

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Biomedicina

**DISEÑO Y EXPRESIÓN DE UN
BIOSENSOR DE LA ACTIVIDAD
DE PKA CILIAR EN MODELOS
CELULARES DEL SÍNDROME
DE ELLIS VAN CREVELD**

Claudia Paradas Cuesta

Villaviciosa de Odón, 20

Mayo 2025

Título del Trabajo: DISEÑO Y EXPRESIÓN DE UN BIOSENSOR DE LA ACTIVIDAD DE PKA CILIAR EN MODELOS CELULARES DEL SÍNDROME DE ELLIS VAN CREVELD

Este trabajo ha sido realizado en IIBM-CSIC Laboratorio C-11, Departamento de fisiología. Facultad Medicina UAM.



Tutor/es: Francesc García-Gonzalo como tutor externo y Emma Muñoz Sáez como mentora interna.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer la oportunidad brindada a todo el equipo que forma el grupo de investigación del centro IIBM que dirige Francesc García Gonzalo, tanto a la investigadora contratada Raquel, por toda la paciencia y amabilidad con la que desempeña su labor, como a todos los compañeros con los que he tenido la suerte de coincidir. Ha sido una grata experiencia llena de aprendizaje.

Este trabajo está dedicado especialmente a mi familia, sin ellos nada hubiese sido posible; Papá, mamá, mi hermana Nerea y mi abuela Encarna, junto con Carolina. Gracias por haber confiado en mí incluso cuando no lo hacía yo misma.

Por último, pero no menos importante, a los profesionales docentes de la Universidad Europea, que me han aportado mucho más que conocimientos necesarios para obtener el grado. Gracias a vosotros sé que la Biomedicina es lo que me apasiona y a lo que quiero dedicarme en mi futuro. Todos y cada uno de vosotros me habéis aportado base teórica y experiencias que me han formado como futura profesional y como persona.

Emma, gracias por acompañarme en la realización de este trabajo, por tu profesionalidad y por tu empatía en todo momento, has sido una ayuda fundamental en este proceso.

Manu, Antonio... puede que no siempre recuerde todo el temario aprendido, pero no olvidaré la labor humana que he recibido por vuestra parte. Gracias a vosotros el camino hacia mis objetivos ha sido mucho más bonito.

Tabla de contenido

Resumen	1
Introducción	1
Estructura ciliar	2
Ciliopatías	2
Ellis van Creveld	3
Objetivos	6
Metodología	6
Generación pDonor-Puro- EF1 α - Δ TATA	6
Generación de pDonor-Puro- EF1 α – Δ TATA-cVASP	10
Transfección transitoria de MEFs por pDonor-Puro- EF1 α – Δ TATA-cVASP	14
Resultados y discusión	17
Enfoque ODS y sostenibilidad	17
Conclusiones	22
Limitaciones del estudio	22
Bibliografía	23
Anexos	26
Anexo I: Lista abreviaturas	26
Anexo II: Material y métodos adicionales	27
Anexo III: Mapa plásmidos	28
Anexo IV: Resultados AGEs	29
Anexo V: Materiales del laboratorio	31

Resumen

Los cilios son estructuras de gran importancia a nivel celular, pues funcionan como antenas que recogen información del ambiente, donde en su interior, se encuentran diversas señalizaciones que son de gran importancia, como la vía de señalización Hedgehog. Su principal funcionalidad se centra en el correcto funcionamiento de los genes GLI, importantes para la correcta formación del sistema nervioso en la etapa embrionaria. La ciliopatía Ellis van Creveld es provocada por fallos en el complejo proteico EVC/EVC2, cuya consecuencia es la transformación de genes GLI a su forma represiva GLIR por acción de la quinasa PKA.

En este estudio queremos generar un biosensor por clonación molecular para poder comprobar la función de PKA en fibroblastos embrionarios de ratón que son *knockout* (KO) para el complejo EVC/EVC2. Se buscará la construcción de dos sensores, ciliar y de membrana plasmática, tanto para medir la acción de PKA en el cilio como para obtener un control, respectivamente. Este sensor constará de tres partes fundamentales: Proteína que conduce al cilio (Arl13b) o a la membrana plasmática (Fyn, como control), unión a anticuerpo para la detección (EFGV), y un sustrato específico de PKA (proteína VASP). Tras evaluar su expresión transitoria a través de ensayo de inmunofluorescencia, esta se muestra correcta y viable en células, al menos de forma transitoria, por lo que el biosensor podría empezar a utilizarse en ensayos *in vitro*.

PALABRAS CLAVE: Cilios primarios, Ellis van Creveld, Hedgehog, PKA, Clonación molecular.

Introducción

Los cilios son estructuras celulares que se extienden desde la superficie de la célula y actúan como orgánulos. Podemos diferenciar cilios primarios, o también denominados sensoriales, y estructurales o móviles (1).

Los cilios primarios, que no suelen tener movilidad, se presentan normalmente como monocilios; no se agrupan entre ellos. Se encuentran en células ya diferenciadas que no tienen altas tasas de división, y su función principal consiste en actuar como receptores de señales y transmitirle información del medio extracelular a la propia célula, dando así

información química y/o mecánica (2). Están formados por canales iónicos, receptores y efectores *downstream*, por lo que son grandes reguladores tanto de homeostasis adulta como del desarrollo embrionario (1).

Estructura ciliar

Los cilios primarios nacen desde el centríolo madre del centrosoma celular (3). Su estructura se forma por un axonema formado por microtúbulos y rodeado por una membrana que se extiende desde la superficie de la célula, a la cual se queda anclado por fibras de transición. El espacio entre el cuerpo basal y el cilio se denomina zona de transición (TZ por sus siglas en inglés “*transition zone*”). Esta zona es de gran interés, pues diversos estudios tienen la hipótesis de que la cantidad y el tipo de proteínas que se encuentran en esta zona es lo que diferencia los cilios de un tipo celular a otro. Además, en esta TZ se encuentran alrededor de 115 proteínas cuya mutación, así como cualquier alteración tanto a nivel funcional como estructural en los cilios, pueden dar lugar a una amplia variedad de enfermedades que contienen un gran espectro de síntomas, son las denominadas ciliopatías (1)

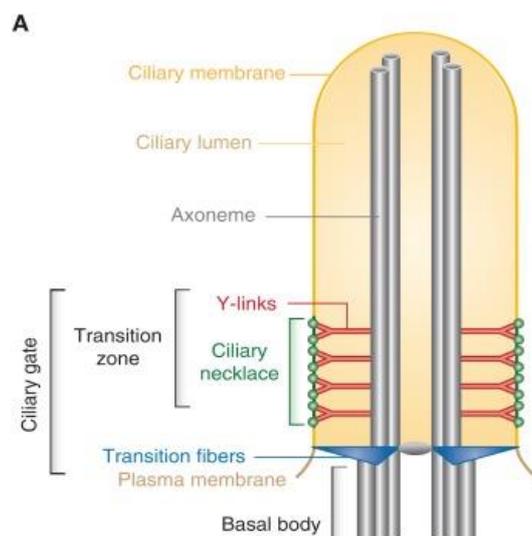


Figura 1: Esquema representativo de la estructura básica del cilio. Imagen adaptada de Garcia-Gonzalo et al. 2017 (4)

Ciliopatías

Un ejemplo de enfermedad que se clasifica como ciliopatía es el síndrome Ellis Van Creveld (EVC). Esta enfermedad es una displasia provocada por alteraciones en el

cromosoma 4, en concreto en el locus 4p16. Su origen se encuentra en los genes *EVC/EVC2*, con sus correspondientes proteínas funcionales EVC/EVC2 (5)

Este complejo heterodimérico participa en la vía de señalización de Hedgehog (Hh), la cual es una ruta muy importante de comunicación intercelular para procesos durante el desarrollo embrionario y la posterior vida adulta, así que tiene una influencia directa en el metabolismo de las células madre del organismo (6). De hecho, es una vía de señalización muy conservada en gran amplitud de especies, observándose desde el género *Drosophila* (mosca) hasta *Homo sapiens* (humanos) (7).

Las mutaciones que alteran tanto la formación como la estabilidad del complejo proteico EVC son las causantes de la enfermedad EvC, pues impiden que se acumulen en una zona específica dentro del cilio, denominada “zona EvC”(6)

Ellis van Creveld

Es en esta área de los cilios inmóviles es donde encontramos el receptor de Sonic Hedgehog (Shh), junto con otros receptores, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico o el receptor del factor crecimiento derivado de plaquetas (2)

La vía Hedgehog contiene múltiples receptores, ligandos y metabolitos necesarios para su cascada de señalización. En los cilios podemos encontrar todas las moléculas necesarias para que se inicie. Entre los más destacados encontramos las proteínas *Patched* (PTCH: ligando), *Smoothed* (SMO: efector), y el ya mencionado complejo EVC/EVC2 (4,6)

En mamíferos, se ha observado que existen factores de transcripción efectores GLI de la ruta Hh, en concreto Gli1, Gli2 y Gli3. Estas proteínas se pueden encontrar en células de las yemas que tras el desarrollo formarán los brazos y las piernas, pudiendo así explicar la polidactilia que provoca su desregulación (8).

Por otro lado, también vemos la importancia de esta vía en el desarrollo del tubo neural, el cual está íntimamente relacionado con la función de Shh y su unión a receptor. Dependiendo de la concentración de esta molécula, se llevan a cabo distintas respuestas sobre el desarrollo del sistema nervioso; cuando la concentración es alta, su función se basa en poder formar la placa del suelo, sin embargo, cuando la concentración es menor, va diferenciando los distintos precursores celulares en neuronas e interneuronas maduras (8).

Cuando no existe ligando de la cascada Hh, es decir, cuando no hay Shh, una proteína que funciona como receptor de esta vía, denominada PTCH, interactúa con el efector SMO e inhibe su transporte a los cilios primarios, ubiquitinándolo y promoviendo el funcionamiento de la maquinaria de salida ciliar (9–11).

Esto resulta en la transformación del oncogén GliFL a un represor GliR, por fosforilación y escisión provocada por la subunidad catalítica de la proteína kinasa A (PKA-C) De esta forma, GliR se transloca al núcleo y lleva a cabo una represión de la transcripción de los genes asociados a la vía Hh, reprimiendo esta ruta (9–12).

