



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Generación y caracterización de un modelo CRISPR-Cas9
del Síndrome por deficiencia de CDKL5 en *Drosophila
melanogaster*

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Palao Romero, Alejandro

Tutor/a: Galindo Orozco, Máximo Ibo

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO CRISPR-CAS9 DEL SÍNDROME POR DEFICIENCIA DE CDKL5 EN *Drosophila melanogaster*

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Agronómica y del Medio Natural

Universitat Politècnica de València

Autor: Alejandro Palao Romero

Tutor académico: Máximo Ibo Galindo Orozco



Valencia, Julio 2022

Curso académico 2021-2022

TÍTULO: Generación y caracterización de un modelo CRISPR-Cas9 del Síndrome por deficiencia de CDKL5 en *Drosophila melanogaster*.

TÍTOL: Generació i caracterització d'un model CRISPR-Cas9 de la Síndrome per deficiència de CDKL5 en *Drosophila melanogaster*.

TITLE: Generation and characterization of CDKL5 deficiency Disorder in a CRISPR-Cas9 *Drosophila melanogaster* model.

RESUMEN

La epilepsia es un problema neurológico responsable de un número considerable de las muertes mundiales y que afecta a más de 50 millones de personas. Además, cada año se diagnostican unos 5 millones de casos. Concretamente, se estima que entre 4 y 10 de cada 1000 personas presentan epilepsia activa, con ataques continuos. En nuestro trabajo, nos vamos a centrar en el Síndrome por deficiencia de CDKL5 (CDD, por sus siglas en inglés CDKL5 deficiency Disorder), un trastorno genético ligado al cromosoma X que provoca la aparición temprana de alteraciones graves del desarrollo neurológico. También en muchos casos acarrea convulsiones epilépticas de difícil control. Solo en España existen 29 casos diagnosticados, pero se sospecha que podría haber cerca de 400 personas, la mayoría mujeres por su modo de herencia y letalidad asociada al varón.

El gen *CDKL5* es el responsable de la síntesis de una proteína necesaria para el desarrollo y función normales del cerebro. La mayoría de las variantes patogénicas del gen *CDKL5* se producen espontáneamente e involucran una proteína no funcional o una ausencia completa de la misma. Se ha observado que estas variantes disfuncionales no se transmiten de padres a hijos, por lo que se originan *de novo*. Sin embargo, hay casos descritos de hermanos afectados por la misma versión de la proteína.

En este trabajo, se ha utilizado como modelo de la enfermedad a *Drosophila melanogaster*, con el fin de simular y corroborar sus síntomas, así como comprender las bases génicas y moleculares del trascurso del síndrome. El estudio se ha centrado en un gen candidato único en moscas, *CG7236*, y que se cree que es equivalente a la familia de genes *CDKL* en humanos, por lo que se propone renombrarlo a *Cdkl*. Para ello, los experimentos realizados han sido, en primer lugar, cruces con moscas que presentan un gen CRISPR en su segundo cromosoma con moscas que poseen la proteína Cas-9 en el tercero. Mediante cruces posteriores para obtener mutaciones en la línea germinal de la progenie, se han obtenido cepas de *D. melanogaster* con características fenotípicas diferenciales respecto a las moscas control de la variante Canton-S, como convulsiones o deficiencias locomotoras. Esto se comprobó en ensayos de convulsión y geotaxis negativa. Posteriormente, mediante extracción de ADN genómico de las moscas mutantes y PCR del fragmento de *Cdkl*, se comprobó la presencia de bandas de diversos tamaños en un gel de agarosa y se secuenció.

Así pues, este proyecto se ha valido del sistema CRISPR-Cas9 para generar una mosca mutante del Síndrome por deficiencia CDKL5 que podría ser la base para estudiar la enfermedad en humanos y encontrar tratamientos satisfactorios.

ABSTRACT

Epilepsy is a neurological problem responsible for a significant number of deaths worldwide, affecting more than 50 million people. In addition, about 5 million cases are diagnosed each year. Specifically, it is estimated that between 4 and 10 out of every 1000 people have active epilepsy, with continuous seizures. In our work, we will focus on CDKL5 deficiency disorder (CDD), a genetic disorder linked to the X chromosome that causes the early onset of severe neurodevelopmental disorders. In many cases it also causes epileptic seizures that are difficult to control. In Spain alone there are 29 diagnosed cases, but it is suspected that there could be close to 400 people, most of them women due to their mode of inheritance and lethality associated with males.

The *CDKL5* gene is responsible for the synthesis of a protein necessary for normal brain development and function. Most pathogenic variants of the *CDKL5* gene occur spontaneously and involve a non-functional protein or a complete absence of the protein. It has been observed that these dysfunctional variants are not transmitted from parent to offspring and therefore originate *de novo*. However, there are described cases of siblings affected by the same version of the protein.

In this work, *Drosophila melanogaster* has been used as a model of the disease in order to simulate and corroborate its symptoms, as well as to understand the genetic and molecular basis of the course of the syndrome. The study has focused on a single candidate gene in flies, *CG7236*, which is thought to be equivalent to the *CDKL* gene family in humans and is therefore proposed to be renamed *Cdkl*. To this end, the experiments carried out were, firstly, crosses with flies that have a CRISPR gene on their second chromosome with flies that have the Cas-9 protein on their third chromosome. Subsequent crosses for germline mutations in the progeny have resulted in a *D. melanogaster* stock with phenotypic characteristics that differ from control flies of the Canton-S variant, such as seizures or locomotor deficiencies. This was tested in seizure and negative geotaxis assays. Subsequently, genomic DNA extraction from the mutant flies and PCR of the *Cdkl* fragment revealed the presence of bands of various sizes on an agarose gel, after which it was sequenced.

Thus, this project has used the CRISPR-Cas9 system to generate a CDKL5 deficiency disorder mutant fly that could be the basis for studying the disease in humans and finding successful treatments.

PALABRAS CLAVE: Síndrome por deficiencia de CDKL5; CRISPR-Cas9; convulsión; epilepsia; transgénesis; cruzamientos

KEYWORDS: CDKL5 deficiency disorder; CRISPR-Cas9; seizure; transgenesis; epilepsy; crossing

AUTOR: Alejandro Palao Romero

TUTOR ACADÉMICO: Dr. Máximo Ibo Galindo Orozco

Valencia, Julio de 2022

AGRADECIMIENTOS

Agradecer en primer lugar a mi familia el inmenso apoyo en casa durante la realización de este trabajo fin de grado, así como durante toda la carrera, sin el cual no habría sido ni la mitad de sencillo llegar a donde he llegado. También a mis amigos de la universidad, los *Biotekes*, por tantas horas de estudio compartidas en las bibliotecas y en los pisos de Benimaclet y Blasco Ibáñez, sin olvidar los ratos de desconexión para tomar algo o ir de fiesta. Y como no, a Nacho, por estar desde el principio de mi estancia en el laboratorio siendo un apoyo incondicional pese a la distancia y los días malos.

En cuanto al Centro de Investigación Príncipe Felipe, quiero darle las gracias a Ibo por haberme acogido en su laboratorio y los buenos consejos que me ha dado. Gracias también a mi compañera Mayka, por tanta paciencia que ha tenido escuchando mis dramas en la cafetería y en el despacho, tanto personales como de laboratorio, y por haberme explicado las veces que hiciera falta cualquier protocolo. Por último, agradecerle a Valeska su carácter tan simpático y positivo y sus recomendaciones musicales, aunque nos hayamos visto menos veces de las que nos habría gustado.

Así concluye mi grado universitario en la UPV, con ganas de descubrir qué me depara mi futuro profesional.

ÍNDICE

1. Introducción	- 1 -
1.1 Los síndromes epilépticos	- 1 -
1.2 Síndrome por deficiencia de CDKL5	- 2 -
1.2.1 El gen <i>CDKL5</i>	- 3 -
1.3 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo patogénico.....	- 5 -
1.3.1 El sistema CRISPR-Cas9 en <i>D. melanogaster</i>	- 6 -
1.3.2 Eventos convulsivos en <i>D. melanogaster</i> y en humanos	- 8 -
1.3.3 Modelo de CDD en <i>D. melanogaster</i>	- 9 -
2. Objetivos	- 10 -
3. Materiales y métodos	- 11 -
3.1 Colección de <i>Drosophila melanogaster</i>	- 11 -
3.2 Elaboración del medio de cultivo.....	- 12 -
3.3 Experimentos	- 13 -
3.3.1 Cruces CRISPR y obtención de las cepas mutantes.....	- 13 -
3.3.2 Ensayo de geotaxis negativa.....	- 16 -
3.3.3 Ensayos de convulsión	- 16 -
3.3.4 Comprobación de la delección CRISPR	- 17 -
3.4 Análisis estadístico	- 19 -
4. Resultados y discusión	- 20 -
4.1 Generación de los mutantes por CRISPR-Cas9.....	- 20 -
4.2 Geotaxis negativa	- 20 -
4.3 Convulsión por shock mecánico.....	- 21 -
4.4 Convulsión por shock térmico	- 23 -
4.5 Delección en <i>Cdkl</i> responsable del fenotipo.....	- 24 -
5. Conclusión	- 25 -
6. Bibliografía	- 26 -

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Indicaciones sobre la procedencia de los stocks de <i>D. melanogaster</i> , sus genotipos y cómo se mencionan a lo largo del trabajo.....	- 11 -
Tabla 2. Cruce realizado con las líneas parentales y genotipos y probabilidad de la descendencia.....	- 13 -
Tabla 3. Cruce realizado con la F ₁ y MKRS, y genotipos y probabilidad de la descendencia.....	- 14 -
Tabla 4. Cruce realizado entre las moscas de ojos blancos/naranjas y alas curvadas de la F ₂ y MKRS, así como sus genotipos y probabilidad de la descendencia.....	- 15 -
Tabla 5. (A) Secuencias de los ARN guía de los CRISPR. (B) Cebadores diseñados a partir de estos y sus temperaturas de fusión. (C) Protocolo PCR incluyendo los reactivos, casas comerciales y volúmenes empleados para la reacción de 25 µL	- 18 -

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de las epilepsias, con valoración de las comorbilidades y las posibles etiologías.....	- 1 -
Figura 2. Estructura tridimensional de CDKL5, sus efectos fisiológicos y sus mutaciones más frecuentes.....	- 5 -
Figura 3. Representación esquemática del sistema CRISPR-Cas9 para edición específica de tejido utilizando el sistema GAL4/UAS.....	- 7 -
Figura 4. Patrón de convulsiones en <i>D. melanogaster</i>	- 8 -
Figura 5. Representación esquemática del proceso de elaboración del medio de cultivo para <i>D. melanogaster</i>	- 12 -
Figura 6. Fotografías de <i>D. melanogaster</i> tomadas en la lupa.....	- 15 -
Figura 7. Métodos de inducción de convulsiones en <i>Drosophila</i>	- 16 -
Figura 8. Efecto de la delección en la geotaxis negativa.....	- 21 -
Figura 9. Efecto de la delección en la convulsión mecánica.....	- 22 -
Figura 10. Efecto de la delección en la convulsión térmica.....	- 23 -
Figura 11. Productos de PCR de los CRISPR del gen <i>Cdkl</i> en gel de agarosa.....	- 24 -
Figura 12. Resultados y análisis de la secuenciación.....	- 25 -

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNg	ADN genómico
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BDSC	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>
CDD	<i>CDKL5 Deficiency Disorder</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CG	<i>Candidate gene</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CyO	<i>Curly O</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DS	<i>Dravet syndrome</i>
EMA	<i>European Medicines Agence</i>
F₁	Primera generación filial
F₂	Segunda generación filial
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
GFP	<i>Green Flurorescent Protein</i>
hsFLP	<i>heat shock flippase</i>
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
Kac	Acetato potásico

KO	<i>knock-out</i>
LGS	<i>Lennox-Gastaut Syndrome</i>
MPT	Modificación postraduccional
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
SE	<i>Status Epilepticus</i>
sgRNA	<i>single-guide RNA</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SUDEP	<i>Sudden Unexpected Death in Epilepsy</i>
VDRC	<i>Vienna Drosophila Resource Center</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS SÍNDROMES EPILÉPTICOS

La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más comunes, ya que afecta a aproximadamente a 50 millones de personas en todo el mundo. Está caracterizado por una predisposición a generar crisis epilépticas recurrentes no provocadas (Fisher et al., 2005). Concretando aún más, un ataque epiléptico es una sincronización anormal de las neuronas en el cerebro que interrumpe sus patrones normales de actividad y puede manifestarse con una serie de signos y síntomas, entre los que destacan convulsiones, movimientos paroxísticos anormales y deterioro de la conciencia y del estado de alerta (Engel & ILAE, 2001).

Tradicionalmente, la epilepsia se ha empleado como un término general que engloba una variedad de "enfermedades epilépticas", cada una de las cuales se atribuye a una única etiología. Esto ha impulsado la propuesta de revisar la terminología de la epilepsia y referirse a ella como una enfermedad en lugar de "trastorno", con el fin de aumentar el nivel de concienciación y la necesidad de encontrar mejores formas para abordar este problema de salud global y hallar una cura (Engel, 2010).

Así, organizaciones como la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés) han realizado esfuerzos constantes para perfeccionar la clasificación de las epilepsias casi desde su creación en 1909, y cobró especial importancia a principios de los años sesenta cuando Henri Gastaut propuso nuevos conceptos de clasificación (Gastaut, 1970). Esta clasificación de las epilepsias ha evolucionado drásticamente desde dicha década, siendo la de 1989 muy influyente en todo el mundo y con un gran impacto en la atención e investigación de la enfermedad. Distingue entre tres aspectos principales (Fig.1): tipos de convulsiones, tipos de epilepsia (siendo en ambos focal y/o generalizada) y síndromes epilépticos, teniendo en cuenta las comorbilidades y la etiología (Scheffer et al., 2017).

