

# Desarrollo de un sistema genético inducible de expresión de la quinasa SGK1

---

## TRABAJO FIN DE GRADO

**Facultad de Ciencias de la Salud. Grado en Medicina.**

Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Área de Fisiología

Universidad de La Laguna

---

**Autora:**

Elena Pozo Vinuesa

**Tutores:**

Diego Álvarez de la Rosa Rodríguez

Teresa Giráldez Fernández

**Curso 2021-2022**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tutores Diego y Tere por su inspiradora dedicación.

A Brian, por su paciencia, su cariño y su tiempo.

A mis compañeros de laboratorio Miguel, Luz, Rebeca, Andrea, Ariana, Guadalberto, Violeta, David y Elva. Gracias por acompañarme en este camino.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<i>RESUMEN</i> .....	5
<i>ABSTRACT</i> .....	5
<i>PALABRAS CLAVE</i> .....	5
<i>INTRODUCCIÓN</i> .....	6
Corriente de potasio tipo M ( $I_M$ ) en la epileptogénesis .....	6
Sistema genético de expresión inducible por cumato.....	8
Sistema de transposición con vectores PiggyBaC .....	10
Mecanismo de acción del sistema de transposición con vector Piggybac.....	10
<i>OBJETIVOS</i> .....	12
<i>MATERIAL Y MÉTODOS</i> .....	12
Diseño de vectores plasmídicos para la expresión controlada de SGK1.1.....	12
Purificación de plásmidos.....	14
Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR).....	16
Análisis de los productos de PCR o purificación de plásmidos mediante electroforesis .	17
Purificación de los productos de PCR .....	18
Digestión de DNA mediante enzimas de restricción.....	18
Purificación de los insertos y PCUo .....	19
Ligación .....	19
Transformación de bacterias <i>E. coli</i> mediante el procedimiento de choque térmico .....	20
Siembra de bacterias y cultivo de colonias aisladas .....	21
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> .....	21
Amplificación de las secuencias codificantes mediante PCR .....	24

Digestión de los insertos purificados y del vector PCUo .....	26
Ligación .....	27
Transformación y selección de bacterias con el gen incorporado al vector PiggyBac.....	27
<i>CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS</i> .....	29
<i>QUÉ HE APRENDIDO CON ESTE TFG</i> .....	30
<i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....	31

## **RESUMEN**

Las distintas isoformas de la proteína quinasa SGK1 participan en la regulación de numerosos procesos fisiopatológicos. Concretamente, la isoforma SGK1.1 regula la excitabilidad neuronal, reduciendo la duración e intensidad de crisis epilépticas y proporcionando neuroprotección frente a las mismas. Por ello, la identificación de dianas de fosforilación de SGK1.1 podría proporcionar interesantes dianas terapéuticas en epilepsia. La identificación de dichas dianas mediante activación crónica de la quinasa tiende a producir falsos positivos. Con objeto de evitar este problema técnico, nos hemos planteado desarrollar un sistema genético que permita la expresión controlada e inducible de la quinasa SGK1.1 en células en cultivo, herramienta que en el futuro será útil para detectar dianas de fosforilación de esta quinasa con mejor eficiencia.

## **ABSTRACT**

The different isoforms of the protein kinase SGK1 participate in the regulation of numerous pathophysiological processes. Specifically, the isoform SGK1.1 regulates neuronal excitability, reducing the duration and intensity of epileptic seizures and providing neuroprotection against them. Therefore, the identification of phosphorylation targets of SGK1.1 could provide interesting therapeutic targets in epilepsy. Identification of such targets by chronic activation of the kinase tends to produce false positives. In order to avoid this technical problem, we have considered developing a genetic system enabling the controlled and inducible expression of SGK1.1 in cultured cells, a tool that in the future will be useful to detect phosphorylation targets of this kinase.

## **PALABRAS CLAVE**

PiggyBaC, Epilepsia, p-cumato, clonaje molecular.

## INTRODUCCIÓN

Las proteínas de la familia kinasa dependiente de suero y glucocorticoides (SGK) están relacionadas con la propagación de cascadas de señalización asociadas con el control del crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de la célula, además del tráfico de vesículas desde y hacia la membrana plasmática y, por tanto, el control del transporte de solutos a través de esta. Existen tres isoformas de SGK (SGK1, SGK2 y SGK3) de las cuáles, la más investigada es SGK1 y el hecho de que su expresión se vea inducida por una gran variedad de estímulos, así como las múltiples funciones que lleva a cabo, sugiere una compleja regulación a varios niveles que precisa aún de estudio. SGK1 ha sido implicada en el control de la actividad de numerosos transportadores y canales iónicos.

La isoforma SGK1 se expresa de forma variable en diferentes tejidos como cerebro, placenta, hígado, páncreas, riñón, corazón, pulmón y músculo esquelético. Este trabajo se centra en el estudio de SGK1.1, una isoforma de SGK1 que solamente se encuentra en el cerebro, principalmente en las neuronas piramidales y cuya expresión es mucho más estable que la de la proteína canónica debido a que carece, en su N-terminal, de la señal de degradación por el proteosoma (González Fernández., 2012/13).

### **Corriente de potasio tipo M ( $I_M$ ) en la epileptogénesis**

Dentro de los canales iónicos que regula SGK1.1, son de especial interés los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje Kv7.2 y Kv7.3 (codificados por los genes KCNQ2 y KCNQ3, respectivamente) cuando se encuentran formando un heterotetrámero. En muchas regiones del cerebro, los heterotetrámeros Kv7.2/3 forman la base molecular de la corriente M, una corriente hiperpolarizante que regula la excitabilidad neuronal al disminuir la frecuencia de disparo del potencial de acción (Brown and Adams, 1980; Wang et al., 1998). El hecho de que disminuya la corriente M en una determinada población neuronal desemboca en una alteración de la repolarización que produce una descarga de potenciales de acción de alta frecuencia, paroxística, excesiva y sincrónica que se manifiesta en forma de crisis epiléptica como convulsiones, fenómenos de experiencia subjetiva o ausencias (Oyler et al., 2018). Gracias al rol que juegan los canales de potasio Kv7 en la regulación del potencial de membrana, su estudio y control suponen una posible estrategia terapéutica de los síndromes de hiperexcitabilidad neuronal como la epilepsia neonatal benigna familiar (BFNE) o la

encefalopatía epiléptica infantil temprana, dos síndromes epilépticos neonatales primarios en donde se observa disminuida la corriente  $I_M$ .

Las convulsiones son el síntoma neurológico más frecuente del sistema nervioso central durante el período neonatal (Spoto et al., 2021). Definir la correlación genotipo-fenotipo de los diferentes síndromes epilépticos y los mecanismos etiopatogénicos subyacentes, desemboca en una mejoría diagnóstica y pronóstica de esta patología. La mayor susceptibilidad a una crisis convulsiva en el neonato, debido a las diferencias funcionales y de maduración sináptica con el cerebro adulto, implica la necesidad de una investigación continua en este campo para lograr un tratamiento dirigido y efectivo según la etiología de las convulsiones.

La BFNE es un síndrome poco frecuente de epilepsia neonatal autosómica dominante relacionado, en el 90% de los casos, con mutaciones en el gen *KCNQ2* que codifica el canal de  $K^+$  dependiente de voltaje  $K_v7.2$ . Las crisis se inician generalmente con una fase tónica asociada a apnea/cianosis y seguidas posteriormente de movimientos clónicos. El fármaco de elección para su tratamiento continúa siendo el fenobarbital (Spoto et al., 2021), seguido de la fenitoína y benzodiacepinas. Sin embargo, los antiepilépticos actuales no han conseguido tasas de respuesta plenamente satisfactorias y nuevos fármacos, como la retigabina (Trobal®) o la flupirtina, que actúan mediante la apertura de los canales neuronales de potasio (*KCNQ2* [ $K_v7.2$ ] y *KCNQ3* [ $K_v7.3$ ]) y que han demostrado ser eficaces como antiepilépticos adyuvantes (Wickenden et al., 2004; Martin-Batista et al., 2021), han sido retirados por la notificación de casos adversos como la coloración del tejido ocular, piel, uñas y labios o casos de hepatopatía, respectivamente (Clark et al., 2015; Surur et al., 2019).

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que la kinasa SGK1.1 aumenta el nivel de la corriente  $I_M$  por aumento de la expresión de dichos canales de  $K^+$  en la membrana, (Miranda et al., 2013), proporcionando a las neuronas protección frente a la hiperexcitabilidad en un modelo de epilepsia del lóbulo temporal (Armas-Capote et al., 2020). Estudios adicionales han demostrado que la activación constitutiva de SGK1.1 en ratones transgénicos reduce los niveles de muerte neuronal y activación glial reactiva en córtex y región límbica durante el estatus epiléptico inducido (Martin-Batista et al., 2021). En este

trabajo, nuestro grupo ha descrito que el efecto neuroprotector de SGK1.1 en ratones transgénicos se logra a través de un mecanismo dual: aumento de la corriente  $I_M$  y disminución de la apoptosis neuronal. Ambas vías actúan de manera sinérgica en la regulación de la hiperexcitabilidad para reducir la intensidad y duración de las convulsiones y como factor antiapoptótico para diferir la neurodegeneración por daño neuronal.