Por lo contrario, cuando Shh está presente, es capaz de unirse a PTCH, y así evitar la transformación de GliFL a GliR, liberando a SMO y permitiendo su transporte a los cilios primarios (9).

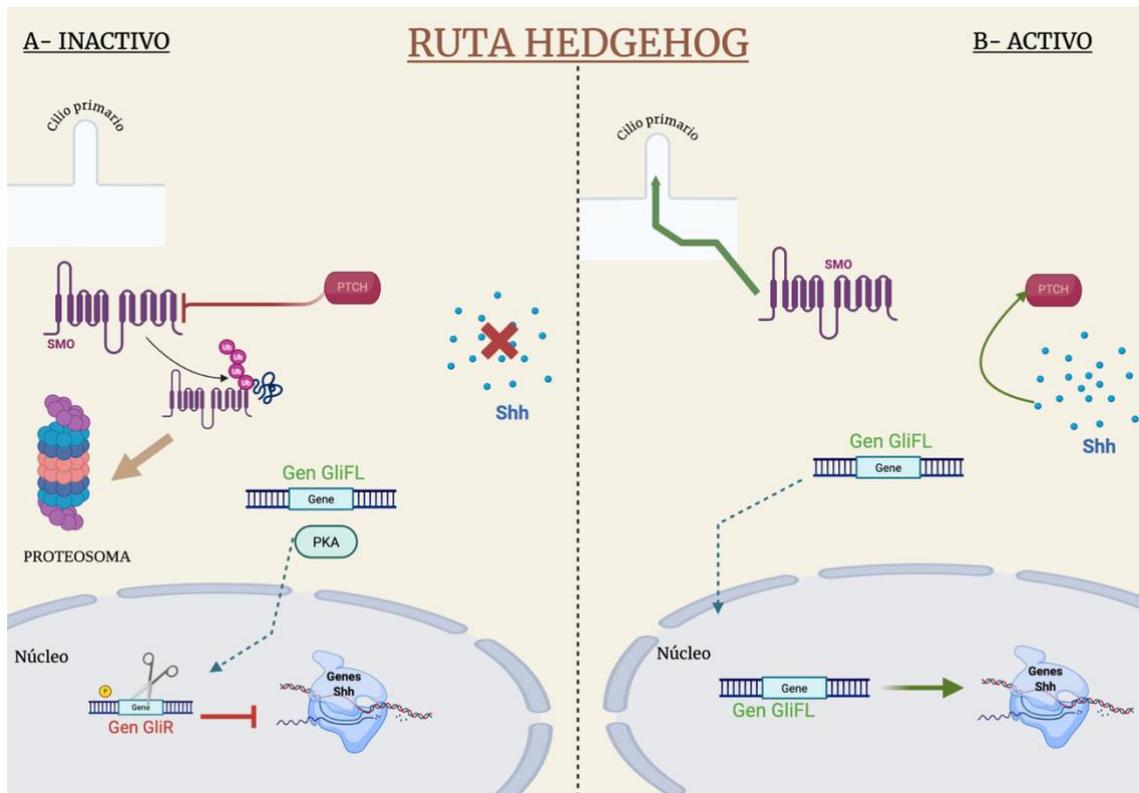


Figura 2: A. En ausencia del ligando Sonic Hedgehog (Shh) el receptor PTCH se encarga de ubiquitinar y transportar al proteosoma al receptor transmembrana Smoothened (SMO), impidiendo su transporte al cilio primario. Cuando esto ocurre, los genes GLI pasan de su forma normal (GliFL) a su forma represora (GliR) por acción de la enzima PKA, la cual fosforila y ejerce cortes en su secuencia. Así, se inhibe la transcripción de los genes encargados de esta ruta. B. En presencia de Shh, este se une a PTCH y SMO es libre para transportarse al cilio. De esta forma, los genes GliFL pueden llevar a cabo su transcripción normal en el núcleo. Paradas, C. Representación simplificada de la represión de la vía Hedgehog por PKA en ausencia del ligando Sonic Hedgehog (Shh). Figura de elaboración propia creado en BioRender.

De esta forma, los resultados de estudios de la señalización de Shh con PKA en modelos *in vivo* de pez cebra resultan en que PKA-C podría considerarse un regulador negativo de la ruta Hh (13).

En este estudio, queremos formar células con un sensor biológico para comprobar la acción de PKA en fibroblastos de embrión de ratón (MEFs por sus siglas en inglés *Mouse Embryonic Fibroblasts*) cuando es estimulada con un análogo de Shh (SAG por sus siglas *Smoothered Agonist*). Este biosensor ya ha sido generado en otros estudios y reveló interesantes resultados sobre la actividad de PKA y SMO (12).

Para formar nuestro sensor, se va a configurar dos plásmidos denominados: pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-cVASP y pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-pmVASP. El primero corresponderá a un sensor ciliar, y el segundo a un sensor plasmático.

Este sensor biológico va a constar de tres partes diferenciadas: proteína VASP (fosfoproteína estimulada por vasodilatadores, siglas en inglés “*vasodilator-stimulated phosphoprotein*”), GFP (*green fluorescent protein*) y ARL13b (proteína ciliar estructural) o Fyn (proteína característica de la membrana plasmática).

La proteína VASP es fosforilada de forma específica por PKA, GFP nos servirá como detección gracias a anticuerpos, y ARL13b es una proteína ciliar que dirigirá el sensor exclusivamente a los cilios para así conocer la actividad de PKA en esa zona en concreto. De la misma forma, Fyn conducirá el sensor hacia la membrana, detectando así PKA en esta ubicación.

Escogemos esta proteína ciliar ARL13b porque en vertebrados muestra una actividad importante, tanto a nivel de formación de los propios cilios como para la posterior señalización celular que llevan a cabo (14,15). Pertenece a la superfamilia de proteínas Ras, denominadas proteínas similares a Arf (ARL por sus siglas en inglés *Arf-like proteins*) que llevan a cabo acción de GTPasas indispensable para un transporte y transducción de señales intracelulares correcta (16,17). La proteína VASP es utilizada ya que es una diana común de la PKA (18,19), por lo que podremos detectar cuando está presente por unión a VASP, la cual se verá fosforilada cuando PKA esté activa.

La proteína Fyn es una tirosina quinasa (TK) de la familia Src que, entre otras muchas funciones, transloca a la membrana numerosas y variadas moléculas gracias a su dominio

SH4 (N-terminal), así como lleva a cabo fosforilaciones en compartimentos específicos de la propia membrana (20,21). Por lo que el sensor pmVASP deberá expresarse a lo largo de toda la membrana celular.

Objetivos

El principal objetivo es generar líneas celulares MEFs que puedan expresar los sensores cVASP y pmVASP, que estarán formados por una proteína conductora, GFP y VASP.

- 1) Generación del pDonor con promotor débil EF1 α _dTATA (Véase Anexo III Figura 1A)
- 2) Generación del biosensor en el plásmido pDonor introduciendo el sensor VASP (ciliar cVASP y plasmático pmVASP) (Véase Anexo III Figura 2A)
- 3) Transfectar MEFs *Wild type* (WT) de forma transitoria para comprobar la expresión del biosensor a través de inmunofluorescencia.

Metodología

Generación pDonor-Puro- EF1 α - Δ TATA

Amplificación del promotor débil EF1 α - Δ TATA por PCR

Para amplificar el promotor necesario para nuestro plásmido, EF1 α - Δ TATA, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuyo molde es el vector pEF1A-dTATA-mGpr75, que se encontraba generado y almacenado en el propio laboratorio.

El kit comercial usado es ADN polimerasa (Véase Tabla 5A y Tabla 6A Anexo V). Los cebadores se obtuvieron de *Integrated DNA Technologies*®: NdeI-EF1 A-dTATA_F (forward) y Sall-EF1 A-dTATA_R (reverse) (ver Anexo II Tabla 3A).

Se preparó una mix para PCR con volumen final de 30 μ L: 1.2 μ L cebadores a 10 μ M (*forward* y *reverse*), 1 μ L dNTPs 10mM, 1 μ L de molde pEF1A-dTATA-mGpr75 50 ng/ μ L, 1.5 μ L DMSO 5% final, 0.3 μ L polimerasa SuperFi 2U/ μ l, 6 μ L *Buffer* SuperFi 5X y rellenamos con Agua MiliQ hasta 30 μ L.

Se programó una PCR “*Touchdown*” en el termociclador.

Una vez terminada, se añadió 6 μL de tampón de carga de ADN 6X, por lo que cada muestra final contiene 36 μL de volumen final.

AGE y Purificación del amplicón de EF1 α – Δ TATA

Se preparó un gel de agarosa al 1% p/v y se cargaron dos pocillos con 18 μL de muestra. En otro pocillo, se cargó 4.5 μL de *Ladder* (Ver tabla Anexo V tabla 6A).

La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 30 minutos.

Una vez finalizada, se observaron las bandas (Ver figura 3A Anexo IV) y se extrajeron del gel para su purificación. El kit de purificación que se usó es NZYGelpure de Nzytech® (Véase tabla 6A Anexo V) obteniendo 30 μL de muestra.

Digestión enzimática de EF1 α – Δ TATA purificado y del vector pDonor MSC-Neo-Puro.

Para poder generar el plásmido pDonor, se necesita eliminar el promotor fuerte derivado de Citomegalovirus (CMV) que compone el vector pDonor-MCS-Neo-Puro y reemplazarlo por el promotor débil EF1 α – Δ TATA que hemos purificado.

Esta digestión es llevada a cabo por las enzimas de restricción NotI y Sall (Véase tabla 5A Anexo V) para el pDonor, mientras que para el inserto EF1 A-dTATA son NdeI y Sall (Véase tabla 5 Anexo V). Para ello, se consultó el sitio web *DoubleDigest Calculator* (Termofisher®) para conocer el tiempo de digestión y el tampón de digestión correcto. Nos recomendó 37°C de incubación y *Buffer O* (Véase Anexo V tabla 6A):

- EF1 α – Δ TATA: Finalmente se utilizó para un volumen final de 40 μL : 30 μL ADN purificado, 4 μL de tampón O 10X, 0.5 μL de cada enzima y rellenamos con Agua *milliQ* hasta completar el volumen final.
- pDonor: Se utilizó para un volumen final de 30 μL : 1.5 μL del vector, 3 μL de tampón O 10X, 0.5 μL de cada enzima de restricción 10U/ μL , y rellenamos de Agua *milliQ* hasta conseguir volumen final.

