



Caracterización del perfil de fosforilación de SGK1 y SGK1.1

Trabajo de Fin de Grado
Facultad de Ciencias de la Salud, sección de Medicina

Ruth del Cristo Cova Martín

Tutor: Diego Álvarez de la Rosa Rodríguez
Cotutora: Belinda Rivero Pérez
Departamento de Ciencias Médicas Básicas
Área Departamental de Fisiología

Trabajo Fin de Grado
Conformidad para la presentación de la memoria y defensa

Drs. Diego Alvarez de la Rosa y Belinda Rivero Pérez, tutores del trabajo realizado por la alumna Ruth del Cristo Cova Martín con el título "Caracterización del perfil de fosforilación de las quinasas SGK1 y SGK1.1" damos nuestra aprobación para la presentación de la memoria y a su defensa como Trabajo Fin de Grado.

La Laguna, 27 de mayo de 2021

Firmado: Diego Alvarez de la Rosa

Firmado: Belinda Rivero Pérez

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Document Id: 3465237 Verification code: Aq3moq7u

Signed by: Diego Álvarez de la Rosa Rodríguez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Date: 27/05/2021 16:12:37

Belinda Rivero Pérez
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

27/05/2021 16:14:53

Índice de contenido

Índice de contenido	3
Índice de tablas y figuras	3
Resumen	4
Palabras clave	4
Introducción	5
Crispr-cas9	7
Objetivos	11
Material y métodos	12
Resultados	22
Discusión	33
Conclusión y perspectivas	35
Qué he aprendido con este tfg	36
Bibliografía	37

Índice de tablas y figuras

Tabla 1: Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de las secuencias insertadas	14
Tabla 2: Anticuerpos utilizados para la inmunodetección con análisis western blot	20
Figura 1: Estructura de Cas9 y su mecanismo de actuación	9
Figura 2: Regiones de la secuencia de las N2a transfectadas amplificadas por PCR	15
Figura 3: Construcción de los plásmidos donantes con las secuencias de SGK1 y SGK1.1	16
Figura 4: Protocolo de transfección con Jet-Prime	17
Figura 5: Estructura y el contenido del plásmido pX330	23
Figura 6: Estructura y el contenido del plásmido Rosa26-puro	24
Figura 7: Imágenes representativas de los clones observados en el microscopio confocal	26
Figura 8: Resultados del análisis PCR y por citometría de flujo	29
Figura 9: Resultados del análisis western blot	32

Resumen

La epilepsia es un trastorno neurológico caracterizado por convulsiones o crisis recurrentes no provocadas, desencadenadas por una descarga paroxística anormal y sincrona de una determinada población neuronal. Cerca del 30% de los pacientes son resistentes a los tratamientos existentes, un hecho que impulsa el estudio en profundidad de los mecanismos de regulación de la excitabilidad neuronal en busca de nuevas y posibles dianas terapéuticas. Se ha descrito que la isoforma neuronal de la proteína quinasa SGK1 (*serum and glucocorticoid-regulated kinase 1*), SGK1.1, regula los canales de potasio Kv7, involucrados en el control de la excitabilidad neuronal. Este proyecto persigue desarrollar dos líneas celulares modificadas genéticamente que expresen selectivamente los genes SGK1 y SGK1.1 mediante la tecnología CRISPR-Cas9. Los clones celulares obtenidos de ambas subpoblaciones serán analizados para constatar la correcta inserción y expresión de las secuencias transgénicas mediante PCR, microscopía confocal y western blot. Se utilizarán anticuerpos fosfoespecíficos para dianas conocidas de fosforilación de SGK1 y SGK1.1 (GSK3 β) para asegurar la funcionalidad de las proteínas expresadas. Estas células serán utilizadas para descubrir las vías de señalización utilizadas por SGK1.1 para aumentar la expresión Kv7 y comprender los mecanismos de su papel neuroprotector.

Abstract

Epilepsy is a neurological disorder characterized by recurrent and unprovoked seizures and crisis, triggered by an abnormal and synchronous discharge of a certain neuronal population. Around 30% of epileptic patients are resistant to existing treatments, a fact that encourages the study of the mechanisms of regulation of neuronal excitability in search of new and potential therapeutic targets. The neuronal isoform of the serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK1.1) has been described to regulate Kv7 potassium channels, involved in the control of neuronal excitability. This project aims at developing two cell lines genetically modified to express SGK1 and SGK1.1 genes through CRISPR-Cas9 technology. The cell clones obtained from both subpopulations will be analyzed to verify the correct insertion and expression of the transgenic sequences by means of PCR analysis, confocal microscopy and western blot. Phospho-specific antibodies against known targets of phosphorylation of SGK1 and SGK1.1 (GSK3 β) will be used to ensure the functionality of the expressed proteins. These cells will be studied to discover the signaling pathways used by SGK1.1 to increase Kv7 expression and understand the mechanisms of its neuroprotective role.

Palabras clave

Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1, CRISPR–Cas9, Epilepsia, Canales de potasio Kv7.

Introducción

La Epilepsia

El término epilepsia describe un trastorno caracterizado por crisis recurrentes no provocadas, impredecibles, producidas por una descarga paroxística anormal, excesiva y sincrónica de una determinada población neuronal. Conforme a la distribución de las descargas, esta actividad anormal del sistema nervioso central se manifiesta de diferentes formas, desde convulsiones hasta fenómenos de experiencia subjetiva o ausencias (Fisher *et al.*, 2014). A partir de la definición de epilepsia como dos o más crisis no provocadas, la prevalencia de enfermedad activa en la actualidad oscila en un rango de 4 a 12 personas por cada 1.000 habitantes, independientemente de la localización geográfica. Con una incidencia aproximada de 50 (entre 40-70) por cada 100.000 habitantes al año en todo el mundo. (Thijs *et al.*, 2019).

La actividad de la crisis comienza en una zona restringida de la corteza cerebral que sufre una descarga paroxística e hipersíncrona de potenciales de acción de alta frecuencia, que posteriormente se propaga hacia las regiones colindantes. Por tanto, la epilepsia se establece en aquellos pacientes que han sufrido una crisis no provocada y cuyo cerebro demuestra una tendencia duradera y patológica a la recurrencia de las mismas (Fisher *et al.*, 2005). Esto es el resultado de un desequilibrio entre excitación e inhibición dentro del Sistema Nervioso Central (SNC). Aunque la patogénesis de esta alteración es diversa dada la cantidad de factores implicados en el control de la excitabilidad neuronal, la identificación de las mutaciones genéticas asociadas a diferentes síndromes epilépticos primarios ha aportado importantes avances en la investigación sobre la enfermedad (Thijs *et al.*, 2019). En efecto, gracias al desarrollo de las tecnologías para el estudio del genoma en los últimos años, se ha acelerado el conocimiento de la arquitectura de esta enfermedad y se ha observado que la disfunción de canales iónicos, incluyendo canales de calcio voltaje-dependientes, sodio y potasio constituye uno de los múltiples mecanismos fisiopatológicos que originan diversos síndromes epilépticos primarios (Myers & Mefford, 2015).

La mayoría de los fármacos contra la epilepsia centran su acción en los elementos más inmediatos de la excitación neuronal; es decir, directamente sobre los neurotransmisores o sobre los canales comentados que regulan el flujo de iones. Por tanto, actúan sobre el potencial de membrana, y no sobre los factores reguladores de su función.

En la mayor parte de los casos, los fármacos tienen efectos pleiotrópicos y, a pesar de los esfuerzos para encontrar una combinación eficaz, solo son efectivos en un 66% de los enfermos. (Duncan *et al.*, 2006). Este hecho impulsa el estudio en profundidad de los mecanismos de regulación de la excitabilidad neuronal en busca de nuevas y posibles dianas terapéuticas.

Corriente M, canales de potasio y SGK1

La corriente M es un tipo de corriente neuronal de potasio dependiente de voltaje, generada por miembros de la familia de canales Kv7, codificados por los genes KCNQ. Esta corriente recibe su nombre por la implicación de la vía muscarínica en su regulación, capaz de inhibir la función del canal por unión del segundo mensajero PIP2, producido por la activación de los receptores muscarínicos de acetilcolina. El canal se forma a partir de la tetramerización de las subunidades Kv7.2 y Kv7.3 y juega un papel esencial en el control del potencial de reposo de la célula, disminuyendo su excitabilidad y regulando la frecuencia de disparo del potencial de acción (D. A. Brown & Adams, 1980; David A. Brown & Passmore, 2009; H. S. Wang *et al.*, 1998)

Las mutaciones en los genes codificantes de ambas subunidades (KCNQ2/3) reducen en un 20-40% las corrientes de potasio. Ello culmina en alteraciones de la repolarización que son el origen del síndrome de convulsiones neonatales familiares benignas, un trastorno hereditario autosómico dominante poco frecuente, de inicio en los primeros días de vida. En esta enfermedad, las crisis pueden manifestarse de diversas formas, que incluyen convulsiones focales, tónico-clónicas, ataques de apnea y alteraciones del sistema autónomo. Aunque la mayor parte de las crisis remite en torno a los cuatro meses de edad, permanecen las convulsiones febriles de la infancia en aproximadamente el 5% de los pacientes y un 11% desarrollará epilepsia en el futuro (Baulac & Baulac, 2009; Hani *et al.*, 2015).

Recientemente, nuestro grupo ha descrito un nuevo regulador de la corriente M, la proteína quinasa SGK1.1. SGK1 (*serum and glucocorticoid-regulated kinase 1*) es una proteína expresada en todo el organismo que juega una función relevante en el riñón, aumentando la expresión de los canales epiteliales de sodio ENaC. (Álvarez De La Rosa *et al.*, 1999; Wesch *et al.*, 2010). SGK1.1 es una isoforma de la proteína SGK1 que se expresa de forma exclusiva en neuronas, tanto del sistema nervioso central como periférico (Arteaga *et al.*, 2008; Martín-Batista *et al.*, 2021; Miranda *et al.*, 2013). En nuestro grupo, se ha estudiado que su activación induce un incremento de la actividad los canales de potasio Kv7, aumentando su expresión en la membrana neuronal.

Esto produce un aumento significativo de la corriente M, que a su vez determina un potencial de reposo más negativo, un descenso de la excitabilidad neuronal, una disminución de la duración e intensidad de las crisis epilépticas y neuroprotección frente a las mismas (Armas-Capote et al., 2020; Martín-Batista et al., 2021; Miranda et al., 2013). Si bien nuestro trabajo ha demostrado que los efectos beneficiosos de SGK1.1 en modelos animales de epilepsia se deben a un aumento de expresión en la membrana y la actividad de los canales Kv7.2/3, el mecanismo por el que actúa esta quinasa es aún desconocido. Sabemos que la acción de SGK1.1 no se debe a la fosforilación directa de las subunidades del canal, lo que nos hace hipotetizar que deben existir otras proteínas intermedias que son fosforiladas por SGK1.1 y regulan al complejo Kv7.2/3. Dado que la activación generalizada de una quinasa podría tener consecuencias no deseables, el estudio de los mecanismos de regulación intermedios implicados en la vía SGK1.1-Kv7.2/3 podría proporcionar información sobre posibles nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de al menos algunas formas de epilepsia. Con objeto de identificar dianas de fosforilación de SGK1.1, en este trabajo planteamos el desarrollo de líneas celulares modificadas genéticamente que faciliten dicha búsqueda. Concretamente, planteamos utilizar una línea celular sin actividad SGK1 y, a partir de ella, generar otras con actividad específica de las isoformas SGK1 o SGK1.1. Así, la comparación de sus fosfoproteomas nos permitirá identificar nuevas dianas específicas de la quinasa neuronal. Para el desarrollo de estos modelos celulares elegimos utilizar la tecnología CRISPR-Cas9, descrita a continuación.

CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas es una novedosa herramienta de ingeniería genética con la que es posible realizar cortes de la doble cadena de DNA de manera selectiva y, sirviéndose de los mecanismos endógenos de reparación del genoma, permite la edición y modificación de la secuencia (Doudna & Charpentier, 2014). Esta tecnología deriva de los sistemas CRISPR-Cas, que en la naturaleza constituye un mecanismo expandido en *Bacteria* y *Archaea* implicado en la respuesta inmunitaria adaptativa ante la presencia de ácidos nucleicos invasores de origen desconocido, como los virus o los bacteriofagos (Mojica & Rodríguez-Valera, 2016). Los sistemas CRISPR-Cas pueden ser clasificados en 6 tipos que, a su vez, se agrupan en dos clases en función del número de proteínas que intervienen en el proceso. Cas9 pertenece a la clase 2, tipo II de los sistemas CRISPR y es la herramienta de edición genética más utilizada, por ser una de las más sencillas, con un solo efector. En concreto, la proteína Cas9 del *Streptococcus pyogenes* fue la primera en utilizarse fuera de células procariontas

El sistema que constituye CRISPR-Cas9 está constituido por un complejo formado por dos elementos fundamentales: Cas9, que actúa como la “tijera” que corta la cadena de DNA y una molécula de RNA, denominada RNA guía (gRNA) con una parte común (tracrRNA) y un segmento de aproximadamente 20 pares de bases complementarias al lugar específico de interés a cortar (crRNA).

La guía

En la naturaleza

Como se mencionaba con anterioridad, el sistema CRISPR-Cas9 forma parte de la respuesta inmune de las bacterias, que persigue la destrucción de la integridad de cualquier DNA exógeno que irrumpe la célula. En la naturaleza, las secuencias que codifican para estas guías de RNA se ubican dentro del DNA de las bacterias, en el locus CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Se presentan como una serie de segmentos repetidos de aproximadamente 20-50 pares de bases, denominados protoespaciadores, porque aparecen separados por otros fragmentos, los espaciadores, de longitud similar. Se ha observado que estos espaciadores proceden de genoma viral y plásmidos conjugados integrados en el locus y se establecen, así, como recuerdos de infecciones previas. Cuando se produce una nueva infección, los gRNAs correspondientes se transcribirán y reconocerán el DNA invasor, guiando a Cas9, por complementariedad de bases. Cas9, con actividad endonucleasa, cortará el genoma foráneo, frenando el avance de la infección. (Mojica & Rodríguez-Valera, 2016; Wright *et al.*, 2016). Además de la complementariedad de bases, para que se una el gRNA y Cas9 realice su función, debe existir adyacente en el DNA vírico una pequeña secuencia, de entre 2 y 6 nucleótidos, denominada PAM (*Protospacer Adjacent Motif*). El triplete que permite en concreto el reconocimiento de Cas9 es 5'-NGG-3', donde N es cualquier base (Le Cong, *et al.*, 2013).

En el laboratorio

Así se “diseña” de forma natural la guía en las bacterias. Sin embargo, *in vitro* es posible editar la secuencia guía para formar el complejo con Cas9 y que pueda ser dirigida a cualquier lugar del genoma de interés. Es decir, es posible sintetizar una secuencia de RNA diseñada para servir como una única guía (*single guide* RNA, sgRNA) al gen que se busca cortar. Esta secuencia de sgRNA presenta un extremo 5' homólogo al lugar de DNA al que se dirige, y una estructura de RNA en el extremo 3' que se une a Cas9 (Doudna & Charpentier, 2014).

Cas9

El segundo pilar del sistema recae en Cas9 (*CRISPR associated protein*), una endonucleasa encargada de producir la rotura de la cadena de DNA (*Double strand break* o DSB). Está constituida por una estructura bilobular, formada por un lóbulo de reconocimiento del RNA guía (REC) y un lóbulo nucleasa (NUC). A su vez, el lóbulo NUC presenta tres dominios: dominio RuvC, otro HNH y, por último, un dominio de interacción con la secuencia PAM en la hebra no complementaria del DNA diana. Los dominios, HNH y RuvC, cortan respectivamente la hebra del DNA diana complementaria al RNA guía y la no complementaria al RNA guía. (Anders et al., 2014). Tras encontrar y unirse a la secuencia PAM, Cas9 inicia una desestabilización de la secuencia adyacente y provoca la separación de las dos hebras, con el objetivo de permitir la unión con la secuencia guía (sgRNA) (figura 1). Siguiendo las leyes características y limitadas de interacción entre las bases nitrogenadas del DNA, la guía solo podrá unirse de forma estable con la secuencia diana, por complementariedad de bases. Con ello, la maquinaria rastrea el genoma hasta encontrar el lugar en el que encaja perfectamente. En último lugar, reorganizaciones tridimensionales inducen la actividad catalítica nucleasa de HNH y RuvC, que permite llevar a cabo el corte de doble cadena (Jiang & Doudna, 2017).

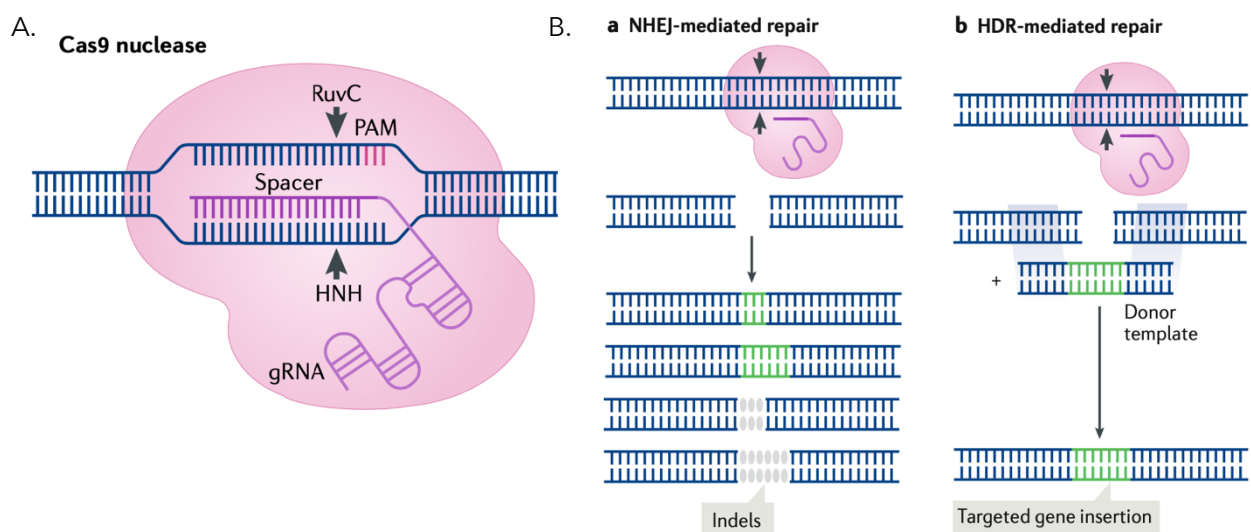


Figura 1. Gráfico ilustrativo de la estructura de Cas9 y su mecanismo de actuación. (Pickar-Oliver & Gersbach, 2019).
A. En los sistemas CRISPR – Cas9, la especificidad de Cas9 depende del al emparejamiento complementario del gRNA con la secuencia DNA diana, colocada junto a la región 5' de la región PAM. Esto da como resultado la generación de una ruptura de doble cadena de DNA por los dos dominios de nucleasa, RuvC y HNH. **B. Estrategias de edición del genoma** una vez la nucleasa ha realizado el DSB. Se ilustra el mecanismo de reparación por recombinación no homóloga, tendente a cometer errores; y recombinación homóloga, con la inserción de una secuencia con brazos homólogos a la región cortada.

Mecanismos de reparación del daño del DNA y sus usos en la edición genética

Los sistemas CRISPR-Cas9, funcionan generando roturas específicas del genoma que ponen en marcha los mecanismos de reparación endógenos. El uso de las características de estos diferentes sistemas ha permitido el desarrollo de estrategias específicas de edición del genoma (H. Wang *et al.*, 2016). La detección y correcta reparación del daño en el DNA es esencial para el mantenimiento de su integridad y la capacidad de supervivencia de la célula. En líneas generales, la reparación de los DSB puede ser llevada mediante dos mecanismos principales. El primero es la recombinación por unión de extremos no homólogos (*NonHomologous End Joining*, NHEJ). Con él, la rotura se repara por una fusión de los extremos independiente de la homología entre los mismos. Se trata de una unión que, aunque con alto poder mutagénico, destaca por la gran rapidez para la protección de la integridad de la secuencia. Este mecanismo implica una reparación muy propensa a errores, que conduce a la acumulación de pequeñas inserciones o deleciones que alteran la pauta de lectura y, con una alta probabilidad, introducen tempranos codones de parada (Ceccaldi *et al.*, 2016). En ingeniería genética, se utilizan los sistemas CRISPR-Cas para llevar a se lleva a cabo el DSB selectivamente en la secuencia de interés y se aprovechan los errores desencadenados para silenciar y bloquear el gen.

Por otro lado, los mecanismos de reparación homóloga (*Homologous Directed Repair*, HDR) utilizan secuencias externas o “donantes” de DNA con extremos homólogos a la región que ha sido dañada para fusionar así ambos extremos. Es decir, la reparación se lleva a cabo con la inserción de una secuencia con brazos homólogos a la región cortada. Estos bordes finales actúan como una plantilla, disminuyendo notablemente la posibilidad de inducción de errores, aunque aumentando el tiempo de reparación y recortando la eficiencia, ya que precisa encontrar una secuencia capaz de encajar (Ceccaldi *et al.*, 2016). En biotecnología, es posible el diseño y construcción de una secuencia en cuyo interior se añada alguna modificación de interés, cuyos extremos sean homólogos a la zona de corte que ha elegido y que conoce el investigador para favorecer este mecanismo de reparación (Sternberg & Doudna, 2015). En otras palabras, una vez la endonucleasa Cas9 ha llevado a cabo el DSB, se aporta la secuencia “donante” o molde diseñado; y, así, es posible introducir mutaciones específicas, proteínas fluorescentes, segmentos más largos de DNA o incluso genes completos aprovechando este sistema de reparación. (Hsu *et al.*, 2014). En este trabajo hemos utilizado el mecanismo de reparación homóloga para introducir de forma controlada en el genoma de una línea celular de neuroblastoma de ratón (células N2a) mutantes de SGK1 y SGK1.1 con actividad constitutiva y con fusión de una proteína fluorescente, que facilita su detección.

Objetivos

Uno de los objetivos finales del proyecto de investigación de nuestro grupo, en el que se enmarca este trabajo de fin de grado, busca caracterizar el perfil completo de dianas de fosforilación de la proteína SGK1.1 dentro de la neurona, para comprender mejor los mecanismos implicados en el aumento de la expresión en la membrana de los canales de potasio Kv7 y el papel neuroprotector de la quinasa, identificando posibles nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de ciertas formas de epilepsia. Como parte de dicho proceso, el objetivo general de este trabajo de fin de grado es el desarrollo de dos subpoblaciones de células N2a (derivadas de neuroblastoma de ratón) modificadas genéticamente mediante el método CRISPR-Cas9, que expresen de forma selectiva proteínas SGK1 y SGK1.1, respectivamente, incluyendo mutaciones que aumentan su actividad.

Concretamente, nos planteamos:

- Objetivo 1: creación de las construcciones de DNA que sirvan como molde para la inserción de SGK1 y SGK1.1 mediante recombinación homóloga inducida por CRISPR-Cas9.
- Objetivo 2: inserción de las secuencias y desarrollo de ambas líneas celulares N2a con SGK1 y SGK1.1 respectivamente.
- Objetivo 3: constatación de la correcta inserción y expresión de las secuencias de interés (SGK1 y SGK1.1) mediante microscopía confocal, citometría de flujo, análisis PCR y western blot.
- Objetivo 4: evaluación de la funcionalidad de las secuencias introducidas en el genoma mediante análisis western blot con anticuerpos fosfoespecíficos de GSK3 β , diana conocida de fosforilación de SGK1 y SGK1.1.

