

Caracterización del gen *MAPT* en modelos celulares para el estudio de la enfermedad de Alzheimer

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología
Universidad de Zaragoza

Autor:

Javier Amezcua Gil

Directoras:

María Pilar Bayona Bafaluy
Nuria Garrido Pérez



Grupo de Biogénesis y patología mitocondrial

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias

2015/2016

Agradecimientos

Siendo la primera vez que escribía una hoja de agradecimientos no tenía muy claro cómo empezar, a quién nombrar o qué expresar, pero me di cuenta de que la respuesta era simple: lo que de verdad ha sido importante para la realización de este trabajo.

Por ello, en primer lugar, agradezco su labor a todos los profesores que he tenido el placer de conocer, ya que sin ellos, sin los educadores, ninguno habríamos llegado hasta aquí. Especial mención para M^a Luisa Margelí, mi maestra de 3^o y 4^o de Primaria con quien realmente inicié mi camino estudiantil, recitando los huesos más importantes del cuerpo humano. También a M^a Teresa Andrés, profesora de Lengua y Literatura de la ESO, por marcar un año de mi vida en que el reconocimiento y el trabajo bien hecho estuvieron unidos de la mano más que nunca. Por último, a M^a José Villacampa, investigadora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular por avivar el interés innato en mí por lo desconocido.

En segundo lugar, a mi familia: a mis padres y mi hermana. Son las personas que siempre he tenido a mi lado y las que, aunque mi tiempo se viera cada vez más mermado por la carrera y no pudiera dedicarles la suficiente atención, más me han respetado y valorado. Se merecen cada uno de ellos estas líneas por diversos motivos, pero, sobre todo, a mi padre por su perseverancia y comprensión, a mi madre por su cariño y por estar ahí y a mi hermana simplemente por existir.

En tercer lugar a mis amigos y compañeros de carrera. Sin duda el trayecto hubiera sido mucho más complicado de no ser por esas risas y palabras de ánimo que hemos compartido y nos hemos transmitido a lo largo de estos años.

Finalmente, y no por ello menos importante, agradezco enormemente a mis dos directoras las enseñanzas y el apoyo ofrecido, ya que sin ellas no hubiera podido desempeñar un proyecto que yo, una persona más teórico que práctica, atisbaba complicado, sino imposible.

Es resultado de todos ellos el presente trabajo que, si bien no es el final, culmina una larga y difícil trayectoria que, como estudiante, siempre recordaré con una sonrisa.

Gracias a todos.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
1.1 Resumen.....	1
1.2 Abstract	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Enfermedad de Alzheimer: origen y bases moleculares.....	2
2.2 <i>MAPT</i> y proteína tau	2
2.2.1 <i>MAPT</i> : isoformas, expresión, mutaciones y ratio 3R/4R	2
2.2.2 <i>Proteína tau</i> : estructura, función, fosforilación, agregación y propagación	4
2.3 Hipótesis: OXPHOS, pirimidinas y Alzheimer	5
3. OBJETIVOS	5
4. MATERIAL Y MÉTODOS	6
4.1 Reactivos y kits comerciales.....	6
4.2 Extracción de RNA total	6
4.2.1 <i>Líneas celulares</i>	6
4.2.2 <i>Extracción de RNA con TRIzol®</i>	7
4.2.3 <i>Cuantificación de la cantidad de RNA por espectrofotometría</i>	7
4.3 Retrotranscripción del mRNA por RT-PCR	7
4.4 Análisis de expresión por qPCR.....	8
4.5 Amplificación de las isoformas de interés por PCR.....	9
4.5.1 <i>Selección de los primers utilizados</i>	10
4.6 Electroforesis horizontal en gel de agarosa	11
4.7 Clonaje de los productos de PCR.....	11
4.8 Transformación bacteriana	12
4.8.1 <i>Preparación de medios de cultivo</i>	12
4.8.2 <i>Internalización del DNA plasmídico en bacterias competentes</i>	12
4.9 Selección de colonias por PCR de colonia	13
4.10 Aislamiento de DNA plasmídico	14
4.11 Secuenciación de las isoformas presentes.....	14
5. RESULTADOS	15
5.1 Cuantificación de los grupos de isoformas 3R y 4R de <i>MAPT</i> en las líneas celulares de estudio.....	15

5.2 Amplificación de las isoformas de la proteína tau y selección de las colonias transformadas	16
5.3 Comparación del crecimiento de colonias según el material genético inicial	19
5.4 Isoformas y variaciones encontradas de <i>MAPT</i> en los modelos celulares.....	20
6. DISCUSIÓN	22
7. CONCLUSIONES	23
7.1 Conclusiones	23
7.2 Conclusions	23
8. BIBLIOGRAFÍA	24
9. ANEXOS	26
9.1 Secuencias de las isoformas (NCBI).....	26
9.2 Mapa genético del vector PCR™-BLUNT II-TOPO®	29
9.3 Alineamiento de isoformas en Ensembl	30
9.4 Alineamiento de isoformas en NCBI	30
9.5 Variaciones del gen <i>MAPT</i> presentes en Ensembl	31
9.6 Cambios realizados por la PHS II polimerasa en dos experiencias.....	31

1. RESUMEN

1.1 Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la presencia de placas seniles y ovillos neurofibrilares en el cerebro, formados por depósitos del péptido β -amiloide y la proteína tau hiperfosforilada, respectivamente. El origen de la enfermedad y las bases moleculares de la misma siguen en estudio, ámbito en el que desde nuestro grupo se ha establecido una hipótesis que relaciona al sistema OXPHOS, la síntesis *de novo* de pirimidinas y la EA. Para comprobar esta hipótesis es necesario investigar las bases moleculares de la enfermedad y para ello deben validarse modelos de estudio de forma previa. En el presente trabajo se ha llevado a cabo la validación de las líneas celulares hNSC, SH-SY5Y y SK-N-BE(2)-C como modelos adecuados a fin de diferenciarlas a neuronas colinérgicas y estudiar la proteína tau en ensayos posteriores. En concreto, se ha realizado la caracterización del gen *MAPT* (*Microtubule-associated protein tau*), codificante para la proteína tau, mediante el análisis de la expresión del gen y del ratio del grupo de isoformas 3R y 4R (establecidas por *splicing* alternativo del exón 10), así como la búsqueda de las 6 isoformas mayoritarias presentes en cerebro adulto humano y el estudio de las variaciones genéticas de *MAPT*. En las líneas SK-N-BE(2)-C y SH-SY5Y no se han encontrado variaciones en los transcritos secuenciados de *MAPT* y se ha observado un claro predominio de la isoforma fetal con respecto a las demás. Sin embargo, más ensayos son necesarios para validar la línea hNSC antes de su utilización, ya que sólo ha podido determinarse la mayor expresión de las isoformas 3R en esta línea celular.

