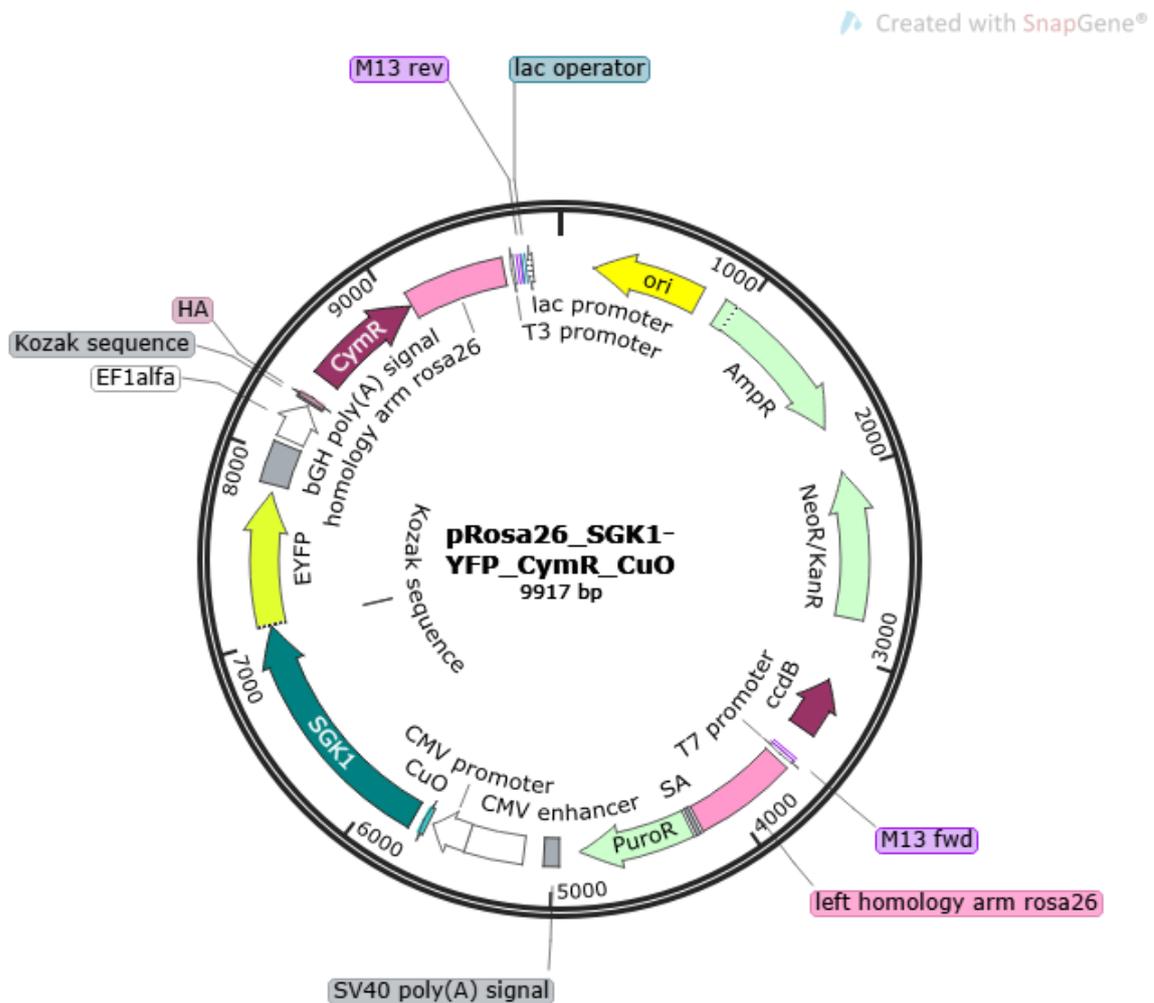


Adaptación del sistema de expresión inducible por cumato mediante CRISPR/Cas en células de neuroblastoma de ratón

Adaptation of the cumate induced expression system with CRISPR/Cas into neuroblastoma mice cells



Trabajo de Fin de Grado

JULIÁN WELLER PÉREZ

Tutorizado por Belinda Rivero Pérez y David Bartolomé Martín

Grado en Biología. Julio 2022

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	1
3.1 SISTEMA DE EXPRESIÓN INDUCIBLE: <i>CUMATE GENE-SWITCH</i>	1
3.2 SGK1	2
3.3. SISTEMA CRISPR/Cas	4
3. OBJETIVOS.....	7
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
5.1. CULTIVOS CELULARES	7
5.2 CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN	7
5.1.1 SECUENCIACIÓN DE <i>pCuO</i>	9
5.2.1 DISEÑO CRISPR	9
5.2.2 CLONAJE DE ELEMENTOS REPRESORES (EF1 α Y CymR)	10
5.1.3 CLONAJE DE ELEMENTO REGULADOR (CuO)	14
5.1.3.1 pCuO mediante InFusion	14
5.1.3.2 pCuO mediante clonaje tradicional	14
5.1.3.3 Comprobación del plásmido	15
5.3 ENSAYOS EN CULTIVOS CON CUMATO	15
5.2.1 ENSAYO CON TRANSFECCIÓN TRASCIENTE	15
5.2.2 ENSAYO CON CRISPR/CAS	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
6.1 EXTRACCIONES DE DNA PLASMÍDICO	18
6.2 DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO BASE LINEARIZADO Y PRODUCTO DE PCR	18
6.3. DIGESTIÓN CON HIND III DE PROSA26_SGK1_CYMR Y SECUENCIACIÓN	18
6.4 RESULTADOS DEL WESTERN BLOT DE TRANSFECCIONES DE LA H2K293 CON DISTINTOS PLÁSMIDOS	19
6.5 COMPROBACIÓN DEL PLÁSMIDO PROSA26_CUO	19

6.6 WESTERN BLOT DE TRANSFECCIÓN TRASCIENTE DE N2A	20
6.6.1. MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA	21
6.7 VISUALIZACIÓN DEL ENSAYO CON CRISPR CON MICROSCOPIO STORM	21
7. CONCLUSIONES	23
8. BIBLIOGRAFÍA.....	24

1. RESUMEN

Con los sistemas de expresión inducibles basados en los operones bacterianos, se puede controlar la expresión de ciertos genes, siendo regulable, incluso, el nivel de expresión. La línea celular N2a reprime la expresión del gen *SGK1* (*serum and glucocorticoid-regulated kinase 1*) cuando es transfectada con plásmidos. En este trabajo, se plantea la posibilidad de regular la expresión de Sgk1 en estas células introduciendo el gen en su genoma bajo el control del sistema de expresión inducible por cumato basado en los operones *cmt* y *cym*. La inserción de SGK1 fusionada a la proteína amarilla fluorescente se realizó en el *locus rosa26* mediante el empleo de la tecnología CRISPR/Cas. La edición genética fue realizada con éxito, aunque se debe profundizar más en el estudio de la regulación de Sgk1 mediante la adición de cumato, optimizando las concentraciones de cumato y el tiempo de exposición

With modern inducible expression systems, it's even possible to make cells express certain genes that they normally wouldn't express. N2a cell line represses *SGK1* gene (serum and glucocorticoid-regulated kinase 1) expression when it is transfected with a plasmid. We pretend to get a cell line of modified N2a cells that has a cumate inducible expression system, that regulates SGK-YFP expression. The construct will be inserted in the locus *rosa26* with CRISPR/Cas technology. The inserted construct will have a SGK1 protein fused to a fluorescent protein that will be expressed in presence of cumate. The insertion was done successfully but further research is need to optimize cumate concentration and incubation time

2. INTRODUCCIÓN

2.1 SISTEMA DE EXPRESIÓN INDUCIBLE: *CUMATE GENE-SWITCH*

Los sistemas de expresión inducible no son descubrimientos recientes, pero a día de hoy son herramientas muy empleadas en distintos ámbitos biológicos. El sistema *cumate* (Mullick et al., 2006) es un sistema de expresión inducible, que emplea los elementos reguladores de operones bacterianos *p-cmt* y *p-cym* de *Pseudomonas putida* para generar distintos modelos de expresión inducible (Eaton, 1997). El operón *cym* se encarga de la degradación del p-cimeno hasta el p-cumato; mientras que el *cmt* continua con el catabolismo del p-cumato. Ambos operones contienen en su secuencia el gen *cymR*; un gen codificante de una proteína represora, CymR. Esta proteína tiene en su estructura un motivo de hélice-giro-hélice que permite su unión al DNA (Brennan & Matthews, 1989). En los operones mencionados anteriormente, CymR reconoce una secuencia entre el promotor del operón y el primer gen del operón *cym*; secuencia

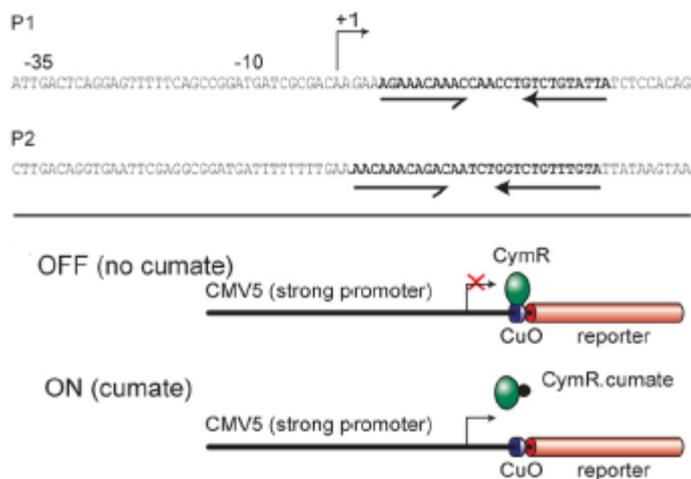


Figura 1 Arriba tenemos señaladas las secuencias *CuO* que reconoce CymR. Abajo tenemos representado el funcionamiento de la regulación del sistema de expresión creado a partir de los elementos del operón *cym*.

también presente en *cmt*. A esta secuencia reguladora que reconoce CymR se le denominó *CuO*. Cuando CymR se une a la secuencia *CuO*, inhibe la expresión del gen que regula; pero cuando CymR se une con una molécula de cumato, pierde la capacidad de unirse al ADN, permitiendo a la transcripción del gen; como se indica en la Figura 1 (Mullick et al., 2006).

2.2 SGK1

La proteína SGK1 (*serum and glucocorticoid regulated kinase 1*), es una serina treonina quinasa perteneciente a la subfamilia de quinasas SGK, familia que pertenece a su vez a la familia de las quinasas AGC (Ghani, 2021); codificada por el gen *SGK1* (Webster et al., 1993; Zhou & Snyder, 2005). Se trata de un gen regulado tanto transcripcionalmente como postranscripcionalmente por varios estímulos externos detectados por la célula, aunque se activa principalmente por la presencia de glucocorticoides y suero (Brunet et al., 2001). En humanos, el gen *SGK1* se encuentra localizado en el cromosoma 6, más concretamente, en el locus 23 (6q23) (Waldegger et al., 1998); mientras que otras proteínas de esta subfamilia se encuentran en diferentes cromosomas (Lang et al., 2006). Estas otras proteínas son SGK2 y SGK3, y junto con SGK1 son importantes intermediarios en la vía de señalización de la PI3K (Fruman et al., 2017; Kobayashi et al., 1999).