Material y métodos

Para alcanzar una expresión lo más selectiva posible de las proteínas SGK1 y SGK1.1, es preciso silenciar previamente el gen SGK1 endógeno de las N2a, creando una población de células SGK1-KO. Las células SGK1-KO fueron desarrolladas con antelación a este trabajo por el equipo del laboratorio mediante la herramienta de edición genética CRISPR-Cas9 combinada con la estrategia NHEJ (ver *Introducción*). A partir de ellas, se desarrolla este proyecto, que comienza con la generación de dos subpoblaciones en las que, con la tecnología del sistema CRISPR-Cas9 y la estrategia de HDR, se insertará en su genoma la secuencias de SGK1 y SGK1.1 respectivamente. La región del DNA de las N2a elegida para la edición es el locus Rosa26, localizado en el cromosoma 6. Constituye un pseudogen que codifica para una secuencia de RNA no esencial que se expresa en todo el organismo del ratón. Al no constituir un gen con una función crítica y, gracias a su estabilidad, este locus proporciona un lugar seguro para la edición genética sin efectos adversos conocidos, cuya versatilidad ha sido ampliamente aprovechada para la investigación biomédica e ingeniería genética en los últimos años. A continuación, en el apartado Material y Métodos se describen de forma objetiva cada una de las técnicas de laboratorio y protocolos utilizados para llevar a cabo CRISPR y el cribado de la efectividad del proyecto. Se reserva el desarrollo ordenado y en detalle de todo el proceso para el apartado de Resultados, al tiempo que se analiza el cumplimiento de cada uno de los objetivos del trabajo.

Línea celular y condiciones de cultivo

La línea celular Neuro-2a (N2a), derivada de células de neuroblastoma de ratón, fue obtenida a partir de la colección de la *American Type Culture Collection* (ATCC, número CCL-131). Para garantizar unas condiciones de trabajo asépticas, las células fueron manipuladas en campanas de flujo laminar de clase II. Se cultivaron en medio de Dulbecco modificado por Eagle con rojo fenol (DMEM, Biowest, FRA), suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos (penicilina/estreptomicina, Thermo-Fisher Scientific; MycozapTM, Lonza). Para favorecer su crecimiento, las células se incubaron a 37°C, a una atmósfera con CO₂ al 5% y fueron pasadas al alcanzar una confluencia en torno al 60-70% con el siguiente procedimiento.

1. En primer lugar, el medio de cultivo fue aspirado y los detritos lavados utilizando tampón fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline, PBS*, Thermo-Fisher Scientific).
2. Para despegar las células se añadió una solución de tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (Tripsina-EDTA, Sigma Aldrich).
3. Tras incubar las células durante tres minutos a 37°C, se añadió medio DMEM para neutralizar y parar el proceso de tripsinización.
4. Las células fueron entonces recogidas y centrifugadas durante 4 minutos a 1000 xg
5. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendieron en el volumen adecuado de medio DMEM en función de la densidad de células a sembrar en una nueva placa.

Transformación y purificación del DNA plasmídico

La transformación es un proceso que consiste en la introducción de DNA externo en bacterias, normalmente con la intención de almacenar o replicar plásmidos. La mayoría contienen un gen de resistencia a antibióticos que permite la selección de las bacterias que han incorporado correctamente el plásmido de interés. Esto se consigue cultivando a las bacterias, una vez transformadas, en presencia del antibiótico en su placa de cultivo, de forma que solo sobreviven aquellas que presenten el plásmido con el gen que les otorga resistencia. Se siguió el protocolo estándar para la transformación con plásmidos de bacterias *Escherichia coli* (cepa Top10) competentes mediante choque térmico (figura 3), según se detalla a continuación:

1. Descongelación progresiva de las bacterias en hielo.
2. Una vez completada, se agregaron 2µL del DNA plasmídico a incorporar y se mantuvieron en hielo 30 minutos más.
3. A continuación se introdujeron 30 segundos en un baño previamente calentado a 42°C
4. Se pasaron seguidamente a hielo 2 minutos.
5. Se agregaron 300µl de medio SOC (*Super-optimal broth*, Invitrogen) a 37°C.
6. Incubación de 1 hora a 37°C con agitación.
7. Tras ello, se sembraron entre 100-150µl en placas de medio Luria-Bertani (LB), con 100µg/ml de ampicilina. Las bacterias transformadas fueron seleccionadas tras una noche de incubación a 37°C.

Las colonias seleccionadas se expandieron mediante cultivo en medio LB líquido suplementado con antibiótico. Se extrajo y se purificó el DNA mediante el método de la lisis alcalina con el kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel GmbH & Co) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del DNA plasmídico fue medida mediante espectrofotometría con el equipo NanoDrop™ 3000 (Thermo Fisher Scientific).

Digestión de plásmidos

Los plásmidos de los que se partió en este trabajo fueron:

- **pX330** (addgene #42230), que contiene Cas9, el tracrRNA (parte común de la gRNA); y donde se clonó en el laboratorio del Dr. Gordon L. Hager el crRNA (parte específica de la gRNA), para dirigir a Cas9 específicamente a Rosa26.
- **Rosa26-puro**, amablemente cedido también por el laboratorio del Dr. Gordon L. Hager (*National Cancer Institute, National Institutes of Health, EE.UU.*), que contiene los brazos de homología de Rosa26, adyacentes al sitio de corte.
- **pEYFP-N1-SGK1^{S422D}-YFP**, plásmido disponible en el laboratorio donde se encuentra la secuencia que codifica para la proteína SGK1 constitutivamente activa fusionada a la proteína amarilla fluorescente.
- **pEYFP-N1-SGK1.1^{S422D}-YFP**, plásmido disponible en el laboratorio donde se encuentra la secuencia que codifica para la proteína SGK1.1 constitutivamente activa fusionada a la proteína amarilla fluorescente.
- **Rosa26-GR**, construcción que contiene fragmentos del gen Rosa26 adyacentes al sitio de corte flanqueando el gen del receptor de glucocorticoide, GR, fusionado a la proteína verde fluorescente, disponible en el laboratorio.

La digestión de los plásmidos consiste en la fragmentación del DNA plasmídico haciendo uso de enzimas de restricción, endonucleasas capaces de reconocer y cortar secuencias específicas del mismo (Figura 3). Se obtiene como producto fragmentos lineales de DNA para su manipulación posterior. Para la digestión se preparó la siguiente mezcla: DNA del plásmido (pX330 o Rosa26-puro) (5 µg), Tampón CutSmart® 1X (5 µl), utilizando las enzimas de restricción XhoI (0,8µl) y NheI (0,8µl). Se añadió agua hasta alcanzar un volumen final de 50 µL. La mezcla se incubó toda la noche a 37°C. Los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% con GelRed. Las bandas correspondientes al tamaño esperado fueron cortadas y el fragmento del plásmido fue purificado con el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel GmbH & Co).

Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

PCR para multiplicación y preparación de las secuencias SGK1 y SGK1.1 para su inserción en el plásmido Rosa26-puro.

Los fragmentos correspondientes a SGK1-YFP y SGK1.1-YFP fueron amplificados mediante PCR bajo las siguientes condiciones:

Pfu ultra II master mix 1X, 0,4 μ M de los cebadores (Tabla 1), 100-200 ng del plásmido pEYFP-N1-SGK1^{S422D} o pEYFP-N1-SGK1.1^{S422D} (isoforma SGK1 y 1.1 constitutivamente activas y fusionadas a la proteína fluorescente amarilla YFP, disponibles en el laboratorio) y completar con agua hasta un volumen de 50 μ l.

Como SGK1 y SGK1.1 difieren en la parte inicial de la secuencia, para la PCR de los fragmentos se emplearon dos oligos *forward* específicos (F-infuSGK1: TGAACCGTCAGATCCGCTAGCGATGACCGTCAAAGCCGAGGC y F-infuSGK1.1: TGAACCGTCAGATCCGCTAGCGATGGTAAACAAAGACATG) y un oligo *reverse* común (R-infuSGK: ACGGGCCCTCTAGACTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCC).

PCR para evaluación de la inserción de la secuencia en el genoma de las N2a.

Para evaluar la correcta inserción de las secuencias de SGK1 y SGK1.1 en el interior del genoma de las células N2a tras la realización de CRISPR se estudiaron para cada una de las dos condiciones dos regiones diferentes de la secuencia completa: por un lado, la que codifica para la región inicial (diferente para SGK1 y SGK1.1) y, por otro la región final que codifica para el último exón y la proteína fluorescente YFP (Figura 2). Los cebadores utilizados en este caso fueron los incluidos en la siguiente tabla (Tabla 1).

Tabla 1: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los extremos de las secuencias insertadas en las N2a.

OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS		
SGK1	F-mSGK1_cDNA	5' TGAGGGGAATGGTAGCGATT 3'
	R_mSGK_cDNA	5' GGAGAGGGGTTAGCGTTCAT 3'
SGK1.1	F-mSGK1_cDNA	5' TCAGAGCCCCAACTTGAAGT 3'
	R_mSGK_cDNA	5' GGAGAGGGGTTAGCGTTCAT 3'
SGK1 y 1.1	F-mSGK1_exon12	5' TTACAAACTCGGCAAGGCAC 3'
	R_84aaGFP	5' AAGTCGTGCTGCTTCATGTG 3'

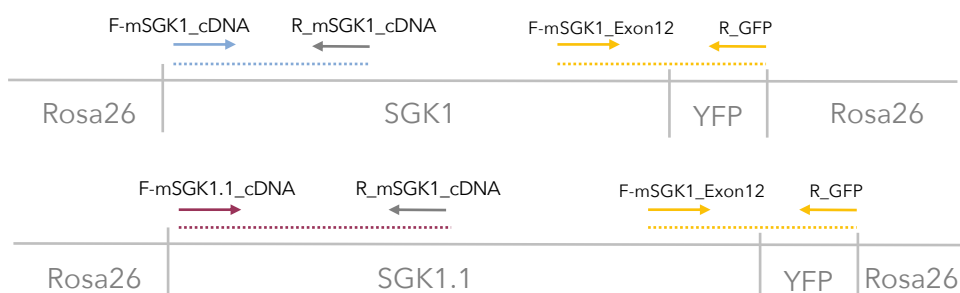


Figura 2. Ilustración gráfica de las regiones de la secuencia de las N2a transfectadas amplificadas por PCR para evaluar la correcta inserción de la secuencia.

Ambas PCRs se realizaron en un volumen final de 25 μ l. Se preparó una mezcla para cada clon de: *master mix* RedTaq polimerasa (12,5 μ l), DNA (1 μ L), oligonucleótidos Forward (F, 0,4 μ l) y Reverse (R, 0,4 μ l) suspendidos a 100 μ M. Se añadió agua hasta completar el volumen final.

La mezcla de PCR se introduce en el termociclador con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95° durante 5 minutos seguido de 35 ciclos sucesivos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C (temperatura de hibridación) y 30 s a 72°C. Una vez completados se mantienen 5 minutos más a 72°C como temperatura de elongación. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con el reactivo GelRed, para su visualización bajo luz ultravioleta con el sistema de imagen de Kodak Gel Logic 200. Estos productos fueron purificados con el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel, GmbH & Co).

Clonaje

Para la ligación del plásmido digerido (*ver Digestión de plásmidos*) con las secuencias de SGK1-YFP y SGK1.1-YFP en dos preparaciones simultáneas, se incubó cada una de las siguientes mezclas durante 15 minutos a 37°C y 15°C a 50°C en un volumen final de 10 µL. Se mezclaron: plásmido Rosa26-puro digerido (200µg) y productos de PCR de SGK1-YFP o SGK1.1-YFP (en paralelo, 119,9µg de cada uno), clonning enhancer 1µL, 5x In-fusion premix (2µL) y se añadió agua hasta alcanzar el volumen final (figura 3) Las cantidades del vector y de los insertos a clonar fueron determinadas con la herramienta de Takara disponible para ello (<https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools/in-fusion-molar-ratio-calculator>).

