

UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE
PREGRADO

“Generación de líneas celulares estables knock-out para PRPK mediante
CRISPR/CAS9”

Seminario de Titulo entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de
los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

MANUEL I. MUÑOZ GONZÁLEZ

Director del Seminario de Titulo:
Dr. Christian González-Billault

marzo 2023

Santiago - Chile

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr(a). MANUEL I. MUÑOZ GONZÁLEZ.

“Generación de líneas celulares estables knock-out para PRPK mediante CRISPR/CAS9”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Director Seminario de Titulo: Dr. Christian González-Billault

Comisión Revisora y Evaluadora:

Presidente Comisión: Dr. Elias Utreras Puratich

Evaluador: Dr. Alejandro Roth Metcalfe

Santiago de Chile,

Índice de contenidos

Índice de contenidos.....	1
Índice de tablas.....	1
Índice de figuras.....	1
Figuras suplementarias (Anexo).....	1
Lista de abreviaturas.....	1
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	1
PRPK en contexto de TCTC.....	4
Roles relacionados a cáncer para PRPK.....	6
PRPK en contexto de citoesqueleto.....	7
CRISPR en neuroblastoma y células neuronales.....	10
Hipótesis.....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos.....	14
Materiales y métodos.....	15
Cultivo celular de líneas SH-SY5Y y HEK.....	15
Lipofección y constructos CRISPR.....	15
Electroporación.....	16
Modificaciones al protocolo CRISPR OriGene.....	16
Selección con Puromicina.....	17
Imágenes en vivo para eficiencia de selección.....	17
Western Blotting.....	18
Genotipificación por PCR.....	20
Diferenciación.....	21
Inmunofluorescencia.....	22
Análisis de imágenes.....	23
Resultados.....	24
Puesta a punto de transfecciones.....	24
CRISPR.....	24
Eficiencia de la selección desde clones.....	24
Presencia del marcador de selección en todos los clones.....	27

Presencia de PRPK en todas las líneas clonales.....	28
Diferenciación y morfología de neuritas	29
Screening de Rabs.....	30
Discusión.....	33
Viabilidad de las líneas <i>knock-out</i>	33
Cambios en la dinámica de diferenciación	36
Futura perspectiva metodológica	39
Conclusiones.....	41
Bibliografía	42
Anexo	49

índice de tablas

Tabla 1. Interactores conocidos de PRPK	9
Tabla 2. Secuencias guías usadas.....	16
Tabla 3. Partidores usados para genotipificación de la región en torno al target para CRISPR.....	20
Tabla 4. Medios usados para diferenciación de células SH-SY5Y.....	21

Índice de figuras

Figura 1. Complejo TCTC y modelo estructural de PRPK.....	3
Figura 2. Pruebas de transección en líneas SH-SY5Y.....	26
Figura 3. Muestra de líneas clonales mostrando GFP post-selección. A. Imágenes en vivo	27
Figura 4. PRPK en líneas clonales obtenidas de células modificadas.....	28
Figura 5. Cambios en la diferenciación de células SH PRPK-KD. Las líneas mostraron una transformación más rápida hacia una morfología celular diferenciada, marcada por la presencia de dos procesos principales. Este cambio estuvo acompañado por una disminución en la expresión de GFP, lo que es consistente con una disminución en la síntesis de proteínas. La línea SH-23 mostró una mayor proporción de diferenciación cuando se trató con ácido retinoico, en comparación con las líneas SH-WT y SH-22. Al evaluar el papel de PRPK en la elongación del axón, no se observaron diferencias significativas en la longitud de la neurita mayor entre las líneas.....	30
Figura 6. Alteraciones en la expresión de Rabs producto de <i>Knock-down</i> de PRPK en SH-SY5Y.....	32
Figura 7. Alteraciones en la expresión de Rabs producto de <i>Knock-down</i> de PRPK en HEK293.....	32
Figuras suplementarias (Anexo)	
Figura Suplementaria 1. Funciones conocidas de PRPK.....	49
Figura Suplementaria 2. Pruebas de anticuerpos contra PRPK.....	51
Figura Suplementaria 3. Puesta a punto de partidores en regiones CRISPR de PRPK. El amplicon esperado se marca en el rectángulo rojo.	51

Lista de abreviaturas

Varios complejos y proteínas tienen múltiples nombres, en vista de cambios desde su descubrimiento original a la función aceptada actualmente, por lo que se especifica el nombre usado finalmente.

Usada	Siglas	Significado
	PRPK	P53 Related Protein Kinase
PRPK	TP53RK	TP53 Reactive Kinase
	TPRK	TP53 Regulating Kinase
TPRKB	TPRKB	TPRK Binding protein
	CGI-121	Comparative Gene Identification study 121
TCTC	TCTC	Threonyl-Carbonyl Transferase Complex
	EKC	Endopeptidase-like Kinase Chromatin-associated
	KEOPS	Kinase, Endopeptidase and Other Proteins of small Size
GAMOS		Galloway-Mowat Syndrome
UPR		Unfolded Protein Response
DNA		Deoxyribonucleic Acid
RNA		Ribonucleic Acid
tRNA		Transference RNA
gRNA		Guide RNA
CRISPR		Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat
NHEJ		Non-Homologous End Joining
RNP		Ribonucleoprotein
KO		<i>Knock-out</i>
KD		<i>Knock-down</i>
WT		Wild-Type
SH		SH-SY5Y, en contexto de referirse a líneas <i>knock-down</i> . Ej. SH-01
RA		<i>Retinoic Acid</i> , Acido Retinoico

Resumen

Este trabajo describe la creación y caracterización de líneas de neuroblastoma humano SH-SY5Y *knock-out* para PRPK (*P53 Related Protein Kinase*), una kinasa poco caracterizada con un papel relacionado con la regulación de la elongación del axón en etapas tempranas del desarrollo neuronal. El gen PRPK se interrumpió mediante la inserción de marcadores de selección en la región codificante del primer exón PRPK utilizando la metodología CRISPR, lo que impidió la expresión de la proteína. Aunque no se logró la eliminación completa, se generaron múltiples líneas con reducción estable de PRPK, las cuales fueron validadas mediante Western-blot y genotipificación. Estas líneas celulares exhibieron un marcado efecto negativo sobre la proliferación celular, un efecto positivo sobre la diferenciación celular inducida por ácido retinoico, y alteraciones en la expresión de proteínas Rabs, las cuales están asociadas con el tráfico de vesículas y la elongación de neuritas. El efecto sobre la proliferación y posible letalidad en las inactivaciones completas sugieren la esencialidad de la PRPK en neuroblastomas, respaldado por observaciones en organismos modelo y otras líneas celulares. El efecto sobre la expresión de Rabs se observó de manera similar en una línea KO completa en HEK293, de manera consistente con lo observado en SH-SY5Y, indicando un rol conservado. En conclusión, la eliminación de PRPK en las líneas celulares SH-SY5Y tuvo efectos significativos en la proliferación y diferenciación celular, así como en la expresión de proteínas Rabs involucradas en el tráfico de vesículas y la elongación de neuritas. Estos resultados sugieren que la PRPK desempeña un papel fundamental en el tráfico de vesículas durante el desarrollo celular, y justifican una mayor investigación para investigar las posibles implicaciones clínicas de estos hallazgos.

Abstract

This work describes the creation and characterization of human neuroblastoma SH-SY5Y lines *knock-out* for PRPK (*P53 Related Protein Kinase*), a poorly characterized kinase with a role related to the regulation of axon elongation in early stages of neuronal development. The PRPK gene was disrupted by the insertion of selection markers into the coding region of the first PRPK exon using CRISPR methodology, thereby preventing protein expression. Although complete knock-out was not achieved, multiple lines with stable PRPK reduction were generated and validated by western-blot and genotyping. These cell lines exhibited a marked negative effect on cell proliferation, a positive effect on retinoic acid-induced cell differentiation, and alterations in the expression of Rabs proteins, which are associated with vesicle trafficking and neurite elongation. The effect on proliferation and possible lethality on complete knockouts may suggest the essentiality of PRPK in neuroblastomas, as supported by observations in model organisms and other cell lines. The effect on Rabs expression was similarly observed in a complete KO line in HEK293, consistently with that observed in SH-SY5Y, indicating a conserved role. In conclusion, the knock-out of PRPK in SH-SY5Y cell lines had significant effects on cell proliferation and differentiation, as well as on the expression of Rabs proteins involved in vesicle trafficking and neurite elongation. These results suggest that PRPK plays a critical role in vesicle trafficking during cell development, and further research is warranted to investigate the potential clinical implications of these findings.

Introducción

P53 Related Protein Kinase (PRPK), originalmente identificada por su secuencia en levadura (gen YGR262c) como una kinasa asociada con eventos de gemación, ha sido clasificada en la familia piD261 (261 residuos). A pesar de su amplia conservación evolutiva, que indica una función ancestral (Figura 1A), PRPK permanece pobremente caracterizada (Beenstock et al., 2020; Berginski et al., 2020; Goswami et al., 2019; Li et al., 2021; Wu et al., 2020).

El primer sustrato propuesto para la PRPK humana fue la proteína P53 (Abe et al., 2001). Sin embargo, desde entonces se ha determinado que PRPK no interactúa directamente con P53, y actualmente el único sustrato directo conocido es Survivin (Zykova et al., 2018). Esta falta de secuencias de reconocimiento de sustrato complica aún más la búsqueda de nuevos sustratos (Stocchetto et al., 1997). Adicionalmente, la función canónica de una PRPK es la de una ATPasa regulando la actividad de KEOPS, lo que aumenta la complejidad de comprender su función y sus posibles aplicaciones.

PRPK ha sido principalmente asociada a la síntesis de tRNAs, en contexto de TCTC (*Threonyl-Carbamoyl Transferase Complex*) como un regulador de la unidad catalítica OSGEP (*O-sialoglycoprotein endopeptidase*), pero también presenta funciones asociadas con regulación de citoesqueleto, evidenciadas en su interacción con MAP1B (*Microtubule-associated protein 1B*) y Rab35, colocalización con ARP2/3 (complejo *Actin-related protein 2/3*), y efecto en dinámica de podocitos en cánceres metastásicos (Abe et al., 2006; Villarroel-Campos et al., 2016; Braun et al., 2017).

Estructuralmente, PRPK se compone de dos lóbulos, denominados lóbulo-C y lóbulo-N, los cuales interactúan con OSGEP y TPRKB (*TPRK (PRPK) Binding*), respectivamente.

En condiciones normales, el dominio C-terminal, que es intrínsecamente desordenado, se encuentra integrado dentro del sitio catalítico del complejo TCTC y el sitio activo de OSGEP, regulando la actividad de este último, mediante su actividad ATPasa. PRPK se distribuye principalmente en el citoplasma, pero posee una señal de localización nuclear, y se ha observado su migración a este bajo condiciones de estrés oxidativo, y sobreexpresión de la misma PRPK (Abe et al., 2001). Respecto a modificaciones post-traduccionales, PRPK posee múltiples sitios de fosforilación que no han sido del todo especificados, exceptuando Ser250, el cual es fosforilado por AKT1 () y TOPK () (Facchin et al., 2007; Zykova et al., 2017). Esta fosforilación se considera necesaria para la activación de PRPK, relacionándose con inducción de cancerogénesis y aumento de migración (Figura 1C). Interesantemente, este sitio se encuentra ocluido en contexto de TCTC, sugiriendo que puede tener un rol en la estabilidad del complejo (Figura 1B).

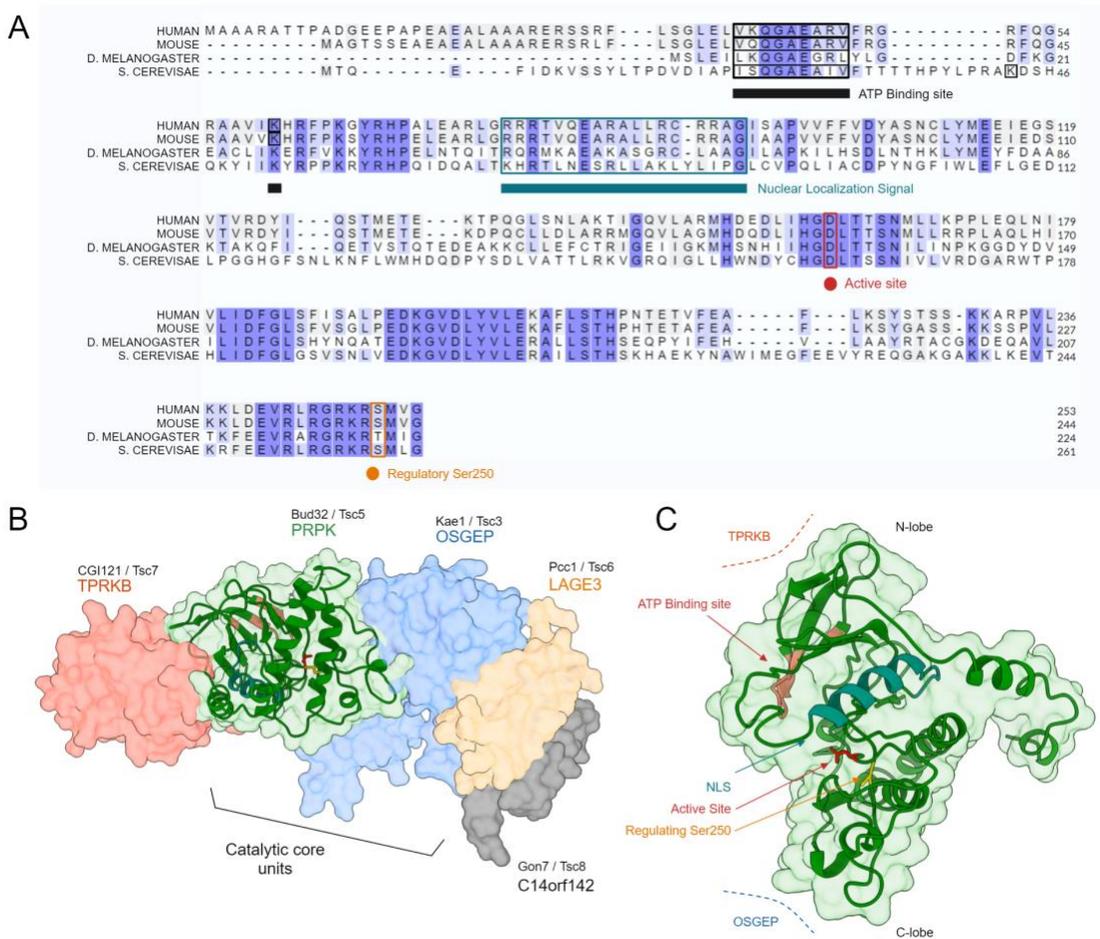


Figura 1. Complejo TCTC y modelo estructural de PRPK. **A.** PRPK se conserva a lo largo de múltiples reinos de vida, mostrando un origen ancestral, y muestra conservación funcional. Secuencias de proteínas humanas, de ratón, moscas y levaduras alineadas con ClustalO. El color indica la identidad en los ejemplos y los cuadros anotan los dominios conservados. **B.** Estructura y componentes de TCTC. El identificador principal es el aceptado para los componentes humanos, seguido de *S. cerevisiae* y *Drosophila*. La unidad catalítica central está compuesta por PRPK (actividad ATPasa asociada con la regulación de la reacción), OSGEP (componente de dimerización estructural) y LAGE3 (cataliza la reacción de transferencia de fracción treonil-carbamóil). TPRKB actúa como un regulador alostérico, se une al ARNt no modificado y forma un complejo que luego se une a los otros componentes para la modificación del ARNt. C14orf142 posiblemente soporta la unidad catalítica OSGEP. **C.** Características principales de PRPK. La estructura carece de las secuencias de reconocimiento de sustrato. Si bien PRPK tiene una señal de localización nuclear, reside principalmente en el citoplasma. Se ha observado acumulación nuclear bajo estrés oxidativo y otras condiciones anormales. El sitio de fosforilación de Ser250 está altamente conservado a lo largo de eucariotas, y su modificación parece ser esencial para la función de PRPK como kinasa, mostrando una correlación con la fosforilación de P53 inducida por PRPK. Como se muestra, este residuo parece estar oculto en el contexto de KEOPS.