Palabras clave: Alzheimer, gen *MAPT*, *splicing* alternativo, variaciones genéticas.

1.2 Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by senile plaques and neurofibrillary tangles present in the brain. These aggregates are formed by β -amyloid peptide deposits and hyperphosphorylated tau protein, respectively. Disease origin and its molecular basis remain to be elucidated and, in this way, our group has established a hypothesis that relates OXPHOS system, *de novo* pyrimidine biosynthesis and AD. To prove it research on the molecular pathways associated with the disease is necessary and for that, scientific models have to be validated previously. In this work, hNSC, SH-SY5Y and SK-N-BE(2)-C cell lines have been validated to differentiate into cholinergic neurons in future assays and hence to study tau protein. In particular, for its validation, the characterization of *MAPT* (Microtubule-associated protein tau) gene, which encodes for tau protein, has been performed by gene expression and isoforms 3R and 4R (synthesized by exon 10 alternative splicing) analysis, search of 6 main isoforms in adult human brain and *MAPT* genetic variations study. Results show no *MAPT* genetic variations in sequenced transcripts and fetal isoform prevalence over others. However, more research on hNSC cell line is necessary, in which only a higher 3R isoforms expression has been found out.

Keywords: Alzheimer, *MAPT* gene, alternative splicing, genetic variations.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Enfermedad de Alzheimer: origen y bases moleculares

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa más común en la actualidad, con más de 20 millones de casos en el mundo¹. Fue descrita por **Alois Alzheimer** al estudiar histológicamente el cerebro de **Auguste Deter**, paciente que sufría demencia, en el que encontró las dos marcas características y necesarias de la EA: **placas seniles extracelulares y ovillos neurofibrilares (NFTs) intracelulares**². Las primeras se componen, sobre todo, del péptido β -amiloide, formado a partir de la proteína transmembranal precursora amiloide (APP) por corte inicial de una α -secretasa (ADAM10), mientras que las segundas están formadas por la proteína tau hiperfosforilada³. La relación entre ambas se desconoce, aunque según la **hipótesis de la cascada amiloide**, surgida del estudio de casos de EA familiar*, la enfermedad tiene su origen en una desregulación de la síntesis del β -amiloide, que lleva a la formación de los ovillos neurofibrilares, neurodegeneración y, finalmente, aparición de la demencia. Otros estudios señalan, sin embargo, que la responsable es la hiperfosforilación de tau^{4,5}.

*Existen dos tipos de EA, familiar y esporádica, siendo la primera menos común (1% del total), hereditaria y con una manifestación más temprana de los síntomas conductuales: pérdida de memoria, de reconocimiento facial, problemas de comunicación y deterioro cognitivo.

2.2 MAPT y proteína tau

2.2.1 MAPT: isoformas, expresión, mutaciones y ratio 3R/4R

MAPT (*Microtubule-associated protein tau*) es el **gen codificante de la proteína tau**, localizado en el cromosoma 17 (17q21.31) y formado por 16 exones (E0-E4, E4a y E5-E14), **cuyo *splicing* alternativo da lugar a diferentes isoformas**^{6,7} (Figura 1; Tabla 1). Presenta un promotor con alto contenido en G+C, carencia de cajas TATA y CAAT e inclusión de E0, varios inicios de transcripción y tres principales islas CpG. Estas islas CpG son importantes por haberse detectado **hipometilación** de las mismas en la EA y, por tanto, mayor expresión de *MAPT*: CpG₃₀₀ localizada en la región promotora, CpG₂₇ situada 13 kb por delante de E1 y CpG₂₁, inmediatamente anterior a E4a⁷.

Existe expresión de *MAPT* tanto en cerebro como en tejidos periféricos como la retina y el músculo esquelético⁷. En el primer caso, durante el desarrollo embrionario se observa una **elevada expresión de *MAPT* en diferentes áreas de la corteza cerebral y otras regiones del cerebro**, en que la única isoforma que se expresa es la fetal⁸, así como durante la etapa adulta de un individuo sano, en que la expresión de la isoforma fetal disminuye (especialmente en el cerebelo)⁵ y se incrementa la de las otras 5 isoformas principales presentes en cerebro adulto humano⁹ (Figura 1; Tabla 1). La excepción la constituye la materia blanca, donde sólo se expresan las isoformas fetal y D, pero también se encuentran las 6 isoformas proteicas, lo que sugiere un **transporte axonal** de las mismas¹⁰.

Por otra parte se han descrito más de 50 mutaciones de *MAPT* que dan lugar a un grupo de enfermedades conocidas como **tauropatías**, entre las que se encuentra la EA,

caracterizadas por la formación de **agregados de tau hiperfosforilada**. Concretamente, la mayoría de mutaciones se encuentran entre E9-E12¹¹ y pueden dividirse en **dos grupos: las que afectan al *splicing* alternativo y las que afectan a la propia proteína**¹. En el primer caso muchas alteran el mecanismo de *splicing* de E10, provocando un desequilibrio entre las isoformas 3R y 4R que causa neurodegeneración y demencia, mientras que en el segundo son, sobre todo, mutaciones con cambio de sentido que pueden afectar a la susceptibilidad de tau de ser fosforilada¹¹. Además, **en función del desequilibrio del ratio 3R/4R las tauopatías puede clasificarse como 3R, 4R o 3R+4R**⁵, donde la FTDP-17 (*frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17*), primera tauopatía en que se demostró que **mutaciones en *MAPT* son suficientes para que exista patología**, es 4R por el aumento de este grupo de isoformas¹², mientras que la EA es 3R+4R, por no existir variación del ratio 1:1^{13,14} entre ambos grupos de isoformas presentes en el cerebro adulto humano sano^{10,15}. Este hecho se ve abalado por la existencia de las 6 isoformas de tau en los NFTs de la EA^{11,16}.

