

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GENERACIÓN DE LÍNEAS DE RATÓN

TRANSGÉNICO POR ABLACIÓN DEL

GEN KCNMA1



EMMA GARCÍA LÓPEZ

TUTORA: Dra. TERESA GIRÁLDEZ FERNÁNDEZ

COTUTORA: ANDREA REYES CARRIÓN

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS BÁSICAS, ÁREA DE FISIOLÓGÍA

CURSO ACADÉMICO 2022-2023

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	3
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
PALABRAS CLAVES	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Epilepsia y canales iónicos	7
1.1.1. Canal BK	7
1.2. Acoplamiento entre canal BK y receptor NMDA	9
1.3. Sistema Cre-loxP	10
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	14
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIAL Y MÉTODOS	15
4.1. Animales de experimentación	15
4.1.1. Cepas de ratón utilizadas	16
4.2. Generación de un ratón KO por el sistema Cre-loxP	18
4.3. Genotipado de los ratones obtenidos	19
4.4. Secuenciación	23
4.5. Electrofisiología	24
4.6. Microscopía de Fluorescencia	27
5. RESULTADOS	27
5.1. Establecimiento de los cruzamientos de líneas de ratón	27
5.2. tdTomato está presente en los ratones Cre ⁺ ;Tomato ^{fl/fl} obtenidos en la F3	27
5.3. La inversión del exón 2 ocurre en los ratones Cre ⁺ ;Tomato ^{fl/fl}	29
5.4. El canal BK no está presente en las neuronas piramidales de los ratones Cre ⁺ ;Tomato ^{fl/fl}	30
5.5. La proteína tdTomato se expresa en las neuronas piramidales de los ratones Cre ⁺ ;Tomato ^{fl/fl}	32
6. DISCUSIÓN	34
7. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	35
8. QUÉ HE APRENDIDO CON ESTE TFG	36
BIBLIOGRAFÍA	37

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Representación del canal BK.	8
Figura 2. Acoplamiento entre NMDAR-BK en la BC-L5PNs.	10
Figura 3. Resultados de la recombinación mediante el sistema Cre-loxP.	11
Figura 4. Generación de un ratón knockout condicional.	12
Figura 5. Estrategia de cruce para la obtención de un ratón knockout condicional evitando la recombinación germinal.	13
Figura 6. Esquema de la disposición de la Cre-Recombinasa en la cepa de ratón B6.Cg-Tg(Camk2a-Cre)T29-1Srl/J.	17
Figura 7. Esquema de la disposición del gen reportero 2A-tdTomato-pA en la cepa B6.Cg-Kcnma1tm1.1Alme/J.	18
Figura 8. Generación de ratón KO condicional de Kcnma1 cortical e hipocampal.	19
Figura 9. Etapas de la PCR.	20
Figura 10. Esquema representativo del genotipado de un ratón.	23
Figura 11. Obtención de rodajas de cerebro.	25
Figura 12. Configuración de célula entera (whole-cell) de la técnica patch-clamp.	26
Figura 13. Estudio de la presencia de tdTomato en los ratones Cre ⁺ ;Tomato ^{fl/fl} .	28
Figura 14. Estudio de la presencia del gen de la Cre-Recombinasa en los ratones Cre ⁺ ;Tomato ^{fl/fl} .	29
Figura 15. Posición del fragmento de ADN de interés en los ratones Cre ⁺ ;Tomato ^{fl/fl} .	30
Figura 16. Corrientes obtenidas en fijación de voltaje en neuronas de la BC-L5 y de la CA1 de hipocampo para estudiar la presencia de canales BK.	31
Figura 17. Presencia de la proteína tdTomato en la BC-L5 y en la CA-1 de hipocampo en rodajas de cerebro de los ratones Cre ⁺ ;Tomato ^{fl/fl} .	32
Tabla 1. Etapas del protocolo de PCR.	22

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

SNC: Sistema Nervioso Central

BK: canal de potasio de alta conductancia regulado por calcio y voltaje

Kcnmal: gen que codifica el canal BK

OMS: Organización Mundial de la Salud

TFG: Trabajo de Fin de Grado

NMDAR: receptores *N-methyl-D-aspartate*

Cre-loxP: sistema de recombinación genética

ADN: ácido desoxirribonucleico

KO: *knockout*

B5-L5PNs: neuronas piramidales de la capa 5 de la corteza de barril

Cre: enzima Cre-Recombinasa utilizada en el Sistema Cre-loxP

FDA: *Food and Drug Administration*

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

CA1: región del hipocampo compuesta por neurona piramidales

WT: *wild type*

RESUMEN

En el Sistema Nervioso Central (SNC), el canal de potasio de alta conductancia regulado por calcio y voltaje (BK) se expresa en diversos tipos celulares y contribuye a diversas funciones neuronales. La importancia fisiopatológica de este canal se ha hecho patente especialmente en los últimos años, en los que se han identificado mutaciones en el gen *Kcnmal* (que codifica BK) asociadas a diferentes síndromes epilépticos. Dado que la epilepsia es una de las enfermedades neurológicas con mayor prevalencia en el mundo, la generación de herramientas que contribuyan al estudio de su patogénesis es muy relevante. En este proyecto, se generó una línea de ratón transgénico donde la expresión del canal BK se encuentra significativamente reducida en determinadas regiones cerebrales de interés, incluyendo la corteza de barriles en el cortex somatosensorial, así como en el hipocampo. La reducción de los niveles de expresión génica de dicho canal se comprobó mediante diferentes técnicas experimentales, incluyendo biología molecular, electrofisiología y microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos permiten concluir que la línea de ratón transgénico obtenida es viable y la expresión del canal BK se encuentra reducida significativamente en las regiones indicadas. Este modelo animal supone una aportación importante para el estudio de mecanismos de función y regulación de procesos neuronales relacionados con BK, incluyendo neurosecreción y transmisión sináptica.

ABSTRACT

In the Central Nervous System, large conductance voltage- and calcium-gated potassium channels (BK) are widely expressed and contribute to various neuronal functions. The pathophysiological relevance of BK is evidenced by the identification in recent years of several genetic mutations of the gene *Kcnmal* (expressing BK) related to different epileptic syndromes. Since epilepsy is one of the most prevalent neurological disorders in the world, the generation of tools that allow to decipher its pathogenesis is of special relevance. In this project, a transgenic mouse line was generated where the expression of the BK channel is significantly reduced in the somatosensory barrel cortex and hippocampus. The loss of expression of this channel was confirmed using different experimental techniques, including molecular biology, electrophysiology and fluorescence microscopy. Our results lead to the conclusion that the obtained transgenic mouse line is viable and that BK is significantly absent in neurons from the above mentioned regions. This animal model constitutes a relevant contribution to study mechanisms of function and regulation of BK related to neuronal function, including neurosecretion and synaptic transmission.

PALABRAS CLAVES

Epilepsia, canal BK, *Kcnma1*, NMDAR, Sistema LoxP.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Epilepsia y canales iónicos

La epilepsia es la enfermedad neurológica más prevalente en el mundo según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Su prevalencia oscila entre 4-12 personas por cada 1.000 habitantes y posee una incidencia aproximada de 50 por cada 100.000 habitantes al año en todo el mundo. Esta enfermedad se caracteriza por crisis de convulsiones recurrentes no provocadas e impredecibles, producidas por una descarga paroxística anormal, excesiva y sincronizada de una determinada población neuronal. Conforme a la distribución de las descargas, esta actividad anormal del sistema nervioso central (SNC) se manifiesta de diferentes formas, desde convulsiones hasta fenómenos de desconexión del medio (1,2).

La patogénesis de esta enfermedad es diversa dada la cantidad de factores implicados en el control de la excitabilidad neuronal. Sin embargo, la identificación de las mutaciones genéticas asociadas a diferentes síndromes epilépticos primarios ha aportado importantes avances en la investigación sobre esta. 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 de calcio, sodio y potasio constituye uno de los múltiples mecanismos fisiopatológicos que originan diversos síndromes epilépticos primarios (2,3).

El laboratorio de la Dra. Teresa Giraldez, lugar donde se ha llevado a cabo el presente TFG, centra su investigación en el estudio de los canales iónicos. Estos canales son proteínas situadas en la membrana de la célula que permiten el paso de iones a través de la membrana celular. Entre las diversas funciones desempeñadas por los canales iónicos se encuentra el control del potencial eléctrico de la membrana plasmática, y, por tanto, de la excitabilidad celular. Una de las líneas de trabajo que se desarrollan en su laboratorio es el estudio de canales iones de potasio (K^+) relacionados con el desarrollo de epilepsia (4-7).

1.1.1. Canal BK

Los canales de K^+ de gran conductancia activados por voltaje y Ca^{2+} (BK) se expresan en varios tejidos y contribuyen a una gran cantidad de funciones fisiológicas, como la excitabilidad neuronal. Se encuentran ampliamente expresados en el SNC y se activan por la despolarización de membrana y por aumentos relativamente altos en los niveles intracelulares de Ca^{2+} (en el rango micromolar), por lo que están a menudo restringidos a la proximidad inmediata de una

fuente de Ca^{2+} (8). Por lo tanto, un mal funcionamiento de los canales BK puede conducir al desarrollo de diferentes patologías dependiendo del tejido afectado, destacando la epilepsia entre ellas (9).

El canal BK se expresa en la membrana plasmática y actúa como un homotetrámero de subunidades alfa (α), subunidad formadora de poro que conforma la unidad funcional y está codificada por el gen *Kcnma1*, ubicado en el cromosoma 10q22.3. Los canales BK pueden estar compuestos por 4 subunidades α solas o presentarse con subunidades auxiliares o moduladoras, de las que se conocen varias familias como: β (β 1-4) y γ (γ 1-4) (10) (Figura 1).

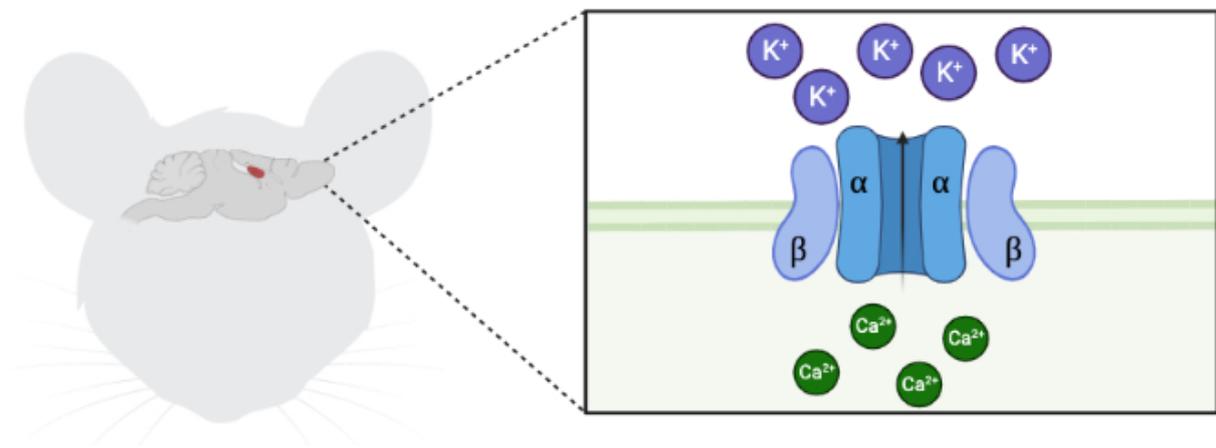


Figura 1. Representación del canal BK. Esquema de un cerebro de ratón, resaltando en rojo el hipocampo, y el canal BK formado por la subunidad α formadora de poro, junto con dos subunidades auxiliares β . Cuando el canal BK se activa por la despolarización y la unión de Ca^{2+} intracelular los iones de K^+ se desplazan hacia el exterior celular.

Las investigaciones en modelos animales, más accesibles para el estudio celular y de tejidos, han proporcionado una información más completa sobre la amplia fisiología y fisiopatología asociada al papel de los canales BK. Los mecanismos por los que las mutaciones de *Kcnma1* alteran la actividad del canal BK causando síntomas en el paciente siguen siendo una incógnita. Se conoce que, en el SNC, los canales BK juegan un papel importante en la excitabilidad neuronal, facilitando el flujo de K^+ hacia el exterior celular tras la despolarización de la membrana durante el potencial de acción, regulando la excitabilidad y la liberación del neurotransmisor (10).

En la mayoría de los contextos neuronales donde se expresan estos canales, la activación de la corriente BK reduce las tasas de activación neuronal o la liberación de transmisores presinápticos. Esto sugiere que un malfuncionamiento de la actividad de los canales BK produciría hiperexcitabilidad como la asociada al desarrollo de convulsiones (11).