PRPK en contexto de TCTC

La mayor parte de la información conocida sobre PRPK es en contexto de TCTC, también denominado KEOPS (*Kinase, Endopeptidase, and Other Proteins of Small size*) o EKC (*Endopeptidase-like Kinase Chromatin-associated*) por los grupos que realizaron paralelamente las caracterizaciones iniciales de este. TCTC realiza la modificación N⁶-threonylcarbonyl adenosine (T⁶A) de tRNAs del tipo ANN, la cual estabiliza la estructura del tRNA-anticodón previniendo la formación de un puente de hidrogeno interno entre A37 y U33. Esta modificación es esencial en múltiples linajes de organismos, explicando porque el complejo es conservado desde archaica hasta eucariotas (Koonin, 2003; Liebeskind et al., 2016).

Este complejo se compone de cinco subunidades ordenadas de forma lineal: TPRKB, PRPK, OSGEP, LAGE3 y GON7. TPRKB (*TPRK Binding protein*) fue descubierta en levaduras usando estudios de co-precipitación, usando PRPK como cebo (Miyoshi et al., 2003). Actualmente se describe como un regulador alostérico del complejo, siendo su función postulada la captura del tRNA inmaduro para así asociarlo al resto de los componentes. Al igual que PRPK, se ha encontrado que esta proteína es esencial en cánceres carentes de P53, y el *knock-down* de esta puede evitar metástasis (Goswami et al., 2019), lo que puede ser parte de la explicación del efecto de PRPK independiente de P53. Se ha postulado que TPRKB puede formar un dímero estable con PRPK, separados del resto de TCTC, y que este par permitiría mantener la actividad kinasa de PRPK (Beenstock et al., 2020). La subunidad catalítica, OSGEP, se encuentra conservada en todos los organismos conocidos, perteneciendo a un grupo de cerca de 60 genes universalmente conservados (Hecker et al., 2009; Koonin, 2003). LAGE3 cumple una función de dimerización del complejo (Beenstock and Sicheri, 2021; Mao et

al., 2008). GON7 ha sido menos caracterizada, actuando posiblemente como un regulador de OSGEP, encontrándose sólo en eucariontes (Arrondel et al., 2019; Wan et al., 2017). Recientemente se ha formulado un mecanismo molecular para TCTC en levaduras (Beenstock et al., 2020), en el cual CGI-121 (TPRKB siendo su ortólogo en humano) inicia la modificación del tRNA formando un complejo con este, el cual luego se une al complejo mayor formado por Bud32-Kae1-Pcc1 (ortólogos humanos PRPK-OSGEP-LAGE3). Aquí, la actividad ATPasa de Bud32 actúa como un regulador de Kae1, la unidad catalítica del complejo, hasta que el tRNA está correctamente orientado para la modificación T⁶A por parte de Kae1. Concordante con lo anteriormente descrito, Pcc1 (LAGE3) mantiene una función estructural. Este modelo es coherente con estructuras cristalográficas obtenidas para el dímero TPRKB-PRPK, donde la actividad kinasa de PRPK se ve impedida dentro de TCTC (Li et al., 2021), pero permanece viable en el dímero PRPK-TPRKB.

Fallas a los componentes de TCTC usualmente causan deficiencias en el crecimiento y proliferación celular (Arrondel et al., 2019; Braun et al., 2017; Kisseleva-Romanova et al., 2006), o incluso letalidad en organismos (Ibar et al., 2013; Braun et al., 2017). En moscas, se ha reportado que PRPK, OSGEP y LAGE3 conforman parte de las unidades esenciales de TCTC, es decir mutaciones en cualquiera de estas tres proteínas generan un fenotipo letal, a diferencia de solo un fenotipo deficiente como es el caso de mutaciones a TPRKB y GON7 (Arrondel et al., 2019). En humanos, mutaciones asociadas a componentes de TCTC y YRDC se relacionan al síndrome de Galloway-Mowat (GAMOS), una enfermedad autosomal caracterizada por nefropatía y síndrome nefrótico, migración neuronal anormal, microcefalia, y deterioro cognitivo (Arrondel et al., 2019). A nivel molecular, usando como modelo podocitos humanos, deficiencias en

PRPK resultaron en una inhibición de la síntesis temprana de proteínas, disminución de la proliferación celular, activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (*Unfolded Protein Response*, UPR) con estrés del Retículo Endoplasmático (ER), activación los sistemas de degradación proteosomal asociados al ER, y un incremento en apoptosis con activación de la respuesta a daño del DNA (*DNA Damage Response*, DDR)

Esto se ha estudiado también en modelos de melanoma múltiple y cáncer colorrectal, sin embargo, también existen indicios de estos síntomas en hepatocitos y cerebro humano (de gente con GAMOS, post mortem) (Abel et al., 2020).

En resumen, PRPK corresponde a una proteína ancestral con un rol principalmente involucrado en la síntesis de tRNA, junto a los otros miembros de TCTC. Alteraciones a PRPK resultantes en pérdidas de función son asociadas a fallas en síntesis proteica, y GAMOS, una enfermedad caracterizada por un desarrollo neuronal anormal.

Roles relacionados a cáncer para PRPK

PRPK se ha encontrado aumentada en múltiples tipos de cáncer, como el mieloma y el carcinoma colorrectal, correlacionándose con una pobre prognosis.

Si bien la reducción de PRPK se correlaciona con la disminución de la fosforilación de p53 y la disminución del crecimiento tumoral, lo que convierte a PRPK en un objetivo farmacológico potencial, se han encontrado vías independientes de p53. La expresión de p18 y RPM1 se altera con la eliminación de PRPK en células deficientes en p53. Además, la modulación de los reguladores río arriba de PRPK, como TOPK, también se ha propuesto como tratamientos potenciales en modelos de cáncer de piel inducidos por radiación UV (Roh et al., 2018).

La actividad de PRPK se ha correlacionado con un aumento de la migración, como lo demuestran los experimentos de cierre y migración de heridas in vitro en lamelipodios humanos, y por las tasas de metástasis en cánceres colorrectales en los que la regulación positiva de PRPK se relaciona con una mala prognosis. Esto se relaciona con la fosforilación de Survina, independiente de p53, pero el mecanismo posterior sigue siendo indeterminado. Los estudios en GAMOS muestran que las mutaciones PRPK limitan la migración de podocitos al interrumpir la formación de redes de actina en sublamelipodios, pero esto parece ser un mecanismo de regulación separado relacionado con las proteínas del complejo ARP (Braun et al., 2017; Molina et al., 2022). Paralelo al desarrollo de este trabajo, un grupo externo generó líneas *knock-out* (KO) para PRPK con objeto de estudiar la función de esta proteína, sumada a TPRKB, en cánceres deficientes para P53 (Goswami et al., 2019). Los experimentos de knockdown de PRPK en melanoma múltiple mostraron una inhibición del crecimiento celular, lo que es consistente con resultados previamente reportados por Hideshima et al (2017), en que se postuló PRPK como un potencial target para terapias contra cáncer en vista de este mismo efecto inhibitorio. Esto sugiere la existencia de otras posibles vías reguladoras descendentes para PRPK.

PRPK en contexto de citoesqueleto

PRPK ha sido asociada a un rol en la regulación del citoesqueleto, por su interacción conocida con Rab35 y por efectos encontrados al disrumpir PRPK. En modelos de GAMOS, se observó que *knock-downs* de PRPK causaron disrupciones en la formación de redes de actina sublamelares en podocitos humanos, con una consecuente disminución en migración. Este rol pro-migratorio ha sido observado también en cancer (Braun et al., 2017; Roh et al., 2018).

Anteriormente en nuestro laboratorio investigamos el rol de PRPK en relación a MAP1B, la primera MAP expresada durante el desarrollo del sistema nervioso, que actúa como un regulador estabilizando microtúbulos, en un rol asociado a extensión de neuritas. MAP1B es proteolíticamente fragmentada, dando a lugar a una cadena pesada (HC, *Heavy Chain*) y una cadena liviana (LC1, *Light Chain 1*). Para comprender el rol de MAP1B, nuestro laboratorio realizó ensayos de doble híbrido usando LC1 como cebo, notando PRPK como un posible interactor, siendo esta información el foco para una posterior investigación en torno al rol de MAP1B, PRPK, y la previamente conocida interacción con Rab35. Validamos que PRPK interactúa estructuralmente con Rab35, causando su ubiquitinación y posterior degradación, generando un fenotipo de axón acortado en neuronas de ratón. Alternativamente, PRPK puede ser secuestrada por MAP1B, en una interacción competitiva que restablece el fenotipo de axón normal, o en sobreexpresión de MAP1B, genera un fenotipo de axón alargado. Los posteriores efectores de esta ruta aún son objeto de estudio (Villarreal-Campos et al., 2016).

Asimismo, PRPK no parece interactuar estructuralmente con Rab11 y Rab4, similares a Rab35, pero no se ha comprobado directamente con los muchos otros miembros de la familia de las Rabs, por lo que esto permanece un objeto de estudio.

En resumen, pese a conocerse una variedad de interactores para PRPK (Tabla 1), más allá de la función canónica asociada a TCTC, los otros roles de PRPK, asociados a su función kinasa y su interacción con proteínas asociadas al citoesqueleto, permanecen aun por caracterizar en mayor detalle.

Tabla 1. Interactores conocidos de PRPK

Relación	Interactor	Descripción	Referencias
Sustratos	P53 (indirecto)	PRPK induce la fosforilación de P53 en Ser-15, estabilizando y activando P53. PRPK interactúa con P53, pero requiere otras proteínas para la fosforilación. Existe evidencia a favor de una interacción estructural entre PRPK y P53.	(Abe et al., 2001; Miyoshi et al., 2003; Zykova et al., 2018)
	Survina	PRPK fosforila Survina en Thr-34, incrementando su estabilidad.	(Zykova et al., 2018)
Reguladores	AKT/Pkb	Fosforila PRPK en Ser-250, incrementando la actividad de PRPK sobre p53.	(Facchin 2007)
	TOPK	Fosforila PRPK at Ser-250, incrementando la actividad de PRPK sobre Survina.	(Zykova et al., 2017; Roh et al., 2018; Li et al., 2021)
TCTC	TPRKB	TPRKB actúa como un regulador alostérico para el complejo KEOPS, interactuando exclusivamente con PRPK. Junto a OSGEP, su interrupción causa defectos en el citoesqueleto de actina, y se ha propuesto como un modulador de proliferación en líneas celulares de cáncer p53-nulos. Una propuesta para el ciclo catalítico complejo de KEOPS sugiere que TPRKB interactúa con el tRNA, formando un dímero de tRNA-TPRKB, que luego se une a las otras subunidades de TCTC.	(Hecker 2008; Mao 2008; Braun 2017; Goswami 2019)
	OSGEP	OSGEP desempeña un rol catalítico directo en la formación del grupo treonilcarbamoil en tRNA ANN. Los homólogos de levadura requieren Bud32 y Pcc1 para lograr funcionalidad in vitro. Se considera uno de los 200 genes comunes en todos los organismos vivos.	(Hecker 2008; Mao 2008)
	LAGE3	LAGE3 posee un rol estructural en la dimerización de TCTC.	(Hecker 2008; Mao 2008 Perrochia 2013)
	GON7	Posee un rol de soporte para la unidad catalítica OSGEP en TCTC. Parece ser exclusivo de Eukariotas.	(Hecker 2008; Mao 2008; Wan 2017)

Relación	Interactor	Descripción	Referencias
Otros interactores	Rab35	Rab35 regula el alargamiento de neuritas y axones en coordinación con MAP1B. Participa en rutas de reciclaje de la vía endocítica.	(Abe 2006; Villarroel-Campos 2016)
	MAP1B	Regula la interacción entre PRPK y Rab35. MAP1B es el primer MAP expresado durante el desarrollo del sistema nervioso, teniendo un papel en la dinámica de microtúbulos y actina. Existe evidencia de ensayos high-throughput que un <i>knock-down</i> de PRPK induce un aumento en la transcripción de MAP1B.	(Villarroel-Campos et al., 2016; Replogle et al., 2022)
	PARP1	PRPK colocaliza con la proteína de reparación del ADN PARP1 en glomérulos renales de rata, y ambos co-inmunoprecipitan en células HEK293T.	(Braun 2017)
	Complejo ARP2/3	PRPK colocaliza con este complejo en podocitos humanos y se une a cuatro de sus componentes: ARPC1B, ARPC2, ACTR2 y ACTR3, cuando GFP-PRPK y GFP-OSGEP se sobreexpresan en células HEK293T.	(Braun 2017)
	CALCOCO2	Mediante ensayos <i>high-throughput</i> se ha encontrado que PRPK captura CALCOCO2, una proteína relacionada con fagocitosis y metabolismo de hierro. A su vez, CALCOCO2 interactúa con Rab1a, Rab5a, Rab7b, Rab8a, Rab35, y otras.	(Rual et al., 2005; Rolland et al., 2014)

CRISPR en neuroblastoma y células neuronales

Una estrategia común para estudios funcionales de proteínas es el uso de mutantes con actividades modificadas respecto a la nativa; por ejemplo, la remoción del sitio catalítico, de algún fragmento que se cree es usado para acoplarse a otra proteína, etc. Esto se logra usualmente mediante la expresión de esta proteína mutante desde un vector transitorio transfectado a las células, dígame un plásmido. Dado que estos vectores comúnmente usan promotores constitutivos fuertes, usualmente se pierde información sobre la expresión espacial y temporal de la proteína nativa. El caso de PRPK es un buen ejemplo: el primer paper caracterizando esta kinasa mostró localización nuclear, la cual fue posteriormente mostrada incorrecta usando anticuerpos más sensibles en

células sin transfectar, mostrando que esta se distribuye citoplasmáticamente. Es posible usar promotores con un comportamiento más cercano al original, pero dado que la proteína original aún está presente, no es posible desacoplar los efectos del mutante de los efectos de la proteína endógena, lo cual es especialmente difícil en proteínas donde una disminución de expresión no se traduce en una pérdida de función, como es el caso de múltiples rutas de señalización (Zimmer et al., 2019; Dempster et al., 2019). Surgen entonces estrategias para reemplazar totalmente la proteína endógena por una mutante, o removerla para observar el efecto; esto último siendo una estrategia de *knock-out*.

Una de las tecnologías con mayor desarrollo en la última década ha sido CRISPR. El mecanismo CRISPR/Cas9 se basa en un sistema de respuesta adaptativa encontrado en bacterias. Cuando un material genético foráneo (usualmente virus) entra a una bacteria, este DNA es degradado y ensamblado con secuencias *tandem repeat*, las cuales posteriormente sirven de guía a la enzima Cas9 para efectuar cortes en esta secuencia encontrada, eliminando nuevas piezas de este DNA foráneo encontradas en la bacteria. Este mecanismo se ha adaptado para su utilización en biotecnología, mediante el diseño de constructos denominados gRNAs, que incluyen tanto el RNA guía como el *RNA tracer* en una misma molécula, y el diseño de estrategias que permiten expresar Cas9, los gRNAs y otros componentes para la selección de células modificadas. Estos procedimientos facilitan entonces la generación de líneas con modificaciones genómicas estables, resolviendo parte de las dificultades mencionadas con el trabajo con vectores transitorios. Esto último es particularmente útil en experimentos de *knock-out*, donde, en comparación con otras técnicas con shRNA o siRNA, se logra una disminución permanente de la expresión de la proteína en cuestión.

Como parte de este proyecto, se propone usar como modelo piloto la línea SH-SY5Y, comúnmente usada para el estudio de procesos de desarrollo de neuritas. Esta es una línea inmortalizada derivada de un neuroblastoma humano femenino, aislado en 1970 desde una biopsia de médula ósea, sometida a tres sub-clonamientos desde SK-N-SH a SH-SY, SH-SY5, y finalmente a SH-SY5Y, la cual tiene un set cromosómico estable con un cromosoma anormal trisómico 1q (Biedler et al., 1973). La línea presenta características similares a la de neuronas inmaduras, sin marcadores de neuronas maduras, con una morfología no polarizada y unas pocas neuritas truncadas, tendiendo a crecer en clusters y aglutinados (Kovalevich and Langford, 2013; Pålman et al., 1984). Estas SH diferenciadas pueden ser consecuentemente diferenciadas en subtipos de neuronas, expresando características de piramidales, dopaminérgicas, etc. El uso de cultivos primarios de neuronas derivadas de tejidos embrionarios está limitado por el hecho de que una vez diferenciadas a neuronas maduras, las células no pueden propagarse más, limitando la cantidad de muestras disponibles para futuros experimentos y análisis. Esto es especialmente relevante considerando técnicas de baja eficiencia, como es el caso de los *knock-out* mediados por CRISPR, los cuales además son seleccionados de forma monoclonal para limitar la variabilidad biológica asociada al cómo se generó la mutación, y a los mecanismos compensatorios que pueda exhibir la célula.