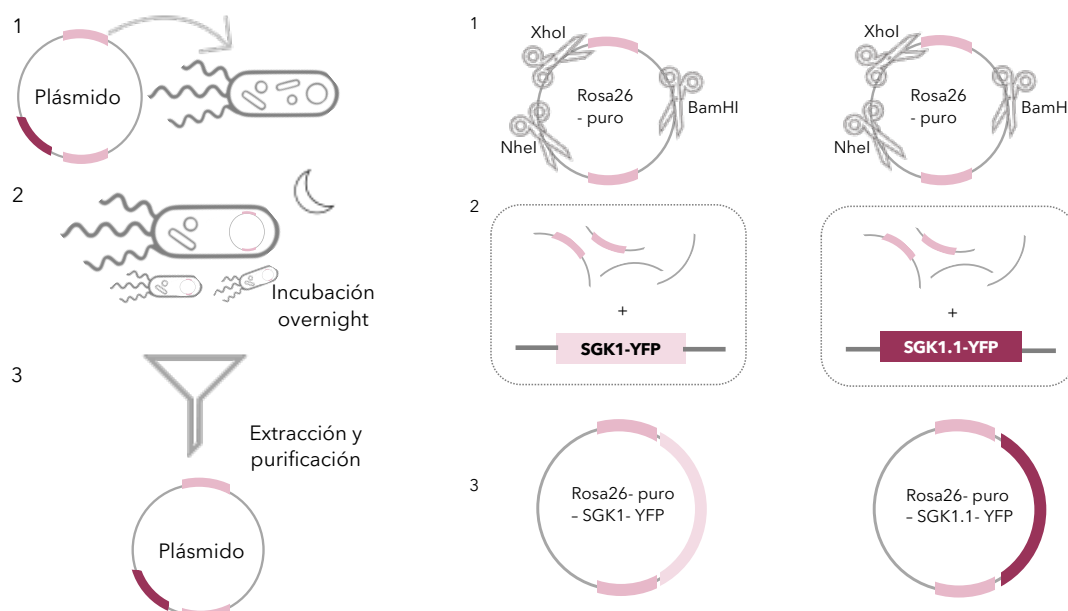


Figura 3. Construcción de los plásmidos donadores con las secuencias de SGK1 y SGK1.1. A. Ilustración del proceso de transformación y purificación bacteriana de los plásmidos utilizados. B. Representación del proceso de creación de las secuencias donantes para la inserción de las secuencias de SGK1 y SGK1.1 con los extremos homólogos a Rosa26. Se ilustran el proceso de digestión (1) del plásmido Rosa26-puro para obtener productos linealizados con los que preparar el clonaje (2) con las secuencias de SGK1 y SGK1.1.

Transfección

Para la transfección de las células N2a se seleccionó el reactivo Jet-prime® (Polyplus-transfection S.A) y se siguió el protocolo en paralelo descrito a continuación e ilustrado en la figura 4. Veinticuatro horas antes de la transfección, se contaron las células con el contador automático EVE™ (NanoEntek), sembrando 200.000 células N2a SGK-KO en placas de 6 pocillos con 3 ml de medio DMEM suplementado. Para la preparación por pocillo se diluyeron en 200 µl del tampón jetPRIME®, 2 µg de DNA en paralelo con la siguiente distribución:

- Transfección de SGK1: rosa26-puro-SGK1 (1 µg) + pX330 (1 µg)
- Transfección de SGK1.1: rosa26-puro-SGK1.1 (1 µg) y pX330 (1 µg)

Cada dilución fue agitada con vortex durante 5 segundos y se añadieron 4 µl del reactivo jetPRIME®, volviendo a mezclarlos con un nuevo golpe de vortex de 10 segundos. La mezcla fue incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de ser añadida gota a gota en su totalidad a cada pocillo. A las 36h se añadió puromicina a una concentración de 3 µg/ml para seleccionar las células que se transfectaron correctamente y que, por tanto, tienen resistencia al antibiótico. Este proceso se ilustra en la figura 4. Tras 48 h después de haber añadido la puromicina, se recogieron las células que se han mantenido con vida y se cuantificaron, sembrando en placas de 10 cm de diámetro 500 células en 10 ml de DMEM suplementado.

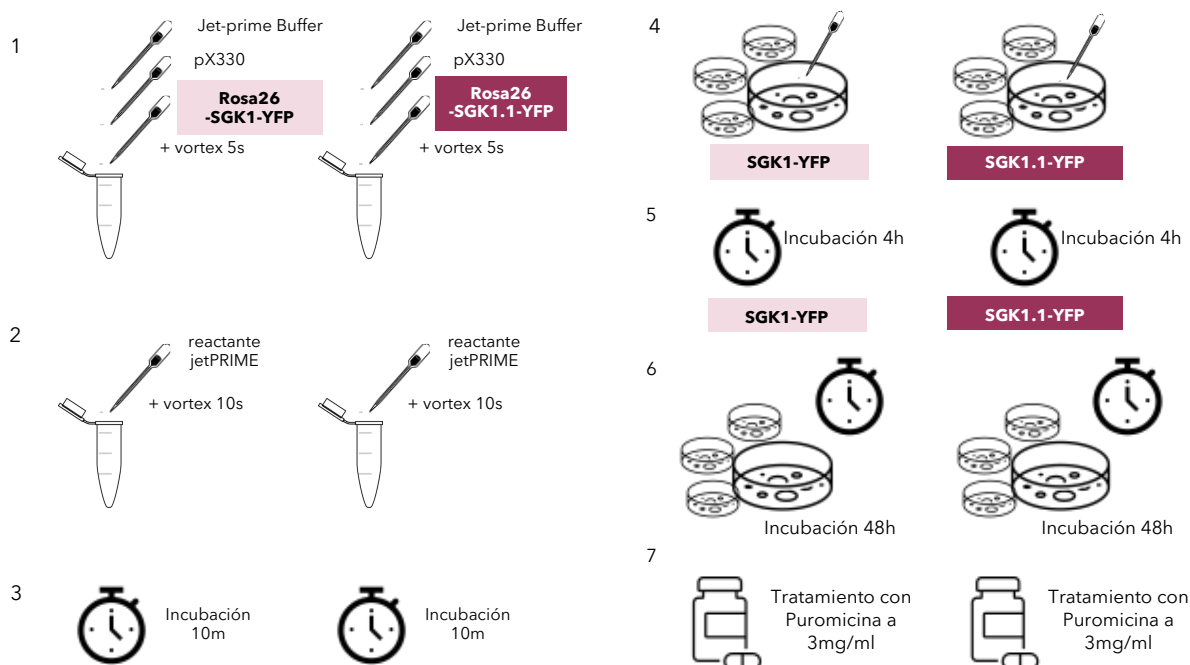


Figura 4. Ilustración del protocolo de transfección con Jet-Prime.

Extracción y purificación del DNA

Para el análisis de la secuencia de inserción es preciso en primer lugar extraer, purificar y cuantificar el DNA de las N2a, un proceso llevado a cabo en los siguientes pasos:

1. Añadir 60 μ l de NaOH 20 mM para lisar las células.
2. Calentar a 95°C durante 30 minutos.
3. Añadir 60 μ l de Tris-EDTA 40mM pH 8, para neutralizar el pH.
4. Centrifugar a 16000g durante 5 minutos.
5. Pasar el sobrenadante, donde se encuentra el DNA, a un tubo nuevo.
6. La concentración de los DNAs extraídos que servirá como molde para la amplificación por PCR fue medida con NanoDropTM 3000 (Thermo Fisher Scientific).

Microscopía confocal

Los microscopios láser confocal permiten visualizar la fluorescencia de las células empleando un láser como fuente de luz, que excita las moléculas fluorescentes de la muestra, consiguiendo que emitan una señal lumínica a una determinada longitud de onda. A diferencia de otros microscopios de fluorescencia convencionales, el microscopio confocal permite obtener imágenes de mayor calidad mediante técnicas de filtrado espacial que eliminan la luz que proviene de planos fuera de foco.

En este proyecto, la señal fluorescente emitida proviene de la YFP, cuya secuencia se insertó fusionada con las de SGK1 y 1.1. La observación de la fluorescencia de las células requiere un paso previo de siembra en un portaobjetos con cámara extraíble de 8 pocillos. En cada pocillo se siembra una muestra de aproximadamente 25000 células de cada uno de los clones desarrollados en 500 ml de medio. La muestra se mantiene durante la noche en el incubador a 37°C para permitir que las células se adhieran. A continuación, se procede a la fijación y montaje de las muestras. Para ello, se retira el medio de cultivo y se lavan las células con 500 μ l de PBS por pocillo. Seguidamente se aspira el PBS y se fijan con 500 μ l de formaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se lavan dos veces nuevamente con PBS y se añade el medio de montaje con Mowiol más DAPI, que es un colorante que tiñe los núcleos de azul. Se utilizó una longitud de onda de 532nm (laser de argón) para excitar las células YFP⁺ y la señal fluorescente emitida fue visualizada y analizada con un microscopio confocal Leica TCS SP8.

Se utilizaron como control negativo las células N2a SGK-KO. Este control permite comparar la intensidad de señal emitida por la YFP de las células transfectadas con la basal de las N2a SGK KO. Si la célula ha sido correctamente transfectada y se ha producido la inserción en el locus Rosa26 de la secuencia de la quinasa constitutivamente activa fusionada a YFP, las células deberán expresar dicha proteína fluorescente en su citoplasma, con lo que la fluorescencia del clon será superior a la basal. Esto nos permitió seleccionar y recoger mediante cilindros de clonaje aquellas adecuadamente transfectadas en la placa de 10 cm de diámetro en una primera aproximación. A medida que continuaba la proliferación de los clones escogidos y se trasladaban a placas de mayor superficie, fueron observados y revisados de forma regular

Citometría de Flujo

El análisis por citometría de flujo es una técnica de gran importancia y utilidad en la práctica clínica, especialmente en el campo de la hematooncología, pero también ampliamente empleada en investigación biomédica. Esta técnica analiza las características celulares ordenando una suspensión de estas en un flujo individual y emitiendo sobre ellas un haz de luz láser. Cuando el haz alcanza la célula, se dispersa y, en caso de que la célula contenga moléculas fluorescentes, se transforma en fotones con una longitud de onda más amplia que son recogidas por detectores que amplifican las señales y las transforman a formato digital. De cada célula analizada el sistema es capaz de identificar una serie parámetros intrínsecos, derivados del tamaño y la complejidad de la partícula, reflejados en el patrón de dispersión, así como de parámetros extrínsecos, derivados del marcaje de las algunos de sus elementos con sustancias que emiten fluorescencia, como la proteína YFP insertada con las secuencias de SGK1 y SGK1.1. El análisis por citometría de flujo se realizó en un citómetro Accuri C6 (BD Biosciences), utilizando como control las células N2a transfectadas con la proteína fluorescente amarilla YFP y se comparó la intensidad de la fluorescencia de los clones.

Western blot

El análisis western blot es una técnica de laboratorio que se fundamenta en el uso de anticuerpos para detectar un antígeno. La especificidad de esa interacción permite identificar una proteína diana selectivamente entre una gran y compleja mezcla, así como ofrecer datos tanto cualitativos como semi-cuantitativos sobre la misma.

La selección de estos anticuerpos primarios se basó, por un lado, en la revisión bibliográfica existente y; por otro, en experimentos de laboratorio en los que se ajustó el protocolo y la concentración requerida. Por un lado, para detectar la expresión de las quinasas en el citoplasma, se identificaron con anticuerpos dirigidos contra SGK1.1 generados previamente en nuestro laboratorio (Martin-Batista *et al.*, 2021) bien anticuerpos comerciales dirigidos contra la proteína YFP (Abcam). Por otra parte, para estudiar su funcionalidad de la secuencia introducida en el genoma se utilizaron anticuerpos fosfoespecíficos contra dianas conocidas de fosforilación como GSK3 β , según se ha descrito recientemente (Armas-Capote *et al.*, 2020). Para el control de la cantidad total de GSK3 β se utilizaron anticuerpos que reconocen a estas proteínas independientemente de su estado de fosforilación. Como control de la carga total de proteína se utilizó un anticuerpo dirigido contra la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

1. Tratamiento de los cultivos celulares previos a la extracción de proteínas.

Veinticuatro horas antes de la extracción de proteínas las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y tratadas durante 12 horas con medio DMEM sin suplementos. Esta técnica, utilizada en investigación biomédica es conocida como “*serum starvation*” y permite una notable reducción de la actividad basal de las rutas de señalización en las células, debido a la eliminación de factores de crecimiento en el medio. Con esto se consigue eliminar “el ruido de fondo” que puede afectar el análisis de las quinasas SGK1 y SGK1.1; optimizando la identificación de las mismas y de las proteínas que intervienen en sus vías de señalización.

2. Preparación de los extractos de proteínas

La preparación de las proteínas a estudio comienza con la extracción a partir de las células N2a.

