendelian Inheritance in Man”</i>
PAM	Motivo adyacente al protoespaciador
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
sgRNA	RNA de una sola guía
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
RE	Retículo endoplasmático
TALEN	Nucleasas efectoras tipo activador de transcripción
TBE	Tampón formado por Tris, borato y EDTA
tracrRNA	RNA CRISPR transactivador
ZFN	Nucleasas de dedos de zinc

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LIPOFUSCINOSIS CEROIDEAS NEURONALES

Las lipofuscinosis ceroides neuronales (NCL) pertenecen al grupo de las epilepsias mioclónicas progresivas, que comprenden un grupo de enfermedades raras y heterogéneas caracterizadas por la combinación de convulsiones epilépticas mioclónicas y el deterioro neurológico progresivo (Kälviäinen *et al.*, 2015). Las NCL son enfermedades de almacenamiento lisosomal que se caracterizan por la acumulación de lipopigmentos ceroides autofluorescentes en los lisosomas. Los órganos que se ven más afectados en estas enfermedades son el cerebro y la retina, pero también se ha encontrado este material acumulado en otros tejidos (Villarroya Pérez, 2002; Kollmann *et al.*, 2013; Vidal Donet, 2014).

Estas enfermedades afectan principalmente a niños y adolescentes y la mayoría de ellas presentan un patrón de herencia autosómico recesivo (Warrier *et al.*, 2013). La incidencia es de 1 cada 12.500 nacidos vivos en EE.UU. y en los países escandinavos, mientras que la incidencia mundial es de 1 cada 100.000, por lo que se consideran enfermedades raras (Jalanko and Braulke, 2009).

Hasta el momento se han descrito 14 variantes de NCL y en casi todas ellas los pacientes son inicialmente sanos y tienen un perfil de desarrollo normal. La edad de la aparición de los síntomas puede variar desde el nacimiento hasta la edad adulta, y el orden en el que aparecen esos síntomas es variable y depende tanto de la edad de inicio como de la forma genética (Schulz *et al.*, 2013). La esperanza de vida va de los 20 a los 40 años en la mayoría de los casos (Oetjen *et al.*, 2016). Los principales síntomas comunes a todas las variantes son demencia, pérdida visual, epilepsia y deterioro motor.

Aunque todas las variantes presentan características patológicas similares, son resultado de más de 400 mutaciones en 13 genes diferentes identificados hasta el momento: *CLN1*, *CLN2*, *CLN3*, *CLN4*, *CLN5*, *CLN6*, *CLN7*, *CLN8*, *CLN10*, *CLN11*, *CLN12*, *CLN13*, *CLN14* (Tabla 1.1) (Warrier *et al.*, 2013).

Tabla 1.1. Mutaciones descritas en los 13 genes causantes de las NCL y número de pacientes afectados en cada variante. Para cada gen se muestran los cambios totales que han sido identificados y el número de pacientes y familias registrados en este estudio que padecen la enfermedad (Warrier *et al.*, 2013).

Gen	<i>CLN1</i>	<i>CLN2</i>	<i>CLN3</i>	<i>CLN4</i>	<i>CLN5</i>	<i>CLN6</i>	<i>CLN7</i>	<i>CLN8</i>	<i>CLN10</i>	<i>CLN11</i>	<i>CLN12</i>	<i>CLN13</i>	<i>CLN14</i>	Total
Cambios totales	73	129	70	2	45	72	33	26	12	1	1	5	1	471
Número de pacientes	216	326	403	7	85	125	73	70	11	2	4	4	2	1329
Número de familias	163	317	383	7	79	106	65	65	10	1	1	3	1	1202

Las lipofuscinosis ceroides neuronales se clasificaron al principio en función de la edad en la que aparecían los síntomas en cuatro categorías: infantil (INCL), infantil tardía (LINCL), juvenil (JNCL) y adulta (ANCL) (Jalanko and Braluke, 2009). Esto se ha modificado con el tiempo debido a nuevas variantes que fueron descritas. En la actualidad la clasificación es más compleja, puesto que se realiza en función de la edad en la que se desarrolla la enfermedad y los genes que están implicados (Tabla 1.2).

Estos genes codifican proteínas tanto solubles como transmembrana que se localizan en diferentes estructuras celulares, especialmente en el retículo endoplasmático, endosomas y lisosomas. La heterogeneidad de las proteínas y su localización subcelular sugieren que pueden desempeñar papeles en una vía funcional importante en las células neuronales (Kyttälä *et al.*, 2006).

Tabla 1.2. Clasificación de las NCL. (Warrier *et al.*, 2013; Cárcel-Trullols *et al.*, 2015).

Gen	Enfermedad	Proteína	Localización subcelular
CLN1	Infantil	CLN1p/ Palmitoil proteína tioesterasa (PPT1) 306 aa, proteína soluble	Matriz lisosomal, vesículas extralisosomales y RE
CLN2	Infantil tardía	CLN2p/ Tripeptidil peptidasa I (TPP1) 563 aa, proteína soluble	Matriz lisosomal y RE
CLN3	Juvenil	CLN3p/ Battenina 438 aa, proteína transmembrana	Membrana de endosomas/lisosomas tardíos
CLN4	Adulta	CLN4p/ CSP α 198 aa, proteína soluble	Citosólica, asociada a membranas vesiculares
CLN5	Infantil tardía (variante finlandesa)	CLN5p 407 aa, proteína soluble	Matriz lisosomal
CLN6	Infantil tardía (variante gitano-india)	CLN6p 311 aa, proteína transmembrana	Membrana del RE
CLN7	Infantil tardía (variante turca)	CLN7p/MFSD8 518 aa, proteína transmembrana	Membrana lisosomal
CLN8	Infantil tardía (variante epiléptica)	CLN8p 286 aa, proteína transmembrana	RE y Aparato de Golgi
CLN9	Juvenil	CLN9p Proteína desconocida	Localización desconocida
CLN10	Congénita	CLN10p/ Catepsina D (CTSD) 412 aa, proteína soluble	Matriz lisosomal
CLN11	Adulta	CLN11p/ Porgranulina 593 aa, proteína soluble	Extracelular
CLN12	Juvenil	CLN12p 1180 aa, proteína transmembrana	Membrana lisosomal y cuerpos multivesiculares
CLN13	Adulta	CLN13p/ Catepsina F 484 aa, proteína soluble	Matriz lisosomal
CLN14	Infantil	CLN14p/ KCTD7 289 aa, proteína soluble	Proteína citosólica y parcialmente asociada a la membrana plasmática

Histopatológicamente se caracterizan por el almacenamiento y acumulación de unos lipopigmentos ceroides autofluorescentes en los lisosomas de las células de los pacientes llamados gránulos de lipofuscina. Este material autofluorescente está compuesto mayoritariamente por proteínas hidrofóbicas. Tanto en la variante juvenil como en la infantil tardía, el principal componente de estos gránulos es la subunidad c de la ATPasa mitocondrial (Villaroya Pérez, 2002; Kyttälä *et al.*, 2006; García Gómez, 2014).

En este trabajo nos vamos a centrar en la variante más prevalente, la variante CLN3 (juvenil), también denominada enfermedad de Batten.

1.2. LIPOFUSCINOSIS CEROIDEA NEURONAL JUVENIL (CLN3)

La enfermedad de Batten (JNCL, lipofuscinosis ceroidea neuronal juvenil) es la variante más común de las lipofuscinosis ceroideas neuronales, con una incidencia estimada de 1 cada 25.000 nacidos vivos en el norte de Europa (Munroe *et al.*, 1997).

En esta variante, la insuficiencia visual aparece entre los 4 y los 7 años de edad, lo que lleva a la ceguera en pocos años. En este periodo se hace evidente un deterioro psicomotor progresivo. Las convulsiones epilépticas comienzan aproximadamente a los 10 años y van aumentando progresivamente en frecuencia y severidad con la edad. Otros síntomas extrapiramidales, como la rigidez, la hipocinesia, la postura encorvada y andar arrastrando los pies aparecen entre los 12 y los 15 años, por lo que los pacientes acaban postrados en la cama a los 20 años. En la variante juvenil también aparecen síntomas psiquiátricos como la agresividad, la depresión y problemas de sueño. Generalmente los pacientes mueren sobre los 30 años (Backman *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2006; Ostergaard *et al.*, 2011).

El gen que se ve afectado en este caso es *CLN3*, que se localiza en el cromosoma 16 y que codifica para una proteína transmembrana denominada CLN3p o Battenina de naturaleza hidrófoba (Figura 1.1). CLN3p se encuentra principalmente en los lisosomas y endosomas (Ezaki *et al.*, 2003; Golabek *et al.*, 1999), pero también se ha encontrado en el aparato de Golgi, mitocondrias y citoesqueleto (Katz *et al.*, 1997; Kremmidiotis *et al.*, 1999; Luiro *et al.*, 2006). Esta proteína está formada por 438 aminoácidos y pesa 48 kDa (Kyttälä *et al.*, 2006; Kousi *et al.*, 2011). El patrón de expresión tisular y la localización de la proteína CLN3 no se conoce con precisión debido principalmente a los bajos niveles de CLN3p endógenos y a la falta de anticuerpos específicos (Cárcel-Trullols *et al.*, 2015).

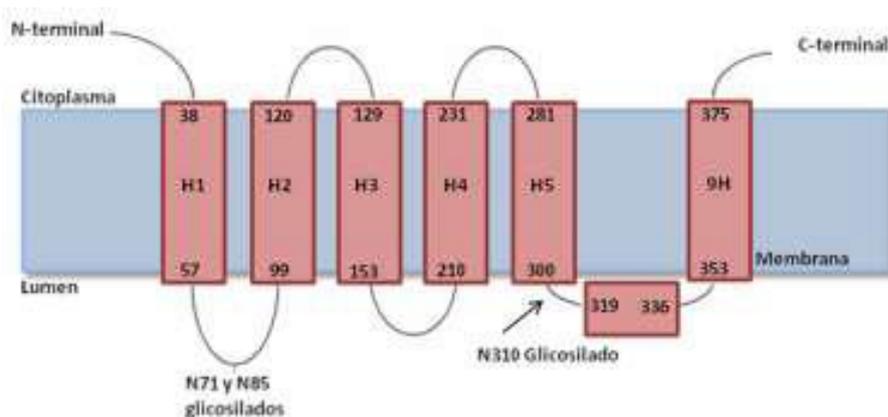


Figura 1.1. Esquema de la proteína CLN3p humana. En el esquema se representa la estructura de la proteína CLN3p, que presenta seis dominios transmembrana (Vidal Donet, 2014).

La función o funciones de esta proteína todavía no se conocen, pero se postula que puede estar involucrada en la endocitosis, en el mantenimiento del pH lisosomal-vacuolar, en

el transporte de arginina al lisosoma, el transporte de diferentes moléculas a través de la membrana lisosomal o en la respuesta antiapoptótica (Cárcel-Trullols *et al.*, 2015).

El gen *CLN3* presenta 15 exones. Se han identificado múltiples mutaciones para dicho gen, pero la más prevalente es la deleción de 1,02 kb, que aparece en homocigosis en el 74 % de los pacientes, pero está presente en el 96 % de los pacientes, ya que algunos casos la mutación se encuentra en heterocigosis (Kousi *et al.*, 2011). Esta deleción de gran tamaño afecta a los exones 7 y 8 y la traducción se detiene por la formación de un codón de stop prematuro. La proteína truncada tiene 181 aminoácidos, pero solo los 153 primeros aminoácidos coinciden con la forma silvestre de la proteína (Figura 1.2) (Munroe *et al.*, 1997; Cárcel-Trullols *et al.*, 2015).

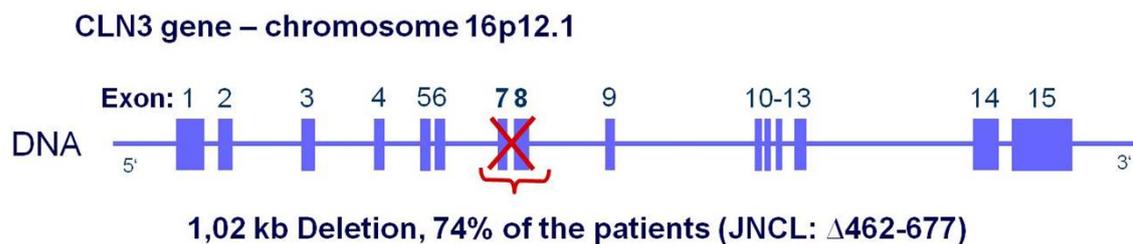


Figura 1.2. Mutación más prevalente del gen *CLN3*. En esta figura se muestra de forma esquemática el gen *CLN3* con la deleción más prevalente en la enfermedad de Batten con 1,02 kb, que afecta a los exones 7 y 8. Adaptada de Ncl-stiftung.de.