En concreto, aunque **existen áreas del cerebro más afectadas por los NFTs** (como la corteza temporal y frontal) **y otras menos susceptibles o no afectadas** (como la corteza cerebelosa y materia blanca) ni el patrón de expresión de *MAPT* ni de las distintas isoformas se ven alterados en un paciente con EA en comparación con un individuo sano, lo que unido a una similar presencia de las isoformas proteicas sugiere que la mayor afeción de ciertas áreas del cerebro por la EA responde a otros patrones diferentes del ratio 3R/4R, cuya respuesta puede estar en el **estudio de la proteína tau**^{10,15}.

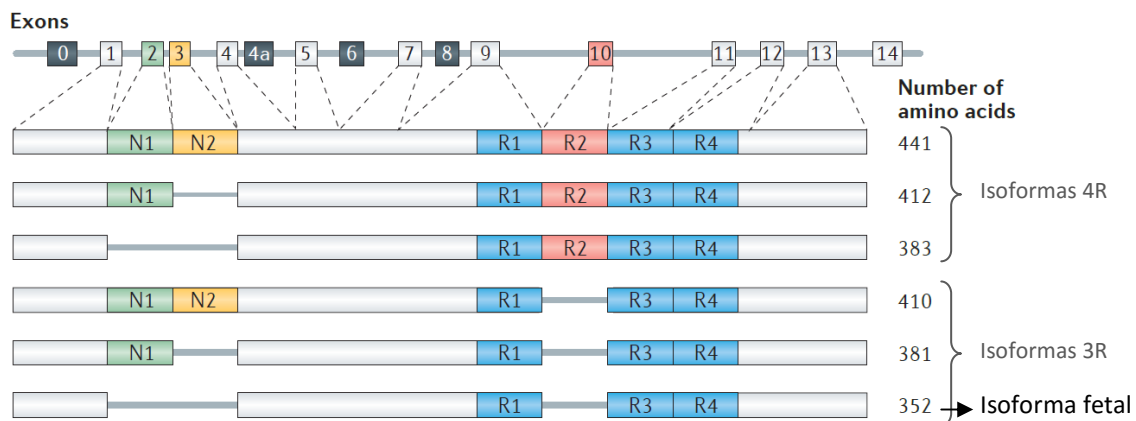


Figura 1⁵. *MAPT* y las 6 isoformas mayoritarias de la proteína tau sintetizadas en cerebro adulto humano por *splicing* alternativo. El gen *MAPT* contiene exones constantes (1, 4, 5, 7, 9, 11 y 13), alternativos (2, 3 y 10), no codificantes (0, parte del 1 y 14) y expresados en tejidos periféricos (4a, 6 y 8)⁷, estando restringida la expresión de E4a al sistema nervioso periférico^{17,18}. Los exones constantes, junto a los alternativos, constituyen las 6 isoformas de cerebro¹³, que difieren en el *splicing* de los alternativos: la ausencia o presencia de E10 divide a las isoformas en 3R y 4R, según tengan 3 o 4 motivos de repetición semi-homólogos de 31-32 aminoácidos (R1-R4), mientras que la ausencia de E2 y E3, sólo de E3 o presencia de ambos las divide en 0N, 1N y 2N, respectivamente, siendo la inserción de E3 dependiente de E2, carácter atípico del evento de *splicing*¹⁷. Se distinguen así la isoforma con 441 aminoácidos (2N4R), 412 (1N4R), 383 (0N4R), 410 (2N3R), 381 (1N3R) y 352 (0N3R). Además, en el cerebro adulto humano los niveles de 3R y 4R son aproximadamente iguales¹⁴, mientras que las isoformas 0N comprenden el 37% del total, las 1N el 54% del total y las 2N el 9%⁵. Por su parte, E0 forma parte del promotor, E1 de la secuencia 5'-UTR (*Untranslated region*) hasta el ATG iniciador de la traducción contenido en el mismo (Figura suplementaria 2) y E14 de la 3'-UTR.

Tabla 1. Consorcio de isoformas entre las bases de datos Ensembl³¹, NCBI^{32,33} y UniProt³⁴

Isoforma (UniProt)	Transcrito (Ensembl)	Nº residuos (UniProt)	Nº pares de bases (NCBI)	RefSeq (NCBI)	Exones ^{7, 5, 11}	Nomenclatura
PNS	201	758	6752	NM_016835 NP_058519	+E4a/+E6	-
E	202	412	5754	NM_001123067 NP_001116539	-E3	1N4R
G	203	776	6816	NM_001123066 NP_001116538	+E4a/+E6/+E8	-
F	204	441	5811	NM_005910 NP_005901	Todos	2N4R
C	205	410	5718	NM_001203252 NP_001190180	-E10	2N3R
Fetal	001	352	5544	NM_016841 NP_058525	-E2/-E3/-E10	0N3R
D	002	383	5637	NM_016834 NP_058518	-E2/-E3	0N4R
B	-	381	5631	NM_001203251 NP_001190181	-E3/-E10	1N3R
A	-	316	-	-	-	-

Enmarcadas las 6 principales isoformas presentes en cerebro adulto humano (fetal, B, C, D, E y F), siendo la isoforma F la canónica por presentar todos los exones posibles. La isoforma A sólo aparece mencionada en UniProt, base de datos en la que no existe reconocimiento proteico de la isoforma G, mientras que en NCBI sí se muestra evidencia de la presencia del transcrito y la proteína resultante (NM_001123066, NP_001116538). Todos los transcritos presentan un tamaño de más de 4 kb.

