FACULTAT
DE CIÈNCIES
I TECNOLOGIA
UVIC | UVIC·UCC

Treball de Fi de Grau

# EDICIÓ DEL GEN ZO_1 PEL SEGUIMENT IN VIVO EN UN MODEL EPITELIAL

ARNAU GEA PAULO

**Grau en BIOTECNOLOGIA**

Tutor: Joan Bertrán Comulada

Co-tutor: Carlo Manzo

Vic, Maig de 2020

# Agraïments

Al meu tutor Joan Bertrán Comulada, li agraeixo la dedicació, l'interès i l'ajuda que m'ha donat, a més de la paciència que ha tingut, per tal de portar a terme aquest treball. A més a més, d'ensenyar-me habilitats, tècniques i coneixements, de l'àmbit científic, que no es poden assimilar dins d'una aula. Moltes Gràcies per confiar en mi i donar-me aquesta oportunitat.

Al meu cotutor Carlo Manzo, per brindar-me l'oportunitat de participar en aquest projecte dins del grup de Recerca QuBI de la Universitat.

A la meva mare, per ensenyar-me els valors que m'han fet qui sóc avui en dia, a guiar-me i acompanyar-me durant aquests anys a més de mostrar-me el camí quan aquest semblava incert. Per preocupar-se, per ajudar-me a continuar endavant i enfrontar els problemes, a ser fort, a estimar i a viure intensament sempre gaudint de cada moment. Gràcies per ser la millor mare del món, t'estimo.

Al meu pare, per acompanyar-me, ensenyar-me i cuidant-me durant els meus primers anys, i per continuar donant-me suport allà on estigui. Moltes Gràcies.

A la meva germana, avis, tieta, cosins i nebots, per voler que en un futur siguis qui vulguis ser, que tinguis somnis, siguis feliç i que ningú s'interposi mai en el camí que vulguis prendre.

Als meus amics, primerament aquells amics que m'han acompanyat durant tota la meva vida, el Pandis, i també a tots aquells amics que he conegut durant la carrera i que han fet que aquesta experiència sigui inoblidable: Carlos, Ariane, Mariona, Maria , Laura i Michelle, pel seu suport, per creure en mi, per ser-hi sempre que m'he ensorrat, pels cafès, per les cerveses, pels riures, per les festes, per les xerrades interminables i pels moments que ens encara en queden per viure.

A la meva parella, l'Àlex, per donar-me pau en els moments necessaris, per ensenyar-me a no ser tan impacient i gaudir més les experiències, per fer-me veure que no tot és impossible i pels moments viscuts i que ens falten per viure. T'estimo.

## Resum

**Títol:** *EDICIÓ DEL GEN ZO_1 PEL SEGUIMENT IN VIVO EN UN MODEL EPITELIAL.*

**Autor:** Arnau Gea Paulo.

**Tutor:** Joan Bertran Comulada i Carlo Manzo.

**Data:** Juny de 2020.

**Paraules clau:** *Epitelis, Unions estretes*, *ZO_1,Caco 2, CRISPR-CAS, CAS9, plàsmid.*

*Aquest treball de final de grau, ens apropa a l'enginyeria genètica molecular creant una proteïna de fusió, entre una proteïna que es troba a les unions estretes i una altra que emet fluorescència. El plantejament d'aquest, és crear aquesta proteïna quimèrica en una línia cel·lular concreta per tal de portar a terme posteriors estudis. Primerament, en la introducció d'aquest treball, s'explicarà alguns conceptes claus per tal d'entendre el perquè de l'objectiu principal. Seguidament, trobarem els materials emprats per fusionar aquestes dues proteïnes i la metodologia utilitzada per crear aquesta fusió. Després, es veuran els resultats obtinguts que demostren la factibilitat del projecte. Finalment, es valoraran tots els factors a través d'unes conclusions que ens permetran avaluar els objectius inicials presentats.*

## Abstract

**Title:** *ZO-1 GENE EDITION FOR LIVE TRACKING IN EPITHELIAL MODEL.*

**Author:** Arnau Gea Paulo.

**Supervisor:** Joan Bertran Comulada i Carlo Manzo.

**Date:** June 2020.

**Keywords:** *Epithelia*, *Tight Juctions, ZO_1, Caco 2, CRISPR-CAS, CAS9, plasmid.*

*This final degree project brings us closer to molecular genetic engineering by creating a fusion protein between a protein found in close bonds and a fluorescence protein. The aim is to create a chimeric protein in a specific cell line in order to carry out further research. Firstly, some key concepts will be explained in the introduction to this paper, in order to clarify the reason behind the main objective, as well as to present the other significant objectives. Secondly, the materials used to fuse these two proteins will be explained, in addition to the methodology used to create this fusion. Thirdly, the results of the methodology will be presented, where it will be debated whether this protein has been properly fused. Finally, all the factors will be assessed through a conclusion that will allow us to evaluate the initial objectives presented.*

# Índex

**1.Introducció ..... 8**

1.1 Les Unions Estretes ..... 8

1.1.1 Epitelis i Zones Oclusives ..... 8

1.1.2 Zona Ocludense 1 (ZO_1) ..... 12

1.1.3 Model CaCO2 ..... 16

1.2 L'etiquetatge de proteïnes pel seu seguiment in vivo ..... 16

1.2.1 Proteines fluorescent i Mcherry ..... 17

1.2.2 Tècnica CRISPR/Cas9 ..... 17

**2. Objectius ..... 20**

**3. Treball experimental ..... 21**

3.1 Materials ..... 21

3.2 Mètodes ..... 22

3.2.1 Disseny de primers ..... 22

3.2.2 Purificació d'ADN genòmic ..... 22

3.2.3 PCR i SOE ..... 23

3.2.4 Digestió amb enzims de restricció ..... 24

3.2.5 Anàlisi d'ADN a partir d'electroforesis en gels d'agarosa ..... 24

3.2.6 Purificació d'ADN plasmídic ..... 25

3.2.7 Lligació i transformació ..... 25

3.2.8 Seqüenciació per Sanger ..... 26

3.2.9 Cultiu de cèl·lules CaCO2 ..... 26

3.2.10 Transfeccions ..... 27

3.3 Resultats i discussió ..... 27

3.3.1 Disseny de Primers ..... 28

3.3.2 Construcció plàsmid pLentiCRISPRv2-ZO_1 ..... 31

3.3.3 Construcció plàsmid pBluescript-Reparador ..... 34

3.3.4 Transfecció de la línia cel·lular CaCO2 amb els plasmidis pLentiCRISPRv2-ZO_1 i pBluescript-Reparador ..... 38

**4. Conclusions i Reflexions finals ..... 40**

4.1 Conclusions ..... 40

4.2 Reflexions finals ..... 40

**5. Bibliografia ..... 42**

**6. Webgrafia ..... 45**

## Llistat de Taules

**Taula 1:** Seqüencies dels primers utilitzats en aquest projecte. En verd les dianes de restricció per la digestió amb BsmBI, per poder lligar el fragment sgARN amb pLentiCRISPR v2 i en groc les dianes de restricció per els enzims XhoI i BamhI, per poder lligar el fragment reparador amb pBluescript SK (+). ..... 21-22

## Llistat de Figures

**Figura 1:** Les unions cèl·lula-cèl·lula estan formades per: desmosomes, les unions comunicants (UC), les unions adherents (UA) i les unions estretes (UE) (Erika & Rendón-Huerta, 2008). ..... 9

**Figura 2:** Representació d'una unió estreta entre les cèl·lules. També trobem proteïnes que formen la unió. (Foto extreta de la pàgina https://biologydictionary.net) ..... 10

**Figura 3:** Tipus d'unions. Unions bicel·lulars i tricel·lulars (Tervonen et al., 2019). ..... 11

**Figura 4:** Representació esquemàtica de les proteïnes que conformen les UE i la manera en la que interactuen. (Erika & Rendón-Huerta, 2008). ..... 12

**Figura 5:** Organització de domini comparatiu d'alguns membres de la família de proteïnes MAGUK. Tots contenen un nucli de dominis PDZ, SH3 i GK. També es pot observar els dominis α, β i γ de la ZO_1. La P fa referencia a un domini ric en prolina. NLS (de l'angles nuclear localization signal) són les senyals de localització nuclear (González-Mariscal et al., 2000). ... 13

**Figura 6:** Organització de domini comparatiu d'alguns membres de la família de proteïnes MAGUK. Tots contenen un nucli de dominis PDZ, SH3 i GK (González-Mariscal et al., 2000).... 14

**Figura 7:** Seqüència d'aminoàcids ZO-1. Per claredat només es mostra de l'aminoàcid 721 fins el 1320 de l'isoforma α +. La seqüència en groc, fa referència als 80 aminoàcids que diferencien la isoforma α + de α . ..... 15

**Figura 8:** Mecanismes del complex cas9 (unió del sgARN amb la seqüència diana i reparació de l'ADN. (Christin & Beckert, 2017). ..... 19

**Figura 9:** Parts del ADN reparador. Les fletxes que es dirigeixen cap a la dreta fan referència als primers FW, mentre que les línies que van cap a l'esquerra representen els primers RV. Els cercles en negre representen el SOE (de l'anglès Senquence Overlap Extension). ..... 29

**Figura 10:** Seqüència del gen de la proteïna ZO_1, que va de la posició 29700176 a 29703195. En groc podem veure la seqúencia sgARN, amb lila la seqüència PAM i amb vermell el codó STOP. ..... 29

**Figura 11:** Construcció de l'ADN reparador. A) seqüència codificant per l'extrem C-terminal de ZO_1. Sobre fons groc es mostra la seqüència dels 20 nucleòtids que donen especificitat al sgARN i s'indica, en blau, el punt de tall de Cas9. També es mostra el PAM sobre fons lila i el codó stop sobre fons vermell. B) seqüència modificada en l'ADN reparador per evitar el seu reconeixement pel sistema CRISPR-Cas. S'ha mutat la tercera base de cada triplet codificant amb canvis sinònims, que resulten en traducció sense canvis d'aminoàcids a la proteïna resultant. Els canvis respecte de A estan marcats en vermell. C) Es mostra part de l'ADN reparador, com a B, afegint

seqüències a 5' que corresponen a part del braç d'homologia upstream i la substitució del codó stop per seqüències que codifiquen per un linker entre ZO_1 i la proteïna mCherry (sobre fons verd).. ..... 30

**Figura 12:** Esquema del plàsmid pLentiCRISPR V2. Imatge proporcionada per la pagina d'Addgene (Addgene: Homepage, 2020).. ..... 31

**Figura 13:** Representació de la digestió amb BsmBI. ..... 32

**Figura 14:** Gel d'agarosa per tal de veure si la lligació amb el plàsmid pLentiCRISPR v2 ha funcionat.. ..... 33

**Figura 15:** Cromatograma on es mostra la inserció del sgARN, seqüència que es mostra marcada amb groc, dins el plàsmid pLentiCRISPRv2.. ..... 33

**Figura 16:** En la figura A podem observar la unió, a partir d'una SOE, del braç d'homologia 5' i l'ADN sintètic per construir el constructe A. En canvi, en la figura B s'observa la unió entre el fragment mCherry i el braç d'homologia 3' per construir el constructe B. ..... 34

**Figura 17:** Anàlisis de les PCR per a la síntesi dels constructes A i B, a partir de les SOE entre el braç d'homologia 5' amb el fragment d'ADN sintètic i el fragment mCherry amb el braç d'homologia 3' . Es mostra la imatge del gel d'agarosa utilitzat en l'anàlisi..... 34

**Figura 18:** En aquesta representació podem observar com a partir d'una SOE, el constructes A i B s'han unit per tal de formar el fragment reparador que posteriorment es lligarà amb el plàsmid pBluescript SK (+) . ..... 35

**Figura 19:** Anàlisi de la PCR per a la unió dels constructes A i B, a partir d'una SOE, per formar el fragment d'ADN reparador. Es mostra la imatge del gel d'agarosa utilitzat en l'anàlisi. ..... 35

**Figura 20:** Plàsmid pBluescript SK (+). Imatge proporcionada per la pàgina d'Addgene. El requadre vermell fa referència a les dianes de restricció que després de la digestió amb SalI i BamhI desapareixen.(Addgene: Homepage, 2020). ..... 36

**Figura 21:** Anàlisi de 2 clons que, putativament, contenen l'ADN reparador. Es van créixer els dos clons, aïllar el plàsmid per miniprep i analitzar una alíquota per digestió amb Pst I. Es mostra la imatge del gel d'agarosa utilitzat en l'anàlisi.. ..... 37

**Figura 22:** Cromatograma de la seqüenciació del plàsmid pBluescript-Reparador, on s'observa la seqüència amb les mutacions; requadre negre, la seqüència del linker; requadre verd i l'inic de la seqüència mCherry; requadre vermell.. ..... 37

**Figura 23:** Edició del genoma de cèl·lules CaCO2. Cèl·lules CaCO2 prèviament editades al locus de la occludina, que expressen una occludina etiquetada amb la proteïna verda fluorescent mEmerald, van ser co-transfectades amb els constructes generats en el present TFG, pLentiCrispv2-ZO_1 i pBluescript-Reparador, incubades en puromicina des de 48 hores després de la transfecció fins 120 hores després de la transfecció i després expandides en absència de selecció durant 15 dies. En aquest moment es van mirar al microscopi de fluorescència. A: camp clar; B: fluorescència deguda a m-Emerald; C: fluorescència deguda a ZO_1-mCherry.....39

## Llistat d'abreviacions

| Abreviació | Significat |
|---|---|
| **UA** | *Unions Adjacents* |
| **UC** | *Unions Conjuntes* |
| **UE** | *Unions Estretes* |
| **JAM** | *Junctional Adhesion Molecules** |
| **ZO_1** | *Zonula Ocludense 1* |
| **MAGUK** | *Membrane-Associated Guanylate Kinase** |
| **GFP** | *Green Fluorescent Protein** |
| **CRISPR** | *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats** |
| **ARN** | *Àcid Ribonucleic* |
| **ADN** | *Àcid Desoxiribonucleic* |
| **Sg** | *Single Guide ** |
| **SgARN** | *ARN guia* |
| **SOE** | *Splicing by Overlap Extension** |
| **PCR** | *Polymerase Chain Reaction** |
| **bp** | *Base pair** |
| **E.Coli** | *Escherichia coli** |
| **RV** | *Reverse** |
| **FW** | *Forward** |
| **NCBI** | *National Center for Biotechnology Information Search database** |

** Abreviatures provinents de l'anglès*

# 1.Introducció

Els epitelis constitueixen barreres biològiques que regulen el pas de moltes molècules i entitats més grans al seu través. Aquesta barrera és molt important en l'intestí on l'epiteli contribueix: a l'absorció selectiva de nutrients i a l'exclusió de microorganismes i entitats moleculars complexes de l'interior de l'organisme. La funció de transport de nutrients depèn de la permeabilitat de la membrana plasmàtica i de la presència de proteïnes transportadores ubicades en les membranes de les cèl·lules epitelials.

A l'hora de parlar d'aquesta barrera formada pels epitelis intestinals, les unions, cèl·lula-cèl·lula, són molt importants. De fet, hi ha unes estructures en les membranes laterals de les cèl·lules de l'epiteli intestinal, també presents en altres barreres biològiques, que eviten, o dificulten, el pas de substàncies de manera paracel·lular, és a dir, entre les cèl·lules que constitueixen aquesta barrera. Entre aquestes estructures trobem les Unions Estretes o "Tight Junctions".