El tiempo de digestión fue de 8 horas en el caso del amplicón EF1A-dTATA y de 3 horas y 30 minutos en el caso del pDonor, ambos a 37°C en un termobloque.

AGE y Purificación de EF1 α – Δ TATA y pDonor digeridos

A ambas muestras digeridas se les añadió el tampón de carga de ADN 6x, en el caso de EF1 α – Δ TATA se le añadió 8 μL y a la muestra digerida de pDonor se le añadió 6 μL .

Se generó un gel de agarosa 1% p/v para cada muestra.

- EF1a_ΔTATA: Tenemos volumen de muestra 48 μL. Se cargaron tres pocillos con 16 μL de muestra EF1α – ΔTATA en cada uno. El primer pocillo corresponde a 4.5 μL *Ladder*
- pDonor: Volumen muestra de 36 μL. Se cargaron tres pocillos con 18 μL de muestra cada uno. El último pocillo lo ocuparon 4.5 μL de *Ladder*

Se corrió la electroforesis a 100V durante 30 minutos.

Una vez finalizada la electroforesis, se extraen las bandas del gel correspondientes a cada segmento (Ver figura 4A Anexo IV) y se purifican con el kit de purificación (Véase tabla 7A Anexo V).

Llevamos a cabo el análisis de la concentración a través de espectrofotometría con un Nanodrop y obtenemos una concentración de pDonor de 26.8 ng/μL y una concentración del inserto EF1α – ΔTATA de 53 ng/μL.

Ligación EF1α – ΔTATA y pDonor

El primer paso fue conocer la relación entre la cantidad de inserto: vector correcta para una ligación eficaz. Para ello, utilizamos la web “Promega” opción “Ligations: Molar Ratio of Insert: vector” para ratio 1:1 en base a 100 ng de vector.

Se editó la cantidad para una ratio de 10:1 y 3:1 (inserto: vector), obteniendo 100 ng de vector y 246 ng de inserto en el mix en el primer caso y 100 ng de vector y 36.9 ng de inserto en el mix del segundo.

Para llevar a cabo la ligación se utiliza el kit comercial de Thermo Scientific® de T4 Ligase 5 (Véase Tabla 5 Anexo V). Se completaron tres mixes: problema 1 (10:1), y problema 2 (3:1), y control.

En el caso de la mezcla 10:1 para un volumen final de 20 μL se utilizó: 4.64 μL inserto EF1α – ΔTATA, 2 μL Buffer 10X ligasa T4 (Tabla 6A Anexo V), 5.4 μL del vector pDonor, 1 μL de Ligasa T4 y rellenar con 8.62 μL de Agua *milliQ* para conseguir los 20 μL finales.

En la mezcla 3:1 para un volumen final de 20 μL se utilizó: 0.7 μL de inserto EF1α – ΔTATA, 2 μL Buffer 10X ligasa T4, 1 μL Ligasa T4 y rellenamos con 10.92 μL de Agua *milliQ* hasta 20 μL.

En el control, se utilizó la misma cantidad de inserto, pero introduciendo en su lugar H₂O *milliQ*.

Para llevar a cabo la ligación, se utilizó el termociclador con un programa que consistía en 30 minutos a 20°C, posteriormente un ciclo de 5 minutos a 70°C para inactivar la ligasa, y un reposo final a 10°C.

Transformación bacteriana pDonor-Puro- EF1 α - Δ TATA

Para poder clonar el plásmido, se utilizaron bacterias *E.coli* competentes de la cepa *DH5 α* . Se descongeló 2 viales que, aproximadamente, corresponden a 250 μ L. Se utilizó 5 μ L de mezcla de ligación y 50 μ L de *DH5 α* tanto en el control como en las muestras problema.

La transformación se llevó a cabo por choque térmico para poder introducir el plásmido en las bacterias competentes con unas condiciones de 1 minuto a 47°C en el termobloque y paro de la transformación insertando los viales en hielo.

Como medio de cultivo se utilizó caldo de lisogenia (LB) a pH 6.8-7.2. Las placas eran placas LB con Kanamicina (LBK. Concentración Kanamicina de 50 μ g/mL) con pH 6.8-7.2. Ambos son administrados y creados por el centro IIBM en el servicio de Medios de cultivo.

Las placas fueron sembradas por suspensión de las muestras y posterior distribución con bolas de cristal estériles a modo césped.

Se incubó *over-night* (O/N) a 37°C.

Una vez incubado, se estudian las placas y se escogen 8 colonias de ambas placas problema y se forma un cultivo en estado líquido siguiendo los siguientes pasos: Se añade a un tubo Falcon con doble cierre: 5.5 μ L del antibiótico Kanamicina y 5.5 mL de medio LB, una vez se haya generado este medio se inocula una colonia por cada tubo, obteniendo 16 tubos. Se incuban a 37°C con agitación O/N.

Preparación Minipreps pDonor-Puro- EF1 α - Δ TATA

Se prepara una miniprep por cada cultivo. Para ello, se sigue el protocolo descrito por el fabricante del kit comercial NZY Tech Miniprep (Ver tabla 7A Anexo V).

Obtenemos 50 μ L de ADN purificado por miniprep.

Se mide la concentración de material genético a través de espectrofotometría con un Nanodrop.

Digestión diagnóstica pDonor-Puro- EF1 α - Δ TATA

Se elabora una digestión diagnóstica de cada una de las Minipreps de forma similar a la realizada previamente: 0.25 μ L de SallI, 0.25 μ L de NdeI, 2 μ L de Buffer O 10X, 1000 ng de plásmido y rellenamos con agua *milliQ* hasta un volumen final de 20 μ L.

La digestión se lleva a cabo en un termobloque a 37°C durante 2 horas.

AGE diagnóstico pDonor-Puro- EF1 α - Δ TATA

Se les añaden a las 16 muestras 4 μ L de tampón de carga de ADN 6X.

Se prepara un gel de agarosa 1% (p/v) y se cargan 18 pocillos: 16 de ellos con 18 μ L de cada muestra y 2 pocillos con 4.5 μ L de *Ladder*

Se corre el gel durante 25 minutos a 110V.

Se observan los resultados del gel a través de un transiluminador con luz UV y se comprueba qué muestra/s contienen las dos bandas esperadas: la banda correspondiente al vector y la banda que corresponde al inserto EF1 α – Δ TATA.

Secuenciación pDonor-Puro- EF1 α - Δ TATA

Para comprobar que las bandas observadas son las esperadas y no corresponden a mutaciones realizadas por la polimerasa, se secuencia la muestra.

Esta secuenciación es llevada a cabo por la empresa SelectScience® gracias a su recurso denominado *LightRun*, cuyo funcionamiento se basa en una secuenciación Sanger para muestras premezcladas. Se prepara según el protocolo: 5 μ L del cebador necesario a 5 μ M, que en este caso se trata de SV40pA-long_R, y 500 ng de plásmido ajustando las muestras a un volumen final de 10 μ L con agua *milliQ*.

Generación de pDonor-Puro- EF1 α – Δ TATA-cVASP

Amplificación de cVASP y pmVASP por PCR

Una vez obtenemos el vector pDonor con el promotor en su interior, iniciamos el proceso para conseguir el biosensor ciliar y plasmático. Para ello, amplificamos VASP ciliar (cVASP) y plasmático (pmVASP), a partir de moldes diferentes, por medio de PCR. El kit comercial usado es ADN polimerasa. Los cebadores se obtuvieron de *Integrated DNA Technologies*®:

- Mix PCR de cVASP: 1.2 μ L cebadores a 10 μ M (*foward* SallI-kozak-Arl13b_F2 y *reverse* NotI-X-VASP_R, Ver Anexo II tabla 4), 1 μ L dNTPs 10mM, 1 μ L de

molde pgLAP5-EF1a-dTATA-Arl13b-GFP-VASP a 50 ng/μL, 1.5 μL DMSO 5% final, 0.3 μL polimerasa, 6 μL *Buffer* SuperFi 5X y rellenamos con Agua MiliQ hasta 30 μL.

- Mix PCR de pmVASP: 1.2 μL cebadores a 10 μM (*forward* SallI-kozak-Fyn_F y *reverse* NotI-X-VASP_R, Ver Anexo II tabla 5), 1 μL dNTPs 10mM, 1 μL de molde pgLAP5-EF1a-Fyn-GFP-VASP a 50 ng/μL, 1.5 μL DMSO 5% final, 0.3 μL polimerasa SuperFi 2U/μl (Invitrogen®), 6 μL *Buffer* SuperFi 5X y rellenamos con Agua MiliQ hasta 30 μL

Se programó ambas PCR “*Touchdown*”.

Una vez terminada, se añadió 6 μL de tampón de carga de ADN 6X por lo que cada muestra final contiene 36 μL de volumen final.

AGE y purificación de los amplicones cVASP y pmVASP

Se elaboró un gel agarosa 1% p/v y se cargaron 4 pocillos con 18 μL cada uno, dos de ellos correspondientes a cVASP y los otros dos corresponden a pmVASP. El primer pocillo correspondía a 4.5 μL de Ladder. Se corrió a 100V durante 30 minutos.

Se deben observar 2 bandas de 2111 pb (cVASP amplificado) y 2 bandas 873 pb (pmVASP amplificado) en el gel a través de luz UV en un transiluminador (Ver imagen 5A Anexo IV).

Se extrajeron las bandas del gel para su posterior purificación, proceso para el que se usó el kit comercial NZYGelpure de Nzytech ® obteniendo 30 μL de muestra.

Digestión enzimática de cVASP, pmVASP y pDonor-EF1α-ΔTATA por Sall y NotI

Esta digestión es llevada a cabo por las enzimas de restricción NotI y Sall (Véase anexo V tabla 5A) para ambos insertos, así como para el vector. Para ello, se consultó el sitio web *DoubleDigest Calculator* (Termofisher) para conocer el tiempo de digestión y el tampón de digestión correcto. Nos recomendó 37°C de incubación y *Buffer* O:

- cVASP y pmVASP: Se utilizó para un volumen final de 40 μL: 30 μL ADN purificado, 4 μL de tampón O 10X, 0.5 μL de cada enzima y rellenamos con Agua *milliQ* hasta completar el volumen final.