2.2.2 Proteína tau: estructura, función, fosforilación, agregación y propagación

La proteína tau se caracteriza por estar formada, sobre todo, por los aminoácidos G, K, P, S y T¹⁸, lo que justifica su **alta solubilidad y naturaleza desplegada** con algún elemento de estructura secundaria (hélices α , láminas β y hélices de poliprolina)^{5,11}. Estructuralmente, presenta un **dominio de proyección**, que incluye las secuencias codificadas por E2 y E3 y es capaz de unirse a estructuras de la membrana plasmática, un **dominio de unión a microtúbulos (MBD)**, que alberga a las 3-4 repeticiones semi-homólogas (Figura 1), un **dominio rico en prolinas**, que forma parte de los dos anteriores y puede asociarse con dominios SH3 de otras proteínas, y una **cola C-terminal**⁴. Por tanto, tau puede interactuar con diversas moléculas de señalización, elementos del citoesqueleto y lípidos, lo que sugiere que se trata de una proteína multifuncional¹⁹, aunque clásicamente se ha descrito como una proteína que promueve el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos¹. Esta función viene dada por su MBD, cuyos motivos **R1-R4 están cargados positivamente** y, por tanto, pueden interactuar con la tubulina cargada negativamente, lo que explica la mayor afinidad de las isoformas 4R con respecto a las 3R por los microtúbulos^{16,17} y es el motivo por el que **la regulación del *splicing* de E10 es importante en las patologías asociadas**, como la FTDP-17¹².

Sin embargo, en caso de existir un desequilibrio entre quinasas y fosfatasa presentes en cerebro puede producirse la fosforilación en las secuencias consenso KXGS presentes en

cada motivo semi-homólogo, **neutralizando así su carga positiva y disminuyendo la interacción de tau con los microtúbulos**^{18,19}. En este proceso parece clave la **fosfoproteína fosfatasa 2A (PP2A)**^{11, 4, 20, 21}, cuya menor actividad se ha sugerido que puede deberse a un descenso de ácido fólico o aumento de L-metionina en la dieta por derivar ambos en una **hiperhomocisteinemia, que puede inhibir a la metiltransferasa de la PP2A (PPMT)** necesaria para su activación^{22,23}. Una vez que se produce la separación de los microtúbulos puede que se induzca la agregación de tau por **modificaciones post-traduccionales agregantes** (como la propia fosforilación, truncamiento o la nitración)¹⁸, formando oligómeros y NFTs en última instancia. Precisamente, se piensa que **los oligómeros de tau son responsables de la toxicidad neuronal** observada en la EA²⁴ y de la propagación de la patología a diferentes áreas del cerebro, pudiendo transportarse entre neuronas por mecanismos en debate actualmente⁵.

2.3 Hipótesis: OXPPOS, pirimidinas y Alzheimer

La **hipótesis de la cascada mitocondrial** es una de las alternativas a la hipótesis de la cascada amiloide y de la hiperfosforilación de tau propuesta por las limitaciones de éstas y que relaciona al sistema OXPPOS con el riesgo de padecer EA³. Desde nuestro grupo se ha propuesto la relación entre la misma y la síntesis *de novo* de pirimidinas por la existencia de **actividad en neuronas de la enzima dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH)**, presente en las crestas mitocondriales junto al sistema OXPPOS y que transforma dihidroorotato en orotato y transfiere los electrones adquiridos a la coenzima Q₁₀²⁵. El proceso sería el que sigue: si el sistema OXPPOS fuese fallando a lo largo de la vida de un paciente se produciría una disminución de la actividad de la DHODH, de forma que se sintetizaría menos orotato y, en consecuencia, menos UDP y UDP-N-acetilglucosamina. Así, la enzima O-β-N-acetilglucosamina transferasa no podría O-β-N-acetilglucosaminar a la proteína tau, produciéndose un **desequilibrio entre dicha modificación anti-agregante**¹⁸ **y la fosforilación de tau**, derivando en la hiperfosforilación de la proteína y formación de los NFTs propios de la EA.

Para comprobar dicha hipótesis, **en el presente TFG se ha elaborado la validación previa de las líneas celulares hNSC, SH-SY5Y y SK-N-BE(2)-C**, escogidas como modelo de estudio de las bases moleculares de la proteína tau por su capacidad para diferenciarse a neuronas colinérgicas (las más afectadas en la EA)³ y la inexistencia de isoformas 3R en el cerebro adulto de los roedores²⁶, así como la falta de deterioro cognitivo en ratones knockout de E10²⁷.

3. OBJETIVOS

- I. **Analizar la expresión del gen *MAPT* y el ratio entre las isoformas 3R y 4R de la proteína tau** en las líneas de estudio hNSC, SH-SY5Y y SK-N-BE(2)-C.
- II. **Determinar las isoformas presentes** en las tres líneas de estudio.
- III. **Estudiar la presencia de variaciones genéticas de *MAPT*** en las tres líneas de estudio para comprobar su posible influencia sobre la expresión de las isoformas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Reactivos y kits comerciales

Todos los reactivos usados en el presente trabajo fueron de grado analítico o de grado apto para biología molecular y, en su caso, válidos para la transformación y crecimiento bacteriano (Tabla 2).

Tabla 2. Material básico del presente TFG

Reactivo/kit comercial	Utilidad	Casa/marca comercial
TRIzol® Reagent	Extracción de RNA total	Invitrogen™
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Síntesis de cDNA	Roche
Phusion Hot Start II DNA polymerase	Amplificación de isoformas	Thermo Scientific™
Low DNA Mass Ladder	Marcador de electroforesis	Life Technologies™
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit*	Clonaje de isoformas	Life Technologies™
MAX Efficiency® DH5α™	Selección de isoformas	Invitrogen™
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Purificación de DNA plasmídico	Sigma-Aldrich

*Contiene el vector de almacenamiento pCR™-Blunt II-TOPO® (Figura suplementaria 1).