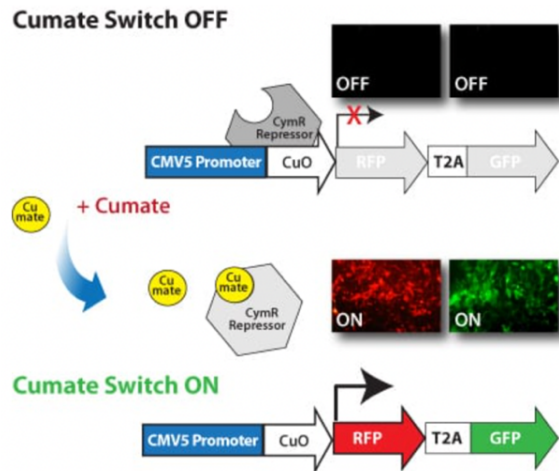
Los resultados obtenidos con ratones transgénicos sugieren que la activación de las rutas de señalización reguladas por SGK1.1 podría proporcionar una aproximación terapéutica útil en el tratamiento de algunos tipos de epilepsia. Sin embargo, la diversidad de isoformas de SGK y el alto número de procesos celulares y fisiológicos regulados por las mismas, incluyendo la proliferación celular, limita esta aproximación terapéutica. Por ello, resulta imprescindible conocer en detalle las cascadas de señalización iniciadas por SGK1.1 y anteriores a los propios canales Kv7.2/7.3, estudiando especialmente a qué otras proteínas fosforila SGK1.1 en la célula, siendo éstas potenciales dianas terapéuticas en el tratamiento de la epilepsia.

La identificación de dianas de fosforilación de *protein kinases* ha avanzado rápidamente gracias a las técnicas de fosfoproteómica. Sin embargo, una importante limitación de estas técnicas es que la sobreactivación permanente de una quinasa celular induce la fosforilación aberrante de numerosas otras proteínas, haciendo que la tasa de identificación de falsos positivos sea elevada. Para evitar este problema técnico, es deseable contar con un sistema celular donde se pueda controlar con precisión la expresión/actividad de la quinasa de interés en el tiempo, limitando la detección de falsos positivos.

### **Sistema genético de expresión inducible por cumato**

Con el objetivo de desarrollar un modelo celular con expresión controlada de SGK1.1 se ha utilizado el sistema de expresión génica inducible por p-cumato (4-isopropylbenzoate). Este sistema nos permite controlar de forma precisa la expresión génica al activar o desactivar la transcripción de la secuencia codificante de interés deliberadamente y observar la relación causa-efecto entre genotipo y fenotipo (en este caso, aparición en la célula de proteínas fosforiladas por SGK1.1 cuando ésta se activa). En este operón inducible, originalmente identificado en la bacteria *Pseudomonas putida* (Mullick et al., 2006), el compuesto de bajo peso molecular p-cumato se une a la proteína represora CymR e impide su unión con el operador (Figura 1).





**Figura 1: Mecanismo de acción del Sistema genético de expresión inducible por cumato.** El represor CymR, *per se*, es activo e impide que los genes estructurales se transcriban. CymR se inactiva en presencia del inductor p-cumato que induce en éste un cambio conformacional y disminuye su afinidad a la secuencia del operador, por lo que ahora se puede iniciar la transcripción. RFP: Red Fluorescent Protein. GFP: Green Fluorescent Protein. Procedencia de la imagen: <https://www.systembio.com/pb-cuo-cmv-mcs-ef1a-cymr-puro-inducible-cdna-cloning-and-expression-vector>.

Sin el represor en su camino la RNA polimerasa II se une al promotor y transcribe el transgén. La ventaja con respecto a otros sistemas similares es la baja expresión de fondo del transgén en ausencia de cumato y el fácil control del nivel de expresión según la concentración de cumato en el medio.

El cumato es una molécula pequeña, barata, inocua, de baja reactividad, que no se encuentra como contaminante en los reactivos comunes para el cultivo de células y que puede ser añadida directamente para inducir la expresión génica sin interferir en la expresión proteica de la célula; lo que lo convierte en un inductor molecular ideal. Por ello, en este trabajo nos planteamos adaptar el sistema de expresión génica inducible por cumato para desarrollar líneas celulares con expresión controlada de SGK1.1, que a su vez puedan ser utilizadas posteriormente en el estudio de proteínas fosforiladas por esta quinasa, de potencial relevancia en el control de la excitabilidad neuronal y por tanto en la epilepsia.

### **Sistema de transposición con vectores PiggyBaC**

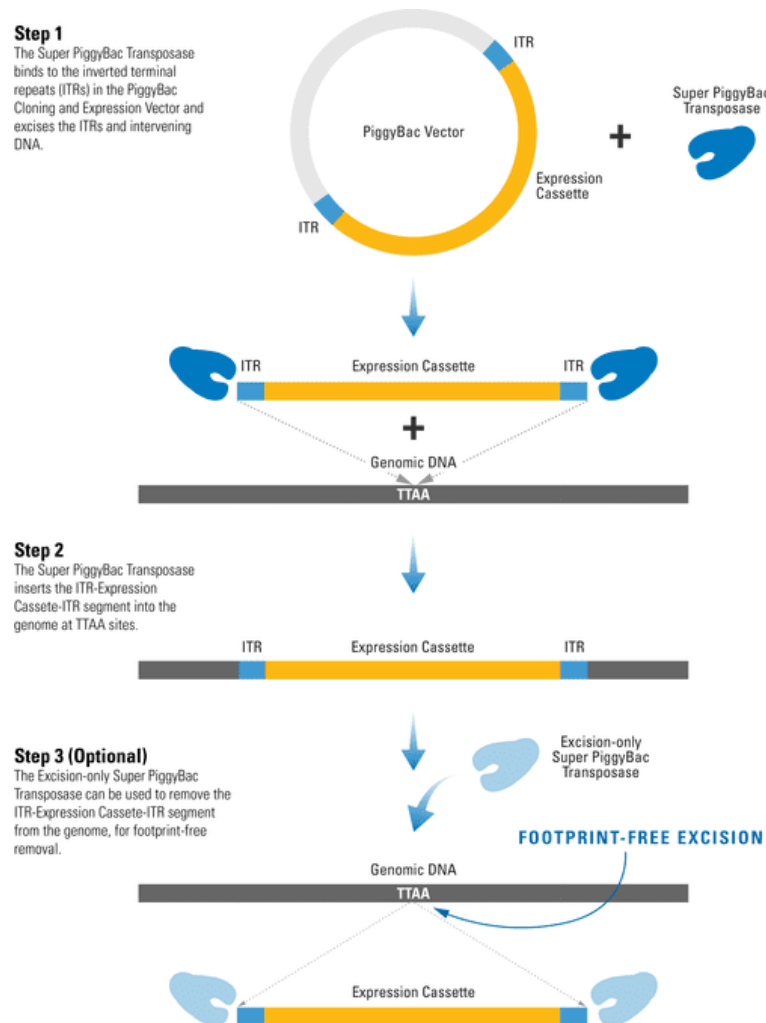
Los plásmidos son moléculas circulares de DNA extracromosómico bacteriano que se replican de forma autónoma, a partir de su propio origen de replicación. Su introducción artificial en células de mamífero, en un proceso denominado “transfección”, permite la expresión de transgenes codificados por dichos plásmidos, siempre que las secuencias codificantes se encuentren bajo el control de un promotor funcional en dichas células.

Esta aproximación tiene la limitación de que los orígenes de replicación bacterianos de los plásmidos no funcionan en células de mamífero, de forma que los plásmidos solo permanecen unas horas en las células transfectadas, siendo degradados o bien diluyéndose al producirse sucesivas divisiones celulares. Una fracción muy pequeña de los plásmidos puede llegar a insertarse al azar en el genoma de las células. Si el plásmido de interés posee un gen de resistencia a antibióticos que sea funcional en células de mamífero, y si estas células son sensibles a dicho antibiótico (p.e. la puromicina), es posible aplicar una selección con dicho antibiótico, seleccionando las pocas células que han adquirido resistencia por integración al azar del plásmido. Este proceso es muy poco eficiente, consume mucho tiempo y tiende a seleccionar subclones celulares con características que pueden diferir mucho de la línea celular original. Por ello, se han desarrollado herramientas moleculares para optimizar este proceso. Una de estas herramientas es la utilización de procesos de transposición para inserción de alta eficiencia de plásmidos en el genoma. La combinación de vectores plasmídicos que actúan como transposones en el sistema de transposición Piggybac (Chen et al., 2020) con el sistema de expresión inducible por cumato representa una opción ideal para generar con alta eficiencia líneas celulares en las que la expresión de SGK1.1 puede ser controlada con elevada precisión.