En el present treball s'ha plantejat generar un model, a partir d'una proteïna de fusió, per l'estudi de la dinàmica d'una proteïna concreta associada a les unions estretes que pot també ser útil per l'estudi de l'organització d'aquestes estructures.

## 1.1 Les Unions Estretes

### 1.1.1 Epitelis i Zones Oclusives

Els epitelis són capes de cèl·lules que recobreixen una superfície i/o cavitats corporals. La seva funció principal és la de separar diferents compartiments en un mateix organisme a més de regular el pas de substàncies entre ells, sigui mitjançant mecanismes de transport transcel·lular o a partir de transports paracel·lulars. A més a més, els epitelis estan formats per un complex d'unió cel·lular format per vàries subunitats ben definides que inclouen les unions adherents (UA), els desmosomes, les unions comunicants (UC) i les unions estretes (UE).(Figura 1)

Per una banda, les UA són les encarregades de donar força mecànica a les cèl·lules a l'estar unides al citoesquelet d'actina. En canvi, els desmosomes són els responsables de donar consistència a les membranes basolaterals de les cèl·lules a més de promoure llocs d'unió per filaments intermediaris. Per altra banda, les UC , que formen canals adjacents, donen pas a la comunicació entre les cèl·lules, permeten el pas de ións i petites molècules de citoplasma a citoplasma de cèl·lules veïnes, donant lloc a unions metabòliques i elèctriques. (Niessen, et al., 2007; Erika & Rendón-Huerta, 2008)

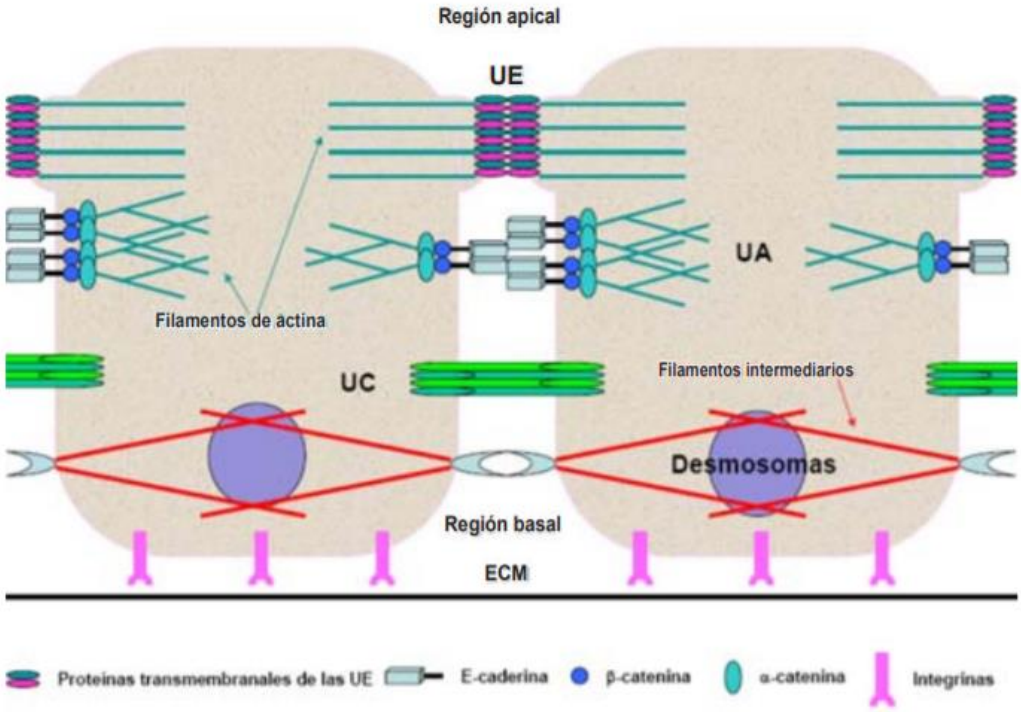


**Figura 1. Les unions cèl·lula-cèl·lula estan formades per: desmosomes, les unions comunicants (UC), les unions adherents (UA) i les unions estretes (UE) (Erika & Rendón-Huerta, 2008).**

Les UE o zones oclusives són el component més apical del complex d'unions intercel·lulars. Aquestes estructures altament dinàmiques funcionen com una barrera hermètica, depenent de les condicions fisiològiques i patològiques a més d'altres estímuls externs, que separen els dominis apicals dels basolaterals, a més de tenir un paper molt important en l'homeòstasi, la polaritat dels teixits i en mantenir les cèl·lules unides, formant una làmina entre dues cèl·lules adjacents a partir de ramificacions proteiques, que s'uneixen als microfilaments del citoesquelet (Erika & Rendón-Huerta, 2008: Figura 2).

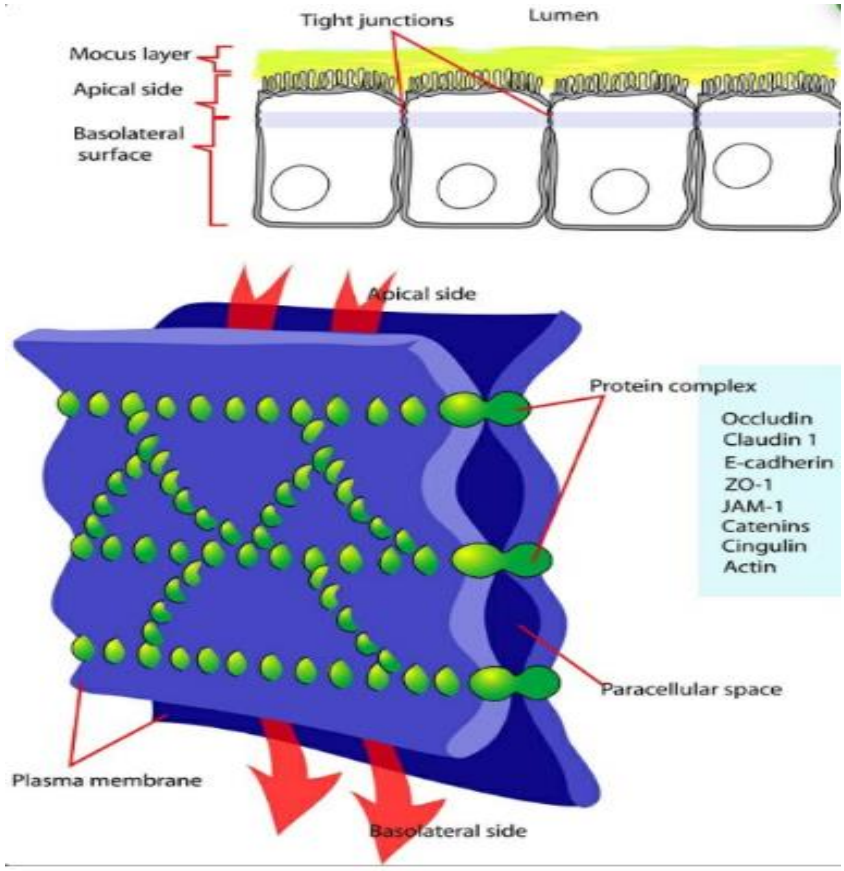


**Figura 2. Representació d'una unió estreta entre les cèl·lules. També trobem proteïnes que formen la unió. (Foto extreta de la pàgina https://biologydictionary.net)**

Les UE, presenten dos tipus d'unions: unions bicel·lulars i unions tricel·lulars. Les primeres apareixen com una xarxa de brins entre dues cèl·lules. El segon tipus d'unió, es forma en les interseccions de tres cèl·lules (Tervonen et al., 2019). (Figura 3)

Aquestes unions, quan es visualitzen per microscòpia electrònica de seccions ultrafines, es veuen punts de fusió entre cèl·lules adjacents, mentre que per criofractura, semblen una xarxa de fibres que envolten la regió apical de la cèl·lula (Erika & Rendón-Huerta, 2008).

Com s'ha comentat anteriorment, aquesta estructura no és estàtica, ja que està regulada per canvis en la composició de les proteïnes de les UE i del citoesquelet d'actomiosina. Les propietats de la barrera epitelial generalment es caracteritzen per com els ions i les molècules petites penetren en l'epiteli. (Tervonen et al., 2019) Es suposa que les molècules i els ions penetren a través de les UE per dues rutes: la via de porus i la via de fugides. La via de porus és una via d'alt rendiment per a molècules amb un radi menor de 0.4 nm a través de porus formats per algunes Claudines. La permeabilitat iònica d'aquests porus depèn de l'especificitat iònica de les Claudines que

els formen. En canvi, la via de fugida és una via inespecífica de baix rendiment amb un límit de grandària suposada de 6 nm. (Tervonen et al., 2019)

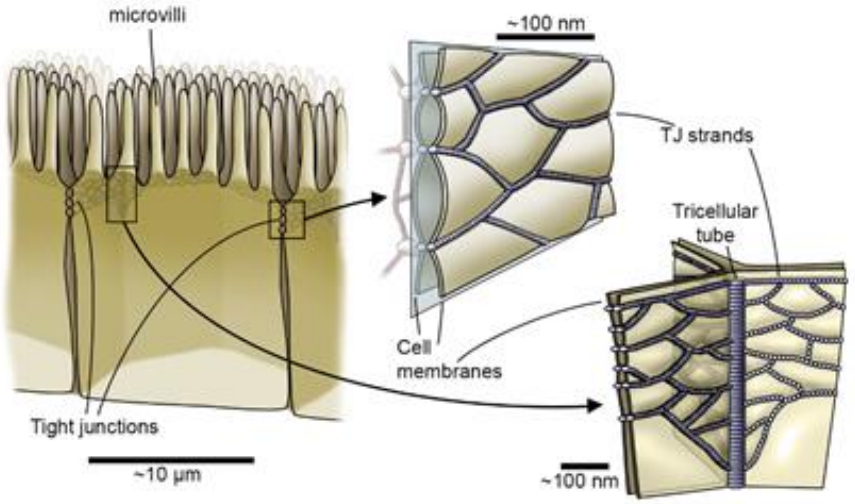


**Figura 3. Tipus d'unions. Unions bicel·lulars i tricel·lulars (Tervonen et al., 2019).**

Aquestes zones oclusives estan formades per unes 40 proteïnes, que es poden dividir en 4 grups diferents (Figura 4) :

- **Proteïnes transmembrana:** aquelles proteïnes que interacciones amb proteïnes de la seva mateixa família, presents en les cèl·lules adjacents, formant canals paracel·lulars amb la capacitat de discriminar el pas de les molècules segons el seva mida i càrrega. Aquestes estan unides al mig de la membrana, i la seva funció és la d'adhesió i permeabilitat. Les Claudines, Ocludines i les JAM serien un exemple d'aquest grup.

- **Proteïnes citosòliques o estructurals:** aquelles que organitzen i ancoren les proteïnes transmembrana als filaments d'actina, com és el cas de les zònules occludens 1, 2 i 3 (ZO-1, ZO-2, ZO-3).

- **Proteïnes de senyalització:** aquelles responsables de regular l'assemblatge del complex.

- **Proteïnes tràfic vesicular:** aquelles que regulen el transport de proteïnes a la membrana, a més també estan presents en la regulació de l'expressió gènica.

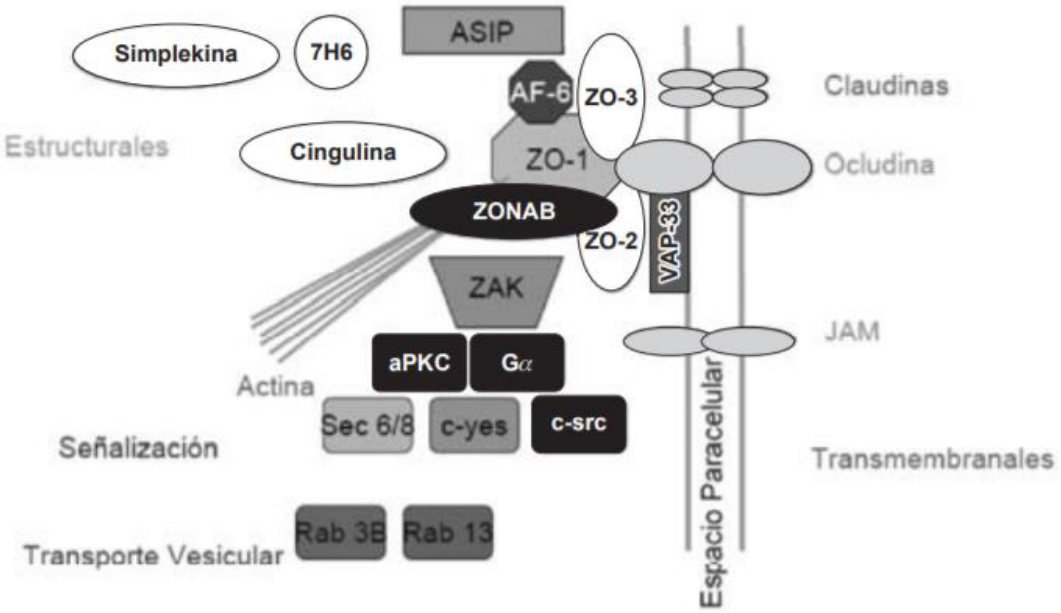


**Figura 4. Representació esquemàtica de les proteïnes que conformen les UE i la manera en la que interactuen. (Erika & Rendón-Huerta, 2008).**

De les més de 40 proteïnes que formen les unions estretes, aquest treball s'ha centrat en la proteïna Zona Ocludens 1 que té la funció d'unir els filaments d'actina amb les unions estretes.

### 1.1.2 Zona Ocludense 1 (ZO_1)

La proteïna Zona Ocludense 1 (ZO_1) forma part, juntament amb ZO_2 i ZO_3, de la família de proteïnes de guanilat quinasa associada a membrana, amoneda MAGUK. (Fanning et al., 1998) Aquestes proteïnes s'han reconegut com a components de les unions estretes. A més a més, contenen múltiples dominis d'interacció proteïna-proteïna que les fan aptes per ser proteïnes de bastida de les unions estretes. Gràcies a aquesta propietat, aquestes exhibeixen una doble funció en les zones oclusives. Per una banda participen en l'organització estructural del complex d'unió en la membrana plasmàtica, a més de la permeabilitat d'aquesta membrana i per l'altra banda, també poden actuar com una molècula de transducció de senyal (González-Mariscal et al., 2000).

Pel que fa a la seva estructura, sabem que en ser part de la família MAGUK, aquesta proteïna es caracteritza per tenir un motiu central compost de tres dominis, encarregats d'unir-se altres de proteïnes: el domini PDZ, el domini SH3, i una regió d'homologia guanilat quinasa GK (Nomme et al., 2011).