1. Se aspiró el medio de cultivo y se añadieron 500 μ l de PBS 1x a cada pocillo.
2. Las células fueron levantadas de la placa con un raspador y se transfirió la suspensión a un tubo para la centrifugación durante 4 minutos a 1500g.
3. Tras descartar el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en 50 μ l de tampón de lisis TENT, el cual contiene: 20 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05 % Triton X-100-, suplementado con una mezcla comercial de inhibidores de la fosfatasa (Roche).
4. Tras una incubación en hielo durante 5 minutos, la suspensión de las células fue centrifugada durante 10 minutos a 14000g y se recuperaron los sobrenadantes en un nuevo tubo para la cuantificación de proteínas

3. Cuantificación del total de proteínas extraídas de las células N2a

Se determinó la concentración de las proteínas extraídas por el análisis del ácido bicinónico (BCA) (Smith *et al.*, 1985). Para este procedimiento se prepara una serie de diluciones a 1/10 con albúmina de suero bovino (BSA, concentrada a 10 µg/µl) con 200 µl de la “solución de trabajo” (98% de solución de BCA, 2% sulfato de cobre II) para elaborar la recta patrón. Por otra parte, se mezclaron 190 µl de la solución de trabajo con 10 µl de las proteínas de las muestras. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C fue medida la absorbancia de cada muestra a 562nm con el lector Benchmark™ Plus Microplate Reader (Bio-Rad) en una placa de 96 pocillos en la que 100 µl de cada muestra fueron colocados por duplicado. La concentración de cada fracción de proteína fue calculada extrapolando los datos medidos con la recta patrón estandarizada. Una vez cuantificada la cantidad de proteínas totales de cada extracción, se calculó la cantidad de agua y de tampón de carga Laemmli a añadir para obtener una concentración final de 1µg/µl en cada muestra.

4. Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas (Western blot)

Las proteínas fueron separadas por su peso molecular mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE Mini-PROTEAN Stain-Free Precast Gels, Bio-Rad) al 15% en cubetas verticales Mini Protean 3 (Bio-Rad) a un voltaje de 80mA durante 40 minutos. Para el seguimiento de la electroforesis se empleó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards Dual Color™ (Bio-Rad). El tampón de electroforesis empleado fue una solución de Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS (dodecilsulfato sódico) al 0,1 %. Una vez separadas las proteínas en el gel, fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa mediante el sistema Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-Rad) y bloqueadas durante 1 hora con una solución al 5% de PhosphoBLOCKER (Cell Biolabs) en *Tris-Buffered Saline Tween* (TBS-T). Tras el bloqueo, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en TBS-T con PhosphoBLOCKER al 0.5 % a la concentración especificada en la Tabla 2.

Tabla 2: Anticuerpos utilizados para la inmunodetección en los distintos experimentos Western Blot.

ANTICUERPOS PRIMARIOS				ANTICUERPOS SECUNDARIOS
DIANA	NATURALEZA	CONCENTRACIÓN	ORIGEN	
SGK1.1	Inmunosuero de conejo	1:5000	Martin-Batista <i>et al.</i> 2021	Goat Anti-Rabbit IgG 1:10000 Abcam
GSK3β-P		1:1000	Abcam	
GSK3β-T		1:1000	Abcam	
GADPH	Inmunosuero de ratón	1:500	Abcam	Goat Anti-Mouse IgG 1:10000 Abcam

A la mañana siguiente, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 5 minutos con TBS-T. Seguidamente, se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con los anticuerpos secundarios especificados en la tabla 2. Finalizada esta segunda incubación, se realizaron de nuevo 3 lavados de 5 min con la solución TBS-T. Para detectar las bandas específicas se empleó el sistema de quimioluminiscencia Immobilon™ Western HRP Substrate (Millipore), colocando las membranas entre dos hojas de transparencia y añadiendo el sustrato de la peroxidasa de rábano (enzima conjugada a los anticuerpos secundarios) sobre la cara que tiene unida las proteínas. La señal quimioluminiscente se detectó con el dispositivo ChemiDoc™ XRS Bio-Rad GelDoc, equipado con una cámara CCD y el programa QuantityOne (Bio-Rad). Una vez obtenidas las imágenes, se cuantificó la cantidad de proteínas con el software Image Lab de Bio-Rad en su versión 6.1. Con la herramienta disponible para el cálculo de volúmenes se delimitaron las bandas obtenidas y se obtuvo el volumen ajustado al total para cada una de ellas. Los datos fueron registrados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel para su manejo y la elaboración de las gráficas.

Resultados

CRISPR

El proceso comenzó con el diseño de todos los elementos que utilizaremos para llevar a cabo la técnica, las herramientas que necesitamos para editar el genoma de las células. Estos son, por un lado, el vector que incluye la secuencia codificante de la proteína Cas9 y la secuencia de DNA que genera el RNA guía (sgRNA) que llamaremos “vector guía”; y, por otro, las dos secuencias “donante” a insertar, que llamaremos “molde”, en el sitio de corte por separado que incluyen los genes de SGK1 y SGK1.1 respectivamente. Ambas secuencias están fusionados a una proteína amarilla fluorescente (YFP) y contienen una mutación puntual que hace que las quinasas sean activas de forma constitutiva.

1. Preparación del vector guía:

El plásmido pX330, incluye la secuencia que codifica para Cas9 y el RNA guía para cortar en el sitio Rosa26, entre el brazo izquierdo y derecho, como se muestra en la figura 5. El plásmido, de 8484bp, fue transformado siguiendo el proceso descrito en Material y métodos (ver Transformación y purificación del DNA plasmídico) y purificado, obteniendo una concentración de 201µg/µl, con un cociente A260/280 de 1.93, que indica la pureza alcanzada, siendo óptima entre 1,8-2.

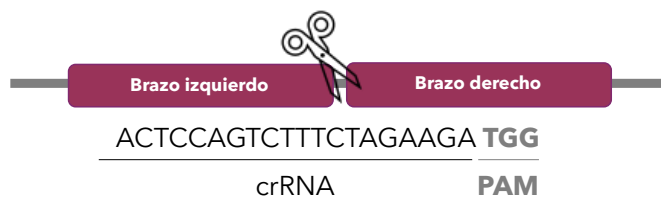
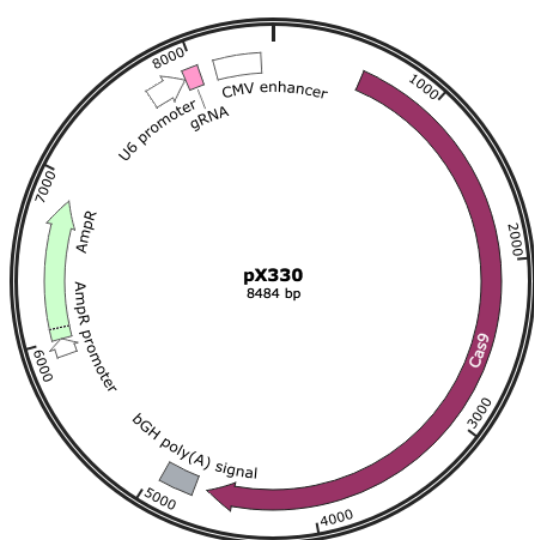


Figura 5. Mapa del plásmido pX330 que incluye las secuencias que codifican para la endonucleasa Cas9 y para el RNA guía que la dirige a Rosa26. Además, incluye un gen de resistencia a ampicilina (Amp-R) para seleccionar las bacterias que han sido transformadas con éxito. Se acompaña de **una ilustración representativa del corte de la endonucleasa Cas9** en el sitio de reconocimiento del RNA guía en el gen Rosa26.

Ya se han preparado las herramientas necesarias para llevar a cabo la edición genética:

- Por un lado, el vector formado por la endonucleasa Cas9 con el RNA guía (dirigido al gen Rosa26), que quedan incluidos en el plásmido pX330.
- Por otra parte, las secuencias donantes a insertar dentro de Rosa26 en dos poblaciones en paralelo: pRosa26-puro-SGK1^{S442D}-YFP y pRosa26-puro-SGK1.1^{S442D}-YFP.

3. Generación de las líneas N2a con inserción estable de SGK1 o SGK1.1

El siguiente paso consiste en introducir estos elementos de las células N2a, mediante un proceso que recibe el nombre de transfección, que, de forma similar a la transformación en bacterias, persigue la inserción de material genético exógeno en el interior de células eucariotas. Este procedimiento se llevará en dos poblaciones de células N2a SGK-KO paralelo. Mientras que el vector guía se introducirá en ambas para realizar el corte; las dos secuencias donantes que se han construido para permitir la reparación del genoma se aportarán de forma selectiva a cada una de las poblaciones. Para la transfección de las células N2a se siguió el protocolo en paralelo descrito e ilustrado en Material y métodos. Tras 48 h después de haber añadido la puromicina, se recogieron las células que se han mantenido con vida y se cuantificaron, sembrando en placas de 10 cm de diámetro 500 células en 10 ml de DMEM suplementado. La finalidad es que las células queden muy separadas, de forma que crezcan formando colonias, en las que todas las células proceden de una única célula, con la misma modificación genética.

Los resultados de los diferentes análisis llevados a cabo para comprobar la correcta inserción de las secuencias diseñadas se desarrollan a continuación y se ilustran en las figuras 7 y 8. El primer cribado de la efectividad de la inserción a estudio se realizó mediante microscopía de fluorescencia, observando la intensidad de la señal lumínica emitida por la proteína YFP, fusionada con las secuencias de SGK1 o SGK1.1. Como se detallaba con anterioridad, dado que cada colonia tiene su procedencia en una única célula, todas las células que se agrupan en ella contienen la misma modificación genética. Las colonias en las que se observó una intensidad de fluorescencia significativa han incorporado correctamente la secuencia codificante de YFP (y presumiblemente con ella SGK) en su genoma. Se analizaron las diferentes colonias resultantes de la transfección y las siguientes imágenes reflejan los hallazgos observados (Figura 7). En la segunda hilera de fotografías vemos muestras de células N2a modificadas con éxito, en las que en su citoplasma resalta la fluorescencia emitida por las YFP expresadas. La primera hilera es una imagen tomada exclusivamente para mostrar los núcleos teñidos por el medio de montaje con DAPI; mientras que la tercera fusiona ambas imágenes.

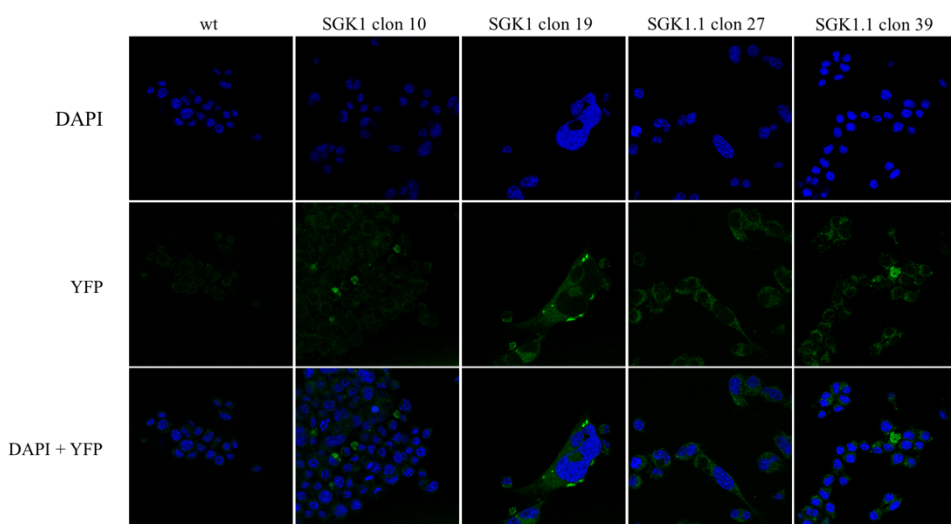


Figura 7: "Imágenes representativas de los clones 10 y 19 con la inserción SGK1-YFP y los clones 27 y 39 que portan SGK1.1-YFP. Las imágenes fueron tomadas bajo microscopía confocal a 63x con aceite de inmersión.

A medida que continuaba la proliferación de los clones escogidos y se trasladaban a placas de mayor superficie, fueron observados y revisados de forma regular para seleccionar los clones en los que la de señal fluorescente era más intensa y homogénea entre las células que constituyen cada clon. Los clones seleccionados se analizaron en paralelo mediante PCR.