1.2. Acoplamiento entre canal BK y receptor NMDA

La activación de los canales BK se produce mediante una despolarización de la membrana celular en sinergia con la unión de Ca^{2+} a la región intracelular del canal. Una de las fuentes de Ca^{2+} propuestas para dicha activación son los receptores *N-methyl-D-aspartate* (NMDAR). Estos receptores son canales iónicos heterotetraméricos regulados por ligando que se activan mediante la unión simultánea de un agonista (glutamato) y un co-agonista (glicina o D-serina) (12).

El acoplamiento NMDAR-BK es funcional en las células granulares del bulbo olfativo de rata (13), en el giro dentado (14) y en las neuronas piramidales de la capa 5 de la corteza del barril (BC-L5PNs) (15), pero solo en el lado postsináptico, donde BK se asocia fundamentalmente a NMDAR. En estas neuronas, el flujo de Ca^{2+} a través de NMDAR produce la apertura de canales BK en áreas somáticas y perisomáticas que dan como resultado la repolarización de la membrana plasmática circundante y la terminación de la entrada de Ca^{2+} a través del NMDAR. Por lo tanto, la activación de los canales BK da como resultado un mecanismo de retroalimentación negativa para modular la excitabilidad neuronal al terminar el estímulo excitatorio mediado por NMDAR (13-16). Sin embargo, la base molecular subyacente para el acoplamiento BK-NMDAR y la presencia y función del acoplamiento NMDAR-BK en otras regiones del cerebro, neuronas y ubicaciones subcelulares siguen siendo desconocidas. Es importante comprender la naturaleza molecular de los complejos NMDAR-BK y su papel fisiológico en el cerebro para comprender su relevancia en la fisiopatología de la epilepsia (Figura 2). A este respecto, la generación de modelos animales que presenten variaciones en dicho sistema de acoplamiento, como por ejemplo una expresión reducida de BK como el que nos planteamos en este trabajo, permitiría evaluar el papel de dichos complejos en los procesos fisiopatológicos en los que se encuentran implicados.

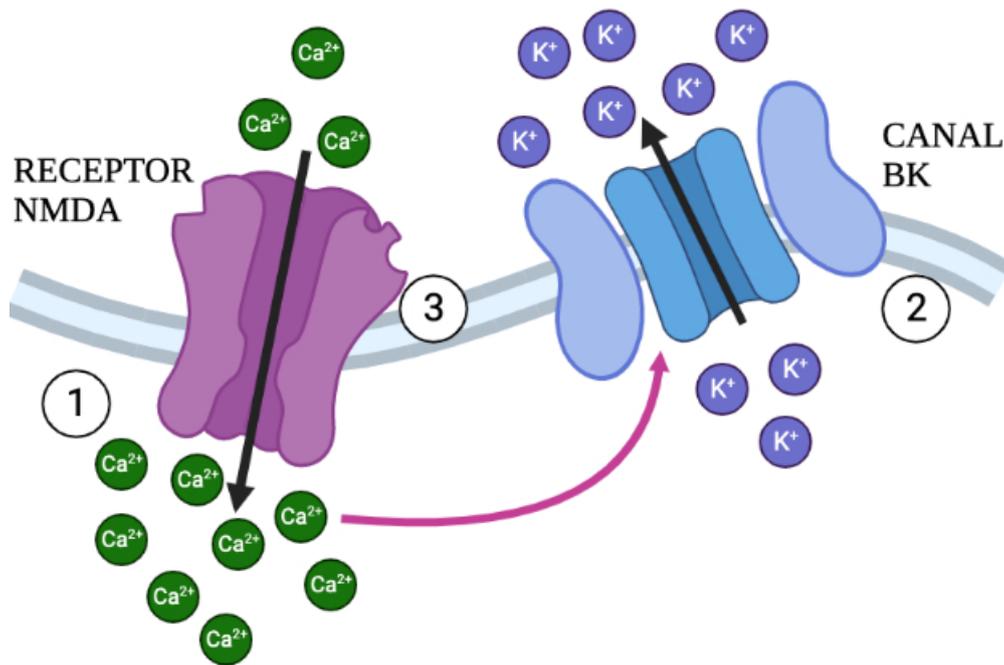


Figura 2. Acoplamiento entre NMDAR-BK en la BC-L5PNs. (1) Activación y apertura de los NMDARs por la despolarización de la membrana celular, más la unión de glutamato y glicina. Esto produce una entrada masiva de Ca^{2+} al interior celular. (2) Activación de los canales BK por unión de Ca^{2+} que entra por NMDAR y por la despolarización celular. (3) Flujo de salida de K^{+} por BK que genera una hiperpolarización de la membrana y la reinstauración del bloqueo por Mg^{2+} de los NMDARs, produciendo así el cierre de los NMDARs y la parada de la entrada de Ca^{2+} . (Modificada de Gómez et al, 2021).

1.3. Sistema Cre-loxP

El sistema Cre-loxP es una poderosa tecnología derivada del bacteriófago P1 ampliamente utilizada para la edición de genes de mamíferos, ya que es muy simple y no requiere factores adicionales para una recombinación eficiente. El sistema se compone de dos elementos: el primero es la enzima Cre-Recombinasa, la cual reconoce el segundo elemento, las secuencias específicas denominadas sitios loxP, que consisten en secuencias de 34 pb. La enzima Cre-Recombinasa genera rupturas de ADN de doble cadena en secuencias específicas y liga las cadenas nuevamente (17). La orientación y ubicación de los sitios loxP determina como se reorganizará el material genético tras el proceso. Por ejemplo, en algunos casos la enzima puede mediar la eliminación del fragmento de ADN que se encuentra entre los dos sitios o, si los sitios loxP se encuentran invertidos, esto resulta en un giro del fragmento de ADN (18,19). El siguiente esquema que se muestra en la Figura 3 representa los tres tipos de reordenamientos que pueden producirse: inversión, eliminación y translocación (20).

- Inversión, como la que se da en este trabajo: si los sitios loxP están en la misma hebra de ADN y tienen orientaciones opuestas, la recombinación da como resultado una inversión y la región de ADN entre los sitios loxP se invierte.

- Delección: si los sitios están orientados en la misma dirección, la secuencia entre los sitios loxP se escinde como una pieza circular de ADN (y no se mantiene).
- Translocación: si los sitios están en moléculas de ADN separadas, se genera un evento de translocación en los sitios loxP (21).

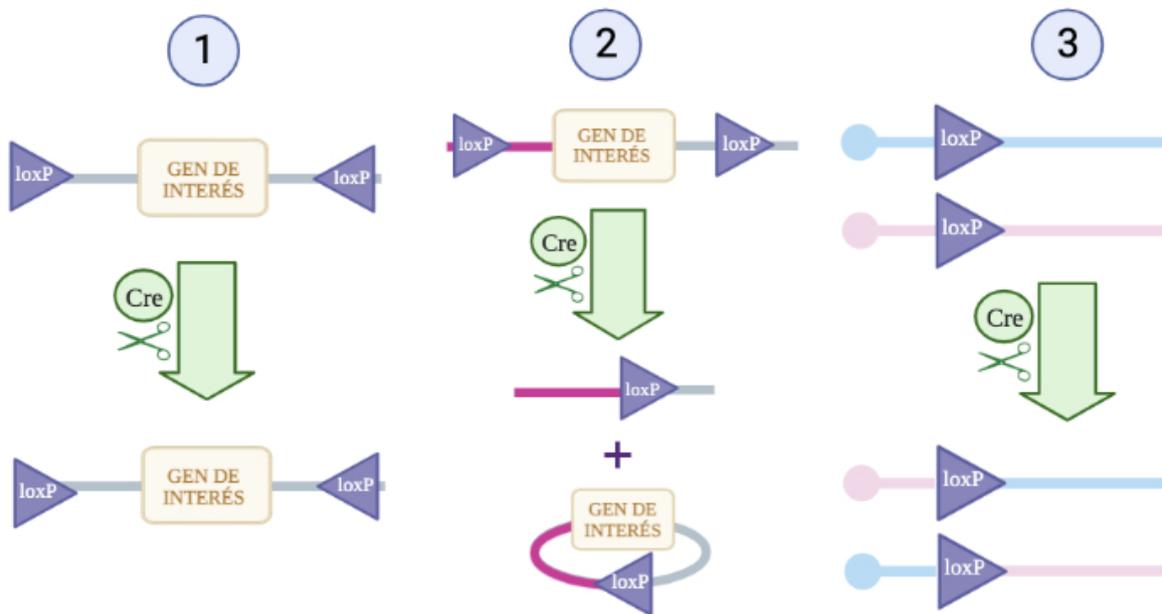


Figura 3. Resultados de la recombinación mediante el sistema Cre-loxP. (1) Inversión: los sitios loxP se encuentran en orientaciones opuestas y la región de ADN entre ellos se invierte. (2) Delección: los sitios loxP están orientados en la misma dirección por lo que el ADN se escinde en una pieza circular. (3) Translocación: ocurre cuando los sitios loxP se encuentran en dos moléculas diferentes. (Modificado de Addgene).

La tecnología Cre-loxP se usa como una poderosa herramienta de biología molecular que permite la selección de genes (*gene targeting*) en células madre embrionarias, por lo que los ratones obtenidos poseen una delección en el gen de interés predefinido. Esto se conoce como *gene knockout technology* o tecnología de eliminación de genes. No obstante, las técnicas convencionales de *gene knockout* generan animales que heredan la delección genética deseada en todos los tipos de células lo que puede conducir a graves defectos de desarrollo o muerte prematura, impidiendo el análisis de las funciones genéticas posteriores al desarrollo, llevando en algunos casos a una interpretación incorrecta de los resultados. Para incrementar la utilidad del *gene knockout technology*, es importante desarrollar técnicas que impongan restricciones regionales (tipos celulares, órganos o tejidos) y/o temporales (diferentes fases del desarrollo o crecimiento) a la delección genética (22).

En este contexto, y en línea con los objetivos de investigación del laboratorio de la Profesora Giraldez, el objetivo fundamental del presente trabajo consiste en la generación de un ratón *knockout* (KO) condicional para el gen del canal BK, y para ello, se emplea el sistema Cre-

loxP. Con esta finalidad se usa una cepa de ratón donde la Cre-Recombinasa se encuentre bajo el control del promotor específico deseado, que se cruzará con otra cepa de ratón conteniendo la secuencia de DNA (relacionada con BK o su función) flanqueada por los sitios loxP. El sistema descrito anteriormente permitirá generar el ratón BK-KO condicional (Figura 4) (20).

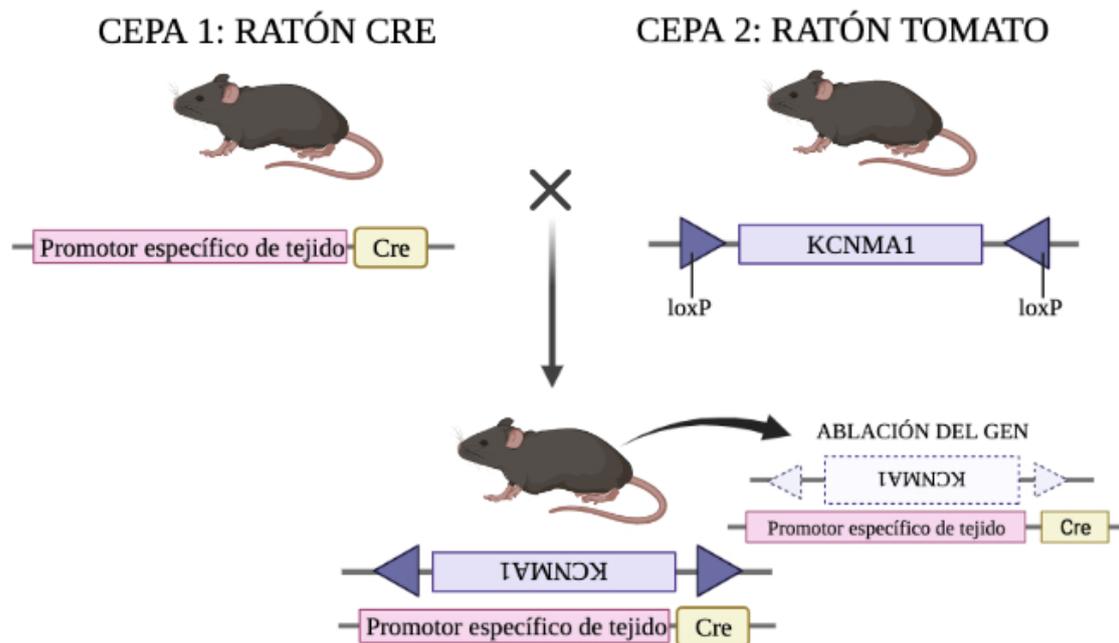


Figura 4. Generación de un ratón knockout (BK) condicional. Cruce entre la cepa 1 que posee la Cre-Recombinasa bajo un promotor específico de tejido y una cepa 2 que posee el gen BK flanqueado por los sitios loxP. Al final del proceso se obtiene un ratón que expresa la enzima Cre-Recombinasa en los tejidos de interés y cuya acción produce la ablación del gen flanqueado por los sitios loxP.