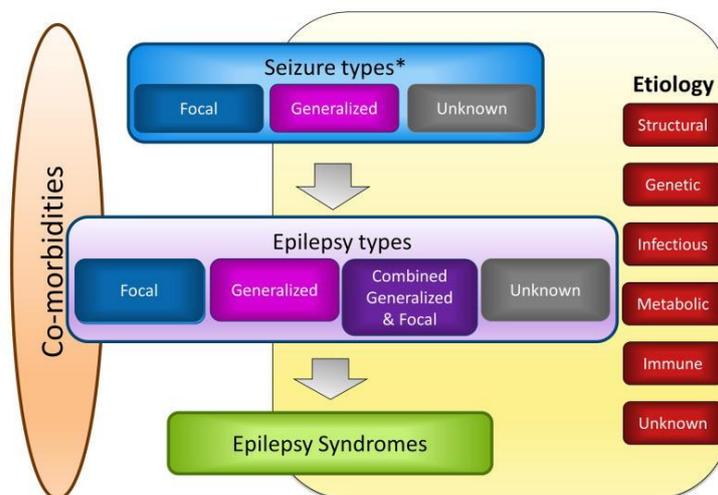


Figura 1. Clasificación de las epilepsias, con valoración de las comorbilidades y las posibles etiologías. Obtenido y adaptado de Scheffer et al., 2017; ILAE.

Entre los síndromes epilépticos considerados raros o de causa desconocida se encuentran varios. El síndrome de Dravet (DS por sus siglas en inglés *Dravet Syndrome*) y el síndrome de Lennox-Gastaut, (LGS, *Lennox-Gastaut Syndrome*), por ejemplo, son encefalopatías epilépticas del desarrollo graves y resistentes a tratamientos existentes, en las que la actividad convulsiva se asocia con una disfunción cerebral general. Otro, es el síndrome por deficiencia de CDKL5, en el que se centrará el presente trabajo. A pesar de sus distintas etiologías, es importante controlar las convulsiones para evitar lesiones, cierto grado de discapacidad, y reducir el riesgo de complicaciones potencialmente mortales, como la muerte súbita inesperada en la epilepsia y el estado epiléptico (SUDEP y SE respectivamente en inglés). Las tres formas principales de tratamiento disponibles son los fármacos anticonvulsivos, la dieta cetogénica y la intervención quirúrgica (Chin *et al.*, 2021).

Aunque no todas las formas de epilepsia se asocian a una reducción de la esperanza de vida, en el caso de las epilepsias pediátricas existe una alta mortalidad debida a diversas comorbilidades y una baja mortalidad de los pacientes por otras causas (Kalume *et al.*, 2013). Lo que es evidente, es que una herramienta clave en la detección precoz de la enfermedad es la secuenciación de nueva generación o NGS (por sus siglas en inglés *Next Generation Sequencing*), que ha llevado a una explosión de descubrimientos de genes en trastornos humanos, alcanzando hasta la mitad de las epilepsias monogénicas un diagnóstico preciso. Este suele darse entre los individuos con convulsiones de inicio temprano y un retraso global del neurodesarrollo (Bayat *et al.*, 2021).

1.2 SÍNDROME POR DEFICIENCIA DE CDKL5

El síndrome por deficiencia de CDKL5 (CDD, por sus siglas en inglés *CDKL5 Deficiency Disorder*) es una encefalopatía epiléptica ligada al cromosoma X causada por mutaciones en el gen de la proteína similar a la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDKL5) (Barbiero *et al.*, 2020), crucial en el desarrollo cerebral. Este desorden afecta a ambos sexos y comparte rasgos comunes con discapacidades intelectuales severas, surgiendo los síntomas en los primeros meses de vida (Balestra *et al.*, 2019). Aun así, por su forma de herencia y su elevada letalidad, los casos de hombres con esta patología son escasos y un elevado porcentaje son mujeres.

Los pacientes con CDD suelen tener varios tipos de crisis, y un estudio informó de una media de 2,8 tipos de crisis diferentes en alguna fase del síndrome. Los espasmos epilépticos (con o sin hirsutia), las crisis tónicas y las convulsiones tónico-clónicas generalizadas son las más frecuentes, y las convulsiones con múltiples fases (como la secuencia de espasmos hipermotores) también son comunes. La epilepsia tiende a evolucionar hacia patrones generalizados o mixtos focales y generalizados (Demarest *et al.*, 2019; Olson *et al.*, 2019).

Normalmente el cuadro clínico comienza con convulsiones que responden de manera insatisfactoria a tratamientos antiepilépticos y puede continuar con trastornos vegetativos, estereotipia de las manos, falta de contacto visual, trastornos respiratorios, dificultades para conciliar el sueño o incluso problemas gastrointestinales (Jakimiec *et*

al.; Hagebeuk *et al.*, 2013). No obstante, diversos fenotipos son posibles debido al impacto de la epigenética y de factores ambientales (Jakimiec *et al.*, 2020).

La epidemiología de esta patología no ha sido estudiada hasta recién entrada esta década, y es por eso mismo que no se dispone de datos de prevalencia o incidencia de la enfermedad en la población. Aun así, la frecuencia de personas diagnosticadas con este síndrome está aumentando gracias a su inclusión en las pruebas genéticas rutinarias para detectar encefalopatías (Hector *et al.*, 2017). Algunas estimaciones sitúan la incidencia entre 1 de cada 40000 y 1 de cada 60000 nacimientos, en comparación con síndromes como el de Dravet, presente en 1 de cada 20000 pacientes o el de Rett, que afecta a 1 de cada 10000 mujeres (Demarest *et al.*, 2019). Se han observado de igual manera mutaciones en este gen en pacientes diagnosticados con síndrome de West, síndrome de Lennoux-Gastaut y síndrome de Rett (Hector *et al.*, 2016), con cuadros sintomáticos muy similares, lo que ha llevado a pronósticos erróneos durante varios años. Por todos estos motivos, está clasificada como una enfermedad rara.

Los tratamientos actuales para el CDD no alivian los síntomas, y los medicamentos antiepilépticos tienen una baja tasa de respuesta. Se están realizando esfuerzos para desarrollar técnicas terapéuticas para tratar el síndrome, incluida la terapia génica (Müller *et al.*, 2016). Farmacológicamente hablando, uno de los medicamentos prometedores y que parece que es eficaz es la fenfluramina, cuyo mecanismo de acción consiste en potenciar la liberación de serotonina. Esta droga ya se ha empleado y aprobado tanto por la FDA como por la EMA para el tratamiento del síndrome de Dravet (DS), y en el CDD parece prometedora al disminuir la frecuencia de los espasmos y convulsiones (Devinsky *et al.*, 2021).

En consecuencia, es necesario estudiar las incógnitas genéticas de este síndrome de inicio temprano y que produce un cuadro epiléptico resistente a fármacos. Por lo tanto, hay que conocer las implicaciones del gen *CDKL5* que codifica una quinasa deficiente en la mayoría de los casos diagnosticados. Sin embargo, se debe tener en cuenta que actualmente se sabe que incluso dos pacientes que tienen la misma mutación en *CDKL5* pueden tener resultados clínicos muy diferentes, por lo que es lógico concluir que pueden existir condiciones más allá de la genética que influyen en el desarrollo del proceso patogénico.

1.2.1 El gen *CDKL5*

El gen *CDKL5* se encuentra en la región cromosómica Xp22.13 y codifica una quinasa que se expresa predominantemente en el cerebro, en los núcleos neuronales y dendritas, con picos de expresión en la etapa posnatal temprana, momento en que los síntomas comienzan a aparecer (Ricciardi *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013).

La proteína *CDKL5* (Fig. 2A) pertenece a una familia ultraconservada de serina-treonina quinasas, regulando las dinámicas de citoesqueleto, la estabilidad y liberación de vesículas sinápticas, el crecimiento de las neuritas y el desarrollo de las espinas dendríticas. Fue descrita por primera vez en 1998, pero no fue hasta 2003 que se

relacionó con síndromes que afectan al desarrollo neuronal ligados al cromosoma X (Katayama *et al.*, 2020).

Hasta la fecha, se han identificado más de 265 variantes alélicas de CDKL5 (Fig. 2C), considerándose entre 70-80 de ellas patogénicas y afectando la gran mayoría a su dominio catalítico (Serrano *et al.*, 2021) excepto la variante recurrente con cambio de sentido p.Val718Met que afecta al empalme (Hector *et al.*, 2017). En general, los diferentes tipos de mutaciones en CDKL5 incluyen mutaciones sin sentido, mutaciones de empalme y deleciones/inserciones que causan desplazamientos de marco de lectura y truncamientos prematuros (Rademacher *et al.* 2011). Se han detectado, además, grandes reordenamientos del gen *CDKL5* mediante amplificación de sonda dependiente de ligación múltiple. Como se ha mencionado, las mutaciones reportadas se localizan casi en todos los exones del gen *CDKL5* y alteran el dominio catalítico o el dominio C-terminal de la proteína CDKL5. El dominio catalítico N-terminal comienza en el exón 2 y el largo C-terminal puede tener un papel regulador. Datos recientes sugieren que las mutaciones sin sentido localizadas en el dominio catalítico de CDKL5 podrían presentar una manifestación clínica más grave que la causada por mutaciones truncadas situadas en el C-terminal (Zhao *et al.*, 2014; Hector *et al.*, 2016).

En estudios moleculares con roedores se ha dilucidado que varias vías están alteradas en el CDD, incluyendo las vías de señalización AKT/mTOR, AKT/GSK-3b y BDNF-Rac1 y la interacción NGL-1-PSD95 (Ricciardi *et al.*, 2012; Fuchs *et al.*, 2015; Zhu & Xiong, 2019). Pese a este hecho, estos modelos animales carecen de actividad convulsiva espontánea. El crecimiento dendrítico y el desarrollo de la espina dendrítica están alterados de forma inconsistente en los modelos celulares de CDD (Zhou *et al.*, 2017).

Los datos obtenidos de estos estudios sugieren que la expresión de CDKL5 modula la localización postsináptica y la composición de receptores ionotrópicos de glutamato NMDA (Fig. 2B) (Okuda *et al.*, 2017).

CDKL5 no solo es relevante por sí misma, sino que interactúa con otras proteínas de rutas del neurodesarrollo como son MeCP2 y FOXG1, lo que puede explicar la coincidencia sintomatológica entre el CDD y el síndrome de Rett. En el caso de MeCP2, que se encarga de metilar determinadas regiones del DNA (islas CpG), puede cambiar su patrón de expresión mediante fosforilaciones producto de su interacción con CDKL5 (Jagtap *et al.*, 2019). Otros sustratos de CDKL5 son DNMT1, AMPH1, NGL-1, HDAC4, MAP1S, ARHGEF2 y EB2 (Fig. X2) (Baltussen *et al.*, 2018; Trazzi *et al.*, 2016).

Finalmente, cabe tener en cuenta que hay otros factores que pueden afectar al desarrollo de la enfermedad, como el mosaicismo gonadal ligado al cromosoma X, ya que en nuevos estudios con ratones con CDD no se observan eventos similares a las convulsiones en machos *knock-out* hemicigóticos ni en las hembras *knock-out* homocigóticas (Terzic *et al.*, 2021).