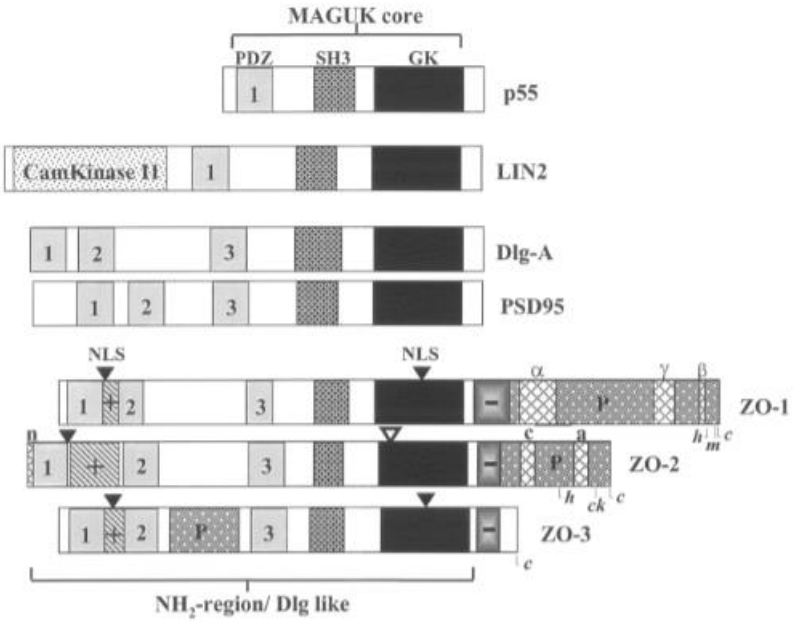


**Figura 5. Organització de domini comparatiu d'alguns membres de la família de proteïnes MAGUK. Tots contenen un nucli de dominis PDZ, SH3 i GK. També es pot observar els dominis α, β i γ de la ZO_1. La P fa referencia a un domini ric en prolina. NLS (de l'angles nuclear localization signal) són les senyals de localització nuclear (González-Mariscal et al., 2000).**

Els dominis PDZ, elements estructuralment conservats originaris de les proteïnes PSD-95, Dlg-A i ZO_1 (d'aquí l'acrònim PDZ), són mòduls de 80-90 aminoàcids. Les proteïnes MAGUK com la ZO_1 tenen tres dominis en el seu N-terminal: PDZ1, PDZ2 i PDZ3. (Figura 5) El primer, PDZ1, és l'encarregat d'unir-se a les Claudines, proteïnes transmembrana formadores de barreres; el segon, PDZ2, té la capacitat de formar dímers que s'uneixen a les zones oclusives i el tercer, PDZ3, s'uneix a la molècula d'adhesió cel·lular JAM-A, encarregada de regular la permeabilitat de les unions estretes. (Figura 6)

El paper crucial que juguen els dominis PDZ és l'agrupament espacial i l'ancoratge de proteïnes transmembrana amb dominis cel·lulars específics a més a més de l'augment de l'eficiència de certs canals. Aquestes bastides també poden acoblar canals i receptors transmembrana a elements de senyalització (González-Mariscal et al., 2000).

En canvi els dominis SH3 són mòduls de 55-70 aminoàcids. En el cas de la ZO-1, el domini SH3 s'uneix a ZAK, serina quinasa, que fosfori-la una regió C-terminal del domini. No obstant això, l'impacte d'aquestes fosforilacions en el paper de ZO-1 continua sent desconegut. A més a més, un factor de transcripció, ZONAB, també s'uneix aquest domini, juntament amb ZO_1, modulant la permeabilitat paracel·lular i a progressió del cicle cel·lular (Balda et al., 2003).

El mòdul GK és homòleg de l'enzim que catalitza la conversió de GMP a GDP a costa de ATP. No obstant això, les proteïnes de les zones oclusives MAGUK, no s'uneixen ni a GMP ni a L'ATP, pel que se suposa que són inactives enzimàticament. La funció d'aquests domini és unir-se a la proteïna transmembrana Ocludina.

S'ha plantejat la hipòtesi que la proteïna ZO_1 actua com un pont entre el citoesquelet d'actina i les proteïnes transmembrana de les unions estretes, ja que s'ha estudiat com interactuen directament amb F-actina a partir d'una anàlisi de cosedimentació. (Fanning et al., 1998) Es desconeix la ubicació exacta del motiu d'aquesta unió, però sembla estar dins de la meitat de C-terminal de ZO_1. Aquest C-terminal comença al final del Mòdul GK i inclou un domini àcid i ric en prolina (González-Mariscal et al., 2000; Willott et al., 1992).

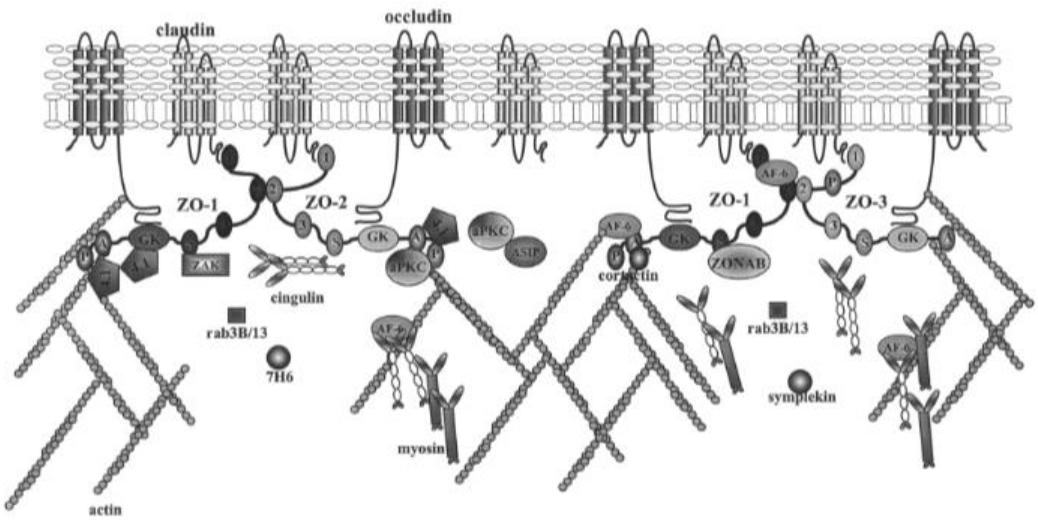


**Figura 6. . La bastida ZO a la regió TJ. A la regió submembranosa de la unió estreta, les tres proteïnes ZO s'uneixen directament a la occludina. Aquesta interacció és proporcionada, en ZO-1 i ZO-2, per la seva regió terminal COOH, i s'espera una associació similar per a ZO-3. Les proteïnes ZO s'uneixen als terminals carboxilics de la claudina a través del seu primer domini PDZ. El ZO-1 forma complexos independents amb interaccions ZO-2 i ZO-3 a PDZ2/PDZ2. La porció aminoterminal de cingulina interactua amb els tres Zos en una regió encara no definida. Les regions carboxil de ZO-1 i ZO-2 s'uneixen a l'actina i a les proteïnes d'unió a l'actina. Per tant, aquestes molècules tenen la capacitat d'actuar com a ponts entre les molècules transmembrana TJ i el citoesquelet. ZO-1 s'associa amb ZAK, una nova serina cinasa, i ZONAB, un factor de transcripció. ZO-2 s'uneix a diferents isoformas PKC. Altres proteïnes, com la symplekin, l'antigen 7H6, rab 3B/13 etc., es localitzen a la regió TJ, encara que el seu reclutament molecular a aquesta àrea continua sent desconegut. (SH3DS; PDZD1,2 i 3; Adacidic-, PD ric en prolina. (González-Mariscal et al., 2000).**

A més a més, d'aquests tres dominis presents en totes les proteïnes MAGUK, s'han identificat tres dominis formats a causa de tres "splicings" alternatius en la ZO_1, anomenats: α, β i γ.(Figura 5) Aquests són els dominis on difereixen les 8 isoformes diferents d'aquesta proteïna. Hi ha dues isoformes descrites, a més de 6 isoformes potencials que s'han mapejat computacionalment.

El domini Alfa (α) es un domini de 80 aminoàcids. Com s'ha comentat anteriorment, a causa d'un "splicing" alternatiu de les transcripcions d'ARNm, la ZO_1 presenta dues isoformes, anomenades α i α+, depenent de si tenen aquest domini. No obstant la isoforma α predomina en les cèl·lules epitelials. (Figura 7)

```
   (721) WYPIVVFLNPDSKQGVKTMRMRLCPESRKSARKLYERSHKLRKNNHHLFTTTIN
LNSMNDGWYGALKEAIQQQQNQLVWVSEGKADGATSDDLDLHDDRLSYLSAPGSEYSMYSTDSRHT
   SDYEDTDTEGGAYTDQELDETLNDEVGTPPESAITRSSEPVREDSSGMHHENQTYPPYSP
  QAQPQPIHRIDSPGFKPAS QQKAEASSPVPYLSPETNPASSTSAVNHNVNLTNVRLEEPT
  PAPSTSYSPQADSLRTPSTEAAHIMLRDQEPSLSSHVDPTK VYRKDPYPEEMMRQNHVLK
   QPAVSHPGHRPDKEPNLTYEPQLPYVEKQASRDLEQPTYRYESSSYTDQFSRNYEHRLRY
   EDRVPMYEEQWSYYDDKQPYPSRPPFDNQHSQDLDSRQHPEESSERGYFPRFEEPAPLSY
   DSRPRYEQAPRASALRHEEQPAPGYDTHGRLRPEAQPHPSAGPKPAESKQYFEQYSRSYE
   QVPPQGFTSRAGHFEPLHGAAAVPPLIPSSQHKPEALPSNTKPLPPPPTQTEEEEDPAMK
PQSVLTRVKMFENKRSASLETKKDVNDTGSFKPPEVASKPSGAPIIGPKPTSQNQFSEHD (1320)
```

**Figura 7. A: Seqüència d'aminoàcids ZO-1. Per claredat només es mostra de l'aminoàcid 721 fins el 1320 de l'isoforma α +. La seqüencia en groc, fa referència als 80 aminoàcids que diferencien la isoforma α + de α , ja que només estan a la α +.**

La majoria de les cèl·lules epitelials expressen tant α+ com α- isoformes, no obstant la primera està quantitativament més expressada. L'únic epiteli en el qual α+ isoforma està absent, és en l'epiteli del Glomèrul renal, cabdell capil·lar que es troba en el ronyó. En canvi, la isoforma α-, està més present en les cèl·lules endotelials. (González-Mariscal et al., 2000).

Segons l'estudi de Baldas i Anderson aquesta distribució no es correlaciona amb les diferències en la resistència de la unió o la complexitat ultra estructural. En canvi, s'observa una correlació amb la plasticitat de la unió; ZO-1 α s'expressa en unions estructuralment dinàmiques, mentre que ZO-1 α + s'expressa en aquelles que són menys dinàmiques (Willott et al., 1992).

El domini β, també compte amb dues isoformes (β1 i β2; 7, 20 aminoàcids respectivament ) i el domini γ (45 aminoàcids) es creu que també. Aquests s'expressen en una varietat de teixits, no obstant encara no han estat descrits (González-Mariscal et al., 2000).

La localització cel·lular de ZO_1 es troba al costat de la membrana cel·lular connectant les unions estretes amb el citoesquelet de la cèl·lula. (Figura 5) Malgrat això, aquesta proteïna també es localitza en el nucli de les cèl·lules epitelials subconfluents el que suggereix que la seva localització nuclear està inversament relacionada amb l'extensió i maduració del contacte cel·lular. A més a més, aquesta localització dins el nucli pot indicar un paper de la proteïna en la regulació de la transcripció. (Hartsock et al., 2008).

### 1.1.3 Model CaCO2

En la dècada dels 70 el "Memorial Sloan-Kettering Cancer Center", a través de la recerca duta a terme per Jorgen Fogh, va establir una col·lecció de línies cel·lulars, CaCO2, a partir de tumors cancerosos, amb l'objectiu de realitzar estudis sobre el mecanisme cancerós i teràpies relacionades (Fogh et al., 1977).

El model cel·lular CaCO2 és una línia cel·lular originalment aïllada de cèl·lules epitelials d'adenocarcinoma de colon humà. Els primers estudis sobre la línia cel·lular de CaCo2 van demostrar que aquestes quan es cultiven en condicions específiques es diferencien i polaritzen de manera que el seu fenotip expressa vàries característiques morfològiques i bioquímiques d'enteròcits intestinals (Pinto et al., 1983). Aquestes cèl·lules, en cultiu, creixen en monocapa, mostrant una morfologia cilíndrica polaritzada amb microvellositats en la part apical, unions estretes entre cèl·lules adjacents i expressen petites activitats enzimàtiques intestinals. A més a més, els resultats vists en diferents estudis utilitzant aquest model correlacionen amb resultats obtinguts *in vivo* (Sambuy et al., 2005). Addicionalment, CaCO2 presenten una millor diferenciació morfològica enteròtica en comparació amb altres línies cel·lulars de carcinoma de colon. (Chantret et al., 1988).

Els cultius de cèl·lules Caco-2 proporcionen una eina important per a estudiar i obtenir una visió més àmplia de la regulació dels processos cel·lulars epitelials intestinals.

## 1.2 L'etiquetatge de proteïnes pel seu seguiment in vivo

Per tal de poder fer un seguiment *in vivo* de la proteïna ZO_1 i així acabar d'esbrinar el paper que aquesta desenvolupa en la cèl·lula a més de la seva relació amb les unions estretes, s'ha procedit a generar una proteïna de fusió. Mètode que ha ajudat a investigar diferents temes com l'organització i dinàmica del citoesquelet (Choidas et al. 1998), la dinàmica de les unions gap (Holm et al. 1999; Jordan et al.1999) i la visualització processos dinàmics de les unions estretes.

En aquest treball de final de grau, això ha estat possible gràcies a una de les noves estratègies d'edició del genoma, la tècnica de CRISP/Cas9. Es basa en un complex proteic que talla l'ADN en un lloc específic del genoma i permet la inserció de nous elements genètics.

No obstant això, no és l'única manera d'obtenir una proteïna quimèrica. Encara que hi ha estudis com el de Roberts, que han creat 10 proteïnes, entre elles ZO_1, fusionades amb la proteïna fluorescent GFP a partir de la tècnica CRISPR/Cas9 (Roberts et al., n.d.), també s'ha pogut obtenir proteïnes, ZO_1 concretament, quimèriques utilitzant el plàsmid pEGFP-C1, que codifica per una variant de GFP, i el reactiu de Lipofectamina per tal de fer una transfecció transitòria i així també poder estudiar la proteïna ZO_1 in vivo. (Riesen et al., 2002)

### 1.2.1 Proteines fluorescent i Mcherry

Des del descobriment de la proteïna verda fluorescent (avGFP), proteïna provinent d'*Aequorea victoria* (Shimomura et al., 1962), les proteïnes fluorescents han tingut un gran impacte com a base per l'estudi de processos fisiològics i el desenvolupament d'eines biotecnològiques per l'estudi de fenòmens cel·lulars in vivo, ja que permeten rastrejar proteïnes dins les cèl·lules o organismes de manera més dinàmica.

A més a més, gràcies a la creació de proteïnes que comprenen els espectres blau, verd, groc (Tsien et al., 1998), i la creació de proteïnes amb espectre vermell derivades de la DsRed, *Discosoma striata* (Matz et al., 1999), s'ha obtingut un total de proteïnes que recullen espectres d'emissió pràcticament de tot l'espectre visible (Olenych et al., 2007). Les proteïnes d'espectre vermell, a causa de la major longitud d'ona d'excitació, produeixen menor toxicitat. Per aquest motiu són d'especial interès per experiments que necessitin marcar proteïnes amb més d'un color. Entre elles, la proteïna mCherry destaca per tenir un màxim d'emissió de 610nm, tenir una intensitat de fluorescència que està al voltant de 75% de la eGFP , a més de ser molt fotoestable, útil per capturar imatges durant llargs períodes de temps. Per aquest motiu és una de les millors de la sèrie.