Es importante destacar que entre las consecuencias no deseadas se encuentra la recombinación no intencional de la línea germinal. Cuando la expresión y la actividad de la Cre-Recombinasa ocurren en las células de la línea germinal, la escisión, inversión o translocación del alelo “floxeado” por acción de la Cre-Recombinasa ocurrirá en todas las células del organismo, en lugar de la región y el tipo de célula deseados. Por tanto, evitar esta recombinación indeseable es esencial en este trabajo para que la Cre-Recombinasa se exprese exclusivamente en una zona determinada del Sistema Nervioso (SN). Esto es posible siguiendo el esquema de cruzamiento de líneas de ratón que se muestra en la Figura 5, donde las hembras con las características deseadas son seleccionadas en las primeras generaciones (F1 y F2) para el establecimiento de los cruces siguientes. En la línea de ratón empleada en el presente trabajo, la recombinación germinal producida por el alelo Cre procedente de la madre es del 0%. (18,20).

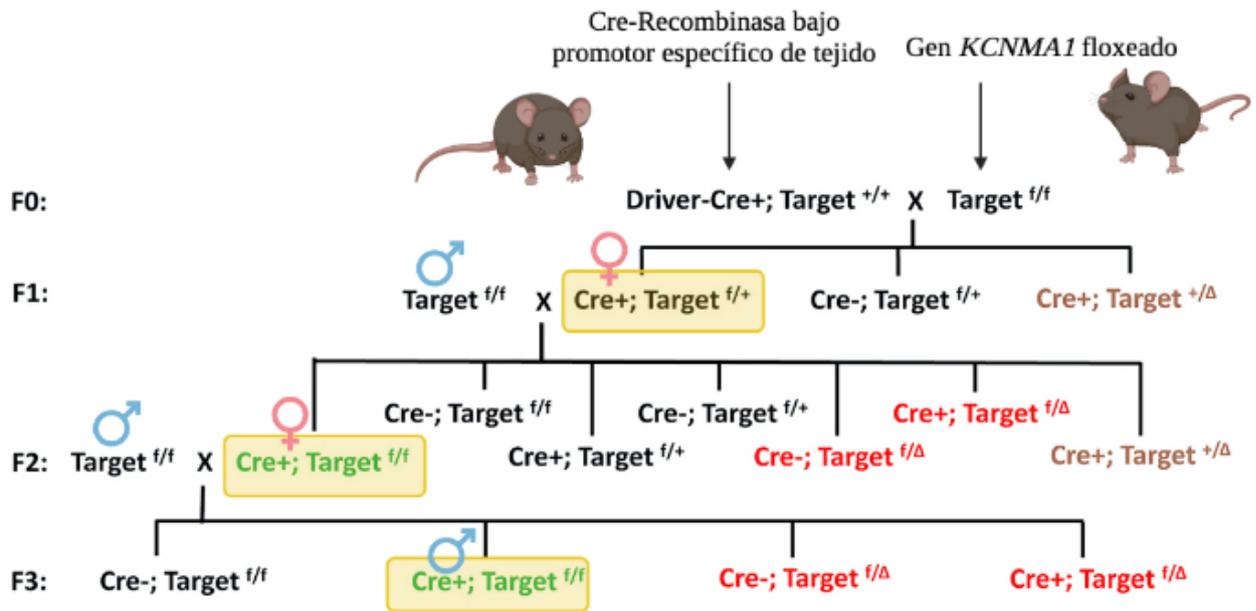


Figura 5. Estrategia de cruce para la obtención de un ratón knockout condicional evitando la recombinación germinal. Partiendo de un cruce Cre⁺;Tomato^{fl/fl} x Tomato^{fl/fl}, se selecciona la hembra Cre⁺;Tomato^{fl/-} de la descendencia y se cruza con un macho Tomato^{fl/fl} hasta obtener un macho Cre⁺;Tomato^{fl/fl}, para evitar que la Cre-Recombinasa se exprese en la línea germinal. (Modificada de Luo et al., 2020).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Nuestro trabajo está basado en la hipótesis general de que la generación de modelos animales constituye una herramienta esencial para el estudio de mecanismos de enfermedad. En este contexto, la generación de un modelo de ratón en el que el gen *Kcnma1* sea inactivado mediante el uso del sistema Cre-loxP aportará una herramienta de gran valor para estudiar el efecto que provocan las mutaciones BK en la integración sináptica. A largo plazo, esta herramienta permitirá testar la hipótesis del trabajo actual en el laboratorio receptor, que propone un papel fundamental de los complejos NMDAR-BK en la función neuronal.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este TFG es la generación de un ratón *knockout* mediante el uso del sistema Cre-loxP para estudiar el efecto de la ausencia de canal BK en la integración sináptica en diversas partes del cerebro de ratón.

Este objetivo fundamental se divide en los siguientes objetivos específicos:

- **Objetivo 1:** generación de una línea de ratón donde la expresión del canal BK se encuentre significativamente reducida en la corteza de barriles y el hipocampo.
 - Objetivo 1.1: cría y cruce de las diversas líneas de ratón.
 - Objetivo 1.2: caracterización y selección mediante genotipado.
- **Objetivo 2:** caracterización del modelo animal generado Cre⁺:Tomato^{fl/fl} mediante electrofisiología y microscopía de fluorescencia.
 - Objetivo 2.1: registros electrofisiológicos para la cuantificación de corrientes iónicas mediadas por BK, mediante el uso de la técnica de *patch-clamp* en rodajas de cerebro del ratón obtenido Cre⁺:Tomato^{fl/fl} para el estudio de la corrientes del canal BK.
 - Objetivo 2.2: cuantificación de los niveles de fluorescencia producida por la proteína exógena tdTomato en rodajas de cerebro del ratón Cre⁺:Tomato^{fl/fl}.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Animales de experimentación

Todos los procedimientos de experimentación y manipulación de animales, llevados a cabo en el presente TFG, han sido aprobados por el Comité Ético de la Universidad de La Laguna y se ajustan a las directrices españolas y europeas para la protección de animales de experimentación (RD1201/2005; 2010/63/UE). Todos los ratones utilizados para el desarrollo de este trabajo se crían y se mantienen en el Estabulario de la Universidad de La Laguna bajo unas condiciones idóneas e ideales para su bienestar físico, mental y social.

El empleo de roedores como herramienta de investigación posee numerosas ventajas, destacando las siguientes: el tamaño (son económicos de mantener), robustez (prosperan y se reproducen en una amplia gama de condiciones ambientales) y fecundidad (tienen una gestación corta, producen camadas grandes y se desarrollan rápidamente, lo que permite una rápida expansión de una colonia). Debido a sus estrechas similitudes metabólicas y anatómicas con los humanos, con los que además comparten una homología de codificación de ADN cercana en general al 95% (23), se pueden estudiar en ellos muchas de las enfermedades hereditarias humanas, ya que presentan síndromes similares. Como resultado podemos comparar los genes entre cromosomas humanos y de ratón, por lo que es muy útil para genética comparativa. La característica más valiosa del ratón como herramienta de investigación es la capacidad de algunos linajes de sobrevivir a la *inbreeding depression* o depresión por endogamia/consanguinidad que conlleva una reducción en la variabilidad genética dentro de una población aumentando su susceptibilidad a enfermedades. Algunas de las características de los ratones que limitan los efectos negativos de la endogamia son: una tasa de reproducción alta y cortos intervalos entre camadas, lo que permite una mayor variabilidad genética en cada generación. Sin embargo, aunque los ratones pueden ser menos susceptibles a la depresión por endogamia sigue siendo un factor importante a tener cuenta y es necesario tomar medidas para mantener la variabilidad genética de las poblaciones, como la de no emparentar hermanos (23).

En el caso del presente proyecto, el uso de roedores como base para la generación del modelo animal planteado está plenamente justificado, debido a que existen altos niveles de expresión del canal BK en la neocorteza, los ganglios basales, el hipocampo, el tálamo, la habénula y su trayecto hacia el núcleo interpeduncular en el meséncefalo, el cerebelo, los núcleos vestibulares en el romboéncéfalo y el sistema olfativo. Además, se ha estudiado que animales con deficiencia de los canales BK muestran comportamientos que pueden parecerse a algunos

síntomas observados en pacientes que poseen con un mal funcionamiento del gen *Kcnma1*. La eliminación de *Kcnma1* en roedores produjo varios tipos de deficiencias motoras como ataxia, temblor, alteración de la coordinación motora, reducción de la fuerza muscular y reflejo de parpadeo anormal en ratones siendo todo relacionado con una disfunción cerebelosa. Las neuronas de Purkinje de estos ratones sin *Kcnma1* mostraron una actividad de disparo basal significativamente reducida y una mayor depresión de la transmisión a corto plazo en las sinapsis en los núcleos cerebelosos profundos y una retroalimentación olivo-cerebelosa interrumpida. Por lo tanto, los resultados de los estudios anteriores, donde se emplearon animales de experimentación, demuestran que el malfuncionamiento de los canales BK están asociados con fenotipos con trastornos del movimiento también observados en humanos (11).

El desarrollo de líneas específicas de tratamiento para las patologías (conocidas generalmente como canalopatías) asociadas a *Kcnma1* está actualmente limitado por varios factores importantes que incluyen, entre otros, la falta de moduladores farmacológicos selectivos del canal BK aprobados por la FDA, la ausencia de presentaciones clínicas estereotipadas, así como una insuficiente causalidad entre las alteraciones en la actividad del canal y los síntomas del paciente (11).

4.1.1.Cepas de ratón utilizadas

Las cepas de ratón usadas en el presente trabajo son: *Wild Type* C57BL/6J, proporcionada por el Estabulario de la Universidad de La Laguna; *Cre-Driver* B6.Cg-Tg(Camk2a-cre)T29-1Srl/J, proporcionada por la Dra. Teresa Iglesias (IIB, Madrid); B6.Cg-Kcnma1^{tm1.1Alme}/J, proporcionada por la Dra. Andrea Meredith (Universidad de Maryland, EE.UU.).

- C57BL/6J (#000664)

Creada por el Dr. Little, fue la primera en tener secuenciado su genoma. Estos ratones tienen un pelaje negro. Es una cepa de ratón de laboratorio comúnmente utilizada en la investigación científica debido a su buena capacidad de aprendizaje y memoria, resistencia a la obesidad y la diabetes, susceptibilidad a ciertas enfermedades, facilidad de cría y estandarización en experimentos (17).

- Cre: B6.Cg-Tg(Camk2a-cre)T29-1Srl/J (#005359)

Se trata de una cepa de ratón transgénica que posee una modificación genética que facilita que la Cre-Recombinasa se exprese bajo el promotor específico de la proteína dependiente de calcio/calmodulina (Camk2a) (Figura 6). Esto da lugar a que la enzima Cre-Recombinasa se

expresión, de manera selectiva, en células neuronales del cerebro anterior, incluida la capa de células piramidales CA1 del hipocampo. Además, esta cepa es útil para estudiar la plasticidad sináptica y la potenciación a largo plazo (LTP) en las redes del hipocampo. Su fondo genético es C57BL/6J (17).

Los ratones homocigotos de esta cepa de ratón son viables, fértiles, de tamaño normal y no muestran anomalías físicas o de comportamiento. Cuando este ratón se cruza con una cepa que contiene una secuencia de interés flanqueada por el sitio loxP, se produce una recombinación (explicada en la Figura 3) mediada por la enzima Cre-Recombinasa en las células piramidales del cerebro anterior y de la capa CA1 de hipocampo.

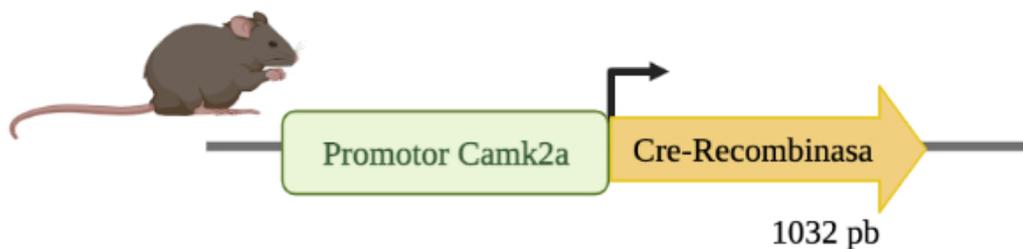


Figura 6. Esquema de la disposición de la Cre-Recombinasa en la cepa de ratón B6.Cg-Tg(Camk2a-Cre)T29-1Sr1/J. La Cre-Recombinasa se encuentra bajo el promotor de la proteína quinasa Camk2a.