El panel A de la figura 8 se reflejan los resultados obtenidos del análisis PCR de los clones elegidos de cada subpoblación. Los productos amplificados con la primera pareja de oligonucleótidos de las muestras seleccionadas pertenecientes a la línea de SGK1 muestran una banda de 746 pb, correspondiente con el gen SGK1 que se encuentra inicialmente en las células N2a, ya que partimos de una línea que no expresa la proteína SGK1, pero la mantiene en su genoma; y una banda de 174 pb, correspondiente con la secuencia de SGK1 que se ha insertado en Rosa26. En cambio, en la segunda PCR, además de bandas inespecíficas también detectadas en las células wild type (WT), algunos clones presentaron una banda que no se corresponde con el tamaño esperado. En cuanto a los resultados extraídos del estudio de SGK1.1, se corrobora en la imagen revelada correspondiente al primer segmento la integridad del extremo inicial de la secuencia insertada con una banda de gran intensidad a la altura de 396 pb que se corresponde con lo esperado. Esta banda, además, se observa en todos los clones analizados. En este caso, no se detecta la banda correspondiente a la amplificación de ese segmento original en la línea celular, debido a que los cebadores se encuentran a una distancia de 67159 pb. En cuanto al extremo final, a pesar de que se advierten algunas bandas que podrían ser el resultado de la amplificación de secuencias en las que los cebadores han hibridado durante el proceso de forma inespecífica, se aprecia con más intensidad una banda a la altura de 606pb, que se corresponde con el tamaño esperado para el último exón y la secuencia que codifica para YFP.

En base a todos los resultados anteriores, se seleccionaron los siguientes clones para su posterior análisis por citometría de flujo, con el fin de comprobar la pureza de los clones.

- Clones seleccionados de SGK1: 2, 7, 12, 21, 22, 23, 25, 26, 27 y 45.
- Clones seleccionados de SGK1.1: 11, 16, 23, 25, 26, 29, 30, 27, 38, 42, 43, 44, 45, 56 y 62

Para el análisis por citometría de flujo se utilizaron como control las células N2a transfectadas con la proteína fluorescente amarilla YFP y se comparó la intensidad de la fluorescencia de cada uno de los clones seleccionados. Los resultados obtenidos mediante este análisis se expresan en histogramas y con los que se cuantifica la señal obtenida y expresa en porcentajes respecto al control. Esta cuantificación permite seleccionar los clones con mayor intensidad de fluorescencia y con una mejor y más homogénea expresión de nuestra proteína de interés de forma más específica. Se han reflejado los histogramas de los clones 11 y 44 en el panel C de la figura 8, junto con una tabla que incluye los resultados medidos en porcentaje para cada uno de los clones analizados.

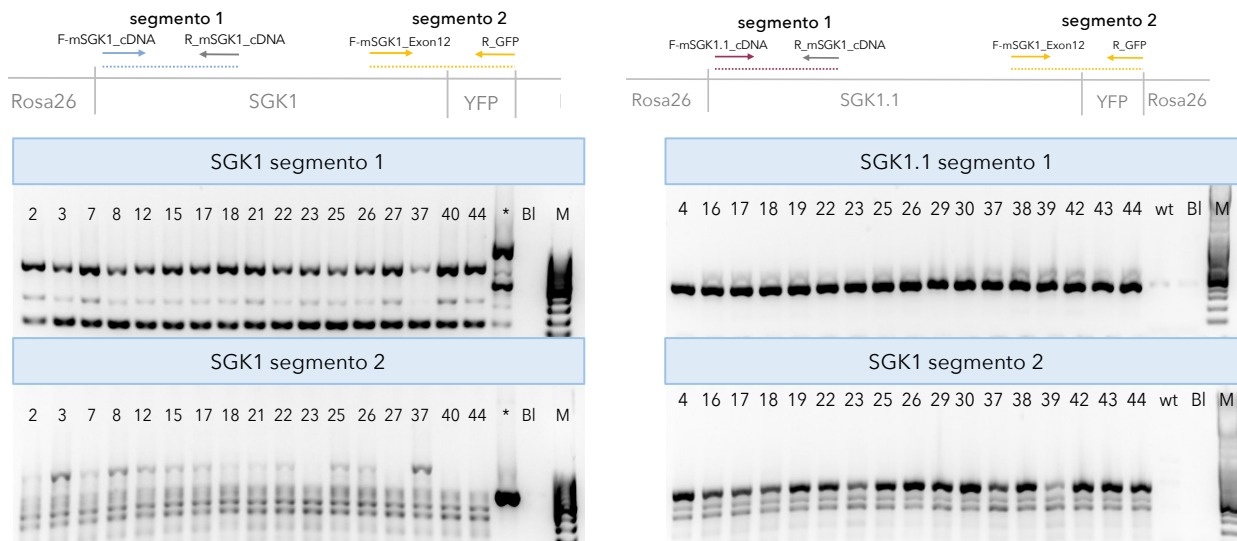
Al igual que con los productos obtenidos con el análisis PCR, los resultados de la citometría muestran una gran disparidad entre los clones de SGK1 y SGK1.1. No se registraron porcentajes de fluorescencia que superaran la unidad con respecto al control en las muestras analizadas para línea de SGK1. Por otro lado, los resultados obtenidos con los clones analizados pertenecientes a la población de SGK1.1 son mucho más alentadores. Son varios los clones que cumplen con los valores esperados, destacando aquellos resaltados en la tabla de la figura 8 que mostraron porcentajes de fluorescencia significativos. Entre ellos los clones 11 y 44, que alcanzaron niveles del 65% y 20,8% respectivamente.

Cada análisis que se realiza permite verificar gradualmente con mayor especificidad y certeza la correcta inserción de la secuencia. Esto permite delimitar aún más los clones en los que la modificación genética ha tenido éxito para continuar con el estudio. Sin embargo, dada la disparidad e inespecificidad de los resultados obtenidos con los clones de la subpoblación de SGK1, se decidió continuar con el estudio en busca de una respuesta que explicara estos hallazgos y se optó por secuenciar los fragmentos de PCR obtenidos de clones de ambas subpoblaciones. Los resultados obtenidos con la secuenciación de los clones enviados de la subpoblación de SGK1 evidencian duplicaciones en la región final de la secuencia.

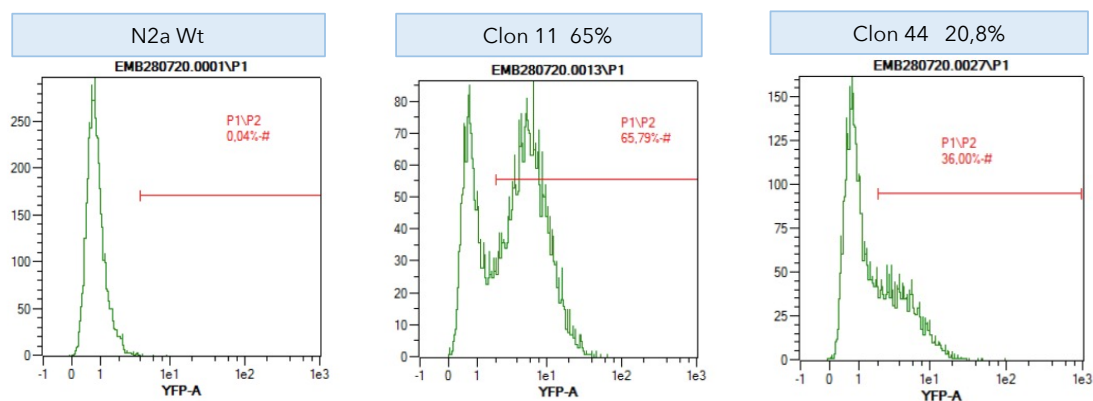
En efecto, todas las muestras mostraron la misma alteración en su extremo, hallazgos que podrían explicar la disminución de la intensidad de la señal al microscopio confocal, la aparición de bandas inespecíficas en el análisis PCR idénticas en todos los clones y los pobres resultados obtenidos en el citómetro de flujo. La uniformidad de la duplicación sugiere que una alteración que justifique la afectación así de todos los clones debe ser anterior a la transfección. Se decide, entonces, que es prioritario secuenciar el molde original con el que se insertó la secuencia, el plásmido rosa26-puro-SGK1. Se observó, efectivamente, una duplicación del extremo final y se decidió repetir el experimento, comenzando de nuevo con la síntesis del molde. A pesar de intentar diferentes abordajes para repetir el clonaje para realizar de nuevo la transfección y desarrollar una nueva subpoblación SGK1, fue imposible crear un molde con éxito en el que no se encontrara la duplicación en el extremo final.

Por otra parte, entre las muestras de los clones enviadas para secuenciar pertenecientes a la línea celular de SGK1.1, el clon 44 probó tener su secuencia perfectamente inserta e íntegra. El resto de los clones presentaban pequeñas mutaciones que no eran detectadas en el análisis PCR ya que los segmentos amplificados no cubren la secuencia completa. Por esta razón, se decidió continuar con el estudio de la funcionalidad de la proteína exclusivamente con los extractos de las células que pertenecen al clon 44.

A



B



RESULTADOS DEL CITÓMETRO									
SGK1				SGK1.1					
CLON	RESULTADO	CLON	RESULTADO	CLON	RESULTADO	CLON	RESULTADO	CLON	RESULTADO
2	0,5%	23	0,20%	11	65%	29	11%	43	18,6%
7	0,19%	25	0,07%	16	2,4%	30	2,5%	44	20,8%
12	0,29%	26	0,05%	23	11%	37	7,8%	45	10,55%
21	0,51%	27	0,08%	25	3,39%	38	5,65%	56	51%
22	0,24%	45	0,52%	26	15%	42	20%	62	30%

Figura 8. A Análisis PCR para la detección de la inserción de SGK1, SGK1.1 y de la proteína fluorescente YFP. En la parte superior se representan de forma esquemática los dos segmentos analizados. En la parte inferior, se muestran los geles de agarosa revelados con los productos de la amplificación de cada segmento (segmento 1, inicial y segmento 2, final) y para cada subpoblación, SGK1 (izquierda) y SGK1.1 (derecha). Cada clon se identifica con un número, que se ha especificado en una hilera superior a cada banda. **B. Análisis por citometría de flujo de la expresión de YFP.** Se utilizaron células N2a transfectadas con la proteína fluorescente YFP como control del experimento. Se analizó la intensidad de la fluorescencia emitida por las YFP de los clones. La primera imagen, en la que solo se distingue un único pico, se corresponde con el grupo control, las células N2a transfectadas con la proteína fluorescente. Esa señal permite comparar la intensidad de la fluorescencia emitida por los clones, que se corresponde con el segundo pico del histograma. En la figura se representan los resultados obtenidos de los clones 11 y 44 en concreto con sus respectivos resultados medidos en porcentajes. El clon 11 (2) mostró una fluorescencia del 65% y el clon 44 (3) una intensidad del 20,8%

En efecto, este proyecto no se centra exclusivamente en el desarrollo de una línea celular modificada genéticamente y estable. Se persigue, además, insertar una secuencia que codifique para una proteína funcional, una quinasa que se exprese, que fosforile sus dianas conocidas y que nos permita encontrar las que quedan por descubrir. La estrategia llevada a cabo para demostrar la funcionalidad de la proteína se ha realizado de manera escalonada en este proyecto de fin de grado mediante el análisis de western blot respondiendo a las siguientes preguntas:

Los hallazgos detallados hasta ahora han demostrado que la secuencia en el genoma está inserta e íntegra, pero ¿se está expresando realmente el gen SGK1.1 en el citoplasma de los clones transfectados?

Para responder a esta pregunta, se ha llevado a cabo un análisis western blot en el que se incubó la muestra con un anticuerpo policlonal dirigido a SGK1.1 y se cuantificó la abundancia de la quinasa en el citoplasma de las células N2a-KO y el clon 44. Se utilizó la proteína GAPDH como control de carga. Este control se utiliza porque durante la preparación de los extractos para el experimento, se calcula obtener una concentración final de proteína para todas las muestras de 1 µg/ml; sin embargo, siempre pueden ocurrir errores de pipeteo a la hora de cargar el gel de electroforesis para la separación de las proteínas por su peso molecular. Es por ello por lo que, durante el experimento, una vez realizada la transferencia del gel a la membrana, esta se corta en dos mitades aproximadamente, que se incubarán en paralelo contra los anticuerpos de SGK1.1 y GAPDH respectivamente. La ubicuidad de GAPDH y su bajo peso molecular permite utilizarlo como control de carga en el gel, y así, normalizar los valores obtenidos de la concentración de SGK1.1 y minimizar los posibles errores de pipeteo. En los resultados se puede observar que una vez normalizada la cantidad de SGK1.1 con la de GAPDH, el clon 44 expresa una cantidad significativamente superior, aproximadamente tres veces más, de la quinasa cuando se compara con las células SGK1-KO (Figura 9A).