El otro modelo utilizado en este proyecto es la línea HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*), una línea derivada de la exposición de un cultivo primario de tejido renal embrionario humano, expuesto a Adenovirus Tipo 5 (AD5). Pese a su origen como epitelio renal, esta línea también expresa marcadores comúnmente asociados con neuronas, tales como neurofilamentos, neuroreceptores, canales específicos, proteínas

asociadas a vesículas sinápticas, etc; y se han descrito protocolos de cultivo mixto con neuronas para inducir neurogénesis (Stepanenko and Dmitrenko, 2015). Sin embargo, estas no manifiestan un fenotipo neuronal funcional. Desde una perspectiva técnica, una de las ventajas de HEK293 sobre SH-SY5Y es su alta tasa proliferativa y relativa facilidad de transfección, lo que la hace un modelo ideal para la puesta a punto de las primeras fases experimentales.

En resumen, las técnicas CRISPR permiten realizar estudios funcionales de proteínas manteniendo un contexto endógeno y estudios en tiempos prolongados dado que generan modificaciones genómicas estables. Sin embargo, protocolos como la generación de *knock-outs* pueden ser especialmente largos, por lo que modelos como líneas inmortalizadas son preferibles sobre cultivos primarios. Para el caso particular de nuestro foco sobre los roles de PRPK asociados a la regulación de neuritas, la línea SH-SY5Y presenta un modelo ideal, dada su capacidad de ser diferenciada en un fenotipo similar al de neuronas maduras, pero posee limitantes técnicos en cuanto a su capacidad de transfección y tasa proliferativa; los cuales pueden ser complementados con la línea HEK293, la cual presenta un rápido crecimiento y también ha mostrado presencia de marcadores neuronales, aunque contrapone una mayor heterogeneidad en cultivos, asociada a una mayor inestabilidad genética en esta línea.

Hipótesis

PRPK es esencial para promover la diferenciación de neuroblastomas SH-SY5Y controlando la expresión de proteínas que regulan el tráfico de membrana.

Objetivo general

Evaluar el rol de PRPK sobre la diferenciación de células de neuroblastoma (SH-SY5Y) mediante la expresión de proteínas que regulan el tráfico de membrana

Objetivos específicos

1. Generar líneas KO para PRPK en células de neuroblastoma (SH-SY5Y)
2. Evaluar como un fenotipo deficiente de PRPK se relaciona con la regulación del desarrollo de neuritas en un modelo SH-SY5Y PRPK-KO.
3. Analizar como un fenotipo deficiente de PRPK afecta los niveles de expresión de distintas proteínas Rab, para establecer relaciones entre la función de PRPK y la regulación del tráfico vesicular, regulación del citoesqueleto, y desarrollo de neuritas.

Materiales y métodos

Cultivo celular de líneas SH-SY5Y y HEK293

Se utilizó una línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Cat. ATTC CRL-2266). Estas células se mantuvieron en medio MEM-F12 (*Minimum Essential Media*) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (FBS) inactivado por calor y 1% Penicilina/Espectinomicina Estreptomicina (Pen/Strep), en condiciones de 37°C y 5% CO₂, cambiando medio cada 48h. Las líneas HEK293 (Cat. ATTC CRL-1573) se mantuvieron en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% FBS y 1% Pen/Strep, cambiando medio cada 72h. Las células se cultivaron en placas de 100 mm, 60 mm, 12-pocillos o 6-pocillos (Corning), dependiendo de la fase de expansión o experimento.

Lipofección y constructos CRISPR

Se utilizó un kit *PRPK (TP53RK) Human Gene Knockout Kit (CRISPR)* (OriGene, Cat. KN409748). El marcador de selección LoxP-EF1A-tGFP-P2A-Puro-LoxP (OriGene, Cat. KN409748D) fue resuspendido a 500 ng/μL en agua ultrapura. Los constructos CRISPR de este kit fueron amplificados utilizando un protocolo HeatShock estándar en *E. coli*. El DNA plasmidial fue purificado usando un kit *PureLink MidiPrep* (Invitrogen, Cat. K210005), y este DNA fue cuantificado utilizando un *Qubit dsDNA Broad Range Assay Kit* (Invitrogen, Cat. Q33230). Se utilizó Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Cat. 11668030) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, células crecidas en placas de 35 mm se incubaron con 2 μg totales de DNA en 25 μL de OptiMEM (Gibco, Cat. 11058021) y 4 μL de Lipofectamina en OptiMEM por 5 min a temperatura ambiente. Luego esto se mezclan a un volumen final de 50 μL, por 20 min, y se incuban sobre 1 mL

de medio fresco (correspondiente a la línea celular usada) sin suero por 4 a 18 h, tras lo cual se reemplaza este por medio completo.

Los experimentos para lipofección de SH-SY5Y con constructos CRISPR se incubaron 18 h. Estos constructos fueron lipofectados usando 4 µg del vector Cas9-gRNA y 4 µg del marcador de selección, en placas de 60 mm. La eficiencia de transfección fue evaluada a 48 h vía la expresión de GFP utilizando un microscopio confocal (Zeiss LSM 510 Meta).

Tabla 2. Secuencias guías usadas

RNA Guía	Secuencia
gPRPK_1	ATCGGCCGCGTAGTAGCTC
gPRPK_2	AGGCCGCTCAAGAAG

Los constructos PRPK-WT y PRPK-KD (Cat. interno 1552, 1553) se incubaron 4 h para transfección, usando 2 µg en placas de 6 pocillos.

Electroporación

Las transfecciones de las líneas se realizaron usando un equipo Amaxa Nucleofector 4D (Lonza) y reactivos para nucleofección en SH-SY5Y (Lonza, Cat. V4XC-2024), usando el protocolo CA 137, acorde a las instrucciones del fabricante para 2×10^6 células y 2 µg de DNA por reacción. Estos constructos fueron nucleofectados usando 1 µg del vector Cas9-gRNA y 1 µg del marcador de selección. La eficiencia fue evaluada a 24 h vía la expresión de GFP utilizando un microscopio confocal (Zeiss LSM 510 Meta).

Modificaciones al protocolo CRISPR OriGene

El protocolo original está diseñado para células de rápida proliferación, lo que no es directamente aplicable a SH-SY5Y. Las células nucleofectadas fueron expandidas en

placas de 60 mm. Se realizó un lavado con PBS durante el primer cambio de medio para eliminar células muertas. Una vez confluyente, estas placas fueron expandidas a placas de 100 mm, y posteriormente sub-cultivadas en proporción 1:5 hasta un total de 3 pasajes (18 días post-nucleofección) para permitir la pérdida del marcador en células sin eventos de NHEJ (*Non-homologous end joining*). Células del primer pasaje fueron preservadas en 500 µL de FBS 10% DMSO a -80 °C, utilizando un recipiente de congelación *Mr. Frosty* (Thermo Scientific, Cat. 5100-0001).

Selección con Puromicina

Placas confluentes de tres pasajes fueron tratadas con Puromicina 1 µg/µL, durante un periodo de 5 días. Se realizaron lavados con PBS entre cada cambio de medio cada 48 h para remover células muertas. Estas placas se mantuvieron por un periodo de 14 días (19 días post inicio de selección, 37 días post-nucleofección) para permitir el crecimiento de colonias, tras lo cual estas (con una población de ~200 células por colonia) fueron aisladas a placas de 12-pocillos. Para esto, se lavó la placa con PBS, se aspiró este PBS, y se utilizaron cilindros de clonamiento (Bel-Art, Cat. 378470100) untados en vaselina estéril, con 50 µL de tripsina y resuspensión por up-down. Se seleccionan 6 clones y la placa es reposada 5 min en medio o PBS para minimizar la muerte celular por shock térmico y así maximizar la supervivencia de los clones. Este procedimiento se repite, tomando 24 clones por placa. Estos clones fueron expandidos a placas de 6-pocillos para permitir la extracción de DNA y proteínas (21 días post-aislado, 40 días post-selección, 58 días post-nucleofección).

Imágenes en vivo para eficiencia de selección

Para evaluar la expresión del marcador GFP se utilizó un equipo *Lionheart FX Live-Imager* (BioTek). Se tomaron imágenes en canales contraste de fases y GFP, las cuales

luego fueron cuantificadas utilizando el software FIJI (Schindelin et al., 2012) para determinar la eficiencia de transfección. Esto mismo se repitió para evaluar la presencia de células GFP- en líneas posterior a la selección con antibiótico.

Western Blotting

Para extracción de proteínas totales, se utilizó buffer RIPA (20 mM tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sodio), suplementado con inhibidores de proteasas, Calyculin A, PMSF 100 mM, y NaF 100 mM. Las células fueron lavadas en PBS a 4°C, incubadas 5 min en RIPA a 4°C, separadas de los recipientes de cultivo usando scrappers, traspasadas a tubos de 1,5 mL, e incubadas 15 min adicionales. Luego, se removieron detritos celulares mediante centrifugación a 20,000 g por 20 min a 4°C. El sobrenadante se recolectó en tubos nuevos y fue cuantificado con un ensayo *Qbit Protein Broad-Range* (Invitrogen, Cat. A50669), para posteriormente ser desnaturado y usado para Western, y/o almacenado a -80°C a largo plazo. Se realizó una estandarización de anticuerpos usando 20 µg de proteína total extraída de las líneas celulares SH-WT, HEK-WT, HEK PRPK-KO, N2A expresando PRPK-WT; en geles SDS-PAGE al 12% (electroforesis a 80 V por 15 min, luego 120 V por 120 min), transferidos a PDVF usando un equipo semi-seco *Power Blotter* (Invitrogen, Cat. PB0012). Esta membrana se bloqueó 1 h en TBS-Tween 0.1% BSA 5%. Se utilizaron los anticuerpos Anti-PRPK (mouse) OriGene Cat. TA808232, dilución 1:3,000; y Anti-PRPK (mouse) Santa-Cruz Cat. sc-398705, dilución 1:500. Ambos anticuerpos se diluyeron en TBS-Tween 0.1% BSA 1%. Se optó por usar principalmente el OriGene, dada su mejor señal. Este se incubó overnight a 4°C, posteriormente con 4 lavados de 10 min, secundario por 1 h, y 5 lavados de 5 min. Se usaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP 1:5,000 y un kit de detección

SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Scientific, Cat. 34580). Las imágenes fueron obtenidas en un Fotodocumentador *Allience 9.7* (UVITECH). Se utilizó el anticuerpo Anti-Tubulina (mouse) 1:10,000, con mouse-HRP 1:5,000 para normalizar la carga de proteínas en todos los westerns, siguiendo los lavados indicados para cada experimento. La cuantificación se realizó usando ImageJ y MS Excel.

Para las líneas clonales, se extrajeron proteínas desde placas de 6 pocillos, usando el buffer previamente descrito. Dado el número, estos clones fueron cuantificados por en placas P96 por Bradford (Bio-Rad, Cat. 500-0006) contra una curva estándar de BSA; y analizados en las condiciones previamente descritas. Muestras de interés fueron cuantificadas nuevamente por Qbit.

Las líneas HEK-WT y HEK-PRPK-KO fueron cuantificadas mediante Qbit, y analizadas en geles como lo anteriormente descrito para verificación de PRPK. Para el screening, se utilizaron anticuerpos primarios Anti-Rab1b (rabbit) (BOSTER, Cat. A04589-1) dilución 1:10,000; Anti-Rab23 (rabbit) (BIOSS, Cat. Bs-12389R) dilución 1:1,000; Anti-Rab35 (rabbit) (CellSignaling, Cat. 9690S) dilución 1:1,000; Anti-RALB (rabbit) (BOSTER, Cat. PB9795) dilución 1:1,000; Anti-VAMP4 (rabbit) (SynapticSystems, Cat. 136002) dilución 1:1,000; Anti-Rab11b (mouse) (BOSTER, Cat. M04526) dilución 1:1,000; Anti-Rab7a (mouse) (GeneTex, Cat. GTX169196) dilución 1:3,000; y Anti-VAMP7 (mouse) (SynapticSystems, Cat. 232011) dilución 1:1,000; todos en TBS-Tween 0.1% BSA 1% a 4°C overnight. Tanto los lavados primarios como secundarios se realizaron con 3 veces por 5 min con TBS-Tween 0.1%. Los anticuerpos secundarios y revelado fueron como anteriormente descritos.

Genotipificación por PCR

Para realizar la genotipificación de las líneas clonales se extrajo DNA genómico usando un kit *E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit* (Omega Bio-tek, Cat. D3396-02) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se extrajeron desde clones en placas 12-pocillos confluentes (5-7 DIV) mediante tripsinización y posterior resuspensión en PBS. Como nota, bajo sugerencia del fabricante, se puede realizar una extracción desde muestras tripsinizadas, o removidas mediante un cell-scrapper, siendo la técnica anterior más efectiva para el número de muestras. Este DNA fue cuantificado vía Qubit, como previamente descrito para los constructos.

Para el diseño de los partidores se tomó una región de 400pb (ENSEMBL chr20 46688908-46689801) en torno al sitio de corte de Cas9 y se usó el software Primer-BLAST (Ye et al., 2012) para generar partidores candidatos. Se seleccionaron 4 pares (Tabla 3) de 17 posibles pares candidatos, tomando en consideración los off-targets, vía BLAST, y formación de estructuras secundarias, vía ViennaRNA (Lorenz et al., 2011). Los partidores fueron sintetizados por IDT y resuspendidos en agua ultrapura a 0,1mM.

Tabla 3. Partidores usados para genotipificación de la región en torno al target para CRISPR. Estos pares se evaluaron contra DNA genómico de HEK293 y SH-SY5Y, antes de decidir por el par PRPK2F/R para genotipificaciones. *Ins* corresponde al par amplificando desde dentro de inserto.

Partidor	T. melting [°C]	Secuencia
PRPK1_F	57,8	GTCCGCCGTCTGCCAAG
PRPK1_R	56,7	ATTTCCGAAGCGAGCCGAA
PRPK2_F	58,3	GGTGCTTGATCACCGCCG
PRPK2_R	56,7	GGGAGGCGTAACCACTTACAG
PRPK3_F	57,7	AAATCCAGCTTCGGAGCGC
PRPK3_R	56,4	CCGAAAAGTTGGGAGGCGTA
PRPK4_F	57,4	TGAGGGAAATCCAGCTTCGGA
PRPK4_R	56,8	CTTACAGGCCGGAAGTGTCC
Ins_1	56,3	TGGCCCGCATTACAAGACT
Ins_2	56,7	CATCTTCCGCTCACGCAAC

Se realizaron PCRs utilizando SapphireAmp Fast PCR Master Mix (TaKaRa Bio, Cat. RR350), acorde a las instrucciones del fabricante para 100 ng de DNA y un volumen final de 20 μ L por muestra. Se utilizo un protocolo PCR de 10 min a 94°C, 35 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 58°C, 30 s a 72°C; y una elongación final de 10 min a 72°C. La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1,5% con GelRed (Biotium, Cat. 41003), a 100 V por 20 min o 1 h (medio gel o gel entero, respectivamente). Las imágenes fueron obtenidas en un Fotodocumentador Allience 9.7 (UVITECH).

Diferenciación de SH-SY5Y inducida con Ácido Retinoico

Se utilizo una versión modificada del protocolo descrito por Shipley et al. (2016). Se plaquearon 100,000 células en placas de 6-pocillos. Estas se mantuvieron en medio MEM-F12 5% FBS + Acido Retinoico (RA) (CALBIOCHEM, Cat. 554720) 10 μ M en DMSO, por 6 días, tras lo cual se disminuyó el FBS al 1% por 6 días adicionales, manteniendo el RA. Se realizaron cambios de medio cada 2 días. Las células diferenciadas obtenidas en esta fase se mantuvieron con medio Neurobasal (Gibco, Cat. 10888-022) suplementado con B27, GlutaMax, y BDNF. Los experimentos de transfección se realizaron como previamente descritos, fijando las células 24 h posterior a la transfección.