### 1.2.2 Tècnica CRISPR/Cas9

Un altre descobriment important va ser l'any 1987, quan Ishino i col. van descobrir, mentre estudiaven la fosfatasa alcalina d'*Escherichia coli* una estructura de Repeticions Palindròmiques Curtes Intercalades (CRISPR) (Ishino et al., 1987). Encara que es creia que era una possible resposta immunitària adaptativa contra la infecció de fags a través d'un procés guiat per l'ARN, no va ser fins al 2012 quan, Gasiunas i col., Jinek i col., van demostrar el mecanisme que explica com les matrius CRISPR es transcriuen a ARN, per després dividir-se i unir-se en proteïnes associades a CRISPR ( cas9, en aquest cas). (Christin & Beckert, 2017)

S'ha vist  que aquesta tècnica es pot utilitzar per induir ruptures dirigides a la doble cadena en eucariotes. A més a més, també es pot utilitzar per promoure la inserció de nous elements genètics flanquejats per seqüències homòlogues derivades del locus objectiu, i lliurant aquest element flanquejat juntament amb l'ARN guia i Cas9 (Christin & Beckert, 2017).

Aquesta tècnica té el següent funcionament, el complex Cas9 comença a "escanejar" ràpidament el genoma buscant alguna base que coincideixi amb el seu motiu adjacent, la seqüència PAM. Al reconèixer aquesta seqüència, el complex  s'atura permetent que l'ARN guia (sgARN)  s'uneixi a les bases 5' del PAM. Si no hi ha cap emparellament entre sgARN i l'ADN genòmic, el complex es separa i continua llegint mostres de PAM addicionals d'altres llocs. En canvi, si sgARN coincideix perfectament amb la seqüència del genoma, sgARN ingressa en un canal central de la proteïna, mentre que l'ADN genòmic complementari queda amagat per un dels dominis de la Cas9. Simultàniament, l'ADN genòmic no complementari, entra en un altre canal de la Cas9 on també es talla. Després del tall, el complex Cas9 es separa del ADN genòmic i continua buscant seqüències PAM. La ruptura de la cadena bicentenària porta a l'activació de les respostes associades. La cèl·lula repara la ruptura mitjançant, la recombinació homologa (HR) o mitjançant la unió dels extrems no homòlegs (NHEJ), mecanisme que no depèn de l'ADN homòleg. El primer mètode donarà un resultat sense errors de la reparació, i s'introduirà una plantilla exògena, aquest mecanisme ens ajuda a incorporar elements genètics nous dins del genoma. En canvi, el NHEJ pot donar com a resultat una mutació en el genoma (Christin & Beckert, 2017). (Figura 8)

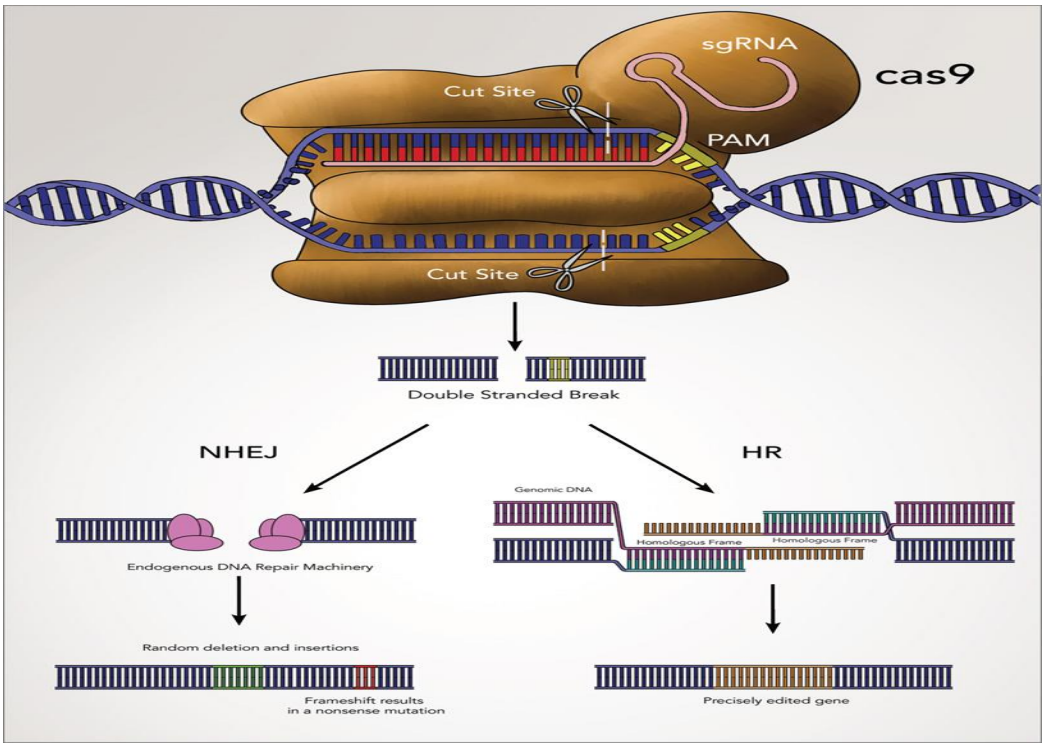


**Figura 8.Mecanismes del complex cas9 (unió del sgARN amb la seqüencia diana i reparació de l'ADN. (Christin & Beckert, 2017).**

Com s'ha comentat anteriorment, la meta d'aquest treball és crear una proteïna de fusió amb la finalitat de generar un model intestinal consistent en cèl·lules CaCO2, cèl·lules d'adenocarcinoma de colon que presenten unions estretes en confluència, que tinguin la proteïna ZO_1, present en les zones oclusives, etiquetada. Aquesta eina permetrà facilitar posteriors estudis sobre la localització i la dinàmica subcel·lular d'aquesta proteïna en diferents situacions patofisiològiques de les unions estretes, presents en les barreres biològiques.

Per l'edició del genoma d'aquestes cèl·lules s'ha escollit la metodologia CRISPR/Cas9 i la proteïna mCherry que convertirà la proteïna de fusió (ZO-1-mCherry) en fluorescent pel fàcil seguiment.

## 2. Objectius

L'objectiu principal del present estudi és generar una línia cel·lular derivada de CaCO2 que expressi la proteïna Zona Ocludens 1 marcada, amb la proteïna fluorescent mCherry, sota el control dels elements reguladors naturals del gen. Aquest marcatge servirà per portar a terme posteriors estudis sobre la dinàmica subcel·lular d'aquesta proteïna i així acabar de desenvolupar el paper que juga dins de les unions estretes.

A més a més, aquest treball té objectius específics per tal d'assolir l'objectiu principal. Aquests objectius específics són:

- Generar un plàsmid (plentiCRISPR v2) que codifiqui l'endonucleasa Cas9 associada a una guia específica d'ARN, per a dirigir-se al gen de la ZO_1 en l'extrem 3' de la seqüència de codificació.

- Generar un plasmidi (pBluescript SK (+)) que funcioni com un donant reparador per l'ADN i que contingui la seqüència de l'etiqueta (proteïna mCherry) flanquejat pels braços d'homologia i així permetre la recombinació homòloga.

- Obtenir línies cel·lulars clonals de Caco2, amb integració específica de l'ADN reparador, expressant la proteïna Zona Ocludens 1 etiquetada.

.

# 3. Treball experimental

## 3.1 Materials

En aquest apartat es mostra en un llistat el material emprat per tal de poder portar a terme aquest treball.

Els plàsmids utilitzats són: plentiCRISPR v2 (Addgene plàsmid # 52961 ; http://n2t.net/addgene:52961 ; RRID:Addgene\52961); pBluescript SK(+) d'Agilent i plàsmid pmCherry-Occludin-N-10 (Addgene plàsmid # 55112; http://n2t.net/addgene:55112; RRID:Addgene_55112) per tal d'obtenir la seqüència de la proteïna fluorescent mCherry. (Addgene: Homepage, 2020) Els oligonucleòtids o primers, per sintetitzar el fragment reparador i el fragment de sgARN, s'han demanat a Sigma i figuren en la Taula 1. S'ha utilitzat la Polymerasa (High fidelity Prime STAR HS DNA polymerase de TAKARA), per a la clonació i l'amplificació de la PCR. El sèrum, la glutamina i els antibiòtics, per al cultiu cel·lular han estat comprats a Gibco (Thermofisher). Les sals, agarosa i reactius generals han estat comprats a Sigma. El material de plàstic com: plaques, pipetes, puntes de pipeta s'han obtingut de VWR i a més a més s'han utilitzat d'Eppendorf de la marca amb el nom del mateix producte.

| **Nom del primer** | **Seqüència (5'-> 3')** |
|---|---|
| sg _FW | caccgGGAGATCCAAATTATCTCGT |
| sg_RV | aaacACGAGATAATTTGGATCTCCc |
| synt_FW | CCTAAAACCTGGCAAAACAAGTGTCTTCCCGGtGACCCTAACTACCTAGTTG-GAGCAAACTGT |
| synt_RV | GACCGGTCCGCTACCGGAGCCGCTAAAGTGGTCAATAAGGACAGAAACACAGTTTG CTCCAACTAGGTAG |
| mCherry_FW | GTTTCTGTCCTTATTGACCACTTTAGCGGCTCCGGTAGCGGACCGGTC |
| mCherry_RV | CATTATTTAAGTTCCTATATTTCAAGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC |
| Ha5'_FW | atatatggatccAAGGGAAGCAAACGTCCACA |
| Ha5'_RV | CCGGGAAGACACTTGTTTTGC |
| Ha3'_FW | GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACTCTTGAAATATAGGAACTTAAATAATG |

| | |
|---|---|
| Ha3'_RV | atatactcgagCACTTTAGGGCACAGCATTG |

**Taula 1: Seqüencies dels primers utilitzats en aquest projecte. En verd les dianes de restricció per la digestió amb BsmBI, per poder lligar el fragment sgARN amb pLentiCRISPR v2 i en groc les dianes de restricció per els enzims XhoI i BamhI, per poder lligar el fragment reparador amb pBluescript SK (+).**

## 3.2 Mètodes

### 3.2.1 Disseny de primers

Els oligonucleòtids o primers són polímers sintètics d'àcids nucleics curts utilitzats en investigació per encebar la síntesi de cadenes d'ADN amb ADN polimerases. En el seu disseny cal tenir en compte l'ADN que es vol sintetitzar, ja que cal que siguin totalment específics en la nostra aplicació concreta, la generació de plàsmids amb seqüència determinada. Els primers utilitzats en aquest estudi s'han dissenyat utilitzant les eines benchling i NCBI primer designing tool. Els detalls rellevants es descriuen en l'apartat de resultats i discussió i les seqüències dels primers utilitzats es troben a la taula 1.

### 3.2.2 Purificació d'ADN genòmic

Per tal d'extreure l'ADN genòmic de les cèl·lules CaCO2, en primer lloc, s'ha fet un "scrapping" de cèl·lules cultivades a una confluència del 50-80% en PBS. Posteriorment, s'han centrifugat a 1600 rpm durant 3 minuts, per tal de formar un pèl·let. En segon lloc, el pèl·let obtingut s'ha resuspés en 500 µL de tampó d'ET-Proteinasa K i s'ha incubat a 55 °c durant 60 minuts. A continuació, s'han afegit 55 µL d'una solució d'acetat sòdic a una concentració de 3M i s'ha barrejat per inversió, seguidament s'han afegit 600 µL d'isopropanol homogeneïtzant suaument fins a observar una aparença gelatinosa del material genètic. Aquest material, compost principalment per ADN genòmic, s'ha recollit utilitzant una punta neta de pipeta P200 i s'ha transferit a un nou tub Eppendorf. Finalment, s'ha rentat el material amb 500 µL d'etanol al 70% seguit d'una centrifugació a 14000 rpm durant 5 minuts. Finalment, s'ha rebutjat el sobrenadant i s'ha deixat assecar el sediment a l'aire entre 5 i 10 minuts. Una vegada que l'etanol s'ha evaporat, el pèl·let ha estat dissolt utilitzant 100 a 300 µL (depenent de la mida del pèl·let, per a pèl·lets grans volums prop dels 300 µL i per a pèl·lets petits volums prop dels 100 µL) de 10 mm Tris pH8, depenent de la grandària del pèl·let.

### 3.2.3 PCR i SOE

En el present treball s'ha utilitzat la PCR i l'extensió de solapament o SOE (de l'anglès sequence overlap extension) per crear fragments d'ADN amb la seqüència desitjada i en quantitat suficient per poder generar plàsmids recombinants necessaris pel projecte. La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és una metodologia estàndard que consta fonamentalment de 3 fases que es repeteixen un nombre de cicles dins d'un tub. En la primera fase l'ADN es desnaturalitza. En la segona els primers s'hibriden amb els brins d'ADN en posicions on les seqüències són complementàries i es formen ponts d'Hidrogen entre bases enfrontades. Finalment, en la tercera etapa s'ajusta la temperatura per a afavorir l'extensió del nou bri a partir dels primers per part de la polimerasa.

Per una banda, les reaccions de PCR s'han preparat utilitzant el parell de primers específics de cada reacció (Taula 1 dins l'apartat de Materials), que hibriden a cadenes complementàries (un a cada una de les cadenes de L'ADN motlle a amplificar), a una concentració inicial de 10 µM i final de 0,25 µM (s'ha posat 1,25 µL per reacció de 50 µL). També s'hi ha afegit deoxinucleòtids trifosfat (dNTPs) a una concentració final de 0,2 mM. Com el tampó proporcionat està a 5 vegades la concentració de treball, s'ha afegit 10 µL a cada reacció de 50 µL i l'enzim, polimerasa, s'ha utilitzat a 2,5 unitats per reacció (es proporciona a 5 unitats per µL). Per acabar de completar la reacció s'ha afegit el motlle, ADN a amplificar, i aigua. Per aquest projecte, s'ha utilitzat l'ADN polymerassa Prime StarTM (Takara) i el tampó subministrat amb l'enzim.

A més a més, el motlle ha estat diferent en cada cas particular, així, per amplificar els braços d'homologia del gen s'ha utilitzat ADN genòmic a una concentració final a la reacció de 2-5 micrograms per mL. En canvi, quan el motlle ha estat un plasmidi, com en el cas del fragment mCherry, s'ha utilitzat uns 20 ng/mL de concentració final a la reacció. En la generació d'un fragment d'ADN sintètic, per extensió d'oligonucleòtids gràcies a complementarietat dels extrems, s'ha utilitzat barreges dels dos oligonucleòtids implicats a una concentració final de 5 µM. Finalment, en les reaccions d'extensió de solapaments, utilitzades per unir els diferents fragments esmentats entre si, s'ha utilitzat entre 100 ng i 1 µg de cada fragment per mL de reacció.

Per altra banda, els paràmetres de les diferents PCR utilitzades en aquest treball han estat: En primer lloc, per a la generació del DNS sintètic, s'han utilitzat els diferents paràmetres: 96 ºC durant 5 minuts, per activar la polimerasa, seguit de 3 cicles de (96 ºC durant 10 segons, 55 ºC durant 10 segons, 72 ºC durant 20 segons), una extensió final a 72ºC durant 5 minuts i per últim baixar a 4 ºC. En canvi, els paràmetres de la PCR per a l'amplificació del fragment mCherry i els braços d'homologia han estat: 95 ºC durant 5 minuts, per activar la polimerasa, seguit de 30 cicles de (95 ºC durant 10 segons, 55 ºC durant 10 segons, 72 ºC durant 20 segons), una extensió final a 72 ºC durant 5 minuts i per últim baixar a 4 ºC. Finalment, els paràmetres de la PCR de les reaccions d'extensió

de solapaments, han estat: 96 ºC durant 5 minuts, per activar la polimerasa, seguit de 30 cicles de (96 ºC durant 20 segons, 55 ºC durant 20 segons, 70 ºC durant 1 minut), una extensió final a 70 ºC durant 5 minuts i per últim baixar a 4 ºC.