Si se demuestra, en efecto, que SGK1.1 está presente en el citoplasma, ¿cómo es posible evaluar su funcionalidad?

Con el fin de obtener confirmación sobre la capacidad de fosforilación de SGK1.1, se seleccionó una de las dianas conocida de la quinasa, la proteína quinasa 3 de la glucógeno-sintasa (GSK3-β) (Kobayashi & Cohen, 1999), expresada endógenamente en las células N2a.

Mediante dos análisis western blot semi-cuantitativos en paralelo se determinaron las abundancias de proteína total y fosforilada utilizando los anticuerpos anti-GSK3- β y anti-pGSK3 $\alpha\beta$ -Ser21/9 respectivamente. De esta forma, es posible determinar la abundancia relativa de la proteína fosforilada frente a la cantidad total de la misma en el citoplasma y estimar, así, la actividad de la quinasa SGK1.1.

Los datos obtenidos del análisis western blot para SGK1.1 frente a GADPH y GSK3- β fosforilada frente a GSK3- β total, se corresponden con los hallazgos de experimentos realizados en paralelo y de forma independiente. Para cada una de las condiciones se realizaron entre tres y cuatro réplicas sobre muestras procedentes de diferentes extractos de proteínas. La siguiente figura refleja los resultados obtenidos (Figura 9B) mediante el análisis semicuantitativo, que demostraron una capacidad de fosforilación superior de la proteína SGK1.1 en el clon 44 que en la población control SGK-KO. Como se muestra en la figura, los resultados evidencian unos niveles de fosforilación frente al total más de dos veces superiores en el clon 44 que en las células N2a-KO.

En conjunto, los resultados de este trabajo demuestran un aumento en la actividad SGK1.1 en un clon de células N2a modificado para expresar un mutante constitutivamente activo de esta quinasa fusionada a la proteína fluorescente YFP. De esta forma, hemos obtenido una herramienta que en el futuro posibilitará la identificación y estudio de nuevas dianas moleculares de la quinasa SGK1.1, permitiendo comprender mejor su función celular e, idealmente, los mecanismos mediante los que regula la corriente M y afecta a la excitabilidad neuronal, ejerciendo como factor protector en crisis epilépticas.

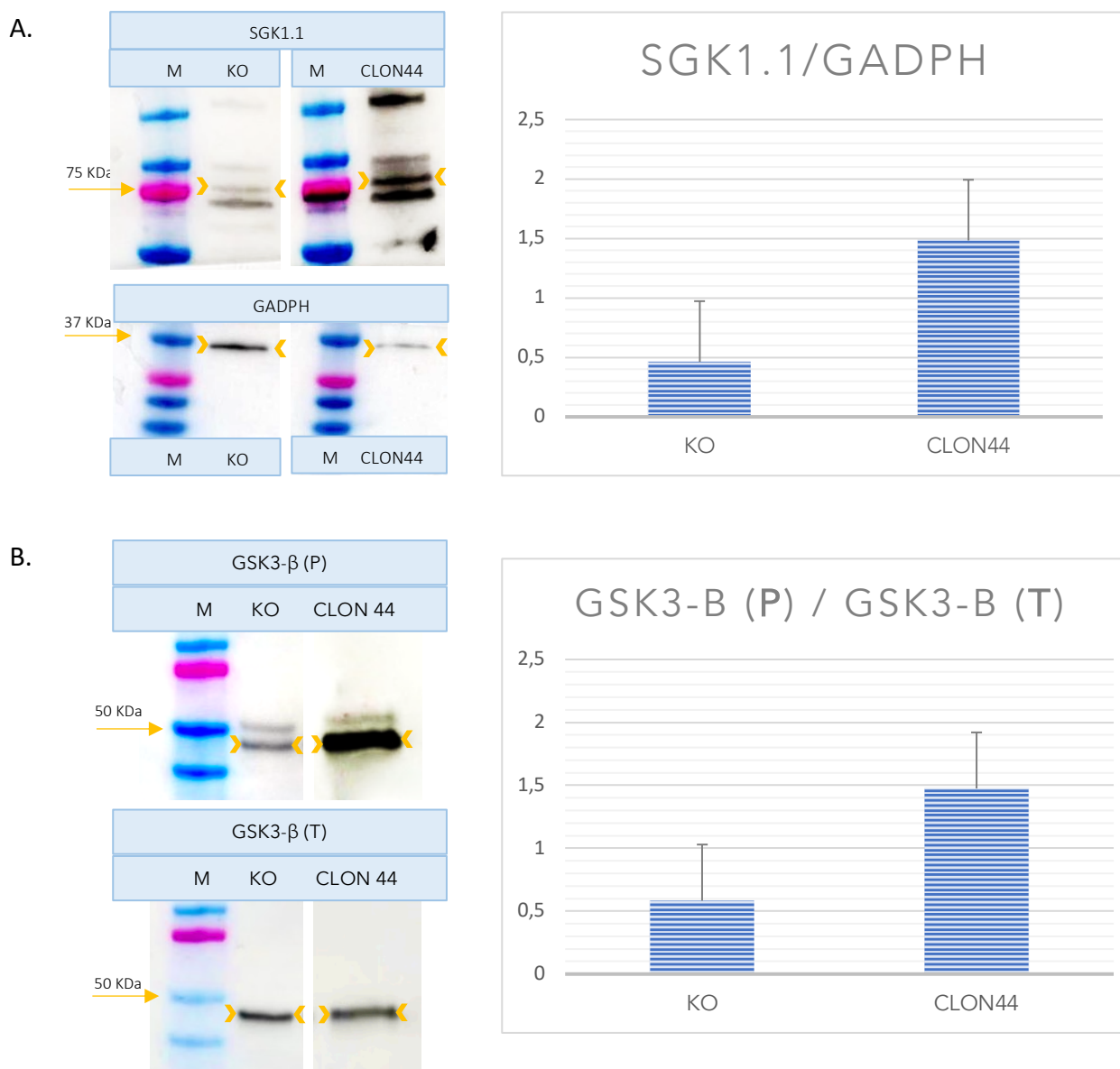


Figura 9. A. Resultados preliminares de la expresión proteica de SGK1.1 en las muestras obtenidas de los extractos celulares de las N2a-KO y el clon 44 de la subpoblación de SGK1.1 Inmunoblots representativos de las muestras incubadas con el anticuerpo policlonal anti-SGK1.1 y el anticuerpo anti-GADPH como control de carga. Se observa una banda de proteínas de peso molecular entorno a 75kDa que se corresponde con el tamaño esperado. La condición de anticuerpo policlonal explica las diferentes bandas inespecíficas halladas a otras alturas, por lo que se ha señalado entre indicadores de color amarillo la banda de interés. En el gráfico de la derecha se representa la cuantificación de la expresión relativa de SGK1.1 en las células N2a-KO y el clon 44 de SGK1.1, normalizada con los niveles de GADPH. **B. Resultados preliminares de la expresión de GSK3B fosforilada (P) frente a GSK3B total (T) en las muestras obtenidas de los extractos celulares de las N2a-KO y el clon 44 de la subpoblación de SGK1.1** B.1 Inmunoblots representativos de las muestras incubadas con los anticuerpos anti-GSK3 $\alpha\beta$ (P) y anti-GSK3- β (T). Se observa una banda de proteínas de peso molecular 50 kDa que se corresponde con el tamaño esperado. Se ha señalado entre indicadores de color amarillo la banda de interés. En el gráfico de la derecha se representación la expresión relativa de GSK3- β (P) respecto a GSK3- β (T) en las células N2a-KO y el clon 44 de SGK1.1.

DISCUSIÓN

Desde el descubrimiento de la doble hélice del DNA, investigadores y médicos se han esforzado por comprender en profundidad el genoma de los organismos superiores, cómo dirige el desarrollo, la fisiología del equilibrio y de la enfermedad. La carrera por ampliar lo que conocemos hasta ahora trae consigo la aparición de nuevas propuestas que contemplan la posibilidad de llevar a cabo modificaciones específicas del genoma y la creación de innovadoras aplicaciones en el campo de la biología. Sin embargo, estas ideas necesitan herramientas de ingeniería genética eficientes, aún en la actualidad en continuo avance y desarrollo.

El sistema CRISPR-Cas9 ha surgido en los últimos años como una herramienta versátil y precisa, que ha revolucionado el mundo de la ingeniería genética y abre las puertas a grandes avances tanto de la investigación biomédica como de la medicina diaria que conocemos en la actualidad. Este hecho, ha convertido a las investigadoras que lo propusieron, J. Doudna y E. Charpentier, en merecedoras del Premio Nobel de Química en el año 2020. CRISPR-Cas constituye una herramienta de trabajo sólida y eficaz, que utiliza el sistema de emparejamiento de bases Watson-Crick, mediante un ARN guía, para identificar secuencias de ADN diana y realizar un corte en el sitio específico de interés, que será utilizado para modificar localmente la secuencia. Son muchos los estudios que han demostrado que CRISPR-Cas9 representa una herramienta eficiente que ha transformado nuestra capacidad para manipular, visualizar y analizar secuencias específicas de DNA y RNA de las células vivas. El abanico de posibilidades de CRISPR es muy amplio: inserción o delección de secuencias, edición de bases, represión y activación de la transcripción genética o comprensión de la estructura tridimensional del genoma, entre otras. Aunque las comparaciones directas pueden ser difíciles de evaluar debido a las diferencias en los sitios diana y los objetivos de su uso, algunos análisis muestran que las eficiencias de edición mediadas por CRISPR-Cas9 pueden alcanzar el 80% o más según el objetivo; que es tan alto o mayor que los niveles observados con otras técnicas como ZFN, siglas en inglés de “Zinc Finger Nuclease” o TALEN siglas en inglés de “Transcription activator-like effector nuclease”, siendo a su vez más versátil. (Kim et al., 2014)(Hwang et al., 2013).

Uno de los ejemplos de las numerosas aplicaciones que pueden ser desarrolladas para beneficio de la Medicina haciendo uso de esta tecnología consiste en la reproducción precisa de translocaciones cromosómicas y mutaciones en oncogenes asociadas al desarrollo de ciertos tipos de tumores.

CRISPR-Cas constituye tecnología robusta para estudiar y ampliar los conocimientos sobre reordenamientos genómicos, desarrollo y progresión de cánceres u otras enfermedades. En efecto, esta herramienta ya a sido utilizada para el desarrollo de líneas celulares humanas y células primarias con traducciones cromosómicas similares a las descritas en cánceres como el cáncer de pulmón (Choi & Meyerson, 2014), la leucemia mieloide aguda y el sarcoma de Ewing (Chen et al., 2014), (Torres et al., 2014). Un segundo enfoque que su uso podría permitir es el análisis sistemático y ampliado de las funciones de los genes en células humanas y de otros mamíferos, la identificación de genes esenciales para la viabilidad celular y el estudio de posibles dianas farmacológicas. Asimismo, un mejor conocimiento del genotipo y su relación con distintos fenotipos podría ampliar la naturaleza y la utilidad de los cribados genéticos, extendiendo su uso.

Un último ejemplo entre tantos de las aplicaciones de CRISPR-Cas9 con relevancia para la salud humana incluye la capacidad de corregir mutaciones genéticas responsables de trastornos hereditarios. Recientemente, investigadores del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) y el Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD) han desarrollado una estrategia con esta tecnología que ha permitido corregir el defecto de las células madre de la sangre de pacientes con anemia de Fanconi en estudios preclínicos. (Román-Rodríguez et al., 2019) En febrero de 2021, se registraron 43 ensayos clínicos, a nivel mundial, de terapias génicas usando CRISPR. Estos ensayos, todos en fases iniciales, están dirigidos a desórdenes sanguíneos, cáncer, ojos, infecciones crónicas o alteraciones en el plegamiento de proteínas. En todos los casos, estos ensayos dirigen la edición génica a células o tejidos concretos, y nunca a células de la línea germinal; por lo que, la edición nunca va a ser transmitida a la siguiente generación. Esto es debido a que, a pesar de que el impacto científico y médico ante la aparición de CRISPR es indiscutible, es una tecnología que aún no está preparada para dar ese paso, por lo que se debe continuar investigando.