Tabla 4. Medios usados para diferenciación de células SH-SY5Y.

Medio 1	Volumen para 50 mL	Concentracion
MEM-F12	47,5 mL	
5% FBS	2,5 mL	5%
1% Pen/Strep	500 μ L	1:100
10 μ M RA.	100 μ L	1:500
10 mM HEPES	500 μ L	1:100
Medio 2		
MEM-F12	48,5 mL	
1% FBS	500 μ L	1%

Medio 2		
1% Pen/Strep	500 μ L	1:100
10 μ M RA.	100 μ L	1:500
10 mM HEPES	500 μ L	1:100
Medio 3		
Neurobasal	47 mL	
1% Pen/Strep	500 μ L	1:100
1x B27	1 mL	1:50
2mM Glutamax	500 μ L	1:100
1x BDNF	50 μ L	1:1000

Inmunofluorescencia

Las células sembradas sobre covers de vidrio se lavaron en PBS y fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% y sacarosa 4%, durante 20 min a 37°C, seguido de tres lavados por 5 min con PBS. Las células se permeabilizaron con Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Cat. X100) al 0,1%, seguido de tres lavados con PBS. Se bloquea 1 h con PBS BSA 5% a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se incubaron overnight a 4°C, en PBS BSA 1%, tras lo cual se remueven restos con 3 lavados en PBS. Se utilizaron anticuerpos: anti- β III-tubulina 1:200, anti-PRPK (OriGene, Cat. TA808230) 1:300, y ActiStain 488 (Cytoskeleton, Cat. PHDG1) 1:127. El anticuerpo secundario se incubó 1 h a temperatura ambiente, en PBS BSA 1%. Se incubó en PBS DAPI 1:10,000 por 5 min, seguido de dos lavados adicionales en PBS. Se lavó una última vez en agua para remover rastros de sales, y las muestras fueron fijadas a un portaobjetos usando *FluorSave* (Merck, Cat. 345789). Las imágenes fueron tomadas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 710.

Análisis de imágenes

Las imágenes fueron segmentadas automáticamente usando una pipeline personalizada en CellProfiler (Stirling et al., 2021), seleccionando células bajo los criterios de: tamaño y circularidad del núcleo (descartando células en mitosis y detritos marcados por DAPI), y densidad en un radio de 100 μm (descartando células aglomeradas que no es posible distinguir individualmente). Las imágenes segmentadas fueron luego usadas para reconstruir células individuales en ImageJ, y junto al plugin *SNT* (Arshadi et al., 2021), reconstruir las neuritas de estas. De esta información, se tomó la data de neuritas más larga. Los conteos y figuras fueron realizados en Python, usando librerías Pandas, SciPy, y Plotly.

Resultados

Puesta a punto de transfecciones

Se realizaron múltiples ensayos de lipofección para el kit OriGene y su marcador de selección, con resultados insatisfactorios. No se logró observar células GFP+ a las 24 h, 48 h y 72 h post-lipofección. Por esto se prefirió utilizar nucleofección, obteniendo en un principio una eficiencia de un 40% a las 24 h con un plásmido GFPmax control (datos no mostrados). La nucleofección de los constructos CRISPR (Figura 2A) y el inserto de selección PURO/turboGFP resultó con una eficiencia GFP+ del 0,5% a 24 h post-nucleofección (Figura 2B), sin diferencias cuantificadas entre gPRPK_1 y gPRPK_2.

CRISPR

Eficiencia de la selección desde clones

Las metodologías por CRISPR no incluyen directamente un mecanismo para inserción del DNA removido, sino que utilizan los mecanismos de reparación propios de las células modificadas. Estos corrigen la lesión causada al sitio de corte del complejo Cas9-sgRNA, con el efecto secundario de potencialmente integrar un fragmento de DNA disponible (ie. el marcador de selección), o cometer errores durante la reparación, causando INDELS y la consiguiente pérdida de función producto de una mutación *frameshift*. Aun así, el evento más probable es la “correcta” reparación del DNA, sin que ocurra una modificación. Esto permite que la Cas siga realizando cortes en la misma región, lo que finalmente hace de esto un proceso probabilístico. En vista de esto, una vez realizado el protocolo de CRISPR y posterior selección con Puromicina, es necesario mantener múltiples líneas provenientes de las células transfectadas, en pos de que algunas de estas hayan sufrido dos eventos efectivos, siendo por ende KO homocigotas.

Uno de los cuellos de botella del proceso a nivel técnico y de tiempo es la selección y expansión de líneas monoclonales desde las células SH-SY5Y modificadas. En primera instancia, la tasa de crecimiento de células únicas tiende a ser notoriamente más lenta, incluso en presencia de otras células a baja concentración. Luego, múltiples colonias (líneas clonales en poblaciones de 500-1000 células) pueden no expandirse al ser traspasadas a pocillos únicos, o posiblemente perder viabilidad durante el proceso de tripsinización. Finalmente, estas líneas pueden mantener un crecimiento debajo del esperado, y por ende no es posible expandirlas para posteriores caracterizaciones.

Se realizaron tres rondas de selección de clones, desde la selección por Puromicina hasta la expansión y caracterización de líneas clonales. Sumando estas, se aislaron 120 colonias, de las cuales 41 (34,1%) lograron proliferar para su caracterización por Western blot, y de estas, 33 (27,5% del original) pudieron ser expandidas y preservadas (Figura 2C). Notoriamente, todas estas líneas mostraron una deficiencia en proliferación.

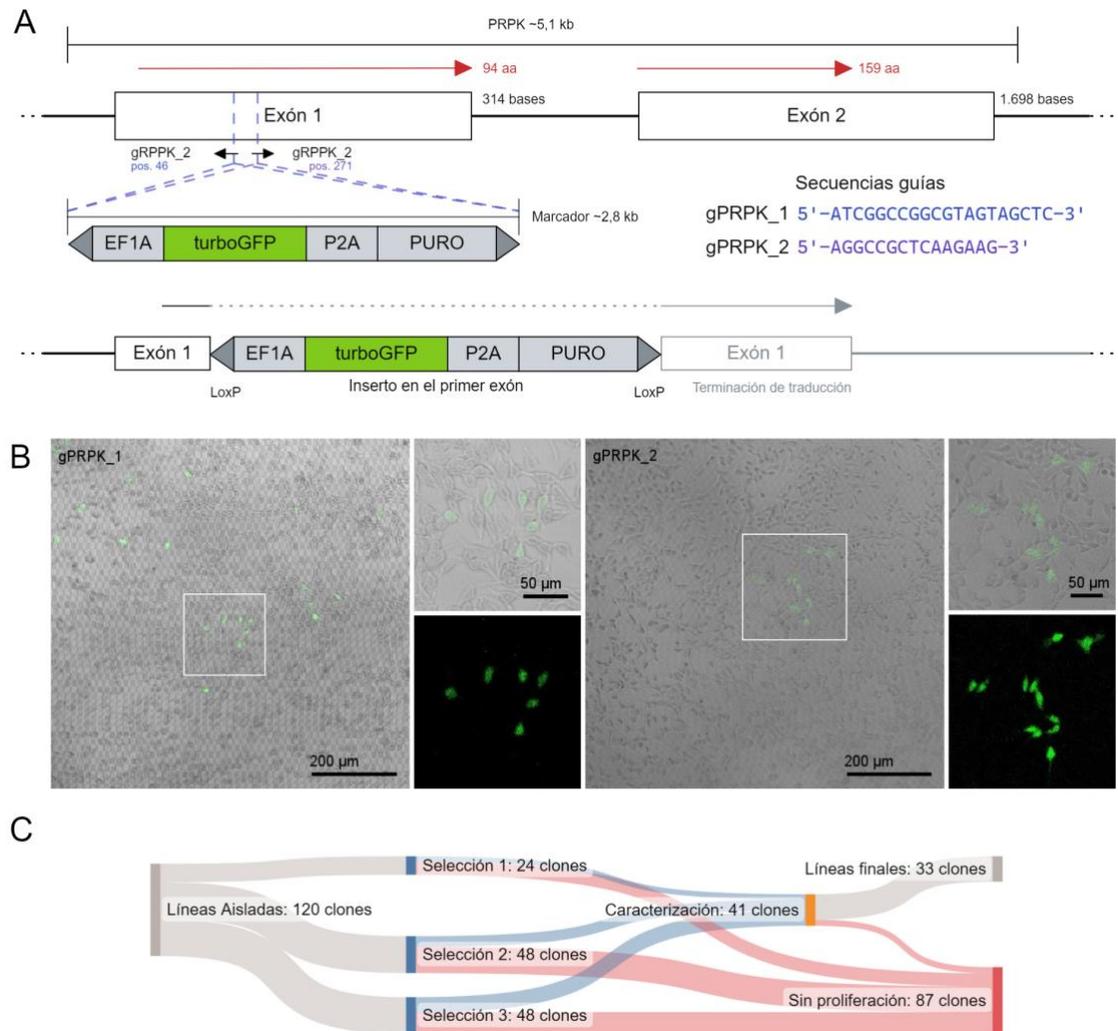


Figura 2. Pruebas de transección en líneas SH-SY5Y. **A.** Esquema del gen de PRPK y el efecto de la inserción de los marcadores. PRPK posee dos exones para un único péptido, sin variantes de *splicing* conocidas. Usando guías contra el primer exón, se genera una lesión en la región codificante, en la cual posteriormente se puede incorporar, vía NHEJ, un marcador de selección (cassette LoxP-EF1A-turboGFP-P2A-Puromicina-LoxP), interrumpiendo de forma temprana la traducción de PRPK. La inserción puede ser reversa (no ilustrado). **B.** 24 h post-nucleofección de líneas SH-SY5Y. Imágenes corresponden a muestras *en vivo*. Se obtiene una eficiencia del 0.5%, considerando la expresión del inserto de selección (resistente a Puromicina y expresando GFP). Las posteriores etapas de selección por Puromicina y cultivo monoclonal permiten obtener líneas 100% GFP+. **C.** Eficiencia del proceso de selección de clones. Para obtener poblaciones estables de *knock-out* homocigotos (ambas copias del gen interrumpidas) es necesario contar con líneas clonales, lo cual representa un cuello de botella por los pasos de aislamiento y expansión necesarios. Una parte significativa de los clones fallan en las primeras etapas de expansión, o durante la expansión para análisis.

Presencia del marcador de selección en todos los clones

Durante las fases de selección y expansión de colonias en placas P100, y posterior aislamiento y expansión de líneas clonales; estas líneas fueron observadas para la presencia del marcador *turboGFP* introducido junto al marcador de resistencia a Puromicina. Todas las líneas poseían expresión de GFP, sin observarse diferencias significativas entre líneas (Figura 3A, capturas selectas del monitoreo).

Para verificar la correcta inserción del marcador de selección, descartando sitios off-target, se realizaron PCRs desde DNA genómico, usando un par con un primer en el gen de PRPK (Tabla 3, *PRPK_2R*), y otro dentro del marcador de selección (Tabla 3, *Ins_1*). Así, la amplificación verifica que ocurre una inserción en el sitio correspondiente. De las muestras analizadas, SH-08 no mostró amplificación, por lo que se asume que en esta la inserción ocurrió off-target o, más probablemente, de forma inversa, dado que los sistemas de reparación NHEJ pueden incorporar el inserto de forma invertida.

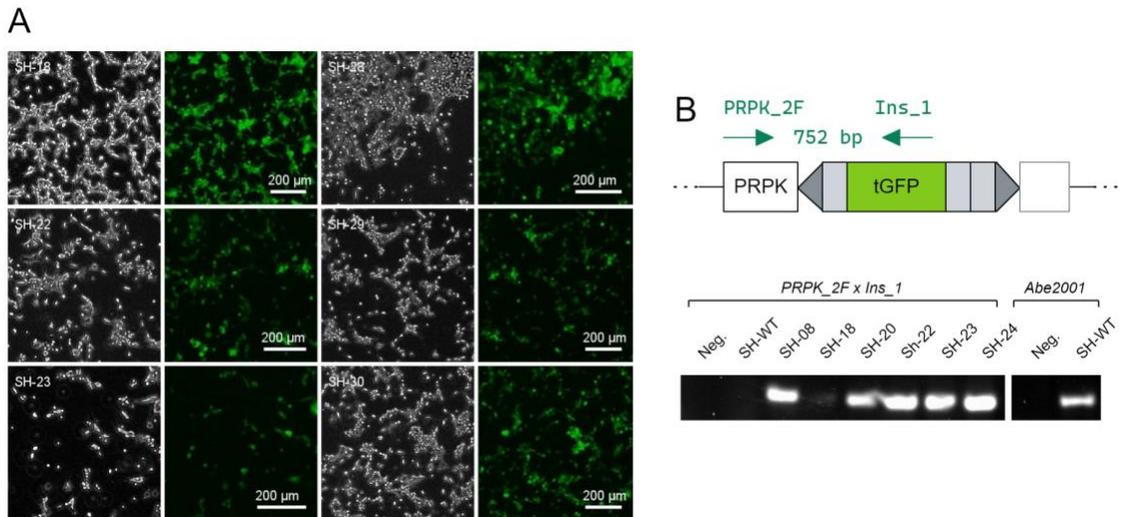


Figura 3. Muestra de líneas clonales mostrando GFP post-selección. **A.** Imágenes en vivo de muestras en expansión para posteriores análisis vía Western-Blot, por lo que se encuentran directamente sobre las placas. Se observan diferencias en confluencia, pese a que estas han sido inoculadas en mismos números y tiempos, lo que posteriormente se vio correlacionado con el nivel de *knock-down* de PRPK. En este punto, la totalidad de células son GFP+. **B.** Amplificación por PCR para verificar sitio de inserción. El grupo izquierdo

corresponde a muestras usando un primer (PRPK_2F) localizado en el gen de PRPK, junto a uno localizado dentro del marcador de selección (Ins_1), como ilustra el esquema. El par de partidores reportado por Abe et al. (2001) fue aparece aquí como control positivo de amplificación. *Neg.* corresponde a muestras sin DNA.

Presencia de PRPK en todas las líneas clonales

Para evaluar de forma concluyente la presencia o no de PRPK, y por ende la obtención o no de un clon *Knock-out*, se optó por Western-Blot de las muestras. Para esto, se tuvo que poner en punto primero el uso de los anticuerpos contra PRPK OriGene Cat. TA808232; y Santa-Cruz Cat. sc-398705. Los análisis posteriores se realizaron con el anticuerpo OriGene, al obtenerse mejores resultados (Figura Suplementaria 2. Pruebas de anticuerpos contra PRPK.), según los métodos descritos.

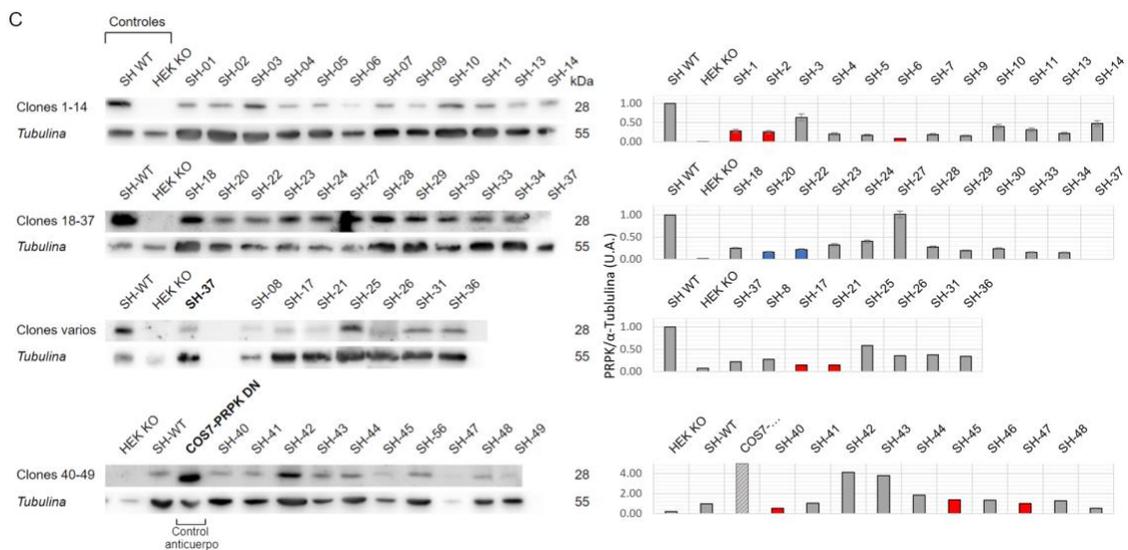


Figura 4. PRPK en líneas clonales obtenidas de células modificadas. Todas las líneas modificadas muestran expresión de PRPK, indicando que, pese a eventos positivos de inserción del marcador, estos fallaron en impedir la síntesis de PRPK, a diferencia de la línea HEK cortesía de Goswami et al. Las líneas poseen una disminución en la expresión relativa (E.R.) de PRPK al comparar con las líneas WT (normalizando a Tubulina), mostrando un amplio espectro entre una disminución de cerca de un 80% (líneas SH-02, SH-06, etc), o niveles cercanos a los normales (SH-03, SH-18). Múltiples líneas (en rojo) fallaron en fases de expansión, por lo no se usaron posteriormente. Las líneas SH-22 y SH-23 fueron usadas para experimentos de diferenciación. **Nota:** SH-37 pareció ser un KO, completo, pero posteriores repeticiones marcaron un error con la muestra, observándose la presencia de PRPK. **Nota 2:** La cuantificación real de PRPK-DN indica una media de 10,7-fold sobre SH-WT, pero la barra a 5-fold se recortó por conveniencia del gráfico.