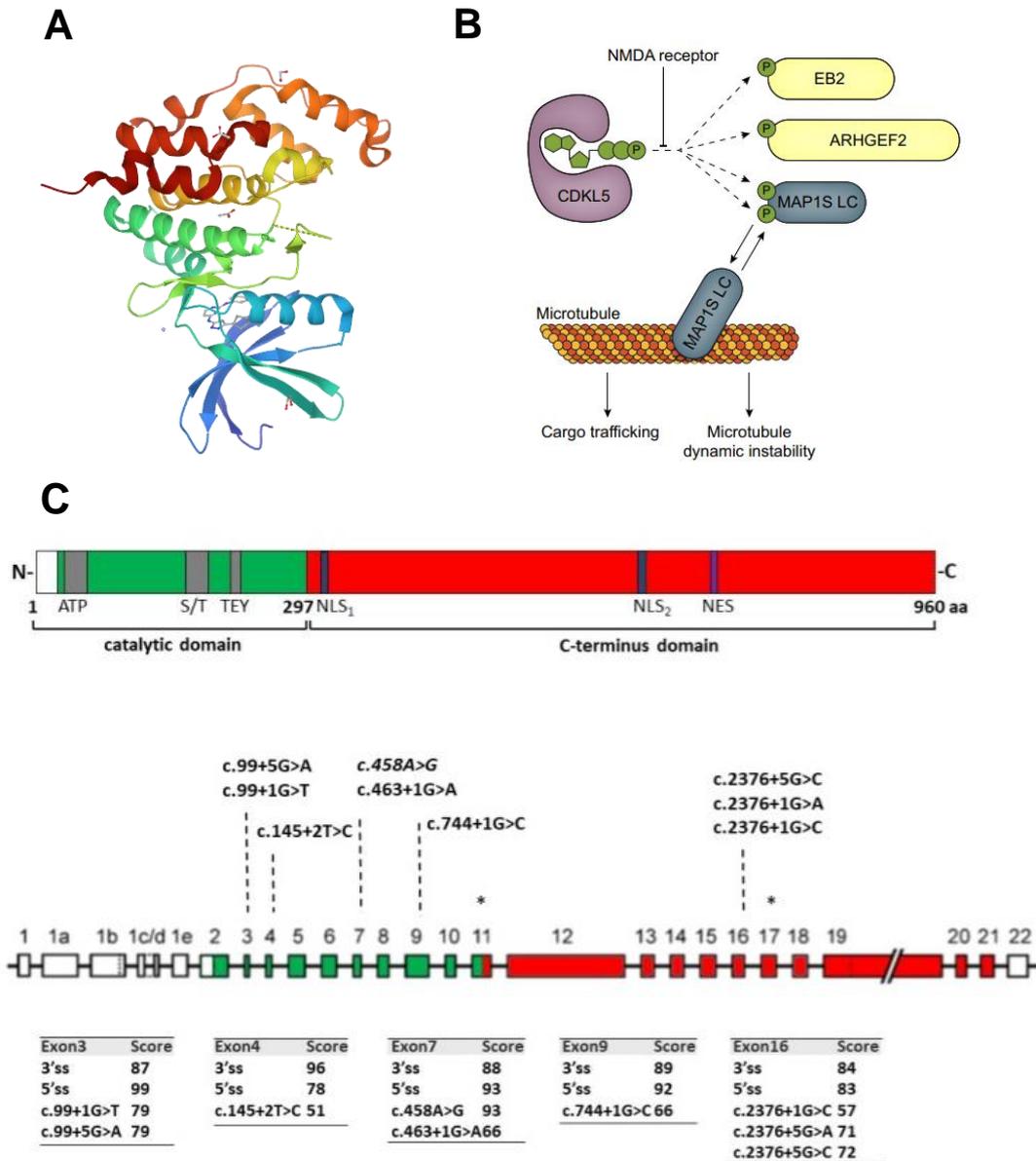


Figura 2. Estructura tridimensional de CDKL5, sus efectos fisiológicos y sus mutaciones más frecuentes. (A) Estructura cristalina del dominio quinasa del CDKL5 humano obtenida por difracción de rayos X con una resolución de 2 Å. Extraída de Protein Data Bank (PDB). (B) Esquema resumido de los nuevos sustratos de CDKL5 y sus funciones en la dinámica de los microtúbulos. CDKL5 fosforila proteínas asociadas a microtúbulos, aumentando o disminuyendo su afinidad por los mismos. Fallos en este mecanismo desestabilizan la dinámica de los microtúbulos en cultivos neuronales KO. Obtenido y adaptado de Baltussen et al., 2018. (C) Representación de la isoforma humana hCDKL5-1 con sus principales dominios funcionales, así como su división en intrones y exones y la predicción bioinformática de las mutaciones patógenicas. Obtenido y adaptado de Balestra et al., 2019.

1.3 *Drosophila melanogaster* COMO MODELO PATOGENICO

Son muchas las características destacadas de *Drosophila*, organismo usado en investigación durante más de 100 años, que la hacen un modelo de estudio tan atractivo. En primer lugar, la mosca tiene un ciclo vital muy rápido. Una sola pareja fértil puede

producir cientos de crías genéticamente idénticas en un plazo de 10 a 12 días a 25°C, en comparación con otros modelos como los roedores (Pandey & Nichols, 2011). Por otro lado, el genoma de la mosca de la fruta ha sido completamente secuenciado y anotado, y codifica para un poco más de 14.000 genes en cuatro cromosomas, de los cuales solo tres contienen el grueso del genoma. Se calcula que casi el 75% de los genes relacionados con enfermedades en el ser humano tienen ortólogos funcionales en la mosca (Lloyd & Taylor, 2010). La identidad global a nivel de nucleótidos o la secuencia de proteínas entre la mosca y el mamífero es de aproximadamente el 40% entre los homólogos; sin embargo, en los dominios funcionales conservados, puede llegar del 80 al 90% o superior (Pandey & Nichols, 2011).

En las últimas tres décadas, también se ha modelado en *Drosophila* diversas enfermedades humanas, entre ellas muchas que afectan al sistema nervioso (Mohr & Perrison, 2019). Dichos estudios se ven facilitados por el hecho de que el sistema nervioso de *Drosophila* es complejo y posee muchas características del nuestro, entre ellas: ojos, órganos olfativos, órganos gustativos, órganos auditivos, una médula nerviosa ventral (análoga a la médula espinal), neuronas sensoriales periféricas para la propiocepción y el dolor, y un cerebro. Además, se han generado enormes colecciones de mutantes que afectan al desarrollo neural, gestionadas principalmente por el Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC) (Bokus *et al.*, 2020).

La fosforilación, la modificación postraduccional (MPT) más común en las proteínas, está implicada en múltiples procesos biológicos en los organismos eucariotas. Las quinasas y las fosfatasa actúan conjuntamente para regular los niveles de esta modificación. De esta forma, mutaciones en estas enzimas siempre son factores implicados en las enfermedades humanas (Morrison *et al.*, 2000). *D. melanogaster* es un sistema ideal para el estudio de la función de los genes de la quinasa y la fosfatasa debido precisamente a su mencionada alta conservación de genes con el genoma humano y la baja redundancia de genes en su propio genoma (Fortini *et al.*, 2000). Es concretamente en una de estas quinasas en las que se va a incidir en el presente trabajo.

Aunque uno de los principales puntos fuertes de *Drosophila* como organismo modelo es su gran idoneidad para los cribados genéticos, estos presentan alguna que otra limitación. Entre ellas destaca que las estrategias basadas en análisis de mutaciones suelen requerir la aplicación de técnicas de mosaico, debido a la alta tasa de mutaciones homocigóticas letales (Meltzer *et al.*, 2019).

1.3.1 El sistema CRISPR-Cas9 en *D. melanogaster*

El proceso de inserción dirigida de un gen exógeno en un locus específico del genoma (*knock-in* en inglés) en insectos se limitaba inicialmente a las tecnologías transgénicas basadas en transposones (Chen *et al.*, 2016). Sin embargo, la capacidad de la comunidad científica para generar cambios precisos en el genoma para investigaciones funcionales de genes y otros elementos genéticos está en proceso de mejora gracias al sistema CRISPR-Cas9 (por sus siglas en inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short*

Palindromic Repeats), que ha demostrado ser una herramienta sencilla y muy robusta en incontables organismos y tipos celulares.

El sistema CRISPR/Cas9 tiene su origen en bacterias como sistema de defensa guiado por ARN contra los virus y plásmidos invasores (Barrangou *et al.*, 2007). El más utilizado en los laboratorios es el de *Streptococcus pyogenes*, el cual se simplificó a dos componentes para facilitar la ingeniería del genoma: una endonucleasa común llamada Cas9 y un único ARN quimérico denominado ARN guía (sgRNA, *single guide RNA* en inglés) (Jinek *et al.*, 2012). Cas9 forma un complejo con el sgRNA y juntos median las roturas de doble cadena en sitios específicos del ADN. La posterior reparación de este puede resultar en pequeñas inserciones y deleciones (Port *et al.*, 2020). La especificidad está determinada por una secuencia de 20 nucleótidos en el extremo 5' del sgRNA que puede alterarse para que coincida con cualquier secuencia deseada en el ADN (Bassett & Liu, 2014).

Precisamente, en *Drosophila melanogaster* CRISPR se utiliza de forma rutinaria para la generación de mutaciones heredables en la línea germinal, incluyendo pequeñas inserciones/deleciones (indels) o deleción de grandes fragmentos de ADN, mediante la expresión transgénica de Cas9 con un promotor activo en la línea germinal (como el promotor *nos*, Fig. 3) (Meltzer *et al.*, 2019). De esta manera, se ha conseguido interrumpir, eliminar, sustituir, marcar y editar múltiples genes y elementos genómicos mediante el sistema CRISPR-Cas9 en este organismo modelo (Bassett *et al.*, 2013; Gratz *et al.*, 2013). Cabe destacar la mutagénesis específica de tejido, que también se ha logrado en el insecto modelo combinando el sistema CRISPR/Cas9 con el sistema Gal4/UAS, un activador situado aguas arriba (Fig. 3) (Port *et al.*, 2014; Poe *et al.*, 2019).

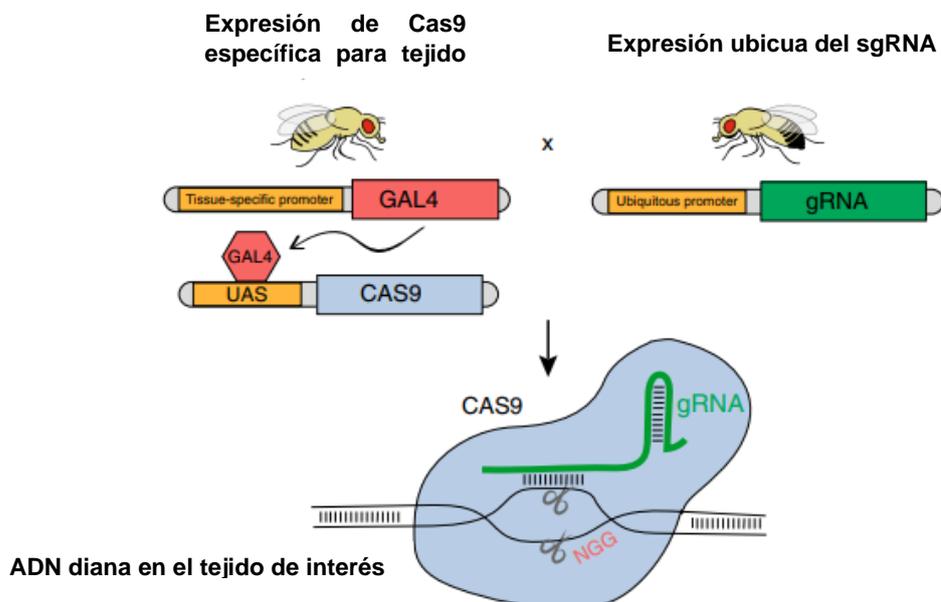


Figura 3. Representación esquemática del sistema CRISPR-Cas9 para edición específica de tejido utilizando el sistema GAL4/UAS. Obtenido y adaptado de Meltzer *et al.*, 2019.

A pesar de ser una herramienta de edición génica nunca vista, su eficiencia no es máxima. Una forma de mejorarla es la optimización de los sgRNA transgénicos. Estudios anteriores en *Drosophila* han jugado con la elección del promotor del sgRNA, la longitud y la composición de la secuencia diana para producir aquellos organismos más eficientes (Port *et al.*, 2014).

1.3.2 Eventos convulsivos en *D. melanogaster* y en humanos

El patrón de convulsiones en las moscas y en los seres humanos presentan varias similitudes que respaldan la utilidad de este tipo de investigación (Fig.4). Estudios anteriores han demostrado que, en el caso de *Drosophila*, se ha observado un umbral de convulsiones en todos los individuos, así como una modulación genética que regula la susceptibilidad a estas. Además, dicho umbral se ve aumentado en las subsiguientes convulsiones ante un tratamiento de choque electroconvulsivo. Se ha observado también que la actividad convulsiva se extiende por el sistema nervioso central (SNC) de la mosca a lo largo de vías particulares que dependen de las conexiones sinápticas funcionales y de la actividad eléctrica reciente, pudiendo segregarse espacialmente en regiones concretas del SNC. Como último hallazgo, los fenotipos de *Drosophila* pueden mejorar con los fármacos anticonvulsivos humanos, como el valproato de sodio, fenitoína, gabapentina y bromuro de potasio, viéndose apoyado por el hecho de que las mutaciones que afectan a canales de sodio (Na⁺) son supresores de las convulsiones (Kuebler & Tanouye, 2000).

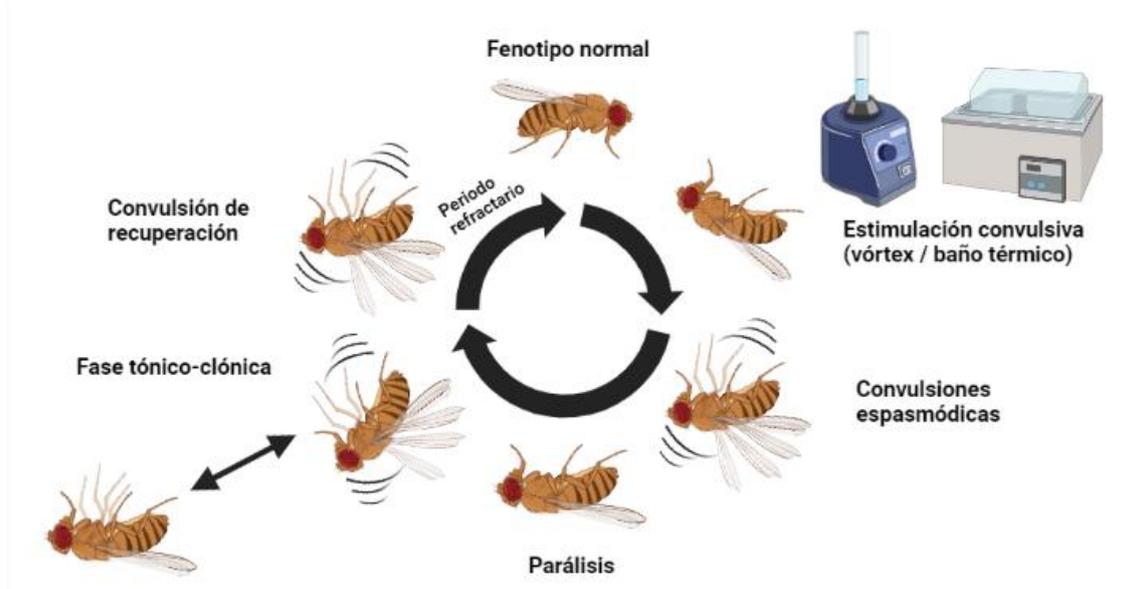


Figura 4. Patrón de convulsiones en *D. melanogaster*. El ciclo consta de una primera fase en la que se ha de estimular la convulsión de manera mecánica y/o térmica, seguida de unas primeras convulsiones parecidas a los espasmos humanos. Después, le sigue una fase en la que la mosca queda completamente paralizada mirando hacia arriba. A continuación, se alcanza una fase denominada tónico-clónica, en la que se alternan arqueamiento y tensión del tórax (tónica) con sacudidas rápidas de las extremidades (clónica). Por último, tiene lugar una última convulsión a partir de la cual la mosca se recupera. En este punto se encuentra en el denominado periodo refractario, en el que no es posible llevar a cabo una nueva estimulación. Creada con Biorender.