### **Mecanismo de acción del sistema de transposición con vector Piggybac**

El transposón Piggybac utiliza un mecanismo de “corta y pega” para transferir una secuencia de DNA desde el vector Piggybac al genoma (Figura 2). Entre las ventajas de su utilización con respecto a otros sistemas de transposición, cabe mencionar que no tiene límite de tamaño para la integración de una secuencia, es un vector no viral económico de producir y la integración genómica es reversible, pudiendo restablecer la secuencia genómica original de la célula y valorar los cambios fenotípicos de la transgénesis.

La aproximación para el desarrollo de la línea celular con expresión inducible de SGK1.1 sería co-transfectar las células con el transposón (vector piggyBac) y la transposasa Piggybac, expresada a partir de su secuencia codificante en un plásmido independiente. La transposasa se uniría a las repeticiones terminales invertidas (ITRs) que flanquean el *cassette génico* en el vector y seccionaría el segmento ITR-cassette génico-ITR para insertarlo en los sitios TTAA (secuencias consenso del tipo 5'-TATAAA-3') del genoma de la célula huésped.



**Figura 2:** Mecanismo de acción del vector plasmídico Piggybac. Procedencia de la imagen: <https://www.mn-net.com/media/pdf/2f/61/5f/Short-instruction-NucleoSpin-Plasmid-EasyPure.pdf>

## OBJETIVOS

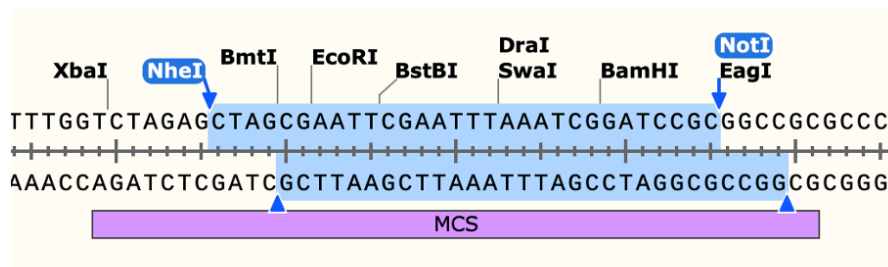
El objetivo general de este trabajo es desarrollar modelos celulares controlados para el estudio de fosforilación de proteínas por parte de las distintas isoformas de la quinasa SGK1 mediante técnicas de biología molecular y celular. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos concretos:

- 1) Diseñar y generar vectores piggyBac que contengan la secuencia codificante de SGK1.1 bajo el control del operador inducible por cumato.
- 2) Desarrollar una línea celular estable con expresión inducible de SGK1.1 usando el sistema de transposición con vectores piggyBaC.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Diseño de vectores plasmídicos para la expresión controlada de SGK1.1

Diseñamos dos construcciones en paralelo para expresar la quinasa SGK1.1 de ratón con la mutación S515D, que la convierte en constitutivamente activa, bajo el control del sistema genético CuO. Una de las construcciones expresa SGK1.1 fusionada con la proteína cian fluorescente optimizada (*enhanced cyan fluorescent protein*, eCFP) y la otra expresa SGK1.1 fusionada al epítipo FLAG, en ambos casos en el extremo COOH-terminal de la quinasa. Para ello, planeamos amplificar las secuencias codificantes correspondientes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluyendo dianas de enzimas de restricción que posibiliten su inserción en la zona de clonaje múltiple del vector PB-CuO-CMV (Figura3).



**Figura 3.** Zona de clonaje múltiple (*multiple cloning site*, MCS) del vector PB-CuO-CMV, donde se señalan las dianas de enzimas de restricción utilizadas para el clonaje (NheI/Not) y el fragmento de DNA del vector eliminado con el corte y sustituido por la secuencia codificante de SGK1.1.

Para la construcción SGK1.1-eCFP se amplificó, mediante PCR, la secuencia codificante de la proteína de fusión a partir del vector peCFP-SGK1.1-S515D, ya disponible en el laboratorio, utilizando para ello los siguientes oligonucleótidos:

-NheI-mSGK1.1.FOR:

TAAGCA**GCTAGC****GCCACCATGG**atgtaaacaagacatgaatggattcccg

En minúscula, zona complementaria a la secuencia codificante de SGK1.1; resaltado en amarillo, secuencia Kozak, que mejora la eficiencia de iniciación de la traducción; en cian, diana de la enzima de restricción NheI.

-NotI-XFP.REV: TAAGCA**GCGGCCGCTTA**ctgtacagctgcatgcc

En minúscula, zona complementaria a la región final de la secuencia codificante de eCFP; resaltado en verde, codón de parada; en cian, diana de la enzima de restricción NotI.

Para la construcción SGK1.1-FLAG se amplificó la secuencia codificante de SGK1.1 utilizando como molde un vector ya disponible en el laboratorio que incluye esta secuencia y los siguientes oligonucleótidos:

-NheI-mSGK1.1.FOR: oligonucleótido común (secuencia descrita anteriormente)

-NotI-mSGK1-FLAG.REV:

CA**GCGGCCGCT****TCAGATTACAAGGATGACGACGATAAG**agaggaaggaatccacaggagg

En minúscula, zona complementaria a los últimos siete codones de la secuencia codificante de SGK1.1; resaltado en amarillo, secuencia codificante del epítipo FLAG-DYKDDDDK-; resaltado en verde, codón de parada; en cian, diana de la enzima de restricción NotI.

Construcción	Oligonucleótidos utilizados para amplificar SGK1.1	
<b>SGK1.1-eCFP</b>	-NheI- mSGK1.1.FOR	TAAGCAGCTAGCGCCACCATGGatgtaaacaaaagacatgaatggattcccg
	-NotI-XFP.REV	TAAGCAGCGCCGCTTActgtacagctgctccatgcc
<b>SGK1.1-FLAG</b>	-NheI- mSGK1.1.FOR	TAAGCAGCTAGCGCCACCATGGatgtaaacaaaagacatgaatggattcccg
	-NotI-mSGK1- FLAG.REV	CAGCGGCCGCTCAGATTACAAGGATGACGACGATAAGGagaggaaggaatccacaggagg

**Tabla 1:** Resumen de los oligonucleótidos utilizados para amplificar la secuencia codificante mediante PCR con las dianas de restricción y el epítipo FLAG en el segundo constructo.

### Purificación de plásmidos

Utilizamos el kit comercial *NucleoSpin® Plasmid EasyPure* (Macherey-Nagel) para la extracción y purificación de plásmidos a partir de cultivos de bacterias *E. coli* (cepas TOP10 -Invitrogen- o bien XL10-Gold -Agilent-). Las bacterias se crecieron en medio líquido Luria-Bertani (LB; composición: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 2,5 g/L NaCl) en presencia de un antibiótico de selección, dependiendo del plásmido de interés. Generalmente, utilizamos ampicilina 100 µg/ml o bien kanamicina 50 µg/ml. Empleamos cultivos de 5 ml de LB inoculados con la bacteria portadora del plásmido e incubados durante toda la noche a 37°C en agitación. Elegimos el método de lisis alcalina para aislar el plásmido por su simplicidad, bajo coste y reproducibilidad. Este método permite la extracción gracias a las diferencias en los procesos de desnaturalización y renaturalización del DNA plasmídico y el cromosómico: el menor tamaño del DNA plasmídico y su estructura circular superenrollada son determinantes.

Parámetros	Determinaciones
Volumen de cultivo	2-10 mL
Rendimiento	15-30 µg
Volumen de elución	50 µL
Capacidad máxima	35 µg
Vectores	<15 kbp
Tiempo de preparación	14 min/6 preps
Formato	microcolumna

Tabla 2: Determinaciones adaptadas del kit *NucleoSpin® Plasmid EasyPure*.

1. En primer lugar, se recolectaron 5 mL del cultivo en fase estacionaria (según recomendaciones del protocolo; Tabla 2) y se centrifugó a temperatura ambiente 30s a 12.000 xg. Se desechó el sobrenadante para conservar únicamente el precipitado de las bacterias.
2. Para resuspender el pellet se añadieron 150 µL de Buffer A1 (GTE: Glucosa, Tris-HCl y EDTA, solución isotónica que secuestra los iones  $Ca^{2+}$  del medio) y se mezcló con el vortex.
3. Se añadieron 250 µL de Buffer A2 (solución de lisis: NaOH, SDS), se agitó suavemente con la mano por inversión 5 veces y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos. En este paso es importante no usar vortex. El SDS es un detergente que rompe las membranas bacterianas y desnaturaliza las proteínas mientras que el NaOH desnaturaliza el DNA.
4. Para la neutralización se añadieron 350 µL de Buffer A3 (acetato potásico) y se agitó por inversión hasta que la disolución se volvió transparente, con un precipitado de color blanco. La neutralización del medio en presencia de una concentración alta de sal (acetato potásico) provoca la precipitación de las proteínas y la del DNA cromosómico junto con el SDS.
5. Los agregados macromoleculares de DNA cromosómico-proteínas-lípidos y otros componentes celulares se decantan por centrifugación (3 min a 12.000 xg) y el DNA

plasmídico permanece disuelto en el sobrenadante, que se retiró y se transfirió a una microcolumna proporcionada por el kit acoplada a un tubo colector (2mL).