Cabe destacar que estos ratones transgénicos pueden expresar la Cre-Recombinasa en varias estructuras de la línea germinal masculina, incluidos los espermatozoides. Además, en el estudio de Luo et al. 2020, se informó que en esta cepa, cuando se cruzaban machos mutantes fl^+/fl^+ cruzados con hembras fl^+/fl^- , se obtenían algunos descendientes con el gen de interés “floreado”, eliminado en la línea germinal. Por ello, para los experimentos Cre-lox y para evitar y minimizar la eliminación de la línea germinal del alelo flanqueado por los sitios loxP, los investigadores pueden considerar cruzar hembras T29-1 de la línea $CamKII\alpha$ -Cre con machos “floreados” (Figura 5) (17).

- **Tomato: B6.Cg-Kcnma1^{tm1.1Alme}/J o Kcnma1^{fl}-tdTomato (#035901).**

Esta cepa de ratón tiene una modificación genética que le permite expresar una proteína fluorescente (tdTomato) en las células que expresan el gen *Kcnma1*, gen que codifica el canal BK. La proteína tdTomato es una proteína fluorescente fotoestable que emite una luz roja brillante, siendo muy útil su uso como marcador fluorescente en células vivas. Además, no requiere que se fije el tejido en el que se encuentra la proteína, por lo que se puede observar la fluorescencia de la proteína en su estado natural (24).

Estos ratones suponen un buen candidato para generar el modelo animal propuesto en este trabajo, ya que poseen dos sitios loxP que flanquean el exón 2 del gen *Kcnma1* (que codifica el canal BK) y un “knockin” del indicador tdTomato en orientación inversa en el intrón 2 del mismo gen. Es importante resaltar que el gen reportero Tomato se encuentra en orientación inversa a la transcripción, por lo que solamente dará lugar a la producción efectiva de proteína fluorescente tras la acción de la Cre-Recombinasa. El fondo genético de esta línea de ratón es C57BL/6J y se mantienen en el laboratorio mediante cría selectiva. Cuando se cruza este ratón con un ratón que expresa la Cre-Recombinasa bajo el promotor específico de tejido, la descendencia resultante tendrá el exón 2 invertido, pero el gen reportero 2A-tdTomato se encontrará en la fase de lectura y se expresará en los tejidos específicos que tenga la Cre-Recombinasa activa (17,25). En otras palabras, las células que exhiban fluorescencia roja serán aquellas en las que la expresión del gen *Kcnma1* esté ausente o significativamente reducida.

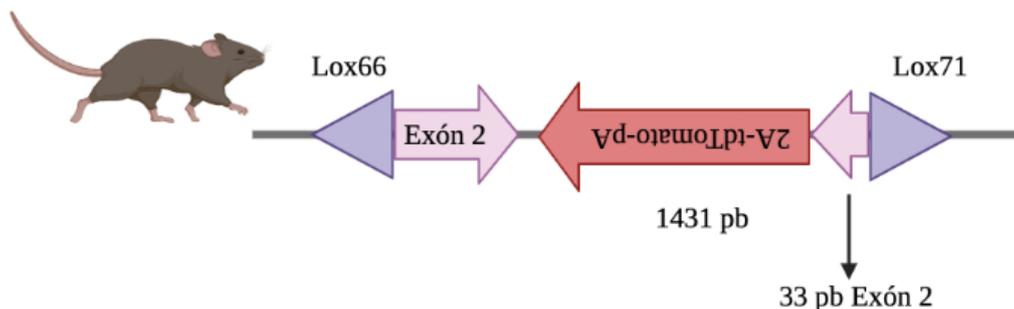


Figura 7. Esquema de la disposición del gen reportero 2A-tdTomato-pA en la cepa B6.Cg-Kcnma1tm1.1Alme/J. El exón 2 está en fase de lectura y el gen 2A-tdTomato-pA se encuentra invertido y no expresa en las células.

4.2. Generación de un ratón KO por el sistema Cre-loxP

Utilizando las líneas descritas anteriormente, la recombinación mediada por sistema Cre/loxP se produce en el exón 2 del gen *Kcnma1*, usando una estrategia de inversión (Figura 4). Al ocurrir la inversión (Figura 4), se impide la transcripción del exón 2, mientras que simultáneamente cambia la orientación del casete 2A-tdTomato-pA, situándolo bajo el control del promotor endógeno del gen *Kcnma1* y los elementos reguladores correspondientes. La fluorescencia de tdTomato sirve para identificar las células que han sufrido la inactivación de *Kcnma1* mediada por la Cre-Recombinasa. El producto resultante debe ser una línea de ratón *knockout* condicional donde el gen *Kcnma1* se encuentra inactivo en la corteza y en el hipocampo de ratón, ya que el cruzamiento se ha producido con ratones B6.Cg-Tg(Camk2a-cre)T29-1Stl/J, que presentan niveles elevados de Cre-Recombinasa en esas zonas del cerebro.

Los pasos siguientes en el procedimiento se centran en la caracterización de los animales, para asegurar que su genotipo corresponde a los resultados esperados.

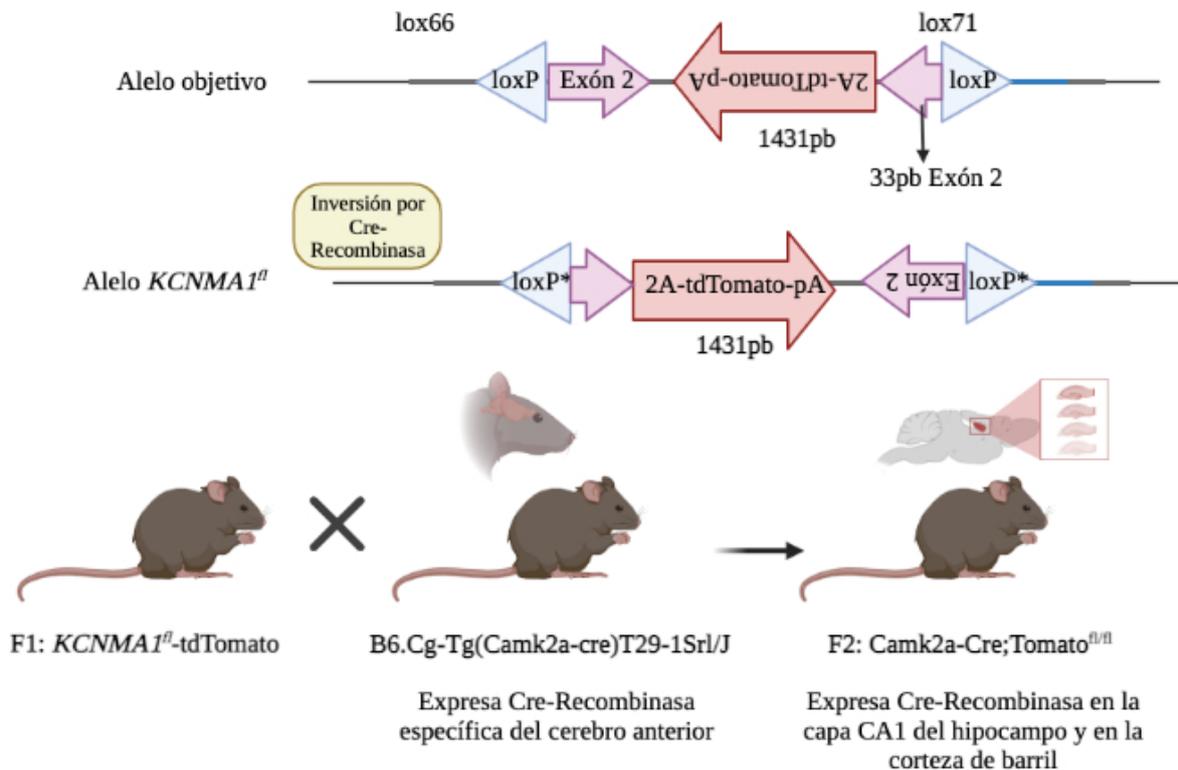


Figura 8. Generación de ratón KO condicional de Kcnma1 cortical e hipocampal. En la parte superior observamos el alelo en su conformación inicial y tras la recombinación Cre, el alelo invertido, muestra la inversión de la proteína 2a-tdTomato-pA junto con la inversión de los sitios loxP. En la parte inferior, observamos un cruce entre un ratón Tomato^{fl/fl} y un ratón Cre⁺, que da lugar a un cKO de Kcnma1 cortical e hipocampal (Modificada de Zemen et al., 2015).

4.3. Genotipado de los ratones obtenidos

El genotipo es la composición genética de un locus (posición fija en un cromosoma que determina la posición de un gen o de un marcador), una región genómica o un organismo completo. El proceso de genotipado, que se puede realizar a través de diversas aproximaciones técnicas, tiene múltiples propósitos, como seleccionar sujetos apropiados para un experimento, identificar portadores y seleccionar los progenitores apropiados. En este trabajo se ha realizado a través de la reacción en cadena de la polimera (*Polymerase Chain Reaction* o PCR), que es un método para la amplificación enzimática del ADN, permitiendo la amplificación de pequeñas cantidades de material genético. La técnica fue desarrollada por primera vez en 1983 por Kary Mullis (26,27).

La PCR funciona mediante el uso de polimerasa de ADN junto con oligonucleótidos *primers* o cebadores específicos que se unen a una secuencia de ADN diana del ADN genómico. El

proceso implica varios ciclos de calentamiento y enfriamiento (Tabla 1), lo que permite la desnaturalización del ADN de doble cadena, la unión de cebadores al ADN de cadena simple y la extensión de los cebadores por la polimerasa de ADN para crear una copia complementaria de la secuencia de ADN diana. Cada ciclo de PCR duplica la cantidad de la secuencia de ADN objetivo en la mezcla de reacción (Figura 9).

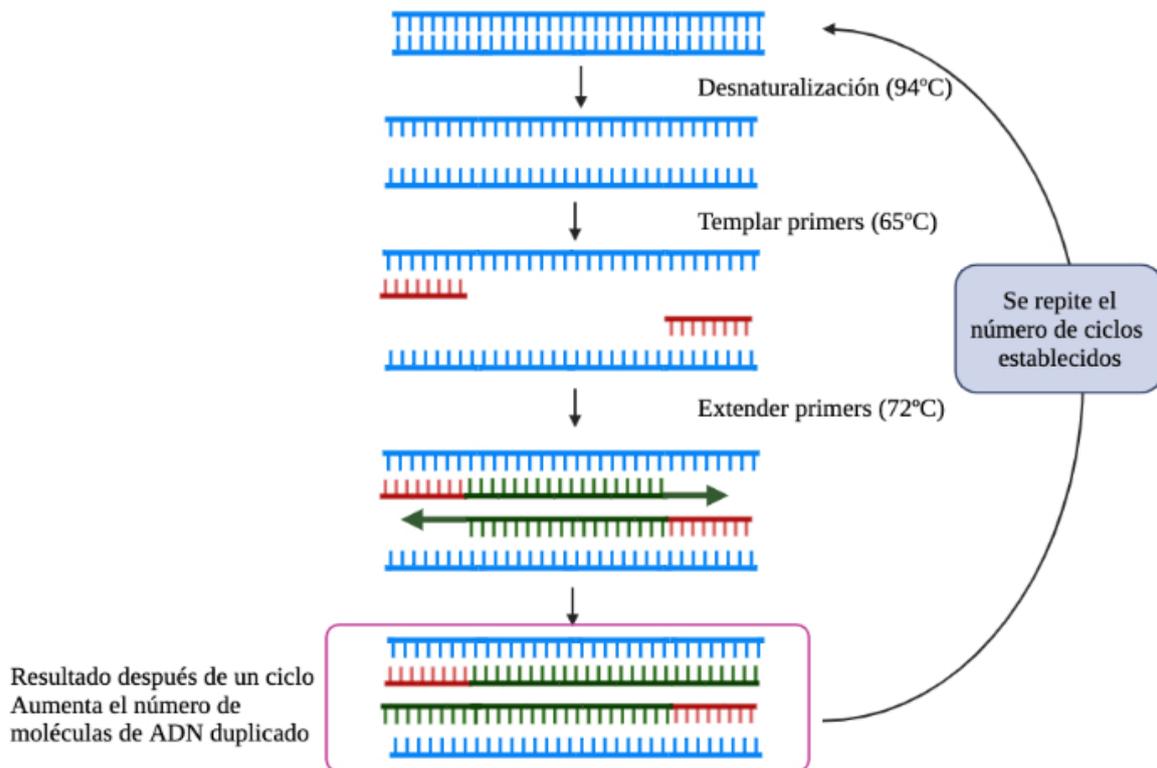


Figura 9. Etapas de la PCR. La PCR consta de las siguientes etapas: (1) Desnaturalización del ADN producida a altas temperaturas (94-95°C) que separa las dos hebras de la molécula de ADN (2) Unión y apareamiento de los *primers* a las hebras de ADN separadas. (3) Síntesis de la nueva hebra de ADN por la enzima polimerasa. Este proceso se repite varias veces (número de ciclos establecidos), lo que resulta en una amplificación exponencial de la cantidad de ADN.