En suma, las convulsiones en humanos y en *D. melanogaster* presentan suficientes paralelismos como para implicar que las anomalías neuronales subyacentes son muy similares. Debido a esto vale la pena el estudio de estas en futuras investigaciones, así como en el presente trabajo, puesto que se dispone de muy poca información al respecto de los patrones y tipo de convulsiones en el síndrome a estudiar.

1.3.3 Modelo de CDD en *D. melanogaster*

Pese a lo expuesto, el síndrome por deficiencia de CDKL5 no ha sido estudiado todavía en la mosca de la fruta. Trabajos anteriores han concluido que *Drosophila* solo codifica una proteína CDKL relacionada con CDKL1-5 humanas y que comparten funciones en la regulación de la longitud de los cilios en las células, la proliferación celular, la diferenciación neuronal, la cognición y el aprendizaje (Canning et al., 2018).

Se cree que el gen candidato *CG7236* es el equivalente a la familia de genes *CDKL* en humanos y, por consiguiente, responsable de la patología. Con todo esto, se propone que dicho gen se renombre a *Cdkl*, previa caracterización fenotípica y molecular de los mutantes generados.

2. OBJETIVOS

Dado que la baja prevalencia y los fondos destinados al estudio de esta enfermedad son poco favorecedores para comprender sus consecuencias en el organismo humano, los principales objetivos que se han establecido en este proyecto son los que se proceden a enumerar:

- Generar mutantes en *Drosophila melanogaster* mediante el sistema CRISPR-Cas9 y valorar molecularmente las lesiones en el gen *Cdkl*.
- Caracterizar el fenotipo resultante mediante pruebas de geotaxis negativa y convulsión mecánico-térmica y compararlo con el de los pacientes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 COLECCIÓN DE *Drosophila melanogaster*

Todas las moscas empleadas en el trabajo se cultivaron en tubos de poliestireno transparente procedentes de la empresa Dominique Dutscher rellenos con 7 mL de medio de harina de maíz y se cerraron con tapones de acetato de celulosa del proveedor Genesee. Para controlar el crecimiento, se mantuvieron las cepas *stock* a 17°C y las cepas experimentales a 25°C (Tabla 1).

En estas últimas condiciones, las moscas son capaces de completar su desarrollo desde huevo hasta mosca adulta en una media de 10 días. Previamente a los cruces que se desean efectuar, se puede añadir levadura fresca con tal de potenciar la receptividad de las hembras, ya que se han demostrado sus efectos hedónicos y afrodisíacos (Gorter et al., 2016).

Tabla 1. Indicaciones sobre la procedencia de los stocks de *D. melanogaster*, sus genotipos y cómo se mencionan a lo largo del trabajo. El signo de puntuación “;” separa los distintos cromosomas.

Procedencia	Genotipo	Mención en el texto
Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center (VDRC 341673)	P{hsFLP}1, y ¹ w ¹¹¹⁸ ; P{HD CFD00774}attP40/CyO-GFP	CRISPR774
Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center (VDRC 342392)	P{hsFLP}1, y ¹ w ¹¹¹⁸ ; P{HD CFD00307}attP40/CyO-GFP	CRISPR307
Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center (BDSC 54593)	P{ry ^{+7.2} =hsFLP}1, y ¹ w ¹¹¹⁸ ; P{y ^{+7.7} w ^{+mC} =UAS-Cas9.P}attP2 P{w ^{+mC} =GAL4::VP16-nos.UTR}CG6325 ^{MVD1}	nos-Cas9
Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center (BDSC 54593)	w ¹¹¹⁸ ; wg ^{Sp-1} /CyO; MKRS/TM6B, Tb ¹	MKRS
Universitat de València (Campus de Burjassot)	Wild-type	Canton-S

Las tres primeras cepas de la Tabla 1, se emplearon en los cruces iniciales, mientras que la cepa MKRS se utilizó como marcador aprovechando el hecho de que contiene en el cromosoma 2 el balanceador CyO que da un fenotipo de alas curvadas. Además, es dominante, letal en homocigosis y como cualquier balanceador, no recombina (Miller et al., 2018). Finalmente, la cepa Canton-S se usó para la extracción de DNA genómico silvestre.

3.2 ELABORACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

La preparación del medio de cultivo para el crecimiento de *D. melanogaster* es un paso fundamental para la propagación de las cepas en el laboratorio (Fig. 5). Normalmente se preparan unos 2 L de medio, que da para aproximadamente 250 tubos de poliestireno. En primer lugar, ha de prepararse una mezcla compuesta por los siguientes ingredientes: 120 g de harina de maíz, 100 g de azúcar, 20 g de harina de soja y 20 g de agar. Esta mezcla puede conservarse por un tiempo prolongado a 4°C. En el momento en que se desea continuar el procedimiento, se calienta en el microondas 1 L de agua destilada durante 5 min a 800 W y se vierte a la mezcla. A continuación, se añaden 60 g de levadura fresca y se homogeneiza todo con la batidora. La mezcla resultante se introduce en el autoclave y, una vez esterilizada, se trabaja en cabina de flujo. Se vuelve a añadir 1 L de agua destilada calentada igual que antes y se añade, previa espera para que se enfríe la mezcla y no se degraden, 6 g de Nipagin disueltos en 20 mL de etanol 96° y 10 mL de ácido propiónico, actuando como conservantes (antifúngico y antibacteriano). Se lleva a cabo una última homogeneización con la batidora y se dispensan unos 7mL por cada tubo con el dispensador Masterflex Easy-Load III. Finalmente se cubren los tubos con una tela fina y se dejan toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se quita la sábana y se tapan con los tapones de acetato de celulosa, guardándolos en bandejas a 4°C para prolongar su conservación.



Figura 5. Representación esquemática del proceso de elaboración del medio de cultivo para *D. melanogaster*. Creada con Biorender.

3.3 EXPERIMENTOS

La generación de una mosca que presente el fenotipo característico del síndrome por deficiencia de CDKL5 se estudió de dos maneras distintas. En un primer experimento, se llevaron a cabo cruces seriados empleando el sistema CRISPR-Cas9 con selección de genotipos concretos, que fueron los que se esperó dieran lugar a lo previamente expuesto. En el experimento posterior el objetivo fue corroborar, mediante técnicas de biología molecular, que las moscas que expresaron los síntomas de la patología presentaban la delección originada por la herramienta de edición génica en el gen *Cdkl*.

3.3.1 Cruces CRISPR y obtención de las cepas mutantes

El primero de los cruces fue el de cada cepa CRISPR por la cepa nos-Cas9 (Tabla 2). Previamente se seleccionaron hembras vírgenes (ya fuera en estado de pupa madura o de mosca adulta recién nacida) dejando crecer cada tubo por separado, para asegurarse de que la fecundación ocurría únicamente por los machos del cruce. Concretamente se eligieron 23 hembras vírgenes de nos-Cas9, 15 de CRISPR307 y 8 de CRISPR774.

Se hizo en ambos sentidos, machos por hembras y viceversa, ya que la mutación no depende del cromosoma sexual en estos experimentos. Todos ellos siguen la herencia mendeliana clásica.

Tabla 2. Cruce realizado con las líneas parentales y genotipos y probabilidad de la descendencia. El signo “+” hace referencia a que el cromosoma está completo, sin ninguna mutación. Los machos tienen un solo cromosoma X, por eso el signo “-“. Solo se muestra el cruce en un sentido, pero en el opuesto la descendencia sería la misma.

Cruces parentales	Genotipo F ₁
CRISPR307 x nos-Cas9	
♀ ^v $\frac{yw\ hsFLP}{yw\ hsFLP}; \frac{CRISPR307}{CyO\ GFP}; \frac{+}{+}$	$\frac{1}{4}$ ♀ $\frac{yw\ hsFLP}{yw\ hsFLP}; \frac{CRISPR307}{+}; \frac{nos-Cas9}{+}$
♂ $\frac{yw\ hsFLP}{-}; \frac{+}{+}; \frac{nos-Cas9}{nos-Cas9}$	$\frac{1}{4}$ ♀ $\frac{yw\ hsFLP}{yw\ hsFLP}; \frac{CyO\ GFP}{+}; \frac{nos-Cas9}{+}$
×	$\frac{1}{4}$ ♂ $\frac{yw\ hsFLP}{-}; \frac{CRISPR307}{+}; \frac{nos-Cas9}{+}$
	$\frac{1}{4}$ ♂ $\frac{yw\ hsFLP}{-}; \frac{CyO\ GFP}{+}; \frac{nos-Cas9}{+}$
CRISPR774 x nos-Cas9	
♀ ^v $\frac{yw\ hsFLP}{yw\ hsFLP}; \frac{CRISPR774}{CyO\ GFP}; \frac{+}{+}$	$\frac{1}{4}$ ♀ $\frac{yw\ hsFLP}{yw\ hsFLP}; \frac{CRISPR774}{+}; \frac{nos-Cas9}{+}$
♂ $\frac{yw\ hsFLP}{-}; \frac{+}{+}; \frac{nos-Cas9}{nos-Cas9}$	$\frac{1}{4}$ ♀ $\frac{yw\ hsFLP}{yw\ hsFLP}; \frac{CyO\ GFP}{+}; \frac{nos-Cas9}{+}$
×	$\frac{1}{4}$ ♂ $\frac{yw\ hsFLP}{-}; \frac{CRISPR774}{+}; \frac{nos-Cas9}{+}$
	$\frac{1}{4}$ ♂ $\frac{yw\ hsFLP}{-}; \frac{CyO\ GFP}{+}; \frac{nos-Cas9}{+}$

Antes de iniciar el segundo cruce (Tabla 3), se cultivaron moscas MKRS para recoger 10 días después hembras vírgenes. Paralelamente, en la primera generación filial (F₁) se fueron seleccionando estas hembras y, además, en la población general se buscaron ejemplares que no tuvieran las alas curvadas, ya que esto significaría que tendrían un alelo CRISPR en el segundo cromosoma. De esta manera, se procedió al cruce de la F₁ de cada CRISPR por la cepa balanceadora MKRS, nuevamente en ambos sentidos.

Tabla 3. Cruce realizado con la F₁ y MKRS, y genotipos y probabilidad de la descendencia. Se resalta la descendencia de interés, siendo la probabilidad de tener esa combinación de cromosomas a la vez 1/16. Solo se muestra el cruce en un sentido, pero en el opuesto la descendencia sería la misma.

Cruces por el balanceador	Genotipo F ₂ (Cromosoma 2)	Genotipo F ₂ (Cromosoma 3)
F₁ CRISPR307 × MKRS	$\frac{1}{4} \frac{CRISPR307}{wgSp}$	$\frac{1}{4} \frac{nos-Cas9}{MKRS}$
♀ $\frac{yw\ hsFLP}{yw\ hsFLP}; \frac{CRISPR307}{+}; \frac{nos-Cas9}{+}$	$\frac{1}{4} \frac{+}{wgSp}$	$\frac{1}{4} \frac{+}{MKRS}$
×		
♂ $\frac{w-}{-}; \frac{wgSp}{CyO}; \frac{MKRS}{TM6B}$	$\frac{1}{4} \frac{CRISPR307}{CyO}$	$\frac{1}{4} \frac{nos-Cas9}{TM6B}$
	$\frac{1}{4} \frac{+}{CyO}$	$\frac{1}{4} \frac{+}{TM6B}$
F₁ CRISPR774 × MKRS	$\frac{1}{4} \frac{CRISPR774}{wgSp}$	$\frac{1}{4} \frac{nos-Cas9}{MKRS}$
♀ $\frac{yw\ hsFLP}{yw\ hsFLP}; \frac{CRISPR774}{+}; \frac{nos-Cas9}{+}$	$\frac{1}{4} \frac{+}{wgSp}$	$\frac{1}{4} \frac{+}{MKRS}$
×		
♂ $\frac{w-}{-}; \frac{wgSp}{CyO}; \frac{MKRS}{TM6B}$	$\frac{1}{4} \frac{CRISPR774}{CyO}$	$\frac{1}{4} \frac{nos-Cas9}{TM6B}$
	$\frac{1}{4} \frac{+}{CyO}$	$\frac{1}{4} \frac{+}{TM6B}$

Se eligieron solamente las moscas con CyO pues se conoce que es un marcador que no recombina. La mutación aleatoria que produjo el CRISPR en la línea germinal quedó así localizada en una región del gen *Cdkl*. Tras este cruce apareció un mosaico de tres colores de ojos diferentes, el rojo brillante silvestre (w⁺ homocigoto), el naranja (w⁺w) y el blanco (w⁻ homocigoto). Las moscas con el sistema CRISPR-Cas9 tenían los ojos rojos. Como no se buscaba que se originase una nueva mutación adicional, estas también se desecharon. Consecuentemente, el objetivo se centró en las moscas con ojos blancos y las alas curvadas, ya que dispondrían de la mutación localizada y del cromosoma completo con la mutación, sin elementos interferenciales. No obstante, debido a que solo 2 de cada 16 moscas presentaban este genotipo, se llegaron a seleccionar algunas moscas con ojos naranjas, sin el cromosoma totalmente intacto.