4.2 Extracción de RNA total

4.2.1 Líneas celulares

Las tres líneas celulares, escogidas por su capacidad para diferenciarse a neuronas colinérgicas (y, por tanto, útiles para el estudio de la enfermedad de Alzheimer en caso de validarlas para estudios posteriores) que se utilizaron fueron:

- **hNSC:** células madre neuronales euploides, derivadas de la línea H9 (WA09) de células madre embrionarias humanas, capaces de diferenciarse a neuronas, oligodendrocitos y astrocitos y obtenidas de la marca comercial Life Technologies™. Pase 17 (24/09/15).
- **SH-SY5Y:** células aneuploides derivadas de neuroblastoma (ATCC® CRL-2266™), obtenidas en Sigma-Aldrich a partir de tres subclones de la línea metastásica SK-N-SH, establecida a su vez a partir de una biopsia de médula ósea de una niña de 4 años. Pase 31 (01/10/15).
- **SK-N-BE(2)-C:** línea aneuploide, subclon de la línea neuroblástica SK-N-BE(2) (ATCC® CRL-2271™), establecida a partir de células metastásicas de cerebro de un niño de 2 años y cedida por Anne Chomyn del Laboratorio de Giuseppe Attardi, California Institute of Technology, Division of Biology, Caltech. Sin pase (29/09/15).

4.2.2 Extracción de RNA con TRIzol®

En primer lugar se extrajo el RNA total de tres pellets secos en condiciones de esterilidad y mediante el reactivo TRIzol®, solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidinio que mantiene la integridad del RNA y permite purificarlo del resto de componentes celulares (a los que rompe y disuelve). Para ello se añadieron y mezclaron **500 µl de TRIzol®** a cada uno de los tres pellets de partida (con $5-10 \times 10^6$ células), se dejaron reaccionar 5 minutos a temperatura ambiente y se añadieron **100 µl de cloroformo** para generar una bifase de extracción, con posterior agitación vigorosa, incubación 3 minutos a temperatura ambiente y centrifugación 15 minutos a 12.000 rcf a 4°C. Obtenida la bifase se recogió todo el volumen disponible de la fase acuosa y se precipitó el RNA total añadiendo **250 µl de isopropanol frío**.

A continuación se incubaron las muestras 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron 10 minutos a 12.000 rcf a 4°C y se eliminó sin apurar el sobrenadante para realizar un lavado con **500 µl de etanol al 75%**. Tras un pequeño vórtex y centrifugación 5 minutos a 7.500 rcf a 4°C se descartó todo el volumen posible del sobrenadante y los pellet de RNA obtenidos se dejaron secar al aire y temperatura ambiente (protegidos). Una vez secos se añadieron distintos volúmenes de H₂O miliQ a cada muestra en función de la cantidad de pellet obtenida con objeto de alcanzar una concentración similar de RNA total extraído en todas ellas. Finalmente, se incubaron los tres pellets en un thermoblock a 50°C con agitación durante 5 minutos para favorecer la correcta resuspensión del RNA.

4.2.3 Cuantificación de la cantidad de RNA por espectrofotometría

Para determinar la concentración y pureza del RNA total aislado se empleó un espectrofotómetro NanoVue™, depositando **2 µl en el pedestal del equipo** para cada medida y teniendo presentes los criterios de pureza basados en relaciones de absorbancia a distintas longitudes de onda, es decir, A_{280}/A_{260} (valor en torno a 1,8 y 2 es indicativo de muestra pura para DNA y RNA, respectivamente) y A_{260}/A_{230} (debe ser en torno a 2,2). Realizadas las medidas se almacenaron las muestras a -80°C.

4.3 Retrotranscripción del mRNA por RT-PCR

La retrotranscripción de los mRNAs maduros (y, por tanto, con cola de poliA en su extremo 3') del RNA total extraído a cDNA monocatenario se realizó por RT-PCR utilizando como *primer* un oligo(dT)₁₈. Para ello se preparó una mezcla inicial de reactivos con las tres muestras de RNA total, el oligo(dT)₁₈ y H₂O miliQ (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Reactivos para síntesis de cDNA monocatenario (I)

Reactivo	Cantidad (µg/µl)
RNA total	1 µg
Oligo(dT) ₁₈	1 µl
H ₂ O miliQ	Hasta 13 µl

Posteriormente, las tres muestras se desnaturalizaron 10 minutos a 65°C en termociclador para eliminar las posibles estructuras secundarias presentes en los mRNAs que

podieran afectar a la retrotranscripción. Después se añadieron los segundos reactivos necesarios hasta un **volumen final de 20 µl para cada tubo** (Tabla 3.2) y se incubaron en termociclador las tres preparaciones: primero a 50°C durante 60 minutos (tiempo escogido por tener todos los transcritos un tamaño superior a 4 kb (Tabla 1)), a continuación 5 minutos a 85°C para inactivar a la retrotranscriptasa y por último a 4°C de forma indefinida.

Tabla 3.2. Reactivos para síntesis de cDNA monocatenario

Reactivo	Concentración I	Volumen (µl)	Concentración II
Tampón	x5	4	x1
Inhibidor de RNasas	-	0,5	-
dNTPs	10 mM	2	1 mM
Retrotranscriptasa	-	0,5	-
Volumen final	-	20	-

Concentración I = Concentración del *stock*. Concentración II = Concentración final.

4.4 Análisis de expresión por qPCR

La expresión de las isoformas de interés, así como el ratio de expresión 3R/4R de las isoformas en las tres líneas utilizadas habían sido comprobadas previamente por el **grupo de investigación Biogénesis y patología mitocondrial**, pero se decidió repetir la experiencia para incrementar la validez estadística de los resultados.

En primer lugar se prepararon las mezclas de los reactivos necesarios (Tabla 4), teniendo en cuenta que el **volumen final para cada capilar (por muestra) debía ser de 10 µl** (9 µl de la mezcla de reactivos generada y 1 µl de cada muestra de cDNA monocatenario, sacadas del congelador a -80°C y depositadas en hielo durante el experimento). Para ello se trabajó en asepsia, así como en baja luz para evitar dañar la naturaleza fluorescente del SYBR Green.