### 3.2.4 Digestió amb enzims de restricció

Els enzims de restricció tallen l'ADN per unes seqüències específiques de nucleòtids. La majoria d'aquests enzims, digereixen l'ADN de manera asimètrica a través de la seva seqüència de reconeixement, la qual cosa resulta en un sortint monocatenari en l'extrem digerit del fragment d'ADN. Aquests extrems, anomenats "extrems cohesius", són els que permeten que el vector i l'insert s'uneixin entre si. Quan els extrems cohesius són compatibles les dues peces es connecten i finalment es fusionen per la reacció de la lligació.

Per les digestions amb enzims de restricció s'han generat reaccions de 30 µL dels quals 3 µL corresponen al tampó que ve amb l'enzim, 1 µL a l'enzim i la resta corresponen a l'ADN a digerir i aigua. Normalment s'han digerit al voltant de 2 µg d'ADN amb unes 10 unitats d'enzim a 37 º C durant 1 hora.

### 3.2.5 Anàlisi d'ADN a partir d'electroforesis en gels d'agarosa

L'electroforesi en un gel d'agarosa no desnaturalitzant, és un mètode estàndard que s'utilitza per a separar fragments d'ADN. La migració d'aquests fragments en el gel és inversament proporcional al seu pes molecular. El percentatge d'agarosa que s'utilitza depèn de la mida dels fragments a separar. A més sempre s'afegeix un marcador de pes molecular en paral·lel a les mostres.

En aquest projecte, els gels s'han preparat com a solució de 0,5 g d'agarosa en 50 ml de tampó TAE (1%). La barreja es prepara dins un flasc erlenmeyer i es fa bullir en un microones fins a la total dissolució. Una vegada que la temperatura disminueix fins a uns 70ºC, s'ha afegit, a la barreja, 5 µL de 10000x SybrSafe (Invitrogen) i posteriorment s'ha transferit a un motlle, recobert amb una cinta, i s'ha introduït una pinta de 10 pous. Un cop solidificat, la cinta i la pinta s'han retirat i s'ha posat el gel a la cubeta d'electroforesi, prèviament omplerta amb tampó TAE. Els gels es corren a 100 volts de 40 a 60 minuts i els resultats s'han visualitzat amb llum ultraviolada mitjançant el sistema d'imatge Versadoc4000 de Bio-Rad.

### 3.2.6 Purificació d'ADN plasmídic

El plàsmid d'ADN s'ha extret usant el kit de Miniprep (Qiagen). Un total d'1,5 ml d'un cultiu nocturn s'ha centrifugat a 14000 rpm durant 1 minut. El següent sobrenadant, d'aquesta centrifugació, s'ha rebutjat i el precipitat s'ha resuspès amb 200 µL de tampó P1. Una vegada homogeneïtzats, s'ha afegit 200 µL de tampó P2 i el contingut s'ha barrejat per inversió, seguit de l'addició i homogeneïtzació de 300 µL de tampó N3. La següent mescla s'ha centrifugat a 14000 rpm durant 10 minuts, i el sobrenadant s'ha transferit a un nou tub Eppendorf.

Després, s'ha afegit al sobrenadant un volum d'isopropanol (que correspon al volum de sobrenadant recuperat) per a precipitar l'ADN, seguit d'una centrifugació a 14000 rpm durant 10 minuts. Després s'ha rebutjat el sobrenadant i s'ha rentat el precipitat amb 1 ml d'etanol al 70%, seguit d'una centrifugació a 14000 rpm durant 5 minuts. Finalment, s'ha rebutjat el sobrenadant i s'ha deixat assecar el sediment a l'aire durant 5 a 10 minuts, seguit de l'addició de 50 µL de miliQ-$H_2O$ per a dissoldre el precipitat d'ADN.

### 3.2.7 Lligació i transformació

Per una banda, l'últim pas en la construcció d'un plàsmid recombinant és connectar l'insert d'ADN (gen o fragment d'interès) en un esquelet de vector digerit de manera compatible. Això s'aconsegueix connectant covalentment la cadena principal de sucre dels dos fragments d'ADN. Aquesta reacció, anomenada lligació, és realitzada per l'enzim ADN ligasa T4. La majoria de les reaccions de lligació involucren fragments d'ADN que han estat generats per la digestió amb enzims de restricció.

Per l'altra banda, la transformació genètica de bacteris és un procediment de laboratori pel qual s'introdueix material genètic a un bacteri. Generalment, el material genètic inserit és conegut com a plasmidi (ADN circular), aquests contenen en general, un o diversos gens d'interès, un gen reporter (que permet visualitzar la transcripció del plasmidi), i un gen de resistència a un antibiòtic (que permet seleccionar al bacteri transformat dels altres) per la seva capacitat de créixer al medi que conté l'antibiòtic de resistència. Les transformacions tenen moltes aplicacions, però en aquest treball s'ha utilitzat per a la producció dels mateixos plàsmids.

Per la lligació dels inserts als vectors s'ha utilitzat la T4 ADN lligassa amb el tampó proporcionat per la mateixa casa comercial. En primer lloc, s'ha barrejat el vector, prèviament preparat perquè tingui extrems diferents entre si, de manera que no es pugui autolligar, però compatible amb els del fragment d'ADN a introduir (que

anomenem insert). Normalment s'afegeix un excés d'insert respecte de vector, unes 5 vegades d'excés molar. Això, empíricament, ha donat millors resultats que utilitzar relacions equimolars de les molècules a lligar.

Les reaccions de lligació s'han preparat afegint volums de vector i insert que sumin 12 µL (intentant posar 5 vegades més molècules d'insert que de vector) més 1,5 µL del tampó 10X que proporciona la casa comercial, i que conté ATP, més 1,5 µL de la lligassa (NEB).

Finalment, per fer a les transformacions de cèl·lules *E.coli* competents amb els plàsmids ja lligats, s'ha fet un mix amb diferents reactius: 20 µL del producte de la lligació, 10 µL de KCM(KCl,CaCl2, MgCl2), 27 µL de PEG 800 al 10% i aigua fins a arribar a un volum total de 100 µL. Un cop llest el mix, s'ha introduït 100 µL de cèl·lules competents i s'han deixat incubar 30 minuts a 4ºC, després durant 2 minuts a 37ºC i finalment s'ha afegit 800 µL de LB + Amp durant 20 minuts a 37ºC. Finalment, s'han sembrat en dues plaques, una d'elles com a control negatiu.

### 3.2.8 Seqüenciació per Sanger

La seqüenciació de Sanger llança seqüències d'alta qualitat per a segments relativament llargs d'ADN (de fins a aproximadament 900 parells de bases). La tècnica sol utilitzar-se per a seqüenciar fragments individuals d'ADN, com a plasmidis bacterians o ADN copiat en la PCR. En aquest treball, aquesta tècnica s'ha utilitzat per confirmar que les seqüències dels plàsmids generats (pLentiCRISPR v2 i pBluescrip) són les desitjades.

En el cas de la inserció del sgARN al plàsmid pLentiCRISPR v2, s'ha fet una sola seqüenciació, en canvi, per tal de seqüenciar el plàsmid pBluescript SK (+) amb l'ADN reparador, s'han fet un total de 7 seqüenciacions. Per tal de veure si aquesta inserció s'ha fet correctament, s'ha comparat les seqüències obtingudes de la seqüenciació per Sanger amb la seqüències teòriques, utilitzant l'eina virtual "Blast to sequence" de la pàgina NCBI. (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, 2020)

### 3.2.9 Cultiu de cèl·lules CaCO2

Les cèl·lules de CaCO2 s'han obtingut de la doctora Raquel Martin (Universitat de Barcelona, facultat de farmàcia, referència ATCC HTB37) i s'han cultivat en DMEM complementades amb un sèrum boví fetal al 10% i una solució de penicilina / estreptomicina / glutamina proporcionada com a estoc 100X (ThermoFisher 10378016)

(D10 ). Les cèl·lules s'han cultivat a 37 ºC i al 5% de CO2 en una incubadora humidificada. Els passatges s'han realitzat amb una confluència superior al 70%. A continuació, s'han rentat les cèl·lules tres vegades amb PBS (normalment s'ha utilitzat 5 ml per cada rentat, ja que s'ha utilitzat plaques de diàmetre de 10 cm) i després s'ha afegit tripsina, posteriorment s'han mantingut a la placa fins que la majoria de les cèl·lules s'han separat de la superfície (generalment, se sol afegir 1,5 ml de solució de tripsina per placa de 10 cm i amb un temps d'incubació va ser d'uns 5 minuts). Finalment, s'han recollit les cèl·lules amb medis de cultiu per sembrar-les.

### 3.2.10 Transfeccions

La transfecció és el procés mitjançant el qual s'introdueix un insert d'ADN (gen o fragment d'interès) en les cèl·lules eucariotes.

Per a la transfecció, s'han deixat créixer les cèl·lules CaCO2 fins a una confluència del 20% i posteriorment s'han transfectat amb una mescla de politiolenimina (PEI) - ADN. El PEI és una molècula de càrrega altament positiva que s'uneix eficaçment a l'ADN, neutralitzant les càrregues negatives en l'ADN i facilitant l'entrada a la cèl·lula. S'ha utilitzat 4 µL de PEI a 1mg/ml en aigua i pH 7,4 (lineal PEI, MW 25000; incorporació de Polysciences 9002-98-6) per 1 mg d'ADN. Aquesta mescla per a la transfecció conte els següents reactius: 0,5 mg de plentiCrisprv2-ZO_1, 5,5 mg de pBluescript-Reparador i 24 ml de PEI en 1 ml de DMEM lliure de sèrum. Aquesta mescla final s'incuba durant 15 minuts a temperatura ambient i s'afegeix a una placa de 10 cm que conté 30-40% de cèl·lules confluents de Caco2 en 10 ml de D10.

## 3.3 Resultats i discussió

Per tal de portar a terme aquest treball primerament, s'ha localitzat el gen que codifica per a la proteïna ZO_1 dins del genoma per tal d'obtenir la seva seqüenciada cromosòmica. Segons el "National Center of Biotechnology Information" (NCBI) el gen que codifica per aquesta proteïna, en humans, es troba en el Cromosoma 15. (NM_001301025; National Center for Biotechnology Information, 2020)

En segon lloc, s'ha decidit la posició de la proteïna fluorescent mCherry, ja que existia la possibilitat de posar-la abans de l'extrem N-terminal o després l'extrem C-terminal de la proteïna ZO_1. Un estudi sobre la creació d'una proteïna de fusió entre la proteïna fluorescent GFP i ZO_1 publicat el 2002 mostra que només el ZO1-CGFP (proteïna GFP col·locada a la regió C-terminal) s'ha colocalitzat juntament amb ZO_1 nativa, en canvi la ZO1-NGFP (proteïna GFP col·locada a la regió N-terminal) ha aparegut, no només en

les unions cèl·lula- cèl·lula sinó que a més a més també en el citoplasma. (Riesen et al., 2002) Una de les raons que poden explicar aquesta observació és una possible reducció de les afinitats entre la proteïna ZO_1 i els seus socis d'unió. Com s'ha comentat en la introducció en la regió N-terminal d'aquesta proteïna trobem el domini PDZ1, l'encarregat d'unir ZO_1 a les Claudines. Per tant, al posar la proteïna fluorescent en N-terminal de la ZO_1, aquesta pot perdre les unions amb les Claudines fent que ZO_1 no es trobi localitzada on ha d'estar.

Finalment, s'ha decidit posar la proteïna mCherry a l'extrem C-terminal de la proteïna ZO_1, ja que no hi ha cap evidència de què aquesta proteïna fluorescent afecti les unions de ZO_1 amb altres proteïnes.

### 3.3.1 Disseny de Primers

La idea, per tal de fer aquest projecte, és que la cèl·lula repari el tall induït, per la proteïna Cas9, a partir de la recombinació homologa (HR). Per això és necessari la creació dos plasmidis: pLentiCRISPV2-ZO-1, plàsmid encarregat de portar la informació necessària perquè la Cas9 trobi el seu lloc de tall específic, així com la informació per a la mateixa Cas9, i pBluescript-Reparador, plàsmid que porta els braços d'homologia, perquè es doni la recombinació homòloga, flanquejant la informació que codifica per mCherry.

Per tal de crear tant la seqüència que dona especificitat al sgARN com l'ADN reparador s'han dissenyat un total de 10 oligonucleòtids (primers): 2 per donar especificitat al sgARN per a la cas9 i 8 per obtenir l'ADN reparador. L'ADN reparador es va generar a partir de 4 fragments, que es van unir per extensió de seqüències solapades o SOE (de l'anglès sequence overlap extension) que és donaràn en les PCR. Aques procés s'explicarà posteriorment. (Figura 9)

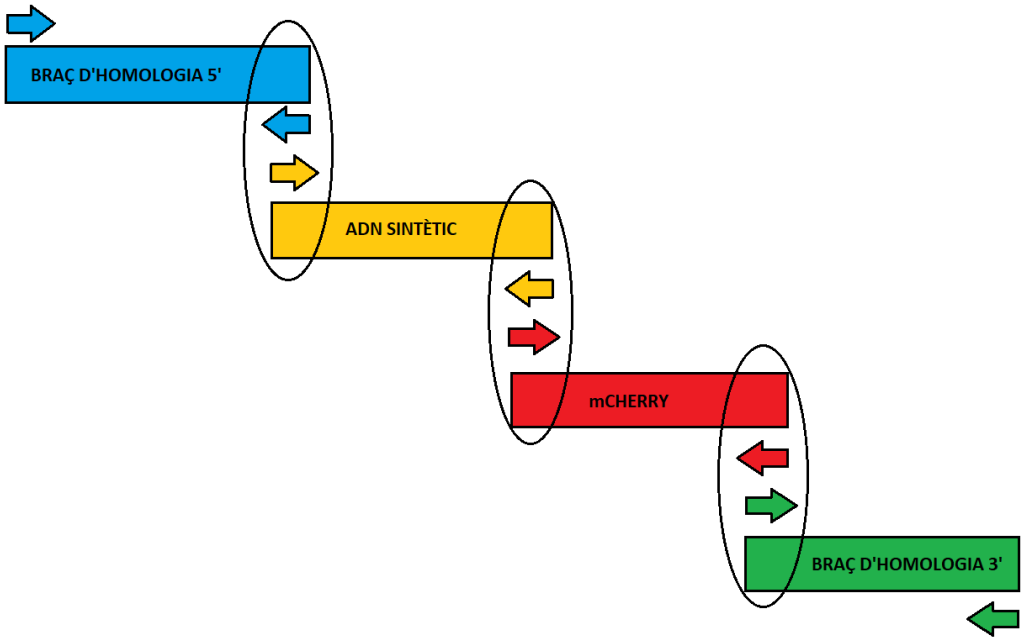


**Figura 9. Parts del ADN reparador. Les fletxes que es dirigeixen cap a la dreta fan referència als primers FW, mentre que les línies que van cap a l'esquerra representen els primers RV. Els cercles en negre representen el SOE (de l'anglès Senquence Overlap Extension).**

En primer lloc, un cop decidit que la proteïna mCherry anirà a l'extrem C-terminal, s'ha buscat una seqüència d'especificitat del sgRNA i una seqüència PAM, a partir de l'eina virtual Benchling. A la Figura 10 s'indica, sobre fons groc, la seqüència dels 20 nucleòtids específics seguits dels tres nucleòtids que constitueixen el PAM (sobre fons lila). Així mateix, s'indica el triplet stop sobre fons vermell. (Cloud-Based Informatics Platform for Life Sciences R&D | Benchling, 2020; Figura 10)

```
CAGAAGAAAATTATGTCTAAATATACGTATTTGCCCTATAATTGCAAAGCATTACGGATAGCAGTTTACT
GAACTGTAAATGACATCAACTTCTTTTCTCTCATAGGTGATCCTAAAACCTGGCAAAACAAGTGTCTTCC
CGGAGATCCAAATTATCTCGTTGGAGCAAACTGTGTTTCTGTCCTTATTGACCACTTTTAACTCTTGAAA
TATAGGAACTTAAATAATGTGAAACTGGATTAAACTTAATCTAAATGGAACCACTCTATCAAGTATTATA
```

**Figura 10. Seqüència del gen de la proteïna ZO_1, que va de la posició 29700176 a 29703195. En groc podem veure la seqüència d'especificitat del sgARN, amb lila la seqüència PAM i amb vermell el codó STOP.**

A partir d'aquí, s'han creat dos primers, un anomenat sg _FW i l'altre sg_1RV (de l'anglès forward i reverse respectivament: Taula 1) per tal de poder construir la seqüencies que dona especificitat al sgARN que més tard s'introduiran en el plàsmid pLentiCRISP-v2.