- pDonor-EF1 α - Δ TATA: Se utilizó para un volumen final de 30 μ L: 2 μ L del vector, 3 μ L de tampón O 10X, 0.5 μ L de cada enzima de restricción 10U/ μ L, y rellenamos de Agua *milliQ* hasta conseguir volumen final.

El tiempo de digestión fue de 6 horas a 37°C en un termobloque. Al finalizarla, se añadió Buffer carga ADN 6x a cada muestra, 8 μ L para la correspondiente al pDonor y 6 μ L a las que se corresponden con cVASP y pmVASP.

AGE y purificación de cVASP, pmVASP y pDonor-EF1 α - Δ TATA digeridos

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% p/v en el que se cargaron los pocillos con las distintas muestras (2 pocillos cargados con 18 μ L de muestra pDonor y 3 pocillos para cada VASP cargados con 16 μ L).

Se corrió a 100V durante 30 minutos.

Se observaron las bandas a luz UV en el transiluminador para comprobar que correspondían a los tamaños esperados: cVASP 2080 pb, pmVASP 859 pb y pDonor 6151 pb (Véase imagen 6A Anexo IV).

Se recortaron las bandas y se purificaron siguiendo el protocolo comercial del kit de purificación NZYGelpure de Nzytech®.

Una vez purificadas, se midieron en el Nanodrop® para medir su concentración:

- cVASP = 49'8 ng/ μ L
- pmVASP = 21'2 ng/ μ L
- pDonor-EF1 α - Δ TATA = 33'4 ng/ μ L

Ligación cVASP – pDonor y pmVASP-pDonor

Todas las ligaciones se llevan a cabo según el kit comercial de Thermo Scientific® de T4 Ligase 5 weiss U/ μ L. Se preparan 4 mixes totales: cVASP-pDonor, pmVASP-pDonor y sus respectivos controles. Las ligaciones se llevan a cabo en una ratio 3:1 (inserto:vector) con 100 ng de vector en todas ellas.

- Mix cVASP- pDonor-EF1 α - Δ TATA: 2 μ L de Buffer ligasa T4 10X, 1 μ L ligasa T4, 3 μ L de vector, 2 μ L de inserto cVASP digerido, y rellenamos con agua *milliQ* hasta un volumen final de 20 μ L. Para su control se rellena con agua *milliQ* la cantidad de inserto.
- Mix pm-VASP-pDonor-EF1 α - Δ TATA: 2 μ L de Buffer ligasa T4 10X, 1 μ L ligasa T4, 3 μ L de vector, 2 μ L de inserto cVASP digerido, y rellenamos con agua *milliQ*

hasta un volumen final de 20 μ L. Para su control se rellena con agua *milliQ* la cantidad de inserto.

La ligación se lleva a cabo en un termobloque, con 30 minutos a 22°C y un ciclo posterior de 70°C durante 5 minutos y reposo en hielo hasta la transformación bacteriana.

Transformación bacteriana pDonor-Puro- EF1 α - Δ TATA-VASP

Se utilizaron *E. coli* DH5 α competentes (Véase tabla 6A Anexo V) que se encuentran en el laboratorio.

Se utilizan cuatro eppendorf de 1,5 mL para poder llevar a cabo la transformación de las cuatro muestras: cVASP, cVASP control, pmVASP y pmVASP control.

En cada eppendorf, se inoculan 5 μ L del producto de ligación correspondiente y 50 μ L de bacterias. Se resuspende con toques mecánicos manuales.

Se incuban en hielo durante 20 minutos y se realiza un choque térmico para introducir el plásmido en las bacterias que consta de 1 minuto a 42°C en el termobloque e inmediatamente después, se colocan 1 minuto en hielo.

Se le añade a cada eppendorf 500 μ L de LB bajo la llama para tener esterilidad y se incuban a 37°C en el termobloque durante 1 hora.

Tras la incubación, se centrifugan durante 1 minuto a velocidad máxima y se absorbe sobrenadante hasta que queda en el eppendorf aproximadamente 200 μ L. Se resuspende el pellet y se siembran las placas LBK con método césped mediante bolas de cristal.

Se incuban *O/N* a 37°C.

Una vez completada la incubación, se observan las placas y se escogen 3 colonias de ambas placas problema y se forma un cultivo en estado líquido siguiendo los siguientes pasos: Se añade a un tubo Falcon con doble cierre: 5.5 μ L del antibiótico Kanamicina y 5.5 mL de medio LB. Después, se inocula una colonia por cada tubo, obteniendo 6 tubos. Se incuban a 37°C con agitación *O/N*.

Purificación y digestión diagnóstica pDonor-Puro- EF1 α - Δ TATA-VASP

Tras la incubación de 18 horas de los cultivos líquidos, se procede a su purificación según el kit comercial de NZY Tech Miniprep ®. Resulta en 6 muestras de ADN individuales: 3 de cVASP-pDonor y 3 de pmVASP-pDonor.

Se lleva a cabo la digestión diagnóstica con NotI y Sall durante aproximadamente 3 horas con un mix conformado por: 0.25 μ L de Sall, 0.25 μ L de NotI, 2 μ L de Buffer O 10X, 1000 ng de plásmido y se rellena con agua *milliQ* hasta un volumen final de 20 μ L.

Una vez finalizada, se cargan las muestras con 4 μ L de tampón de carga de ADN 6X.

AGE diagnóstica pDonor-Puro- EF1 α - Δ TATA-VASP

En un gel de agarosa 1% p/v se cargan 18 μ L de muestra en cada pocillo y así como 4.5 μ L de Ladder.

Se corre a 105 V durante 25 minutos. Una vez finalizada se observan las bandas que aparecen a través de luz UV en el transiluminador.

Secuenciación pDonor-Puro- EF1 α - Δ TATA-VASP

Esta secuenciación es llevada a cabo por la empresa SelectScience® gracias a su recurso denominado *LightRun*, cuyo funcionamiento se basa en una secuenciación Sanger para muestras premezcladas. Se prepara según el protocolo: 5 μ L del cebador necesario a 5 μ M, que en este caso se trata de SV40pA-long_R, y 500 ng de plásmido ajustando las muestras a un volumen final de 10 μ L con agua *milliQ* en ambas muestras, al igual que se hizo con pDonor-EF1 α - Δ TATA.

Transfección transitoria de MEFs por pDonor-Puro- EF1 α – Δ TATA-cVASP

Transfección celular

Se descongela 1 placa de 100p de MEFs *WT*. El medio utilizado es DMEM con 10% de SFB, generado por el centro IIB.

Se realizan un total de 3 pases previos a la transfección. Tras esos pases, se procede a sembrar la placa de 24 pocillos, organizados como muestra la figura 3.

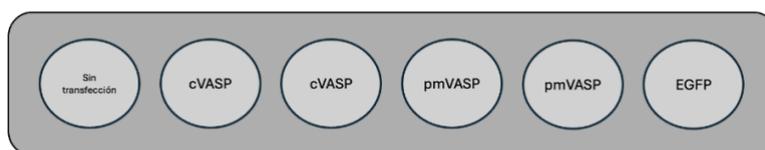


Figura 3: Esquema representativo de la placa de 24 pocillos donde se realizará la siembra y transfección del biosensor. Pocillo 1 no se transfecta como control negativo, los pocillos 2 y 3 se transfectan con el biosensor ciliar, los pocillos 4 y 5 corresponderán al biosensor plasmático, y el último pocillo se transfecta con EGFP como control positivo.

Cada pocillo se transfectará con el plásmido correspondiente, según la tabla 1.

Tabla 1: Plásmidos a transfectar.

Pocillo	Plásmido	Concentración	500 ng/pocillo	1000 ng (2 pocillos)
2,3	pDonor-EF1 α - Δ TATA-cVASP	1007 ng/ μ L	0.5 μ L	1 μ L
4,5	pDonor-EF1 α - Δ TATA-pmVASP	839 ng/ μ L	0.6 μ L	1.2 μ L
6	pEGFP	680 ng/ μ L	0.73 μ L	-

Se lava cada pocillo 2 veces con 500 μ L de agua *milliQ*, dejando 2-3 minutos entre cada lavado.

En la placa p100, las células se lavan con 250 mL de PBS 1X. Se añade 1 mL de tripsina y se dejan unos minutos en el incubador a 37°C para acelerar el proceso de tripsinización. Una vez transcurrido el tiempo, se observan en el microscopio y se confirma que se han tripsinizado, se resuspenden en un tubo Falcon de 15 mL estéril con medio DMEM con 10% de SFB. Se añade en un eppendorf 60 μ L de células y 60 μ L de colorante vital azul de tripán. Posteriormente se carga la cámara de Neubauer (10 μ L por cámara) y se realiza el contaje.

Se diluyen las células en DMEM con 10% de SFB a una concentración final de $2.5 \cdot 10^5$ células/mL en un nuevo tubo Falcon y se siembra 1 mL por pocillo.

Se prepara la mezcla de transfección según el kit de Jet OPTIMUS®, tal como se indica en la tabla 2, en un eppendorf de 1.5 mL. Se deja reposar la mezcla durante 10 minutos, y una vez pasado este tiempo, se añade la mezcla a los pocillos.

Tabla 2: Mix para la transfección según el protocolo de jetOPTIMUS®

Transfección p24	X1 pocillo	X4 pocillos
jetOPTIMUS <i>buffer</i>	50 μ L	200 μ L
ADN (ver Tabla 1)	500 ng	2000 ng
Reactivo jetOPTIMUS	1 μ L	4 μ L

Pasadas 4 horas desde la transfección, se realiza un cambio con medio fresco. Se deja reposar 24 horas y, tras ese reposo post-transfección, se realiza un ayuno. Este ayuno se

llevará a cabo con medio DMEM al 0.02% de SFB, y se dejarán 24 horas. Esto provocará que la célula desarrolle de forma correcta los cilios.