Todas las líneas obtenidas mostraron la presencia de PRPK. Las líneas con mayor disminución de PRPK (ej. SH-06, SH-04, SH-01) mostraron severas deficiencias de

crecimiento, no pudiendo ser expandidas para experimentos posteriores. Las siguientes líneas, SH-22 y SH-23, mostraron la mayor disminución, y en consecuencia fueron usadas en subsiguientes caracterizaciones. Se usó como control negativo una línea HEK293 *knock-out* caracterizada por Goswami et al. y PRPK-Dominante Negativo, una *Kinase Dead*, expresada en COS7, como control positivo, suplementando la previa validación de los anticuerpos.

Diferenciación y morfología de neuritas

Para estudiar los posibles roles de PRPK en contexto de regulación de dinámicas de citoesqueleto y el efecto fenotípico asociado a un *knock-down* estable de PRPK, realizamos un experimento de diferenciación usando las líneas SH-22 y SH-23, seleccionadas por su disminución de un 70% y 63% de PRPK, respetivamente (considerando que líneas con mayor disminución no fueron expandidas en este punto). Ambas líneas son heterocigotas para la disrupción de PRPK, en base a la presencia de PRPK y la amplificación del marcador en el sitio de esta.

Las líneas mostraron una transformación más rápida hacia una morfología característica de células diferenciadas, marcada por la presencia de dos prolongaciones mayores (Figura 5A). Adicionalmente, dado que ambas líneas cuentan con un marcador GFP expresado constitutivamente, se observó una disminución en la expresión de este, concordante con una disminución en síntesis proteica. La línea SH-23 tiene una mayor proporción de diferenciadas en el tratamiento con ácido retinoico (significativo comparando con líneas SH-WT y SH-22, bajo el mismo tratamiento) (Figura 5C). Evaluando el rol de PRPK sobre elongación, no se observó un cambio significativo en la longitud de la neurita mayor entre estas líneas (Figura 5B).

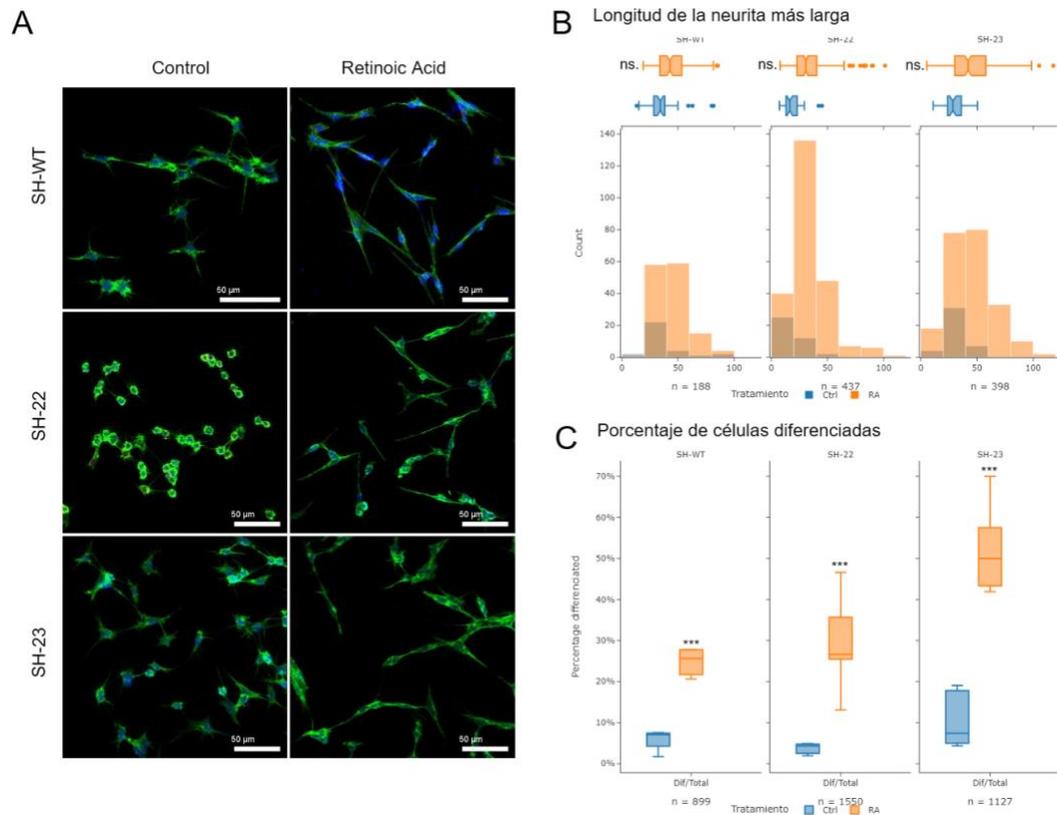


Figura 5. Cambios en la diferenciación de células SH PRPK-KD. Las líneas mostraron una transformación más rápida hacia una morfología celular diferenciada, marcada por la presencia de dos procesos principales. **A.** Imágenes de ejemplo mostrando diferencias morfológicas entre líneas SH control y expuestas a RA, en condiciones control o PRPK *knock-down*. Se muestran Faloidina en Verde, DAPI en azul para claridad. **B.** Al evaluar el papel de PRPK en la elongación del axón, no se observaron diferencias significativas en la longitud de la neurita mayor entre las líneas, pero sí cambios a nivel de población. (Dos covers por condición, 5 posiciones por cover). **C.** La línea SH-23 mostró una mayor proporción de diferenciación cuando se trató con ácido retinoico, en comparación con las líneas SH-WT y SH-22 (n total = 3574).

Screening de Rabs

PRPK se ha relacionado a roles en la regulación del desarrollo de neuritas, mediante su interacción con Rab35 y MAP1B, pero los mecanismos no han sido completamente descritos. Para estudiar el efecto de un *knock-down* estable de PRPK, hicimos un screening no-dirigido para evaluar los cambios de expresión en múltiples proteínas Rabs, asociadas a un espectro amplio de funciones regulatorias de tráfico: Rab1b se asocia al tráfico desde retículo endoplasmático (*Endoplasmic Reticulum, ER*) a Golgi,

asociándose además a la vía secretora temprana. Defectos en Rab1 pueden causar Esclerosis Lateral Amiotrófica en ratones (Cui et al., 2022). Rab7 es considerada un marcador de transporte retrogrado en axón, y se le asocia un rol en desarrollo de neuritas, mediante la interconexión de la vía secretora y vía endocítica, modulando el contacto entre endosomas tardíos (*Late Endosomes, LE*) y el retículo endoplasmático, además de promover la translocación de endosomas tardíos hacia la periferia celular, y subsecuente fusión con la membrana plasmática (Mignogna and D'Adamo, 2018). Rab11 regula la asociación de endosomas de reciclaje (*Recycling Endosome, RE*) con vesículas de tráfico, modulando el transporte de componentes celulares y moléculas de señalización a locaciones específicas de la célula. Junto con Rab35, contribuye a la regulación del crecimiento neurítico y axonal, el crecimiento de dendritas, migración cortical, diferenciación de glías, y plasticidad sináptica (Rozés-Salvador et al., 2020). Rab23 ha sido relacionada la unión de los autofagosomas con lisosomas, y se ha observado localizada en endosomas tempranos, sin embargo su función exacta en estos aún no está del todo definida (Hor et al., 2018). VAMP4 (*Vesicle-Associated Membrane Protein*) está asociada con el tráfico retrogrado desde endosomas a red trans-Golgi (*Trans-Golgi Network, TGN*), el cual es necesario para el reciclaje de las moléculas asociadas a TGN (Ivanova and Cousin, 2022). VAMP7 regula el tráfico exocítico de vesículas, y es necesaria para este, en un rol asociado a Rab21 (Mignogna and D'Adamo, 2018).

Se pudo observar que en SH-SY5Y Rab23, Rab11b, Rab1b, Rab7a y VAMP7 presentaron un aumento de la expresión en las células KD, siendo el caso de Rab1b y Rab7a el más contrastante, dada la no-expresión en SH-SY5Y WT (Figura 6). Se

observó un aumento menor en la cantidad de Rab35, acorde con lo previamente descrito en *knock-down* de PRPK.

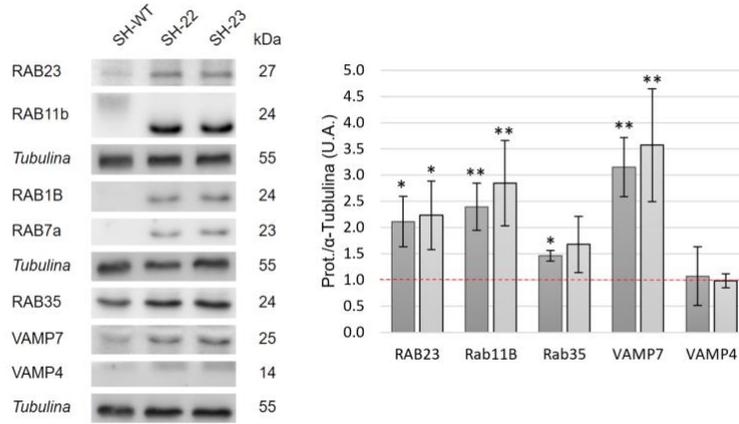


Figura 6. Alteraciones en la expresión de Rabs producto de *Knock-down* de PRPK en SH-SY5Y. **Nota:** Dada el cambio de expresión de Rab1B (~11 *fold* estimado en SH-22, ~14 *fold* en SH-23) y Rab7a (estimado 10-*fold*), estas se excluyeron del gráfico. N=3.

Replicando esto en líneas HEK293 (sin diferenciación), se observa nuevamente el aumento en Rab1b y VAMP7. El cambio no resulta tan notorio en Rab7a y Rab1b, dado que si se observa expresión en la línea HEK293 WT. En este caso el aumento de VAMP4 resulta más notorio. En contraste, no notamos un cambio en Rab7a (Figura 7).

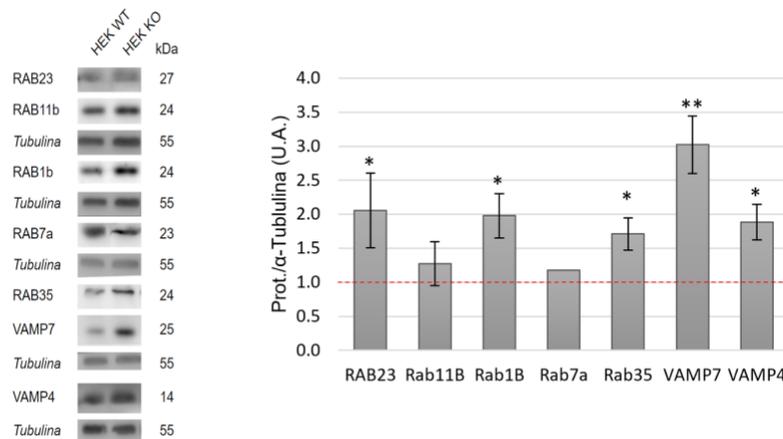


Figura 7. Alteraciones en la expresión de Rabs producto de *Knock-down* de PRPK en HEK293. **Nota:** Una de las réplicas de Rab7a no fue contabilizada, por lo que se muestra sin barras de error. N=3.

Discusión

Viabilidad de las líneas *knock-out*

Una de las dificultades para estudiar proteínas relacionadas a señalización es mantener un adecuado perfil de expresión, a nivel espacial y temporal (Willems et al., 2020). Métodos de expresión heteróloga comúnmente usan promotores constitutivos, en consecuencia, afectando los perfiles de expresión de las proteínas en estudio, con efectos indeseados (Willems et al., 2020; Droogers et al., 2022; Zimmer et al., 2019). PRPK resulta un buen ejemplo de esto, como se describió en la primera caracterización de esta proteína, en la cual se observó una acumulación nuclear al expresarla en células COS-7 (Abe et al., 2001), siendo esto rectificado en estudios posteriores donde se observó la localización citoplasmática de PRPK (Abe et al., 2006). Considerando esto, nuestra estrategia se enfocó en modificaciones a la expresión de la proteína endógena, utilizando técnicas CRISPR, que han facilitado significativamente en la última década la generación de modificaciones genómicas estables en líneas de mamíferos.

Se consideró como prueba piloto la generación de *knock-outs* para PRPK en líneas humanas, usando específicamente SH-SY5Y por sus características similares a neuronas inmaduras, formación de neuritas, y capacidad de diferenciación en células similares a neuronas maduras, lo cual las hace un modelo especialmente útil para el estudio de mecanismo de regulación neuronal (Biedler et al., 1973; Shipley et al., 2016). Una de las limitantes de este modelo es la relativa dificultad de transfección que presenta (Wang et al., 2018), remarcada por complejidades asociadas al uso de vectores de gran tamaño, como los usados en CRISPR (Søndergaard et al., 2020). A esto se suma la

dificultad de obtener líneas genéticamente idénticas y estables para minimizar la variación biológica comúnmente encontrada al trabajar con *Knock-outs* (Schumann et al., 2015; Smits et al., 2019). Además, los niveles de expresión residual pueden permanecer cercanos a los originales, dada la plasticidad biológica y mecanismos compensatorios como el reinicio de la traducción (obteniendo proteínas N-terminal truncadas), o la omisión de exones editados por variaciones en el splicing (Smits et al., 2019). En este contexto, se observaron bajos rendimientos de transfección, lo que obligó a reformular los métodos usados, siendo el posterior paso de aislamiento y expansión de clones uno de los cuellos de botella más significativos durante este proyecto. Completado esto, se observaron niveles variantes de expresión residual de PRPK, con rangos entre un 80% de disminución de expresión hasta mantención de los niveles originales, concluyendo en que no fue posible obtener mutantes *knock-out* completos para PRPK.