1.3. SISTEMA CRISPR

La capacidad de diseñar sistemas biológicos y organismos tiene un elevado potencial para aplicaciones en la ciencia básica, la medicina y la biotecnología. En los últimos años han surgido una serie de tecnologías para la edición de genomas, incluyendo las nucleasas de dedos de zinc (ZFN, *zinc-fingers nucleases*), las nucleasas efectoras tipo activador de transcripción (TALEN, *transcription activator-like effectors nucleases*) y el sistema de nucleasas CRISPR/Cas9 guiadas por RNA. Las dos primeras tecnologías utilizan como estrategia la unión de endonucleasas a dominios catalíticos modulares de proteínas de unión a DNA para inducir cortes de doble cadena (DSB, *double-stranded breaks*) en el DNA diana. Por el contrario, Cas9 es una nucleasa guiada por pequeñas moléculas de RNA que se unen por complementariedad al DNA diana (Wood *et al.*, 2011; Gaj *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2016).

El sistema basado en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) es un sistema inmune adaptativo microbiano contra virus y plásmidos que fue descubierto explorando el genoma de células procariontas. Este sistema utiliza nucleasas guiadas por RNA para cortar elementos genéticos foráneos y se ha identificado en un amplio rango de bacterias y arqueas (Mojica and Rodríguez-Valera, 2016; Lander, 2016). En 2012, el potencial de los sistemas CRISPR/Cas se presentó como una herramienta de edición de genomas con una

capacidad excepcional para desencadenar mutaciones dirigidas en prácticamente cualquier organismo (Mojica and Montoliu, 2016).

En procariontes, el sistema CRISPR/Cas es un sistema de defensa sofisticado que se activa cuando la bacteria es infectada por el DNA foráneo. El primer paso consiste en la adquisición de ese DNA foráneo, que se incorpora como secuencia espaciadora en el genoma de la bacteria entre las secuencias del locus CRISPR, que contienen los genes *Cas*. Tras un nuevo encuentro con el mismo DNA, se transcribe el “array” CRISPR dando lugar a los pre-crRNA (*pre-RNA CRISPR*) y se procesan los espaciadores (crRNA, *RNA CRISPR*), produciéndose un RNA de interferencia, que es capaz de guiar a las enzimas Cas hacia una secuencia complementaria y degradarla (Figura 1.3) (Marraffini, 2015).

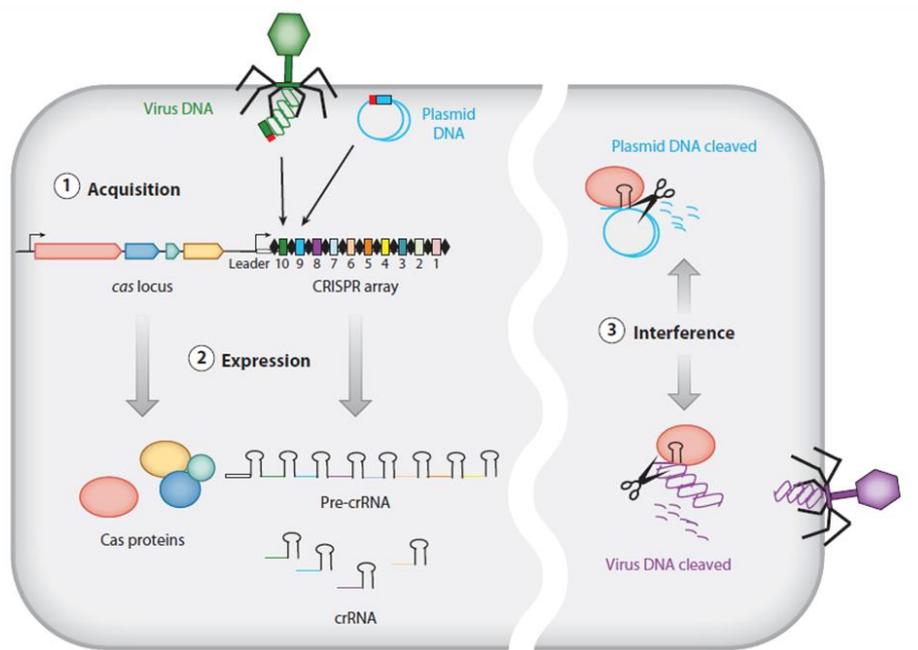


Figura 1.3. Etapas de la inmunidad CRISPR/Cas en procariontes. En esta imagen se representa, en primer lugar, la fase de adquisición del DNA foráneo en el locus CRISPR (1), la expresión de los RNA (2) y la interferencia de éstos con el DNA foráneo para guiar las endonucleasas Cas e inactivarlo (3). Adaptada de microbioun.blogspot.com.es.

Todos los sistemas CRISPR/Cas albergan los genes *Cas1* y *Cas2*, que forman parte de la etapa de inmunización. Sin embargo, basándose en el contenido de genes *Cas* accesorios, cada sistema puede clasificarse en tres tipos. Aunque todos utilizan el mismo mecanismo para lograr la inmunidad a través de nucleasas guiadas por el crRNA, entre ellos difieren en la biogénesis del RNA CRISPR (Marraffini, 2015). Recientemente, también se ha descrito un nuevo tipo de sistema CRISPR en *Natrobacterium gregoryi* que presenta diferencias con respecto a los tres tipos descritos anteriormente (Gao *et al.*, 2016).

1.4. SISTEMA CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR tipo II o CRISPR/Cas9, es el sistema más conocido y empleado en multitud de aplicaciones desde que fue descrito en *Streptococcus pyogenes*. Algunas de las muchas aplicaciones que se pueden destacar son: estudios sobre el cáncer (Sánchez-Rivera and Jacks, 2015) o la creación de modelos de ratón *knock-in* y *knock-out* (Singh *et al.*, 2014).

Los componentes principales del sistema CRISPR/Cas9 son los genes *Cas* o genes asociados a CRISPR que codifican para proteínas con actividad de nucleasas, en este caso Cas9, un RNA procesado que es complementario a los protoespaciadores, conocido como RNA CRISPR (crRNA) y un RNA necesario para la unión del crRNA a la nucleasa llamado RNA CRISPR transactivador (tracrRNA). Los protoespaciadores siempre se asocian a una secuencia denominada motivo adyacente al protoespaciador (PAM, *protoespacer adjacent motif*), que son secuencias cortas de entre 3 y 5 nucleótidos que varían en función del sistema, y que en este caso es 5'- NGG (Ran *et al.*, 2013; Marraffini, 2015; Wojtal *et al.*, 2016).

La Cas9 es una endonucleasa guiada por una pequeña secuencia de RNA que se une a una región específica del genoma gracias a una secuencia de 20 nucleótidos presente en el crRNA, que es complementaria a la secuencia diana. Esta nucleasa media cortes en las dos hebras (DSB). La función del sistema CRISPR/Cas9, que es propia de procariontes, se reconstituye en células eucariotas a través de la expresión ectópica de la proteína Cas9 y los RNA necesarios. Además, el crRNA y el tracrRNA pueden fusionarse juntos, artificialmente, para crear un RNA de una sola guía (sgRNA, *single-guide RNA*) que actúa de forma eficiente, como los componentes por separado. De este modo, Cas9 puede ser dirigida a cualquier diana modificando la secuencia de 20 nucleótidos dentro del sgRNA, por lo que se convierte en un sistema fácil de diseñar (Figura 1.4) (Ran *et al.*, 2013). En definitiva, la grandeza de esta tecnología reside en el hecho de que no requiere más componentes que los mencionados arriba para funcionar en cualquier organismo procarionte o eucariota, incluyendo al ser humano.

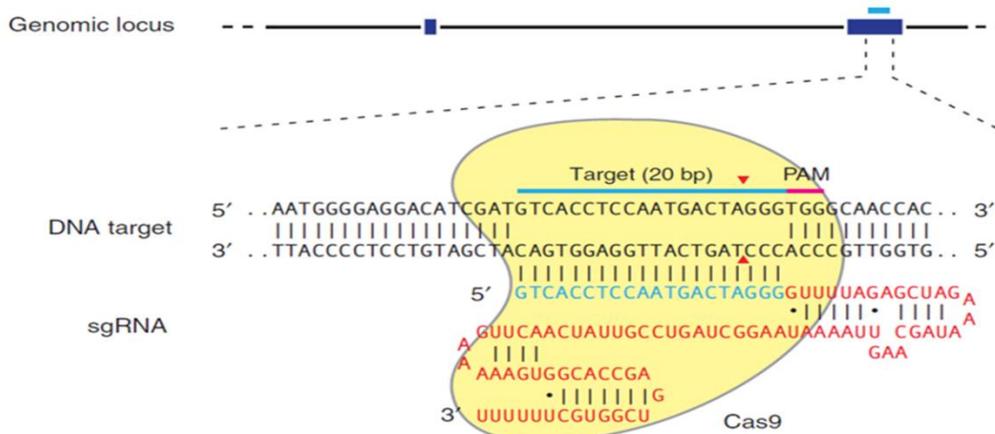


Figura 1.4. Esquema de la nucleasa Cas9 guiada por RNA. La nucleasa Cas9 de *S. pyogenes* (representada en amarillo) es dirigida al DNA genómico por un sgRNA que consiste en una secuencia de 20 nucleótidos (azul) y la secuencia transcrRNA (rojo). La secuencia guía hibrida con el DNA diana (barra azul) delante de la secuencia PAM (barra rosa) (Ran *et al.*, 2013).

Los cortes de doble cadena en el DNA mediados por la Cas9, o por cualquier otro mecanismo artificial o accidental, pueden ser reparados por dos vías, la vía de reparación por recombinación no homóloga (NHEJ, *non-homologous end joining*) o la vía de reparación directa por homología (HDR, *homology direct repair*). La reparación a través de la NHEJ, que es propensa a errores, con frecuencia produce mutaciones de inserción o deleción (*indels*) que pueden conducir al desplazamiento del marco de lectura y a la generación de codones de parada prematuros. Alternativamente, como se muestra en la Figura 1.5, en presencia de un molde externo de reparación el corte puede ser editado a través de la vía HDR, lo que puede ser empleado para generar modificaciones precisas del genoma (Sánchez-Rivera and Jacks, 2015).

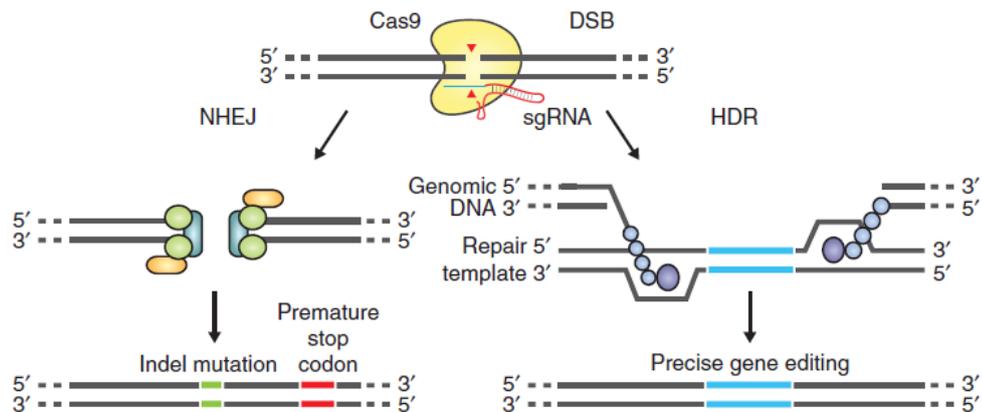


Figura 1.5. La reparación de DSB promueve la edición de genes. Los cortes de doble cadena inducidos por la nucleasa Cas9 (amarillo) se pueden reparar siguiendo dos mecanismos distintos. En la vía NHEJ (izquierda), propensa a errores, los extremos son procesados por la maquinaria de reparación endógena y se unen de nuevo, dando lugar a desplazamientos en el marco de lectura y a la aparición de un codón de parada prematuro, lo que resulta en la eliminación de genes. En presencia de una plantilla de reparación, la célula puede emplear la vía HDR (derecha), que permite una edición precisa y de alta fidelidad (Ran *et al.*, 2013).

El mecanismo de reparación NHEJ puede ser aprovechado para obtener *knock-out* de genes específicos, ya que el cambio en la pauta de lectura puede llevar a codones de parada prematuros. Además, la combinación de varios cortes permite la obtención de deleciones de gran tamaño en el genoma, que pueden comprobarse fácilmente mediante la técnica de PCR (Figura 1.6) (Ran *et al.*, 2013; Bauer *et al.*, 2014; Wettstein *et al.*, 2015).