6. Se centrifugó la columna durante 30 s a 2,000 xg y se desechó el líquido eluido. Se añadieron 450  $\mu$ L de Buffer AQ (solución de lavado) en la microcolumna y se centrifugó durante 1 minuto a máxima velocidad. Repetimos el paso de lavado para que la eliminación de los contaminantes fuese más efectiva.
7. Se transfirió la columna a un tubo eppendorf, se añadieron 50  $\mu$ L de Buffer AE (tampón de elución; Tabla 2) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. El DNA plasmídico puro es eluido en condiciones estrictas de baja fuerza iónica con este tampón ligeramente alcalino (5 mM Tris/HCl, pH 8.5), que estabiliza el DNA e impide su degradación.
8. Finalmente se centrifugó durante 1 minuto a máxima velocidad para conseguir el DNA plasmídico.

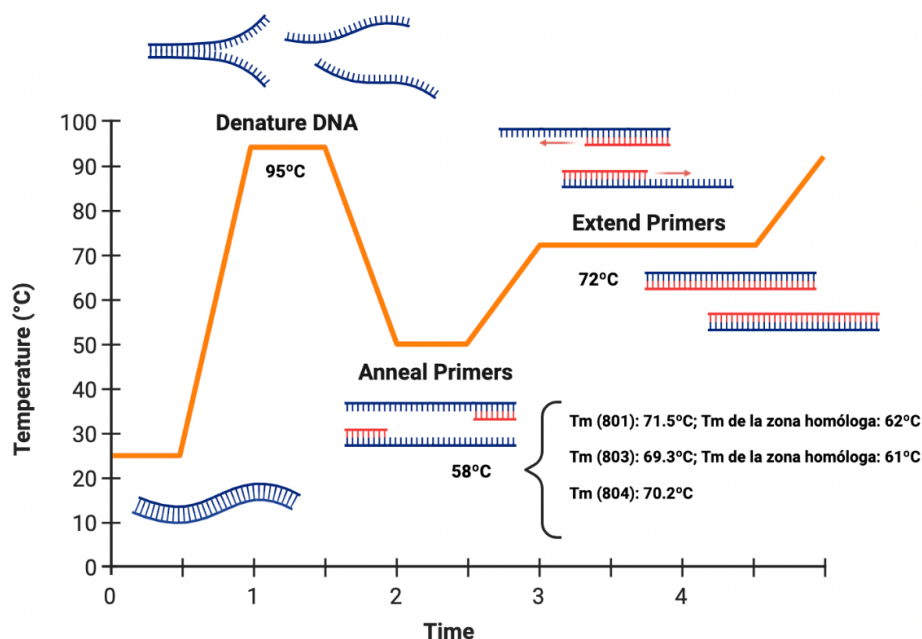
La concentración del DNA plasmídico fue medida con el equipo NanoDrop™ 3000 (Thermo Fisher Scientific) mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia de la muestra a 230, 260 y 280 nm. La absorbancia a 260 es proporcional a la concentración del DNA, considerando un coeficiente de extinción molar para DNA de doble cadena de 50 ( $\mu$ g/mL)<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Las relaciones 260/280 y 260/230 proporcionan además una indicación de la pureza de la preparación.

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

Para el clonaje de los nuevos constructos se amplificó el DNA de interés mediante PCR utilizando las parejas de oligonucleótidos *forward* y *reverse* correspondientes (descritas en la Tabla 1). Para la reacción, seguimos las indicaciones del fabricante de la enzima comercial Pfu ultra II (Agilent) con un protocolo modificado, con el objetivo de maximizar el rendimiento de la amplificación (Wang et al., 2002). Las condiciones de mezcla para cada tubo de PCR fueron las siguientes: Pfu ultra II Master mix 25  $\mu$ L (incluye la enzima polimerasa, tampón y mezcla de los cuatro deoxinucleótidos trifosfato -dNTPs), 1  $\mu$ L del correspondiente cebador a 0,25  $\mu$ M, 1  $\mu$ L (aprox. 20 ng) del DNA plasmídico molde y 22  $\mu$ L de agua para completar un volumen final de 50  $\mu$ L. Se introdujeron los tubos en el termociclador programado con las condiciones especificadas en el protocolo y teniendo en



cuenta las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos utilizados, siguiendo un protocolo estándar de PCR (Figura 4). Cada ciclo de amplificación consta de tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión, que es la síntesis de la nueva cadena por adición de nucleótidos gracias a la Taq polimerasa (DNA polimerasa termoestable).



**Figura 4:** Ilustración de la PCR con las temperaturas programadas en cada fase. En la fase de alineamiento se calculó la  $T^a$  en función de la media de las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) de la zona homóloga de cada oligonucleótido ( $T_m - 5^\circ\text{C}$ ). 801: corresponde a NotI-mSGK1-FLAG.REV; 803: NheI-mSGK11.FOR, oligonucleótido común en ambas amplificaciones; 804: NotI-XFP.REV.

### **Análisis de los productos de PCR o purificación de plásmidos mediante electroforesis**

Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA) y teñidos con el reactivo GelRed. Para comprobar que el tamaño de las bandas era el adecuado se utilizó un marcador de peso molecular (peqGOLD, VWR). Los productos se visualizaron con luz ultravioleta con el sistema de imagen de Kodak Gel Logic 200, que permitió el registro de las imágenes y su almacenamiento digital mediante el uso de una cámara CCD.

## Purificación de los productos de PCR

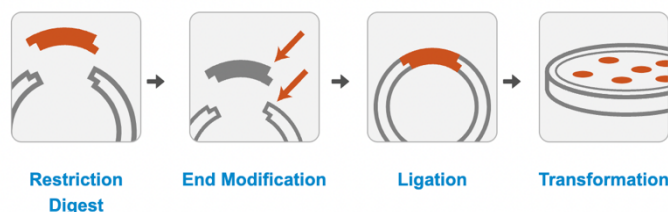
Con objeto de eliminar los dNTPs, cebadores y polimerasa de la reacción de PCR purificamos las muestras obtenidas de la reacción con el kit comercial *PCR clean-up* de NucleoSpin® (Macherey-Nagel).

1. Añadimos a 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra el doble de Buffer NTI y transferimos a una *spin* microcolumna proporcionada por el kit acoplada a un tubo colector (2mL).
2. Centrifugamos 30 segundos a 11.000 xg y desechamos el sobrenadante.
3. Añadimos 700  $\mu\text{L}$  del Buffer NT3 a la columna y volvemos a centrifugar 30 segundos a 11.000 xg. Desechamos el sobrenadante y repetimos el paso para minimizar la cantidad de sales del producto.
4. Centrifugamos 1 minuto a 11.000 xg para limpiar completamente el Buffer NT3 y añadimos 15  $\mu\text{L}$  del Buffer de elución previamente calentado a 70°C. Incubamos 5 minutos y centrifugamos en dos pasos para maximizar la recuperación del DNA según la recomendación del fabricante: primero 1 minuto a 50 x g y luego otro minuto a 11000 x g.

La cuantificación de la purificación se lleva a cabo con el equipo NanoDrop™ 3000 (Thermo Fisher Scientific) mediante espectrofotometría, según describimos anteriormente.

## Digestión de DNA mediante enzimas de restricción

Utilizamos las enzimas de restricción NotI y NheI de *New England Biolabs (NEB)* para digerir los insertos y facilitar su complementariedad con los extremos del vector. Se realizó también la digestión con las mismas endonucleasas de PCUo para obtener un DNA lineal y defosforilamos el vector para evitar su recircularización durante la ligación usando el *kit Quick Dephosphorylation de NEB* que incluye la fosfatasa *Quick CIP (Alkaline Phosphatase Calf Intestinal)*.