El tercer pase consistió en seleccionar estas moscas de ojos blancos y/o naranjas y cruzarlas de nuevo con el marcador MKRS. Como se quiso que esta vez la descendencia proviniese de un único parental con la mutación generada por el CRISPR-

Cas9, el diseño de los tubos fue de 1 macho o hembra virgen de este tipo por 4 machos o hembras vírgenes del MKRS (Tabla 4). En total se realizaron 20 cruces, 10 del CRISPR307 y 10 del CRISPR774. Dentro de cada CRISPR, 5 usando machos y 5 usando hembras vírgenes. En cuanto a los machos, se logró que todos tuviesen los ojos blancos para el cruce, pero 4 de las 5 hembras CRISPR307 y 1 de las 5 hembras CRISPR774 tuvieron ojos naranjas, lo que pudo afectar a la eficiencia en los resultados.

Tabla 4. Cruce realizado entre las moscas de ojos blancos/naranjas y alas curvadas de la F₂ y MKRS, así como sus genotipos y probabilidad de la descendencia. Se representa solo el cruce en un sentido, pero se hizo en ambos, y no se hace distinción entre macho y hembras en los cromosomas no sexuales a fin de simplificar y evitar redundancias.

Cruces ojos blancos y/o naranjas por el balanceador	Genotipo F ₃ (Cromosoma 2)	Genotipo F ₃ (Cromosoma 3)
♀ $\frac{yw\ hsFLP}{w-}; \frac{+}{CyO}; \frac{+}{TM6B/MKRS}$	$\frac{1}{3} \frac{+}{wgSp}$	$\frac{1}{3} \frac{+}{MKRS}$
×	$\frac{1}{3} \frac{+}{CyO}$	$\frac{1}{3} \frac{+}{TM6B}$
♂ $\frac{w-}{-}; \frac{wgSp}{CyO}; \frac{MKRS}{TM6B}$	$\frac{1}{3} \frac{CyO}{wgSp}$	$\frac{1}{3} \frac{MKRS}{TM6B}$
	$\frac{CyO}{CyO}$ (letal)	$\frac{TM6B}{TM6B}$ (letal)

Las moscas que se seleccionaron fueron las que presentaban el fenotipo de alas curvadas (CyO) pero sin las 3 quetas esternopleurales apiladas y completamente verticales (Fig.6), dado que así se supo que tendrían la mutación y el cromosoma completo.

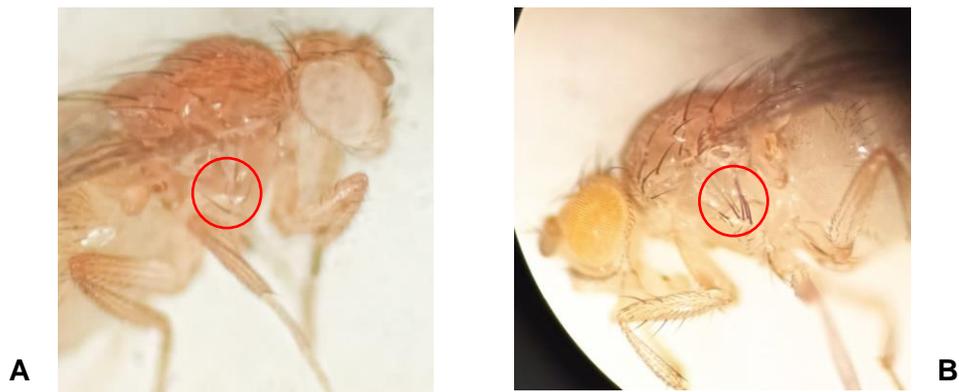


Figura 6. Fotografías de *D. melanogaster* tomadas en la lupa: (A) El fenotipo silvestre de las quetas esternopleurales. (B) El fenotipo mutante wg^{Sp} con la posición característica de las mismas.

3.3.2 Ensayo de geotaxis negativa

Una vez se tuvieron las cepas con la mutación en *Cdkl*, se sometieron en primer lugar a un experimento de geotaxis negativa. *Drosophila melanogaster* silvestre presenta una respuesta de escape innata durante la cual asciende por la pared del cilindro después de ser golpeadas hasta el fondo del mismo (Gargano et al., 2005). Se pretende comprobar si la delección de parte del gen *Cdkl* influye en este comportamiento.

Tuvieron lugar 3 repeticiones del experimento por *stock* CRISPR y control Canton-S, empleando 10 moscas para todos los casos. Primero se introdujeron las moscas en un tubo vacío sin comida durante unos minutos. Para que el recorrido fuese mayor, se puso encima del tubo principal otro tubo pegado con cinta adhesiva, marcando previamente en el primero una raya a 8 cm del suelo. Después, se golpeó el tubo contra la mesa suavemente para que las moscas cayesen al fondo del tubo y se comenzó una grabación de 10 segundos, contando posteriormente cuántas superan el umbral de los 8 cm en el tiempo establecido.

3.3.3 Ensayos de convulsión

En las moscas adultas, los mutantes susceptibles de sufrir convulsiones se clasifican en dos categorías principales basadas en la inducción de convulsiones: mecánicas e inducidas por la temperatura (Mituzaitte et al., 2021). Se espera en este caso que por la mutación se originen estas conductas espasmódicas.

Se hicieron 3 repeticiones del experimento por *stock* CRISPR y control Canton-S, empleando 10 moscas del mismo sexo para todos los casos. El primer ensayo que tuvo lugar, dado que es menos violento, fue el del agitador tipo vórtex. Consistió en someter a las moscas que anteriormente habían estado en un tubo sin comida a una agitación a máxima velocidad durante 10 segundos, contando y analizando a aquellas que convulsionaban (Fig. 7A). El otro ensayo involucraba un baño térmico de agua destilada durante 2 min a 40°C, en el que las moscas habían permanecido sin comer un tiempo incluso mayor (Fig. 7B). De igual manera, se contaron y analizaron a las que convulsionaron.

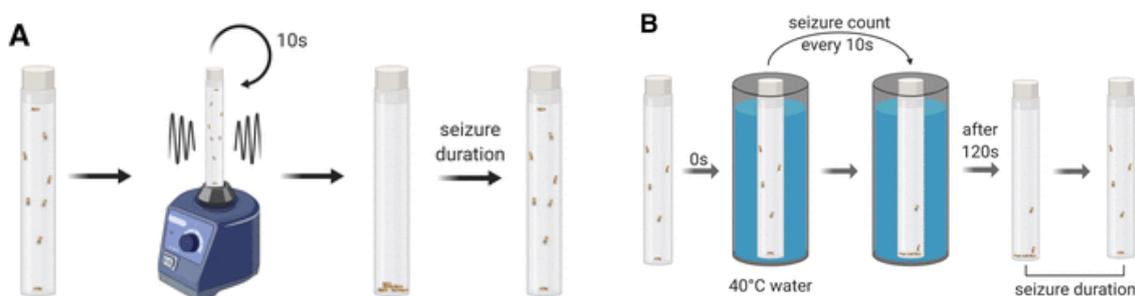


Figura 7. Métodos de inducción de convulsiones en *Drosophila*: (A) Esquema del ensayo en el agitador. (B) Esquema del ensayo en el baño térmico. Obtenido y adaptado de Mituzaitte et al., 2021.

3.3.4 Comprobación de la delección CRISPR

Para confirmar si realmente había tenido lugar la delección en el gen *Cdkl* por parte del sistema CRISPR-Cas9 en cada uno de los 9 stocks generados (3 provenientes del CRISPR307 y 6 del CRISPR774), se procedió a extraer ADN genómico de las moscas mutantes, realizar una PCR del fragmento génico y comprobar si la banda observada en el posterior gel tenía el tamaño esperado o inferior.

El protocolo para la extracción de genómico de buena calidad de *Drosophila* fue el propuesto por VDRC. En primer lugar, se anestesiaron 25 moscas con dióxido de carbono y se añadieron 250 μ L de disolución A (Tris-HCl 0,1 M pH 9, EDTA 0,1 M, SDS 1%) para favorecer la disgregación del material biológico. A continuación, se homogeneizaron con un mortero para microtubos y se depositó el tubo en hielo. Después, se incubó a 70°C en el bloque térmico durante 30 min, añadiendo 35 μ L de KAc 8 M trascurrido ese tiempo e incubando esta vez en hielo otros 30 min. Luego, se centrifugó la mezcla resultante 15 min a 13 000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. En la campana extractora de gases, se adicionaron 250 μ L de fenol-cloroformo 1:1, llevando a cabo posteriormente una centrifugación de 5 min a 13 000 rpm. El sobrenadante volvió a ser transferido a un nuevo tubo y se añadió un volumen de 150 μ L de isopropanol. Nuevamente, una centrifugación a 10 000 rpm durante 5 min pero esta vez descartando el sobrenadante y lavando con 1 mL de etanol 70%. Por último, una centrifugación de 5 min a 13 000 rpm y secado del etanol, con posterior resuspensión del ADN precipitado en 100 μ L de tampón TE.

La calidad y cantidad de ADNg extraídos se determinaron mediante un gel de agarosa al 0,8% y un espectrofotómetro NanoDrop™. Para el gel se usaron GeneRuler y Lambda HindIII como marcadores de peso molecular.

El diseño y elección de los cebadores necesarios para la PCR del gen de interés fue llevado a cabo utilizando el *software* SnapGene Viewer, tras haber localizado los ARN guía en la secuencia del ADN genómico de *Drosophila*. Los ARN guía (sgRNA, *single-guide RNA* en inglés) se buscaron en la web del VDRC por su correspondiente código identificativo (Tabla 5A). Los cebadores fueron encargados y comprados a la empresa Integrated DNA Technologies (IDT) (Tabla 5B). Las condiciones de las PCR fueron las siguientes. La primera, para CRISPR307, consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos que incluyen un paso de desnaturalización a 95°C durante 30 s, un paso de alineamiento a 56°C (cebadores *Cdkl F* y *Cdkl R*) durante 30 s ($T_m \pm 5^\circ\text{C}$) y un paso de extensión a 72°C durante 1,1 min (1 min por kb, y el producto tiene aproximadamente 1,1 kb); después de dichos ciclos una extensión final a 72°C durante 7 min y conservación del producto a 4°C. La segunda, para CRISPR774, se llevó a cabo en las mismas condiciones, pero cambiando la temperatura de alineamiento a 52°C (*Cdkl F2* y *Cdkl R*) y la extensión a 1,8 min (producto de 1,8 kb). Finalmente, los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% (100 V, 45 min) y se determinó el tamaño de las bandas, enviándolos *a posteriori* al servicio de secuenciación del Centro de Investigación Príncipe Felipe empleando los mismos cebadores.

Tabla 5. (A) Secuencias de los ARN guía de los CRISPR. (B) Cebadores diseñados a partir de estos y sus temperaturas de fusión (T_m , temperatura de melting en inglés). (C) Protocolo PCR incluyendo los reactivos, casas comerciales y volúmenes empleados para la reacción de 25 μ L.

A	sgRNA diana 1	sgRNA diana 2
CRISPR307 VDRC (ID 342392)	ACGGTGTGGTCTACAAGTGC	CTCCGGCGCCCCGGTACCATC
CRISPR774 VDRC (ID 341673)	CAGTCCGGGCGAGAATTACA	ATCGCTATGAGAAGCTCAGT

B	Cebadores directos (<i>Cdkl</i> F y F2 respectivamente)	Cebador reverso común (<i>Cdkl</i> R)
	TGAGAAGCTCAGTCGGCTGG ($T_m = 59,3^\circ\text{C}$)	TCGGTGCGATGTAGCAGGT ($T_m = 58,9^\circ\text{C}$)
	GTTCCCTTTGGCCACCAA ($T_m = 55,9^\circ\text{C}$)	

C	Reactivos	Volúmenes (μL)
	H ₂ O libre de nucleasas	25
	Tampón 10X con MgCl ₂ (Biotools)	2,5
	dNTPs (20 mM)	0,5
	Cebador directo (10 μ M)	0,5
	Cebador reverso (10 μ M)	0,5
	Taq polimerasa 1U/ μ L (Biotools)	0,5
	ADN molde genómico (\approx 150 ng)	1
	TOTAL REACCIÓN	25

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las representaciones gráficas y el análisis estadístico de los distintos ensayos se realizaron con los programas GraphPad Prism 9.3.1 y Excel 2016. El tamaño de la muestra es 10 en todos los casos. En teoría, se emplea la prueba t de Student de dos colas o el ANOVA si la muestra tiene una distribución normal o gaussiana, dependiendo de si tenemos dos o más grupos. Asumiendo este hecho, la prueba de elección es ANOVA con corrección de Šidák (se supone independencia estadística en las pruebas individuales), que limita el riesgo de primera especie y se emplea para analizar los datos de la prueba, ya que hay más de dos grupos a comparar entre sí y se quiere saber si las diferencias entre grupos son significativas. Además, se utilizó el parámetro del valor P para determinar la significación estadística de todos los análisis, con un alfa de 0,05 como referencia, es decir, un intervalo de confianza del 95%. En concreto, para las gráficas de las figuras del apartado 4 se explica lo siguiente. El signo * representa una significatividad estadística con valor $p < 0,05$ comparado con el control; el signo ** indica un valor $p < 0,01$ respecto al control; el signo ***, un valor $p < 0,001$ respecto al control; y el signo **** muestra un valor $p < 0,0001$ comparado con el control.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los resultados obtenidos para cada CRISPR y sus diferentes parentales tendrá partes claramente diferenciadas. En primer lugar, se expondrán los tipos mutantes y hallazgos genéticos obtenidos. A continuación, se discutirán las distintas figuras con los resultados individuales de cada uno de los tres ensayos para el estudio de fenotipos: el de geotaxis negativa y los dos de convulsiones mecánica y térmica. De esta manera, se espera observar ciertos cambios conductuales al afectar al gen que codifica para dicha proteína. Por último, mediante la extracción de ADN genómico, PCR, y electroforesis en gel de agarosa se espera corroborar molecularmente que el fenotipo que se ha observado en la mosca se debe a una delección en la región codificante del gen y por tanto a una proteína disfuncional.