Los resultados obtenidos en este estudio son una muestra del éxito de esta técnica para la edición génica, con la creación de una subpoblación en las que se ha insertado en el núcleo con éxito un gen de nuestro interés, capaz de activar la maquinaria celular necesaria para expresar la proteína para la que codifica. Como resultado, se ha obtenido una proteína funcional, que fosforila las dianas conocidas a una proporción superior comparado con las células control.

Si bien, se trata de una técnica robusta y sólida, su eficiencia no siempre es la esperada. En el transcurso de este Trabajo de Fin de Grado han surgido importantes cuestiones a este respecto. En el caso de la subpoblación de SGK1, ninguna de las colonias transfectadas incorporaron con éxito la secuencia completa y, a pesar de intentar diferentes abordajes para repetir el clonaje y realizar de nuevo la transfección para el desarrollo de una nueva subpoblación SGK1, fue imposible crear un molde con éxito en el que no se encontrara la duplicación en el extremo final. Por otra parte, aunque las células N2a-KO mostraron una concentración relativa de GSK3 β fosforilada menor que la observada en el clon 44, sería conveniente realizar nuevos experimentos con otras dianas de fosforilación previamente descritas como Nedd4–2 (Staub et al., 1996) para afianzar los resultados de este estudio. Además, nuestro grupo ha descubierto recientemente y publicado que el papel neuroprotector de SGK1.1 no se debe exclusivamente a su función como modulador de los canales de potasio Kv7 de la membrana (Armas-Capote et al., 2020) (Miranda et al., 2013), sino que ejerce un doble papel protector modulando vías intracelulares independientes del mecanismo anterior que reducen el daño neuronal inducido por las crisis epilépticas. (Martin-Batista et al., 2021) Éxitos que inspiran nuevas posibilidades e impulsan los esfuerzos por descubrir detalladamente la función de SGK1.1 en la neurona.

Conclusión y perspectivas

En efecto, el objetivo final del gran proyecto de investigación en el que se enmarca este Trabajo de Fin de Grado persigue caracterizar el perfil completo de la proteína SGK1.1, comprender su papel en el aumento de la expresión en la membrana de los canales de potasio Kv7 y su capacidad para modular vías intracelulares que disminuyen el daño celular. Para ello, una vez se ha desarrollado con este trabajo una línea celular estable el siguiente objetivo consiste en llevar a cabo un análisis de las proteínas fosforiladas que pertenecen a las rutas de señalización en las que participa SGK1.1. Esta determinación del perfil de fosforilación será llevada a cabo por el servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, CSIC). Para ello, se realizará un análisis de fosfoproteómica diferencial; es decir, una comparación de perfiles de fosforilación entre dos condiciones: control, que son las células SGK-KO y el clon 44 de SGK1.1 que se ha desarrollado con este trabajo de fin de grado; con lo que se obtiene el nivel de fosforilación entre ambas. Dado que la proporción en que se encuentran los péptidos fosforilados respecto a la matriz es muy baja, este tipo de estudio requiere un procedimiento complejo y laborioso, con un enriquecimiento previo de la muestra mediante diversos y complejos procedimientos que favorezcan su aislamiento.

Se determinará el perfil de fosforilación de cada muestra y el resultado que se obtendría sería de cantidad relativa de fosfoproteína entre control (N2a KO para SGK1) y mutante (N2a+Clon44). A partir del resultado obtenido en esta prueba, de acuerdo con el número y tipo de fosfoproteínas identificadas, se continuará con el estudio del papel neuroprotector de la quinasa.

Qué he aprendido con este TFG

Cada uno de los procedimientos detallados a lo largo de este TFG reflejan todos los conocimientos a nivel técnico y teórico que he adquirido en los últimos meses, procedimientos nunca manejados de forma práctica a lo largo de la carrera. Podría extender en una lista numerosas técnicas (difíciles de resumir) del laboratorio relacionadas con el manejo de cultivos celulares (pases de células, contajes...), experimentación con elementos extraídos de su interior (ácidos nucleicos para PCR, proteínas para Western Blot) o plásmidos (transformación, clonajes, digestión...). Además, gracias a la amplia lectura de bibliografía acerca de las últimas investigaciones sobre síndromes epilépticos y las consecuencias de las crisis, no solo he ampliado mis conocimientos acerca de esta patología, sino que he podido apreciar la imperiosa necesidad de continuar su estudio para mejorar los abordajes del gran porcentaje de pacientes resistentes a los fármacos disponibles en la actualidad; así como frenar la progresión del deterioro del sistema nervioso acompañante.

A nivel personal; he aprendido a trabajar en equipo, paciencia, dedicación, gestión del tiempo. Las células precisan de su propio tiempo de incubación, cada cultivo tiene sus ritmos sin entender lo que son los días de la semana. Cada una de estas técnicas no es inmediata. Precisan de sus tiempos de mezclas, separación, centrifugación, ciclos, etc. Y muchas veces, no salen. Quizás algo a la fuerza, he reforzado mi tolerancia a la frustración. He aprendido a ser metódica y a llevar siempre una libreta encima para revisar cada posible paso que haya podido salir mal o guardar para la próxima todos los que salieron bien.

La medicina avanza en esta dirección y he tenido una gran oportunidad para conocer las bases de lo que será mi futuro como profesional, ahora que se están dando los primeros pasos de tantos grandes avances.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez De La Rosa, D. A., Zhang, P., Náráy-Fejes-Tóth, A., Fejes-Tóth, G., & Canessa, C. M. (1999). The serum and glucocorticoid kinase *sgk* increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 274(53), 37834–37839. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.37834>
- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519), 569–573. <https://doi.org/10.1038/nature13579>
- Armas-Capote, N., Maglio, L. E., Pérez-Atencio, L., Martín-Batista, E., Reboreda, A., Barrios, J. A., Hernández, G., Álvarez De La Rosa, D., Lamas, J. A., Barrio, L. C., & Giraldez, T. (2020). SGK1.1 Reduces Kainic Acid-Induced Seizure Severity and Leads to Rapid Termination of Seizures. *Cerebral Cortex*, 30(5), 3184–3197. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz302>
- Arteaga, M. F., Coric, T., Straub, C., & Canessa, C. M. (2008). A brain-specific SGK1 splice isoform regulates expression of ASIC1 in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(11), 4459–4464. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800958105>
- Baulac, S., & Baulac, M. (2009). Advances on the Genetics of Mendelian Idiopathic Epilepsies. *Neurologic Clinics*, 27(4), 1041–1061. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2009.07.001>
- Brown, D. A., & Adams, P. R. (1980). Musacrinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neuron. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 283, 673–676.
- Brown, David A., & Passmore, G. M. (2009). Neuronal KCNQ (Kv7) channels. *British Journal of Pharmacology*, 156(8), 1185–1195. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00111.x>
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., & D'andrea, A. D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break Mechanisms of DNA DSB Repair. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009.Repair>
- Chen, C., Liu, Y., Rappaport, A. R., Kitzing, T., Schultz, N., Shroff, A. S., Dickins, R. A., Vakoc, C. R., Bradner, J. E., Stock, W., Lebeau, M. M., Shannon, K. M., Kogan, S., Zuber, J., & Lowe, S. W. (2014). *MLL3 Is a Haploinsufficient 7q Tumor Suppressor in Acute Myeloid Leukemia*. 25(5), 652–665. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.03.016.MLL3>
- Choi, P. S., & Meyerson, M. (2014). Targeted genomic rearrangements using CRISPR/Cas technology. *Nature Communications*, 5, 1–6. <https://doi.org/10.1038/ncomms4728>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213). <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Duncan, J. S., Sander, J. W., Sisodiya, S. M., & Walker, M. C. (2006). Adult epilepsy. *Lancet*, 367(9516), 1087–1100. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68477-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68477-8)
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
- Fisher, R. S., Van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470–472. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x>
- Hani, A. J., Mikati, H. M., & Mikati, M. A. (2015). Genetics of Pediatric Epilepsy. *Pediatric Clinics of North America*, 62(3), 703–722. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2015.03.013>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai, S. Q., Sander, J. D., Peterson, R. T., Yeh, J. R. J., & Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31(3), 227–229. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.*, 46, 505–531.
- Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J., & Kim, J. S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research*, 24(6), 1012–1019. <https://doi.org/10.1101/gr.171322.113>
- Le Cong, F., Ann Ran, David Cox, Shuailiang Lin, Robert Barretto, Naomi Habib, Patrick D. Hsu, Xuebing Wu, W. J., & Zhang, L. A. M. and F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(February), 819–824.
- Martín-Batista, E., Maglio, L. E., Armas-Capote, N., Hernández, G., Álvarez de la Rosa, D., & Giraldez, T. (2021). SGK1.1 limits brain damage after status epilepticus through M current-dependent and independent mechanisms. *Neurobiology of Disease*, 153(October 2020). <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105317>
- Miranda, P., Cadaveira-Mosquera, A., González-Montelongo, R., Villarrojo, A., González-Hernández, T., Lamas, J. A., de la Rosa, D. A., & Giraldez, T. (2013). The neuronal serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1.1 reduces neuronal excitability and protects against seizures through upregulation of the M-current. *Journal of Neuroscience*, 33(6), 2684–2696. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3442-12.2013>

- Mojica, F. J. M., & Rodríguez-Valera, F. (2016). The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *FEBS Journal*, *283*, 3162–3169. <https://doi.org/10.1111/febs.13766>
- Myers, C. T., & Mefford, H. C. (2015). Advancing epilepsy genetics in the genomic era. *Genome Medicine*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0214-7>
- Pickar-Oliver, A., & Gersbach, C. A. (2019). The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(8), 490–507. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0131-5>
- Román-Rodríguez, F. J., Ugalde, L., Álvarez, L., Díez, B., Ramírez, M. J., Risueño, C., Cortón, M., Bogliolo, M., Bernal, S., March, F., Ayuso, C., Hanenberg, H., Sevilla, J., Rodríguez-Perales, S., Torres-Ruiz, R., Surrallés, J., Bueren, J. A., & Río, P. (2019). NHEJ-Mediated Repair of CRISPR-Cas9-Induced DNA Breaks Efficiently Corrects Mutations in HSPCs from Patients with Fanconi Anemia. *Cell Stem Cell*, *25*(5), 607–621.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.016>
- Staub, O., Dho, S., Henry, P. C., Correa, J., Ishikawa, T., McGlade, J., & Rotin, D. (1996). WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome. *EMBO Journal*, *15*(10), 2371–2380. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00593.x>
- Sternberg, S. H., & Doudna, J. A. (2015). Expanding the Biologist's Toolkit with CRISPR-Cas9. *Molecular Cell*, *58*(4), 568–574. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.032>
- Thijs, R. D., Surges, R., O'Brien, T. J., & Sander, J. W. (2019). Epilepsy in adults. *The Lancet*, *393*(10172), 689–701. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32596-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32596-0)
- Torres, R., Martín, M. C., García, A., Cigudosa, J. C., Ramírez, J. C., & Rodríguez-Perales, S. (2014). Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nature Communications*, *5*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms4964>
- Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and beyond. *Annual Review of Biochemistry*, *85*, 227–264. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014607>
- Wang, H. S., Pan, Z., Shi, W., Brown, B. S., Wymore, R. S., Cohen, I. S., Dixon, J. E., & McKinnon, D. (1998). KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: Molecular correlates of the M-channel. *Science*, *282*(5395), 1890–1893. <https://doi.org/10.1126/science.282.5395.1890>
- Wesch, D., Miranda, P., Afonso-Oramas, D., Althaus, M., Castro-Hernández, J., Dominguez, J., Morty, R. E., Clauss, W., González-Hernández, T., De La Rosa, D. A., & Giraldez, T. (2010). The neuronal-specific SGK1.1 kinase regulates δ -epithelial Na⁺ channel independently of PY motifs and couples it to phospholipase C signaling. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *299*(4), 779–791. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00184.2010>
- Wright, A. V., Nuñez, J. K., & Doudna, J. A. (2016). Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering. *Cell*, *164*(1–2), 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.035>