**Figura 5:** Ilustración de las fases de clonación para SGK1.1-eCFP y SGK1.1-FLAG. Procedencia de la imagen: <https://nebcloner.neb.com/#/>

-Para la digestión de los productos de PCR y del vector se siguió el protocolo *Restriction Enzyme Digestion de New England Biolabs*: realizamos los cálculos para obtener los  $\mu\text{L}$  correspondientes a  $1\mu\text{g}$  de DNA,  $5\mu\text{l}$  (1X) del Buffer *rCutSmart*,  $1\mu\text{L}$  de NotI-HF y agua hasta alcanzar un volumen final de  $50\mu\text{l}$  e incubamos durante 5–15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Repetimos la reacción de digestión con el protocolo *Restriction Enzyme Digestion de New England Biolabs* pero sustituyendo  $1\mu\text{L}$  de NotI-HF por  $1\mu\text{L}$  de NheI-HF y utilizando  $1\mu\text{g}$  del DNA de la digestión con NotI-HF.

-Para la defosforilación del extremo 5' del vector seguimos las indicaciones del protocolo: realizamos los cálculos para obtener  $1\text{ pmol}$  de DNA con la calculadora de NEB (*NEBioCalculator*®), añadimos  $2\mu\text{l}$  del *rCutSmart*™ Buffer (10X),  $1\mu\text{l}$  de Quick CIP y agua hasta alcanzar un volumen final de  $20\mu\text{l}$ . Incubamos durante 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y a continuación realizamos una inactivación rápida de la reacción calentando durante 5 minutos a  $80^{\circ}\text{C}$ .

### **Purificación de los insertos y PCUo**

Los productos de la digestión enzimática se purificaron con el kit comercial *PCR clean-up* de NucleoSpin® (Macherey-Nagel) según el protocolo descrito en el apartado de *purificación de los productos de PCR* para eliminar los restos de enzimas inactivadas y las sales provenientes de la reacción de digestión que pudieran interferir en el rendimiento de las aplicaciones posteriores. Esto permite una elución de las muestras en volúmenes pequeños de tampón con baja concentración de sales. La cuantificación de la purificación y los valores de concentración DNA/proteínas se llevaron a cabo con el equipo NanoDrop™ 3000 (Thermo Fisher Scientific) mediante espectrofotometría como en fases anteriores.

### **Ligación**

Una vez purificados los insertos y defosforilado el vector PiggyBaC, utilizamos el protocolo *Quick Ligation Protocol (M2200)* de *New England Biolabs* para su ligación y así obtener dos nuevas moléculas recombinantes que comparamos con una muestra control consistente en una reacción con vector defosforilado sin inserto. La proporción molar inserto-vector fue de 3:1. Realizamos los cálculos para obtener las cantidades de vector e inserto necesarias para

las reacciones (50 ng de vector PCuo: 7200 bp; 37,5 ng para los insertos SGK1.1-FLAG: 2300 bp y SGK1.1-CFP: 1600 bp) con *NEBioCalculator*.

1. Preparamos 3 tubos eppendorf, uno para cada inserto y otro para el control. Añadimos a cada tubo 10  $\mu\text{L}$  del *Quick Ligase Reaction Buffer (2X)*; 2,4  $\mu\text{L}$  del vector PCuo; 1,9  $\mu\text{L}$  de DNA del inserto SGK1.1-FLAG en el primer tubo y 2,8  $\mu\text{L}$  de DNA del inserto SGK1.1-CFP en el segundo; añadimos a cada tubo 1  $\mu\text{L}$  de Quick Ligase y finalmente completamos con 4,7  $\mu\text{L}$  de agua en el primer tubo, 3,8  $\mu\text{L}$  en el segundo y 6,6  $\mu\text{L}$  en el tubo control para alcanzar 20  $\mu\text{L}$  de volumen final.
2. Damos un breve pulso de centrifuga para mezclar e incubamos los tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos para desnaturalizar posibles apareamientos. Colocamos en hielo picado.
3. Utilizamos 2  $\mu\text{L}$  de cada ligación para la transformación de bacterias.

### **Transformación de bacterias *E. coli* mediante el procedimiento de choque térmico**

El procedimiento de choque térmico permite la transformación de bacterias *E. coli*, proceso por el que el DNA recombinante previamente generado de forma artificial es captado por las bacterias mediante la creación de poros en su membrana. A continuación, se describe el protocolo de transformación de bacterias *XL10-Gold*® ultracompetentes, obtenidas de un proveedor comercial (Agilent):

1. Colocamos en hielo las células *XL10-Gold*®, previamente conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y tubos *eppendorf* rotulados para cada una de las transformaciones (incluyendo una transformación control). Pre calentamos a  $42^{\circ}\text{C}$  el medio SOC (*Super-optimal broth*: 2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 20 mM glucosa, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgSO}_4$ ).
2. Cuando se descongelaron las bacterias, añadimos 100  $\mu\text{L}$  de células a cada eppendorf y 4  $\mu\text{L}$  del mix  $\beta$ -mercaptoetanol provisto en el kit. Mezclamos suavemente dando unos toques sobre el tubo con los dedos e incubamos en hielo durante diez minutos, mezclando suavemente con toques cada dos minutos aproximadamente.
3. Se añadió a cada tubo 2  $\mu\text{L}$  de la reacción de ligación correspondiente, mezclamos suavemente y se dejó incubar en hielo durante 30 minutos.

4. Aplicamos el choque térmico a 42°C durante 30 segundos exactos y pasamos a hielo durante 2 minutos.
5. Se agregó 900 µL de SOC precalentado previamente a 42°C.
6. Incubamos 1 hora a 37°C en agitación a 200 rpm y conservamos a 4°C para sembrar en placas posteriormente.

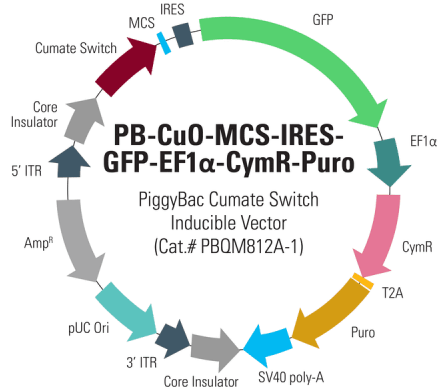
### **Siembra de bacterias y cultivo de colonias aisladas**

Extendimos 100 µL de cada transformación con un asa de siembra de vidrio, que se esterilizó entre siembra y siembra con alcohol quemado por mechero, en placas de medio LB-agar con 100 µg/ml de ampicilina hasta que la superficie quedó seca. Incubamos las tres placas boca abajo durante una noche en estufa a 37°C.

Con la punta de una pipeta seleccionamos y recogimos colonias de bacterias aisladas que crecieron, se resembraron en 2 mL de medio líquido LB-Ampicilina y se cultivaron durante la noche en agitación a 37°C y 250 rpm. La extracción y purificación del DNA se realizó mediante lisis alcalina con el kit *NucleoSpin® Plasmid EasyPure* (Macherey-Nagel) según el protocolo descrito anteriormente en el apartado *Purificación de plásmidos*.

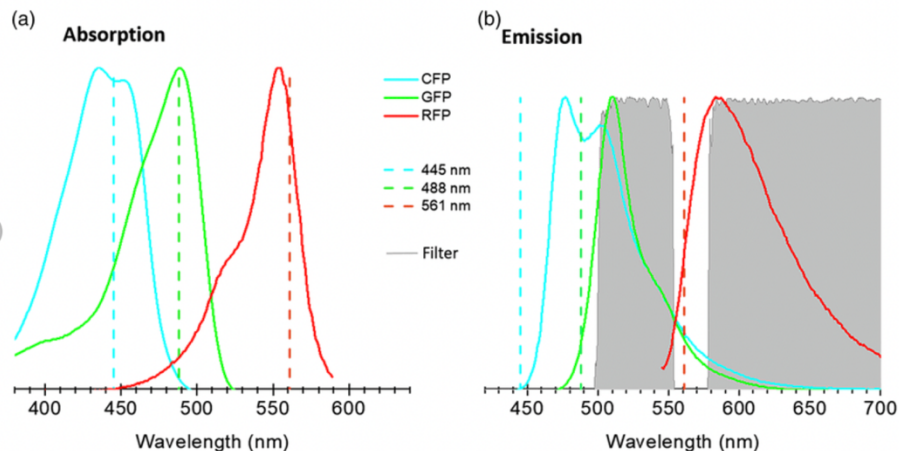
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El primer paso de este trabajo consistió en el diseño de un vector derivado del sistema piggyBac con la secuencia codificante de SGK1.1 bajo el control de un promotor inducible por cumato (Figura 6). Este diseño incluyó la mutación S515D, que hace que la quinasa tenga actividad constitutiva. Además, se fusionó la secuencia codificante de SGK1.1 a la de la proteína fluorescente cyan optimizada (eCFP), de modo que la aparición de fluorescencia pondría de manifiesto la expresión controlada de SGK1.1.