Respecto a la viabilidad de células deficientes para PRPK, se ha reportado que modelos de KO y KD de PRPK inhiben el crecimiento en líneas celulares (Hideshima et al., 2017; Goswami et al., 2019) o son directamente no viables para organismos completos (observado en ratones, moscas y peces zebra) (Ibar et al., 2013; Braun et al., 2017). Recalcadamente, PRPK se ha identificado también como un gen esencial en líneas modelo DLD1, GBM, HCT-116, HeLa, Jiyoye, K562, KBM7, NALM-6, y RPE1 (Bertomeu et al., 2018) y, en la última incorporación del dataset DepMap 22Q2, es considerada esencial en muestreos en líneas cancerosas, incluyendo SK-N-SH, SK-N-AS, y SK-N-FI; pero no en otros neuroblastomas como SK-N-DZ (Behan et al., 2019). La deficiencia en proliferación fue observada en un crecimiento marcadamente más lento de líneas KD que controles WT, tardando cerca del doble de tiempo en alcanzar la misma confluencia,

dejando abierta la posibilidad de que estos pocos KO completos fueran rebasados entre las rondas de selección. Esto último está respaldado en que, de las líneas obtenidas, las que presentaban mayor disminución en PRPK (*knock-down* de hasta 80%) también presentaban una marcada disminución en fitness, al punto de que múltiples de estas líneas no pudieron ser expandidas para posteriores análisis y conservación. Esto es esperable, dada la función de PRPK como componente de TCTC (sumada a su cercana interacción con OSGEP), que a su vez es esencial para los procesos de síntesis tRNA y consecuente síntesis de proteínas, y previa evidencia apuntando a *knock-downs* transitorios de PRPK promoviendo apoptosis en modelos de cáncer (Braun et al., 2017). En el modelo HEK293 se observó un leve aumento en la tasa proliferativa de los mutantes PRPK-KO (Kennaley, 2019; Goswami et al., 2019), lo cual concuerda con la capacidad excepcional de adaptarse de estas células la cual ha sido observada anteriormente (Stepanenko and Dmitrenko, 2015; Smits et al., 2019; Malm et al., 2020). Esta capacidad ha sido asociada a su inestabilidad genómica, ya que el cariotipo de las células HEK293 es altamente inestable, con una moda de 72-76 cromosomas (Stepanenko and Dmitrenko, 2015), conllevando a una alta variación en números de copias de genes. Considerando esto, aún faltan futuros análisis funcionales para determinar los mecanismos moleculares detrás de este efecto, como pueden ser expresión de proteínas involucradas en rutas alternativas de síntesis de tRNA, ajenas a TCTC, y posibles alteraciones a su número de copias.

La metodología de este proyecto puede ser descrita como *knock-in*, desde la perspectiva de los marcadores de selección que son insertados en los exones de PRPK para causar una pérdida de función de esta, siendo posible reemplazar estos marcadores por un constructo que además incluya variantes de PRPK. Así, en SH-SY5Y, una alternativa

para estudiar de mejor manera y más controlada las funciones de PRPK, sería directamente la creación de modelos *knock-in* con mutantes de PRPK, permitiendo observar el efecto de una pérdida parcial de función (ej. Inactivando la función kinasa, o simulando mutaciones presentes en GAMOS), o usando KO condicional. Aunque SH-SY5Y es un modelo clásico para el estudio de procesos relacionados a diferenciación y establecimiento de morfología neuronal, hay que destacar que no es el único modelo de neuroblastoma. Se ha reportado que otras líneas de neuroblastomas como SK-N-DZ, MHH-NB-11, CHP-212 y IMR-32, presentan una respuesta proliferativa nula o levemente positiva a *knock-downs* de PRPK (Behan et al., 2019), indicando una mayor actividad de los mecanismos compensatorios (dígase rutas alternativas de síntesis de tRNAs). Esta característica puede limitar su utilidad como modelos normales (por ejemplo, parte de la resistencia de SK-N-DZ puede ser explicada por mutaciones en P53), pero, aun así, pueden servir como parental para líneas similares a neuronas diferenciadas desde estas líneas modificadas, permitiéndonos observar el rol de PRPK en su contexto de kinasa ajena a TCTC, y más enfocado en su rol en regulación de neuritas.

Cambios en la dinámica de diferenciación

Uno de los focos de este trabajo es la relación de PRPK con la modulación de los procesos de elongación axonal, donde PRPK posee un rol no-canónico (Villarreal-Campos et al., 2016). En este trabajo se observó como el KD de PRPK generó efectos sobre las dinámicas de diferenciación y generación de neuritas. Específicamente, al inducir diferenciación mediante ácido retinoico, se notó un incremento en la proporción de células diferenciadas (Figura 5), no obstante, sin cambios significativos en la longitud de las neuritas establecidas. En este sentido, en experimentos de interferencia en neuronas de ratón, se ha observado previamente un incremento en la longitud de los

axones, el cual fue asociado a un aumento en los niveles de Rab35 de dichas células (Villarroel-Campos et al., 2016).

Para comprender los mecanismos subyacentes en los cambios morfológicos observados, realizamos un screening de múltiples proteínas Rabs. Molecularmente, en SH-SY5Y se observaron efectos sobre proteínas Rabs asociadas a diversas facetas de regulación del tráfico, notándose el incremento de Rab1b, Rab7a, Rab11b, Rab23, y VAMP7 (Figura 6). Junto a ello, se observó un incremento leve en Rab35, lo que ya ha sido descrito en el evento en que PRPK induce la ubiquitinación y posterior degradación de Rab35 (Figura Suplementaria 2H), siendo también observado que interferencia shRNA contra PRPK resulta en una acumulación de Rab35 (Villarroel-Campos et al., 2016) Este fenotipo involucrando Rabs también se observó en HEK293 (Figura 7), no obstante, sin notar un cambio en la expresión de Rab7a.

El proceso de diferenciación en SH-SY5Y está marcado por un arresto en la proliferación celular y disminución en replicación del DNA, en contrapunto con un aumento en la expresión de genes asociados a transmisión sináptica, reestructuración y desensamblaje de matriz extracelular, y fusión y exocitosis de vesículas (Chiocchetti et al., 2016).

Se ha observado que Rab1b inhibe proliferación celular en cáncer, al opuesto que Rab1a (Jiang et al., 2015), lo que concuerda con un arresto en proliferación, pero más relevantemente, puede ser uno de los factores que causan la pérdida general de fitness de las Resumiendo, observamos un aumento en la proporción de células SH-SY5Y modificadas. Complementando, el modelo HEK PRPK-KO muestra un aumento menor en la expresión de esta, lo que resulta interesante en vista de que HEK se mantiene viable y proliferativa. Sería interesante estudiar el efecto de un *knock-down* de Rab1a sobre la proliferación de SH.

Rab7a aumentó notoriamente en las líneas SH PRPK-KD, previamente reportándose como un marcador de proliferación en líneas de cáncer, y como promotor de diferenciación de células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs, *myeloid-derived suppressor cells*) (Ding et al., 2017), las cuales comparten un origen en médula ósea con SH-SY5Y. En contrapunto, en la línea HEK PRPK-KO, no se observó un aumento en Rab7a, lo que implica que la supervivencia de estas líneas está dada por otros mecanismos, impulsando la búsqueda de estos. diferenciadas, y luego observamos un aumento general en las proteínas Rabs asociadas, que además era presente en líneas HEK293 PRPK-KO.

Rab11b está ampliamente descrita como un regulador de crecimiento neurítico y axonal, el crecimiento de dendritas, diferenciación de glías, y plasticidad sináptica (Rozés-Salvador et al., 2020), por lo que su aumento en las líneas SH-SY5Y concuerda con lo observado en el incremento de diferenciación. Esta interactúa con Rab35 para promover la elongación axonal, lo que es relevante en contexto de que, aunque se observó un ligero aumento, no se encontró un cambio significativo en la longitud final de las neuritas. Cabe mencionar que durante diferenciación de SH-SY5Y *wild-type*, Rab35 no cambia su expresión de forma significativa (Chiocchetti et al., 2016). Similar a lo observado en Rab7a, el incremento de esta no fue tan notorio en la línea HEK PRPK-KO.

Si bien se ha demostrado que Rab23 desempeña un papel en el desarrollo del cáncer, mediante señalización vía AKT y modulación de Rac1 en modelos de cáncer, y cilios (Ye et al., 2014; Hor et al., 2018; Zhao et al., 2019). su papel en el desarrollo de neuritas no ha sido extensamente estudiado. Es probable que su mayor expresión en líneas deficientes en PRPK esté relacionada con la supervivencia de estas células, dada su

función descrita como promotor de proliferación, pero no se puede descartar un potencial papel en el desarrollo de neuritas, justificando una consecuente investigación.

VAMP7 se encontró aumentada en ambos modelos, SH-SY5Y y HEK293, sin una diferencia significativa entre estos. Data publicada por Chiocchetti et al. (2016) analizando diferenciación de SH-SY5Y inducida por ácido retinoico no mostró cambios en VAMP7 durante la diferenciación, por lo que el efecto aquí observado es probablemente relacionado con el rol de VAMP7 como modulador de exocitosis, lo que puede relacionarse con el aumento observado en VAMP7 en la línea HEK293.

Futura perspectiva metodológica

Una parte de este proyecto consideró la puesta a punto de un flujo de trabajo para CRISPR en el laboratorio, principalmente de las técnicas y protocolos para el cultivo de líneas clonales y la validación de estas. Se obtuvieron múltiples líneas monoclonales de células SH, las cuales mantuvieron, aunque disminuida, la expresión de PRPK. En vista de que PRPK presenta una única copia del gen, y SH-SY5Y no presenta multiplicidad, es pertinente asumir que estas líneas son al menos heterocigotas para la expresión de PRPK, y por ende es viable un segundo evento CRISPR para eliminar el otro alelo. En sí, esto es factible usando el mismo set de guías, dado que la secuencia original fue destruida por la inserción del marcador de selección, sumado al uso de un segundo (y diferente) marcador de selección para así obtener finalmente líneas completamente KO. Cabe cuestionar la viabilidad de estas líneas *después* de remover dicho segundo alelo.

La modificación mediante CRISPR de líneas neuronales o similares a estas (como el caso de neuroblastomas) es aún un área en desarrollo. A diferencia de otras líneas como HELA o HEK293, las líneas neuronales tienen una tasa de crecimiento notoriamente más lenta y son menos proclives a aceptar DNA externo en transfecciones (Willems et al.,

2020; Fang et al., 2020, 2021), lo que además dificulta la incorporación de los vectores transitorios que expresan Cas9 y los gRNA. Una potencial solución a esto último es el uso de ribonucleoproteínas (RNP), mediante la expresión y purificación de Cas9 y la transcripción *in vitro* de los sgRNA (Schumann et al., 2015; Roth et al., 2018; Naeimi Kararoudi et al., 2018). Esto permitiría superar el cuello de botella inicial que es la eficiencia de transfección de los complejos Cas9-gRNA, permitiendo aumentar el pool inicial de células con potenciales eventos de inserción.

Durante el desarrollo de este proyecto, han surgido multitud de mejoras a los métodos asociados a CRISPR para el estudio de proteínas en neuronas y líneas cercanas (como el neuroblastoma aquí usado). Estos permiten agilizar los tiempos de desarrollo de *knock-ins* (Willems et al., 2020), circunvenjan limitantes en el diseño de guías (Fang et al., 2020), y facilitan *multiplexing* (edición concurrente de múltiples genes en una misma muestra) de KI para el estudio de interacción proteína-proteína *in vivo* (Droogers et al., 2022). Esta última técnica permite el marcaje de múltiples proteínas endógenas con tags fluorescentes en una misma célula, posibilitando así la realización de experimentos FRET, a fin de observar *in vivo* la interacción de estas proteínas marcadas. Con esto, sería posible la construcción de librerías para interactores conocidos de PRPK, obteniendo así evidencia *in vivo* de estas interacciones, permitiendo así estudiar como estas interacciones cambian durante el desarrollo neuronal, y en respuesta a estímulos como estrés oxidativo o la inducción de diferenciación.

Conclusiones

Las líneas generadas en este trabajo son heterocigotas para PRPK, resultando en una disminución de la expresión de PRPK, lo que luego se correlaciona con cambios en la tasa de proliferación, cambios en los perfiles de expresión de múltiples proteínas Rabs, y cambios en las dinámicas de diferenciación de estas células.

1. PRPK corresponde es un gen esencial en neuroblastomas SH-SY5Y, por lo que un *KO* es no-viable y por ende, mecanismos alternativos de estudio deben ser propuestos.
2. La disminución de PRPK favorece la diferenciación en líneas SH-SY5Y, observándose cambios significativos en la proporción de células diferenciadas tras inducción con Ácido Retinoico, y un incremento menor en la proporción células espontáneamente diferenciadas sin tratamiento.
3. Un *KD* estable de PRPK se está asociado a una acumulación de proteínas Rab7a, Rab1b, Rab11b, y VAMP7; con menores aumentos en Rab23 y el previamente reportado aumento en Rab35. Estas proteínas, exceptuando VAMP7, han sido previamente reportadas como aumentadas durante diferenciación de SH-SY5Y, siendo así parte de la explicación molecular del punto 2.

Bibliografía

- Abe, Y., Matsumoto, S., Wei, S., Nezu, K., Miyoshi, A., Kito, K., Ueda, N., Shigemoto, K., Hitsumoto, Y., Nikawa, J., Enomoto, Y., 2001. Cloning and Characterization of a p53-related Protein Kinase Expressed in Interleukin-2-activated Cytotoxic T-cells, Epithelial Tumor Cell Lines, and the Testes. *J. Biol. Chem.* 276, 44003–44011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105669200>
- Abe, Y., Takeuchi, T., Imai, Y., Murase, R., Kamei, Y., Fujibuchi, T., Matsumoto, S., Ueda, N., Ogasawara, M., Shigemoto, K., Kito, K., 2006. A Small Ras-like protein Ray/Rab1c modulates the p53-regulating activity of PRPK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.071>
- Abel, M.E., Zhang, X., Asah, S.M., Wolfinger, A., McCullumsmith, R.E., O'Donovan, S.M., 2020. KEOPS complex expression in the frontal cortex in major depression and schizophrenia. *World J. Biol. Psychiatry.* <https://doi.org/10.1080/15622975.2020.1821917>
- Arrondel, C., Missouri, S., Snoek, R., Patat, J., Menara, G., Collinet, B., Liger, D., Durand, D., Gribouval, O., Boyer, O., Buscara, L., Martin, G., Machuca, E., Nevo, F., Lescop, E., Braun, D.A., Bosch, A.-C., Sanquer, S., Guerrero, I.C., Revy, P., Parisot, M., Masson, C., Boddaert, N., Charbit, M., Decramer, S., Novo, R., Macher, M.-A., Ranchin, B., Bacchetta, J., Laurent, A., Collardeau-Frachon, S., van Eerde, A.M., Hildebrandt, F., Magen, D., Antignac, C., van Tilbeurgh, H., Mollet, G., 2019. Defects in t6A tRNA modification due to GON7 and YRDC mutations lead to Galloway-Mowat syndrome. *Nat. Commun.* 10, 3967. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11951-x>
- Arshadi, C., Günther, U., Eddison, M., Harrington, K.I.S., Ferreira, T.A., 2021. SNT: a unifying toolbox for quantification of neuronal anatomy. *Nat. Methods* 18, 374–377. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01105-7>
- Beenstock, J., Ona, S.M., Porat, J., Orlicky, S., Wan, L.C.K., Ceccarelli, D.F., Maisonneuve, P., Szilard, R.K., Yin, Z., Setiaputra, D., Mao, D.Y.L., Khan, M., Raval, S., Schriemer, D.C., Bayfield, M.A., Durocher, D., Sicheri, F., 2020. A substrate binding model for the KEOPS tRNA modifying complex. *Nat. Commun.* 11, 6233. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19990-5>
- Beenstock, J., Sicheri, F., 2021. The structural and functional workings of KEOPS. *Nucleic Acids Res.* 49, 10818–10834. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab865>
- Behan, F.M., Iorio, F., Picco, G., Gonçalves, E., Beaver, C.M., Migliardi, G., Santos, R., Rao, Y., Sassi, F., Pinnelli, M., Ansari, R., Harper, S., Jackson, D.A., McRae, R., Pooley, R., Wilkinson, P., van der Meer, D., Dow, D., Buser-Doepner, C., Bertotti, A., Trusolino, L., Stronach, E.A., Saez-Rodriguez, J., Yusa, K., Garnett, M.J., 2019. Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR–Cas9 screens. *Nature* 568, 511–516. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1103-9>
- Berginski, M.E., Moret, N., Liu, C., Goldfarb, D., Sorger, P.K., Gomez, S.M., 2020. The Dark Kinase Knowledgebase: an online compendium of knowledge and experimental results of understudied kinases. *Nucleic Acids Res.* 7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa853>
- Bertomeu, T., Coulombe-Huntington, J., Chatr-aryamontri, A., Bourdages, K.G., Coyaud, E., Raught, B., Xia, Y., Tyers, M., 2018. A High-Resolution Genome-Wide CRISPR/Cas9 Viability Screen Reveals Structural Features and Contextual