Para llevar a cabo el genotipado que permite la caracterización de los ratones de interés, se requieren varios elementos clave:

- *ADN genómico:* en este trabajo se utiliza el ADN extraído de oreja o cola de cada ratón. Para conseguirlo, se cortan unos milímetros de oreja o cola del ratón a estudiar. Debemos tener en cuenta que se prioriza el estudio del genoma con orejas ya que este tejido es menos doloroso para el ratón, siendo la cola además muy importante en la termorregulación del animal. Estas muestras se conservan a 4°C y, si no se utilizan inmediatamente, son viables durante 2-4 días.

- *Cebadores o primers*: secuencias cortas de ADN sintético que se diseñan para unirse específicamente a la región del ADN que se desea amplificar, marcando el inicio y el final de esta secuencia. Los cebadores suelen tener una longitud de 18 a 25 nucleótidos.
- *Taq polimerasa*: es una enzima termoestable, que resiste las altas temperaturas requeridas en la reacción de PCR. Esta sintetiza una nueva cadena de ADN complementaria a la plantilla de ADN genómico que deseamos amplificar, usando como molde de partida los cebadores específicos que añadimos a la reacción. Esta se encuentra diluida en un buffer específico de PCR que es una solución que contiene una combinación óptima de iones y pH para permitir la actividad óptima de la Taq polimerasa y la estabilidad del ADN genómico.
- *Termociclador*: es el aparato que controla con precisión la temperatura y el tiempo de cada ciclo de PCR, que incluye la desnaturalización, el apareamiento y la extensión. Consta de un bloque termal, que es una pieza de metal con varios orificios donde se colocan los tubos que contienen la muestra de reacción de PCR. El bloque termal se calienta y se enfría para controlar la temperatura en cada ciclo de la reacción de PCR.

Proceso de obtención de muestras de tejido y extracción de ADN genómico:

NOTA: este proceso se realiza en una campana extractora y utilizando guantes, para evitar posibles contaminaciones en la muestra, sobre todo trazas de ARN.

1. A las muestras de tejido, orejas o colas, se le añaden 60 μ L de NaOH para realizar la hidrólisis de la muestra, asegurando que el material está sumergido completamente. Las muestras deben calentarse a 95°C durante 30 minutos.
2. Acabada la incubación a 95°C, se realiza la neutralización de las muestras añadiendo 60 μ L de Tris-HCl 40mM/EDTA 0,2mM (con un pH de 6-7). Se pipetea la solución para su mezcla y se centrifuga a 11000 rpm durante 5 minutos. Las muestras que no se usan inmediatamente se conservan a 4°C.
3. A continuación, con el ADN extraído, se procede a la preparación de la PCR. Se prepara el llamado “mix de PCR” que para cada muestra incluye 10 μ L de Red Taq Polimerasa, 0,25 μ L de cada primer que usamos (siempre una pareja), 7 μ L de H₂O. Siempre debemos incluir en este volumen los controles negativos que en nuestro caso utilizamos H₂O, cepa WT, cepa Cre y cepa Tomato.
4. Los diversos tubos conteniendo “mix de PCR” se introducen en el termociclador y se lleva a cabo el programa detallado en la Tabla 1.

PASO	TEMPERATURA	NOTA
1	94°C	
2	94°C	
3	65°C	Disminuir 0,5°C por ciclo
4	68°C	
5		Repetir los pasos 2-4 durante 10 ciclos (<i>touchdown</i>)
5		Repetir los pasos 2-4 durante 10 ciclos
6	94°C	
7	60°C	
8	72°C	
9		Repetir los pasos 6-8 durante 28 ciclos
10	72°C	
11	10°C	∞

Tabla 1. Etapas del protocolo de PCR. En este protocolo, primero se realiza una etapa de desnaturalización del ADN a 94°C. Luego baja la temperatura para permitir que los *primers* se unan a la secuencia de interés formando los apareamientos. Seguidamente, se aumenta de nuevo la temperatura para que la enzima Taq polimerasa sintetice una nueva hebra de ADN complementaria. Por último, una vez completados los ciclos de PCR, se lleva a cabo una extensión final a 72°C para completar la síntesis de las hebras de ADN. La muestra se mantiene a 10°C hasta que se retire del termociclador.

Para interpretar los resultados de la PCR, se visualiza el producto de PCR, una vez terminado el programa deseado, utilizando un gel de agarosa al 2%.

Preparación de gel de agarosa al 2% (volumen 100ml):

1. Pesar 2g de agarosa.
2. Mezclar la agarosa pesada con 100ml de TAE 1x.
3. Calentar la mezcla anterior en el microondas hasta conseguir su disolución completa.
4. Esperar a que se enfríe un poco la muestra y cuando esté a temperatura ambiente, añadir 10 µL de GelRed. El GelRed es un colorante fluorescente ultrasensible, extremadamente estable y ambientalmente seguro para ácidos nucleicos, que se intercala en el ADN amplificado y produce fluorescencia roja bajo luz ultravioleta.
5. Verter la disolución en la cubeta, previamente preparada con los peines necesarios que crearán los pocillos donde se pipeteará el producto de PCR una vez haya solidificado el gel.

6. Una vez ha solidificado el gel preparado, se retiran los peines y se coloca el gel en la cámara de electroforesis, agregando el tampón de corrida (TAE 1x) hasta que el gel quede totalmente sumergido en el mismo.
7. En el primer pocillo, se carga un marcador de tamaños de fragmentos de ADN. En este caso, se emplea el PeqGOLD 100 pb, debido a que los fragmentos que queremos visualizar no poseen un tamaño mayor a 600 pb. El marcador es necesario para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN generados en la PCR.
8. En los pocillos consecutivos, se cargan las muestras o productos de ADN amplificado en el gel.
9. Cargadas todas las muestras, se procede a realizar la electroforesis. Para ello, se deben conectar los electrodos (polo positivo y polo negativo), seleccionando el voltaje que nos permita separar las bandas de ADN a la velocidad adecuada. El tiempo de la electroforesis depende del número y tamaño de bandas que queramos visualizar.
10. Por último, una vez finalizada la electroforesis y se visualiza el gel en una cámara de luz ultravioleta.



Figura 10. Esquema representativo del genotipado de un ratón. (A) Se lleva a cabo en el Estabulario, donde seleccionamos los ratones que deseamos genotipar y obtenemos el tejido a estudiar cortando trozos de oreja o colas. (B) y (C) Procesamiento de la muestra en el laboratorio, realizamos la PCR y obtenemos los resultados del genotipado siguiendo el protocolo explicado anteriormente.

4.4. Secuenciación

La secuenciación de ADN es el método que determina el orden de las cuatro bases de nucleótidos (adenina, timina, citosina y guanina) que forman una molécula específica de ADN

y transmiten su información genética. En la doble hélice del ADN, las cuatro bases se unen específicamente dos a dos, para formar unidades llamadas pares de bases (pb). Así, la adenina (A) se empareja con la timina (T) y la citosina (C) se empareja con la guanina (G). En concreto, en este TFG, se realizó la secuenciación de ADN genómico procedente de diversos tejidos de ratones de interés. El proceso de secuenciación se realiza en una compañía situada fuera del laboratorio, dedicada a este fin (MACROGEN SPAIN). En este trabajo, se enviaron a secuenciar muestras procedentes de hipocampo, corteza, cola y oreja de ratones WT, ratones Cre, ratones Tomato y ratones obtenidos de los cruces creados para estudiar el orden y la posición del gen *Kcnmal* y proteína tdTomato.

Preparación de muestras para secuenciación (28):

- A. Obtención de tejidos de ratones macho (3 meses). Se anestesiaron con isoflurano, se decapitaron y se extrajo el cerebro rápidamente.
- B. Se extrajo ADN genómico de las muestras, tal y como se detalla en el apartado “Genotipado de los ratones obtenidos” usando NaOH, TrisHCl y EDTA.
- C. Se realizó una PCR *Clean Up* del ADN genómico extraído de los tejidos.
- D. Terminada la PCR *Clean Up*, se realiza una PCR del ADN purificado siguiendo los pasos marcados en el apartado Genotipado de los ratones obtenidos usando los *primers* de interés.
- E. Al terminar la electroforesis, se procede a la extracción de ADN de los geles de agarosa para cuantificar la concentración de ADN purificado.

4.5. Electrofisiología

Con objeto de cuantificar los niveles de expresión de BK en los ratones resultantes del proceso detallado en este trabajo, se seleccionaron ratones macho de 28-36 días de vida, obtenidos y genotipados como Cre⁺;Tomato^{fl/fl}, y se cuantificó la corriente eléctrica producida por bK mediante la técnica de electrofisiología.

Realización de registros electrofisiológicos

1. Los ratones seleccionados se anestesian con isoflurano, se decapitan y se extrae el cerebro rápidamente. Este se sumerge en una solución alta en sacarosa (solución de corte: 189 mM sacarosa, 10 mM glucosa, 26mM NaHCO₃, 3mM KCl, 5 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂ y 1,25 mM NaH₂PO₄) que burbujea con carbógeno continuamente (95% O₂ – 5% CO₂).

- Usando un vibratomo (Microm HM650V) se obtienen rodajas de cerebro coronales de unas 350 μm de espesor. Estas rodajas deben mantenerse durante $\geq 1,5\text{h}$ a temperatura ambiente (22°C) en medio cerebroespinal artificial, ACSF (124 mM NaCl, 2,69 mM KCl, 1,25 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgSO_4 , 26 mM NaHCO_3 , 10 mM glucosa, 2mM CaCl_2 y 0,4 mM ácido ascórbico, pH 7,35), que se burbujea también constantemente con carbógeno.
- Una vez recuperadas las rodajas, se transfieren a la cámara de registro montada en un microscopio (Olympus BX51WI) equipado con objetivos de inmersión 10x/40x, donde las rodajas están siendo continuamente perfundidas con ACSF carbogenado.

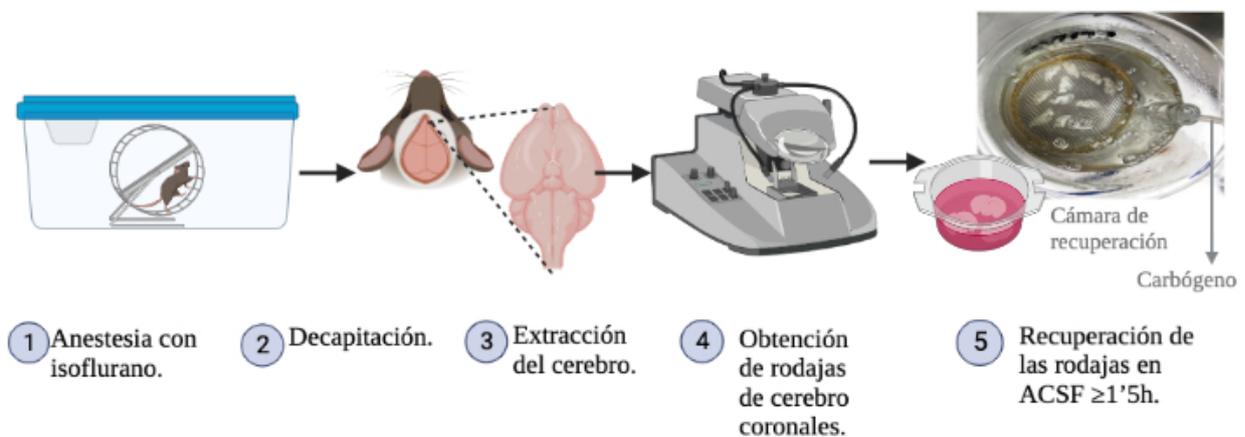


Figura 11. Obtención de rodajas de cerebro. Se siguen 1,2,3,4 y 5 para conseguir las rodajas coronales de cerebro de ratón. En la imagen final (5) (obtenida de Hoeymisse et al., 2020), se observa la cámara de recuperación donde se encuentran continuamente perfundidas con ACSF carbogenado.