**Figura 6:** PB-Cuo-MCS-IRES-GFP-EF1 $\alpha$ -CymR-Puro Inducible cDNA Cloning and Expression Vector also co-expresses the cumate repressor, CymR, and puromycin resistance (Puro) from the EF1 $\alpha$  promoter. Procedencia: <https://www.systembio.com/pb-cuo-cmv-mcs-ef1a-cymr-puro-inducible-cdna-cloning-and-expression-vector>

Como el vector PB-Cuo-CMV utiliza el promotor inducible por cumato para coexpresar el DNA de interés y otra proteína fluorescente de color verde (*enhanced Green Fluorescent Protein*, eGFP, Figura 6) se planteó la posibilidad del solapamiento de espectros como una limitación para detectar la expresión de SGK1.1 (Figura 7). Para solventarlo, generamos otro constructo aparte con el epítipo FLAG: péptido corto de 8 aminoácidos hidrofílico que, debido a esto y a su pequeño tamaño, reside en la superficie de la proteína de fusión y es detectable con anticuerpos monoclonales específicos y/o anticuerpos secundarios con el fluoroforo de elección, es decir, podríamos emplear una fluorescencia claramente distinguible de la eGFP para la detección de SGK1.1 como podría ser la roja con RFP (Figura 7). Otra alternativa hubiera sido diseñar una proteína de fusión entre SGK1.1 y RFP directamente; sin embargo, el constructo con el epítipo FLAG suponía una herramienta de especial interés para experimentos futuros que creímos conveniente desarrollar.



**Figura 7:** (a) Espectros de absorción de CFP, GFP y RFP, donde se puede observar el solapamiento en el rango de longitud de onda entre 450-500 nm (CFP: Cyan Fluorescence Protein; GFP: Green Fluorescence Protein; RFP: Red Fluorescence Protein). (b) Espectros de emisión de estas tres proteínas fluorescentes, donde también se puede apreciar el considerable solapamiento entre la emisión de CFP y GFP. Procedencia de la imagen: [https://www.researchgate.net/figure/a-Absorption-and-b-emission-spectra-of-CFP-GFP-and-RFP-fluorophores-The-spectra\\_fig1\\_330176227](https://www.researchgate.net/figure/a-Absorption-and-b-emission-spectra-of-CFP-GFP-and-RFP-fluorophores-The-spectra_fig1_330176227)

Con respecto al diseño de los primers, se incorporó en el oligonucleótido *forward* de ambos constructos una cola que incluía la secuencia diana de la enzima de restricción NheI y para los primers *reverse*, se añadió la diana de la enzima de la restricción NotI (Figura 8). El plásmido con el vector peCFP-SGK1.1-S515D, disponible en el laboratorio (Wesch et al., 2010) y que nos sirvió de molde para las reacciones de PCR, se recuperó a partir de bacterias *E. coli* congeladas a -80°C en medio LB + 30% de glicerol, siguiendo el proceso descrito en *purificación del plásmido peCFP-SGK1.1-S515D (Material y Métodos)*. Se obtuvo una concentración medida con el equipo NanoDrop™ 3000 (Thermo Fisher Scientific) de 427,9 ng/μl, con un cociente A260/280 de 1,91 y un cociente 260/230 de 2,15. Se considera que un DNA es de pureza óptima si la relación A260/280 tiene un valor entre 1.8-2.0. Si el cociente fuese menor, podría indicar la presencia de contaminantes de tipo aromáticos como fenoles o proteínas, que tienen aminoácidos de estas características y, por tanto, una fuerte absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. Como segunda medida se utiliza el cociente 260/230 que indica que el DNA es de pureza óptima si tiene un valor entre 2,0-2,2. Un cociente 260/230 menor de 1,8 podría indicar la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm como carbohidratos o sales caotrópicas (Tabla 3). Cuantificamos también con NanoDrop™ 3000 la concentración del vector PB-Cuo y obtuvimos un resultado de 435,3 ng/μl con unos cocientes A260/280 de 1,92 y 260/230 de 2,38, que consideramos adecuados.

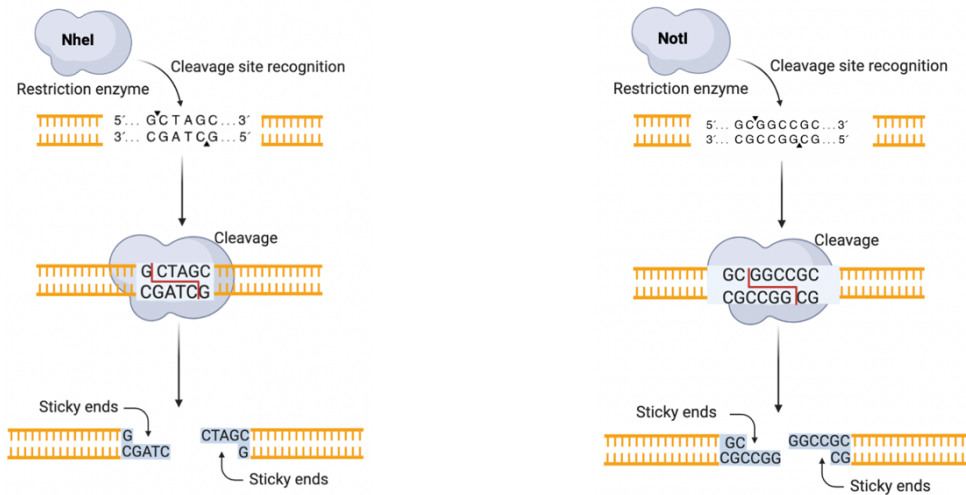
- NheI-mSGK1.1.FOR:

TAAGCAGCTAGCGCCACCATGGatgtaaacaaagacatgaa  
tggattcccg

-NotI-mSGK1-FLAG.REV:

CAGCGGCCGCTCAGATTACAAGGATGACGACGATAAGagaggaagga  
atccacaggagg

-NotI-XFP.REV: TAAGCAGCGGCCGCTTActgtacagctcgtccatgcc



**Figura 8:** Secuencia de cada oligonucleótido con las dianas de las enzimas de restricción en color azul y debajo su mecanismo de acción: NheI hidroliza los enlaces fosfodiéster del DNA entre G y C del extremo 5' y NotI entre C y G, formando extremos cohesivos que luego facilitarían la ligación con el vector piggyBac.

## Amplificación de las secuencias codificantes mediante PCR

Para sintetizar los insertos con las características deseadas, amplificamos de forma simultánea dos muestras de PCR: una para obtener la quinasa SGK1.1 fusionada a eCFP y las dianas de restricción; y otro para conseguir la secuencia codificante de la quinasa con las dianas de restricción, pero fusionada a la secuencia codificante del epítipo FLAG en vez de a eCFP. Ambas amplificaciones se generaron utilizando como molde el vector *peCFP-SGK1.1-S515D*.

Calculamos la temperatura de apareamiento de los cebadores a partir de la media aritmética de las temperaturas de fusión de cada uno y restando al resultado 5°C. Tras 30 ciclos conseguimos sintetizar un número detectable de copias de los nuevos insertos, según constatamos mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (Figura 9).

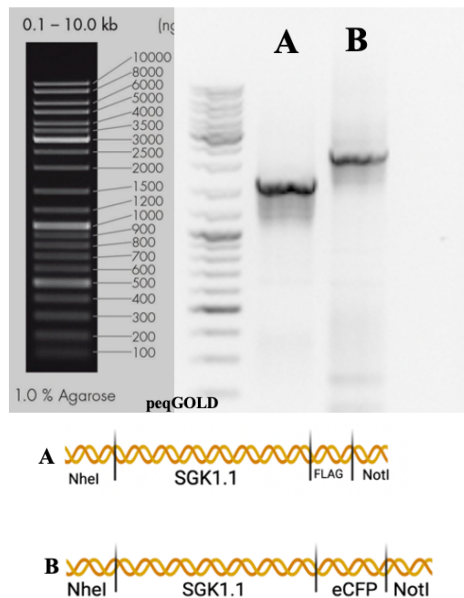


La utilización del marcador de peso molecular peqGOLD (fragmentos de DNA de tamaño conocido) nos permitió verificar que las bandas de cada muestra correspondían a los pesos estimados por constructo:

-SGK1.1-FLAG: 1578 *base pair* (bp) de la secuencia codificante más 24 bp del epítipo, aprox. 1600 bp.

-SGK1.1-CFP: 2300 bp

Los productos amplificados en el carril A correspondientes al fragmento SGK1.1-FLAG muestran una banda más intensa entre 1500-2000 pb y los del carril B una banda entre 2000-2500 pb. Estos resultados nos permitieron seleccionar las muestras amplificadas para el clonaje, ya que concordaban con lo esperado.



**Figura 9:** Análisis de los productos de amplificación por PCR con electroforesis en gel de agarosa 1.0%. Carril A: constructo formado por SGK1.1-FLAG; Carril B: constructo formado por SGK1.1-eCFP. Carril 1: marcador de peso molecular peqGOLD con una guía del tamaño de las bandas en pares de bases a su izquierda. En la parte inferior se muestran de forma esquemática cada segmento analizado. Visualización del gel con luz ultravioleta con el sistema de imagen de Kodak Gel Logic 200.