Tabla 4. Reactivos para la realización de la qPCR

Reactivo	Volumen (µl)
SYBR Green*	2
Primers (Tabla 5)	0,5
H ₂ O miliQ	6,5
Volumen final	9

*Contiene el resto de componentes necesarios para el correcto funcionamiento de la qPCR (DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y tampón) y el propio SYBR Green, marcador fluorescente afín al dsDNA y, por tanto, útil para determinar por análisis de fluorimetría la cantidad de una determinada secuencia de DNA (en caso de estar presente).

Tabla 5. Primers para amplificar los conjuntos de isoformas 3R y 4R¹⁵

	Primer directo	Primer reverso	Tm (°C)
Isoformas 4R	GAAGCTGGATCTTAGCAACG	GACGTGTTTGATATTATCCT	58
Isoformas 3R	AGGCGGGAAGGTGCAAATAG	TCCTGGTTTATGATGGATGTT	58

En total se prepararon **30 muestras**, 10 por cada pareja de *primers*: muestras de cDNA procedentes de las tres líneas celulares por 3 veces cada muestra (triplicado técnico) por 3 parejas de *primers* (los de las isoformas 3R, las isoformas 4R (Tabla 5) y el gen de la β -actina, *housekeeping* empleado como control interno para validar la técnica, poder comparar la expresión de los grupos de isoformas entre las distintas líneas y cuantificar los niveles de mRNA de interés presentes) más 3 muestras de control negativo para validar cada una de las parejas de *primers* utilizadas. Una vez preparadas se llevaron las muestras a un **termociclador con espectrofluorímetro** y se amplificaron siguiendo un programa estándar de qPCR: desnaturalización a 95°C (6 minutos), seguida de 50 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C y 30 segundos, hibridación a 58°C y 30 segundos y extensión a 72°C y 45 segundos) y una incubación final a 95°C (1 minuto).

Finalmente, los resultados se analizaron junto con los obtenidos previamente por el grupo de investigación, detectándose expresión en las tres líneas de estudio (5.1 Cuantificación de los grupos de isoformas 3R y 4R de *MAPT* en las líneas celulares de estudio).

4.5 Amplificación de las isoformas de interés por PCR

Validado el uso de las líneas escogidas el cDNA monocatenario obtenido de todas ellas se transformó en cDNA bicatenario mediante amplificación por PCR con la PHS II polimerasa, DNA polimerasa (variante de la Pfu polimerasa) escogida por dejar los **amplificados con extremos romos**, pudiendo así introducirlos en el vector escogido (4.7 Clonaje de los productos de PCR), y por ser de **alta fidelidad**. De esta manera en caso de detectar variaciones en las secuencias analizadas en principio éstas se deberían a polimorfismos o mutaciones del propio genoma de las líneas celulares y no a un error introducido por la polimerasa durante la amplificación.

Para realizar la PCR (Tabla 7) se prepararon las mezclas de reacción adecuadas, donde los *primers* (Tabla 8), la cantidad de cDNA monocatenario usado como molde (Figura 3D) y, por tanto, la cantidad de H₂O miliQ (hasta un volumen final de 20 μ l) fueron diferentes según el ensayo, siendo las habituales las presentes en la Tabla 6. Una vez preparadas se llevaron a un termociclador y los productos de PCR generados se guardaron a 4°C hasta su uso posterior.

Tabla 6. Reactivos para amplificar los cDNA de las isoformas de tau en cerebro adulto humano

Reactivo	Concentración I	Volumen (μ l)	Concentración II
Tampón HF*	x5	4	x1
dNTPs	10 mM	0,4	200 μ M
PHS II polimerasa	2 U/ μ l	0,2	0,02 U/ μ l
TAU F/TAU 1bF**	10 μ M	1	0,5 μ M
TAU R/TAU 4R**	10 μ M	1	0,5 μ M
cDNA molde	-	1	-
H ₂ O miliQ	-	12,4	-
Volumen final		20	

*Contiene MgCl₂.

**Dilución previa 1/25 con H₂O miliQ de todos ellos por estar a una concentración inicial de 250 μ M.

Tabla 7. Programa de PCR con Phusion Hot Start II DNA polimerasa (PCR PHS II)

Etapa	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1. Desnaturalización inicial	30	98
2. Desnaturalización	10	98
3. Hibridación	20	T _m *
4. Extensión	30/kb**	72
5. Final de la extensión	300	72
	∞	4



*Temperatura de fusión variable según la pareja de *primers* usada para la puesta a punto del protocolo (5.2 Amplificación de las isoformas de la proteína tau y selección de las colonias transformadas).

**Extensión de 80 segundos para garantizar la amplificación de todos los cDNA de interés (Anexos).

Tabla 8. *Primers* para amplificar los cDNA de las 6 isoformas de tau en cerebro adulto humano

	<i>Primer</i>	Secuencia 5'→3'	T _m (°C)	T _{mR} * (°C)
Primer y segundo ensayo	TAU F	GAACCAGGATGGCTGAGCC	67,5	66,6
	TAU R	AGGGGCCTGATCACAACC	66,6	
Tercer ensayo	TAU 1bF	CTCTGTCGACTATCAGGTGA	58,5	58,5
	TAU 4R	CTCTCATTCTCTCTCCACA	63,0	

*Temperaturas de fusión obtenidas mediante T_m Calculator de Thermo Fisher Scientific (Phusion DNA polimerasa);

<https://www.thermofisher.com/es/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>

4.5.1 Selección de los *primers* utilizados

Con el fin de conseguir amplificar todos los transcritos posibles generados a partir de *MAPT* en cada línea celular es necesario el uso de *primers* que hibriden con secuencias comunes a todas las isoformas. Para ello, primero se llevó a cabo un **análisis por alineamiento** con la información presente en la base de datos Ensembl y, posteriormente, en NCBI.