Tanto en humanos como en ratones, SGK1 cumple con unas funciones similares, el mantenimiento de la homeostasis. Entre alguna de las funciones que cumple esta proteína, se pueden señalar sus funciones principales como regulador del transporte de sodio celular y como modulador de distintos canales y transportadores iónicos (Ghani, 2021). En el riñón, SGK1 cobra un papel muy importante en la reabsorción de sodio en el túbulo distal. Como se indica en la figura 2 (Zhou & Snyder, 2005), SGK1 en las células epiteliales del riñón, es capaz de fosforilar a Nedd4-2, una proteína que promueve la ubiquitinización de

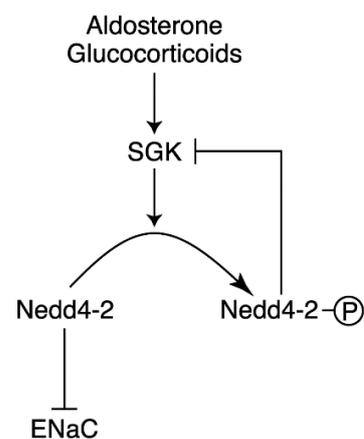


Figura 2 Mecanismo de regulación de ENaC por SGK1

los canales de sodio ENaC, promoviendo su degradación. Al fosforilar a Nedd4-2, SGK1 impide que reconozca a estos canales, evitando su eliminación. A su vez, la fosforilación de Nedd4-2 induce la degradación de SGK1 mediante ubiquitinación.

Como proteína que mantiene la homeostasis en el cuerpo, su expresión puede ser estimulada por una variedad de situaciones que impliquen estrés celular, como pueden ser cambios en el volumen celular por choques osmóticos, deshidratación, altas concentraciones de glucosa, estrés oxidativo y mecánico, choques térmicos, daños neuronales, etc. (Lang et al., 2019; Tang, C. et al., 2011)

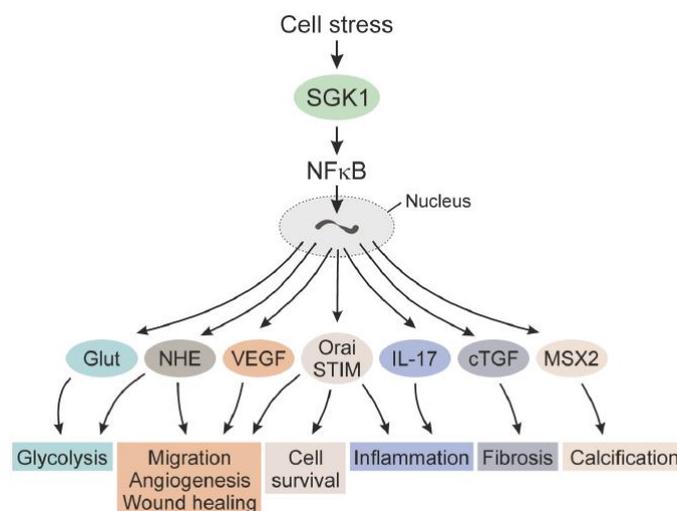


Figura 3 Efectos de SGK1 por el estrés.

En situaciones de estrés celular por falta de energía, SGK1 estimula la absorción de glucosa por parte de las células para realizar la glicólisis, a la vez que se estimula la angiogénesis. Si el estrés continúa, la proteína promueve la supervivencia celular mediante una acción antiapoptótica (Brunet et al., 2001) y la migración celular, siendo esta última importante para los procesos de reparación tisular. Cuando el estrés se alarga lo suficiente en el tiempo, SGK1 provoca el reemplazo de células consumidoras de energía por matriz extracelular mediante un aumento de la fibrosis y calcificación del tejido. (Lang et al., 2019)(Figura 3).

Dada las funciones que tiene de forma normal la proteína, no es de extrañar que alteraciones en su expresión y regulación puedan provocar o ser consecuencia de enfermedades de distinto tipo: obesidad, isquemia, hipertensión, crecimiento tumoral, enfermedades que involucren fibrosis (Waerntges et al., 2002), enfermedades neuronales, (Ghani, 2021; Lang et al., 2006; Zhang, J. et al., 2021).

En los últimos años, SGK1 ha cobrado importancia tanto como diana para tratamientos contra distintos tipos de cáncer (Conza et al., 2017) como biomarcador para la prognosis de pacientes oncológicos (Tang, Z. et al., 2018); ya que, en varios tipos de cáncer, se ha observado una modificación de la expresión de SGK1, encontrándose también diferentes patrones de modificación (Sang et al., 2020).

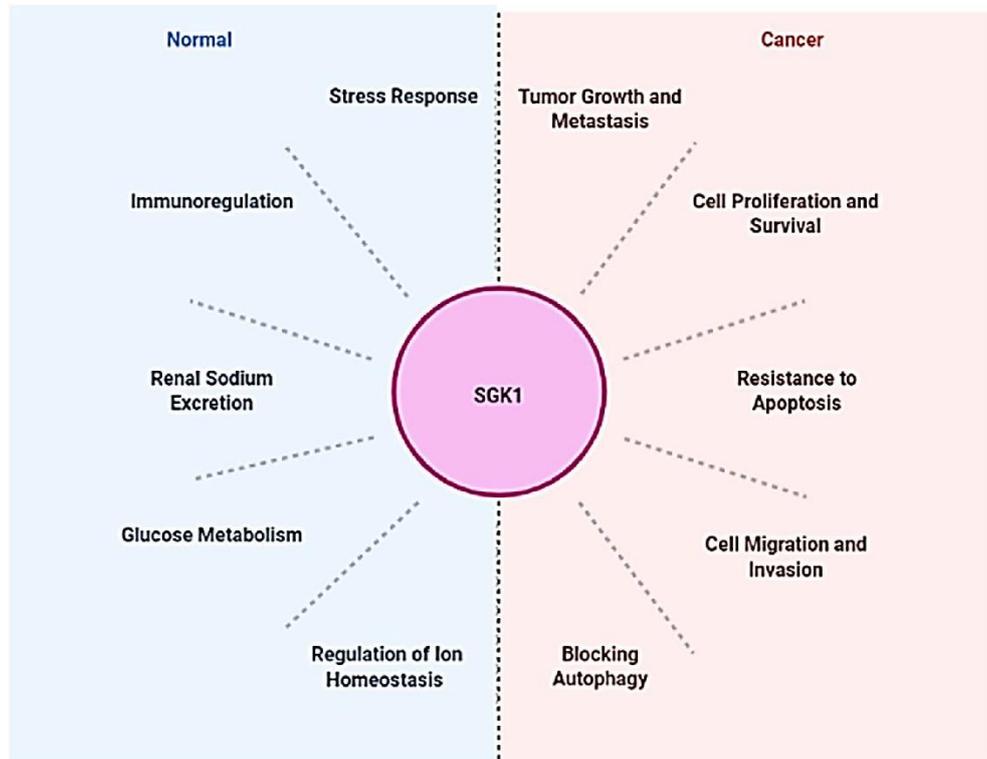


Figura 4 Comparación entre funciones en condiciones normales de SGK1 y en células cancerosas (Ghani, 2021)

2.3. SISTEMA CRISPR/Cas

El estudio de los *loci* CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) (Jansen et al., 2002), presentes en bacterias y arqueobacterias, ha supuesto uno de los mayores avances en la ingeniería genética de los últimos años, dadas las aplicaciones que se han desarrollado a partir de ellos (Zhang, F. et al., 2014). Estos sitios del genoma están compuestos por secuencias cortas repetidas intercaladas con secuencias variables, así como una secuencia líder adyacente a estas repeticiones. Acompañando a los *loci* CRISPR, existen unas secuencias codificantes de proteínas que se denominan *Cas* (*CRISPR-associated*) (Jansen et al., 2002).

En el año 2007 se descubrió que las secuencias que flanquean las regiones repetidas del locus provienen de genomas de bacteriófagos y plásmidos conjugativos. Por lo que, se propuso como

un sistema de defensa adaptativo que desarrollaron bacterias y arqueas frente a las infecciones por DNA foráneo (Barrangou et al., 2007)

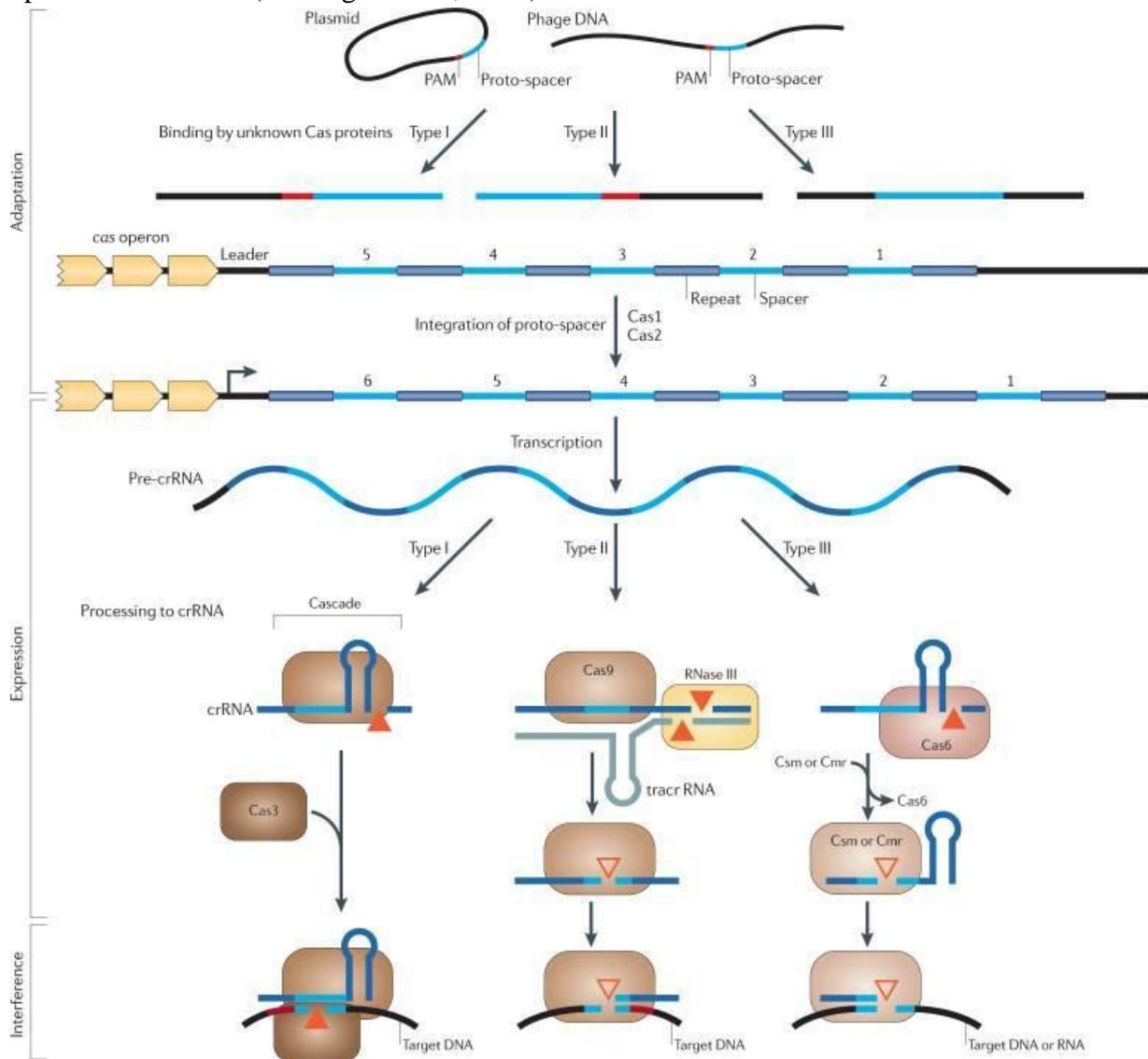


Figura 5 Esquema del funcionamiento de los distintos tipos de sistemas CRISPR/Cas