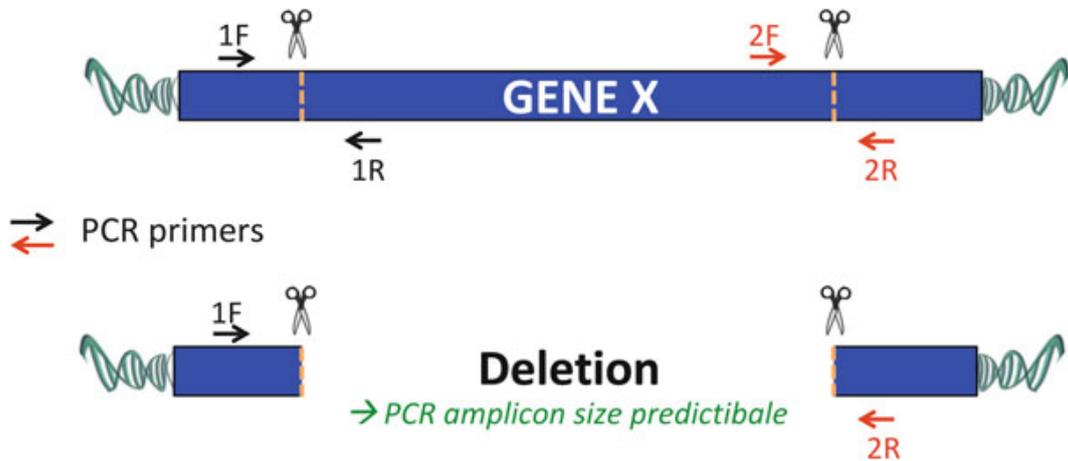


Figura 1.6. Visión general de la estrategia CRISPR/Cas9 emparejada. Para generar grandes deleciones puede diseñarse el sistema CRISPR/Cas9 con el fin de inducir dos cortes en el DNA genómico. Estas deleciones de gran tamaño pueden evaluarse por PCR diseñando dos cebadores, uno directo y otro reverso, por delante y por detrás de la deleción, respectivamente. Esta PCR permite la evaluación de la eficiencia de las parejas de CRISPR/Cas9, así como el estudio y detección de los clones silvestres, heterocigotos y homocigotos mutantes (Wettstein *et al.*, 2015).

La aproximación esquematizada en la Figura 1.6 será la estrategia que se seguirá para la obtención de los modelos celulares con la deleción de 1,02 kb.

2. OBJETIVOS

Actualmente el laboratorio dispone de una línea de fibroblastos con la delección de 1,02 kb en el gen *CLN3* de un paciente del Hospital La Fe (Valencia) con la enfermedad de Batten cuyo diagnóstico fue confirmado en el laboratorio. También dispone de dos líneas de linfoblastos de pacientes con esta mutación (obtenidas del repositorio de células Coriell Institute). En estos últimos, el sistema endosomal-lisosomal no responde de manera similar a los fibroblastos a condiciones que afectan a su actividad (por ejemplo la ausencia de suero) ni tampoco permiten estudios en condiciones equivalentes exactamente a las de formación de una monocapa en confluencia.

Puesto que el laboratorio está realizando estudios sobre alteraciones en el sistema endosomal-lisosomal en esa mutación, se consideró conveniente disponer de otros modelos celulares para poder profundizar en las mismas. En base a esto, el objetivo de este trabajo ha sido obtener, mediante la tecnología CRISPR/Cas9, líneas celulares con la delección de 1,02 kb que puedan utilizarse en el futuro como modelos adicionales en el estudio de la enfermedad y para verificar resultados anteriores.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Aparatos

Las reacciones de PCR se realizaron en dos termocicladores: GeneAmp PCR System 9700 de Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, EE. UU.) y MJ Research PTC-100 Thermal Cycler de GMI (St. Paul, MN, EE.UU.).

Para el cultivo y mantenimiento de las líneas celulares se utilizaron la campana de bioseguridad de flujo laminar Telstar Bio II (Tarrasa, España) y una estufa de CO₂ modelo LTC2323 de Shel Lab (Cornelius, OR, EE.UU.).

Las imágenes de las células se realizaron con el microscopio invertido Zeiss Axiovert200M de Carl Zeiss, Inc. (Oberkochen, Alemania).

Para la transformación de las cepas Top 10 de *E. coli* se empleó el electroporador MicroPulser™ Electroporator de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EE.UU.).

También se emplearon otros equipos de uso habitual en un laboratorio de biología celular y molecular como microscopios, agitadores, centrifugas, balanzas, estufas, baños, NanoDrop, equipos de electroforesis, transiluminadores, etc.

1.1.2. Líneas celulares

Se utilizaron células humanas embrionarias de riñón (HEK293T, *human embryonic kidney cells*, referencia de la ATCC: CRL-3216™) y una línea celular humana de neuroblastoma o SH-SY5Y (referencia de la ATCC: CRL-2266™).

Como control de la delección de 1,02 kb de *CLN3* se empleó una línea de fibroblastos de un paciente español obtenidos a partir de explantes de piel con la variante juvenil de lipofuscinosis cerioidea neuronal (13 años de edad), cuyo diagnóstico fue confirmado por PCR en el laboratorio.

1.1.3. Medios de cultivo

Para el mantenimiento y amplificación de las líneas celulares se han utilizado diferentes medios comerciales así como otros reactivos de uso habitual. Los medios de cultivo MEM (referencia: 4655), DMEM (referencia: 5796) y DMEM:F12 (referencia: 8437), la tripsina/EDTA (mezcla de tripsina al 0,04 % y de EDTA al 0,02 %), el dimetilsulfóxido (DMSO) y la insulina humana procedían de Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, EE.UU.). El Opti-MEM (referencia: 31985), los aminoácidos esenciales MEM 50x, los aminoácidos no esenciales MEM 100x, la penicilina (10.000 U/ml), la estreptomina (10.000 µg/ml), las vitaminas MEM 100x y el suero bovino fetal (FBS) se adquirieron de Thermo Fisher Scientific. El agua bidestilada estéril procedía de Laboratorios Braun (Barcelona, España). El material de plástico utilizado

hibridados se utilizó la enzima T4 DNA ligasa. Las dos enzimas fueron proporcionadas por Thermo Fisher Scientific.

Para las PCR se empleó AmpONE Taq DNA polymerase de Vitro S.A. (Sevilla, España).

1.1.7. Otros

La transfección de las células eucariotas se llevó a cabo con el reactivo Lipofectamina 3000 de Thermo Fisher Scientific. En la selección de colonias se emplearon discos de clonaje de 3 mm de Sigma-Aldrich Co.

Los cebadores fueron adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich Co. Para los geles se empleó agarosa en polvo de Roche y para teñir el DNA se utilizó GelRed de Biotium (Fremont, CA, EE.UU.). El marcador de DNA GeneRuler Low Range DNA Ladder, el marcador de DNA 100 pb y 1 kb y el tampón de carga se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific. Para el tampón de electroforesis TBE se empleó Tris-Base, ácido bórico y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), todos procedentes de Sigma-Aldrich Co.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Cultivo de células eucariotas

3.2.1.1. Condiciones de cultivo de los fibroblastos

Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con un 80 % de humedad relativa y un 5 % (v/v) de CO₂/aire, utilizando el medio mínimo esencial (MEM, *Minimum Essential Medium*) con sales de Eagle y suplementado con L-glutamina 2 mM, aminoácidos esenciales MEM 1x, aminoácidos no esenciales MEM 1x, vitaminas MEM 1x, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y 15 % de FBS. Estos cultivos se mantenían, cambiando el medio cada tres días, hasta que alcanzaban la confluencia deseada para cada experimento.

Con el fin de conservar un stock de células, se congelaron alícuotas de los cultivos por métodos estándar en una solución de DMSO al 10 % en FBS y se guardaron en nitrógeno líquido.

3.2.1.2. Condiciones de cultivo de las células HEK293T

Las células HEK293T se cultivaron en las mismas condiciones de temperatura, humedad y CO₂ que los fibroblastos, empleando en este caso medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina (100 U/ml) y 10 % de FBS inactivado (56 °C durante 30 min).

Para conservar stocks de las células obtenidas con la delección de 1,02 kb de *CLN3* se congelaron alícuotas de los cultivos en una solución de DMSO al 10 % en FBS inactivado y se guardaron en nitrógeno líquido.

3.2.1.3. Condiciones de cultivo de las células SH-SY5Y

Las células SH-SY5Y también se cultivaron en las mismas condiciones de temperatura, humedad y CO₂, utilizando en este caso medio DMEM:F12 en una relación 1:1 (v/v) suplementado con L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales MEM 1x, penicilina (100 U/ml) y 15 % de FBS.

Para conservar stocks de las células obtenidas con la delección de 1,02 kb de *CLN3* se congelaron alícuotas de los cultivos en una solución de DMSO al 10 % en FBS y se guardaron en nitrógeno líquido.

3.2.2. Construcción de los vectores con los sgRNAs específicos

3.2.2.1. Diseño de los sgRNAs

La secuencia del gen *CLN3* humano se obtuvo de la base de datos “Gene” y la secuencia correspondiente a la delección más frecuente para este gen, de 1,02 kb, se obtuvo de la base de datos OMIM, ambas del NCBI. Se diseñaron dos secuencias guías complementarias al extremo 5’ de la delección y otras dos para el extremo 3’ empleando el programa CRISPR RGEN Tools, disponible en la web <http://www.rgenome.net/>. En el Anexo I se muestra la región del gen *CLN3* con la delección completa subrayada, en azul la región diana donde hibridan los guías para CRISPR y en verde donde hibridan los cebadores para el estudio por PCR.

3.2.2.2. Clonación de las secuencias sgRNAs en el vector PX458

3.2.2.2.1. Vector de expresión

El vector de expresión empleado para la clonación de las secuencias guías fue pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458).

3.2.2.2.2. Digestión del vector

Para la digestión de 1,5 µg de vector se empleó 1 µL de la endonucleasa BbsI junto con 5 µL de Tampón 2, y 5 µL de BSA 10X, incubándose a 37 °C durante 2 h. Esta enzima de restricción es de tipo II, por lo que corta fuera del sitio de reconocimiento dejando extremos cohesivos diferentes, que imposibilitan la recircularización del vector a la hora de ligar el inserto. Además, los sitios de restricción se pierden, puesto que están orientados “hacia afuera”. El producto de esta reacción fue purificado mediante columna con el kit QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen.

3.2.2.2.3. Hibridación de los oligonucleótidos

Se mezclaron 4,5 μL de cada oligonucleótido del stock a 100 μM y 1 μL de Tampón Dúplex 10X, compuesto por acetato potásico 1 M y HEPES 300 mM a pH 7.5. La hibridación se realizó en un termociclador aplicando una rampa de temperaturas desde 95 hasta 25 $^{\circ}\text{C}$, bajando 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. La hibridación se verificó en un gel de agarosa al 2 % para comprobar que se había formado una cadena doble de DNA.

3.2.2.2.4. Ligación

Para la ligación del vector PX458 digerido con los oligonucleótidos hibridados (sgRNAs) se empleó 1 μL de la enzima T4 DNA Ligasa con 1 μL de su tampón específico proporcionado por la casa comercial. La proporción empleada de vector digerido:inserto fue 50 ng de vector por 1 ng de inserto. La reacción de ligación se realizó a 22 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h y posteriormente se inactivó la enzima a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min.

3.2.2.2.5. Transformación y selección de colonias positivas

La transformación del DNA se realizó en la cepa Top 10 de *E. coli* mediante electroporación. Para ello se mezclaron 50 μL de bacterias con 1 μL del producto de la ligación. Todo el proceso de transformación se llevó a cabo en hielo. La mezcla se sometió a electroporación empleando el equipo "MicroPulser™ Electroporator", que favorece la entrada del DNA en las bacterias. A continuación se incubaron las bacterias en agitación a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h y posteriormente se sembraron en placas de LB-agar con ampicilina (100 mg/mL). Estas placas se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ entre 18-20 h.

Se seleccionaron 10 colonias de cada construcción y se comprobó por PCR si el vector había introducido correctamente el inserto. Para ello se emplearon como cebador directo la secuencia directa de sgRNA correspondiente a cada construcción y como cebador reverso el R-PX458, de secuencia 5'-GTTATGTAACGGGTACTCT-3', que hibrida en una región del vector cercana al punto de inserción (Anexo II). Al mismo tiempo se realizaron réplicas de las colonias seleccionadas en placas de LB-agar con ampicilina para poder usarlas posteriormente en el caso de ser positivas.

Para cada construcción se seleccionó una colonia positiva y estas se cultivaron en 3 mL de medio LB con ampicilina (100 mg/mL) en tubos de 15 mL. Se crecieron a 37 $^{\circ}\text{C}$ y se extrajo DNA plasmídico empleando el Kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen. Para comprobar que las sgRNAs se habían insertado de forma correcta, cada construcción se secuenció mediante el método Sanger en el servicio de Genómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe. Se emplearon los cebadores F-PX458 y R-PX458, que hibridan en el vector en regiones cercanas al lugar de inserción de las sgRNAs (Anexo II).

Las colonias con la construcción correcta se almacenaron en glicerol a -80 $^{\circ}\text{C}$ para mantener stocks de cada una de ellas.

Para extraer mayor cantidad de cada construcción se crecieron las colonias en 250 mL de medio de cultivo con ampicilina (100 mg/mL) a 37 °C durante 16-18 h y se obtuvieron los plásmidos con el kit Genopure Plasmid Midi Kit de Roche.

3.2.3. Evaluación de la actividad de las construcciones

Para la evaluación de las construcciones se transfectaron células HEK293T con dichas construcciones por parejas para poder evaluar posteriormente si el corte en ambos puntos daba lugar a la delección de 1,02 kb deseada en el gen *CLN3*. Para ello se hicieron combinaciones de los plásmidos empleando uno con la secuencia complementaria a la región 5' y otra con la secuencia complementaria a la región 3' de la delección.