- Los registros electrofisiológicos se realizan en la configuración de célula entera de la técnica de *patch-clamp* (26). Usando una microforia de micropipetas horizontal (Sutter), se “estiran” micropipetas de cristal borosilicato (GC150F-10; Harvard Apparatus) hasta obtener un valor de resistencia eléctrica de 5-8 $\text{M}\Omega$. Estas “pipetas de patch” son las utilizadas para realizar registros electrofisiológicos en las rodajas de cerebro preparadas previamente (pasos 1-3).
- Las corrientes de BK se registraron en las neuronas piramidales de capa 5 de la corteza de barriles de ratones WT y ratones $\text{Cre}^+; \text{Tomato}^{\text{fl/fl}}$, utilizando el procedimiento de “fijación de voltaje” (VC) de la configuración de *células entera* de la técnica de *patch-clamp* (Figura 12). Las rodajas se colocan en la cámara de registro bajo el microscopio, bañadas en ACSF normal (descrito anteriormente) suplementado con TTX (1 μM , bloqueando la producción de potenciales de acción). Las pipetas de *patch* se rellenaron con la solución interna de registro (123 mM KMeSO_3 , 9 mM NaCl, 9 mM HEPES, 0,9

mM EGTA, 14 mM *Tris-phosphocreatine*, 2 mM ATP-Mg, 2 mM ATP-Na, 0,3 mM GTP-Tris, pH 7,3). El proceso de registro se describe en la Figura 12. La recogida de datos se realiza mediante equipamiento electrónico y software especializados, consistentes en: digitalizador Digidata 1440A, un amplificador Multiclamp 700B y el software Clampex 10.4 (Axon Instruments). El análisis de los datos se realiza utilizando Clampfit 10.4 y GraphPad Software.

- Para evaluar los niveles de corriente BK en las células estudiadas, se obtuvieron sistemáticamente relaciones I-V. El protocolo de registro se detalla en la Figura 15. Brevemente, el potencial de reposo de las células fue fijado a un valor de -60 mV. Se aplicaron protocolos en los que se aplican cambios de voltaje durante 300 ms desde -100 a 100 mV durante 300 ms en incrementos de 20 mV (Figura 15). Las corrientes BK se aislaron mediante la sustracción de los valores de corriente después de la aplicación en el baño de un fármaco bloqueante de BK, paxilina (1 μ M). Los valores obtenidos se normalizaron de acuerdo a los valores de capacidad celular, para evitar errores de cuantificación sesgados por el tamaño de la célula (30).

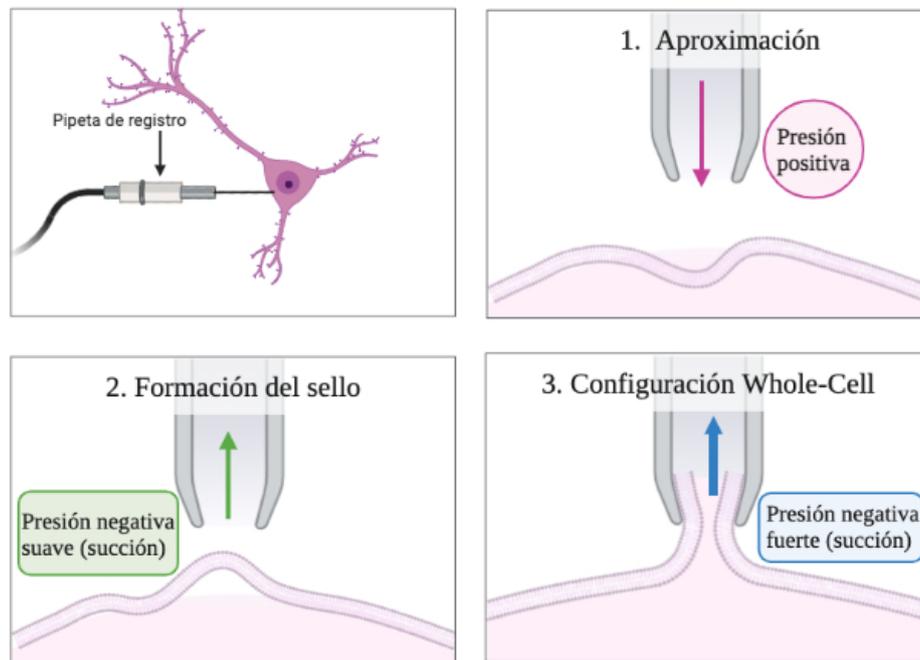


Figura 12. Configuración de célula entera (whole-cell) de la técnica patch-clamp. Esquema de los pasos a seguir para obtener un gigasello y establecer la configuración de célula-entera. Cuando la micropipeta está lo suficientemente cerca de la célula para crear una depresión en la membrana plasmática (1. Aproximación), se aplica una succión breve y suave para crear un contacto firme entre la micropipeta y la membrana plasmática. Si se realiza correctamente, el contacto se fortalece y la resistencia aumenta y alcanza 1 G Ω o más (2. Formación del sello). Una vez que el sello es estable y está por encima de 1 G Ω , se aplica una succión breve y fuerte para romper la membrana plasmática (3. Configuración de célula entera). Al lograr esto, se permitirá la continuidad entre el citoplasma y la micropipeta interior (Modificada de Segev et al., 2015).

4.6. Microscopía de Fluorescencia

La fluorescencia producida por la proteína fluorescente tdTomato, descrita en el apartado “Cepas de ratón utilizadas”, se cuantificó en muestras de tejido obtenidas de ratones macho de 28 a 36 días de vida $Cre^{+};Tomato^{fl/fl}$. Los datos se registraron en un microscopio NIKON Eclipse TI-U, equipado con un equipo de iluminación (Lumencor Spectra X), usando la línea LED verde (550 nm), un objetivo seco de 20x NA 0.40, el filtro para mCherry (Chroma) y una cámara iXon Ultra 888 EM-CCD (Andor). Brevemente, los ratones seleccionados se anestesian con isoflurano, se decapitan y se extrae el cerebro rápidamente. Este se sumerge en una solución alta en sacarosa (solución de corte: 189 mM sacarosa, 10 mM glucosa, 26mM $NaHCO_3$, 3mM KCl, 5 mM $MgSO_4$, 0,1 mM $CaCl_2$ y 1,25 mM NaH_2PO_4) que burbujea con carbógeno continuamente (95% O_2 – 5% CO_2). Usando un vibratomo (Microm HM650V) se obtienen rodajas de cerebro coronales de unas 100 μm de espesor y se mantuvieron a temperatura ambiente (22°C) en medio ACSF (124 mM NaCl 2,69 mM KCl, 1,25 mM KH_2PO_4 , 2 mM $MgSO_4$, 26 mM $NaHCO_3$, 10 mM glucosa, 2mM $CaCl_2$ y 0,4 mM ácido ascórbico, pH 7,35), que se burbujea también constantemente con carbógeno. Por último, las rodajas se transfirieron a la cámara del equipo para observar y cuantificar la fluorescencia de tdTomato.

5. RESULTADOS

5.1. Establecimiento de los cruzamientos de líneas de ratón

Una gran parte del trabajo realizado en este TFG consistió en el establecimiento de los cruzamientos de las líneas de ratón, según se detalla en el apartado de Métodos de esta memoria. Esta parte del trabajo fue realizado por Andrea Reyes Carrión en el Estabulario de la ULL, quien tiene los permisos y formación necesarias para la manipulación y cuidado de animales de experimentación, yo participé en el diseño experimental y asistí en los procesos de cruces y supervisión de todo el proceso, así como la selección de animales para su posterior caracterización y estudio.

5.2. tdTomato está presente en los ratones $Cre^{+};Tomato^{fl/fl}$ obtenidos en la F3

Una vez obtenidas las líneas seleccionadas para el objetivo principal de este trabajo, un volumen considerable del mismo consistió en su caracterización mediante genotipado, según se detalla en el apartado de Métodos de esta memoria.

Se realizaron genotipados de cada grupo experimental $Cre^+;Tomato^{fl/fl}$ x $Tomato^{fl/fl}$. Como controles, se usaron ratones WT y ratones $Tomato^{fl/fl}$. Brevemente, la identificación de individuos en los que la recombinación se había producido con éxito, se realizó mediante el desarrollo de PCR con *primers* específicos que amplifican una secuencia específica del gen *tdTomato*. Como la orientación de esta secuencia es diferente el ratón WT con respecto al “floxeado” en el que se ha producido la inversión, el resultado de esta PCR dará lugar a un producto de 196 pb para el alelo WT, mientras que este producto será de 235 pb en el caso del alelo “floxeado”. La combinación de ambas bandas se obtendrá en el caso de individuos heterocigotos para ambos alelos (Figura 13).

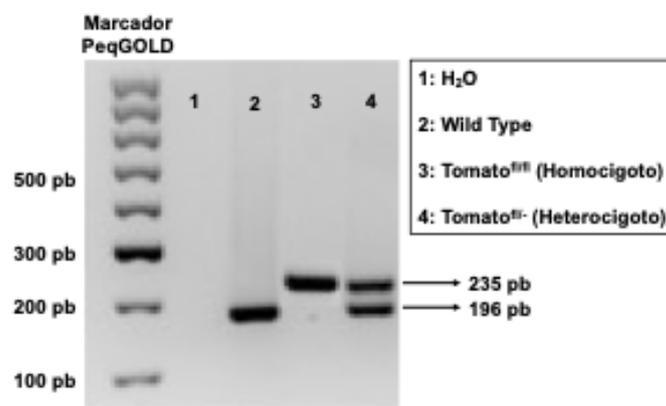


Figura 13. Estudio de la presencia de *tdTomato* en los ratones $Cre^+;Tomato^{fl/fl}$. Genotipado en gel de agarosa al 2% que muestra un ejemplo de los productos de PCR obtenidos de diferentes ratones. *tdTomato*^{fl/fl} (una banda: 235 pb) y *tdTomato*^{fl/-} (dos bandas: 235 y 196 pb). Utilizamos dos primers: 59916 Fwd: 5'-CAGAGACCAGTTGGGTGTCA-3' y 59917 Rev: 5'-ACAAGCTGGGCATGGTAGAG-3'. (1) H₂O: marcador, no muestra productos. (2) WT: marcador, no muestra productos. (3) *Tomato*^{fl/fl}: una banda de 235 pb. (4) *Tomato*^{fl/-}: dos bandas de 235 y 196 pb.

Adicionalmente, se evalúa la presencia de la Cre-Recombinasa en las muestras de los diferentes ratones. Como controles, de nuevo, usamos ratones WT y ratones $Tomato^{fl/fl}$ y añadimos un ratón Cre^+ homocigoto. En este caso, se utilizan *primers* específicos que amplifican un producto de PCR de 521 pb en los ratones Cre^+ (Figura 14).

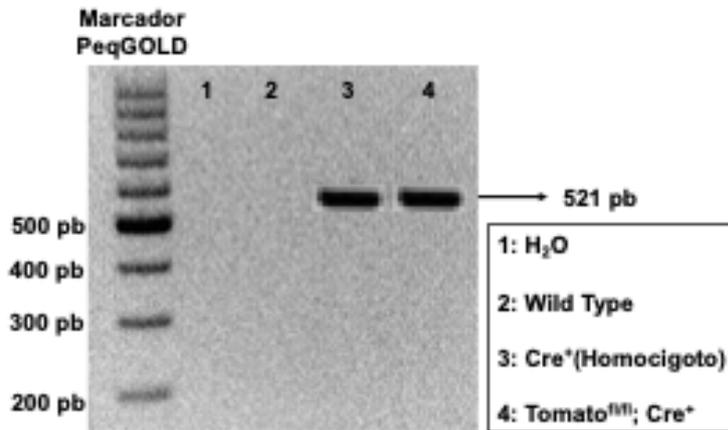


Figura 14. Estudio de la presencia del gen de la Cre-Recombinasa en los ratones Cre⁺;Tomato^{fl/fl}. Genotipado en gel de agarosa al 2% que muestra un ejemplo de productos de PCR para las muestras obtenidas de los diferentes ratones (una banda: 521 pb). Utilizamos dos primers: 10884: 5'-GTT CTC CGT TTG CAC TCA GG-3' y oIMR8990: 5'CAG GTT CTT GCG AAC CTC AT-3'. (1) H₂O: marcador, no muestra productos. (2) WT: marcador, no muestra productos. (3) Cre⁺: una banda de 521 pb. (4) Tomato^{fl/fl}; Cre⁺: una banda de 521 pb.

Tras un gran número de genotipados, el trabajo realizado permitió seleccionar individuos resultantes del cruce Cre⁺;Tomato^{fl/fl} x Tomato^{fl/fl}, genotipados como Cre⁺;Tomato^{fl/fl}, que fueron identificados al poseer simultáneamente la banda Cre⁺ (521 pb) y la banda del alelo “floxeado” (196 pb).