De las presentes en el laboratorio del grupo de investigación la pareja de *primers* **TAU 1bF y TAU 4R** era inicialmente las de mayor interés por hibridar con las regiones 5'-UTR y 3'-UTR del transcrito 203 (Tabla 1), respectivamente, y, por tanto, abarcar toda la secuencia codificante o CDS del gen. Sin embargo, al alinear todas las secuencias de interés en **Ensembl** se observó que por tres pares de bases (CTC) el *primer* **TAU 1bF no hibrida por completo con el 5'-UTR de la isoforma D**, mientras que el *primer* **TAU 4R no hibrida con el 3'-UTR de la isoforma fetal** (Figura suplementaria 2). Así, en caso de presentarse las isoformas fetal y D éstas no podrían amplificarse con los *primers* TAU 1bF y TAU 4R, razón por la que se descartaron y se utilizaron los *primers* TAU F y TAU R. El inconveniente es que al ser *primers* más internos se unen a regiones internas de la CDS (Figura suplementaria 2), por lo que con estos *primers* no puede conocerse si existe o no variación en la secuencia génica original en las regiones de hibridación, inconveniente no presentado por los *primers* TAU 1bF y TAU 4R.

Dados los resultados obtenidos en el primer y segundo ensayo (Tabla 14) se realizó un nuevo **alineamiento en NCBI** para contrastar los resultados presentes en Ensembl. Se obtuvo que tanto el 5'-UTR como el 3'-UTR de las isoformas fetal y D eran reconocidas por los *primers* TAU 1bF y TAU 4R (Figura suplementaria 3), motivo por el que se decidieron utilizar en un tercer ensayo y así, además, **comprobar experimentalmente qué información presente en las dos bases de datos era la incorrecta.**

4.6 Electroforesis horizontal en gel de agarosa

Los resultados de la amplificación de los cDNA de interés se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Todos los geles del presente TFG se prepararon con una **porosidad del 1% (p/v)**, disolviendo **0,5 g de agarosa en 50 ml del tampón electroforético TAE** (Tris 40 mM, pH 8, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM), solución a la que, tras hervir para disolver la agarosa y dejar enfriar brevemente, se añadían **2,5 µl de bromuro de etidio** (agente que se intercala en el DNA y permite visualizarlo al irradiar con luz UV), consiguiendo una concentración final de 0,5 µg/ml del mismo.

A continuación, la solución se vertía sobre un soporte electroforético, cerrado con cinta de carrocero y con los peines necesarios para formar los pocillos de carga, y se dejaba enfriar para la polimerización de la agarosa. Después la cinta y los peines eran retirados, se introducía el soporte con el gel en una cubeta de electroforesis (sumergiéndolo con TAE) y se cargaban las muestras en los pocillos, **mezclando 4-5 µl de los productos de PCR con 2 µl de tampón de carga** (Ficoll al 30% que incrementa la densidad de las muestras para que se depositen en el fondo de los pocillos y azul de bromofenol al 0,1 % -p/v- en TAE que se desplaza con el frente de migración y, por tanto, permite controlar el transcurso de la electroforesis) y utilizando el marcador de bajo Mr Low DNA Mass Ladder.

Finalmente, se realizaba la separación electroforética de las muestras cargadas aplicando un **voltaje de 80–100 V unos 30 minutos.**

4.7 Clonaje de los productos de PCR

Para separar entre sí las diferentes isoformas amplificadas se realizó un clonaje de los productos de PCR en el vector pCR™-Blunt II-TOPO® con posterior transformación bacteriana.

Se escogió este vector por ser de **almacenamiento** y abierto gracias a tener unido en sus **extremos romos** a dos topoisomerasas I de *Vaccinia* virus, que se separan del mismo al clonarse un determinado inserto. Por tanto, este sistema cuenta con la ventaja de no requerir ninguna enzima de restricción ni ligasa (Tabla 9) para introducir los productos amplificados y de no necesitar de ningún reactivo adicional para seleccionar aquellas colonias transformadas correctamente, ya que en caso de introducirse el vector sin inserto éste no sería circular y sería degradado por nucleasas bacterianas, mientras que en caso de cerrarse sin un inserto el vector cuenta con el **gen *ccdB***, letal en *E. coli* (Anexos), que causaría la muerte de la bacteria en cuestión. Por tanto, únicamente aquellas bacterias que hayan incorporado el vector con un producto de PCR clonado (que interrumpe la expresión del gen fusionado *lacZα-ccdB*) serán las que sobrevivan a la selección positiva dada por la **resistencia a kanamicina.**

Tabla 9. Reactivos para el clonaje de los productos de PCR (Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit)

Reactivo	Volumen (µl)
Producto de PCR	3-4*
Solución de sal	1
H ₂ O miliQ	0-1
pCR™-Blunt II-TOPO®	1
Volumen final	6

*La cantidad añadida de producto de PCR a la reacción de clonaje depende de la intensidad observada de las bandas electroforéticas, es decir, de la cantidad de producto amplificado. Por su parte, la solución de sal impide que una vez clonado el inserto las topoisomerasas pudieran revertir la reacción de integración, manteniéndose así el DNA introducido.

4.8 Transformación bacteriana

4.8.1 Preparación de medios de cultivo

A la hora de trabajar con bacterias los medios que se necesitaron en el presente TFG fueron LB, SOC y placas de kanamicina en medio LB para la transformación. El primero se preparó disolviendo **5 g de peptona**, **2,5 g de extracto de levadura** y **2,5 g de NaCl** en **500 ml de H₂O miliQ**, con posterior esterilización en autoclave; el segundo es un medio más rico que el LB, utilizado para estimular el crecimiento bacteriano y comercializado en alícuotas por Invitrogen™ con las MAX Efficiency®DH5α™; las placas de kanamicina se prepararon con los mismos componentes que el medio LB más **7,5 g de agar** y **500 µl de kanamicina (50 mg/ml)**, añadida después de un autoclavado previo del resto de elementos. Tras obtener la solución con todos los componentes se añadieron unos **25 ml** de la misma en distintas placas de Petri, dejándolas solidificar, incubándolas a 37°C toda la noche y, finalmente, almacenándolas a 4°C selladas con parafilm para evitar contaminaciones hasta su uso posterior.