En la figura 5 (Makarova et al., 2011) se observa el funcionamiento del sistema CRISPR/Cas para la obtención de resistencias por parte de los procariontes. La inclusión del material genético extraño (protoespaciadores) se da en la fase de adaptación y viene mediada por las proteínas Cas1 y 2 asociadas al *locus* CRISPR, que insertan este material genético entre dos secuencias cortas palindrómicas, generando un espaciador. Posteriormente, en la fase de expresión, se transcribe el *locus* y se genera un pre-crRNA (CRISPR RNA) que necesitará ser procesado para poder obtener los distintos crRNA. Dependiendo del sistema CRISPR que porten tendrán un procesamiento u otro. Centrándonos en los sistemas tipo II, un *trans-encoded* small RNA (tracrRNA) se hibrida en una región espaciadora y gracias a una RNasaIII se genera un fragmento que servirá de guía para Cas9, conduciéndola por complementariedad de bases al sitio en el que ejerce su función nucleasa y realiza un corte de doble cadena. Para que este corte

se realice, la secuencia que reconozca el crRNA tiene que tener una secuencia PAM (*Protospacer Adjacent Motif*); para diferenciar la secuencia del *locus CRISPR* y la secuencia extraña (Mojica et al., 2009). En los sistemas tipo II la secuencia PAM es NGG (donde N es cualquier nucleótido) y se encuentra corriente abajo de la región homóloga del crRNA (Jinek et al., 2012).

E. Charpentier y J. Doudna propusieron extraer el sistema CRISPR/Cas9 de las bacterias y aplicarlo en el laboratorio, como herramienta de edición génica. Descubrieron los elementos necesarios para realizar este corte específico in vitro, identificando las moléculas de crRNA y tracrRNA como imprescindibles, además de la propia Cas9. En el mismo trabajo, demostraron la posibilidad de sustituir el dúplex crRNA: tracrRNA (Jinek et al., 2012); por una única molécula de RNA, denominada sgRNA (del inglés *single guide RNA*).

En el laboratorio, una vez producida de forma específica una rotura de doble cadena de DNA (DSB, *Double Strand Break*) (Jinek et al., 2012) la célula procede a reparar el daño generado. Para ello, existen principalmente dos vías: la reparación de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *non-homologous end joining*) o la reparación guiada por homología (HDR, del inglés *homology directed repair*), como se observa en la Figura 6 (Guitart et al., 2016). En el primer caso, la célula repara la DSB mediante la ligación de los extremos generados, por lo que pueden ocurrir

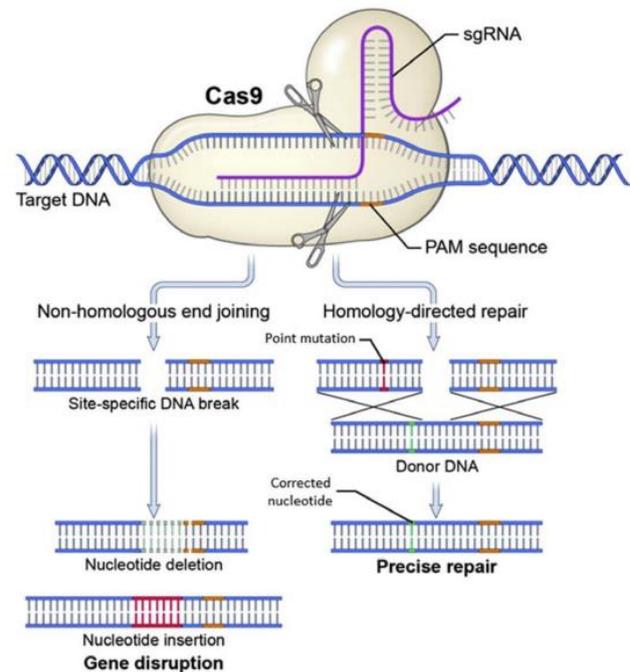


Figura 6 NHEJ y HDR tras DSB mediada por CRISPR/Cas9

inserciones o deleciones de nucleótidos, lo que con alta probabilidad introduce un codón de parada prematuro, perdiendo la función del gen. En el segundo caso, la célula puede utilizar un molde de DNA para la reparación de la DSB, si este tiene regiones homólogas a ambos lados de la zona de corte de Cas9, aprovechando esta estrategia para insertar nucleótidos o incluso genes enteros a la secuencia (Guitart et al., 2016).

3. OBJETIVOS

En experimentos previos realizados en el laboratorio de Fisiología del departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Universidad de La Laguna, se observó que la línea celular N2a es capaz de reprimir la expresión de SGK1 tras realizar una transfección transiente con un plásmido que contenía los genes necesarios para la expresión de SGK1-YFP. Partiendo de esta información, el objetivo de este Trabajo Fin de Grado es adaptar los elementos de inducción por cumato a partir de un sistema comercial a un molde de reparación de DNA, para introducirlo en el *locus rosa26* (Soriano, 1999), mediante el empleo de la tecnología CRISPR/Cas9. Para ello, los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Identificar los elementos del sistema de inducción por cumato en el sistema comercial *PiggybacTM*.
2. Clonar los elementos del sistema de inducción por cumato en el pRosa26-SGK1-YFP.
3. Editar genéticamente las células N2a mediante CRISPR, para incorporar la secuencia codificante de la proteína SGK1 fusionada a la proteína amarilla fluorescente, junto con los elementos del sistema de inducción por cumato.
4. Comprobar el funcionamiento del sistema de inducción por cumato en el genoma de las células N2a.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Para nuestro experimento, necesitamos construir nuestro sistema de expresión que luego insertaremos en el genoma de las células N2a para poder regular la expresión de SGK1.

4.1. CULTIVOS CELULARES

Para la realización de este trabajo se emplearon dos líneas celulares diferentes. La línea principal, la que se pretende modificar genéticamente es la N2a, que deriva de células de neuroblastoma de ratón (American type culture collection, #CCL-131). Sin embargo, para la comprobación de las construcciones que se fueron obteniendo a lo largo del trabajo, se emplearon las células HEK293T, que son células embrionarias de riñón humano con el antígeno T SV40 (American type culture collection, #CRL-3216).

Para garantizar unas condiciones de trabajo asépticas, las células fueron manipuladas en campanas de flujo laminar de clase II. Se cultivaron en medio de DMEM (Biowest, Países del Loira, Francia), suplementado con suero fetal bovino al 10% y una mezcla de los antibióticos

penicilina/estreptomicina (Thermo-Fisher Scientific, Massachussets, Estados Unidos). Las células se incubaron a 37°C, con CO₂ al 5% y fueron pasadas al alcanzar una confluencia del 80%, aproximadamente.

4.2 CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN

Se partió del plásmido comercial PB-*Cuo-MCS-IRES-GFP-EF1 α -CymR-Puro Inducible cDNA Cloning and Expression Vector* (en adelante, pCuO, Figura 7) de la casa *System Biosciences* (California, Estados Unidos), que porta los elementos que nos interesan para el sistema inducible.

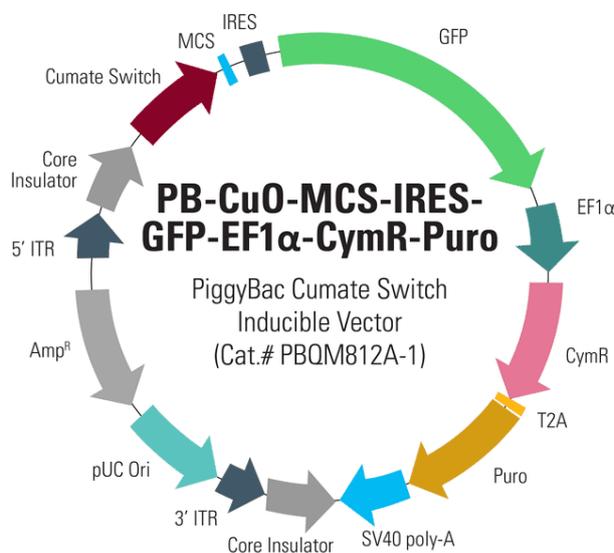


Figura 7 Mapa genético del plásmido comercial con el sistema inducible

Una vez recibido, el plásmido se utilizó para transformar bacterias de una cepa de *Escherichia coli* supercompetente, la cepa TOP10. La transformación se llevó a cabo mediante un protocolo de choque térmico. A una alícuota de 50 μ l de suspensión bacteriana se le agregó 1 μ l del plásmido y se incubó 20 min en hielo. A continuación, se sumergieron en un baño de agua a 42°C durante 30 seg y nuevamente, 2 minutos en hielo. Se le añadieron 300 μ l de medio SOC precalentado a 37°C. Este medio es empleado para mejorar la tasa de rendimiento de las transformaciones en cepas de bacterias supercompetentes y está compuesto de 2% Triptona, 0,5% de extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 MgSO₄ y 20 mM de glucosa. Se incubaron 1 h a 37 °C y 200 rpm; y de ahí, se sembraron 100 μ l en una placa de LB (Luria-Bertani) y agar con 50 μ g/ml de ampicilina. La placa se deja en la incubadora a 37 °C overnight y al día siguiente, se seleccionó una colonia que se sembró en 50 ml de medio LB-ampicilina y se incubó a 37 °C a 200 r.p.m. hasta el día siguiente. A continuación, se extrajo el pCuO empleando el kit NucleoBond Xtra Midi, siguiendo las instrucciones del fabricante

(Macherey-Nagel, Dueren, Alemania). La concentración obtenida se midió con el Nanodrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Lyon, Francia),

De este plásmido, nos interesan los elementos que conforman el sistema de expresión inducido por cumato, el cumato switch y los elementos represores EF1 α y CymR. Sin embargo, solo disponíamos del mapa del plásmido (Figura 7), por lo que el primer paso que se realizó fue obtener la secuencia nucleotídica del vector, especialmente de los elementos de interés .

4.1.1 SECUENCIACIÓN DE *pCuO*

El plásmido *pCuO* purificado se envió a secuenciar a la empresa MacroGen SPAIN (Madrid, España), empleando los oligonucleótidos indicados en la tabla 1. Se comenzó a secuenciar con oligonucleótidos disponibles en el laboratorio, y a medida que se avanzaba en la lectura de la secuencia, se diseñaron nuevos cebadores.

F-CMV	5'-GGGCGGTAGGCGGTGTACGGT-3'
F-EF1 α	5'-GGGCAGAGCGCACATCGCCC-3'
R-CymR	5'-GCGCTTGAATTCGCGTACC-3'
F-GFP	5'-ACGTAAACGGCCACAAGTTC
R-GFP	5'-AAGTCGTGCTGCTTCATGTG-3'
F-Core Ins	5'-ACGTAAACGGCCACAAGTTC-3'

Tabla 1 Oligos empleados en la secuenciación del *pCuO*

Tras recibir los resultados de la secuenciación, conseguimos obtener la secuencia de los elementos represores EF1 α y CymR y del *cumate switch*. Con esta información se diseñaron las estrategias para clonar los elementos de interés en el plásmido *pRosa26_SGK1_YFP*, disponible en el laboratorio.