Purificamos las muestras amplificadas con el kit comercial *PCR clean-up* de NucleoSpin® (Macherey-Nagel) según los pasos descritos en el apartado *Purificación de los productos de PCR (Material y Métodos)* y posteriormente cuantificamos la concentración de las purificaciones con el equipo NanoDrop™ 3000, obteniendo para el inserto SGK1.1-FLAG un resultado de 434,2 ng/μl con unos cocientes A260/280 de 1,81 y 260/230 de 1,55; y para el inserto SGK1.1-CFP una concentración de 359,9 ng/μl con unos cocientes A260/280 de 1,83 y 260/230 de 1,94. Ambas muestras de DNA cumplían con los rangos

óptimos de pureza para el cociente 260/280 (Tabla 3). La muestra con SGK1.1-FLAG podría estar contaminada con carbohidratos o sales caotrópicas por presentar un cociente 260/230 <1,8; sin embargo, como el ratio era >1,5 consideramos que la impureza de la muestra no era lo suficientemente relevante como para comprometer su funcionalidad. Conservamos, por tanto, ambos tubos de PCR a -20°C para su posterior digestión.

Análisis	Parámetros	Criterios de validez
A260/280	≥1,8-2,1	Pureza óptima
	≥1,6-1,7	Pureza aceptable
	<1,6	DNA con contaminantes aromáticos
A260/230	>2-2,2	Pureza óptima
	>1,8	Pureza aceptable
	<1,8	DNA contaminado con carbohidratos o sales caotrópicas

**Tabla 3:** Análisis de la pureza de las muestras de DNA mediante espectrofotometría según la relación de absorbancias.

### Digestión de los insertos purificados y del vector PCUo

Utilizamos las enzimas de restricción NotI-HF y NheI-HF (NEB) para preparar los vectores e insertos para la ligación. Cada enzima reconoce en el fragmento su diana de restricción amplificada mediante PCR y corta las dos cadenas del DNA produciendo extremos cohesivos que favorecen su posterior unión con el vector por complementariedad de bases (Figura 8). Para la linealización del plásmido piggyBac empleamos las mismas enzimas de restricción que cortan en sus sitios de reconocimiento específico en el MCS (Figura 3). Cuando la enzima corta el vector plasmídico, genera una molécula lineal que permite la inserción de las secuencias codificantes sin interrumpir ninguna función esencial del plásmido. En el diseño previo de los constructos se tuvo en cuenta deliberadamente la elección de estas enzimas de restricción por cortar con este patrón específico de extremos cohesivos ya que la ligación es más eficiente que la realizada con fragmentos romos. Podría ocurrir que en la reacción de ligación el plásmido PCUo recircularice, es decir, obtendríamos un transformante sin inserto. Para disminuir este problema y aumentar la eficiencia de la clonación, desfosforilamos el plásmido siguiendo el protocolo descrito en el apartado *Digestión de DNA mediante enzimas de restricción (Material y Métodos)* con la fosfatasa *Quick CIP*. Otras estrategias que utilizamos para aumentar la eficiencia de la ligación, aparte de desfosforilar el vector, fueron el uso de un tampón de ligación que

contuviera polietilenglicol como el *Quick Ligase Reaction Buffer (2X)* de *NEB* (15% de polietilenglicol) o aumentar las concentraciones de T4 DNA ligasa y de inserto para incrementar su interacción con el vector. Tras obtener los insertos y el vector digeridos y purificados según describimos en el apartado *Purificación de los insertos y PCUo (Material y Métodos)*, determinamos su concentración con NanoDrop™ 3000 en un volumen de 1 µL (Tabla 4). Para disminuir el ruido de fondo en el detector de NanoDrop™ 3000 utilizamos como blanco el *buffer* de elución con el que purificamos el DNA de las muestras.

Muestra	Concentración DNA
SGK1.1-CFP	17,2 ng/µl
SGK1.1-FLAG	17,4 ng/µl
PCUo	20,6 ng/µl

**Tabla 4:** Análisis con el sistema NanoDrop™ 3000 (Thermo Fisher Scientific) de los fragmentos de DNA y del vector PCUo digeridos y purificados.

## Ligación

La enzima *Quick Ligase* del kit comercial *Quick Ligation M2200*) de *New England Biolabs* fusiona los extremos compatibles del plásmido y del inserto purificados y, a continuación, regenera el grupo fosfato del extremo 5' del vector defosforilado. Los cálculos para transformar el peso de vector e inserto a molaridad para cumplir la proporción molar indicada en el protocolo *Quick Ligation Protocol M2200* (inserto-vector 3:1; inserto: 0.060 pmol y vector: 0.020 pmol) los realizamos con la calculadora *NEBioCalculator®* que nos permitió obtener resultados de manera precisa y rápida. Si bien podríamos haber probado ligaciones con diferentes relaciones molares, los mejores resultados se obtienen cuando la proporción de inserto es superior con respecto al vector.

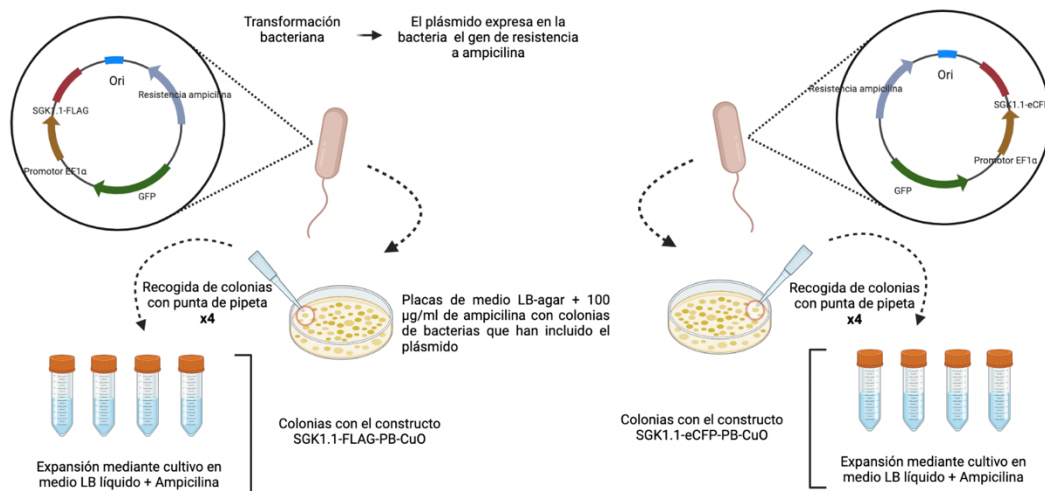
## Transformación y selección de bacterias con el gen incorporado al vector PiggyBac

Para la transformación primero debemos inducir en las bacterias un estado de competencia para que el DNA pueda entrar y ser procesado. Está descrito que el cloruro cálcico facilita la adsorción del DNA sobre la superficie celular y el shock térmico desestabiliza la membrana de la bacteria, de manera que se favorece la entrada del DNA a través de los poros formados temporalmente. En nuestro caso, empleamos células congeladas ya competentes que descongelamos lentamente en hielo. Tras la transformación de las

bacterias por el procedimiento descrito en el apartado *Transformación de bacterias E. coli mediante el procedimiento de choque térmico (Material y Métodos)* obtenemos nuestras dos moléculas recombinantes que pueden perpetuarse de manera indefinida para futuros experimentos y una muestra con el control negativo del vector defosforilado sin inserto que usamos para evaluar la eficiencia del clonaje.

El vector Piggy Bac tiene dos *cassettes génicos* de resistencia a antibióticos: uno a ampicilina para selección de bacterias y otro a puromicina para selección de células de mamíferos (Figura 6). Por tanto, para seleccionar aquellos transformantes que han incorporado el vector recircularizado portador del gen de resistencia, sembramos 100  $\mu$ L de cada transformación en placas de medio LB-agar con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina como se describe en el apartado *Siembra de bacterias y cultivo de colonias aisladas (Material y Métodos)*. Al no estar recircularizado el plásmido de la muestra control, no transcribe el gen de resistencia a ampicilina y no produce colonias en la placa con dicho antibiótico.

Cada bacteria viable que ha incorporado el plásmido origina una colonia sobre el medio tras la incubación en condiciones adecuadas. Seleccionamos 4 colonias al azar de cada placa para expandirlas mediante cultivo en 2 ml (*miniprep*) de medio LB líquido suplementado con ampicilina (Figura 10).



**Figura 10:** Esquematización de la transformación y selección de bacterias con el gen incorporado al vector PiggyBac.

El cultivo en medio líquido de las colonias seleccionadas nos permite obtener grandes cantidades de bacterias idénticas que contienen nuestro plásmido de interés en su interior. Para extraer el DNA de las bacterias, purificamos mediante lisis alcalina con el kit comercial *NucleoSpin® Plasmid EasyPure* (Macherey-Nagel) como se describe en el apartado de *Purificación de plásmidos (Material y Métodos)*.

## CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Si confirmamos que las colonias contienen el plásmido con el gen de interés bien insertado, podremos reservar las *minipreps* congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y usarlas posteriormente para producir a mayor escala el plásmido construido, lo que a su vez permitirá comenzar el desarrollo de las líneas celulares que eran el objetivo final de este proyecto. También podríamos utilizar el DNA plasmídico como molde para el clonaje de otros plásmidos.

Como plan inmediato de este proyecto se prevé analizar el DNA plasmídico de cada colonia para comprobar si coincide con el constructo que diseñamos. Los pasos teóricos para seguir son: 1) digestión de los plásmidos purificados con una de las enzimas de restricción (Not I o NheI), gel de electroforesis para comprobar que el tamaño de los constructos sea el esperado; 2) secuenciación del DNA. Si las secuencias son adecuadas, podríamos ya en esta fase comenzar los ensayos celulares en los cuales se inducirá mediante tratamiento con cumato la expresión del gen, es decir, producir mRNA que se traduce en las proteínas de fusión SGK1.1-eCFP y SGK1.1-FLAG. En el caso de la construcción SGK1.1-eCFP, y dado que eCFP tiene la capacidad de emitir luz azul, podemos excitar la proteína con láser (detección óptima a 485 nm) y utilizar su actividad fluorescente como un marcador biológico versátil para la monitorización de la expresión de la quinasa. Una vez comprobada la expresión de la misma, el siguiente paso sería generar una línea celular estable. Para ello se co-transfectaría en las células de interés el plásmido piggyBac con SGK1.1-eCFP o SGK1.1-FLAG junto con el plásmido de expresión de la enzima transposasa, que catalizará la inserción de nuestro plásmido de interés en el genoma. Las células con inserción de los plásmidos se seleccionarían mediante tratamiento con puromicina, ya que aquellas células que han integrado el vector PiggyBac poseen el gen de resistencia a este antibiótico en su genoma.

Las aplicaciones de este modelo de expresión inducible en cultivo celular son amplias, si bien el principal interés en esta línea de investigación sería la posibilidad de realizar experimentos de fosfoproteómica para identificar de forma eficiente nuevas dianas de fosforilación de SGK1.1, que a su vez pueden permitir profundizar en el estudio de la regulación de los canales Kv7 y de la excitabilidad neuronal en condiciones normales y patológicas.

## **QUÉ HE APRENDIDO CON ESTE TFG**

Sumergirse en el campo de la clonación molecular ha sido una experiencia única. Participar en este proyecto tan ambicioso para esclarecer la función de la proteína SGK1.1 y las repercusiones terapéuticas que podría conllevar en la epilepsia me ha enseñado la importancia del trabajo que realizan cada uno de los integrantes de este laboratorio. Curar empieza por entender el funcionamiento del organismo, conocimiento que adquirimos los médicos gracias al esfuerzo incansable de investigadores que dedican con afán su tiempo a buscar respuestas.

Las posibilidades de la ingeniería genética en el campo de la medicina son incontables. Mediante la aplicación de vectores de clonación y enzimología del DNA recombinante somos capaces de cortar, modificar y unir los genes según más nos convenga para producir una proteína recombinante con las características de interés. Esto nos permite investigar la función de los genes, analizar sus vías moleculares y entender la fisiopatología de la enfermedad: los principio para el desarrollo médico.

Es un mundo apasionante, lleno de preguntas para aquellos empeñados en descubrir la verdad.

## BIBLIOGRAFÍA

Armas-Capote N, Maglio LE, Pérez-Atencio L, Martin-Batista E, Reboreda A, Barios JA, Hernandez G, Alvarez de la Rosa D, Lamas JA, Barrio LC, Giraldez T. SGK1.1 Reduces Kainic Acid-Induced Seizure Severity and Leads to Rapid Termination of Seizures. *Cereb Cortex*. 2020. 30(5):3184-3197. doi: 10.1093/cercor/bhz302.

Brown, D. A., & Adams, P. R. Musacrinic suppression of a novel voltage-sensitive K<sup>+</sup> current in a vertebrate neuron. *J Chem Inf Model*. 1980. 283, 673–676.

Chen Q, Luo W, Veach RA, Hickman AB, Wilson MH, Dyda F. Structural basis of seamless excision and specific targeting by piggyBac transposase. *Nat Commun*. 2020. 11(1):3446. doi: 10.1038/s41467-020-17128-1.

Clark, S., Antell, A., and Kaufman, K. New antiepileptic medication linked to blue discoloration of the skin and eyes. *Ther. Adv. Drug Saf*. 2015. 6; 15–19. doi: 10.1177/2042098614560736

González Fernández R. Identificación de genes regulados por SGK1.1. [Internet]. España: Servicio de publicaciones de la ULL; 2012/13. Disponible en: <https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/104>

Martin-Batista E, Maglio LE, Armas-Capote N, Hernández G, Alvarez de la Rosa D, Giraldez T. SGK1.1 limits brain damage after status epilepticus through M current-dependent and independent mechanisms. *Neurobiol Dis*. 2021. 153:105317. doi: 10.1016/j.nbd.2021.105317.

Martin-Batista E, Manville RW, Rivero-Pérez B, Bartolomé-Martín D, Alvarez de la Rosa D, Abbott GW, Giraldez T. Activation of SGK1.1 Upregulates the M-current in the Presence of Epilepsy Mutations. *Front Mol Neurosci*. 2021. 26;14:798261. doi: 10.3389/fnmol.2021.798261.

Miranda P, Cadaveira-Mosquera A, González-Montelongo R, Villarroel A, González-Hernández T, Lamas JA, Alvarez de la Rosa D, Giraldez T. The neuronal serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1.1 reduces neuronal excitability and protects against seizures through upregulation of the M-current. *J Neurosci*. 2013; 33(6):2684-96. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3442-12.2013.

Mullick A, Xu Y, Warren R, Koutroumanis M, Guilbault C, Broussau S, Malenfant F, Bourget L, Lamoureux L, Lo R, Caron AW, Pilotte A, Massie B. The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol*. 2006. 6:43. doi: 10.1186/1472-6750-6-43.

Oyler J., Maljevic S., Scheffer I. E., Berkovic S. F., Petrou S., Reid C. A. Ion channels in genetic epilepsy: From genes and mechanisms to disease-targeted therapies. *Pharmacol. Rev*. 2018. 70 142–173. 10.1124/pr.117.014456

Serrano-Rivero, Yunier, Fando-Calzada, Rafael, Hernández-García, Armando, Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* [Internet]. 2013;44(2): Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181227534009>

Spoto G, Saia MC, Amore G, Gitto E, Loddo G, Mainieri G, Nicotera AG, Di Rosa G. Neonatal Seizures: An Overview of Genetic Causes and Treatment Options. *Brain Sci.* 2021. 11(10):1295. doi: 10.3390/brainsci11101295.

Surur, A. S., Bock, C., Beirow, K., Wurm, K., Schulig, L., Kindermann, M. K., et al. Flupirtine and retigabine as templates for ligand-based drug design of K V 7.2/3 activators. *Org. Biomol. Chem.* 2019. 17, 4512–4522. doi: 10.1039/c9ob00511k

Wang H. S., Pan Z., Shi W., Brown B. S., Wymore R. S., Cohen I. S., et al. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science.* 1998. 282 1890–1893. doi: 10.1126/science.282.5395.1890

Wang W, Malcolm BA. Two-stage polymerase chain reaction protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions, and insertions, using QuikChange site-directed mutagenesis. *Methods Mol Biol.* 2002. 182:37-43. doi: 10.1385/1-59259-194-9:037.

Wesch D, Miranda P, Afonso-Oramas D, Althaus M, Castro-Hernández J, Dominguez J, Morty RE, Clauss W, González-Hernández T, Alvarez de la Rosa D, Giraldez T. The neuronal-specific SGK1.1 kinase regulates  $\delta$ -epithelial Na<sup>+</sup> channel independently of PY motifs and couples it to phospholipase C signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010. 299(4):C779-90. doi: 10.1152/ajpcell.00184.2010.

Wickenden, A. D., Roeloffs, R., McNaughton-Smith, G., and Rigdon, G. C. KCNQ potassium channels: Drug targets for the treatment of epilepsy and pain. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2004. 14, 457–469. doi: 10.1517/13543776.14.4.457

Zhang F, Liu Y, Tang F, Liang B, Chen H, Zhang H, Wang K. Electrophysiological and pharmacological characterization of a novel and potent neuronal Kv7 channel opener SCR2682 for antiepilepsy. *FASEB J.* 2019. 33(8):9154-9166. doi: 10.1096/fj.201802848RR.