3.2.3.1. Transfección de células HEK293T

Antes de transfectar estas células, se extrajo DNA genómico de un cultivo del stock disponible en el laboratorio empleando el kit High Pure PCR Template Preparation Kit para secuenciar las regiones del gen de *CLN3* donde se habían diseñado los sgRNAs. Para la secuenciación se emplearon los cebadores FRW5 y REV5 para la región 5' de la delección y FRW3 y REV3 para la región 3'.

La transfección de las células HEK293T se realizó empleando Lipofectamina 3000 de Thermo Fisher Scientific siguiendo el protocolo de la casa comercial y en concreto, se sembraron 5 pocillos de una placa de 24-well con 175.000 células por pocillo de manera que en 24 h estuvieran al 70-80 % de confluencia. El primer pocillo se usó como control negativo sin transfectar, el segundo se transfectó con los sgRNA1 y 3, el tercero con los sgRNA1 y 4, el cuarto con los sgRNA2 y 3, y el quinto con los sgRNA2 y 4.

Se retiró el medio DMEM y se añadieron 500 µL de Opti-MEM a cada pocillo. Se prepararon dos mezclas por separado, una con 25 µL de Opti-MEM y 1 µL lipofectamina y otra con 25 µL de Opti-MEM, 1 µL de P3000 y 1 µg/µL de cada pareja de plásmidos (la concentración de los plásmidos se ajustó con agua bidestilada de Laboratorios Braun). La mezcla con los plásmidos se incubó junto a la Lipofectamina durante 15 min a temperatura ambiente y a continuación se añadió cada mezcla de transfección sobre las células gota a gota, manteniéndose durante aproximadamente 6 h. Tras esta incubación se cambió el medio de transfección por el medio de cultivo normal para las HEK293T.

3.2.3.2. Análisis de la delección por PCR

Para determinar la eficiencia de las sgRNAs se hizo un análisis por PCR de la región del gen *CLN3* donde se encuentra la delección. Para ello se extrajo de forma rápida el DNA genómico de las células HEK293T control y de las células transfectadas. Las células se tripsinizaron y se centrifugaron a 100 g durante 10 min a temperatura ambiente. El sedimento se resuspendió en PBS para lavar las células y se centrifugó como en el paso anterior. Para la

lisis celular cada sedimento se resuspendió en 10 μ L de PBS y se añadieron 20 μ L de tampón de lisis (0,3 mM de Tris/HCl pH 7,5, 0,6 mM de CaCl_2 , 1,5 % de glicerol, 0,675 % de Tween 20 y 0,3 μ g/ μ L de proteinasa K). La mezcla se incubó a 65 °C durante 30 min y posteriormente se inactivó la proteinasa K a 90 °C durante 10 min. Se añadieron 30 μ L de agua y se centrifugó a 10.000 g durante 10 min a 4 °C para eliminar restos celulares.

Para la PCR se utilizó el kit AmpONE Taq DNA polymerase con 50 ng de DNA de cada muestra, FRW5 y REV3 fueron los cebadores empleados.

3.2.4. Obtención de líneas clonales y análisis de la delección

Para obtener las líneas clonales con la delección de 1,02 kb se transfectaron células HEK293T y células de neuroblastoma SH-SY5Y siguiendo el mismo protocolo que en el apartado 3.2.3.1.

Se siguieron dos técnicas en paralelo, por un lado la obtención de clones por dilución en placas de 96-well y por otro, con discos de clonaje. Para la primera técnica, las células transfectadas se tripsinizaron y se diluyeron en medio de cultivo, de forma que, al sembrarlas en la placa de 96-well quedara una célula por pocillo en un volumen final de 200 μ L. Durante la primera semana se marcaron los pocillos en los que se observó una colonia de entre 4 y 10 células. Cuando estos pocillos tenían una confluencia del 70-80 % se pasaron a pocillos de placas de 24-well. Para la técnica con discos de clonaje, las células transfectadas se tripsinizaron y se sembraron en placas P100 con una densidad celular de 1/10 del área inicial para poder tener colonias aisladas. A los 3-4 días se marcaron las colonias formadas a partir de una única célula. Se eliminó el medio de cultivo y se colocaron sobre las marcas los discos de clonaje, previamente sumergidos en tripsina a 37 °C, se incubaron 2 min y los filtros se pasaron a una placa de 24-well.

En ambos casos cuando las células alcanzaron una confluencia aproximadamente del 50 %, cada pocillo de 24-well se pasó a dos pocillos nuevos de la misma superficie, con la relación 1/3 y 2/3 de células totales del pocillo original, respectivamente. El pocillo con menos células (1/3) se creció para poder tener la línea clonal amplificada en caso de que fuera positiva. El pocillo con 2/3 de células se creció hasta confluencia y a continuación se obtuvo el DNA genómico (usando el mismo protocolo que en el apartado 3.2.3.2.) para analizar si el clon presentaba o no la delección de 1,02 kb en el gen *CLN3*. El análisis de la delección se hizo mediante PCR. Las células con la delección, tanto homocigotas como heterocigotas, se amplificaron y se guardaron a -80 °C con medio de congelación (FBS conteniendo 10 % DMSO).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Diseño de los sgRNAs y clonación en el vector PX458

Para llevar a cabo la delección de 1,02 kb en el gen *CLN3* se empleó el sistema CRISPR/Cas9 de *S. pyogenes* (Sp), en el que se requiere que las secuencias diana tengan una longitud de 20 nucleótidos y contengan, en posición 5', el motivo adyacente al protoespaciador 5'-NGG. Esta secuencia de tres nucleótidos es necesaria para que la endonucleasa SpCas9 corte en el punto donde se une la secuencia guía, pero la secuencia PAM no forma parte del sgRNA. SpCas9 suele cortar 3 nucleótidos aguas arriba de la secuencia PAM (Ran *et al.*, 2013).

Existen multitud de programas informáticos predictivos para el diseño de experimentos de edición génica con CRISPR/Cas9. Estos programas emplean algoritmos diferentes, ya que cada laboratorio los diseña en base a sus datos.

En este trabajo se empleó el programa CRISPR RGEN Tools y se obtuvieron diferentes secuencias de 20 nucleótidos a ambos extremos de la delección de 1,02 kb que se podrían considerar óptimas para efectuar los cortes de doble cadena. De todas las secuencias se seleccionaron dos para cada extremo, que eran las que se encontraban más cercanas al lugar de corte deseado y con un contenido en GC cercano al 50 % (Tabla 4.1). Además el programa también informa de los posibles off-targets a los que se podrían unir estas secuencias guías en el resto del genoma, lo que podría ocasionar problemas en determinadas aplicaciones del sistema CRISPR/Cas9 por lo que en esos casos deberían estudiarse (Zhang *et al.*, 2015). En el caso de las secuencias seleccionadas en este trabajo, todas hibridan solo en la región del gen *CLN3* en el lugar deseado con un 100 % de complementariedad, y las secuencias sgRNA1, sgRNA2 y sgRNA4 podrían unirse en otro punto del genoma con dos nucleótidos distintos en su secuencia, es decir, con dos "mismatches".

En el Anexo I se muestra la región del gen *CLN3* con la delección completa subrayada, en azul la región diana donde hibridan los guías para CRISPR y en verde donde hibridan los cebadores para el estudio por PCR.

Tabla 4.1. Secuencias guías de 20 nucleótidos diseñadas para el sistema CRISPR/Cas9. Las secuencias sgRNA1 y sgRNA2 son complementarias a la región 5' de la delección, mientras que sgRNA3 y sgRNA4 lo son a la región 3'.

sgRNA1	AAAGAAAAGACTGATGAAG
sgRNA2	TGAAGGGGCAGAGACATCAA
sgRNA3	AAGTCCTACCTTGCTGTGA
sgRNA4	CCTCCCTCACAGCAAGGTA

El vector empleado para insertar las secuencias guía fue pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458). Este vector presenta codificada la nucleasa Cas9 de *S. pyogenes* (SpCas9) fusionada a EGFP (EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*) pero separada por un péptido 2A que es capaz de autodigerirse postraduccionalmente (Ryan *et al.*, 1991), por lo que EGFP se expresa de forma independiente de Cas9. SpCas9 se expresa bajo el control del promotor de mamífero CBh, para que se pueda sintetizar en estas células. Como marcador de selección presenta resistencia al antibiótico ampicilina.

Para obtener la secuencia codificante del sgRNA se diseñaron dos oligonucleótidos antiparalelos. Para clonar los oligonucleótidos hibridados en el vector PX458 es necesario que en el extremo 5' del oligonucleótido directo esté presente la secuencia 5'-CACC y en el extremo 5' del oligonucleótido reverso la secuencia 5'-AAAC, que son complementarias a los extremos cohesivos que quedan en el vector PX458 tras su escisión con la enzima de restricción BbsI. Además es necesario introducir en la región 5' del oligonucleótido directo una G necesaria para la correcta transcripción de la secuencia guía por el promotor U6 (Figura 4.1).

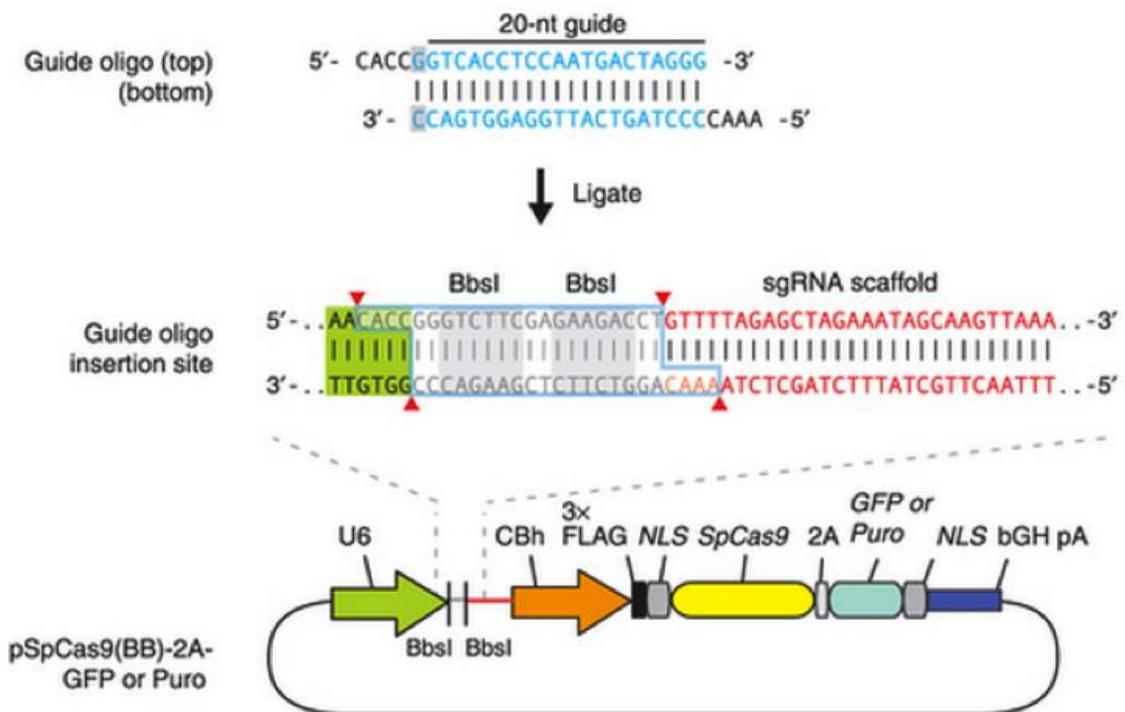


Figura 4.1. Representación esquemática de la clonación de la secuencia guía en el vector pSpCas9(BB)-2A-GFP. Los oligonucleótidos guía en este ejemplo se muestran de color azul. La hibridación deja los extremos necesarios para la ligación con el vector tras su escisión con BbsI. En el caso del vector empleado en este protocolo, además de la secuencia codificante para SpCas9, contiene el promotor U6 para la transcripción de la secuencia guía y la secuencia para EGFP como marcador de transfección (Ran *et al.*, 2013)

Tras la transformación del DNA en las cepas Top 10 de *E. coli* y la selección de colonias positivas, se llevó a cabo un análisis por PCR de 10 colonias para cada construcción como se indica en el apartado anterior para comprobar si las colonias resistentes a la ampicilina habían

insertado correctamente los oligonucleótidos hibridados. Los productos de las PCRs se analizaron en un gel de agarosa al 1% para ver si los cebadores habían hibridado y, por tanto, aparecía una banda de aproximadamente 200 pb. La mayoría de las colonias seleccionadas mostraron banda en el gel, por lo que se escogió, entre las positivas, una colonia de cada construcción para hacer una “*miniprep*” y purificar dicha construcción (Figura 4.2).

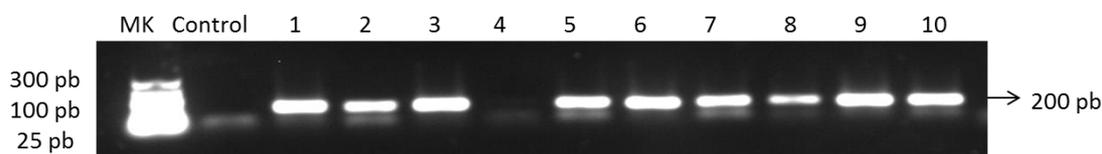


Figura 4.2. Gel cargado con la PCR de las colonias con la construcción del vector PX458 conteniendo la secuencia sgRNA1. El control corresponde a la PCR sin DNA. Como se observa, todas las colonias son positivas excepto la 4.