- Diversity of the Human Cell-Essential Proteome. *Mol. Cell. Biol.* 38. <https://doi.org/10.1128/MCB.00302-17>
- Biedler, J.L., Helson, L., Spengler, B.A., 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 33, 2643–2652.
- Braun, D.A., Rao, J., Mollet, G., Schapiro, D., Daugeron, M.-C., Tan, W., Gribouval, O., Boyer, O., Revy, P., Jobst-Schwan, T., Schmidt, J.M., Lawson, J.A., Schanze, D., Ashraf, S., Ullmann, J.F.P., Hoogstraten, C.A., Boddaert, N., Collinet, B., Martin, G., Liger, D., Lovric, S., Furlano, M., Guerrera, I.C., Sanchez-Ferras, O., Hu, J.F., Boschat, A.-C., Sanquer, S., Menten, B., Vergult, S., De Rocker, N., Airik, M., Hermle, T., Shril, S., Widmeier, E., Gee, H.Y., Choi, W.-I., Sadowski, C.E., Pabst, W.L., Warejko, J.K., Daga, A., Basta, T., Matejas, V., Scharmman, K., Kienast, S.D., Behnam, B., Beeson, B., Begtrup, A., Bruce, M., Ch'ng, G.-S., Lin, S.-P., Chang, J.-H., Chen, C.-H., Cho, M.T., Gaffney, P.M., Gipson, P.E., Hsu, C.-H., Kari, J.A., Ke, Y.-Y., Kiraly-Borri, C., Lai, W., Lemyre, E., Littlejohn, R.O., Masri, A., Moghtaderi, M., Nakamura, K., Ozaltin, F., Praet, M., Prasad, C., Prytula, A., Roeder, E.R., Rump, P., Schnur, R.E., Shiihara, T., Sinha, M.D., Soliman, N.A., Soulam, K., Sweetser, D.A., Tsai, W.-H., Tsai, J.-D., Topaloglu, R., Vester, U., Viskochil, D.H., Vatanavicharn, N., Waxler, J.L., Wierenga, K.J., Wolf, M.T.F., Wong, S.-N., Leidel, S.A., Truglio, G., Dedon, P.C., Poduri, A., Mane, S., Lifton, R.P., Bouchard, M., Kannu, P., Chitayat, D., Magen, D., Callewaert, B., van Tilbeurgh, H., Zenker, M., Antignac, C., Hildebrandt, F., 2017. Mutations in KEOPS-complex genes cause nephrotic syndrome with primary microcephaly. *Nat. Genet.* 49, 1529–1538. <https://doi.org/10.1038/ng.3933>
- Chiocchetti, A.G., Haslinger, D., Stein, J.L., de la Torre-Ubieta, L., Cocchi, E., Rothämel, T., Lindlar, S., Waltes, R., Fulda, S., Geschwind, D.H., Freitag, C.M., 2016. Transcriptomic signatures of neuronal differentiation and their association with risk genes for autism spectrum and related neuropsychiatric disorders. *Transl. Psychiatry* 6, e864. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.119>
- Cui, L., Li, H., Xi, Y., Hu, Q., Liu, H., Fan, J., Xiang, Y., Zhang, X., Shui, W., Lai, Y., 2022. Vesicle trafficking and vesicle fusion: mechanisms, biological functions, and their implications for potential disease therapy. *Mol. Biomed.* 3, 29. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00090-3>
- Dempster, J.M., Rossen, J., Kazachkova, M., Pan, J., Kugener, G., Root, D.E., Tsherniak, A., 2019. Extracting Biological Insights from the Project Achilles Genome-Scale CRISPR Screens in Cancer Cell Lines (preprint). *Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1101/720243>
- Ding, X., Zhang, W., Zhao, T., Yan, C., Du, H., 2017. Rab7 GTPase controls lipid metabolic signaling in myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget* 8, 30123–30137. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16280>
- Droogers, W.J., Willems, J., MacGillavry, H.D., de Jong, A.P.H., 2022. Duplex Labeling and Manipulation of Neuronal Proteins Using Sequential CRISPR/Cas9 Gene Editing. *eneuro* 9, ENEURO.0056-22.2022. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0056-22.2022>
- Facchin, S., Ruzzene, M., Peggion, C., Sartori, G., Carignani, G., Marin, O., Brustolon, F., Lopreiato, R., Pinna, L.A., 2007. Phosphorylation and activation of the atypical kinase p53-related protein kinase (PRPK) by Akt/PKB. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 64, 2680–2689. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7179-7>

- Fang, H., Bygrave, A., Roth, R.H., Johnson, R., Haganir, R., 2020. An Optimized CRISPR/Cas9 Approach for Precise Genome Editing in Neurons.
- Fang, H., Bygrave, A.M., Roth, R.H., Johnson, R.C., Haganir, R.L., 2021. An optimized CRISPR/Cas9 approach for precise genome editing in neurons. *eLife* 10, e65202. <https://doi.org/10.7554/eLife.65202>
- Goswami, M.T., VanDenBerg, K.R., Han, S., Wang, L.L., Singh, B., Weiss, T., Barlow, M., Kamberov, S., Wilder-Romans, K., Rhodes, D.R., Feng, F.Y., Tomlins, S.A., 2019. Identification of TP53RK-Binding Protein (TPRKB) Dependency in TP53-Deficient Cancers. *Mol. Cancer Res. MCR* 17, 1652–1664. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0144>
- Hecker, A., Graille, M., Madec, E., Gadelle, D., Le Cam, E., van Tilbergh, H., Forterre, P., 2009. The universal Kae1 protein and the associated Bud32 kinase (PRPK), a mysterious protein couple probably essential for genome maintenance in Archaea and Eukarya. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 29–35. <https://doi.org/10.1042/BST0370029>
- Hideshima, T., Cottini, F., Nozawa, Y., Seo, H.-S., Ohguchi, H., Samur, M.K., Cirstea, D., Mimura, N., Iwasawa, Y., Richardson, P.G., Munshi, N.C., Chauhan, D., Masefski, W., Utsugi, T., Dhe-Paganon, S., Anderson, K.C., 2017. p53-related protein kinase confers poor prognosis and represents a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Blood* 129, 1308–1319. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-738500>
- Hor, C.H.H., Tang, B.L., Goh, E.L.K., 2018. Rab23 and developmental disorders. *Rev. Neurosci.* 29, 849–860. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0110>
- Ibar, C., Cataldo, V.F., Vásquez-Doorman, C., Olguín, P., Glavic, A., 2013. Drosophila p53-related protein kinase is required for PI3K/TOR pathway-dependent growth. *Dev. Camb. Engl.* 140, 1282–1291. <https://doi.org/10.1242/dev.086918>
- Ivanova, D., Cousin, M.A., 2022. Synaptic Vesicle Recycling and the Endolysosomal System: A Reappraisal of Form and Function. *Front. Synaptic Neurosci.* 14, 826098. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2022.826098>
- Jiang, H.-L., Sun, H.-F., Gao, S.-P., Li, L.-D., Hu, X., Wu, J., Jin, W., 2015. Loss of RAB1B promotes triple-negative breast cancer metastasis by activating TGF- β /SMAD signaling. *Oncotarget* 6, 16352–16365. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3877>
- Kennaley, K., 2019. Identification and Characterization of TPRKB Dependency in TP53 Deficient Cancers (Masters/PhD Thesis). University of Michigan, Michigan, US.
- Kisseleva-Romanova, E., Lopreiato, R., Baudin-Baillieu, A., Rousselle, J.-C., Ilan, L., Hofmann, K., Namane, A., Mann, C., Libri, D., 2006. Yeast homolog of a cancer-testis antigen defines a new transcription complex. *EMBO J.* 25, 3576–3585. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601235>
- Koonin, E.V., 2003. Comparative genomics, minimal gene-sets and the last universal common ancestor. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 127–136. <https://doi.org/10.1038/nrmicro751>
- Kovalevich, J., Langford, D., 2013. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1078, 9–21. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_2
- Li, J., Ma, X., Banerjee, S., Chen, H., Ma, W., Bode, A.M., Dong, Z., 2021. Crystal structure of the human PRPK-TPRKB complex. *Commun. Biol.* 4, 167. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01683-4>
- Liebeskind, B.J., McWhite, C.D., Marcotte, E.M., 2016. Towards Consensus Gene Ages. *Genome Biol. Evol.* 8, 1812–1823. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw113>

- Lorenz, R., Bernhart, S.H., Höner zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P.F., Hofacker, I.L., 2011. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* 6, 26. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>
- Malm, M., Saghaleyni, R., Lundqvist, M., Giudici, M., Chotteau, V., Field, R., Varley, P.G., Hatton, D., Grassi, L., Svensson, T., Nielsen, J., Rockberg, J., 2020. Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development. *Sci. Rep.* 10, 18996. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76137-8>
- Mao, D.Y.L., Neculai, D., Downey, M., Orlicky, S., Haffani, Y.Z., Ceccarelli, D.F., Ho, J.S.L., Szilard, R.K., Zhang, W., Ho, C.S., Wan, L., Fares, C., Rumpel, S., Kurinov, I., Arrowsmith, C.H., Durocher, D., Sicheri, F., 2008. Atomic Structure of the KEOPS Complex: An Ancient Protein Kinase-Containing Molecular Machine. *Mol. Cell* 32, 259–275. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.002>
- Mignogna, M.L., D'Adamo, P., 2018. Critical importance of RAB proteins for synaptic function. *Small GTPases* 9, 145–157. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1277001>
- Miyoshi, A., Kito, K., Aramoto, T., Abe, Y., Kobayashi, N., Ueda, N., 2003. Identification of CGI-121, a novel PRPK (p53-related protein kinase)-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 399–405. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00333-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00333-4)
- Molina, E., Cataldo, V.F., Eggers, C., Muñoz-Madrid, V., Glavic, Á., 2022. p53 Related Protein Kinase is Required for Arp2/3-Dependent Actin Dynamics of Hemocytes in *Drosophila melanogaster*. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 859105. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.859105>
- Naeimi Kararoudi, M., Dolatshad, H., Trikha, P., Hussain, S.-R.A., Elmas, E., Foltz, J.A., Moseman, J.E., Thakkar, A., Nakkula, R.J., Lamb, M., Chakravarti, N., McLaughlin, K.J., Lee, D.A., 2018. Generation of Knock-out Primary and Expanded Human NK Cells Using Cas9 Ribonucleoproteins. *J. Vis. Exp.* 58237. <https://doi.org/10.3791/58237>
- Påhlman, S., Ruusala, A.I., Abrahamsson, L., Mattsson, M.E., Esscher, T., 1984. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ.* 14, 135–144. [https://doi.org/10.1016/0045-6039\(84\)90038-1](https://doi.org/10.1016/0045-6039(84)90038-1)
- Replogle, J.M., Saunders, R.A., Pogson, A.N., Hussmann, J.A., Lenail, A., Guna, A., Mascibroda, L., Wagner, E.J., Adelman, K., Lithwick-Yanai, G., Iremadze, N., Oberstrass, F., Lipson, D., Bonnar, J.L., Jost, M., Norman, T.M., Weissman, J.S., 2022. Mapping information-rich genotype-phenotype landscapes with genome-scale Perturb-seq. *Cell* 185, 2559-2575.e28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.05.013>
- Roh, E., Lee, M.-H., Zykova, T.A., Zhu, F., Nadas, J., Kim, H.-G., Bae, K.B., Li, Y., Cho, Y.Y., Curiel-Lewandrowski, C., Einspahr, J., Dickinson, S.E., Bode, A.M., Dong, Z., 2018. Targeting PRPK and TOPK for skin cancer prevention and therapy. *Oncogene* 37, 5633–5647. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0350-9>
- Rolland, T., Taşan, M., Charlotiaux, B., Pevzner, S.J., Zhong, Q., Sahni, N., Yi, S., Lemmens, I., Fontanillo, C., Mosca, R., Kamburov, A., Ghiassian, S.D., Yang, X., Ghamsari, L., Balcha, D., Begg, B.E., Braun, P., Brehme, M., Broly, M.P., Carvunis, A.-R., Convery-Zupan, D., Corominas, R., Coulombe-Huntington, J., Dann, E., Dreze, M., Dricot, A., Fan, C., Franzosa, E., Gebreab, F., Gutierrez, B.J., Hardy, M.F., Jin, M., Kang, S., Kiros, R., Lin, G.N., Luck, K., MacWilliams, A., Menche, J., Murray, R.R., Palagi, A., Poulin, M.M., Rambout, X., Rasla, J.,

- Reichert, P., Romero, V., Ruysinck, E., Sahalie, J.M., Scholz, A., Shah, A.A., Sharma, A., Shen, Y., Spirohn, K., Tam, S., Tejada, A.O., Trigg, S.A., Twizere, J.-C., Vega, K., Walsh, J., Cusick, M.E., Xia, Y., Barabási, A.-L., Iakoucheva, L.M., Aloy, P., De Las Rivas, J., Tavernier, J., Calderwood, M.A., Hill, D.E., Hao, T., Roth, F.P., Vidal, M., 2014. A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell* 159, 1212–1226. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.050>
- Roth, T.L., Puig-Saus, C., Yu, R., Shifrut, E., Carnevale, J., Li, P.J., Hiatt, J., Saco, J., Krystofinski, P., Li, H., Tobin, V., Nguyen, D.N., Lee, M.R., Putnam, A.L., Ferris, A.L., Chen, J.W., Schickel, J.-N., Pellerin, L., Carmody, D., Alkorta-Aranburu, G., del Gaudio, D., Matsumoto, H., Morell, M., Mao, Y., Cho, M., Quadros, R.M., Gurusurthy, C.B., Smith, B., Haugwitz, M., Hughes, S.H., Weissman, J.S., Schumann, K., Esensten, J.H., May, A.P., Ashworth, A., Kupfer, G.M., Greeley, S.A.W., Bacchetta, R., Meffre, E., Roncarolo, M.G., Romberg, N., Herold, K.C., Ribas, A., Leonetti, M.D., Marson, A., 2018. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature* 559, 405–409. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0326-5>
- Rozés-Salvador, V., González-Billault, C., Conde, C., 2020. The Recycling Endosome in Nerve Cell Development: One Rab to Rule Them All? *Front. Cell Dev. Biol.* 8.
- Rual, J.-F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Berriz, G.F., Gibbons, F.D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., Klitgord, N., Simon, C., Boxem, M., Milstein, S., Rosenberg, J., Goldberg, D.S., Zhang, L.V., Wong, S.L., Franklin, G., Li, S., Albala, J.S., Lim, J., Fraughton, C., Llamasas, E., Cevik, S., Bex, C., Lamesch, P., Sikorski, R.S., Vandenhaute, J., Zoghbi, H.Y., Smolyar, A., Bosak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Cusick, M.E., Hill, D.E., Roth, F.P., Vidal, M., 2005. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 437, 1173–1178. <https://doi.org/10.1038/nature04209>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schumann, K., Lin, S., Boyer, E., Simeonov, D.R., Subramaniam, M., Gate, R.E., Haliburton, G.E., Ye, C.J., Bluestone, J.A., Doudna, J.A., Marson, A., 2015. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 10437–10442. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512503112>
- Shiple, M.M., Mangold, C.A., Szpara, M.L., 2016. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J. Vis. Exp. JoVE* 53193. <https://doi.org/10.3791/53193>
- Smits, A.H., Ziebell, F., Joberty, G., Zinn, N., Mueller, W.F., Clauder-Münster, S., Eberhard, D., Fälth Savitski, M., Grandi, P., Jakob, P., Michon, A.-M., Sun, H., Tessmer, K., Bürckstümmer, T., Bantscheff, M., Steinmetz, L.M., Drewes, G., Huber, W., 2019. Biological plasticity rescues target activity in CRISPR knock outs. *Nat. Methods* 16, 1087–1093. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0614-5>
- Søndergaard, J.N., Geng, K., Sommerauer, C., Atanasoai, I., Yin, X., Kutter, C., 2020. Successful delivery of large-size CRISPR/Cas9 vectors in hard-to-transfect human cells using small plasmids. *Commun. Biol.* 3, 1–6. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1045-7>