4.1 GENERACIÓN DE LOS MUTANTES POR CRISPR-Cas9

Cabe destacar en esta breve introducción y como primer resultado clave, que la mutación CRISPR no es letal, dado que aparece descendencia con las alas planas. Sin embargo, parece que en heterocigosis no presenta un fenotipo propio del síndrome por deficiencia de CDKL5, sino un carácter recesivo, porque las moscas con alas curvadas (heterocigotas) no experimentaron convulsiones en la prueba más severa: el baño térmico.

De los 20 tubos, 10 para cada uno de los dos CRISPR, 2 no produjeron progenie. De los 18 restantes, 9 del CRISPR307 y 9 del CRISPR774 iniciales, se lograron sacar 3 y 6 cruces respectivamente. Estos cruces tuvieron lugar entre los propios hermanos provenientes de los mismos padres y con las características mencionadas, asegurándose de la virginidad de las hembras. Se generaron así nuestras cepas de moscas candidatas a padecer el síndrome por deficiencia de CDKL5 y los síntomas que acarrea, como las convulsiones. Finalmente, se dejaron pasar las generaciones cruzándose entre ellas y cambiándolas cada 3-4 días de tubo, y se fueron sometiendo a diversas pruebas para comprobar resultados.

4.2 GEOTAXIS NEGATIVA

Estudios previos han conseguido asociar alteraciones de los genes implicados en la dinámica de los cilios con síndromes que involucran discapacidades intelectuales y cognitivas. Así, en un modelo murino se consiguió recrear el síndrome X frágil suprimiendo la función del gen *Fmr1*, que juega un papel esencial en el cerebro. Se logró así una predisposición a trastornos como el autismo y discapacidades intelectuales y cognitivas (Lee et al., 2020). Mediante los ensayos de escalada, se persiguió vincular la neurodegeneración a un fenotipo de deficiencia de locomoción en *D. melanogaster*. De esta manera, se realizaron los ensayos con las moscas de ambos tipos de CRISPR y con cada tipo de parental dentro de los mismos.

En primer lugar, un 70% de las moscas empleadas como control, es decir las Canton-S, consiguieron cruzar el umbral de los 8 cm. Con esto podemos deducir que, pese a

que la geotaxis negativa es un comportamiento inherente a *D. melanogaster*, no todas logran superar esta prueba, por lo que debe haber más factores en juego. Si se presta atención a la progenie proveniente de los 3 parentales del CRISPR307 (Fig. 8A), se extraen resultados significativos de disminución en la escalada en los casos del CRISPR307.3 y CRISPR307.4. Esto cuadra porque las moscas empleadas fueron de ojos blancos y alas lisas, luego el cromosoma completo con la delección en *Cdkl* se encuentra en homocigosis. En cambio, no ocurre lo mismo en el caso del CRISPR307.9, lo cual tiene sentido ya que para dicho cruce se emplearon moscas con ojos naranjas y alas planas, pero que no tienen la delección con el cromosoma completo porque conservan un alelo CRISPR. Si bien es cierto que menos de estas moscas cruzaron el umbral, estas diferencias pueden deberse a otros factores, como la edad.

Por otro lado, de la descendencia de los 6 parentales del CRISPR774 (Fig. 8B) solo CRISPR774.7, CRISPR774.8 y CRISPR774.10 muestran resultados significativos. En el 7 y 8 se podía esperar, ya que aunque el resto (excepto el 10) también son de ojos blancos y alas planas, no hay que olvidar que el corte dentro del gen no es siempre exactamente el mismo. No obstante, en el CRISPR774.10 hay moscas de ojos naranjas, de manera que puede deberse al reducido tamaño muestral y se corroborará con la PCR y el gel de agarosa.

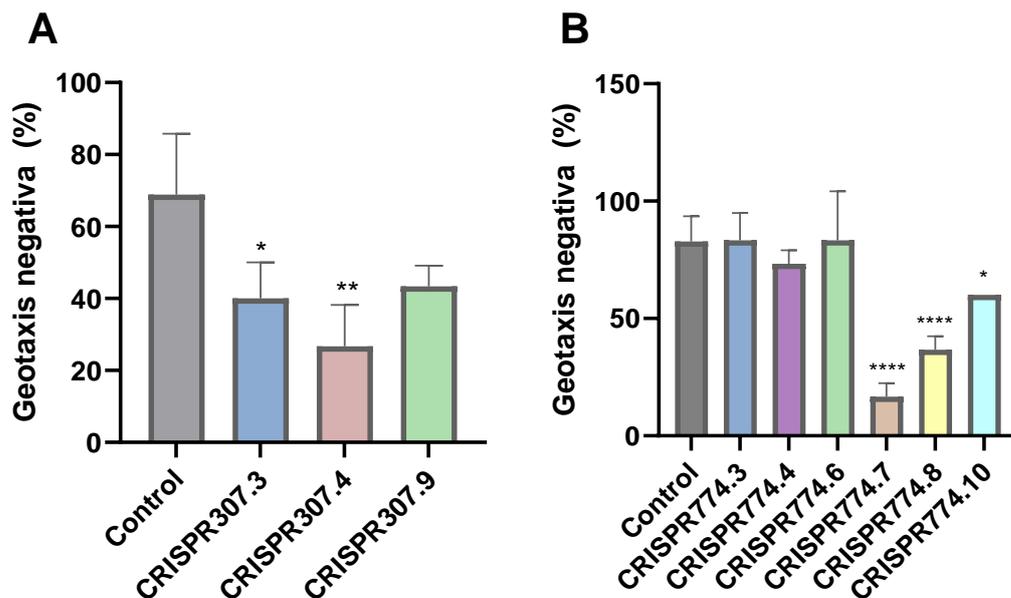


Figura 8. Efecto de la delección en la geotaxis negativa. (A) Porcentaje de moscas provenientes de los diversos stocks de CRISPR307 que superaron la marca de 8 cm en el ensayo de geotaxis negativa. (B) Porcentaje de moscas provenientes de los 6 stocks de CRISPR774 que superaron la marca de 8 cm en el ensayo de geotaxis negativa. Los valores en ambas gráficas representan la media \pm error estándar.

4.3 CONVULSIÓN POR SHOCK MECÁNICO

De la misma manera que en el caso anterior, varios ensayos se han centrado en caracterizar síndromes epilépticos e incluso buscar fármacos anticonvulsivos mediante ensayos de convulsión mecánica en agitador tipo vórtex (Parker et al., 2011; Dare et al.,

2021). La inducción mecánica de estados similares a las convulsiones ha permitido identificar alelos en más de 50 genes, entre los que se encuentran también ortólogos de genes causantes de enfermedades. En algunos casos, los fenotipos relacionados con la epilepsia se generaron a través de estrategias genéticas muy concretas, ya que los alelos completamente *knock-out* pueden ir asociados a letalidad (Lasko & Lüthy, 2021).

Inmediatamente después de la inducción mecánica, ninguna de las moscas control evaluadas mostró un fenotipo convulsivo (Fig.9) mientras que un 30% de las moscas CRISPR307.4 convulsionó justo después de la agitación (Fig. 9A). No se observan diferencias entre machos y hembras ya que la mutación, en contraparte al caso de los humanos, no se encuentra en un cromosoma sexual. Si prestamos atención al CRISPR774, 4 de 6 grupos de descendientes muestran resultados significativos en lo que a convulsiones concierne (Fig. 9B). Con estos datos no se puede confirmar que el CRISPR774 es más eficiente en la obtención del fenotipo del síndrome, ya que la diferencia puede que se deba al simple hecho de haber conseguido más cruces de este.

Analizando las convulsiones propiamente dichas y como era de esperar, tras unos segundos paralizadas, las moscas comenzaron a recuperarse. Algunas de ellas adoptaron directamente la postura erguida, mientras que otras atravesaron una fase tónico-clónica mostrando un fuerte batir de alas y agitación de las patas, intercalando parálisis y finalmente poniéndose de pie. Nuevos intentos del ensayo confirmaron la existencia de un periodo refractario, en el que la mosca ya no puede volver a convulsionar. Suele presentar gran variabilidad entre individuos y se ha estimado entre 3 y 17 min (Kuebler & Tanouye, 2000).

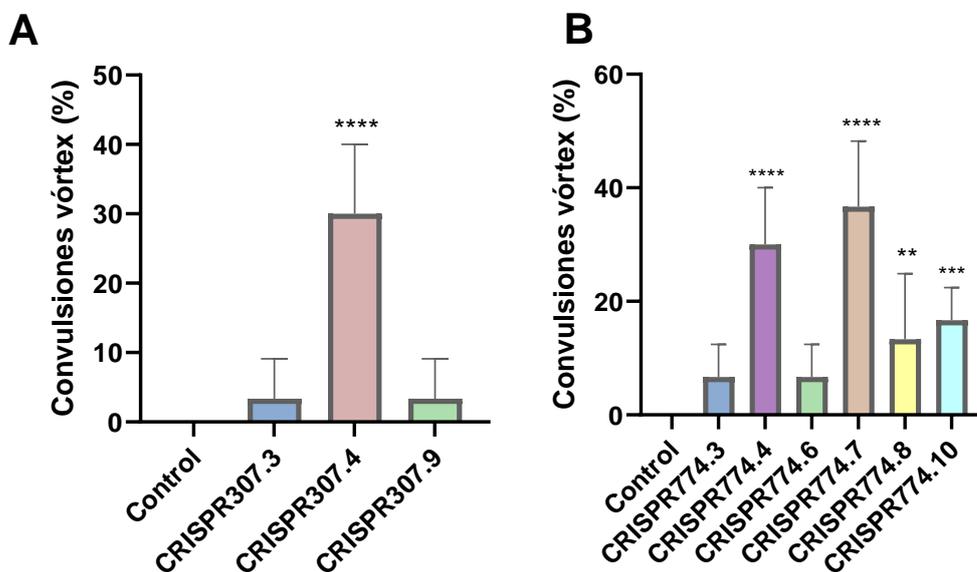


Figura 9. Efecto de la delección en la convulsión mecánica. (A) Porcentaje de moscas provenientes de los 3 stocks de CRISPR307 que convulsionaron tras 10 segundos de agitación a máxima velocidad en el agitador tipo vórtex. (B) Porcentaje de moscas provenientes de los 6 stocks de CRISPR774 que convulsionaron tras 10 segundos de agitación a máxima velocidad en el agitador tipo vórtex. Los valores en ambas gráficas representan la media \pm error estándar.

4.4 CONVULSIÓN POR SHOCK TÉRMICO

Por último, se realizó un experimento de convulsión en baño térmico a 40°C. La mosca de la fruta es un modelo excelente para investigar los mecanismos que subyacen a la respuesta neural al estrés térmico agudo debido a su pequeño tamaño, su enorme relación superficie-volumen y su incapacidad para regular la temperatura corporal internamente (Neven, 2000). En *Drosophila* se han encontrado mutaciones en 1200 genes que causan convulsiones y parálisis inducidas por el calor mediante el cribado genético directo (Burg & Wu, 2012). La función de los genes que codifican los canales de sodio y potasio activados por voltaje, así como las proteínas relacionadas con su función neuronal, parece estar muy afectada por estas alteraciones (Hill et al., 2019).

En este experimento, se planteó la hipótesis de que la supresión del gen *Cdkl*, implicado en la fosforilación de proteínas CDKs, alteraría la homeostasis neurofisiológica intrínseca al estrés térmico agudo, dando lugar a una parálisis rápida.

Como este es el ensayo más agresivo, cabe esperar en un principio resultados más significativos. En el caso del CRISPR307 (Fig. 10A), los 3 tipos de descendencia lo son, aunque como en el anterior ensayo de convulsión vuelve a destacar CRISPR307.4. Por otra parte, en el CRISPR774 (Fig. 10B), también muestran significación estadística toda la progenie de los cruces excepto el caso del CRISPR774.10, que se puede atribuir al hecho de tener ojos anaranjados y la mutación incompleta. Cabe destacar los CRISPR774.7 y CRISPR774.8 que en los tres ensayos han demostrado características patológicas respecto al control, y se corroborará con la pureza y el grado de delección en la PCR y gel de agarosa. De partida se espera con bastante seguridad que el corte haya ocurrido en esta pareja de CRISPRs.