Inmunofluorescencia

Tras el ayuno, se fijan las células con 300 μ L/pocillo de solución de PBS1X+PFA y se dejan incubar 5 minutos a *room temperature* (RT). Tras aspirar los restos, se vuelve a fijar con 300 μ L/pocillo de metanol (-20°C) durante 3 minutos en nevera, y se aspira una vez transcurrido el tiempo. Se añaden 300 μ L/pocillo de solución de bloqueo: PBS 1X, 0.1% Tritón X-100, 2% *Donkey serum*, 0.02% Azida sódica y se deja 30 minutos a RT.

Tabla 3: Mix anticuerpos primarios

Anticuerpo primario	Dilución	Origen	7 pocillos = 140 μ L
Rb-EGFP (verde)	1:200	Rabbit	0.7 μ L
Ms-AcTub (rojo)	1:10000 (Predilución 1:100)	Mouse IgG2b	1.4 μ L
Ms- γ Tub (morado)	1:300	Mouse IgG2a	0.46 μ L

La incubación con anticuerpos primarios se lleva a cabo en una cámara húmeda formada por: Papel *Whatman* mojado con agua *milliQ*, Parafilm y los cubres-objetos. Se depositan 20 μ L de mix en cada uno y se incuba durante 3 horas a RT. Una vez que finaliza esta incubación, se devuelven los cubres a la placa de 24 pocillos. Se lavan 5 veces con 500 μ L de PBS 1X dejando 2-3 minutos entre lavados.

Tabla 4: Mix anticuerpos secundarios (Se prepara en hielo y con oscuridad)

Anticuerpos secundarios	Dilución	Color	Volumen final 3mL
Alexa Flour 488 goat anti-Rabbit	1:10000	Verde	0.3 μ L
Alexa Flour 555 goat anti-mouse IgG2b	1:10000	Rojo	0.3 μ L
Alexa Flour 647 donkey anti-mouse IgG2a	1:10000	Morado	0.3 μ L
DAPI 2000X	1X	Azul	1.5 μ L

Se añade 300 μL /pocillo de mix anticuerpos secundarios y se incuba durante 1 hora en oscuridad a RT. Una vez transcurre la incubación, se aspira los restos de anticuerpos y los pocillos se lavan 5 veces con 500 μL de PBS 1X dejando 2 minutos entre lavados.

Se realiza el montaje en el portaobjetos con ayuda de ProLongTM (Véase Anexo V tabla 6A) y se guarda hasta su observación al microscopio en oscuridad a RT *O/N*, después se almacenará a 4°C en la nevera.

Resultados y discusión

Enfoque ODS y sostenibilidad

De acuerdo con el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD) de la Organización de las Naciones Unidas (ONU), este trabajo busca cumplir los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) propuestos. El principal ODS que se cumple es el número 3 “Salud y bienestar”, pues esta investigación indaga sobre un grupo de enfermedades raras que afectan a parte de la población y de las que no conocemos aún tratamientos asequibles y fáciles de producir, de forma que se podría avanzar en el enfoque clínico y mejorar la calidad de vida de las personas que sufren ciliopatías, así como encontrar una posible cura a su enfermedad. Además, el ODS número 9 puede alcanzarse si se encuentran nuevos caminos de investigación, pues podría aumentar el número de empleados en investigación, así como el impulso de la industria biomédica en busca de técnicas clínicas y biotecnológicas. Además, podría ser posible la colaboración entre distintos sectores (Biológico, biotecnológico y biomédico, entre otros) lo que podría llegar a formar una industria sostenible. También es posible participar en investigaciones científicas globales, donde los países desarrollados podrían colaborar en avances y reducir así la brecha biomédica que existe en otros países en vías de desarrollo.

Incluso es posible satisfacer el ODS 9 “Reducción de desigualdades”, pues conseguir un tratamiento o cura puede disminuir la dificultad que afrontan las personas que sufren enfermedades raras, a la hora de conseguir una terapia o diagnóstico, en comparación con las personas que sufren enfermedades comunes.

Digestión por NdeI y Sall. AGE diagnóstica pDonor-Puro- EF1 α – Δ TATA.

Como indica la Figura 4, tras correr el gel, podemos observar que sólo en una de las 16 muestras totales aparecen las bandas que se esperan; promotor EF1 α – Δ TATA (1204 pb)

y vector digerido (4893 pb). En este caso, corresponde a la muestra 1 de la placa con ratio 3:1 (señalada en amarillo en la figura 5). Los demás pocillos muestran la banda del vector digerido, pero en la mayoría de los casos sigue apareciendo el promotor de CMV (tamaño 392 pb) mientras que en otras solo se observa el vector sin inserto.

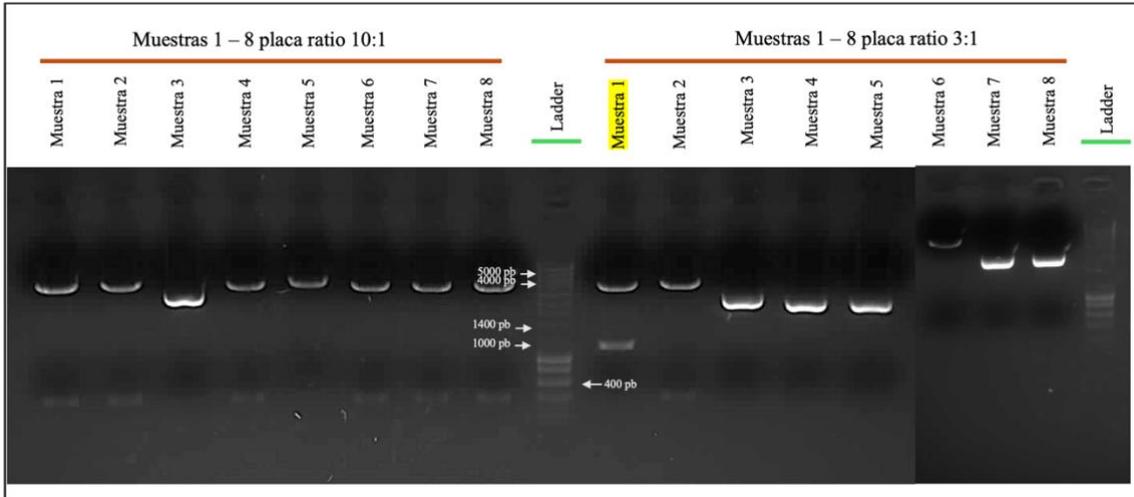


Figura 4: AGE 1% observado a luz UV. Observamos que el vector correctamente digerido (4893 pb) como el promotor (1204 pb) aparecen en la muestra 1 de la placa con ratio 3:1. El promotor de CMV (392 pb) sigue estando presente en las muestras 1,2,4,6,7 y 8 de la placa ratio 10:1 y en las muestra 2 de la placa 3:1. En las que no aparece este promotor fuerte, tampoco aparece el promotor de interés, excepto en la muestra 1 de la placa 3:1, donde sí encontramos ambas bandas.

Este resultado no ha sido del todo sorprendente, pues la clonación molecular es un proceso que puede aparentar sencillez, pero está repleto de posibles inconvenientes que no son fáciles de prever. Una de las más difíciles de superar es la unión de extremos de forma aleatoria, lo que produce un infinito número de combinaciones entre las que se encuentran, en una pequeña fracción, las deseadas (22). En este caso, la ligación con una ratio 3:1 resultó ser más efectiva. Hay estudios que comentan que, siguiendo la teoría, cuando un inserto debe incluirse en un único sitio de restricción, es recomendable el uso de mayor cantidad de vector. Sin embargo, esta teoría puede variar en función del vector y sus fosforilaciones (23), lo que puede dificultar aún más el cálculo óptimo de cada fracción.

También debe ser mencionado como aspecto limitante que, el método de purificación con membrana de sílice, a pesar de ser fiable y utilizado con alta frecuencia en laboratorios, puede dar lugar a errores a la hora de recortar la banda del gel de agarosa, pues es un proceso que requiere de una alta precisión para no perder ADN de interés mientras se realiza (24).

Secuenciación pDonor-Puro- EF1 α – Δ TATA

Tras la secuenciación nos confirman que pDonor está completo y el promotor EF1 α - Δ TATA está incluido en él. Esta secuenciación es un método ampliamente utilizado en los laboratorios de investigación para este tipo de monitoreos, pues es fiable y de un protocolo sencillo, además de no tener un coste elevado (25). Este resultado nos aporta la confirmación de que las bandas que hemos observado en el gel corresponden exactamente al pDonor-Puro y que en su interior se encuentra el promotor EF1 α - Δ TATA.

Digestión por NotI y Sall. AGE diagnóstica de pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-cVASP y pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-pmVASP

Tras correr el gel podemos observar que todas las muestras de pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-cVASP muestran las bandas correspondientes al pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-cVASP, mientras que en las muestras de pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-pmVASP la muestra número 3 no contiene el sensor VASP (Ver figura 5).

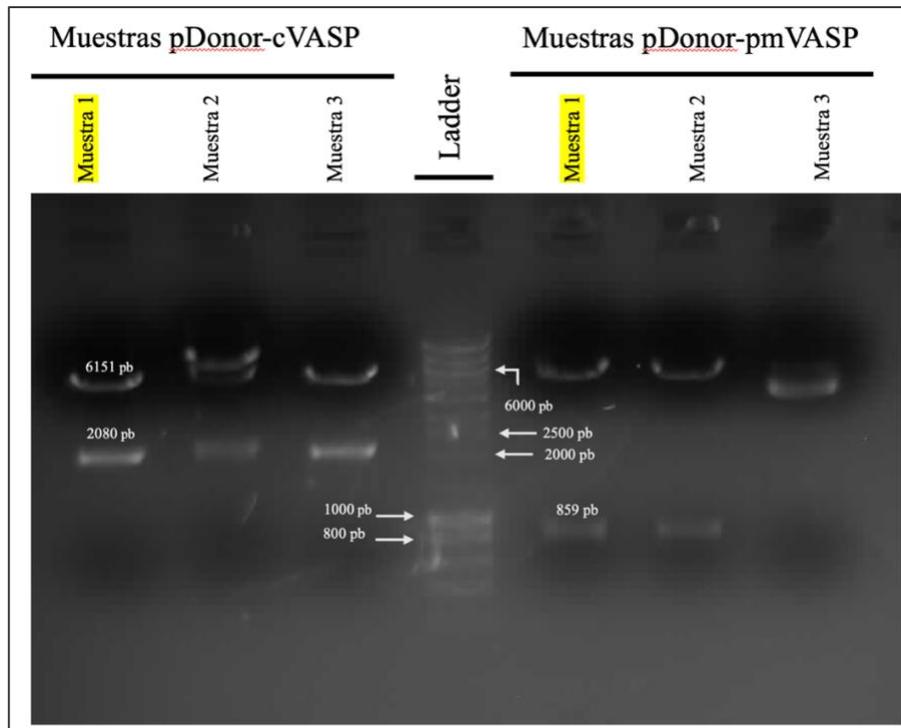


Figura 5: AGE diagnóstica de pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-cVASP y pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-pmVASP. En los tres primeros pocillos del gel observamos los resultados de las muestras correspondientes al pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-cVASP, en el pocillo número 4 tenemos el marcador molecular "ladder" y en los tres últimos pocillos corresponden a las tres muestras de pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-pmVASP. En blanco se señalan los pesos moleculares que corresponden a las bandas de interés.