4.2.1 DISEÑO CRISPR

Se eligió una estrategia de CRISPR empleando plásmidos disponibles en el laboratorio. El plásmido pX330 (#42230, Addgene) porta la información nucleotídica que codifica para Cas9 y el gRNA para dirigir a Cas9 a cortar en el *locus rosa26* (Figura 8). A su vez, el plásmido *pRosa26_CuO_SGK1_CymR* (Figura 8, final de material y métodos) se usó como molde de reparación del corte de doble cadena producido por Cas9. Por ello, en este vector se clonaron los elementos del sistema de inducción por cumato. Ambos plásmidos se purificaron empleando el kit *NucleoBond Xtra Midi*, siguiendo las instrucciones del fabricante (Macherey-Nagel, Dueren, Alemania) y midiendo su concentración en Nanodrop™ 2000.

4.2.2 CLONAJE DE ELEMENTOS REPRESORES (EF1 α Y CymR)

El clonaje de los elementos represores se llevó a cabo mediante el kit In-Fusion® HD (Takara BioKusatsu, Japón).

Para la inserción de los elementos represores EF1 α -CymR se digirió el *pRosa26_SGK1_YFP* con la enzima *HindIII* (New England Biolab, New England, Estados Unidos); capaz de linealizarlo poco antes del brazo de homología derecho del *rosa26* (Figura 9). Para ello, se mezclaron 10 μ g del *pRosa26_SGK1_YFP*, tampón CutSmart 1X, 20 U de la enzima *HindIII* HF y agua hasta completar un volumen de reacción de 50 μ l. La reacción se lleva a cabo a 37°C, durante 1 hora.

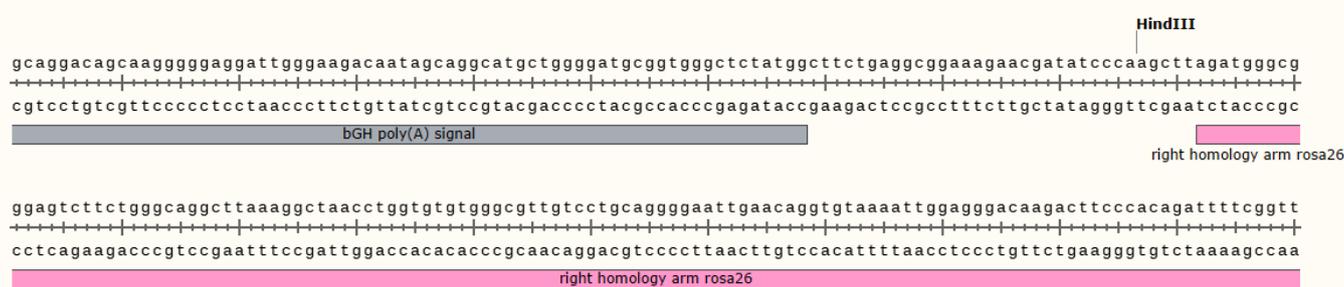


Figura 9 Zona de corte con *Hind III* en *pRosa26_SGK1_YFP*

F- Ef1 α Infu	5'-AAGAACGATATCCCAGGGCAGAGCGCACATCGCCC-3'
R- CymR Infu	5'-CCGCCCATCTAAGCTGCGCTGAATTTGCGTACC-3'

Tabla 2 Oligos empleados para el clonaje infusion

Al mismo tiempo, se realiza una PCR a partir del pCuO empleando los oligonucleótidos diseñados para el clonaje In-Fusion (Tabla 2), para amplificar el fragmento EF1 α -CymR. Estos oligos tienen una cola de 15 pb complementaria a la zona de corte con *HindIII* en *pRosa26_SGK1_YFP*. Las muestras de PCR se prepararon en un volumen de 50 μ l, añadiendo PfuUltra II Hotstart 1X (Agilent, California, Estados Unidos), 0,35 μ M cada cebador (Tabla 2); 1 μ l del plásmido pCuO y agua hasta completar el volumen final. El programa de PCR consistió en una temperatura inicial de desnaturalización a 95 °C 5 min, seguido por 35 ciclos de los pasos de desnaturalización a 95 °C 30 seg, hibridación de los cebadores a 55 °C durante 30 seg y fase de extensión a 72 °C 30 seg, se añadió un paso de extensión final a 72 °C durante 7 min.

Los productos, tanto de la digestión como de la PCR, fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con el reactivo intercalante GelRed 1X (Biotium, California, Estados Unidos), realizada en el tampón TAE 1X. Se empleó como marcador de peso molecular el PeqGOLD (VWR, Pensilvania, Estados Unidos). A continuación, las bandas de interés obtenidas fueron extraídas del gel y purificadas con el kit *NucleoSpin Gel and PCR Cleanup*

(Macherey-Nagel, Dueren, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. a concentración de las extracciones de DNA obtenidas fueron medidas con el Nanodrop 2000TM y almacenadas en el congelador hasta su uso.

Las concentraciones óptimas para el clonaje InFusion® se determinó empleando la calculadora molar de Takara Bio (<https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/prime-r-design-and-other-tools/in-fusion-molar-ratio-calculator>). Para este ensayo, fueron necesarios 167 ng de vector y 33 ng de producto de PCR, que se mezclaron con el reactivo In-Fusion® HD *enzyme premix* 1X y 1 µl del *Cloning enhancer*, completando con agua hasta un volumen final de 10 µl. Los tratamientos de temperatura se realizaron en un termociclador, sometiendo a la mezcla a 37 °C durante 15 minutos seguido de otro periodo de 15 minutos de incubación a 50°C. Al final este proceso se transformaron bacterias *E. coli* Top10 con el plásmido obtenido como se explicó en el punto 5.1, con la diferencia de que se añadieron 2 µl de la mezcla del clonaje.

Se seleccionaron 10 colonias de las obtenidas de la transformación, y se sembraron en 5 ml de medio líquido LB con ampicilina 5 µg/ml, incubándolas a 37 °C a 200 r.p.m. *overnight*. Tras esta incubación se procedió a realizar un protocolo de extracción de DNA plasmídico empleando el kit *NucleoSpin Plasmid EasyPure, Mini kit for easy plasmid DNA purification* (Macherey-Nagel, Dueren, Alemania), según las recomendaciones del fabricante. Los productos obtenidos se llevaron al Nanodrop™ 2000 para medir su concentración.

Para saber si el clonaje se ha realizado correctamente se realizó un ensayo para identificar la incorporación del inserto. Estudiando el mapa genético de ambos plásmidos, observamos que el plásmido pRosa_SGK1_CymR tiene dos dianas para *Hind III* (Figura 10) debido a la inserción de los elementos represores mientras que el pRosa26_SGK_YFP solo tiene una diana para esta enzima, debido a que mantiene el sitio de corte de *HindIII* ya que no hubo inserción. Gracias a esto se puede diseñar un ensayo basándose en la diferencia de dianas para esta enzima de restricción. Se digirió 1 µg de DNA cada plásmido extraído a una digestión de 1 µg de DNA con 16 U de *HindIII* y tampón CutSmart 1X, completando con agua hasta un volumen final de 20 µl. Se incubaron a 37°C durante una hora y después se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, con GelRed 1X y realizada en el tampón TAE 1X. Los plásmidos que mostraron el patrón de bandas esperado si se incorporó el inserto, fueron enviados a secuenciar, para confirmar que dicha inserción se había realizado de forma correcta.

La secuenciación se realizó por parte de la empresa Macrogen SPAIN (Madrid, España) a partir de los cebadores F-CymR y R-EF1 (Tabla 3), con los que se puede leer la zona de inserción.

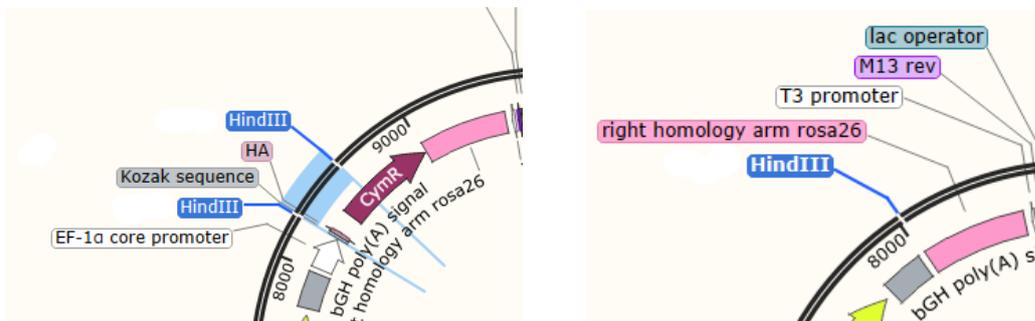


Figura 10 Comparación de dianas de corte entre *pRosa26-SGK1-CymR* y *pRosa26-SGK1-YFP*

R-EF1α	5'-GGGCGATGTGCGCTCTGCCC-3'
F-CymR	5'-GGTACGCGAAATTCAAGCGC-3'

Tabla 3

Con los resultados de la secuenciación, podemos comparar la secuencia que obtuvimos con la secuencia que tiene el constructo del *pRosa_SGK1_Cymr*. Empleando la herramienta del NCBI, BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), comparamos ambas secuencias y se elige la correcta. Una vez se obtuvo el *pRosa26-SGK1-CymR*, se transformaron bacterias TOP10 mediante el protocolo de choque térmico, como se indicó en el apartado 5.1, para realizar la extracción de mayor cantidad del plásmido con el kit *NucleoBond Xtra Midi* (Macherey-Nagel, Dueren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La expresión de SGK1-YFP del plásmido *pRosa-SGK1_CymR* creado se comprobó mediante western blot. Para ello, se transfectaron células HEK293T empleando el protocolo del reactivo JetPRIME (Polyplus™, Estrasburgo, Francia), según las especificaciones del fabricante. Las células se sembraron en una placa de cultivos de 6 pocillos, y se transfectaron cuando alcanzaron una confluencia del 80%. Además del plásmido *pRosa26-SGK1-CymR*, se realizaron transfecciones paralelas de *pRosa26_SGK1_YFP* y el *pNI-SGK1_YFP*, plásmidos de los que disponíamos en el laboratorio debido a anteriores trabajos del grupo de investigación. Se cambió el medio de cultivo de las células tras 4 horas de haber realizado la transfección. La extracción de proteínas se llevó a cabo tras 48 horas de la transfección.

Tras el crecimiento de las células, se recogieron para realizar la extracción de proteínas. Se aspira el medio de las células (DMEM High Glucose) y se lava el cultivo con PBS estéril, se aspira y se vuelve a poner PBS y se recogen las células tras haberlas tratado mecánicamente o químicamente para resuspenderlas. Se centrifugan durante 5 minutos a 2.000 x g y se aspira

el sobrenadante, quedándose en el tubo el pellet de las células. El pellet se lleva al congelador hasta que se realice la extracción de proteínas.

Para ello, a los pellets celulares se les añadió 50 µl del tampón de lisis TENT (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 250 mM, Tritón-X 0,5%) con un inhibidor de proteasas. Se incubaron 5 min y se centrifugaron 10 minutos a 14.000 g. Se pasaron al hielo los sobrenadantes para evitar la degradación de las proteínas. Se realizó una recta patrón con la *working solution* (WS) compuesta por ácido bicinónico (98%) y sulfato cúprico 4% (2%), con concentraciones decrecientes de albúmina de suero bovino (BSA), como se indica en la tabla 4. Con esta recta se determinó la concentración de proteínas de cada una de las extracciones, calculando la cantidad de agua y tampón de carga Laemmli había que añadir para igualarlas.

TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4	TUBO 5	TUBO 6	TUBO 7	TUBO 8
360 µl de WS + 40 µl BSA µg/µl	200 µl de WS + 200 µl de tubo 1	200 µl de WS + 200 µl de tubo 2	200 µl de WS + 200 µl de tubo 3	200 µl de WS + 200 µl de tubo 4	200 µl de WS + 200 µl de tubo 5	200 µl de WS + 200 µl de tubo 6	200 µl de WS

Tabla 4 Recta patrón

Para la realización del *western blot*, se cargaron 40 µl de extractos de proteína en un gel comercial de poliacrilamida *Stainfree* de Biorad (California, Estados Unidos), empleando como marcador de peso molecular 10 µl del Precision Plus Protein Dual Color Standards, de la misma casa. Se realizó la electroforesis en el tampón SDS-PAGE (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%) a 120 V, tras la cual se activó el gel con luz ultravioleta en el Kodak Gel Logic 200 (Kodak, Nueva York, Estados Unidos), pudiendo visualizar la carga total de proteínas del gel. A continuación, se realiza la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de PVDF mediante el uso del Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad, California, Estados Unidos). La membrana se lavó con tampón TBS-T y se bloqueó con el reactivo *Everyblot* (Biorad, California, Estados Unidos). Tras el bloqueo, se incubó la membrana 1h con una dilución 1:1000 del anticuerpo primario (anti-SGK1, policlonal de conejo) en TBS-T. Finalizada la incubación, y tras 3 lavados de 5 min cada uno con TBS-T se incubó la membrana con una dilución 1:25000 en TBS-T del anticuerpo secundario anti-conejo durante una hora. Tras otros 3 lavados de 5 min en TBS-T se incubó la membrana con el sustrato *Clarity™ Western ECL* (Biorad, California, Estados Unidos) durante 4 minutos con un volumen suficiente para que cubra la membrana. La membrana se reveló con *ImageQuant™ LAS 500* (GE Healthcare, Estados Unidos).

4.1.3 CLONAJE DE ELEMENTO REGULADOR (CuO)

La secuencia reguladora del *CuO* se clonó en el plásmido *pRosa26_SGK1_CymR*, entre el promotor CMV y *Sgk1*. Para ello se linearizó el plásmido con la enzima *NheI*, de corte único en la secuencia. (Figura 10). La secuencia *Cuo* es de 28 pb; por lo que se diseñó un dúplex de DNA que contienen el *Cuo* y en los extremos dianas de restricción de *NheI* (Figura 11)

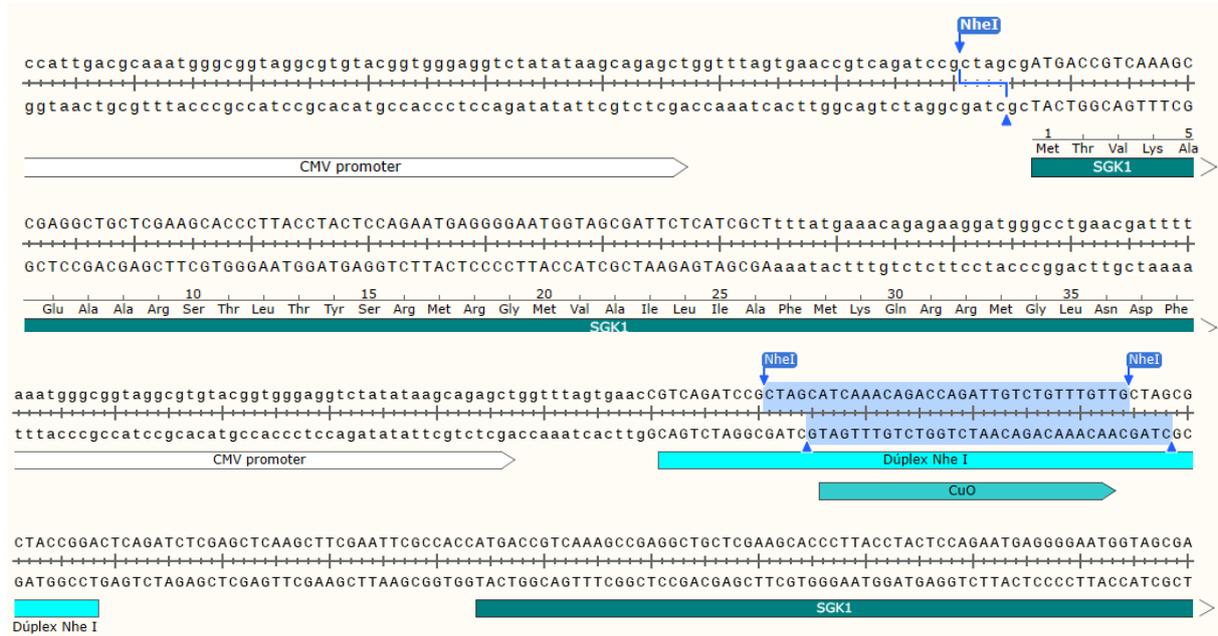


Figura 11. Sitio de linearización con *NheI* y el dúplex con la secuencia *CuO*

Para comenzar este clonaje, se digirió el *pRosa26_SGK1_CymR* con *NheI*; de la misma forma que se explicó en el apartado 5.2.2. Debido al pequeño fragmento a insertar, se decidió emplear dos métodos de clonaje simultáneos para aumentar las probabilidades de éxito: el clonaje mediante *In-Fusion*® y un clonaje tradicional mediante ligasa correctamente: el clonaje mediante *InFusion* y un clonaje tradicional mediante ligasas.

4.1.3.1 *pCuO* mediante *InFusion*®

Este es el mismo método que se empleó para el clonaje de *pRosa26_SGK1_CymR* por lo que hay que repetir los mismos pasos. Se necesitaron 198 ng de vector linearizado y 2 ng de dúplex de DNA con el inserto. Se realiza el protocolo de *In-Fusion*® de la misma manera que en el clonaje anterior, hasta la transformación en las TOP10.

4.1.3.2 *pCuO* mediante clonaje tradicional

Con este clonaje se siguió el protocolo de *Quick Ligation* de *New England Biolabs* (Massachusetts, Estados Unidos). Se dirigieron los extremos del inserto con *NheI*, para generar los extremos cohesivos para su inserción en el vector linearizado. Se digirieron 10 µg de vector en un volumen final de 20 µl con 10 U de enzima. El protocolo recomienda una relación de

vector e inserto digerido de 50 ng: 37,5 ng. La reacción de la ligación tiene lugar incubando la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se procede a transformar y sembrar bacterias en placas con antibiótico como previamente explicado.

4.1.3.3 Comprobación del plásmido

Se sembraron colonias que hayan crecido de ambas transformaciones y se dejaron crecer en medio LB más ampicilina. Al día siguiente, se realizó la extracción de DNA plasmídico, de la misma forma explicada en el apartado 5.1.2.

Se realizó una primera PCR con los plásmidos aislados de las colonias. Los oligos de la PCR amplificarían un fragmento de unas 300 pb y uno de los oligos incluiría la región en donde se habría insertado el *CuO*. Las muestras que consiguieron replicar ese fragmento se sometieron a una segunda PCR con otros oligos. Si el *CuO* se ha insertado correctamente, el fragmento amplificado tendría 58 pb más que el producto de PCR del *pRosa26_SGK1_CymR*; por lo que se vería una banda ligeramente por encima de la banda del producto de PCR de *pRosa26_SGK1_CymR*, confirmándonos que se ha conseguido clonar el plásmido *pRosa26_CuO_SGK1_CymR* (*pRosa26_CuO* para abreviar).

4.3 ENSAYOS EN CULTIVOS CON CUMATO

Con el *pRosa26_CuO* ya construido, se procede a realizar una serie de ensayos con concentraciones de cumato variables con células N2a.

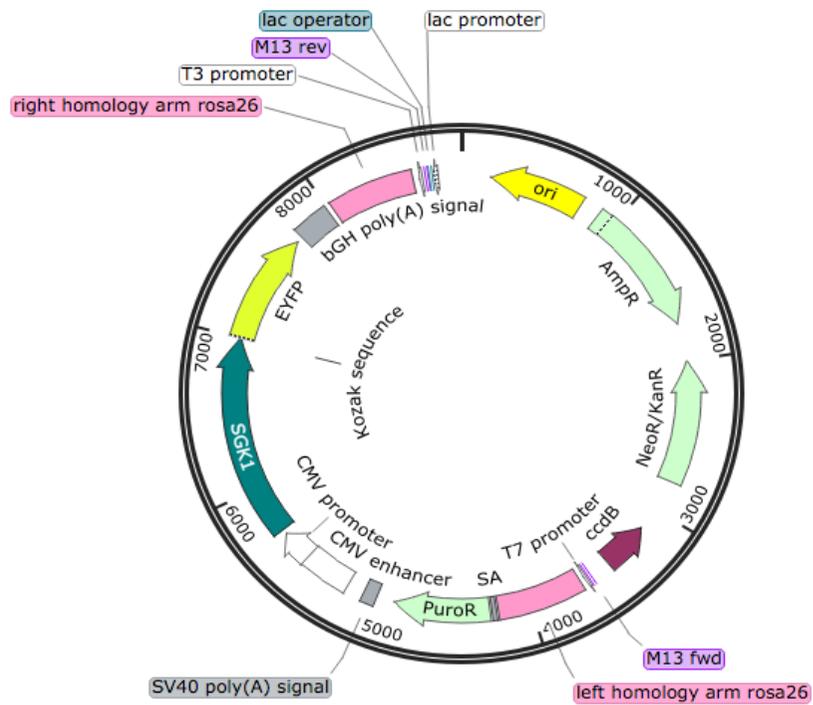
4.3.1 ENSAYO CON TRANSFECCIÓN TRASCIENTE

Se realizó un ensayo con tres placas de 6 pocillos en los que se transfectaron células N2a con distintos plásmidos empleando el protocolo de JetPRIME mencionado anteriormente. En cada placa hubo un pocillo sin transfectar (WT) como control negativo, un pocillo transfectado con *pRosa26_SGK1_YFP*, otro pocillo con *pRosa26_SGK1_CymR* y cuatro pocillos transfectados con *pRosa26_CuO*. Tras un día de transfección, se les añadió concentraciones crecientes de cumato (25, 50 y 125 µg/ml) a tres de los pocillos transfectados con *pRosa26_CuO*, dejando uno sin cumato como control. En cada placa, se recogieron las células a las 6, 12 y 24 h de la adición del cumato y se realizó *western blot*, como se indicó en el apartado 4.2.2.