5.3. La inversión del exón 2 ocurre en los ratones Cre⁺;Tomato^{fl/fl}

El paso descrito anteriormente no permite determinar con seguridad la dirección del exón 2, confirmando que se ha producido su correcta inversión. El paso siguiente en este trabajo consistió en confirmar mediante secuenciación en qué dirección se encontraba el exón 2 y la proteína tdTomato tras el proceso de recombinación en los ratones genotipados como Cre⁺;Tomato^{fl/fl}. Además, pudimos estudiar cómo se mutaban los sitios loxP tras la acción de la Cre-Recombinasa. En concreto, se secuenciaron muestras procedentes de diferentes tejidos (corteza, hipocampo, cola y orejas) de los ratones Cre⁺;Tomato^{fl/fl} para corroborar si la recombinación ocurría solo en los tejidos de interés o en todas las células del animal. Para ello, tras la obtención de las muestras de los ratones Cre⁺;Tomato^{fl/fl} y su posterior secuenciación con los *primers* diseñados a tal efecto, se reconstruyó la secuencia del fragmento de ADN de interés (Figura 15).

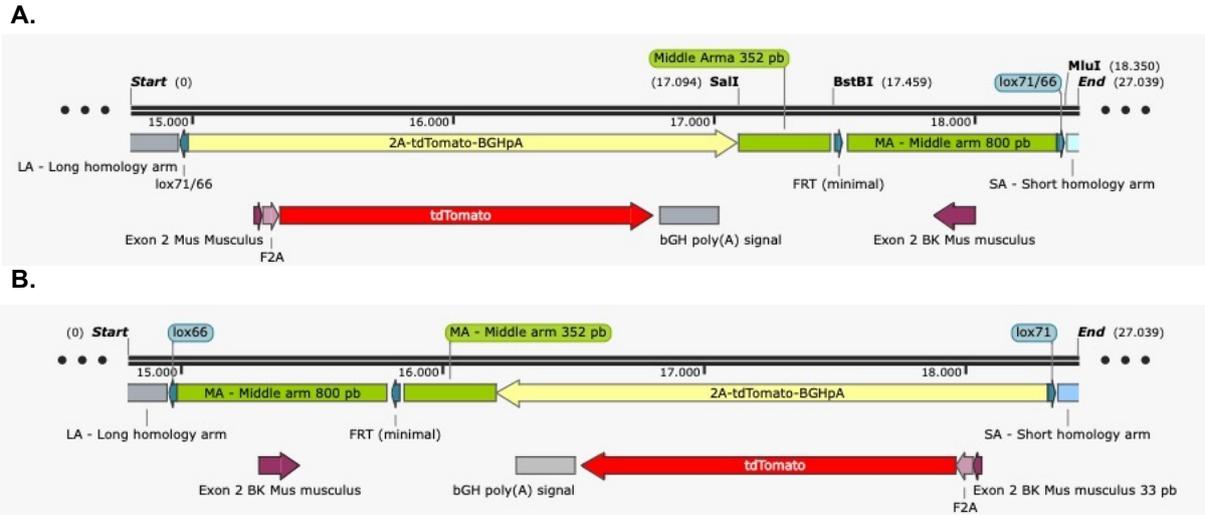


Figura 15. Posición del fragmento de ADN de interés en los ratones *Cre⁺;Tomato^{fl/fl}*. Comparación de posición de los diferentes elementos en el fragmento contenido entre los sitios loxP en los diferentes tejidos estudiados (A: cola y orejas, B: corteza e hipocampo).

La recombinación es un proceso selectivo que se dirige a los tejidos de interés usando promotores específicos de tejido bajo los que controlamos a la Cre-Recombinasa. En nuestro caso, el promotor específico usado es el de la proteína quinasa *Camk2a*, quinasa abundante en las neuronas piramidales del SN. Con el resultado anterior (Figura 15), observamos que la recombinación (acción de la Cre-Recombinasa) sólo ocurre en aquellos tejidos específicos deseados. Por tanto, podemos concluir que el sistema loxP, es efectivo y es una buena herramienta para crear ratones *KO* condicionales.

5.4. El canal BK no está presente en las neuronas piramidales de los ratones *Cre⁺;Tomato^{fl/fl}*

Para determinar si el canal BK está presente o no en las neuronas piramidales de la corteza de barriles y de la CA1 de hipocampo, se realizaron registros de *célula entera* mediante la técnica *patch-clamp* en las rodajas coronales de cerebro de ratón, según se detalla en el apartado de Métodos de esta memoria. Se registraron celulares piramidales de la BC-L5 y de la capa CA1 de hipocampo para estudiar las corrientes del canal BK, tanto en ratones WT como en ratones *Cre⁺;Tomato^{fl/fl}*, previamente genotipados según se ha detallado ampliamente en este trabajo. Los registros fueron obtenidos en fijación de voltaje en ACSF normal suplementado con TTX (1 μ M) en presencia o ausencia de paxilina (1 μ M, bloqueador del canal BK), como se describe en Métodos. Si bien la limitación temporal de este TFG no ha permitido una caracterización exhaustiva, sí hemos obtenido resultados preliminares muy prometedores. Estos resultados demuestran que en los ratones *Cre⁺;Tomato^{fl/fl}* el canal BK no está presente en las células, ya

que las corrientes obtenidas en fijación de voltaje no varían tras la administración de paxilina, en comparación con el WT (Figura 16).

En conclusión, nuestros resultados muestran que el canal BK, en la mayoría de las células piramidales registradas de los ratones $Cre^+;Tomato^{fl/fl}$, no se encuentra en la membrana. Es necesario considerar que la recombinación no ocurre en todas las células, por lo que existirán neuronas piramidales de la corteza de barriles y de CA1 de hipocampo que expresen BK en sus membranas celulares.

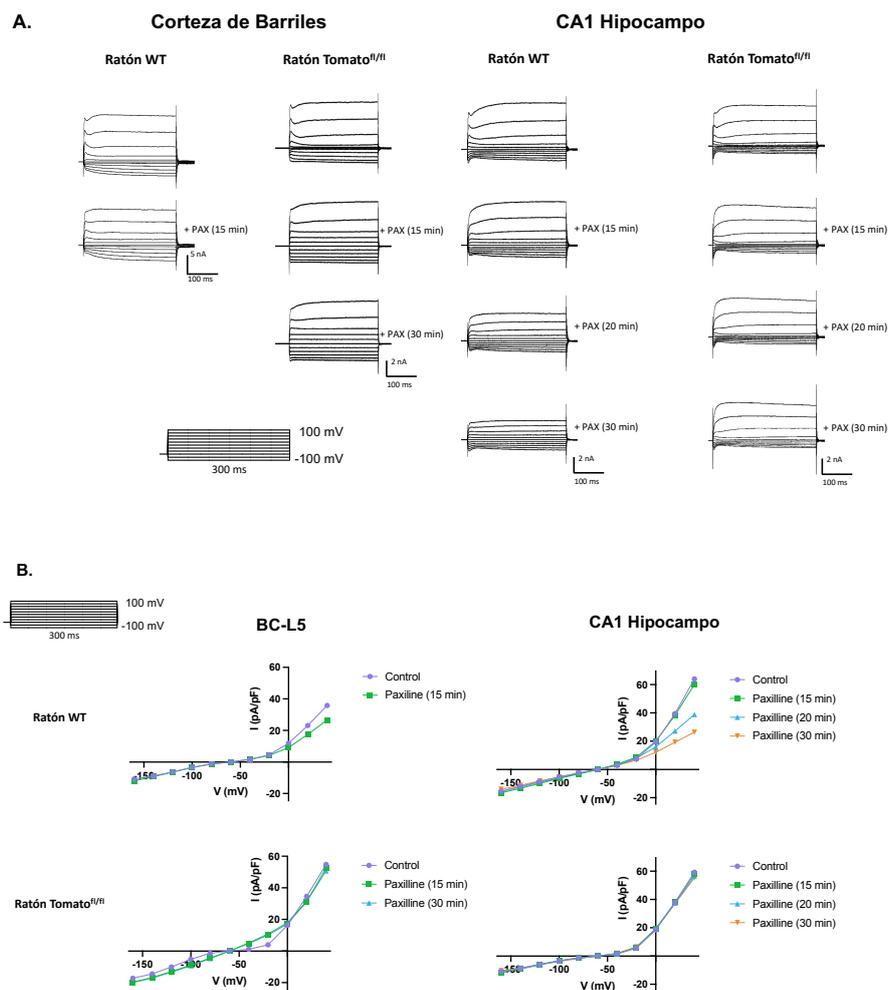


Figura 16. Corrientes obtenidas en fijación de voltaje en neuronas de la BC-L5 y de la CA1 de hipocampo para estudiar la presencia de canales BK. (A) Trazos de las corrientes en neuronas de las BC-L5 y neuronas de la CA1 de hipocampo, usando el protocolo de la imagen, comparando corrientes de ratones WT y ratones $Cre^+;Tomato^{fl/fl}$ (WT, n=1; $Cre^+;Tomato^{fl/fl}$, n=1). (B) Representación de la densidad de corriente de BK para las neuronas de la BC-L5 y de la CA1 de hipocampo a diferentes potenciales de membrana (.WT, n=1; $Cre^+;Tomato^{fl/fl}$, n=1).

5.5. La proteína tdTomato se expresa en las neuronas piramidales de los ratones $Cre^+;Tomato^{fl/fl}$

Como se ha explicado previamente, la falta de expresión de los canales BK debería estar asociada a un aumento de la fluorescencia de tdTomato en las mismas células. El estudio de la expresión de la proteína tdTomato se llevó a cabo en rodajas de cerebro de ratones WT y los ratones seleccionados por genotipado, $Cre^+;Tomato^{fl/fl}$ (Figura 17).

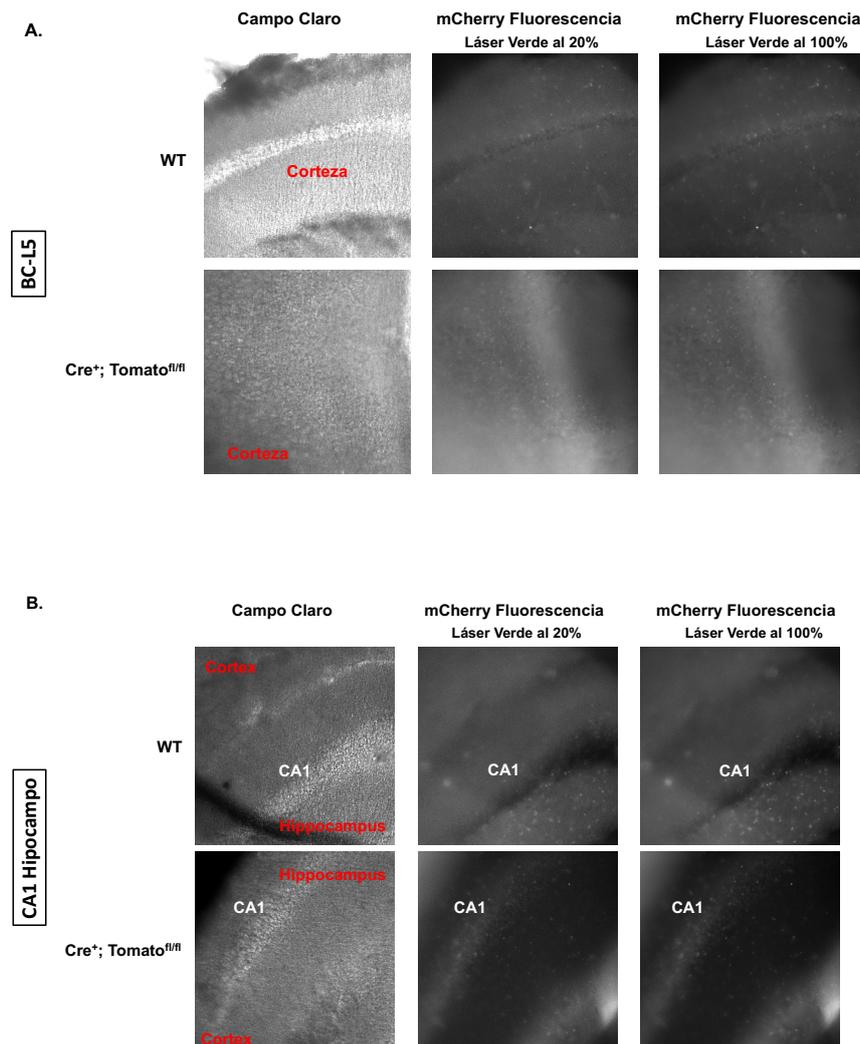


Figura 17. Presencia de la proteína tdTomato en la BC-L5 y en la CA-1 de hipocampo en rodajas de cerebro de los ratones $Cre^+;Tomato^{fl/fl}$. (A) y (B) Imágenes representativas capturadas de la BC-L5 y de la CA1 de hipocampo. Las imágenes se capturaron usando el objetivo 20x y el filtro para mCherry.