La ligación 3:1 sigue siendo funcional en este segundo paso del proyecto, por lo que los resultados son los esperados. Es cierto que, como en el paso anterior, el método de purificación sigue siendo a través de membrana de sílice y el factor humano a la hora de recortar las bandas puede provocar errores que alteren los resultados, como en el caso de la muestra 3 de pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-pmVASP (24). Otro aspecto a tener en cuenta es que se han escogido un número reducido de colonias, por lo que el hecho de que encontremos el plásmido completo en 5 de 6 muestras se puede considerar un desempeño excepcional.

Secuenciación pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-cVASP y pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-pmVASP

La secuenciación nos confirma que ambos plásmidos contienen pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-pmVASP y pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-cVASP, completando así nuestro objetivo de construir los plásmidos necesarios para incluir el sensor en células.

Como en el resultado de la secuenciación anterior, se puede afirmar que las bandas observadas en el gel no corresponden a mutaciones, pues este tipo de secuenciación es fiable y segura (25).

Inmunofluorescencia

Los resultados del ensayo de inmunofluorescencia muestran la expresión de cVASP en el cilio y la expresión de pmVASP en la membrana plasmática, lo que quiere decir que, el sensor tiene una expresión correcta en MEFs WT, como se observa en la Figura 6.

Es importante señalar que, en el caso del control negativo, el color verde que observamos es fondo de la imagen.

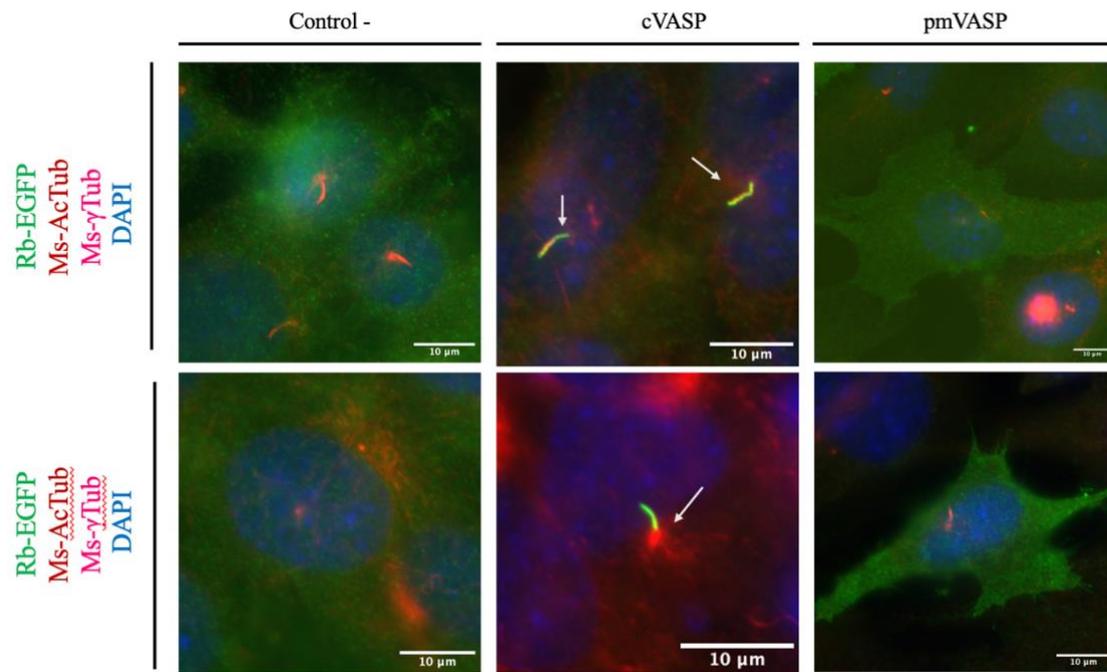


Figura 6: Imágenes representativas de la expresión de *cVASP* y *pmVASP*. El color verde detecta la presencia del sensor por EGFP. El color rojo detecta la tubulina acetilada que corresponde a los cilios, mientras que la gamma-tubulina corresponde a los centriolos de estos. En el control negativo no se transfirió con ningún plásmido. Las barras de escala se corresponden con 10 μm .

En otros estudios donde también se ha usado este biosensor, también ha demostrado estos resultados en una transfección estable de NIH/3T3 (26). Esto ocurre gracias a que la proteína Arl13b que compone el sensor es indispensable para la elongación de la membrana ciliar, tanto de cilios móviles como inmóviles, por lo que su expresión es indudablemente fuerte en esta estructura celular en comparación con otras ubicaciones (27).

En el caso de *pmVASP*, su translocación a la membrana es correcta gracias a la proteína Fyn que forma el biosensor. Esta proteína contiene por sí misma suficientes señales para trasladar a proteínas a la membrana plasmática, en específico, gracias a su región N-terminal. Esta región también es la responsable de que la propia Fyn se traslade a esta zona de la célula (20).

Sin embargo, no se observa gran cantidad de cilios en las células. Lo que puede deberse a que la predilución que se realiza del anticuerpo que marca la tubulina acetilada puede haberse realizado incorrectamente, ya que la privación de suero es un método altamente utilizado en investigación para la ciliogénesis (28).

Conclusiones

El proceso de clonación molecular de plásmidos ha sido efectuado con éxito, pues ambos objetivos han sido alcanzados.

El diseño de pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA ha llevado a cabo diversas modificaciones durante el proceso de ejecución, pues el promotor de CMV ha presentado una fuerte resistencia a ser digerido. Este detalle ha podido ser, en última instancia, un gran limitante para conseguir que el promotor débil se incluya en el pDonor-Puro, de forma que el proyecto ha sufrido un retraso importante.

A la hora de generar el segundo objetivo, es decir, el plásmido que actuará como biosensor, ha sido más sencillo. La construcción del pDonor-Puro-EF1 α - Δ TATA-VASP, tanto ciliar como de la membrana plasmática, ha sido más eficaz y veloz.

La transfección transitoria nos da evidencias concluyentes sobre la localización del biosensor para las que está diseñado, así como que la célula lo expresa de forma correcta. El biosensor está listo para su uso en investigación, pero se debe seguir el proyecto de forma que se pueda comprobar su eficacia en líneas de MEFs, tanto WT como KO para el gen EVC, para así valorar su función de poder observar o cuantificar la actividad de la enzima quinasa en la enfermedad EvC. Se

Limitaciones del estudio

En este estudio la principal limitación ha sido el plazo de tiempo para poder conseguir los objetivos, pues la construcción de un plásmido es un proceso que requiere de paciencia y experiencia del personal, ya que existen diversas variables que no son fáciles de prever. Además, la amplificación del promotor EF α - Δ TATA ha sido un proceso paulatino, pues se han dado diversos errores durante el primer período de tiempo debido a que se estaba utilizando un molde resultante de una colaboración con otro laboratorio. Los resultados de estas amplificaciones no eran concluyentes, pues no se conseguía unir el promotor al plásmido, lo que conllevó que durante semanas se estuvieran realizando PCRs con distintas modificaciones sin obtener el resultado esperado. Tras la secuenciación de este molde, se observó que no contenía la delección en la caja TATA. Tras esta noticia, se pudo cambiar el molde y ya el clonaje siguió su curso normal.

Esta interferencia ha resultado en un notable retraso a la hora de avanzar en el proyecto, sin embargo, ha sido de gran utilidad conocer el verdadero contenido del molde para futuros proyectos del laboratorio.

Bibliografía

1. Mill P, Christensen ST, Pedersen LB. Primary cilia as dynamic and diverse signalling hubs in development and disease. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2025 Feb 5];24(7):421. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7615029/>
2. Horani A, Ferkol TW. Understanding primary ciliary dyskinesia and other ciliopathies. *J Pediatr* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2025 Feb 5];230:15. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8690631/>
3. Anvarian Z, Mykytyn K, Mukhopadhyay S, Pedersen LB, Christensen ST. Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2025 Mar 26];15(4):199. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6426138/>
4. Garcia-Gonzalo FR, Reiter JF. Open Sesame: How Transition Fibers and the Transition Zone Control Ciliary Composition. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2025 Feb 13];9(2):a028134. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5287074/>
5. Thomas DC, Moorthy JD, Prabhakar V, Ajayakumar A, Pitchumani PK. Role of primary cilia and Hedgehog signaling in craniofacial features of Ellis–van Creveld syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2022 Mar 1;190(1):36–46.
6. Barbeito P, Martin-Morales R, Palencia-Campos A, Cerrolaza J, Rivas-Santos C, Gallego-Colastra L, et al. EVC-EVC2 complex stability and ciliary targeting are regulated by modification with ubiquitin and SUMO. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2023 [cited 2025 Feb 6];11:1190258. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10413113/>
7. Manikowski D, Kastl P, Schürmann S, Ehring K, Steffes G, Jakobs P, et al. C-Terminal Peptide Modifications Reveal Direct and Indirect Roles of Hedgehog Morphogen Cholesteroylation. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2021 Jan 12 [cited 2025 Feb 13];8:615698. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7835520/>
8. Caspary T, Larkins CE, Anderson K V. The Graded Response to Sonic Hedgehog Depends on Cilia Architecture. *Dev Cell*. 2007 May 8;12(5):767–78.
9. Ma R, Kutchy NA, Chen L, Meigs DD, Hu G. Primary cilia and ciliary signaling pathways in aging and age-related brain disorders. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2021