4.3.2 ENSAYO CON CRISPR/CAS

Para realizar la transfección con CRISPR emplearemos el *pRosa26_CuO* como molde de reparación y el *pX330* (#42230, Addgene) que contiene la información para sintetizar tanto la proteína Cas9 como el sgRNA para que realice el corte en el *locus rosa26*. En una placa de 6

pocillos realizamos la transfección con ambos plásmidos CRISPR. Para ello realizamos un protocolo de transfección con Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher Scientific, Dueren, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras 48 h, se añadió puromicina (3 $\mu\text{g/ml}$) a los pocillos de células transfectadas y uno pocillos de células *wild type* sin transfectar, como control; ya que dentro de la región de homología del *rosa26* de nuestro plásmido hay un gen para la resistencia a la puromicina. Tras otras 48 h de incubación, se preparan las células para realizar el ensayo con cumato y visualizar la expresión de la proteína amarilla fluorescente unida a SGK1. Las células se visualizaron en un microscopio Nikon Eclipse Ti (Nikon, Tokio, Japón) acoplado a unidades láser de 488 y 647 nm de longitud de onda usando el filtro EGFP para la excitación a 488 nm y el filtro *Continuous Storm* para la de 647 nm. Las imágenes se obtuvieron gracias a la cámara *Orca Flash 4.0 CMOS* (Hamamatsu, Shizuoka, Japón) y fueron analizadas mediante el programa *ImageJ* (<https://imagej.nih.gov/ij/>)



Created with SnapGene®

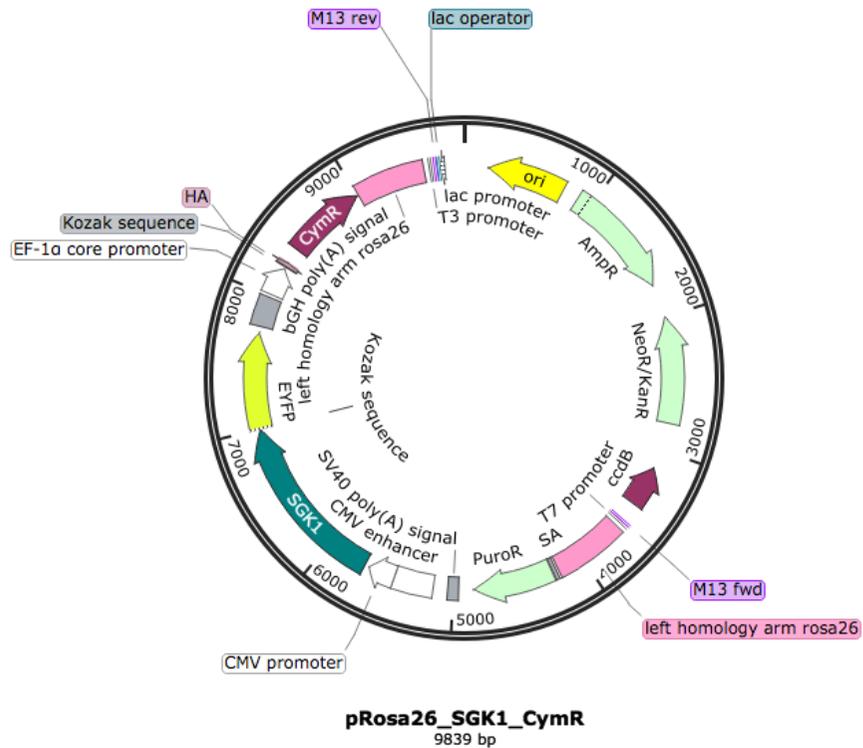
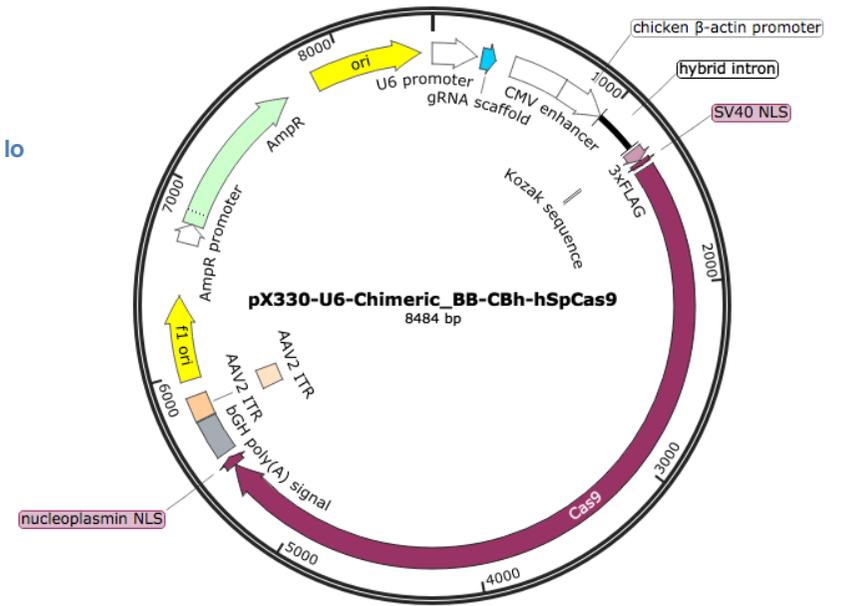
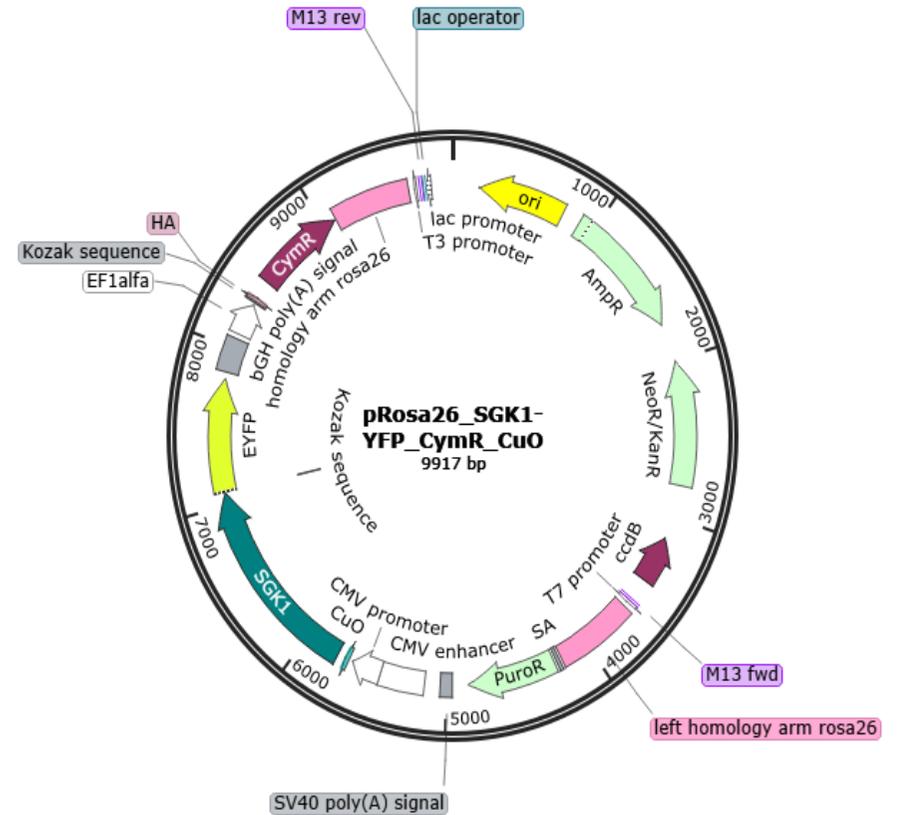


Figura 8 Plásmidos empleados a lo largo de la experimentación.



Created with SnapGene®



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 EXTRACCIONES DE DNA PLASMÍDICO

Las distintas extracciones de DNA plasmídico de cada una de las transformaciones que se realizaron durante la experimentación las tenemos recogida en la siguiente tabla:

pCuO	665.5 ng/ μ l
pRosa26_SGK1_CymR	282.2 ng/ μ l
pRosa26_CuO	334 ng/ μ l

Tabla 5 Concentraciones de extracciones de los plásmidos realizadas

5.2 DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO BASE LINEARIZADO Y PRODUCTO DE PCR

Las dos primeras muestras del gel (Figura 11) se corresponden con las muestras sometidas a una digestión con *HindIII*, observando la banda al tamaño esperado; mientras que las otras dos muestras que se pueden observar son los productos de PCR del fragmento EF1 α -CymR.

5.3. DIGESTIÓN CON HIND III DE PROSA26_SGK1_CYMR Y SECUENCIACIÓN

Los resultados del clonaje anterior mostraron, según el patrón de restricción con *HindIII* dos plásmidos diferentes.

Los plásmidos con la inserción correcta, mostraron un fragmento de aproximadamente 900 pb, que no se detectó en todas las muestras (Figura 13). Las muestras de los posibles positivos se enviaron a secuenciar con los oligos señalados en el apartado 5.2.2, confirmando que el clonaje se realizó correctamente (Figura 14)

The figure shows two screenshots of the BLAST search results interface. Both screenshots display a table of sequences producing significant alignments. The top screenshot shows a single result with a Max Score of 1725, Total Score of 1725, Query Cover of 14%, E value of 0.0, Per. Ident of 99.17%, Acc. Len of 956, and Accession of Query_551523. The bottom screenshot shows a single result with a Max Score of 1707, Total Score of 1707, Query Cover of 13%, E value of 0.0, Per. Ident of 98.96%, Acc. Len of 951, and Accession of Query_21101. Both screenshots include navigation tabs for Descriptions, Graphic Summary, Alignments, and Dot Plot, and a 'Sequences producing significant alignments' header with options for Download, Select columns, and Show (set to 100).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
None provided		1725	1725	14%	0.0	99.17%	956	Query_551523

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
None provided		1707	1707	13%	0.0	98.96%	951	Query_21101

Figura 14 Resultado del alineamiento de secuencias con el programa BLAST

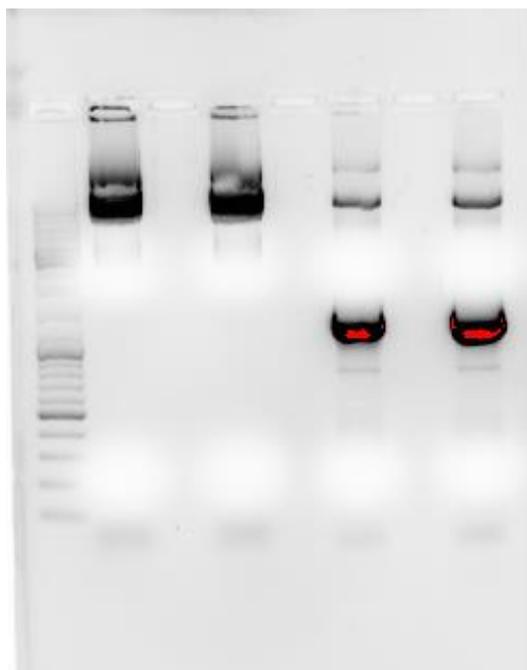


Figura 12 Gel de electroforesis con muestras de plásmido linearizado y producto de PCR de represores.

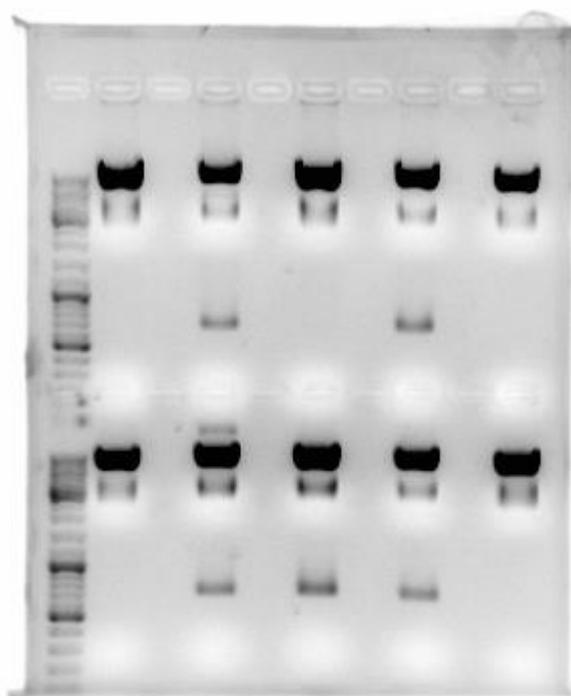


Figura 13 Muestras de pRosa26-SGK1-CymR digeridas con *HindIII*

5.4 RESULTADOS DEL WESTERN BLOT DE TRANSFECCIONES DE LA H2K293 CON DISTINTOS PLÁSMIDOS

Las células fueron transfectadas con tres plásmidos distintos pRosa26_SGK1_YFP, el pN1_SGK1_YFP y pRosa26_SGK1_CymR. En la figura 14, se observa la expresión de SGK1 endógeno de 49 KDa en todos los carriles, mientras que la expresión de SGK1-YFP (75 KDa) transfectada solo se detecta en las células HEK293T (Figura 15).