Para corroborar que los sgRNAs se habían insertado correctamente sin verse afectada su secuencia se amplificó por PCR la región del vector en la que se habían clonado usando los cebadores F-PX458 y R-PX458 (Anexo II). El producto de PCR de cada construcción se secuenció usando los mismos cebadores. La secuenciación confirmó que las sgRNAs se habían introducido de forma correcta en las cuatro construcciones (Anexo III). A continuación, se realizó una “*midiprep*” para obtener las construcciones en mayor cantidad para llevar a cabo las futuras transfecciones.

4.2. Evaluación de las construcciones en células HEK293T

Después de confirmar que las construcciones eran correctas se procedió a su evaluación para determinar si las secuencias diseñadas guiaban a la endonucleasa SpCas9 para generar el corte de doble cadena, y obtener la delección de 1,02 kb en el gen *CLN3*, mediante la combinación de un corte en cada extremo.

Para ello se emplearon células HEK293T. El motivo por el que se emplearon estas células para el análisis previo de la función del sistema CRISPR/Cas9 fue su facilidad de manejo en el laboratorio, la elevada eficiencia de transfección que presentan y su velocidad de crecimiento, lo que permite obtener resultados en un menor tiempo.

Antes de la transfección, para comprobar que las células HEK293T que íbamos a utilizar no presentaban mutaciones en la región de estudio del gen *CLN3*, se secuenciaron las dos regiones diana del sistema CRISPR/Cas9, es decir, la región 5' de la delección y la región 3' (Anexo IV). Las secuencias confirmaron que estas células no presentaban mutaciones puntuales en las regiones diana. Esto es muy importante, puesto que si existen cambios (SNPs, *single nucleotide polymorphism*), respecto a la secuencia del gen descrita en las bases de datos, podrían inhibir la correcta unión del RNA guía, y con ello Cas9 no podría cortar.

Las células se transfectaron con las construcciones por parejas con el objetivo de generar dos cortes y hacer saltar el fragmento del gen. Este método de evaluación es sencillo puesto que la delección que se desea evaluar es de gran tamaño.

Como el plásmido que se utiliza lleva la secuencia codificante para EGFP, se pudo seguir la eficiencia de la transfección con el microscopio de fluorescencia. A las 48 h de la transfección, se observó que para todas las parejas de construcciones había un 90 % de células que habían introducido los vectores y presentaban la EGFP (Figura 4.3).

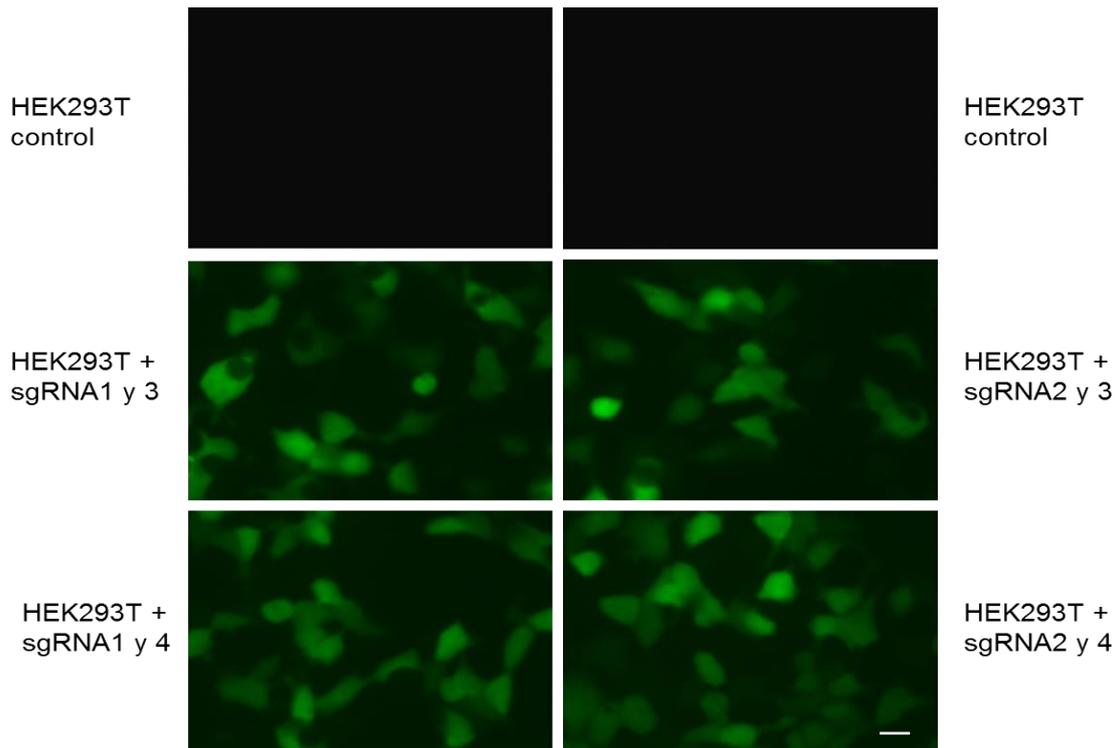


Figura 4.3. Células HEK293T transfectadas con la construcción de PX458 con las secuencias sgRNAs. En la parte superior de la figura se muestran dos imágenes de células HEK293T sin transfectar usadas como control que no presentan EGFP. A continuación se muestran las imágenes de las células HEK293T transfectadas con las 4 combinaciones diferentes de las parejas de guías (Barra: 40 μ m).

A las 72 h de la transfección se procedió a extraer el DNA genómico de estas células como se detalla en el apartado 3.2.3.2. La evaluación de la delección se llevó a cabo mediante PCR. Este método no nos permite cuantificar la eficiencia de cada una de las guías por separado, pero si nos permite conocer si el sistema CRISPR/Cas9 funciona.

Para este estudio, además del DNA genómico de las células HEK293T transfectadas, se empleó como control negativo DNA genómico de células HEK293T sin transfectar y como control positivo DNA genómico de fibroblastos de un paciente con la enfermedad de Batten. Los cebadores empleados para el análisis amplifican toda la región de la delección, hibridando fuera de ella. En el caso de que las células presenten la delección, el amplicón presenta un tamaño de 640 pb aproximadamente. Si por el contrario, las células no han sufrido el corte en

alguno de los extremos o en ninguno de ellos, el fragmento correspondiente a la deleción no habrá saltado, y por tanto, el tamaño del amplicón será de 1600 pb aproximadamente.

Como se observa en la Figura 4.4, los fibroblastos del paciente usados como control positivo muestran solo la banda de 640 pb correspondientes con la presencia de la deleción de 1,02 kb (calle 3), mientras que las células HEK293T control sin transfectar muestran una única banda de 1600 pb (calle 5). Las células transfectadas con todas las combinaciones muestran las dos bandas (calles 6-9) lo que indica que el sistema ha funcionado y que del 90 % de las células que estaban transfectadas y presentaban EGFP, algunas han sufrido el corte en ambos lados de la deleción y han unido los extremos reparando la región del genoma con la deleción. Además, significa que todos los CRISPR diseñados funcionan en mayor o menor medida. Este cambio puede estar presente en homocigosis, si el sistema ha modificado ambas cromátidas, o en heterocigosis, si la función de Cas9 se ha perdido antes de cortar ambas cromátidas.

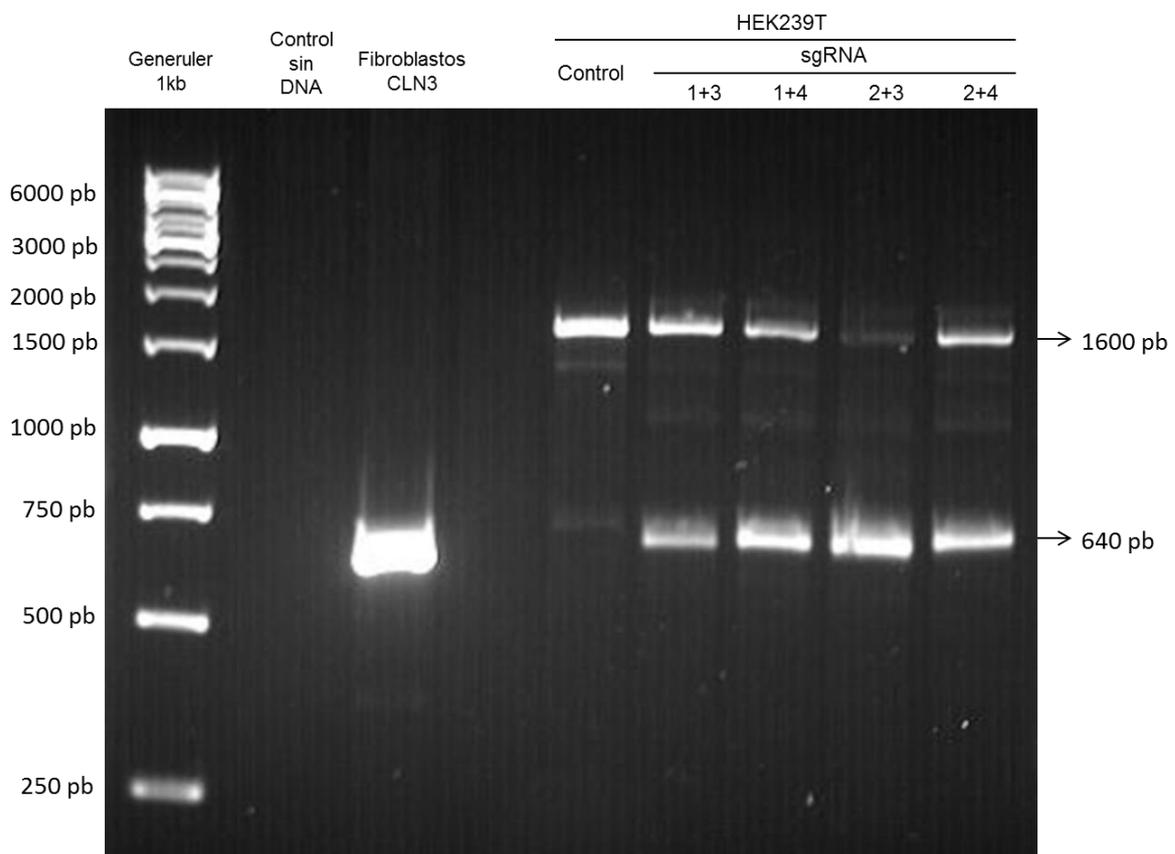


Figura 4.4. Evaluación de la función del sistema CRISPR/Cas9 en células HEK293T. En la imagen del gel podemos observar la presencia de una sola banda en las células usadas como control, uno con la deleción (fibroblastos de paciente) y otro sin la deleción (HEK293T sin transfectar). A continuación se encuentran las células transfectadas con las diferentes combinaciones.

Como se observa en la figura todas las combinaciones han funcionado y cabe destacar que la combinación de las guías sgRNA2 y sgRNA3 presenta mayor intensidad en la banda con la deleción que el resto de las células transfectadas. La combinación de las guías sgRNA1 y

sgRNA3 también mostró en otros geles una intensidad de banda más significativa que en los otros dos casos. Por tanto, estas dos combinaciones fueron las empleadas en el apartado siguiente, en el que se buscaba obtener líneas clonales con la delección.

4.3. Obtención de líneas clonales en HEK293T y SH-SY5Y

Para la obtención de líneas clonales con la delección más prevalente en la enfermedad de Batten se emplearon en paralelo células HEK293T y células SH-SY5Y. Las células HEK293T presentaron una elevada eficiencia de transfección y ofrecieron resultados óptimos en la evaluación inicial de las guías. Las células SH-SY5Y provienen de una línea celular humana de neuroblastoma, por lo que sus características son similares a las células que se encuentran más afectadas en esta enfermedad. Además, las dos líneas tienen un comportamiento similar a los fibroblastos a nivel de la respuesta lisosomal-endosomal a las condiciones de cultivo, de manera que estas líneas celulares pueden ser buenos modelos complementarios para el estudio de alteraciones en lisosomas y endosomas en la enfermedad.

Ambos tipos celulares fueron transfectados con la pareja de guías sgRNA1 y 3 y con la pareja sgRNA2 y 3. A continuación, y como se explica en el apartado de métodos, se usaron las técnicas de obtención de clones por dilución en placas de 96-well y la técnica de discos de clonaje para obtener colonias procedentes de una sola célula (Figura 4.5).