- Feb 1 [cited 2025 Feb 12];163:105607. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9280856/>
10. Walker MF, Zhang J, Steiner W, Ku PI, Zhu JF, Michaelson Z, et al. GRK2 kinases in the primary cilium initiate SMOOTHENED-PKA signaling in the Hedgehog cascade. *PLoS Biol* [Internet]. 2024 Aug 1 [cited 2025 Feb 13];22(8):e3002685. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11322411/>
 11. Zhang Y, Beachy PA. Cellular and molecular mechanisms of Hedgehog signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2023 Sep 1 [cited 2025 Feb 13];24(9):668–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36932157/>
 12. Nguyen TD, Konjikusic MJ, Castillo LM Del, Reiter JF. Smoothened inhibition of PKA at cilia transduces Hedgehog signals. *bioRxiv* [Internet]. 2025 Apr 17 [cited 2025 Apr 24];2025.04.01.646243. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2025.04.01.646243v2>
 13. Hammerschmidt M, Bitgood MJ, McMahon AP. Protein kinase A is a common negative regulator of Hedgehog signaling in the vertebrate embryo.
 14. Cevik S, Hori Y, Kaplan OI, Kida K, Toivenon T, Foley-Fisher C, et al. Joubert syndrome Arl13b functions at ciliary membranes and stabilizes protein transport in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* [Internet]. 2010 Mar 22 [cited 2025 Feb 19];188(6):953. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2845074/>
 15. Chen L, Xie X, Wang T, Xu L, Zhai Z, Wu H, et al. ARL13B promotes angiogenesis and glioma growth by activating VEGFA-VEGFR2 signaling. *Neuro Oncol* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2025 Feb 19];25(5):871. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10158193/>
 16. Pasqualato S, Renault L, Cherfils J. Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for ‘front–back’ communication. *EMBO Rep* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2025 Feb 19];3(11):1035–41. Available from: <https://www.embopress.org/doi/10.1093/embo-reports/kvf221>
 17. Fan Y, Esmail MA, Ansley SJ, Blacque OE, Boroevich K, Ross AJ, et al. Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome. *Nature Genetics* 2004 36:9 [Internet]. 2004 Aug 15 [cited 2025 Feb 19];36(9):989–93. Available from: <https://www.nature.com/articles/ng1414>
 18. Gertler FB, Niebuhr K, Reinhard M, Wehland J, Soriano P. Mena, a relative of VASP and *Drosophila* enabled, is implicated in the control of microfilament

- dynamics. *Cell* [Internet]. 1996 Oct 18 [cited 2025 Feb 25];87(2):227–39. Available from: <https://www.cell.com/action/showFullText?pii=S0092867400813410>
19. Benz PM, Frömel T, Laban H, Zink J, Ulrich L, Groneberg D, et al. Cardiovascular Functions of Ena/VASP Proteins: Past, Present and Beyond. *Cells* [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2025 Feb 25];12(13). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37443774/>
 20. Wolven A, Okamura H, Rosenblatt Y, Resh MD. Palmitoylation of p59fyn is reversible and sufficient for plasma membrane association. *Mol Biol Cell* [Internet]. 1997 [cited 2025 May 15];8(6):1159. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC305721/>
 21. Feuillet V, Semichon M, Restouin A, Harriague J, Janzen J, Magee A, et al. The distinct capacity of Fyn and Lck to phosphorylate Sam68 in T cells is essentially governed by SH3/SH2-catalytic domain linker interactions. *Oncogene*. 2002;21(47):7205–13.
 22. Dardel F. Computer simulation of DNA ligation: determination of initial DNA concentrations favouring the formation of recombinant molecules. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1988 Mar 11 [cited 2025 Apr 3];16(5 Pt A):1767. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC338170/>
 23. Revie D, Smith DW, Yee TW. Kinetic analysis for optimization of DNA ligation reactions. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1988 Nov 11 [cited 2025 Apr 3];16(21):10301–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2848221/>
 24. Matsumura I. Why Johnny Can't clone: Common Pitfalls and Not So Common Solutions. *Biotechniques* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2025 Apr 3];59(3):4–13. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2144/000114324>
 25. Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J Vet Diagn Invest* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2025 May 8];32(6):767. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7649556/>
 26. Nguyen TD, Konjikusic MJ, Castillo LM Del, Reiter JF. Smoothed inhibition of PKA at cilia transduces Hedgehog signals. *bioRxiv* [Internet]. 2025 Apr 17 [cited 2025 May 15];2025.04.01.646243. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2025.04.01.646243v2>

27. Dilan TL, Moye AR, Salido EM, Saravanan T, Kolandaivelu S, Goldberg AFX, et al. ARL13B, a Joubert Syndrome-Associated Protein, Is Critical for Retinogenesis and Elaboration of Mouse Photoreceptor Outer Segments. *The Journal of Neuroscience* [Internet]. 2019 Feb 20 [cited 2025 May 15];39(8):1347. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6381253/>
28. Yamamoto Y, Mizushima N. Autophagy and Ciliogenesis. *JMA J* [Internet]. 2021 Jul 20 [cited 2025 May 15];4(3):207. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8355725/>

Anexos

Anexo I: Lista abreviaturas

ARL: Arf-Like proteins

Arl13b: GTPasa 13B similar al factor de ribosilación de ADP

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

EvC: Ellis Van Creveld

EFGV: Enhanced Green Fluorescence Protein

GLI: Glioma-associated oncogen

GLIFL: Gli-full length

GLIR: Gli-repressor

Hh: Hedgehog

KI: Knock-in

KO: Knock-out

MEFs: Mouse Embryonic Fibroblasts

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible

ONU: Organización de Naciones Unidas

PFA: Paraformaldehído

PKA: Proteína Kinasa A

PKA-C: Subunidad catalítica PKA

PNUD: Programa de Naciones Unidas por el Desarrollo.

PTCH: Mediador Patched

SAG: Sonic hedgehog Agonist

SFB: Suero Fetal Bovino

Shh: Sonic Hedgehog

SMO: Smoothened

RT: Room temperature

TZ: Transition zone

VASP: Vasodilatador-stimulated protein

WT: Wild-type

Anexo II: Material y métodos adicionales

Tabla 1A: Componentes gel agarosa 1% pequeño (14-15 pocillos)

Componente	Cantidad
Agarosa	0,7 gramos
TAE 1X	70 mL
SYBR-Safe (10000X)	1,75 µL (1X)

Tabla 2 A: Componentes gel de agarosa 1% grande (28-30 pocillos)

Componente	Cantidad
Agarosa	1 gramo
TAE 1X	100 mL
SYBR-Safe (10000X)	2,5 µL (1X)

Tabla 3 A: Cebadores para amplificar EF1a-dTATA

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
SalI-EF1A-dTATA_R3	5' AAAAGTCGAC TCAC GACACCTGAAATGGA AGAAAAAACTTTGA ACCACTGTCTGAGG-3'	67,8
NdeI-EF1A-dTATA_F	5' AAAACATATG CGTG AGGCTCCGGTGCCCGT CAGTGG -3'	70

En verde se señala la zona de la enzima de restricción correspondiente y en azul la zona de anclaje al ADN.

Tabla 4 AII: Cebadores para amplificar ARL13B-GFP-VASP

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
NotI-X-VASP_R	5' AAAA GCGGCCG CTTAGGC TGGTGGGCGCCGGCGTT-3'	77,2
SalI-kozak-Arl13b_F2	5' AAAA GTCGAC GGAATTAGCT TGGTACACCATGTTCAGTCTG ATGGCCAGTTGCTGCGG-3'	70,9

En **verde** se señala la zona de la enzima de restricción correspondiente y en **azul** la zona de anclaje al ADN.

Anexo III: Mapa plásmidos

Figura 1A: Mapa plásmido pDonor-Puro-EF1A-dTATA

pDonor-Puro-EF1A-dTATA revised
6082 bp

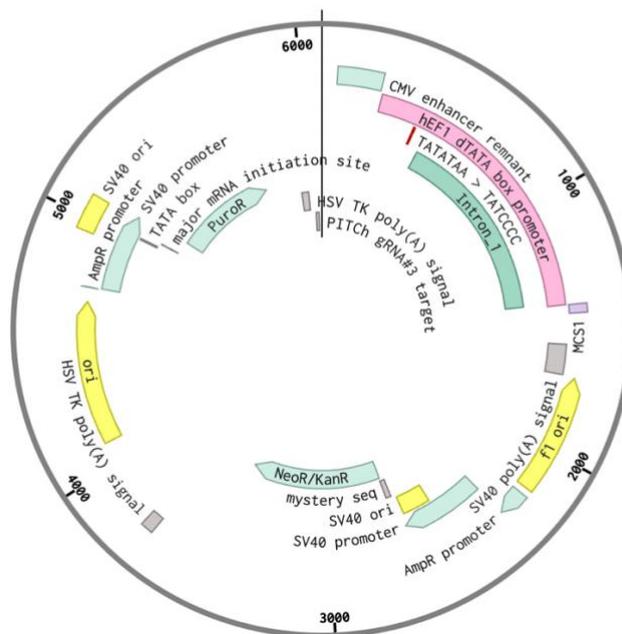
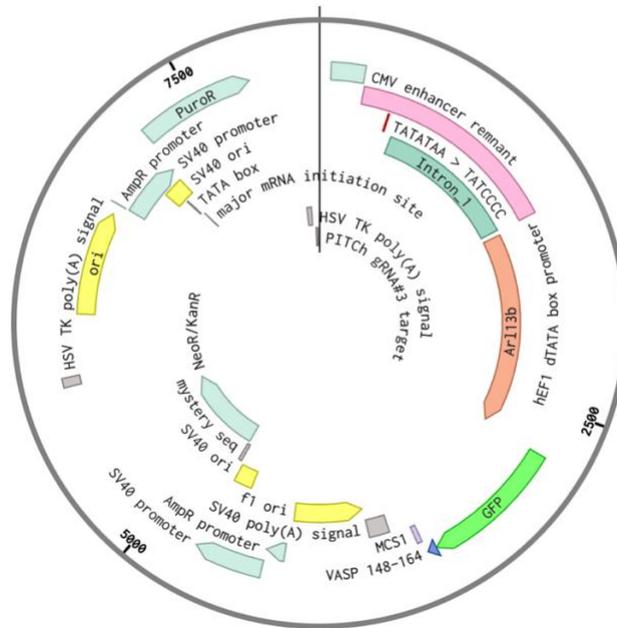