No obstant això, s'ha vist que el tall de la Cas9 s'efectua 40 bp abans del codó stop.(Figura 11 A) A més a més, s'ha d'afegir alguna mutació sigui en el sgARN o la seqüència PAM, perquè la Cas9 no talli aquest fragment reparador, ja que aquest tall és específic d'aquestes seqüències com s'ha vist a la introducció. Com la seqüència PAM, "TGG", és l'únic triplet que codifica per l'aminoàcid de Triptòfan no s'ha pogut modificar, ja que no s'ha volgut canviar la seqüència de la proteïna, per aquest motiu s'ha decidit modificar 6 nucleòtids de la seqüència que dona especificitat al sgARN.(Figura 11 B) Per solucionar aquests problemes, s'ha creat un constructe sintètic que ja porta aquests canvis, a més a més, aquest constructe no té el codó Stop de la proteïna ZO_1, ja que es vol que s'acabi de transcriure després de la proteïna mCherry. Per tat aquest constructe consisteix en una seqüència de 113 bp: les 32 primeres basses (color girs Figura 11C), corresponent a les basses abans de la seqüència d'especificitat del sgARN per després poder fer un SOE d'aquest constructe amb el braç d'homologia 5'; 20 + 3 , corresponen a la seqüència d'especificitat del sgARN mutada (color groc i vermell Figura 11 B i C) i PAM (color lila Figura 11 B i C); 34 (color blau Figura 11C), corresponents a la distància del tall al codó Stop i per últim 24 (color ver Figura 11C) corresponents al "linker" que s'introdueix entre ZO_1 i mCherry i que ens servirà per poder fer un SOE amb el següent fragment que aportarà a resta del linker i la seqüència que codifica per mCherry.(Figura 11 C) Per tal de poder sintetitzar aquest constructe, s'han dissenyat dos primers parcialment complementaris anomenats: synt_FW i synt_RV. (Taula 1).

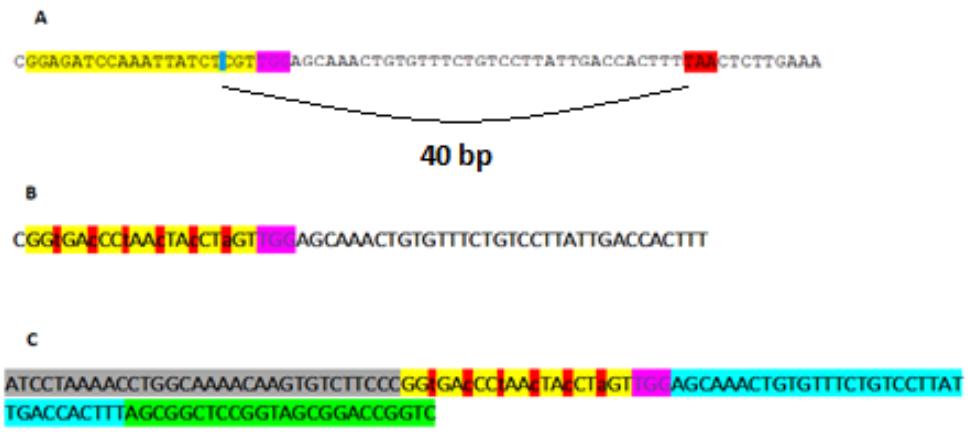


**Figura 11. Construcció de l'ADN reparador. A) seqüència codificant per l'extrem C-terminal de ZO_1. Sobre fons groc es mostra la seqüència dels 20 nucleòtids que donen especificitat al sgARN i s'indica, en blau, el punt de tall de Cas9. També es mostra el PAM sobre fons lila i el codó stop sobre fons vermell. B) seqüència modificada en l'ADN reparador per evitar el seu reconeixement pel sistema CRISPR-Cas. S'ha mutat la tercera base de cada triplet codificant amb canvis sinònims, que resulten en traducció sense canvis d'aminoàcids a la proteïna resultant. Els canvis respecte de A estan marcats en vermell. C) Es mostra part de l'ADN reparador, com a B, afegint seqüències a 5' que corresponen a part del braç d'homologia upstream i la substitució del codó stop per seqüències que codifiquen per un linker entre ZO_1 i la proteïna mCherry (sobre fons verd).**

El primer Ha5'_RV s'ha dissenyat a partir de la complementarietat que té amb el primer de l'ADN sintètic synt_FW .(Figura 9) Un cop dissenyat, gràcies a l'eina virtual primer-blast del NCBI, s'han pogut trobar el primer Ha5'_FW. (Primer designing tool, 2020) Els primers mCherry_Fw i mCherry_RV s'han creat a partir de la seqüència de mCherry. Gràcies a la complementarietat del primer mCherry_RV amb el primer del braç d'homologia 3', s'ha obtingut el primer Ha3'_FW(Figura 9). Un cop obtingut Ha3'_FW, s'ha pogut dissenyar el primer Ha3'_RV, utilitzant un altre cop l'eina virtual primer-blast del NCBI.(Primer designing tool, 2020); Taula 1)

### 3.3.2 Construcció plàsmid pLentiCRISPRv2-ZO_1

Per a la construcció del plàsmid pLentiCRISPRv2-ZO_1 s'ha seguit el protocol publicat per Zhang i col·laboradors (Sanjana et al., 2014). Primer, s'han fosforilat i anellat els dos oligonucleòtids complementaris, sg_FW i sg_RV (Taula 1), per tal d'obtenir la seqüència dels 20 nucleòtids específics del sgRNA amb els sobresortints apropiats per la lligació al vector pLentiCRISPv2 digerit amb BsmBI. En segon lloc, s'ha portat a terme la lligació entre els fragments esmentats. A continuació s'ha transformat E.coli competents amb l'ADN resultant de la lligació. Finalment, s'han fet créixer colònies resultants de la transformació, se n'ha aïllat el plàsmid i s'ha analitzat per verificar-ne l'estructura, primer per digestió amb enzims de restricció i després per seqüenciació d'un dels clons identificats com a correctes segons el patró de digestió.

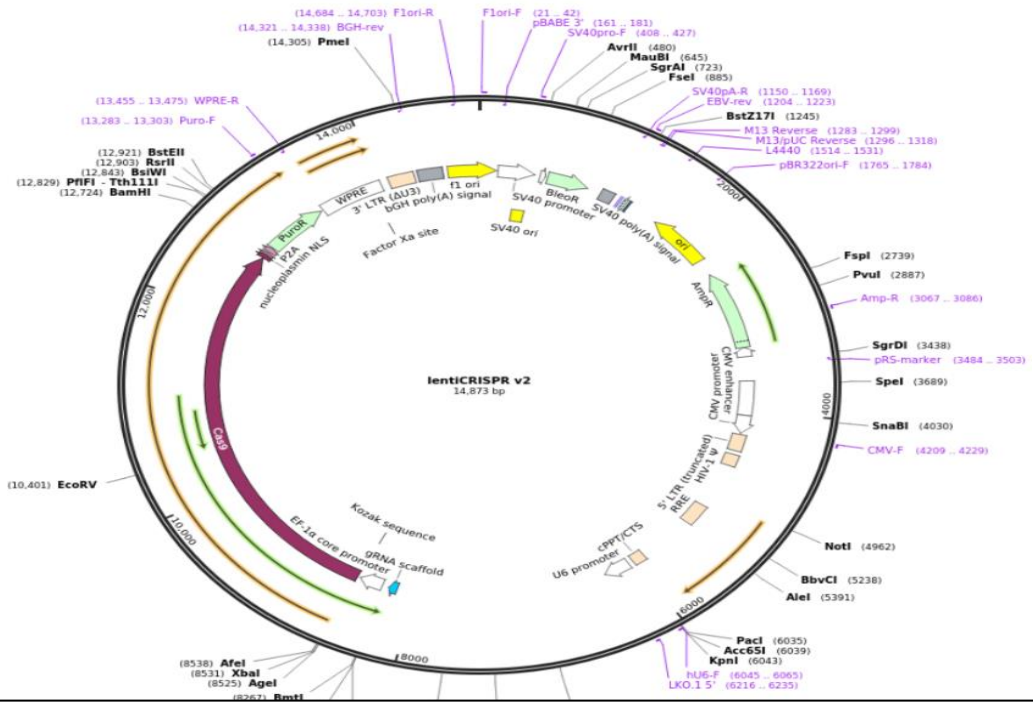


**Figura 12. Esquema del plàsmid pLentiCRISPR V2. Imatge proporcionada per la pagina d'Addgene (Addgene: Homepage, 2020)**.

Quan digerim el pLentiCRISPR v2 (Figura 12) , sense la seqüència específica del nostre sgRNA, amb l'enzim PstI ens dóna sis talls, segons l'eina virtual Restriccion mapper3 a les següents posicions del plàsmid: 1796,5286,6708,6912,6942 i 8154 (Blaiklock, 2020). Aquests sis talls formen sis fragments de diferents mides, ja que estem parlant d'una seqüència circular d'aproximadament 14000 bp. El primer fragment va des de la posició 1796-5286 i té una mida de 3490 bp (de l'anglès "base pairs"), el segon va de la posició 5286-6708 amb una mida de 1422bp, el tercer va des de la posició 6708-6912 amb una mida de 204 bp, el quart va des de la posició 6912-6942 amb una mida de 30bp, el cinquè va des de la posició 6942-8154 amb una mida de 1212 bp i per últim tenim el fragment que va des de la posició 8154-1796 aquest té una mida de 8515 bp.

No obstant això, aquest plàsmid s'ha digerit prèviament amb BsmBI, per tal d'introduir el fragment específic del sgRNA. Això ha causat que les 1885 bp que hi ha entre la posició 2234 i 4119 desapareguin, ja que el BsmBI en aquest plàsmid talla en aquestes dues posicions segons l'eina virtual Restriccionmapper3. (Blaiklock, 2020; Figura 13)

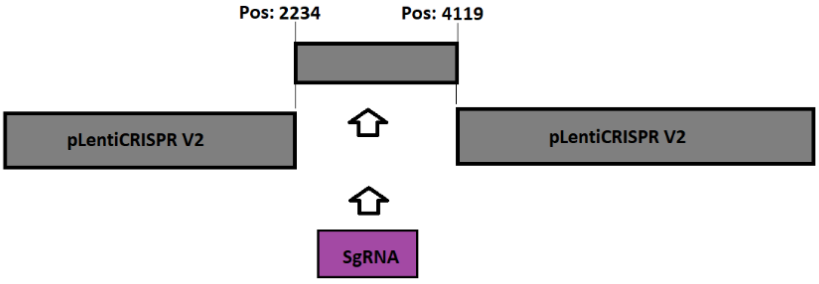


**Figura 13. Representació de la digestió amb BsmBI.**

Per aquest motiu, quan digerim el plàsmid pLentiCRISPRv2-ZO_1 amb PstI el fragment de 3490 bp desapareix, originant un altre fragment de 1628bp en treure les 1885 bp que van de la posició 2234 a la 4119 i afegir els 23 nucleòtids que donen especificitat al sgARN. (Figura14) Per tant, els fragments que s'originen en digerir aquest plàsmid, amb el canvi, i que esperem en el gel són: 8515 bp, 1628 bp, 1422 bp, 1212 bp, 204 bp i 30 bp. Com es pot veure en el gel, només s'observen quatre bandes, referents als fragments de 8515, 1628, 1422 i 1212 bp respectivament. Pel que fa a la banda de 30 bp, no es pot veure en aquest tipus de gel. (Figura 14)

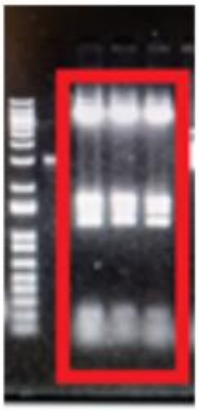

**Figura 14. Gel d'agarosa per tal de veure si la lligació amb el plàsmid pLentiCRISPR v2 ha funcionat.**

Aquest gel, no ens acaba de confirmar que el fragment que donarà especificitat al sgARN estigui dins del plàsmid i per assegurar que tenim la molècula amb la seqüència correcta, s'ha portat a seqüenciar. Posteriorment, s'ha buscat, utilitzant el buscador del programa PDF, la seqüència que dóna especificitat al sgARN, dins de les seqüenciacions dels respectius plàsmids, per tal d'acabar de confirmar-ho. Com es pot observar en la següent figura la seqüència d'especificitat del sgARN esperada està dins del plàsmid i per tant podem afirmar que la lligació del plàsmid pLentiCRISPR v2 amb el fragment sgARN s'ha portat a terme. (Figura 15)

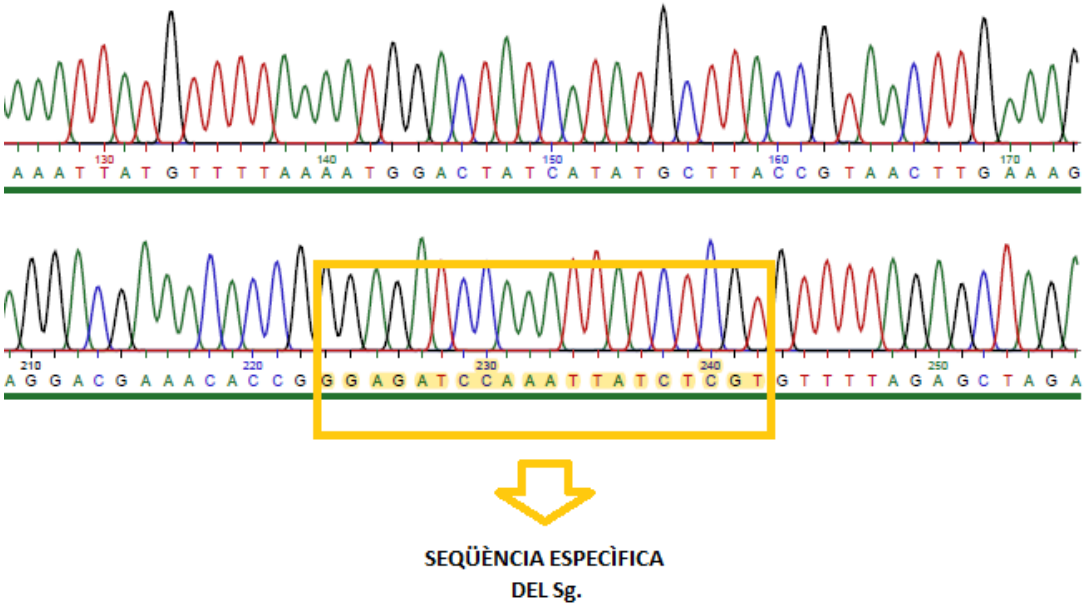


**Figura 15. Cromatograma on es mostra la inserció del sgARN, seqüència que es mostra marcada amb groc, dins el plàsmid pLentiCRISPRv2.**

### 3.3.3 Construcció plàsmid pBluescript-Reparador

En primer lloc, per tal de construir el plàsmid pBluescript-Reparador, s'han sintetitzat per PCR quatre fragments que després s'han unit per extensió de seqüències solapades (Figura 9). Un cop obtinguts els 4 fragments, s'ha unit el braç d'homologia 5' amb l'ADN sintètic, i mCherry amb el braç d'homologia 3', anomenant-los constructe A i B respectivament (Figura 16).