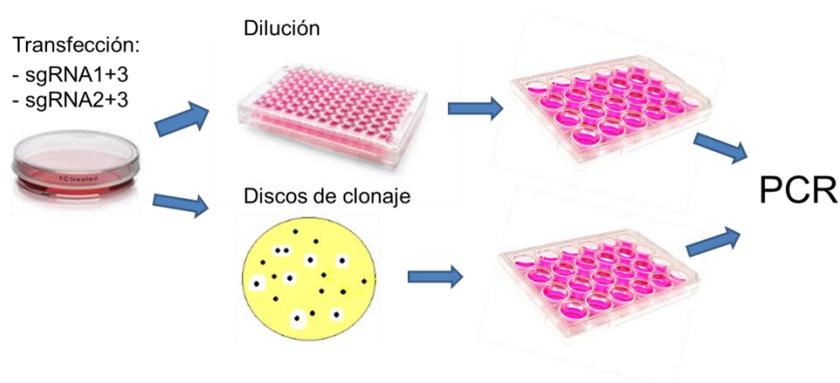


Figura 4.5. Esquema de los pasos realizados para la obtención de clones. En primer lugar se transfectaron células HEK293T y SH-SY5Y con las dos parejas que habían ofrecido mejores resultados en la evaluación inicial (sgRNA1 y 3 y sgRNA2 y 3). Para el aislamiento y obtención de clones de las células transfectadas se emplearon dos procedimientos: dilución en placa de 96-well (parte superior) y discos de clonaje (parte inferior).

Con ambos procedimientos el proceso requirió bastante tiempo debido a que las células después de la transfección crecían de forma más lenta. Por ejemplo, fue necesario esperar más de una semana para poder ver pequeñas colonias en los pocillos de las placas de 96-well. Además, el proceso de amplificación de cada clon para tener suficientes células para extraer DNA genómico y comprobar los clones por PCR también llevó varias semanas. Algunos

de los clones obtenidos no llegaron a ser analizados debido a que crecían formando agregados y perdían la adhesión a la superficie.

Este análisis se realizó con una PCR específica para el genotipado que permite diferenciar los clones homocigotos de los heterocigotos. Por un lado se empleó el cebador directo FRW5 que hibrida delante de la deleción y el cebador reverso REV3 que hibrida después de ésta. En este caso, el amplicón era de 1600 pb para los clones que no presentaban la deleción y de 640 pb para los que sí la tenían. Por otro lado, y para asegurar el resultado, se empleó el mismo cebador directo FRW5 y el cebador reverso REV5, que hibrida en la propia región de la deleción, por lo que en los clones que presentaban la deleción no se obtuvo producto de PCR y en los clones sin modificar, el amplicón resultó de 600 pb aproximadamente (Figura 4.6).



Figura 4.6. Esquema de los cebadores empleados en el análisis de los clones por PCR. En esta figura se representa el gen *CLN3* con la deleción objeto de estudio y los cebadores directos y reversos, representados con una flecha, que se han utilizado para el análisis.

Se analizaron un total de 46 clones de células HEK293T, de las cuales 20 se habían obtenido por dilución en placa de 96-well y 26 por el procedimiento con discos de clonaje. En total, 6 clones resultaron homocigotos para la deleción y 2 heterocigotos. Con respecto a las células SH-SY5Y, se analizaron un total de 43 clones y sólo se obtuvo 2 clones homocigotos y 1 heterocigoto. Es decir, tanto en HEK293T como en SH-SY5Y pueden observarse mejores resultados en los clones obtenidos por dilución (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Resultado del análisis de los clones obtenido en HEK293T y en SH-SY5Y. En esta tabla se recogen los datos del análisis de los clones según el tipo de célula y el procedimiento empleado para su obtención.

Tipo celular	Técnica	Clones analizados	Clones homocigotos	Clones heterocigotos
HEK293T	Dilución	20	5	1
	Discos	26	1	1
SH-SY5Y	Dilución	26	2	1
	Discos	17	0	0

Los casos en los que las células no presentan la delección pueden ser debidos a que la célula a partir de la que se formó la colonia no se transfectó y por tanto, no tenía el sistema CRISPR/Cas9, por lo que no pudo sufrir la modificación. Los clones que presentan la delección en heterocigosis puede deberse a que el sistema no ha podido cortar ambas cromátidas por cuestión de tiempo, ya que el plásmido que lleva el sistema CRISPR/Cas9 no se mantiene de forma constitutiva en las células. Sin embargo, el hecho de que se pierda la función de Cas9 es beneficioso puesto que el RNA guía podría unirse de forma inespecífica a otros puntos del genoma y generar cortes no deseados.

En cuanto a la combinación de guías empleada, cabe destacar que ambas líneas obtenidas en SH-SY5Y, tanto la homocigota como la heterocigota, provenían de células transfectadas con la combinación sgRNA2 y sgRNA3. Del total de los clones analizados, aproximadamente en el 50 % las células habían sido transfectadas con esta pareja de guías, por lo que se puede concluir en este caso que la combinación sgRNA1 y sgRNA3 no ha funcionado.

En cambio, los clones de HEK293T presentan diferentes resultados. Las dos líneas heterocigotas obtenidas previenen de la transfección con las guías sgRNA2 y sgRNA3, mientras que de las homocigotas, dos de ellas son el resultado de la transfección de sgRNA2 y sgRNA3 y las otras cuatro líneas clonales de las guías sgRNA1 y sgRNA3. En este caso la diferencia entre una combinación y la otra no parecen tan obvias.

Por lo que se refiere al aspecto de las células, las que tienen la delección presentan una morfología diferente a las células control. Así, las células HEK293T control presentan una morfología poligonal con ramificaciones y un núcleo bien visible en el centro. Las células con la delección, y en mayor medida las homocigotas, presentan una forma más globular, con el centro más engrosado y en muchos casos cuesta apreciar el núcleo celular. Además, y lo más característico de las células con la delección, es la presencia de unos acúmulos en el interior del citoplasma de las células, que se muestran refringentes al observar las células al microscopio (Figura 4.7), como ocurre en las células de los pacientes con enfermedad de Batten.

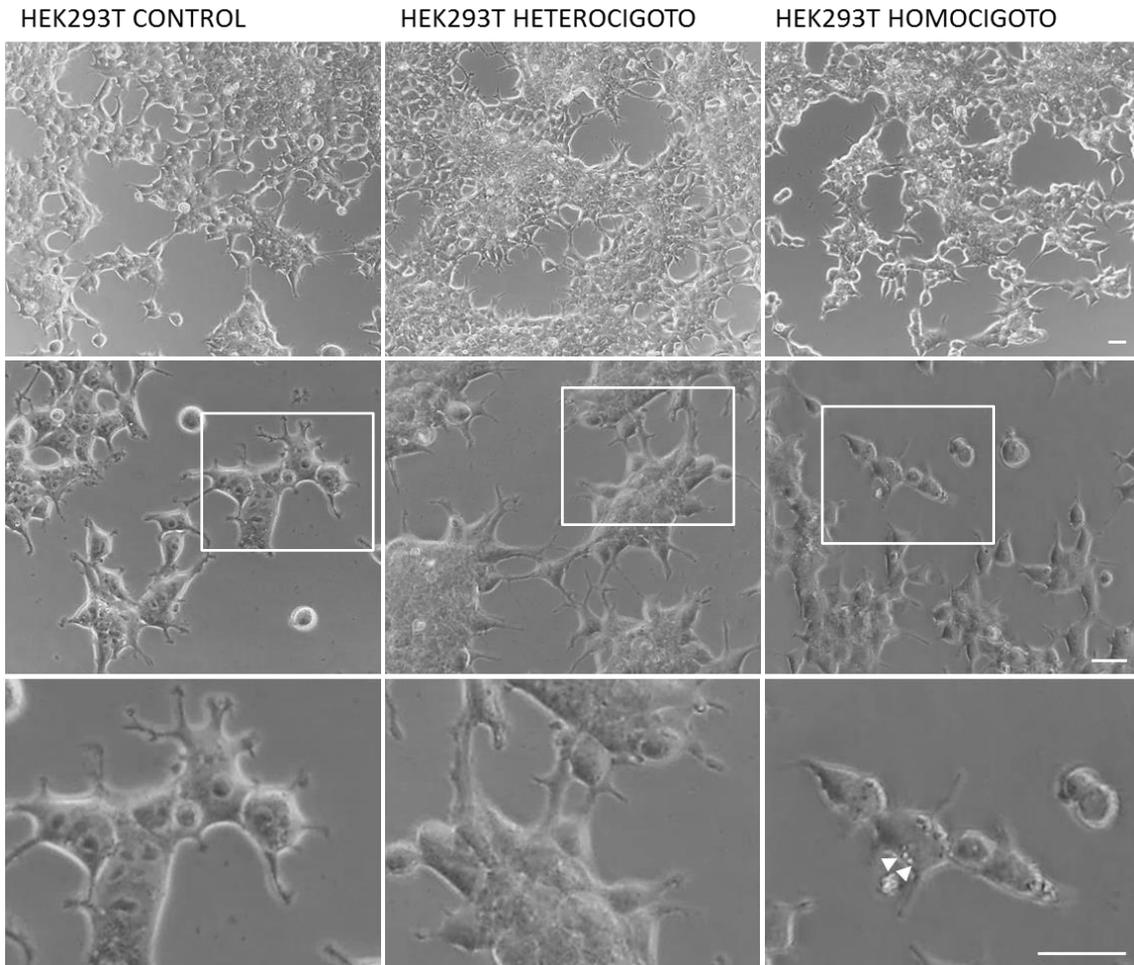


Figura 4.7. Imágenes de las células HEK293T. En esta figura se muestran las diferentes morfologías que presentan las células HEK293T (células control sin transfectar y células heterocigotas y homocigotas para la delección). Las imágenes se tomaron en un microscopio invertido de luz visible (Barra: 20 μm). La fila inferior es una ampliación del área enmarcada en blanco, en las células homocigotas se pueden ver los acúmulos marcados con flechas.

Las células SH-SY5Y control presentan una morfología más alargada y con ramificaciones. Este tipo celular con la delección en homocigosis muestran una forma más engrosada y crecen formando agregados. También pueden observarse en esas células los mismos acúmulos que en las células HEK293T mutadas (Figura 4.8).

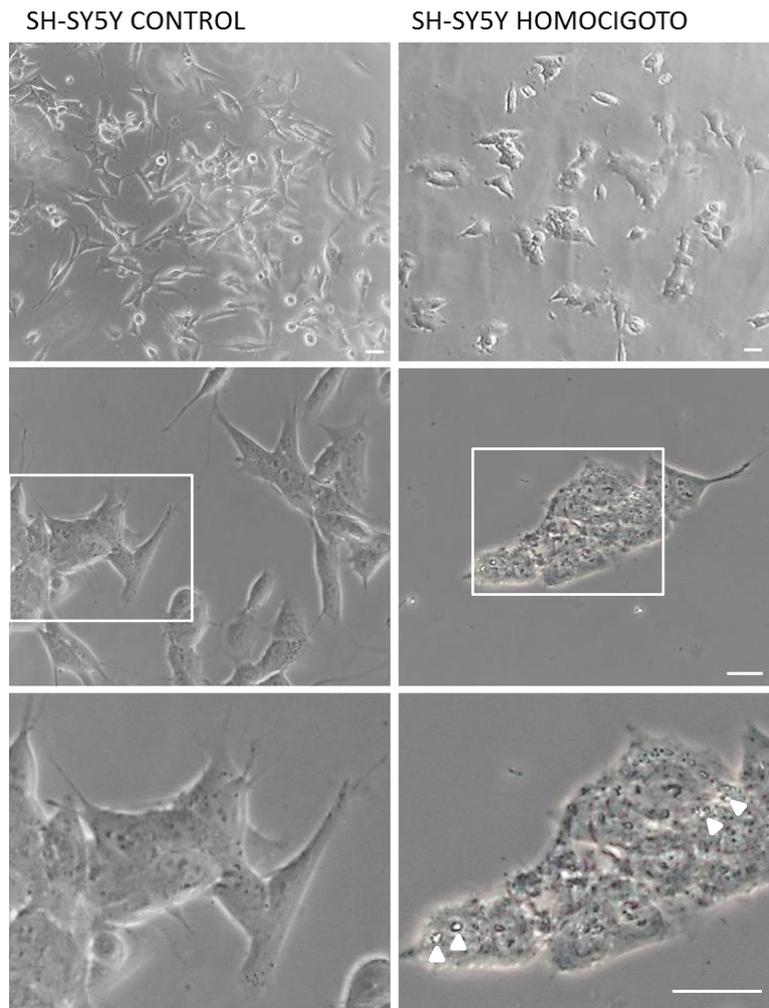


Figura 4.8. Imágenes de las células SH-SY5Y. En estas imágenes se muestra la diferencia entre la morfología de las células SH-SY5Y control sin transfectar y las células homocigotas. Las imágenes se tomaron en un microscopio invertido de luz visible (Barra: 20 μ m). La fila inferior es una ampliación del área enmarcada en blanco, en las células homocigotas se pueden ver los acúmulos marcados con flechas.