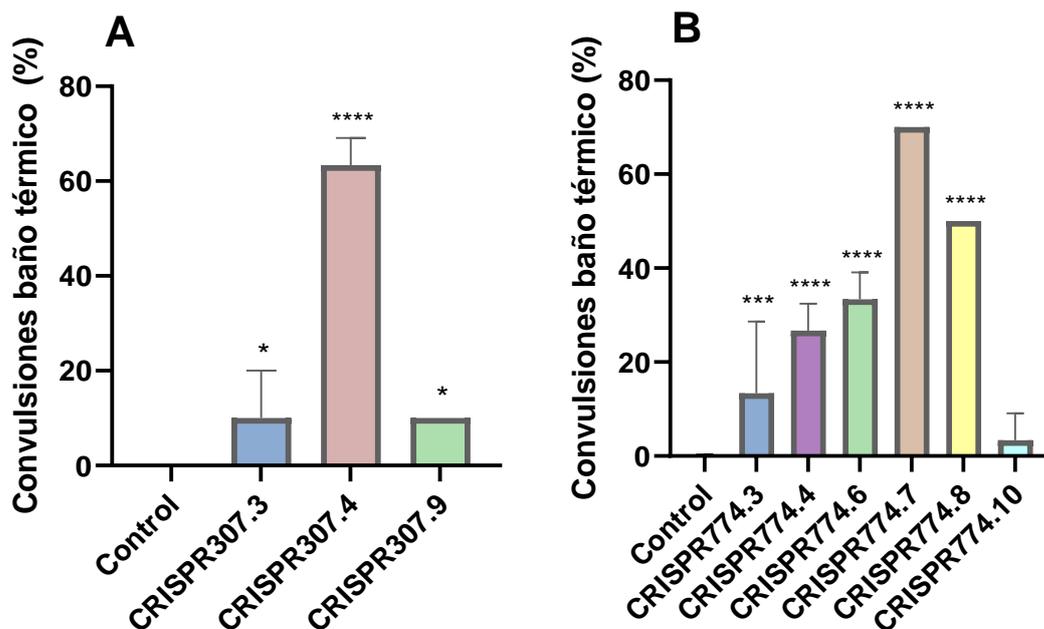


Figura 10. Efecto de la delección en la convulsión térmica. (A) Porcentaje de moscas provenientes de los 3 stocks de CRISPR307 que convulsionaron tras 2 minutos de inmersión en un baño de agua a 40°C. (B) Porcentaje de moscas provenientes de los 6 stocks de CRISPR307

que convulsionaron tras 2 minutos de inmersión en un baño de agua a 40°C. Los valores en ambas gráficas representan la media \pm error estándar.

4.5 DELECIÓN EN *CDKL* RESPONSABLE DEL FENOTIPO

Tras la reacción de PCR exitosa, se cargó el gel de agarosa en la cubeta de electroforesis a 100 V durante 45 min. Los resultados esperados eran dos bandas, debido a la heterocigosidad de las moscas seleccionadas, una del producto del gen silvestre para cada pareja de cebadores (1,1 kb y 1,8 kb, respectivamente) y otra de dicho tamaño menos la delección de aproximadamente 600 pb originada por cada CRISPR (500 pb y 1,2 kb, respectivamente). No obstante, y aparentemente, se obtuvo una única banda correspondiente al producto del gen silvestre (Fig. 11), por lo que se podría pensar que no había tenido lugar ninguna delección.

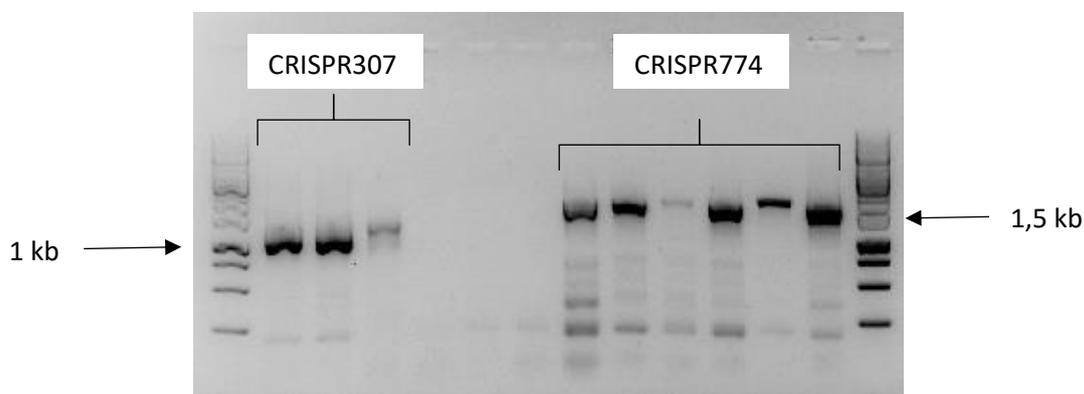
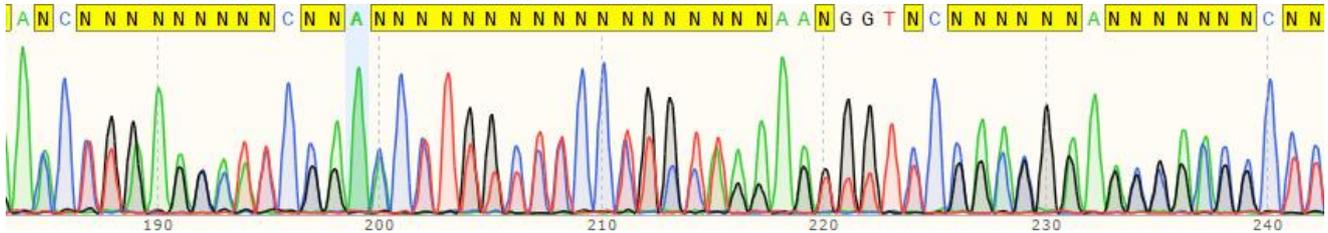


Figura 11. Productos de PCR de los CRISPR del gen *Cdkl* en gel de agarosa 1%. En los 3 primeros carriles, en orden, se observan CRISPR307.3, CRISPR307.4 y CRISPR307.9. Los productos de sus PCR son, aproximadamente 1,1 kb, lo esperado según la pareja de cebadores empleada. En los 6 carriles restantes, en orden, se observan CRISPR774.3, CRISPR774.4, CRISPR774.6, CRISPR774.7, CRISPR774.8, CRISPR774.10. Los productos de sus PCR son, aproximadamente 1,8 kb, lo esperado según la pareja de cebadores empleada. En ambos casos el marcador fue *Generuler*.

Aun así, se hipotetiza que algún tipo de delección ha ocurrido, porque los fenotipos de geotaxis y convulsión observados no pueden ser fruto del azar. Además, el sistema CRISPR-Cas9 no siempre va a cortar el fragmento de la misma manera o con la misma eficiencia, por lo que con que el corte haya sido de < 50 pb ya va a ser indetectable por un análisis electroforético diseñado de esta manera. Un cambio de solo uno o dos nucleótidos es suficiente para cambiar la pauta de lectura y originar una proteína total o parcialmente disfuncional. Partiendo de esta premisa, se recibieron y analizaron las secuencias obtenidas de la secuenciación Sanger. Como se puede observar, hay gran cantidad de dobles picos, lo que confirma que las moscas que se emplearon para la extracción de ADN genómico eran heterocigotas para la mutación (Fig.12A). Además, el programa informático que se encarga del análisis empieza ser incapaz de decidir la identidad del nucleótido (N) a partir de la base 200, justo la distancia desde el cebador directo al primer ARN guía de CRISPR307 (Fig. 12B). Esto es revelador en cuanto a la presencia de una delección que puede haber corrido toda la pauta de lectura, y por ello solo unos pocos nucleótidos coinciden por azar en la secuencia. Se seleccionó

CRISPR307.4 para la figura por la calidad de la secuencia obtenida y la definición de los picos. Para mayor calidad en las secuencias o experimentos de clonación, se podría repetir en un futuro el proceso seleccionando moscas homocigotas para la mutación.

A



B

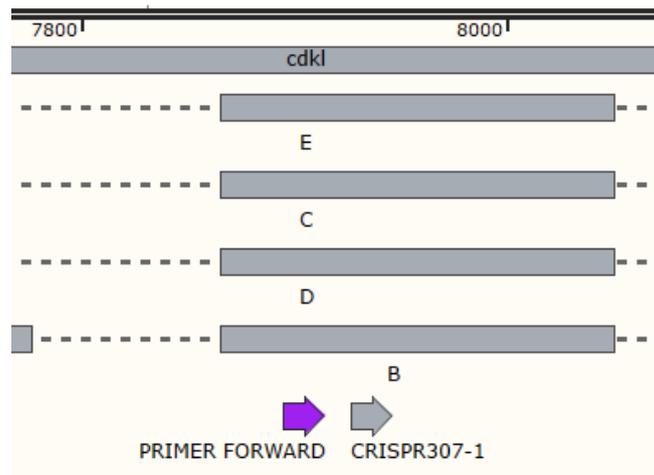


Figura 12. Resultados y análisis de la secuenciación. (A) Picos resultantes de la secuenciación Sanger para CRISPR307.4 (cebador Cdkl F) en la región donde comienza la mutación (180-240 pb). (B) Ampliación de la región mutante del gen Cdkl mostrando la distancia entre el cebador directo y el ARN guía de CRISPR307.

5. CONCLUSIÓN

El síndrome por deficiencia de CDKL5 es un tipo grave de epilepsia de inicio en la infancia asociado a mutaciones de pérdida de función en el gen de proteína similar a la quinasa dependiente de ciclina 5. Aunque el estudio de este gen por sí mismo es crucial para comprender las bases de la enfermedad, hay diferencias en la progresión de la enfermedad en los pacientes. Este hecho sumado a la baja prevalencia complica el pronóstico eficaz. Por lo tanto, es necesario el estudio tanto fenotípico como molecular en un organismo modelo, como la mosca de la fruta.

Con todos los datos recopilados a lo largo del trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- Se ha logrado la generación de mutantes de *Drosophila melanogaster* en el gen *Cdkl* empleando el sistema CRISPR-Cas9.
- La caracterización fenotípica y molecular corrobora la existencia de una delección en su región codificante, responsable de los síntomas de los pacientes de CDD, tales como crisis epilépticas y alteraciones en la locomoción.

6. BIBLIOGRAFÍA

BALESTRA, D., Giorgio, D., Bizzotto, M., Fazzari, M., Ben Zeev, B., Pinotti, M., Landsberger, N., & Frasca, A. (2019). Splicing Mutations Impairing CDKL5 Expression and Activity Can be Efficiently Rescued by U1snRNA-Based Therapy. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4130. <https://doi.org/10.3390/ijms20174130>

BALTUSSEN, L. L., Negraes, P. D., Silvestre, M., Claxton, S., Moeskops, M., Christodoulou, E., Flynn, H. R., Snijders, A. P., Muotri, A. R., & Ultanir, S. K. (2018). Chemical genetic identification of CDKL5 substrates reveals its role in neuronal microtubule dynamics. *The EMBO journal*, 37(24), e99763. <https://doi.org/10.15252/emj.201899763>

BARBIERO, I., Peroni, D., Siniscalchi, P., Rusconi, L., Tramarin, M., De Rosa, R., Motta, P., Bianchi, M., & Kilstrup-Nielsen, C. (2020). Pregnenolone and pregnenolone-methyl-ether rescue neuronal defects caused by dysfunctional CLIP170 in a neuronal model of CDKL5 Deficiency Disorder. *Neuropharmacology*, 164, 107897. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107897>

BARRANGOU, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>

BASSETT, A. R., & Liu, J. L. (2014). CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 41(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.12.004>

BASSETT, A. R., Tibbit, C., Ponting, C. P., & Liu, J. L. (2013). Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell reports*, 4(1), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.020>

BAYAT, A., Bayat, M., Rubboli, G., & Møller, R. S. (2021). Epilepsy Syndromes in the First Year of Life and Usefulness of Genetic Testing for Precision Therapy. *Genes*, 12(7), 1051. <https://doi.org/10.3390/genes12071051>

BOLUS, H., Crocker, K., Boekhoff-Falk, G., & Chtarbanova, S. (2020). Modeling Neurodegenerative Disorders in *Drosophila melanogaster*. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3055. <https://doi.org/10.3390/ijms21093055>

BURG, M. G., & Wu, C. F. (2012). Mechanical and temperature stressor-induced seizure-and-paralysis behaviors in *Drosophila* bang-sensitive mutants. *Journal of neurogenetics*, 26(2), 189–197. <https://doi.org/10.3109/01677063.2012.690011>

CANNING, P., Park, K., Gonçalves, J., Li, C., Howard, C. J., Sharpe, T. D., Holt, L. J., Pelletier, L., Bullock, A. N., & Leroux, M. R. (2018). CDKL Family Kinases Have Evolved Distinct Structural Features and Ciliary Function. *Cell reports*, 22(4), 885–894. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.083>

CHEN, L., Wang, G., Zhu, Y. N., Xiang, H., & Wang, W. (2016). Advances and perspectives in the application of CRISPR/Cas9 in insects. *Dong wu xue yan jiu = Zoological research*, 37(4), 220–228. <https://doi.org/10.13918/j.issn.2095-8137.2016.4.220>

CHIN, R. F., Mingorance, A., Ruban-Fell, B., Newell, I., Evans, J., Vyas, K., Nortvedt, C., & Amin, S. (2021). Treatment Guidelines for Rare, Early-Onset, Treatment-Resistant Epileptic Conditions: A Literature Review on Dravet Syndrome, Lennox-Gastaut Syndrome and CDKL5 Deficiency Disorder. *Frontiers in neurology*, 12, 734612. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.734612>

DARE, S. S., Merlo, E., Rodriguez Curt, J., Ekanem, P. E., Hu, N., & Berni, J. (2021). *Drosophila* parabss Flies as a Screening Model for Traditional Medicine: Anticonvulsant Effects of *Annona senegalensis*. *Frontiers in neurology*, 11, 606919. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.606919>