Figura 2A: Mapa plásmido pDonor-Puro-EF1A-dTATA-ciliaVASP

pDonor-Puro-EF1A-dTATA-ciliaVASP revised
8171 bp



Anexo IV: Resultados AGEs

Figura 3A: Resultado AGE de la PCR de EF1a_dTATA

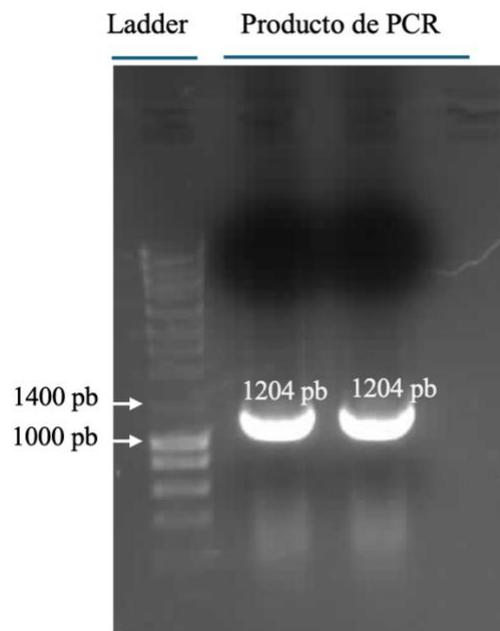


Imagen 4A: Resultado AGE de la digestión enzimática de EF1a_dTATA por NdeI y SalI

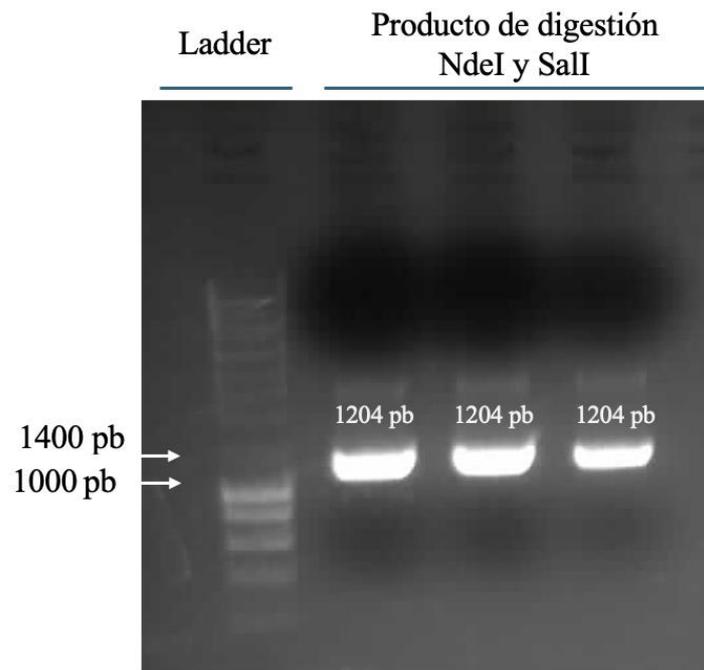


Imagen 5A: Resultado AGE de PCR de cVASP y pmVASP

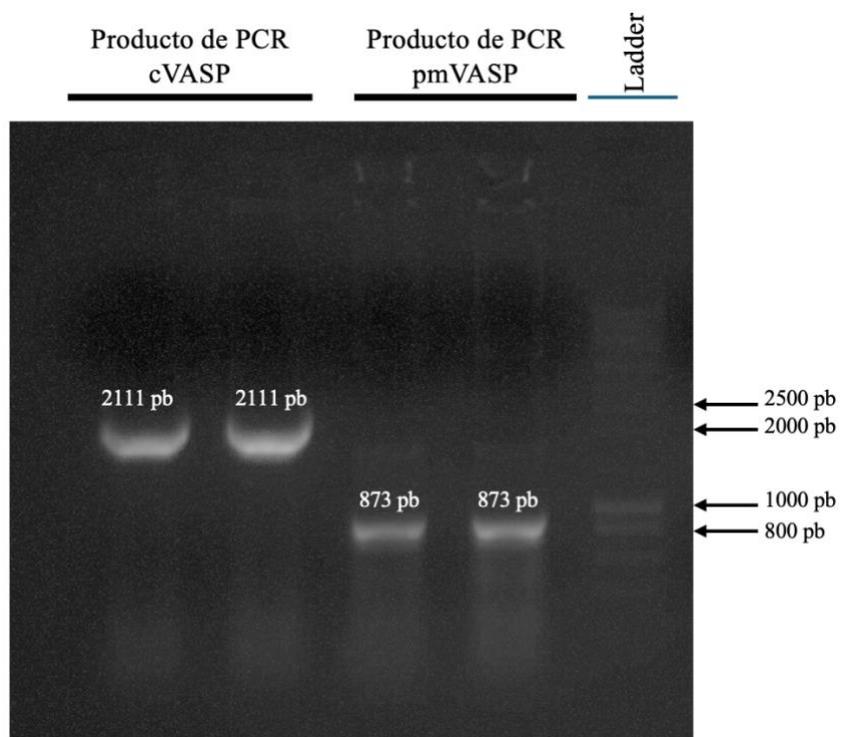
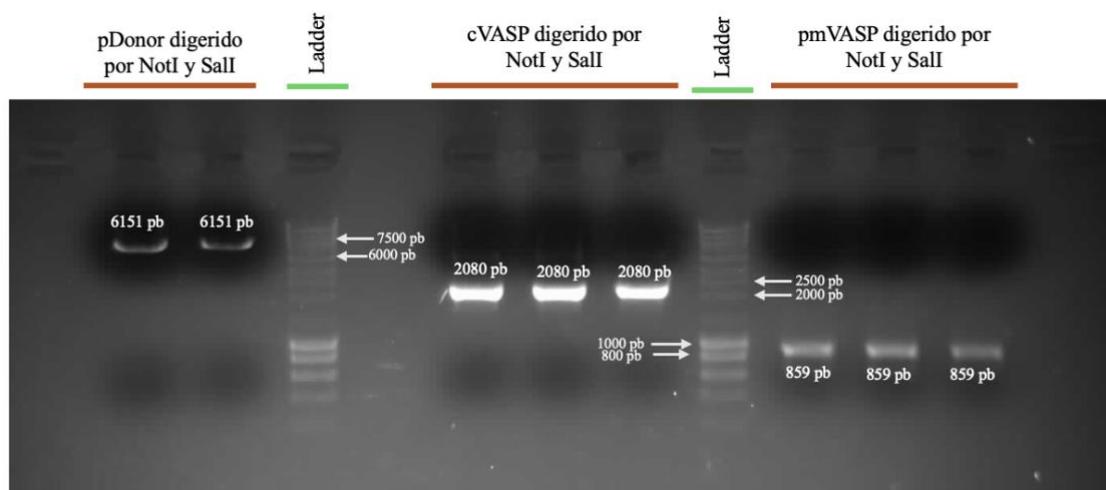


Imagen 6A: Resultado AGE de la digestión enzimática de cVASP, pmVASP y pDonor por NotI y Sall.



Anexo V: Materiales del laboratorio

Tabla 5A: Enzimas

ENZIMA	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
NotI	TermoFisher Scientific ®	ER0595
Sall	TermoFisher Scientific ®	ER0641
NdeI	TermoFisher Scientific ®	ER0581
SuperFi II ADN polimerasa	TermoFisher Scientific ® Invitrogen ®	12361010
T4 ADN Ligasa	TermoFisher Scientific ®	EL0016

Tabla 6A: Tampones y químicos utilizados

QUÍMICO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Tampón SuperFi	TermoFisher Scientific ® Invitrogen ®	12361010
Tampón de carga de ADN	FisherScientific ®	11541575

Tampón O	TermoFisher Scientific ®	BO5
Ladder III	Nzytech®	MB04401
Tampón T4 ADN Ligasa	TermoFisher Scientific ®	EL0014
Medio de montaje ProLong™ Gold	FisherScientific ® Invitrogen™	11559306
Bacterias <i>K12</i> DH5α	Servicio de Medios de cultivo IIBM	Genotipo <i>F-</i> , ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rK-</i> , <i>mK+</i>), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ -, <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>

Tabla 7A: Materiales del laboratorio

EQUIPO	CASA COMERCIAL	MODELO
Termociclador	Tecne ®	Prime Thermal Cycler 3PRIMEG/02
Termobloque	TermoScientific®	Drybath Adv 1blk 200-240V
Kit purificación Minipreps	Nzytech®	NZYMiniprep MB01002
Kit purificación Agarosa	Nzytech®	NZYGelPure MB01102
Sistema de electroforesis en gel	Bio-Rad ®	PowerPac™ Basic Supply (Ref 1645050)

Tabla 8A: Anticuerpos primarios utilizados en la inmunofluorescencia

ANTICUERPO PRIMARIO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Anti-EGFP (rabbit polyclonal)	Proteintech®	50430 - 2 - AP
Anti- acetylated α -tubulin (mouse monoclonal)	Sigma-- Aldrich (Merck) ®	T7451 (clon 6 - 11B - 1)
Anti- γ -tubulin (mouse monoclonal)	Santa Cruz Biotechnology ®	sc- 17787

Tabla 9A: Anticuerpos secundarios utilizados en la inmunofluorescencia

ANTICUERPO SECUNDARIO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Alexa Fluor 488 donkey anti- rabbit IgG (donkey polyclonal)	Thermo Fisher®	A21206
Alexa Fluor 555 goat anti- mouse IgG2b (goat polyclonal)	Thermo Fisher®	A21147
Alexa Fluor 647 goat anti- mouse IgG2a (goat polyclonal)	Thermo Fisher®	A21241