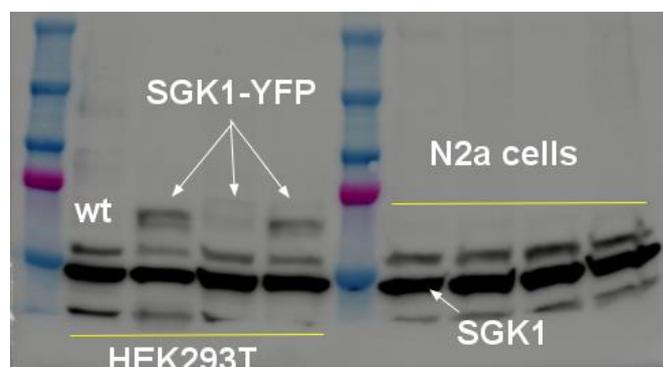


Figura 15 Membrana revelada de las muestras de proteínas

5.5 COMPROBACIÓN DEL PLÁSMIDO PROSA26_CUO

De las colonias que se picaron de la transformación se procedió a realizar una PCR con los una los oligos de la tabla 6, de tal forma que en el caso que la secuencia *CuO* se hubiera insertado tendríamos una secuencia de 300 pb aproximadamente.

F-CuO-tk	5'-CGTCAGATCCGCTAGCATC-3'
R-SGK-cDNA	5'-GGAGAGGGGTTAGCGTTCAT-3'

Tabla 6 Oligonucleótidos empleados en la primera comprobación del pRosa26_CuO

En el primer gel (Figura 15), observamos los resultados de los productos de PCR de las muestras de plásmido obtenidas de las colonias picadas. Todas las bandas que se ven cercanas a las 1000 pb se tratan de contaminaciones, pero la banda de 300 pb aproximadamente, en el 3° pocillo desde la derecha se asumió como inserción del *pCuO*. Debido a cuestiones logísticas y de tiempo, no se pudo enviar dicha muestra a secuenciar, por lo que diseñamos una segunda PCR con oligos distintos (Tabla 7) para poder discernir si esa muestra contiene la inserción o no. En el segundo gel (Figura 16), podemos observar como el primer pocillo genera una banda ligeramente superior a la del 2° pocillo; lo que indica que la inserción se ha realizado correctamente; y la secuencia del CuO se ha clonado en el plásmido.

F-CMV	5'-GGGCGGTAGGCGTGACGGT-3'
R-SGK-cDNA	5'-GGAGAGGGGTTAGCGTTCAT-3'

Tabla 7: Oligos empleados en la segunda comprobación de *pRosa26_CuO*

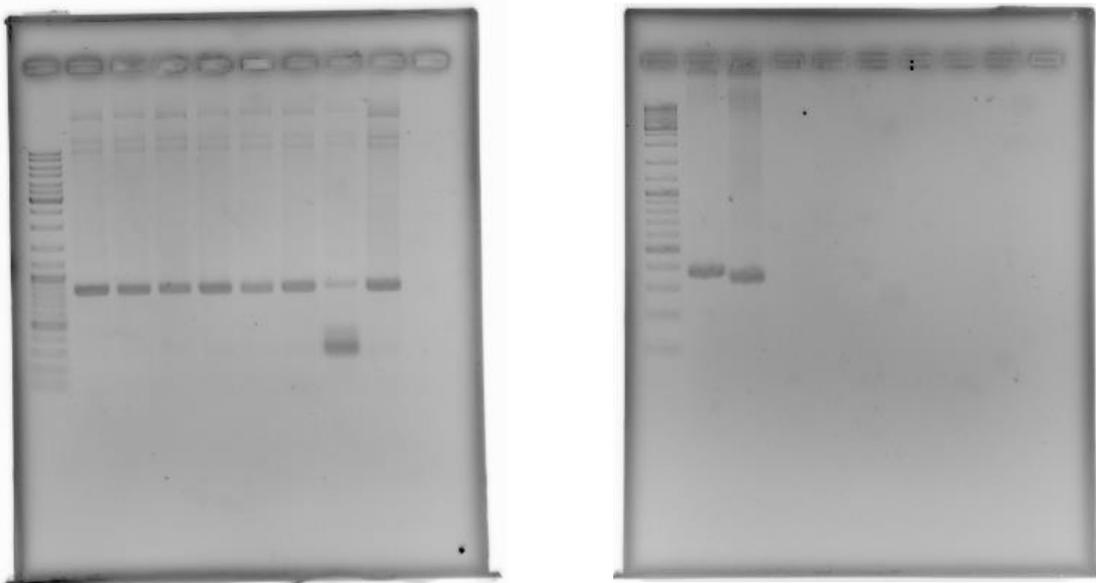


Figura 16 Comprobaciones del *pCuO*

6.6 WESTERN BLOT DE TRANSFECCIÓN TRANSIENTE DE N2A

Estas dos membranas son el resultado del Western del ensayo de transfección transiente en las células N2a. Como podemos observar, solo visualizamos la banda de 50 kDa en todas, que se correspondería con la banda producida por la SGK1 endógena. Ninguna de los pocillos con cumato pareció inducir la expresión de SGK1-YFP presente en los plásmidos. También es importante destacar que en ninguno de los pocillos

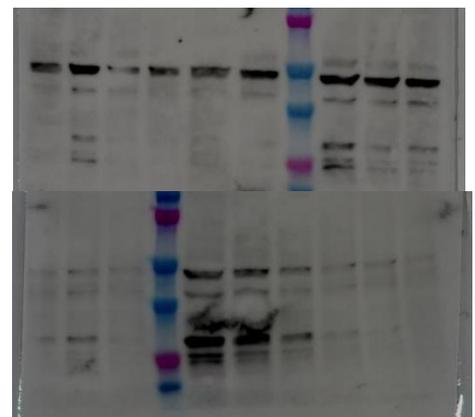


Figura 17 Ensayo de transfección transiente

con la transfección con *pRosa26_SGK1_YFP* hubo SGK1-YFP. El resto de bandas son inespecíficas.

6.6.1. MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

Una de las placas fue llevada a un microscopio óptico de fluorescencia para comprobar si había fluorescencia (Figura 18). No se detectaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de cumato o las transfecciones con *pRosa26_SGK1_YFP*; todas presentaron un grado muy bajo de fluorescencia mientras que las WT no.

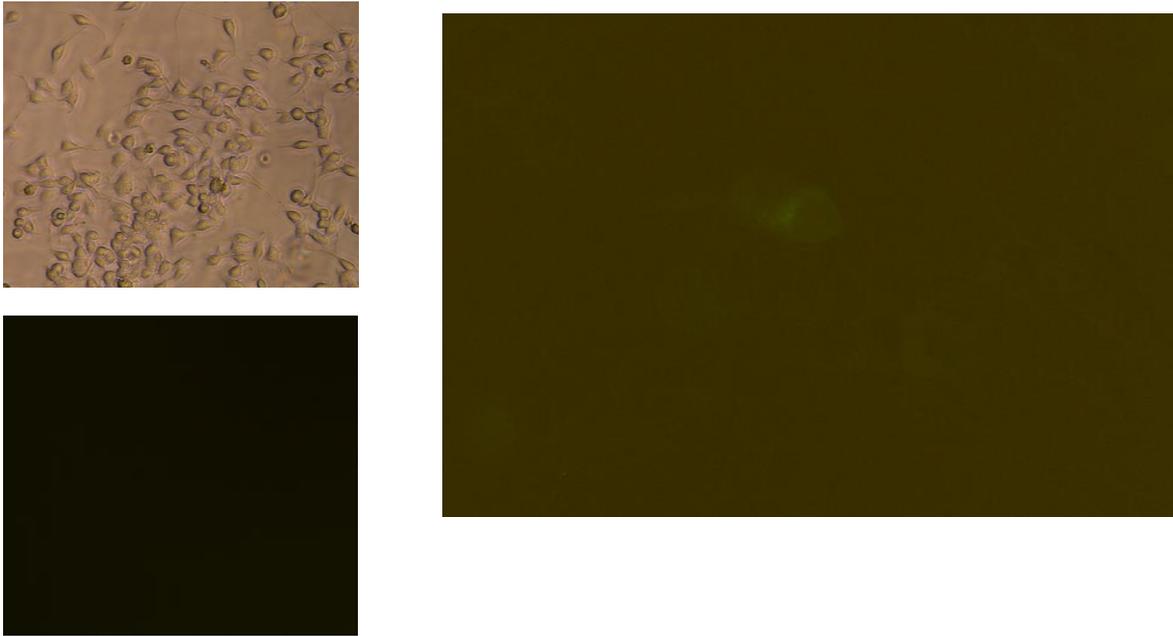


Figura 18 Imágenes de microscopía óptica de fluorescencia

En este caso, las dos imágenes de la izquierda representan imágenes de las células N2a WT. La imagen que aparece en negro indica que en estas células no expresan SGK1-YFP; ya que son las WT; debido a que no se registra fluorescencia. La imagen de la derecha se trata de una del pocillo con una concentración de 50 µg/ml de cumato; observándose que hay cierto grado de fluorescencia.

6.7 VISUALIZACIÓN DEL ENSAYO CON CRISPR CON MICROSCOPIO *Nikon Eclipse Ti*

Cada uno de los cubreobjetos que contenían células modificadas genéticamente con CRISPR fueron observados al microscopio *Nikon Eclipse Ti* a distintos tiempos de incubación con cumato. Cada cubre se encontraba en medio con cumato a una concentración de 50 µg/ml.