En resumen, se han modificado genéticamente células HEK293T y SH-SY5Y utilizando la tecnología CRISPR/Cas9, para producir la delección de 1,02 kb en el gen *CLN3* y se han obtenido varios clones que pueden ser útiles como modelo experimental para el estudio de la enfermedad de Batten.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que podemos destacar de este trabajo son:

- Se han diseñado cuatro sgRNAs funcionales para producir los cortes en los extremos de la delección de 1,02 kb del gen *CLN3* mediante la tecnología CRISPR/Cas9. El programa empleado, CRISPR RGEN Tools, ha hecho una predicción acertada de los mejores candidatos, ya que la evaluación de estas guías, usando células HEK293T, ha permitido comprobar que todas las combinaciones por parejas de sgRNAs generaban la delección.
- La combinación de sgRNAs con la que se han obtenido mejores resultados en SH-SY5Y ha sido la sgRNA2 y 3, mientras que en HEK293T los resultados han sido muy similares para la combinación sgRNA1 y 3 y para la combinación sgRNA2 y 3.
- La eficacia de transfección para obtener líneas estables con la delección de 1,02 kb en HEK293T y SH-SY5Y ha sido diferente. Ha sido mayor en HEK293T, obteniéndose seis líneas celulares homocigotas y otras dos heterocigotas. En cuanto a SH-SY5Y, se han obtenido dos líneas homocigotas y una heterocigota.
- La morfología que presentan las células modificadas es diferente a las células control, y se pueden ver inclusiones citoplasmáticas como ocurre en las células de los pacientes con la variante juvenil de lipofuscinosis ceroida neuronal.
- Estas líneas celulares obtenidas por la tecnología CRISPR/Cas9 podrían ser útiles para confirmar si las alteraciones observadas en los pacientes con enfermedad de Batten se deben a dicha delección y para profundizar más en el estudio de esta patología.

6. BIBLIOGRAFÍA

BACKMAN, M., SANTAVUORI, P., ABERG, L. AND ARONEN, E. (2005). Psychiatric symptoms of children and adolescents with juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Intellect Disabil Res*, 49(1), 25-32.

BAUER, D., CANVER, M. AND ORKIN, S. (2014). Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9. *J Vis Exp*, (95), e52118.

CÁRCEL-TRULLOLS, J., KOVÁCS, A. AND PEARCE, D. (2015). Cell biology of the NCL proteins: What they do and don't do. *Biochim Biophys Acta*, 1852(10), 2242-2255.

CHO, S., KIM, S., KIM, J. AND KIM, J. (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*, 31(3), 230-232.

CHOI, J., DANG, Y., ABRAHAM, S., MA, H., ZHANG, J., GUO, H., CAI, Y., MIKKELSEN, J., WU, H., SHANKAR, P. AND MANJUNATH, N. (2016). Lentivirus pre-packed with Cas9 protein for safer gene editing. *Gene Ther*, 23(7), 627-633.

EZAKI, J., TAKEDA-EZAKI, M., KOIKE, M., OHSAWA, Y., TAKA, H., MINEKI, R., MURAYAMA, K., UCHIYAMA, Y., UENO, T. AND KOMINAMI, E. (2003). Characterization of Cln3p, the gene product responsible for juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis, as a lysosomal integral membrane glycoprotein. *J Neurochem*, 87(5), 1296-1308.

GAJ, T., GERSBACH, C. AND BARBAS, C. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 31(7), 397-405.

GAO, F., SHEN, X., JIANG, F., WU, Y. AND HAN, C. (2016). DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Nat Biotechnol*, 34(7), 768-773.

GARCÍA GÓMEZ, P. (2014). *Optimización del diagnóstico de las variantes más prevalentes de lipofuscinosis ceroidea neuronal* (Trabajo Fin de Grado). Universitat Politècnica de València.

GOLABEK, A., KACZMARSKI, W., KIDA, E., KACZMARSKI, A., MICHALEWSKI, M. AND WISNIEWSKI, K. (1999). Expression studies of CLN3 protein (battenin) in fusion with the green fluorescent protein in mammalian cells in vitro. *Mol Genet Metab*, 66(4), 277-282.

JALANKO, A. AND BRAULKE, T. (2009). Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochim Biophys Acta*, 1793(4), 697-709.

KÄLVIÄINEN, R. (2015). Progressive myoclonus epilepsies. *Semin Neurol*, 35(03), 293-299.

KATZ, M., GAO, C., PRABHAKARAM, M., SHIBUYA, H., LIU, P. AND JOHNSON, G. (1997). Immunohistochemical localization of the Batten disease (CLN3) protein in retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38(11), 2375-2386.

KOLLMANN, K., UUSI-RAUVA, K., SCIFO, E., TYYNELÄ, J., JALANKO, A. AND BRAULKE, T. (2013). Cell biology and function of neuronal ceroid lipofuscinosis-related proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1832(11), 1866-1881.

KOUSI, M., LEHESJOKI, A. AND MOLE, S. (2011). Update of the mutation spectrum and clinical correlations of over 360 mutations in eight genes that underlie the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Hum Mutat*, 33(1), 42-63.

KREMMIDIOTIS, G. LENSINK I., BILTON R., WOOLLATT E., CHATAWAY T., SUTHERLAND G. AND CALLEN D. (1999). The Batten disease gene product (CLN3p) is a Golgi integral membrane protein. *Hum Mol Genet*, 8(3), 523-531.

KYTTÄLÄ, A., LAHTINEN, U., BRAULKE, T. AND HOFMANN, S. (2006). Functional biology of the neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL) proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1762(10), 920-933.

LANDER, E. (2016). The Heroes of CRISPR. *Cell*, 164(1-2), 18-28.

LUIRO, K., KOPRA, O., BLOM, T., GENTILE, M., MITCHISON, H., HOVATTA, I., TÖRNQUIST, K. AND JALANKO, A. (2006). Batten disease (JNCL) is linked to disturbances in mitochondrial, cytoskeletal, and synaptic compartments. *J Neurosci Res*, 84(5), 1124-1138.

MARRAFFINI, L. (2015). CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*, 526(7571), 55-61.

Microbioun.blogspot.com.es. (2016). *microBIO: Las bacterias también se “vacunan”: el sistema CRISPR/Cas*. [online] Available at: <http://microbioun.blogspot.com.es/2015/07/las-bacterias-tambien-se-vacunan-el.html> [Accessed 5 Sep. 2016].

MOJICA, F. AND MONTOLIU, L. (2016). On the origin of CRISPR-Cas technology: from prokaryotes to mammals. *Trends in Microbiol*, [Epub ahead of print]

MOJICA, F. AND RODRIGUEZ-VALERA, F. (2016). The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *FEBS J*, 283(17), 3162-3169.

MOLE, S. AND WILLIAMS, R. (2013). Neuronal ceroid-lipofuscinoses. University of Washington, Seattle. [online] Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1428/> [Accessed 3 Sep. 2016].

MUNROE, P., MITCHISON, H., O'RAWA, A., ANDERSON, J., BOUSTANY, R., LERNER, T., TASCHNER, P., VOS, N., BREUNING, M., GARDINER, R. AND MOLE, S. (1997). Spectrum of mutations in the Batten disease gene, CLN3. *Am J Hum Genet*, 61(2), 310-316.

Ncl-stiftung.de. (2016). *NCL-Stiftung - State of Research*. [online] Available at: <http://www.ncl-stiftung.de/main/pages/index/p/372> [Accessed 11 Sep. 2016].

OETJEN, S., KUHL, D. AND HERMEY, G. (2016). Revisiting the neuronal localization and trafficking of CLN3 in Juvenile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis. *J Neurochem*, [Epub ahead of print]

OSTERGAARD, J., RASMUSSEN, T. AND MOLGAARD, H. (2011). Cardiac involvement in juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten disease). *Neurology*, 76(14), 1245-1251.

RAN, F., HSU, P., WRIGHT, J., AGARWALA, V., SCOTT, D. AND ZHANG, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 8(11), 2281-2308.

RYAN, M., KING, A. AND THOMAS, G. (1991). Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol*, 72(11), 2727-2732.

SÁNCHEZ-RIVERA, F. AND JACKS, T. (2015). Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nat Rev Cancer*, 15(7), 387-395.

SCHULZ, A., KOHLSCHÜTTER, A., MINK, J., SIMONATI, A. AND WILLIAMS, R. (2013). NCL diseases - clinical perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 1832(11), 1801-1806.

SINGH, P., SCHIMENTI, J. AND BOLCUN-FILAS, E. (2014). A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics*, 199(1), 1-15.

VIDAL DONET, J. (2014). *Alteraciones en la degradación intracelular de proteínas y en la endocitosis en las lipofuscinosis ceroides neuronales infantil tardía y juvenil* (Tesis doctoral). Universitat de València.

VILLARROYA PÉREZ, A. (2002). *Bases Moleculares de las Lipofuscinosis Ceroides Neuronales* (Tesis doctoral). Universitat de València.

WARRIER, V., VIEIRA, M. AND MOLE, S. (2013). Genetic basis and phenotypic correlations of the neuronal ceroid lipofusinoses. *Biochim Biophys Acta*, 1832(11), 1827-1830.

WETTSTEIN, R., BODAK, M. AND CIAUDO, C. (2015). Generation of a knockout mouse embryonic stem cell line using a paired CRISPR/Cas9 genome engineering tool. *Methods Mol Biol*, 1341, 321-343.

WILLIAMS, R., ABERG, L., AUTTI, T., GOEBEL, H., KOHLSCHÜTTER, A. AND LÖNNQVIST, T. (2006). Diagnosis of the neuronal ceroid lipofuscinoses: an update. *Biochim Biophys Acta*, 1762(10), 865-872.

WOJTAL, D., KEMALADEWI, D., MALAM, Z., ABDULLAH, S., WONG, T., HYATT, E., BAGHESTANI, Z., PEREIRA, S., STAVROPOULOS, J., MOULY, V., MAMCHAQWI, K., MUNTONI, F., VOIT, T., GONORAZKY, H., DOWLING, J., WILSON, M., MENDOZA-LONDONO, R., IVAKINE, E. AND COHN, R. (2016). Spell checking nature: versatility of CRISPR/Cas9 for developing treatments for inherited disorders. *Am J Hum Genet*, 98(1), 90-101.

WOOD, A., LO, T., ZEITLER, B., PICKLE, C., RALSTON, E., LEE, A., AMORA, R., MILLER, J., LEUNG, E., MENG, X., ZHANG, L., REBAR, E., GREGORY, P., URNOV, F. AND MEYER, B. (2011). Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science*, 333(6040), 307.