DEMAREST, S., Pestana-Knight, E. M., Olson, H. E., Downs, J., Marsh, E. D., Kaufmann, W. E., Partridge, C. A., Leonard, H., Gwadry-Sridhar, F., Frame, K. E., Cross, J. H., Chin, R., Parikh, S., Panzer, A., Weisenberg, J., Utley, K., Jaksha, A., Amin, S., Khwaja, O., Devinsky, O., ... Benke, T. A. (2019). Severity Assessment in CDKL5 Deficiency Disorder. *Pediatric neurology*, 97, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2019.03.017>

DEVINSKY, O., King, L., Schwartz, D., Conway, E., & Price, D. (2021). Effect of fenfluramine on convulsive seizures in CDKL5 deficiency disorder. *Epilepsia*, 62(7), e98–e102. <https://doi.org/10.1111/epi.16923>

ENGEL J., Jr (2010). Do we belittle epilepsy by calling it a disorder rather than a disease? *Epilepsia*, 51(11), 2363–2364. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02701.x>

ENGEL, J., Jr, & International League Against Epilepsy (ILAE) (2001). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, 42(6), 796–803. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.10401.x>

FISHER, R. S., van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J., Jr (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470–472. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x>

FORTINI, M. E., Skupski, M. P., Boguski, M. S., & Hariharan, I. K. (2000). A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome. *The Journal of cell biology*, 150(2), F23–F30. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.2.f23>

FUCHS, C., Rimondini, R., Viggiano, R., Trazzi, S., De Franceschi, M., Bartesaghi, R., & Ciani, E. (2015). Inhibition of GSK3 β rescues hippocampal development and learning in a mouse model of CDKL5 disorder. *Neurobiology of disease*, 82, 298–310. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.06.018>

GARGANO, J. W., Martin, I., Bhandari, P., & Grotewiel, M. S. (2005). Geotaxis negativa iterativa rápida (RING): un nuevo método para evaluar el deterioro locomotor relacionado con la edad en *Drosophila*. *Gerontología experimental*, 40(5), 386–395. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.02.005>

GASTAUT, H. (1970). Clinical and electroencephalographical classification of epileptic seizures. *Epilepsia*, 11(1), 102–113. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1970.tb03871.x>

GORTER, J., Jagadeesh, S., Gahr, C. *et al.* The nutritional and hedonic value of food modulate sexual receptivity in *Drosophila melanogaster* females. *Sci Rep* 6, 19441 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep19441>

- GRATZ, S. J., Cummings, A. M., Nguyen, J. N., Hamm, D. C., Donohue, L. K., Harrison, M. M., Wildonger, J., & O'Connor-Giles, K. M. (2013). Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 194(4), 1029–1035. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.152710>
- HAGEBEUK, E. E., van den Bossche, R. A., & de Weerd, A. W. (2013). Respiratory and sleep disorders in female children with atypical Rett syndrome caused by mutations in the CDKL5 gene. *Developmental medicine and child neurology*, 55(5), 480–484. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2012.04432.x>
- HECTOR, R. D., Dando, O., Landsberger, N., Kilstrup-Nielsen, C., Kind, P. C., Bailey, M. E., & Cobb, S. R. (2016). Characterisation of CDKL5 Transcript Isoforms in Human and Mouse. *PloS one*, 11(6), e0157758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157758>
- HECTOR, R. D., Kalscheuer, V. M., Hennig, F., Leonard, H., Downs, J., Clarke, A., Benke, T. A., Armstrong, J., Pineda, M., Bailey, M., & Cobb, S. R. (2017). CDKL5 variants: Improving our understanding of a rare neurologic disorder. *Neurology Genetics*, 3(6), e200. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000200>
- HILL, A. S., Jain, P., Folan, N. E., & Ben-Shahar, Y. (2019). The *Drosophila* ERG channel seizure plays a role in the neuronal homeostatic stress response. *PLoS genetics*, 15(8), e1008288. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008288>
- JAGTAP, S., Thanos, J. M., Fu, T., Wang, J., Lalonde, J., Dial, T. O., Feiglin, A., Chen, J., Kohane, I., Lee, J. T., Sheridan, S. D., & Perlis, R. H. (2019). Aberrant mitochondrial function in patient-derived neural cells from CDKL5 deficiency disorder and Rett syndrome. *Human molecular genetics*, 28(21), 3625–3636. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz208>
- JAKIMIEC, M., Paprocka, J., & Śmigiel, R. (2020). CDKL5 Deficiency Disorder-A Complex Epileptic Encephalopathy. *Brain sciences*, 10(2), 107. <https://doi.org/10.3390/brainsci10020107>
- JINEK, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- KALUME, F., Westenbroek, R. E., Cheah, C. S., Yu, F. H., Oakley, J. C., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2013). Sudden unexpected death in a mouse model of Dravet syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 123(4), 1798–1808. <https://doi.org/10.1172/JCI66220>
- KATAYAMA, S., Sueyoshi, N., Inazu, T., & Kameshita, I. (2020). Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 (CDKL5): Possible Cellular Signalling Targets and Involvement in CDKL5 Deficiency Disorder. *Neural plasticity*, 2020, 6970190. <https://doi.org/10.1155/2020/6970190>
- KUEBLER, D., & Tanouye, M. A. (2000). Modifications of seizure susceptibility in *Drosophila*. *Journal of neurophysiology*, 83(2), 998–1009. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.2.998>
- LASKO, P., & Lüthy, K. (2021). Investigating rare and ultrarare epilepsy syndromes with *Drosophila* models. *Faculty reviews*, 10, 10. <https://doi.org/10.12703/r/10-10>

- LEE, B., Panda, S., Lee, H. Y. (2020). Primary ciliary deficits in the dentate gyrus of fragile X syndrome. *Stem Cell Reports*, 15(2), 454–466. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.07.001>
- LLOYD, T. E., & Taylor, J. P. (2010). Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1184, e1–e20. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05432.x>
- MELTZER, H., Marom, E., Alyagor, I., Mayseless, O., Berkun, V., Segal-Gilboa, N., Unger, T., Luginbuhl, D., & Schuldiner, O. (2019). Tissue-specific (ts)CRISPR as an efficient strategy for in vivo screening in *Drosophila*. *Nature communications*, 10(1), 2113. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10140-0>
- MILLER, D. E., Cook, K. R., Hemenway, E. A., Fang, V., Miller, A. L., Hales, K. G., & Hawley, R. S. (2018). The Molecular and Genetic Characterization of Second Chromosome Balancers in *Drosophila melanogaster*. *G3 (Bethesda, Md.)*, 8(4), 1161–1171. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200021>
- MITUIZAITE, J., Petersen, R., Claridge-Chang, A., Baines, R.A. (2021) Characterization of Seizure Induction Methods in *Drosophila*. *eNeuro*, 8 (4) ENEURO.0079-21.2021; DOI: [10.1523/ENEURO.0079-21.2021](https://doi.org/10.1523/ENEURO.0079-21.2021)
- MOHR, S. E., & Perrimon, N. (2019). *Drosophila melanogaster*: a simple system for understanding complexity. *Disease models & mechanisms*, 12(10), dmm041871. <https://doi.org/10.1242/dmm.041871>
- MORRISON, D. K., Murakami, M. S., & Cleghon, V. (2000). Protein kinases and phosphatases in the *Drosophila* genome. *The Journal of cell biology*, 150(2), F57–F62. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.2.f57>
- MÜLLER, A., Helbig, I., Jansen, C., Bast, T., Guerrini, R., Jähn, J., Muhle, H., Auvin, S., Korenke, G. C., Philip, S., Keimer, R., Striano, P., Wolf, N. I., Püst, B., Thiels, C. h., Fogarasi, A., Waltz, S., Kurlemann, G., Kovacevic-Preradovic, T., Ceulemans, B., ... Kluger, G. (2016). Retrospective evaluation of low long-term efficacy of antiepileptic drugs and ketogenic diet in 39 patients with CDKL5-related epilepsy. *European journal of paediatric neurology: EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*, 20(1), 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2015.09.001>
- NEVEN LG. Physiological responses of insects to heat. *Postharvest Biology and Technology*. 2000;21(1):103–11. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00169-1](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00169-1)
- OKUDA, K., Kobayashi, S., Fukaya, M., Watanabe, A., Murakami, T., Hagiwara, M., Sato, T., Ueno, H., Ogonuki, N., Komano-Inoue, S., Manabe, H., Yamaguchi, M., Ogura, A., Asahara, H., Sakagami, H., Mizuguchi, M., Manabe, T., & Tanaka, T. (2017). CDKL5 controls postsynaptic localization of GluN2B-containing NMDA receptors in the hippocampus and regulates seizure susceptibility. *Neurobiology of disease*, 106, 158–170. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.07.002>
- OLSON, H. E., Demarest, S. T., Pestana-Knight, E. M., Swanson, L. C., Iqbal, S., Lal, D., Leonard, H., Cross, J. H., Devinsky, O., & Benke, T. A. (2019). Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 Deficiency Disorder: Clinical Review. *Pediatric neurology*, 97, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2019.02.015>

- PANDEY, U. B., & Nichols, C. D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews*, 63(2), 411–436. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003293>
- PARKER, L., Howlett, I. C., Rusan, Z. M., & Tanouye, M. A. (2011). Seizure and epilepsy: studies of seizure disorders in *Drosophila*. *International review of neurobiology*, 99, 1–21. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387003-2.00001-X>
- POE, A. R., Wang, B., Sapar, M. L., Ji, H., Li, K., Onabajo, T., Fazliyeva, R., Gibbs, M., Qiu, Y., Hu, Y., & Han, C. (2019). Robust CRISPR/Cas9-Mediated Tissue-Specific Mutagenesis Reveals Gene Redundancy and Perdurance in *Drosophila*. *Genetics*, 211(2), 459–472. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301736>
- PORT, F., H. M. Chen, T. Lee, and S. L. Bullock, (2014) Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: E2967–E2976. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405500111>
- PORT, F., Strein, C., Stricker, M., Rauscher, B., Heigwer, F., Zhou, J., Beyersdörffer, C., Frei, J., Hess, A., Kern, K., Lange, L., Langner, N., Malamud, R., Pavlović, B., Räddecke, K., Schmitt, L., Voos, L., Valentini, E., & Boutros, M. (2020). A large-scale resource for tissue-specific CRISPR mutagenesis in *Drosophila*. *eLife*, 9, e53865. <https://doi.org/10.7554/eLife.53865>
- RADEMACHER, N., Hambrock, M., Fischer, U., Moser, B., Ceulemans, B., Lieb, W., Boor, R., Stefanova, I., Gillessen-Kaesbach, G., Runge, C., Korenke, G. C., Spranger, S., Laccone, F., Tzschach, A., & Kalscheuer, V. M. (2011). Identification of a novel CDKL5 exon and pathogenic mutations in patients with severe mental retardation, early-onset seizures and Rett-like features. *Neurogenetics*, 12(2), 165–167. <https://doi.org/10.1007/s10048-011-0277-6>
- RICCIARDI, S., Ungaro, F., Hambrock, M., Rademacher, N., Stefanelli, G., Brambilla, D., Sessa, A., Magagnotti, C., Bachi, A., Giarda, E., Verpelli, C., Kilstrup-Nielsen, C., Sala, C., Kalscheuer, V. M., & Broccoli, V. (2012). CDKL5 ensures excitatory synapse stability by reinforcing NGL-1-PSD95 interaction in the postsynaptic compartment and is impaired in patient iPSC-derived neurons. *Nature cell biology*, 14(9), 911–923. <https://doi.org/10.1038/ncb2566>
- SCHEFFER, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y. H., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 512–521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>
- SERRANO, R. J., Lee, C., Douek, A. M., Kaslin, J., Bryson-Richardson, R. J., & Sztal, T. E. (2021). Novel pre-clinical model for CDKL5 Deficiency Disorder. *Disease models & mechanisms*, dmm.049094. Advance online publication. <https://doi.org/10.1242/dmm.049094>
- TERZIC, B., Cui, Y., Edmondson, A. C., Tang, S., Sarmiento, N., Zaitseva, D., Marsh, E. D., Coulter, D. A., & Zhou, Z. (2021). X-linked cellular mosaicism underlies age-dependent occurrence of seizure-like events in mouse models of CDKL5 deficiency disorder. *Neurobiology of disease*, 148, 105176. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105176>

TRAZZI, S., Fuchs, C., Viggiano, R., De Franceschi, M., Valli, E., Jedynak, P., Hansen, F. K., Perini, G., Rimondini, R., Kurz, T., Bartesaghi, R., & Ciani, E. (2016). HDAC4: a key factor underlying brain developmental alterations in CDKL5 disorder. *Human molecular genetics*, 25(18), 3887–3907. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw231>

ZHAO, Y., Zhang, X., Bao, X., Zhang, Q., Zhang, J., Cao, G., Zhang, J., Li, J., Wei, L., Pan, H., & Wu, X. (2014). Clinical features and gene mutational spectrum of CDKL5-related diseases in a cohort of Chinese patients. *BMC medical genetics*, 15, 24. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-15-24>

ZHOU, A., Han, S., & Zhou, Z. J. (2017). Molecular and genetic insights into an infantile epileptic encephalopathy - CDKL5 disorder. *Frontiers in biology*, 12(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s11515-016-1438-7>

ZHU, Y. C., & Xiong, Z. Q. (2019). Molecular and Synaptic Bases of CDKL5 Disorder. *Developmental neurobiology*, 79(1), 8–19. <https://doi.org/10.1002/dneu.22639>

ZHU, Y. C., Li, D., Wang, L., Lu, B., Zheng, J., Zhao, S. L., Zeng, R., & Xiong, Z. Q. (2013). Palmitoylation-dependent CDKL5-PSD-95 interaction regulates synaptic targeting of CDKL5 and dendritic spine development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), 9118–9123. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300003110>