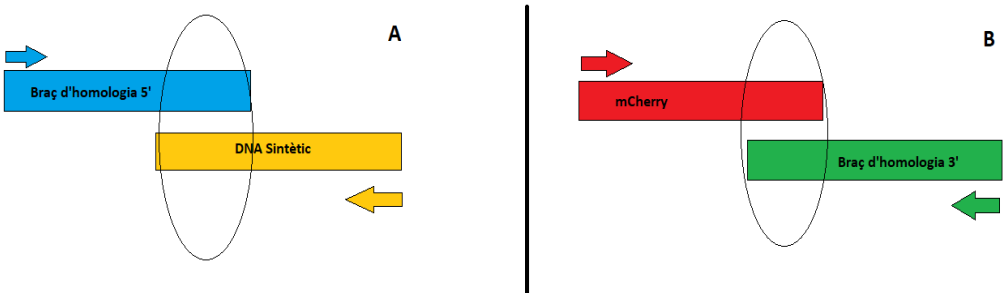


**Figura 16. En la figura A podem observar la unió, a partir d'una SOE, del braç d'homologia 5' i l'ADN sintètic per construir el constructe A. En canvi, en la figura B s'observa la unió entre el fragment mCherry i el braç d'homologia 3' per construir el constructe B.**

A la figura 17 es mostra el resultat de l'amplificació dels fragments A i B esmentats a la figura anterior. El fragment A té una mida d'1 Kb, ja que a l'unir el braç d'homologia de 833 bp i l'ADN sintètic de 111bp fan un total de 944 bp (aproximadament 1Kb). Pel constructe B s'ha obtingut una banda de 2Kb, resultat de la unió del braç d'homologia 3' de 1280 bp amb el fragment de mCherry de 742bp. (Figura 17)

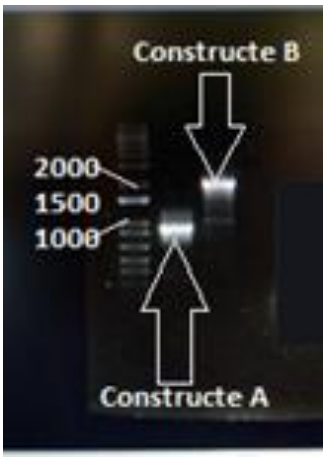


**Figura 17. Anàlisis de les PCR per a la síntesi dels constructes A i B, a partir de les SOE entre el braç d'homologia 5' amb el fragment d'ADN sintètic i el fragment mCherry amb el braç d'homologia 3' . Es mostra la imatge del gel d'agarosa utilitzat en l'anàlisi.**

Seguidament, s'ha unit per SOE els constructes A i B, donant lloc al fragment reparador que posteriorment es lligarà amb el plàsmid pBluescript SK (+). ( Figura 18)

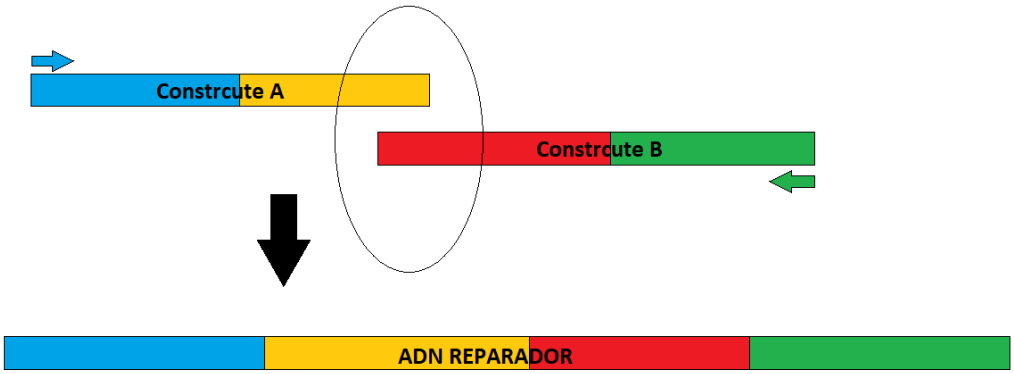


**Figura 18. En aquesta representació podem observar com a partir d'una SOE, el constructes A i B s'han unit per tal de formar el fragment reparador que posteriorment es lligarà amb el plàsmid pBluescript SK (+).**

Per comprovar si aquests dos constructes s'han unit correctament, s'ha fet un altre gel d'agarosa. Com s'ha vist anteriorment, les mides dels constructes A i B són 1Kb i 2Kb respectivament, per tant la mida d'aquesta unió ha de ser de 3 Kb. En el gel d'agarosa presentat a la figura 19, es pot observar la banda de 3 Kb, per tant podem afirmar que la unió dels constructes A i B per tal de formar el fragment reparador ha funcionat. Malgrat això, també es pot observar una banda no desitjada d'1 Kb, per tant, el fragment de 3 Kb es va aïllar del gel, dins una llesca d'agarosa, i es va purificar amb un kit de la casa comercial Qiagen. (Figura 19)

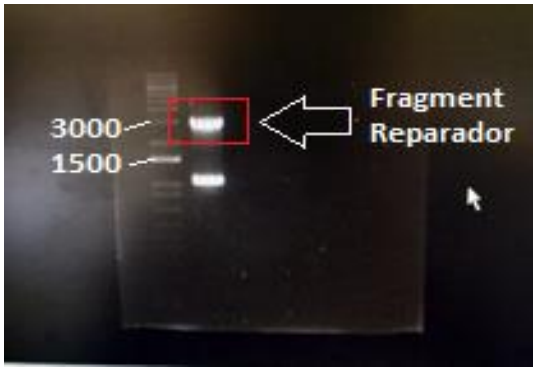


**Figura 19. Anàlisi de la PCR per a la unió dels constructes A i B, a partir d'una SOE, per formar el fragment d'ADN reparador. Es mostra la imatge del gel d'agarosa utilitzat en l'anàlisi.**

Posteriorment, aquest fragment reparador de 3 Kb s'ha lligat amb el plàsmid pBluescript SK(+) digerit amb SalI i BamHI. Aquestes dianes de restricció donen extrems compatibles amb els extrems del fragment reparador digerit amb XhoI i BamHI. En el plàsmid vector es troben en les posicions 674 i 719 respectivament fent que la digestió alliberi 45 bp que hi ha entre les posicions esmentades emportant-se dianes de restricció que hi havia entre aquestes posicions i afegint-ne de noves amb el nostre fragment reparador (Figura 20), com és el cas de la diana per l'enzim PstI, present en el fragment reparador de 3 kb (informació no mostrada).

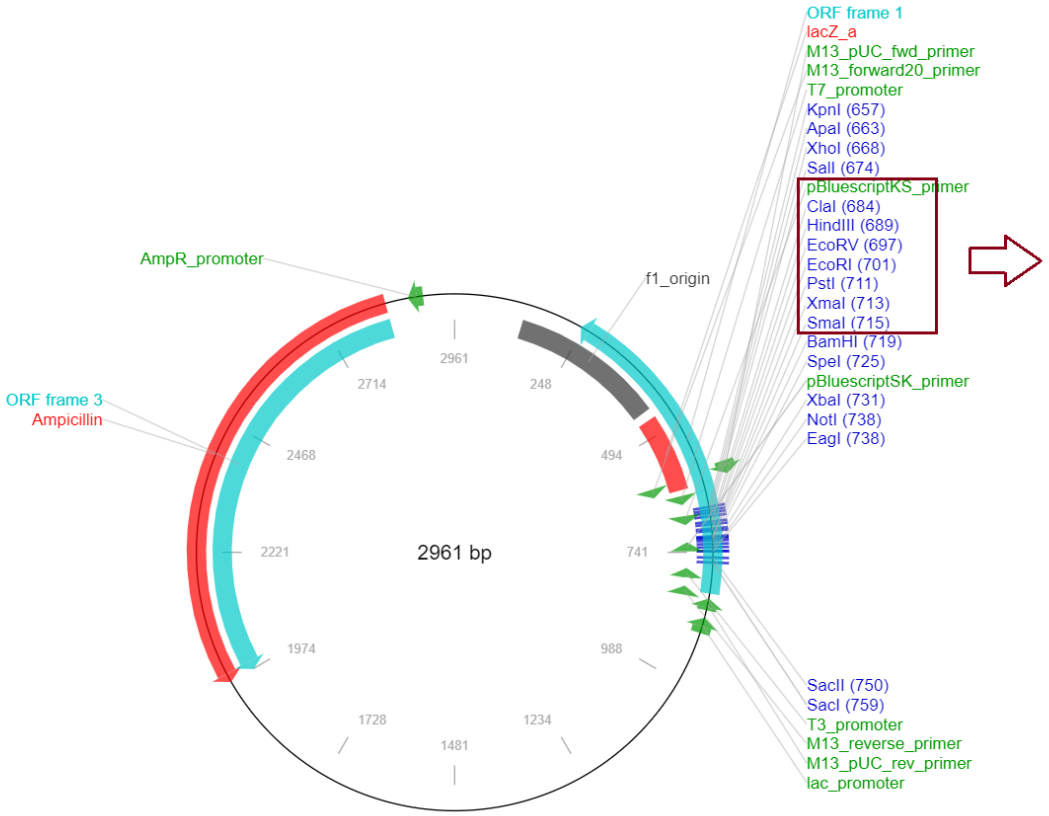


**Figura 20. Plàsmid pBluescript SK (+). Imatge proporcionada per la pàgina d'Addgene. El requadre vermell fa referència a les dianes de restricció que després de la digestió amb SalI i BamhI desapareixen.(Addgene: Homepage, 2020)**

S'ha utilitzat aquest enzim per tal d'observar si el plàsmid i el fragment reparador s'han lligat correctament. Gràcies a l'eina virtual Restriccionmapper3, s'ha vist que l'enzim PstI talla en 3 posicions diferents el plàsmid construït amb la lligació: 275, 1274 i 2725 (Blaiklock, 2020). El tall en aquestes tres posicions genera 3 fragments diferents: un fragment va des de la posició 275-1274 i té una mida de 999 bp( 1 Kb aproximadament), un altre va de la posició 1274-2725 amb una mida de 1451bp (1,4 Kb aproximadament) i el darrer va des de la posició 2725-275 amb una mida de 3511 bp(3,5 Kb aproximadament). A la figura 21 es pot veure que s'ha obtingut la molècula desitjada.

Un dels clons identificats com a putativament correcte per la digestió amb PstI es va portar a seqüenciar.

**Figura 21. Anàlisi de 2 clons que, putativament, contenen el ADN reparador. Es van créixer els dos clons, aïllar el plàsmid per miniprep i analitzar una alíquota per digestió amb Pst I. Es mostra la imatge del gel d'agarosa utilitzat en l'anàlisi.**

A més a més, s'ha buscat, utilitzant el buscador del programa PDF, les seqüències: del ADN reparador amb les 6 mutacions i del linker entre Zo_1 i mCherry dins de les seqüenciacions dels respectius plàsmids, per tal d'acabar de confirmar-ho. Les dades presentades a la figura següent mostren que el plàsmid obtingut té la seqüència correcta. (Figura 22)

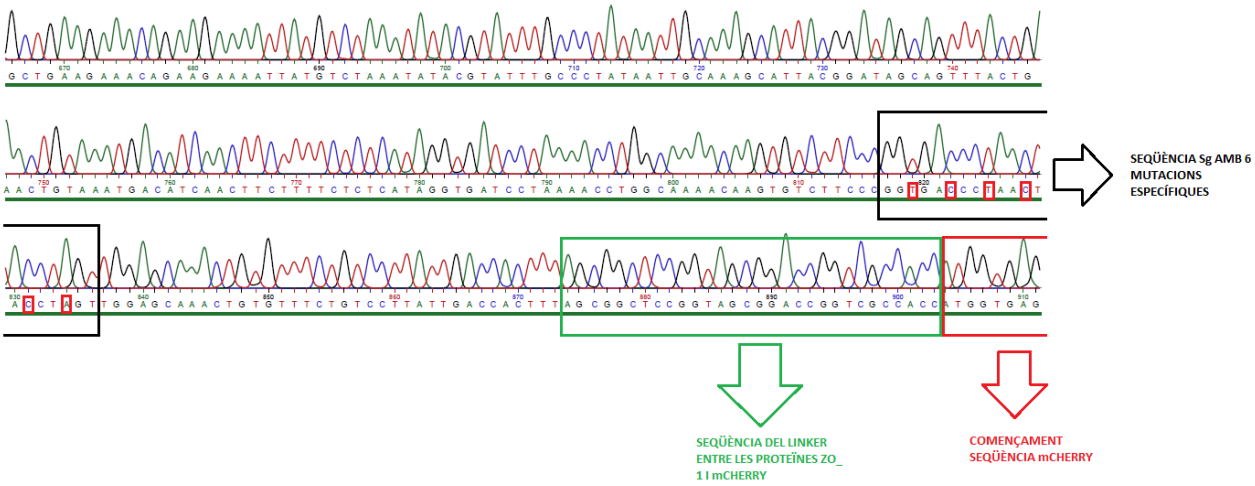


**Figura 22. Cromatograma de la seqüenciació del plàsmid pBluescript-Reparador, on s'observa la seqüència amb les mutacions; requadre negre, la seqüència del linker; requadre verd i l'inic de la seqüència mCherry; requadre vermell.**

### 3.3.4 Transfecció de la línia cel·lular CaCO2 amb els plasmidis pLentiCRISPRv2-ZO_1 i pBluescript-Reparador

Finalment, s'ha dut a terme la transfecció de les cèl·lules Caco2 , perquè expressessin, sota el control del promotor natural, la ZO-1 etiquetada amb mCherry a l'extrem C-terminal. La sublínia utilitzada, deriva del nostre laboratori a partir de cèl·lules obtingudes de la Dra. Raquel Martin (Universitat de Barcelona, facultat de farmàcia, ATCC referència HTB37), que ja expressa la proteïna occludina, fusionada amb la proteïna m-Emerald i mostra una fluorescència verda a nivell de la membrana.