ANEXO I. REGIÓN DEL GEN *CLN3* EN LA QUE SE ENCUENTRA LA DELECIÓN

GTCCTTTCTGTCTGCACCATATATTAGCTCATTTAAGCCACACAGCAGTCCTGTGAGCTAGGTGCTATGA
TATTCCCATTTTCCAGATGAGGAACTGAAGCTCAGAGAGTATAAACTCTTGACACACAATAAGGAGT
GGGAGAGCTGAGACTTGAACCCAGGCGTGCCTGACTCCAGAGCCTGTGTTTGTAGCAGGCCTGTTTGG
CCAGCTCCTGCCTCTCCTTGCCACGTGGTGGGAGGGTTGCCCTGGAAGCTCTGCGGTCTACTCT
ATTCTCCTGTCCCAGGCTGTGCTCCTGGCGGACATCTCCCCACACTCGTCATCAAATTGTTGGCTCCTCT
TGGCCTTACCTGTGCCCTACAGGTCTGGGTGAGGGTAGTGGGAGGCAGGGTGGGCAGGAGCTGAG
AAAGGGGAGGCTGGGATGGCTGAGATGCTGAGAGTAGAGACCGACCTTCCCCCTCCCTTCCCTTCTCA
CCCCCTCAGCCCCGGGTTCTCGTCAGTGGGATTTGTGCTGCTGGAAGCTTCGTCCTGGTTGCCTTTTCT
CATTCTGTGGGGACCAGCCTGTGTGGTGAAGTGTGTGGTTCTGTGTCAGATGGGGAGCCCCGAGGAACC
ACATCAGAGCATTGTGGGAAGAGTCTCCCCAGCCTCCCAGAGGAAAGGGATTCTTCTGTCCACCTTA
GAAGCCTGCTAGGGCTATCAGCAGTAGGCGATGGGAGACTGGGACAATTTGGAGGGGTAGGCAGTG
GAGGAGATGGGAGAAAATGGATGAATTAGATGGAGATTGAGGTGAACAAAGTCAAGACTCTGTGATG
GACCAGGCACAGTGAATCATGCCTATAATCCCAGCACTTTGGAAAGCCAAGGCAGGCAGATCACCTGA
GGTCAGGAGTTCGAAACCAGCCTGGCCAACATGGAGAAACCCCGTCTCTACCAAAAATACAAAATTA
GCTGGGTGTGGTGGCAGGAGCCTGTAATCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCTCTTGA
ACCTGGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCACGCCACTGTACTCCAGCCTGGGTGACAGGGCG
AGACTCCGTCTCCAAAAAGAAAAGAAAAGAAAAGACTGATGAAGGGGCAGAGACATCAAGGGTGCA
TGCTGCCCTGGTCTGATAACTGGGTGGATGGAGGTGCCACTCTCCATGAAGGGACACGCAGGGGAG
TGGGGCTCTGCTTCCAGACCTGGAACCTGGCCTATGCATGGGATCTATTGGAGCCTCTATGAGCTGATAC
TGAGGAGGCCATGGCCAGACACATTAGAGGCCTGGGCAGTGTGGCAAGGTGTGGTGTGACCATCCCA
GTGCTTGTCTCCCCCAGGTGTGGTCTTCGCTAGCATCTCATCAGGCCTTGGGGAGGTCACCTTCTCT
CCCTCACTGCCTTCTACCCAGGTAAGCAGGTGGAGCAGGGAGTGTGGGGAGAGGCTGTCCCATGGTC
AGCCTAGGTCCTCCTGAATGTTCTGTGTTCTCCTTCCCAGGGCCGTGATCTCCTGGTGGTCTCAGGGA
CTGGGGGAGCTGGGCTGCTGGGGGCCCTGTCTACCTGGGCCTCACCCAGGCCGGCCTCTCCCCTCAG
CAGACCCTGCTGTCCATGCTGGGTATCCCTGCCCTGCTGCTGGCCAGGTGAGCTGCCCTGAGCCGGA
GGGAGAGGGTCCAAGGAGAGAAAACCTGGCCATGGCTGGGTGTGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCA
GCATTTGGGAGGCCAAGGAGGGCAGATCGCCTAAGGTGAGGAAACCAGCCTGGCCAACATGGTGAA
ACCCCGTCTACTAAAAATACAACAATTAGCCAGGTGTGGTGGCGGGTGCCTGTAGTCCCAACTACTC
AGGAGGCTAAGGCAGGAGAATCGTTGAACCCCGAGGCAGTGGTGGCAGTGAGCCGAGATCGTGC
CATTGCACTCCAGCCCGGGCGACAGAGTTAGACTCTGTCTCAGGAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAGAA
AAGAAAACCTGATTATGATTGCAATCTTCAAAGTCCCTACCTGCTGTGAAGGGAGGCGGAATCTGGACT
CTGATAGCCCCAGGTGTGAGTCTGGAGCTGCCACTTTTTAGCTTTGTAGCGTTGAACAAGTTACTCCA
CCTCTCTGAACCCTCAGTTTCCCATATCTCAAATGGCAGTTGTTCTTGCTTTCCTTGGAGGTGATGAGG
GTAATGCATTCAGCACAGTGTGGTTCCCAAGGTGATTAGAAGTAGGATGAGGGTGGACTTTATTTGATT
AGTTCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATCAGTGTGACCAGGTTGGCCTCGAATGTGTAGCCTTGCCTG
CCTGAGTGCCAGGGCAACAGGCCTGAACCATGGCGACTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGA
GACGGAGTCTCATGGTGTCACTCAGGCTGGAGTGCAGTGAAGTGGTGTGATCTCAGCTCACTGCAGCCT
CGGCCTCCCGGGCTCTAGTGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCAGTAGCTGGGACTACAGGCCCATGCCA
CCATGCCTGGCTAATTTTTTATATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCACTGTATTGGCCAGGCTGGTCTCAA
ACTCCTGACCTCAAGTGAATCCACCTGCCTTGGCCTCCATAATGCTAGGAATACAGGCCTGAGCCACCG
CGCCCGCCTGATTAGTTCTGTGATTTTCATGCATATTACAAAACACTTTGGCCGGGCATGGTGGCTCA
CATCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGCGCACCACGAGGTCAGGAGTTTGA

ANEXO II. SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LAS sgRNAs Y CEBADORES PARA PCR

F-CR1 5'-CACCGAAAGAAAAAGACTGATGAAG

R-CR1 5'-AACCTTCATCAGTCTTTTCTTTC

F-CR2 5'-CACCGTGAAGGGGCAGAGACATCAA

R-CR2 5'-AACTTGATGTCTCTGCCCTTAC

F-CR3 5'-CACCGAAGTCCCTACCTTGCTGTGA

R-CR3 5'-AACTCACAGCAAGGTAGGGACTTC

F-CR4 5'-CACCGCCTCCCTTACAGCAAGGTA

R-CR4 5'-AACTACCTTGCTGTGAAGGGAGGC

FRW5 5'-GCTATCAGCAGTAGGCGATGG

REV5 5'-ACACTGCCCAGGCCTTAATG

FRW3 5'-GAGAGAAACTTGGCCATGGCTG

REV3 5'-CTCATCCTACTTCTAATCACCTTGG

F-PX458 5'-GAGGGCCTATTTCCCATG

R-PX458 5'-GTTATGTAACGGGTACCTCT

ANEXO III. SECUENCIACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES CON LOS sgRNAs

>HB1=F_PX458_G08.ab1

NNNNCNNGNTGTTAGANAGANAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAAT
ACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATC
ATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACAC
CGAAAGAAAAAGACTGATGAAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTA
TCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA
GGCTAGTCCGTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCCGTTACATAAC
TTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAA
TAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAG
TGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTGTGCC
AGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGT
CGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTA
TTTTTTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGN

>HB1=R_PX458_C09.ab1

NNNNNNNNNNNNNNCGNNNNNNCNNAACGGNNTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTA
AACANANNANCANCGANNCGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCT
ATTTCTAGCTCTAAAAC**CTTCATCAGTCTTTTTCTTTC**GGTGTTTCGTCTTCCACAAGATATATAAAGC
CAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAACATAATTTTAAACT
GCAAACACCCAAGAAATTATTACTTTCTACGTACAGTATTTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACAGTCAA
ATTAATTCCAATTATCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGG
CCCTCATATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCNNGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTT
TCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCN

>HB2=F_PX458_H08.ab1

NNNNNNNNNNNNGTTANAGAGANAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAA
ATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTA
TCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAAC
ACCGTGAAGGGCAGAGACATCAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGT
TATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAAT
AAGGCTAGTCCGTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCCGTTACATA
ACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAGTAACGCC
AATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA
AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTGTGC
CCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATG
GTCGANGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATT
TATTTATTTTTTTAATTATTTTGTGCNCGATGGGGGNNGNGNGGGGGGGNNNNNNCN

GGNCGGGGCGGNNNAGNGNCNGGCGGNNNNNGCNANNGTNCNNNNNCNNCNNNTCNNANNN
GNNNNCNNCNAANNNTNNNNTTTANNGGNNNNNNNN

>HB2=R_PX458_C09.ab1

NNNNNNNNNNNNNNNNNGNNNNNNNNNNANNNNGGANTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCT
CTAAACAANNNNNNNNNNNNNNNNTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACT
TGCTATTTCTAGCTCTAAACT**TTGATGTCTCTGCCCTTAC**GGGTGTTTCGTCCTTTCCACANGATATATA
NAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTA
AACTGCAAACACCCAAGAAATTACTTTCTACGTCACGTATTTGTACTAATATCTTTGTGTTNACA
GTCAAATTAATTCCAATTANCTCTCTAACAGCCTTGATCGTANATGCNAATANNANGGAATCATGGGA
AANANGCCCTCNCNTGTGAGCANANGGCCNGNNNNNNNNNNNAANCNTANANNNGNNNNNTTG
CNGG

>HB3=F_PX458_A09.ab1

NNNNNNNNNNNTGTTANAGAGANAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAA
ATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAATGGACTA
TCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAAC
ACCGAAGTCCCTACCTTGCTGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTA
TCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA
GGCTAGTCCGTTTTAGCGCGTGCGCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCCGTTACATAAC
TTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAA
TAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAG
TGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTGTGCC
AGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGT
CGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTAT
TTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGNNNNGGGNGGGNNNNCGCNCANGNNNNNG
NNNGGNNNNNGGNNNNGGNGNNNNNNCGNNNNNNNGNNNGAANNNTNNNNNNCGNNANCC
NNNNANANNNGNNNCNNTCNAANNNTTCNNTTTNNGNNNNNNNN

>HB3=R_PX458_C09.ab1

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCNNNNNNNGANTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCT
AAAACAANNNNNNNNNNNNNNNNTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTT
GCTATTTCTAGCTCTAAACT**TCACAGCAAGGTAGGGACTTC**GGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGATATAT
AAAGCCAAGAAATCGAAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTTAAAACATAATTTTA
AACTGCAAACACCCAAGAAATTACTTTCTACGTCACGTATTTGTACTAATATCTTTGTGTTTACA
GTCAAATTAATTCCAATTATCTCTCTAACAGCCTTGATCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAA
ATAGGCCCTCACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCNNNNAACCGTANAANGGCNNCGTTGCTG

GCGTTTTTCCANANNCCNCCNCCCCCNAGANNAGCATCANNANANNTCNANNCCNANGTCNGANGTG
GCNAANNCCGANAGGACNANNNNNNNACCAGNCNTTTCNNNNNNNANNGCNGNN

>HB4=F_PX458_B09.ab1

NNNNNNNNNTGTTANAGAGANAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAAT
ACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATC
ATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACAC
CGCTCCCTTACAGCAAGGTAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATC
AACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGG
CTAGTCCGTTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCCGTTACATAACTTA
CGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATA
GGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTGGCAGTACATCAAGTG
TATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTGTGCCAG
TACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCG
AGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTA
TTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCNNNGGNNNNNGNNNNNNCNCANGNGGGNNGGG
GCGGGGNCAGGGGCGGGNCGGNNNGCANNANNGTGCNNCNCNNNCNAATCANNANNNCGCG
CNCNAAAGTTNNCTTTNNNNNNNNNNNGNNGNNN

>HB4=R_PX458_C09.ab1

NNNNNGCGNNNGCGCTNANCGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACAAAAAG
CACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTA
AAACT**TACCTTGCTGTGAAGGGAGGC**GGTGTTTCGTCCTTCCACAAGATATATAAAGCCAAGAAATCG
AAATACTTTCAAGTTACGGTAAGCATATGATAGTCCATTTAAAACATAATTTAAAAGTCAAATACC
CAAGAAATTATTACTTTCTACGTACGTATTTGTACTAATATCTTTGTGTTACAGTCAAATTAATTCCA
ATTATCTCTAACAGCCTTGTATCGTATATGCAAATATGAAGGAATCATGGGAAATAGGCCCTCACAT
GTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTCCATAGG
CTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACT
ATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACC
GGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTANGTATCTCA
GTTCCGGTGTANGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCG
CCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA
CNGGTAACNGNANTAGCAGANCGAGGTATGTNGNCGGNGCTACANANTTCTGNAGTNGNNGCCNA
NCTANGNCTANNCTAGAANAACANNNTNGGNNNNNGCGCTCNCNNAANCCNNNTACCNTNNN
NNAANANTTGGNANTNTNGNNNNNNNNNNAACNNNNNNNNGGNANNGNNGNTTTTTTN
NTNNNNNNNNNNNATNNNNNNNAAAANNNNNNNNNNNNNNNNANNNNNNNNNNNNTNCNNG
NNNNNNN

ANEXO IV. SECUENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS HEK293T

>PCRHEK5=FRW5_F07.ab1

NNNNNNNGCAGNGGANANANGGGANANTGGATGAATTAGATGGAGATTGAGGTGAACAAAGTCA
AGACTCTGTGATGGACCAGGCACAGTGACTCATGCCTATAATCCCAGCACTTTGGAAAGCCAAGGCAG
GCAGATCACCTGAGGTCAGGAGTTCGAAACCAGCCTGGCCAACATGGAGAAACCCGCTCTACCAAA
AATACAAAAATTAGCTGGGTGTGGTGGCAGGAGCCTGTAATCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAG
GAGAATCTCTTGAACCTGGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCACGCCACTGTACTCCAGCCTG
GGTGACAGGGCGAGACTCCGTCTCCAAAAAGAAAAGAAAGAAAAGACTGATGAAGGGGCAGAG
ACATCAAGGGTTGCATGTCTGCCCTGGTCTGATAACTGGGTGGATGGAGGTGCCACTCTCCATGAAGG
GACACGCAGGGGAGTGGGGCTCTGCTTACAGCCTGGAACCTGGCCTATGCATGGGATCTATTGGAGCC
TCTATGAGCTGATACTGAGGAGGCCATGGCCAGACACATTAGAGGNNNGNCAAGTGTANNN

>PCRHEK3=REV3_F10.ab1

NNNNNNNGNNTNANNNNNNNNACCTCCAGGAAAGCAAGAACAACACTGCCATTTGAGATATGGGGAA
ACTGAGGGTTCAGAGAGGTGGAGTAACTTGTTCAACGCTACAAAGCTAAAAAGTGGCAGCTCCAGGAC
TCACACCTGGGGCTATCAGAGTCCAGATTCCG**CCTCCCTTACAGCAAGGTAGGGACT**TGAAGATTGC
AATCATAATCAAGTTTTCTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTNNNNCENNNAAAAAANNNNNNNNNNNCCC
CNGGGNGNNNNNNAANNNGNNNANTNNNGNNNNNNNNCNCNNNNNCCNCGGGNNNNNNNN
NNNNNCCCNCNNNNNNCCNNNNNNNTNNNNANNNNNNGNNNCCCCCCCCNNNCNGGNNN
ANTNNTNNNNTTTTNANNAAAANNGGNTNNNNCNNNNNNNGNNNNNNNNNNNNCNCNNNNNN
NNGNNAANNNNNCCNNTNNNCCNCAANNNGNGNNNTNNNGNNNNNNNNNNCNCNNNNCN
NNNNNGNNNAANTTTTTNNNNNNNNN