Podemos apreciar en las imágenes que prácticamente no se puede apreciar emisión de fluorescencia por parte de las células. A medida que aumenta el tiempo de incubación, parece

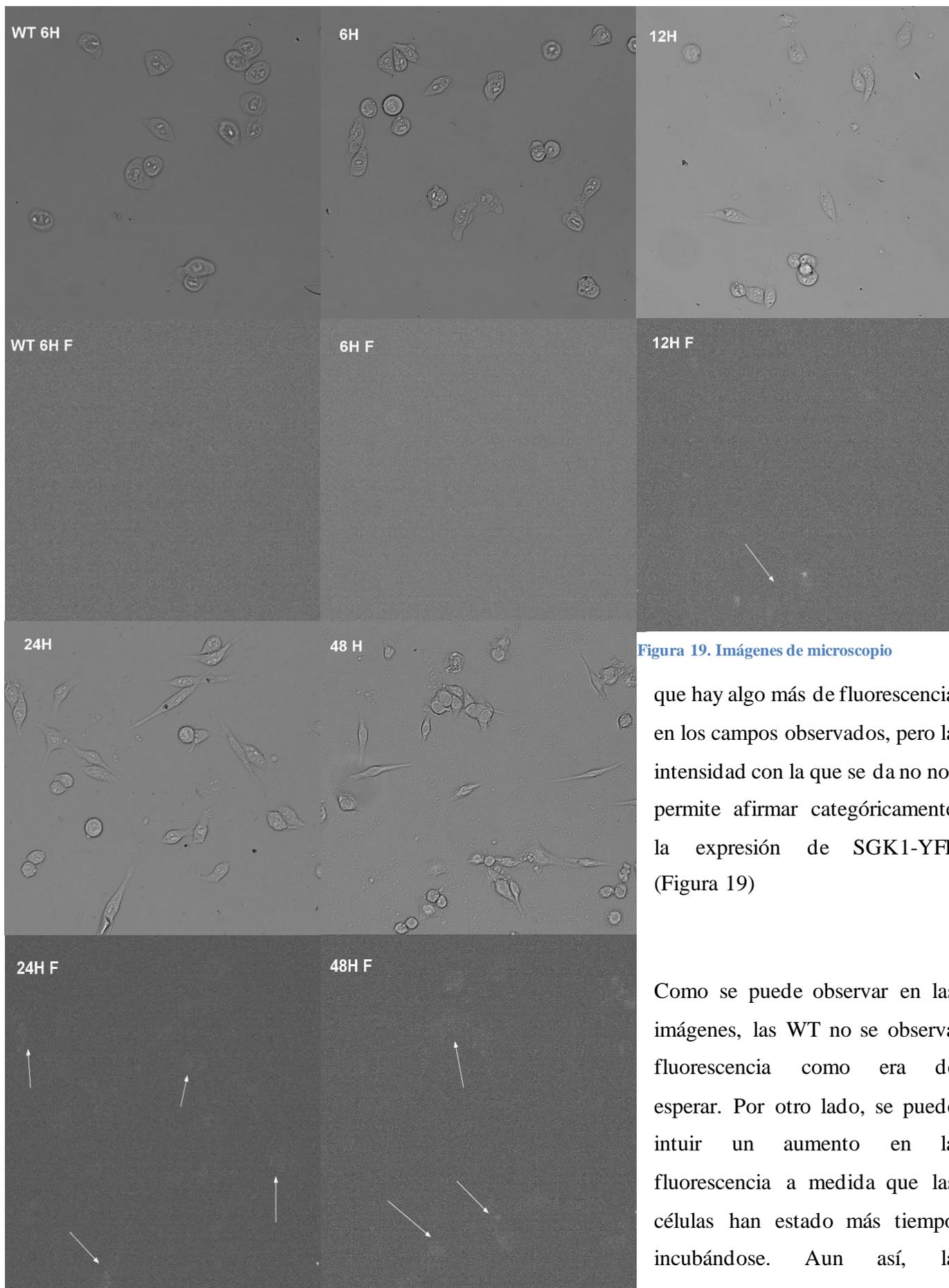


Figura 19. Imágenes de microscopio

que hay algo más de fluorescencia en los campos observados, pero la intensidad con la que se da no nos permite afirmar categóricamente la expresión de SGK1-YFP (Figura 19)

Como se puede observar en las imágenes, las WT no se observa fluorescencia como era de esperar. Por otro lado, se puede intuir un aumento en la fluorescencia a medida que las células han estado más tiempo incubándose. Aun así, la fluorescencia observada es

mínima, por lo que SGK1-YFP no se expresa todo lo que debería.

7. DISCUSIÓN

Las células N2a parecen mostrar una resistencia a la expresión de SGK1 mediante plásmidos o la degradan rápidamente después de expresarse. Este hecho, se había observado con trabajos anteriores en el laboratorio, confirmando que las células N2a reprimen la expresión de SGK1-YFP cuando son transfectadas transitoriamente.

Se propuso en este trabajo la adaptación del sistema de expresión inducible por cumato para regular de forma más fina la expresión de este gen en las N2a. La creación del sistema se ha realizado satisfactoriamente, adaptándose los elementos EF1 α -CymR y Cuo al plásmido creado para recombinación homóloga después del corte por Cas9. El diseño se ha realizado correctamente, consiguiendo introducir todo el fragmento de interés en el genoma de las N2a. A pesar de eso, se ha observado que las N2a siguen reprimiendo la expresión SGK1-YFP fuertemente, no siendo permitiendo la expresión de esta proteína más allá de bajos valores; ya que se ha observado un ligero aumento de fluorescencia en microscopía, pero que no se ha podido observar mediante western blot. Esto puede deberse a la gran variedad de rutas reguladas por SGK1, por lo que un aumento de esta quinasa en este tipo celular podría activar rutas que inhiban su propia expresión o promuevan su degradación de proteína, o ambas. Por otro lado, la conjugación con YFP puede tener alguna influencia en alguno de los mecanismos de regulación postranscripcionales de la proteína, por ejemplo, fomentando su degradación.

8. CONCLUSIONES

Con todo lo expuesto en este Trabajo Fin de Grado, podemos concluir que:

1. El sistema de expresión inducido por cumato puede ser adaptado al sistema de edición genética CRISPR y ser introducido en el genoma de las células N2a.
2. Las células N2a, a pesar de la inducción por cumato, no permiten la expresión por encima de niveles basales de la proteína SGK1.
3. Se deben realizar experimentos posteriores para optimizar la cantidad y el tiempo de exposición al cumato para alcanzar la mayor expresión posible de SGK1.

We conclude that:

1. Cumate induced expression system can be adapted with CRISPR technology and introduced in N2a cells genome.
2. N2a cells represses SGK1 expression above basal levels.

3. Further experiments must be done to optimize cumate concentration and incubation time.

9. BIBLIOGRAFÍA

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, <https://10.1126/science.1138140>

Brennan, R. G., & Matthews, B. W. (1989). The helix-turn-helix DNA binding motif. *The Journal of Biological Chemistry*, *264*(4), 1903-1906.

Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A., & Greenberg, M. E. (2001). Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO3a). *Molecular and Cellular Biology*, *21*(3), 952-965. <https://10.1128/MCB.21.3.952-965.2001>

Conza, D., Mirra, P., Cali, G., Tortora, T., Insabato, L., Fiory, F., Schenone, S., Amato, R., Beguinot, F., Perrotti, N., & Ulianich, L. (2017). The SGK1 inhibitor SI113 induces autophagy, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in endometrial cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, *232*(12), 3735-3743. <https://10.1002/jcp.25850>

Eaton, R. W. (1997). p-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA encoding conversion of p-cymene to p-cumate. *Journal of Bacteriology*, *179*(10), 3171-3180. <https://10.1128/jb.179.10.3171-3180.1997>

Fruman, D. A., Chiu, H., Hopkins, B. D., Bagrodia, S., Cantley, L. C., & Abraham, R. T. (2017). The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell*, *170*(4), 605-635. <https://10.1016/j.cell.2017.07.029>

Ghani, M. J. (2021). SGK1, autophagy and cancer: an overview. *Molecular Biology Reports*, *49*(1), 675-685. <https://10.1007/s11033-021-06836-6>

Guitart, J. R., Johnson, J. L., & Chien, W. W. (2016). Research Techniques Made Simple: The Application of CRISPR-Cas9 and Genome Editing in Investigative Dermatology. *The Journal of Investigative Dermatology*, *136*(9), e87-e93. <https://10.1016/j.jid.2016.06.007>

Jansen, R., Embden, J. D. A. van, Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, *43*(6), 1565-1575. <https://10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, *337*(6096), 816-821. <https://10.1126/science.1225829>

Kobayashi, T., Deak, M., Morrice, N., & Cohen, P. (1999). Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase. *Biochemical Journal*, *344*(Pt 1), 189-197. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220630/>

Lang, F., Böhmer, C., Palmada, M., Seebohm, G., Strutz-Seebohm, N., & Vallon, V. (2006). (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiological Reviews*, *86*(4), 1151-1178. <https://10.1152/physrev.00050.2005>

Lang, F., Stoumaras, C., Zacharopoulou, N., Voelkl, J., & Alesutan, I. (2019). *Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 and the response to cell stress*. Shared Science Publishers OG. <https://10.15698/cst2019.01.170>

Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., van der Oost, J., & Koonin, E. V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews. Microbiology*, *9*(6), 467-477. <https://10.1038/nrmicro2577>

- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Almendros, C. Y. 2. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155(3), 733-740. <https://10.1099/mic.0.023960-0>
- Mullick, A., Xu, Y., Warren, R., Koutroumanis, M., Guilbault, C., Broussau, S., Malenfant, F., Bourget, L., Lamoureux, L., Lo, R., Caron, A. W., Pilotte, A., & Massie, B. (2006). The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnology*, 6(1), 43. <https://10.1186/1472-6750-6-43>
- Sang, Y., Kong, P., Zhang, S., Zhang, L., Cao, Y., Duan, X., Sun, T., Tao, Z., & Liu, W. (2020). SGK1 in Human Cancer: Emerging Roles and Mechanisms. *Frontiers in Oncology*, 10, 608722. <https://10.3389/fonc.2020.608722>
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nature Genetics*, 21(1), 70-71. <https://10.1038/5007>
- Tang, C., Zelenak, C., Völkl, J., Eichenmüller, M., Regel, I., Fröhlich, H., Kempe, D., Jimenez, L., Le Bellego, L., Vergne, S., & Lang, F. (2011). Hydration-sensitive Gene Expression in Brain. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 27(6), 757-768. <https://10.1159/000330084>
- Tang, Z., Shen, Q., Xie, H., Zhou, Z., Shi, G., Zhang, C., Mohammed, A., Wu, Y., Ni, S., & Zhou, X. (2018). Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) is a predictor of poor prognosis in non-small cell lung cancer, and its dynamic pattern following treatment with SGK1 inhibitor and γ -ray irradiation was elucidated. *Oncology Reports*, 39(3), 1505-1515. <https://10.3892/or.2018.6181>
- Waerntges, S., Klingel, K., Weigert, C., Fillon, S., Buck, M., Schleicher, E., Rodemann, H. P., Knabbe, C., Kandolf, R., & Lang, F. (2002). Excessive transcription of the human serum and glucocorticoid dependent kinase hSGK1 in lung fibrosis. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 12(2-3), 135-142. <https://10.1159/000063790>
- Waldegger, S., Erdel, M., Nagl, U. O., Barth, P., Raber, G., Steuer, S., Utermann, G., Paulmichl, M., & Lang, F. (1998). Genomic organization and chromosomal localization of the human SGK protein kinase gene. *Genomics*, 51(2), 299-302. <https://10.1006/geno.1998.5258>
- Webster, M. K., Goya, L., Ge, Y., Maiyar, A. C., & Firestone, G. L. (1993). Characterization of *sgk*, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Molecular and Cellular Biology*, 13(4), 2031-2040. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC359524/>
- Zhang, F., Wen, Y., & Guo, X. (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*, 23(R1), R40-R46. <https://10.1093/hmg/ddu125>
- Zhang, J., Lv, W., Liu, Y., Fu, W., Chen, B., Ma, Q., Gao, X., & Cui, X. (2021). Knockdown of Serum- and Glucocorticoid-Regulated Kinase 1 Enhances Cisplatin Sensitivity of Gastric Cancer Through Suppressing the Nuclear Factor Kappa-B Signaling Pathway. *Balkan Medical Journal*, 38(6), 331-340. <https://10.5152/balkanmedj.2021.21114>
- Zhou, R., & Snyder, P. M. (2005). Nedd4-2 Phosphorylation Induces Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase (SGK) Ubiquitination and Degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4518-4523. <https://10.1074/jbc.M411053200>