S'ha pogut observar utilitzant un microscopi de fluorescència, cèl·lules de la línia CaCO2 vermelles després d'haver estat transfectades amb la barreja del dos plàsmids creats en aquest treball. Es veu que una proporció de les cèl·lules que mostren expressió de m-Cherry associada a la membrana, presumiblement com a part de la proteïna de fusió ZO_1-mCherry (Figura 23).

No obstant això, a conseqüència del Real Decret 463/2020, del 14 de març, on es declara l'estat d'alarma per a la gestió de la situació de crisis sanitària ocasionada per la COVID-19, aquest apartat ha estat alterat, ja que no s'ha pogut acabar la part experimental d'aquest treball. Per aquest motiu, en un futur per tal de concloure l'experiment, caldrà aïllar clons per caracteritzar-los molecularment analitzant per western blot la presència d'una proteïna del pes molecular esperat i a més d'amplificar la part del genoma rellevant per a seqüenciar-lo i verificar l'edició.

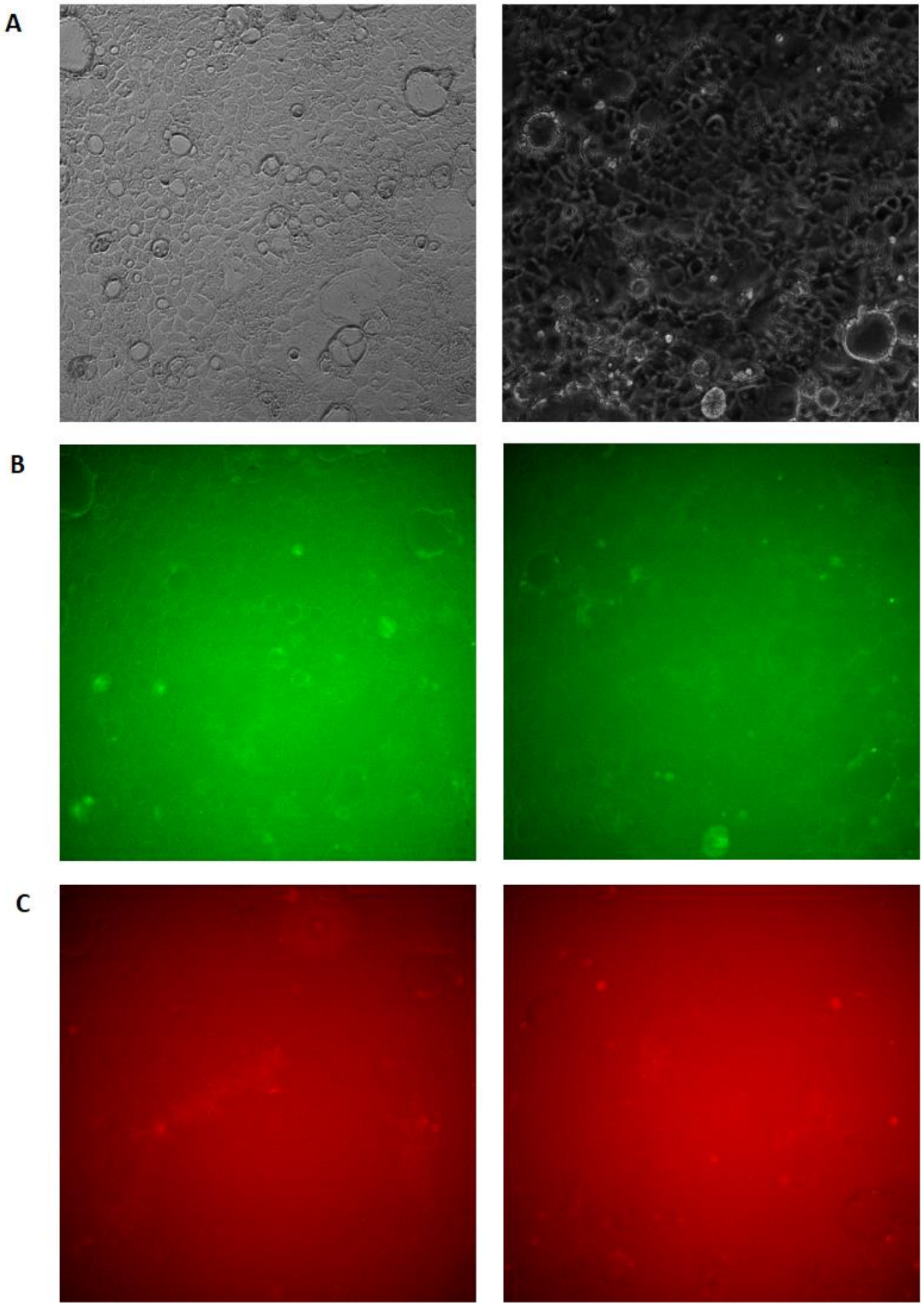


**Figura 23. Edició del genoma de cèl·lules CaCO2. Cèl·lules CaCO2 prèviament editades al locus de la occludina, que expressen una occludina etiquetada amb la proteïna verda fluorescent mEmerald, van ser co-transfectades amb els constructes generats en el present TFG, pLentiCrispv2-ZO_1 i pBluescript-Reparador, incubades en puromycina des de 48 hores després de la transfecció fins 120 hores després de la transfecció i després expandides en absència de selecció durant 15 dies. En aquest moment es van mirar al microscopi de fluorescència. A: camp clar; B: fluorescència deguda a m-Emerald; C: fluorescència deguda a ZO_1-mCherry.**

# 4. Conclusions i Reflexions finals

## 4.1 Conclusions

1. No hi ha estudis publicats amb la proteïna ZO-1 etiquetada, amb mCherry, i expressada a nivells fisiològics

2. Hem construït un plàsmid capaç de dirigir la síntesi d'un RNA guia que portarà la proteïna Cas9 a tallar el genoma humà prop del codó stop del gen de ZO-1

3. Hem construït un plàsmid amb les seqüències codificant per la proteïna fluorescent mCherry flanquejades per braços d'homologia corresponents al gen ZO-1

4. Hem transfectat cèl·lules CaCO2 amb els elements necessaris per poder modificar el genoma de cèl·lules humanes de manera dirigida per obtenir un gen ZO-1 modificat. Aquesta modificació fa que el gen codifiqui una proteïna de fusió ZO-1mCherry, de fàcil seguiment i útil pe diversos estudis. Dades preliminars suggereixen fortament que l'experiment ha estat un èxit, però cal acabar-lo.

## 4.2 Reflexions finals

Realitzar una fusió entre dues proteïnes no ha resultat ser tan fàcil, ja que ha requerit un estudi previ dels coneixements bàsics per tal de portar-ho a terme, a més d'un temps en el laboratori, que s'ha vist afectat per certs inconvenients com és el cas de l'estat d'alarma ocasionada pel COVID-19. Tanmateix, s'han aconseguit certs resultats, a més aquesta experiència m'ha ajudat a comprendre d'una manera més pràctica, els coneixements de certes matèries d'aquest grau tals com enginyeria genètica molecular i cultius cel·lulars entre d'altres.

Si valorem els objectius establerts al començament d'aquest treball, en l'apartat 2, podrem avaluar si els propòsits mencionats s'han pogut portar a terme. El primer objectiu d'aquest treball era generar un plàsmid (plentiCRISPR v2) que codifiques per a l'endonucleasa Cas9 associada a una guia específica d'ARN. Aquest objectiu s'ha pogut portar a terme, gràcies a la construcció de la seqüencia que dona especificitat al sgARN i una posterior lligació amb el plàsmid. Com s'ha vits en l'apartat de resultats, més concretament en l'apartat 3.3.2, la construcció d'aquest fragment ha sigut un èxit, com

podem observar en els gels, i gràcies a la seqüenciació pel mètode de Sanger s'ha pogut observar que la lligació del sgARN i el plàsmid ha tingut èxit, per tant podem afirmar que s'ha assolit aquest objectiu.

El segon objectiu d'aquest treball era el de generar un plàsmid (pBluescript SK (+)) que funciones com un donant reparador per l'ADN i tingues la seqüència de l'etiqueta (proteïna mCherry) flanquejat pels braços d'homologia i així permetre la recombinació homòloga. Aquest objectiu s'ha portat a terme gràcies a la construcció d'un ADN reparador, a partir de 3 SOE, i posteriorment lligar-lo al plàsmid pBluescript SK (+). Com s'ha vist en subapartat 3.3.3 de l'apartat de resultats, la construcció d'aquest fragment ha sigut un èxit, com podem observar en els gels, i gràcies a la seqüenciació pel mètode de Sanger s'ha pogut observar que aquesta lligació ha tingut èxit, per tant podem afirmar que aquest objectiu també ha estat assolit.

Finalment, l'últim objectiu d'aquest treball era obtenir línies cel·lulars clonals de CaCO2, amb integració específica de l'ADN reparador, expressant la proteïna Zona Ocludens 1 etiquetada. Per portar a terme aquest objectiu, primerament s'havien d'assolir els dos primers objectiu i un cop aconseguits aquests obtenir, a partir d'una transfecció, la línia cel·lular CaCO2 editada. Com s'ha comentat en l'apartat de resultats, 3.3.4 més concretament, aquest objectiu ha estat alterat a causa de l'estat d'alarma que estem vivint. Per aquest motiu no podem afirmar que aquest objectiu s'hagi complert, i per tant tampoc podem al·legar que l'objectiu principal d'aquest treball s'hagi assolit. No obstant això, un cop passat aquest estat d'alarma, m'agradaria continuar amb la investigació per tal de complir aquest objectiu principal.

# 5. Bibliografia

*Balda, M. S., Garrett, M. D., and Matter, K. (2003).* The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. J. Cell Biol. 160, 423-432.

*Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M. G., & Zweibaum, A. (1988).* Epithelial Polarity, Villin Expression, and Enterocytic Differentiation of Cultured Human Colon Carcinoma Cells: A Survey of Twenty Cell Lines. Cancer Research, 48(7), 1936–1942.

*Choidas, A., Jungbluth, A., Sechi, A., Murphy, J., Ullrich, A., & Marriott, G. (1998*). The suitability and application of a GFP-actin fusion protein for long-term imaging of the organization and dynamics of the cytoskeleton in mammalian cells. European journal of cell biology, 77(2), 81–90.

*Christin, J. R., & Beckert, M. V. (2017).* Origins and Applications of CRISPR-Mediated Genome Editing. Einstein Journal of Biology and Medicine, 31(1&2), 2.

*Erika, D., & Rendón-Huerta, P. (2008).* Volumen 33 No. 1 Enero-Marzo.

*Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., & Anderson, J. M. (1998).* The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. The Journal of biological chemistry, 273(45), 29745–29753.

*Fogh, J., Fogh, J. M., & Orfeo, T. (1977).* One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. Journal of the National Cancer Institute, 59(1), 221–226.

*González-Mariscal, L., Betanzos, A., & Ávila-Flores, A. (2008).* MAGUK proteins: Strcuture and role in the tight juctions.Seminars in cell and development Biology,11(4), 315-324.

*Hartsock, A., & Nelson, W. J. (2008).* Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. Biochimica et biophysica acta, 1778(3), 660–669. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012

*Holm, Ingvar., Mikhailov, Alexei., Jillson, Tracy & Rose, Birgit. (2000).* Dynamics of gap junctions observed in living cells with connexin43-GFP chimeric protein. European journal of cell biology. 78. 856-66.

*Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakatura, A. (1987).* Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. Journal of Bacteriology, 169(12), 5429–5433.

*Jordan K., et al. (1999).* Trafficking, assembly,and function of a connexin43-green fluorescentprotein chimera in live mammalian cells. Mol. Biol. Cell 10, 2033–2050.

*Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A .P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., Lukyanov, S.A. (1999).* Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. Nature Biotechnol. 17 (10):969-973.

*Niessen C. M. (2007).* Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. The Journal of investigative dermatology, 127(11), 2525–2532.

*Nomme, J., Fanning, A. S., Caffrey, M., Lye, M. F., Anderson, J. M., & Lavie, A. (2011).* The Src homology 3 domain is required for junctional adhesion molecule binding to the third PDZ domain of the scaffolding protein ZO-1. Journal of Biological Chemistry, 286(50), 43352–43360.

*Olenych, S.G., Claxton, N.S., Ottenberg, G.K. & Davidson, M. W. (2007).* The Fluorescent Protein Color Palette. Current Protocols in Cell Biology. 21.5.1-21.5.34.

*Riesen, F. K., Rothen-Rutishauser, B., & Wunderli-Allenspach, H. (2002).* A ZO1-GFP fusion protein to study the dynamics of tight junctions in living cells. Histochemistry and Cell Biology, 117(4), 307–315.

*Roberts, B., Haupt, A., Tucker, A., Grancharova, T., Arakaki, J., Fuqua, M. A., Nelson, A., Hookway, C., Ludmann, S. A., Mueller, I. A., Yang, R., Horwitz, A. R., Rafelski, S. M., & Gunawardane, R. N. (n.d.).* Systematic gene tagging using CRISPR/Cas9 in human stem cells to illuminate cell organization Running title: Methods for endogenous FP tagging in stem cells.

*Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A., & Zucco, F. (2005).* The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: in£uence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. In Cell Biology and Toxicology (Vol. 21). Springer.

*Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T. S., Heckl, D., Ebert, B. L., Root, D. E., Doench, J. G., & Zhang, F. (2014).* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science, 343(6166), 84–87.

*Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y. (1962).* Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent. Journal of Cellular and Comparative Physiology, 59, 223–239.

*Tervonen, A., Ihalainen, T. O., Nymark, S., & Hyttinen, J. (2019).* Structural dynamics of tight junctions modulate the properties of the epithelial barrier. PLoS ONE, 14(4), e0214876.

*Tsien, R. Y., (1998).* The green fluorescent protein. Annu. Rev. Biochem. 67 :509-544.

*Willott, E., Balda, M. S., Heintzelman, M., Jameson, B., & Anderson, J. M. (1992).* Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 262(5 31-5).

# 6. Webgrafia


Addgene.org. 2020. *Addgene: Homepage*. [online] Extret de: <https://www.addgene.org/>. [Consulta: 20-02-2020].

Benchling. 2020. *Cloud-Based Informatics Platform For Life Sciences R&D | Benchling*. [online] Extret de: <https://www.benchling.com/>. [Consulta: 03-02-2020].

Blaiklock, P., 2020. *Restrictionmapper Version 3*. [online] Restrictionmapper.org. Extret de: <http://www.restrictionmapper.org/>.[Consulta: 20-02-2020].

Blast.ncbi.nlm.nih.gov. 2020. *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*. [online] Extret de: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. [Consulta: 04-02-2020].

Media.addgene.org. 2020. [online] Extret de: <https://media.addgene.org/data/plasmids/58/58473/58473-map_X0HCgs9WaXq6.pdf> [Consulta: 20-05-2020].

Ncbi.nlm.nih.gov. 2020. *National Center For Biotechnology Information*. [online] Extret de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Consulta: 03-02-2020].

Ncbi.nlm.nih.gov. 2020. *Primer Designing Tool*. [online] Extret de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. [Consulta: 03-02-2020].