Nuestros resultados muestran unos niveles significativamente mayores de fluorescencia de tdTomato en los ratones $Cre^+;Tomato^{fl/fl}$ en comparación a los ratones WT, en los que no se aprecia apenas fluorescencia correspondiente a dicha proteína. Este resultado es consistente con la observación de que, en estos mismo ratones en los que está presente la proteína

tdTomato, el exón 2 (donde se encuentra el gen que da lugar al canal BK) se encuentra invertido, por lo que el canal BK no se expresa en las neuronas piramidales “rojas” de los ratones Cre⁺;Tomato^{fl/fl}.

6. DISCUSIÓN

Los ratones transgénicos se han utilizado ampliamente en la investigación biomédica para estudiar la función de los genes y su papel en enfermedades humanas, así como para evaluar la eficacia de nuevas terapias y medicamentos. En este caso, hemos utilizado el sistema Cre-LoxP, una herramienta de ingeniería genética que se utiliza para manipular de manera precisa y específica el ADN en células vivas utilizando la enzima Cre-Recombinasa y los sitios de recombinación loxP.

El uso del sistema Cre-LoxP nos ha permitido generar un ratón KO condicional, Cre⁺;Tomato^{fl/fl}, mediante los cruces específicos (15) y su posterior comprobación mediante el uso de diversas técnicas experimentales (descritas en Materiales y Métodos). El genotipado y la secuenciación de los ratones obtenidos nos han permitido seleccionar los ratones deseados, confirmando que el ratón KO condicional es viable y con las características deseadas. Únicamente en aquellos tejidos de interés, corteza y CA1 de hipocampo, se produce el proceso de recombinación y la eliminación de la expresión del canal BK.

Los registros electrofisiológicos de las corrientes iónicas en la rodajas de cerebro obtenidas de los ratones Cre⁺;Tomato^{fl/fl} usando la técnica de *patch-clamp*, permitió comprobar la ausencia del canal BK en estos ratones (Figura 16). Aunque sean resultados preliminares, el uso de un bloqueador específico del canal BK, la paxilina aplicada a una concentración adecuada para el bloqueo de canales BK, desveló que en los ratones Cre⁺;Tomato^{fl/fl}, el canal BK no se expresaba. Las corrientes iónicas medidas en fijación de voltaje no variaban tras el paso de la paxilina, comparado con el WT, ratón que expresa BK y contribuye en las corrientes iónicas registradas.

La presencia de la proteína tdTomato se corroboró mediante microscopía de fluorescencia. Este estudio nos desveló que tdTomato se expresa en los ratones Cre⁺;Tomato^{fl/fl}. Un aspecto importante a tener en cuenta para futuros estudios, dada la poca eficiencia de la fluorescencia de tdTomato, es la posible inclusión de estudios de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra tdTomato, para incrementar la señal de fluorescencia (11).

Los resultados obtenidos pueden ser de gran relevancia para futuros estudios sobre el efecto de las mutaciones BK en la epilepsia. El uso de ratones KO condicionales podría contribuir al estudio patogénico de la enfermedad y a la creación de nuevos fármacos más efectivos contra la misma. Para ello, los resultados preliminares obtenidos serán corroborados con un mayor número de experimentos en el laboratorio receptor, que continuará la línea de trabajo.

7. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

El sistema Cre-loxP es una herramienta biológica potente, simple y efectiva para la manipulación genética de sistemas de experimentación animal. Esta estrategia nos permite la generación y selección de ratones KO condicionales de interés. En nuestro caso, la obtención del ratón KO condicional para el gen canal BK en las neuronas piramidales de corteza e hipocampo nos permitirá estudiar el efecto que puede generar la ausencia de BK en la integración sináptica.

El objetivo final del proyecto de investigación en el que se enmarca este Trabajo de Fin de Grado persigue esclarecer los roles fisiológicos y patológicos de los complejos NMDAR-BK en el cerebro de ratón, especialmente en áreas epileptogénicas. Por lo tanto, en este TFG se ha llevado acabado una primera parte, donde se ha creado una línea de ratón Cre⁺;Tomato^{fl/fl} x Tomato^{fl/fl}, corroborado mediante genotipado para luego estudiar las rodajas del ratón obtenido mediante electrofisiología y fluorescencia.

El futuro de la investigación con el sistema Cre-loxP es muy prometedor, ya que se espera, como en este trabajo, experimentos que combinen el sistema Cre-loxP con enfoques más avanzados de microscopía para visualizar y rastrear la actividad de células y tejidos específicos en tiempo real, incluyendo el uso de marcadores fluorescentes en el contexto de un organismo vivo. Estas mejoras permitirán una comprensión más profunda de la función genética y el desarrollo de la biomedicina.

8. QUÉ HE APRENDIDO CON ESTE TFG

Durante la realización de este TFG, he aprendido la importancia que tiene la investigación en el campo de la Medicina. Más allá de la formación académica que recibimos en la Facultad, centrada en signos, síntomas y síndromes clínicos, la investigación es fundamental para avanzar en el conocimiento y para desarrollar nuevas terapias y tratamientos que nos permitan prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades.

En mi caso, he tenido la oportunidad de profundizar en el funcionamiento de los canales iónicos y el gen *Kcnma1*. He aprendido lo que significa trabajar en un laboratorio, las horas que lleva conseguir resultados, y también las horas que lleva no conseguirlos. He visto de cerca la minuciosidad del trabajo, la importancia de seguir una misma estructura de trabajo, la paciencia y la dedicación que se requieren para alcanzar los resultados deseados. También he superado mi miedo a los ratones y he comprendido la importancia de los animales en la investigación.

El trabajo de investigación es un camino largo y difícil, pero es necesario para seguir avanzando y debemos darle el reconocimiento que merece.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014 Apr;55(4):475-82. doi: 10.1111/epi.12550. Epub 2014 Apr 14.
2. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet*. 2019 Feb 16;393(10172):689-701. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32596-0. Epub 2019 Jan 24.
3. Myers CT, Mefford HC. Advancing epilepsy genetics in the genomic era. *Genome Med*. 2015 Aug 25;7(1):91. doi: 10.1186/s13073-015-0214-7.
4. Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, et al. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK50785/>
5. Armas-Capote N, Maglio LE, Pérez-Atencio L, et al. SGK1.1 Reduces Kainic Acid-Induced Seizure Severity and Leads to Rapid Termination of Seizures. *Cereb Cortex*. 2020 May 14;30(5):3184-3197. doi: 10.1093/cercor/bhz302.
6. Martin-Batista E, Maglio LE, Armas-Capote N, et al. SGK1.1 limits brain damage after status epilepticus through M current-dependent and independent mechanisms. *Neurobiol Dis*. 2021 Jun;153:105317. doi: 10.1016/j.nbd.2021.105317. Epub 2021 Feb 24.
7. Kshatri AS, Gonzalez-Hernandez A, Giraldez T. Physiological Roles and Therapeutic Potential of Ca²⁺ Activated Potassium Channels in the Nervous System. *Front Mol Neurosci*. 2018 Jul 30;11:258. doi: 10.3389/fnmol.2018.00258.
8. Berkefeld H, Sailer CA, Bildl W, Rohde V, Thumfart JO, Eble S, Klugbauer N, Reisinger E, Bischofberger J, Oliver D, Knaus HG, Schulte U, Fakler B. BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling. *Science*. 2006 Oct 27;314(5799):615-20. doi: 10.1126/science.1132915.
9. Du W, Bautista JF, Yang H, Diez-Sampedro A, You SA, Wang L, Kotagal P, Lüders HO, Shi J, Cui J, Richerson GB, Wang QK. Calcium-sensitive potassium channelopathy in human epilepsy and paroxysmal movement disorder. *Nat Genet*. 2005 Jul;37(7):733-8. doi: 10.1038/ng1585. Epub 2005 Jun 5.
10. Yuan P, Leonetti MD, Pico AR, Hsiung Y, MacKinnon R. Structure of the human BK channel Ca²⁺-activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science*. 2010 Jul 9;329(5988):182-6. doi: 10.1126/science.1190414. Epub 2010 May 27.

11. Bailey CS, Moldenhauer HJ, Park SM, Keros S, Meredith AL. KCNMA1-linked channelopathy. *J Gen Physiol.* 2019 Oct 7;151(10):1173-1189. doi: 10.1085/jgp.201912457. Epub 2019 Aug 19.
12. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2013 Jun;14(6):383-400. doi: 10.1038/nrn3504.
13. Isaacson JS, Murphy GJ. Glutamate-mediated extrasynaptic inhibition: direct coupling of NMDA receptors to Ca(2+)-activated K⁺ channels. *Neuron.* 2001 Sep 27;31(6):1027-34. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00428-7.
14. Zhang J, Guan X, Li Q, Meredith AL, Pan HL, Yan J. Glutamate-activated BK channel complexes formed with NMDA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Sep 18;115(38):E9006-E9014. doi: 10.1073/pnas.1802567115. Epub 2018 Sep 4.
15. Gómez R, Maglio LE, Gonzalez-Hernandez AJ, Rivero-Pérez B, Bartolomé-Martín D, Giraldez T. NMDA receptor-BK channel coupling regulates synaptic plasticity in the barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Aug 31;118(35):e2107026118. doi: 10.1073/pnas.2107026118.
16. Tazerart S, Blanchard MG, Miranda-Rottmann S, Mitchell DE, Navea Pina B, Thomas CI, Kamasawa N, Araya R. Selective activation of BK channels in small-headed dendritic spines suppresses excitatory postsynaptic potentials. *J Physiol.* 2022 May;600(9):2165-2187. doi: 10.1113/JP282303. Epub 2022 Mar 9.
17. Young L. The Jackson laboratory. *Mol Med [Internet].* 1998. Disponible en: <https://www.jax.org/>
18. Luo L, Ambrozkiwicz MC, Benseler F, Chen C, Dumontier E, Falkner S, et al. Optimizing Nervous System-Specific Gene Targeting with Cre Driver Lines: Prevalence of Germline Recombination and Influencing Factors. *Neuron.* 2020 Apr 8;106(1):37-65.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2020.01.008. Epub 2020 Feb 5.
19. Gierut JJ, Jacks TE, Haigis KM. Strategies to achieve conditional gene mutation in mice. *Cold Spring Harb Protoc.* 2014 Apr 1;2014(4):339-49. doi: 10.1101/pdb.top069807.
20. Kim H, Kim M, Im SK, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res.* 2018 Dec;34(4):147-159. doi: 10.5625/lar.2018.34.4.147. Epub 2018 Dec 31.
21. Addgene: Cre-lox system [Internet]. Addgene.org. Disponible en: <https://www.addgene.org/collections/cre-lox/>

22. Tsien JZ, Chen DF, Gerber D, Tom C, Mercer EH, Anderson DJ, Mayford M, Kandel ER, Tonegawa S. Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell*. 1996 Dec 27;87(7):1317-26. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81826-7.
23. Flurkey K, Curren J, Leiter E, Witham B. *The Jackson Laboratory Handbook on Genetically Standardized Mice*. 2009.
24. Morris LM, Klanke CA, Lang SA, Lim FY, Crombleholme TM. TdTomato and EGFP identification in histological sections: insight and alternatives. *Biotech Histochem*. 2010 Dec;85(6):379-87. doi: 10.3109/10520290903504753. Epub 2010 Jan 29.
25. Zemen BG, Lai MH, Whitt JP, Khan Z, Zhao G, Meredith AL. Generation of *Kcnma1fl-tdTomato*, a conditional deletion of the BK channel α subunit in mouse. *Physiol Rep*. 2015 Nov;3(11):e12612. doi: 10.14814/phy2.12612.
26. Rumsby G. An introduction to PCR techniques. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2006. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16761372/>
27. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* [Internet]. 1997. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9056205/>
28. DNA extraction from agarose gels [Internet]. Igem.org. Disponible en: <https://static.igem.org/mediawiki/2019/9/96/T--Thessaly--GelExtracton.pdf>
29. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 1981 Aug;391(2):85-100. doi: 10.1007/BF00656997.
30. Whitt JP, McNally BA, Meredith AL. Differential contribution of Ca^{2+} sources to day and night BK current activation in the circadian clock. *J Gen Physiol*. 2018 Feb 5;150(2):259-275. doi: 10.1085/jgp.201711945. Epub 2017 Dec 13.