- Stepanenko, A.A., Dmitrenko, V.V., 2015. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene* 569, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.065>
- Stirling, D.R., Swain-Bowden, M.J., Lucas, A.M., Carpenter, A.E., Cimini, B., Goodman, A., 2021. CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.06.30.450416>
- Stocchetto, S., Marin, O., Carignani, G., Pinna, L.A., 1997. Biochemical evidence that *Saccharomyces cerevisiae* YGR262c gene, required for normal growth, encodes a novel Ser/Thr-specific protein kinase. *FEBS Lett.* 414, 171–175. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)00980-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00980-0)
- Villarroel-Campos, D., Henriquez, D.R., Bodaleo, F.J., Oguchi, M.E., Bronfman, F.C., Fukuda, M., Gonzalez-Billault, C., 2016. Rab35 Functions in Axon Elongation Are Regulated by P53-Related Protein Kinase in a Mechanism That Involves Rab35 Protein Degradation and the Microtubule-Associated Protein 1B. *J. Neurosci.* 36, 7298–7313. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4064-15.2016>
- Wan, L.C.K., Maisonneuve, P., Szilard, R.K., Lambert, J.-P., Ng, T.F., Manczyk, N., Huang, H., Laister, R., Caudy, A.A., Gingras, A.-C., Durocher, D., Sicheri, F., 2017. Proteomic analysis of the human KEOPS complex identifies C14ORF142 as a core subunit homologous to yeast Gon7. *Nucleic Acids Res.* 45, 805–817. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1181>
- Wang, T., Larcher, L.M., Ma, L., Veedu, R.N., 2018. Systematic Screening of Commonly Used Commercial Transfection Reagents towards Efficient Transfection of Single-Stranded Oligonucleotides. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* 23, 2564. <https://doi.org/10.3390/molecules23102564>
- Willems, J., Jong, A.P.H. de, Scheefhals, N., Mertens, E.J., Catsburg, L.A.E., Poorthuis, R.B., Winter, F. de, Verhaagen, J., Meye, F.J., MacGillavry, H., 2020. ORANGE: A CRISPR/Cas9-based genome editing toolbox for epitope tagging of endogenous proteins in neurons. *PLoS Biol.* <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000665>
- Wu, Y., Zhou, L., Wang, Z., Wang, X., Zhang, R., Zheng, L., Kang, T., 2020. Systematic screening for potential therapeutic targets in osteosarcoma through a kinome-wide CRISPR-Cas9 library. *Cancer Biol. Med.* 17, 782–794. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0162>
- Ye, F., Tang, H., Liu, Q., Xie, Xinhua, Wu, M., Liu, X., Chen, B., Xie, Xiaoming, 2014. miR-200b as a prognostic factor in breast cancer targets multiple members of RAB family. *J. Transl. Med.* 12, 17. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-17>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zhao, T., Han, D., Meng, H., 2019. Rab23 contributes to the progression of colorectal cancer via protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Oncol. Lett.* 18, 1793–1799. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10491>
- Zimmer, A.M., Pan, Y.K., Chandrapalan, T., Kwong, R.W.M., Perry, S.F., 2019. Loss-of-function approaches in comparative physiology: is there a future for knockdown experiments in the era of genome editing? *J. Exp. Biol.* 222, jeb175737. <https://doi.org/10.1242/jeb.175737>
- Zykova, T., Zhu, F., Wang, L., Li, H., Lim, D.Y., Yao, K., Roh, E., Yoon, S.-P., Kim, H.-G., Bae, K.B., Wen, W., Shin, S.H., Nadas, J., Li, Y., Ma, W., Bode, A.M., Dong,

Z., 2018. Targeting PRPK Function Blocks Colon Cancer Metastasis. *Mol. Cancer Ther.* 17, 1101–1113. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0628>

Zykova, T.A., Zhu, F., Wang, L., Li, H., Bai, R., Lim, D.Y., Yao, K., Bode, A.M., Dong, Z., 2017. The T-LAK Cell-originated Protein Kinase Signal Pathway Promotes Colorectal Cancer Metastasis. *EBioMedicine* 18, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.04.003>

Anexo

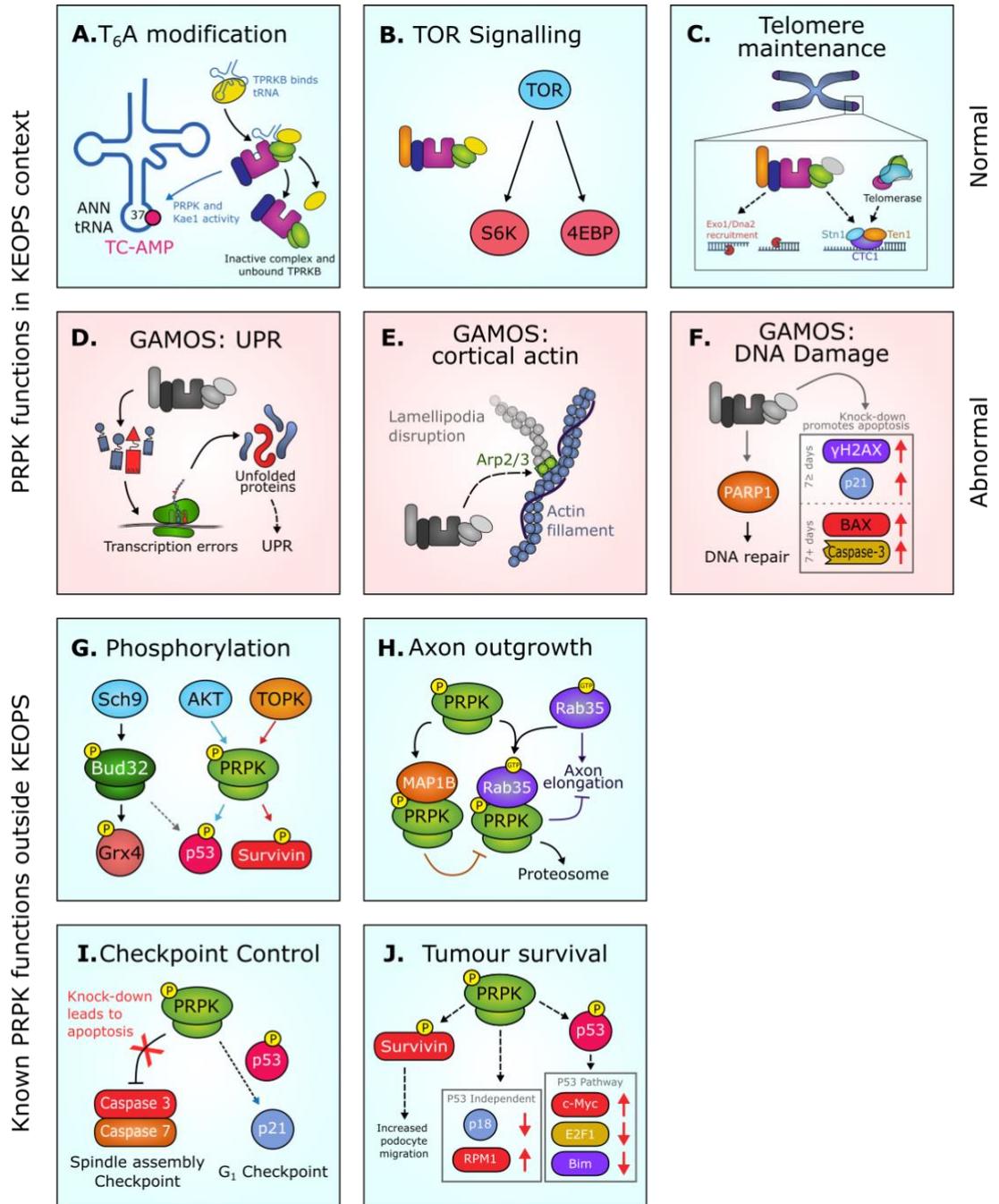


Figura Suplementaria 1. Funciones conocidas de PRPK. **A.** El rol más aceptado para el complejo treonil-carbonilo transferasa (TCTC) en levadura es la transferencia de TC-AMP al nucleótido 37 en ARNt de ANN, siendo la unidad funcional mínima Pcc-Kae1-Bud32. Aquí, Kae1 es la subunidad catalítica de unión TC-AMP, Bud32 exhibe actividad ATPasa y Pcc1 actúa como una unidad de dimerización estructural. OSGEP, PRPK y LAGE3 son los homólogos humanos respectivos. **B.** PRPK opera como un transductor para la vía

PI3K / TOR, siendo esencial para la regulación de S6K y 4E-BP en metazoos. Esto regula el crecimiento celular, como demuestran experimentos de *knock-down* de PRPK que la célula. Este fenotipo anormal se revierte mediante la regulación positiva de S6K activado, por mecanismos aún no caracterizados. **C.** TCTC está implicado en el *capping* de telómeros en levadura, de manera independiente de la participación de TCTC en la reparación del daño del ADN. Los defectos en las subunidades TCTC dan lugar a telómeros acortados en la levadura, marcadamente con defectos en Gon7 y Bud32. Contrariamente, se ha reportado que los pacientes con TCTC mutado tienen una longitud de telómeros normal, lo que sugiere que esto no es una función en humanos. **D.** La disfunción de TCTC se asocia con un aumento de la Respuesta a Proteína Desplegada (*Unfolded Protein Response*), dado el rol del complejo en la síntesis de tRNA. Esto parece estar focalizado en OSGEP, PRPK (ambos parte del complejo esencial de modificación de t6A) y TPRKB, ya que la interrupción de cualquiera de estos aumenta UPR y la actividad proteasómica. **E.** OSGEP y PRPK interactúan y colocalizan con Arp2/3 en podocitos humanos, y el knockdown de PRPK causa interrupciones en la red de actina subcortical. **F.** La eliminación de OSGEP, PRPK o TPRKB aumenta la respuesta al daño del ADN y la apoptosis en los podocitos humanos. Además, los tratamientos con mitomicina-C (un genotóxico) inducen la apoptosis a concentraciones a las que los podocitos WT no se ven afectados. Esto puede estar mediado por la interacción PRPK y OSGEP con PARP1, una proteína relacionada con la reparación del ADN. En modelos de levadura, TCTC también parece promover el reclutamiento de Exo1 y Dna2 en roturas de ADN, también se une al ADN *in vitro* y las roturas de ADN *in vivo*. **G.** PRPK es fosforilada en el residuo C-terminal Ser250 por AKT y TOPK, activando su actividad kinasa, y la posterior fosforilación indirecta de p53. Del mismo modo, Bud32 es fosforilada por Sch9 promoviendo la interacción con Grx4, pero necesariamente aumentando la fosforilación de Grx4. Esto muestra una función conservada a través de eucariotas, recalcada aún más por Bud32 siendo capaz de fosforilar p53 (no presente en la levadura). Survina actúa como mediador para la fosforilación de p53 y se ha identificado como un sustrato directo para PRPK en Thr34, que modula la estabilidad de Survina. **H.** PRPK induce la degradación proteasómica de Rab35, una pequeña GTPasa que promueve el crecimiento de axones en neuronas de rata. Esto es inhibido por la unión de MAP1B a PRPK, bloqueando así la degradación de Rab35 y promoviendo el desarrollo de polaridad axo-dendrítica. **I.** La eliminación de PRPK aumenta la activación de las caspasas 3/7 y conduce a la detención del ciclo celular debido a la activación del punto de control del conjunto del husillo. La regulación positiva de PRPK conduce a la inducción de p53 y p21 río abajo, que parece ser necesaria para la activación del punto de control G1. **J.** PRPK se ha encontrado aumentada en múltiples tipos de cáncer, como el mieloma y el carcinoma colorrectal, correlacionándose con una pobre prognosis. Si bien la reducción de PRPK se correlaciona con la disminución de la fosforilación de p53 y la disminución del crecimiento tumoral, lo que convierte a PRPK en un objetivo farmacológico potencial, se han encontrado vías independientes de p53. La expresión de p18 y RPM1 se altera con la eliminación de PRPK en células deficientes en p53. Además, la modulación de los reguladores río arriba de PRPK, como TOPK, también se ha propuesto como tratamientos potenciales en modelos de cáncer de piel inducidos por radiación UV. Se ha indicado que la depleción de TPRKB inhibe la proliferación tumoral en células nulas de p53, posiblemente actuando como una redundancia a la función de p53, ya que esta dependencia no se encuentra en las células que expresan p53. Relacionadamente, p53 parece mediar la degradación proteasomal de TPRKB, que es rescatada por PRPK. Esta misma interacción entre PRPK y TPRKB inhibe la unión de PRPK a p53, lo que sugiere similitudes entre TPRKB y p53. La actividad de PRPK se ha correlacionado con un aumento de la migración, como lo demuestran los experimentos de cierre y migración de heridas *in vitro* en lamelipodios humanos, y por las tasas de metástasis en cánceres colorrectales en los que la regulación positiva de PRPK se relacionó con una mala prognosis. Esto se relacionó con la fosforilación de Survina, independiente de p53, pero el mecanismo posterior sigue siendo indeterminado. Los estudios en GAMOS muestran que las mutaciones PRPK limitan la migración de podocitos al interrumpir la formación de redes de actina en sublamelipodios, pero esto parece ser un mecanismo de regulación separado relacionado con las proteínas del complejo ARP.

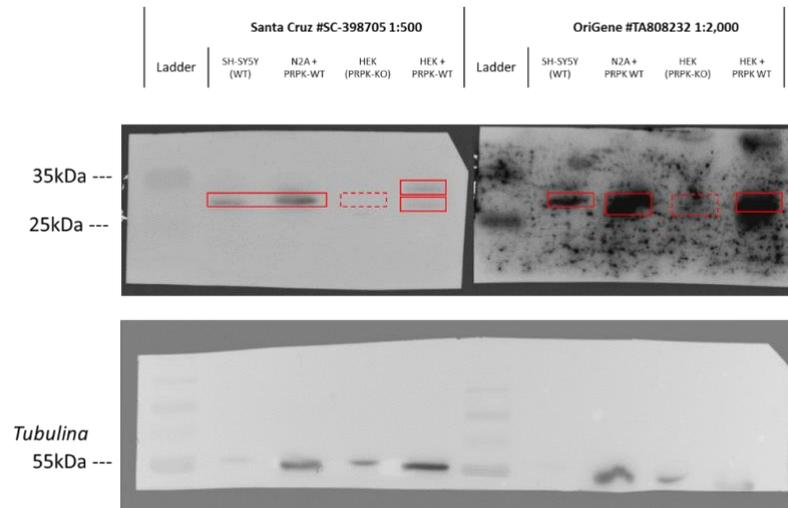


Figura Suplementaria 2. Pruebas de anticuerpos contra PRPK. El anticuerpo OriGene fue preferido, en vista de la marcada sensibilidad que presentaba. Acordemente, se optimizaron la concentración y lavados para mejorar la claridad de la señal. El Santa Cruz, usado a la mínima dilución recomendada, fue guardado de reserva.

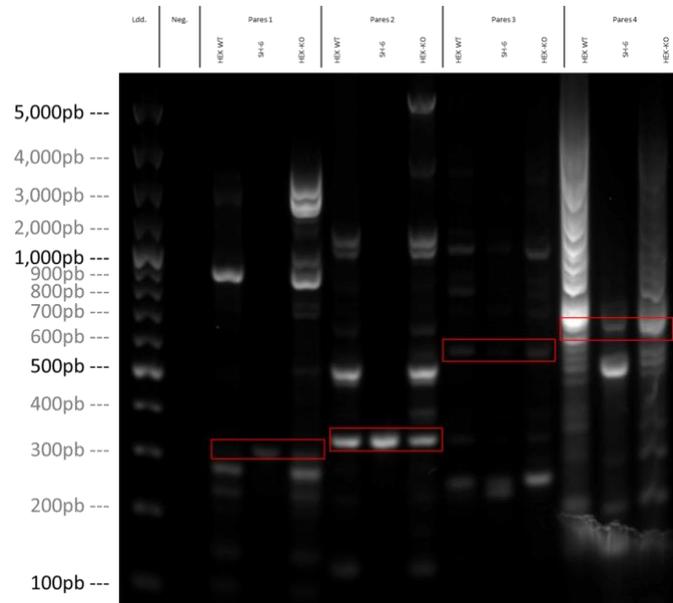


Figura Suplementaria 3. Puesta a punto de partidores en regiones CRIPSR de PRPK. El amplicón esperado se marca en el rectángulo rojo. Por la especificidad y calidad de señal, se prefirió usar el par 2 (PRPK_2F/R) para posteriores genotipificaciones, reemplazando PRPK_2F por INS_F, el cual se ubica en la secuencia del marcador de inserción y por tanto hace prueba de la localización de este en contexto de PRPK. Adicionalmente, se puede ver la mayor inestabilidad genética de la línea HEK, con múltiples sitios off-target que no están descritos en la secuencia humana cuando se diseñaron los partidores. **Nota:** al igual que la imagen de anticuerpos, esta se encuentra sin optimización.