4.8.2 Internalización del DNA plasmídico en bacterias competentes

Tras realizar la mezcla de clonaje, dar un pequeño pulso y dejar incubar 30 minutos a temperatura ambiente se realizó la transformación bacteriana. Para ello, se utilizaron **células competentes de la cepa E. coli DH5α** (MAX Efficiency®DH5α™) y se trabajó en condiciones de esterilidad. En primer lugar, se descongelaron en hielo tres alícuotas de **25 µl de las bacterias competentes** (almacenadas a -80°C) a las que se añadieron **2 µl de cada una de las mezclas de clonaje**. A continuación se incubaron en baño de hielo y cámara fría 30 minutos, tiempo tras el que se realizó un choque término para la transformación bacteriana poniendo las muestras en un thermoblock 45 segundos a 42°C (sin agitación). Después se transfirieron rápidamente los viales a un baño de hielo en el que se incubaron 2 minutos para, posteriormente, añadirle a cada uno de los tres viales **250 µl de medio SOC**. Seguidamente se incubaron las muestras 60 minutos a 37°C con 250 rpm de agitación, a fin de favorecer el cierre de las membranas tras el choque térmico y la oxigenación apropiada para el crecimiento celular. Finalmente, las bacterias transformadas se sembraron en tres placas de kanamicina con ayuda de un asa de vidrio (esterilizada con etanol al 70%) y se dejaron crecer en una estufa toda la noche a 37°C.

4.9 Selección de colonias por PCR de colonia

Para analizar la presencia de insertos de interés en los DNA plasmídicos se escogieron al azar **10 colonias bacterianas de cada placa**, se realizó un cultivo líquido de las mismas y, posteriormente, una división de cada uno de ellos en dos alícuotas: una para la realización de una PCR de colonia, en la que no se parte de DNA puro, sino de todo el material bacteriano presente en el sobrenadante recogido y utilizado como molde (Tabla 10), llevando así a amplificadores inespecíficos (Figuras 4A-G); otra para la propagación del DNA plasmídico de aquellas muestras positivas para la PCR de colonia y su posterior secuenciación.

Para ello, se recogieron las colonias seleccionadas de cada placa con un palillo estéril y se inocularon en **50 µl de medio LB** (dispuestos previamente en distintos eppendorf de 1,5 ml), generando así el cultivo líquido. A continuación se estimuló el crecimiento bacteriano disponiendo las muestras en un thermoblock a 37°C durante 30 minutos con agitación, tiempo tras el que **25 µl** de cada una de ellas se transfirieron a nuevos eppendorf y se guardaron a 4°C. Con los 25 µl restantes se realizó la PCR de colonia (Tablas 10 y 11), previa ruptura de las células por incubación en thermoblock 5 minutos a 98°C y posterior centrifugación a velocidad máxima otros 5 minutos para separar el DNA plasmídico (entre otras moléculas) del resto de componentes celulares. Por último, se realizó una electroforesis (4.6 Electroforesis horizontal en gel de agarosa) y se identificaron las colonias positivas para las isoformas de interés.


Tabla 10. Reactivos para amplificar los insertos introducidos en los vectores por PCR de colonia

Reactivo	Concentración I (dU)	Volumen (µl)	Concentración II (dU)
Tampón*	x10	4	x1
dNTPs	10 mM	0,50	200 µM
Taq polimerasa	5 U/µl	0,15	0,04 U/µl
TAU F/TAU 1bF	10 µM	0,75	0,3 µM
TAU R/TAU 4R	10 µM	0,75	0,3 µM
DNA molde	-	2	-
H ₂ O miliQ	-	18	-
Volumen final		25	

*Contiene MgCl₂.

Tabla 11. Programa de PCR de colonia (convencional)

Etapa	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1. Desnaturalización inicial	120	95
2. Desnaturalización	20	95
3. Hibridación	20	56
4. Extensión	60/kb*	72
5. Final de la extensión	300	72
	∞	4

 **30 ciclos**

*Extensión de 90 segundos dado que las isoformas detectadas mediante electroforesis de colonia presentaban un tamaño en torno a 1200 pb (Figura 3A).

4.10 Aislamiento de DNA plasmídico

Los 25 μl restantes de cada uno de los cultivos preparados previamente (4.9 Selección de colonias por PCR de colonia) y positivos para la PCR de colonia se llevaron a crecimiento para aumentar el número de copias de DNA plasmídico presente en cada una de las muestras. Para ello, cada uno de los 25 μl se dispusieron en tubos Falcon de 50 ml a los que previamente se les había añadido **45 ml de medio LB con 45 μl de kanamicina (50 mg/ml)**, introducida con objeto de mantener la necesidad del vector por parte de las *E. coli* DH5 α y así evitar la pérdida del mismo. Una vez preparadas todas las suspensiones celulares se dejaron crecer toda la noche a 37°C y 250 rpm de agitación y al día siguiente se extrajo el DNA plasmídico de las mismas, siguiendo el protocolo de extracción de Sigma-Aldrich y mediante el kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit de la misma compañía. Finalmente, las moléculas extraídas se disolvieron en **60 μl de H₂O miliQ** y se cuantificaron por espectrofotometría mediante el espectofotómetro NanoVue™ (4.2.3 Cuantificación de la cantidad de RNA por espectrofotometría).

4.11 Secuenciación de las isoformas presentes

La secuenciación de los insertos clonados en el vector pCR™-Blunt II-TOPO® se realizó en el Servicio de Secuenciación de DNA de la empresa Secugen S.L. Para ello se prepararon **muestras de un volumen de 15 μl y concentración de 100 ng/ μl de las muestras de DNA plasmídico extraído** y se enviaron a secuenciar, aprovechando los sitios de reconocimiento de los *primers* F17 y R19 del fago M13 presentes en el vector. El uso de dos *primers* (directo e inverso) es necesario para obtener las secuencias completas por tener todos los cDNA detectados en torno a 1200 pb (Figura 3A) y ser la secuenciación por cada *primer* efectiva sólo en torno a 600 pb.

Finalmente, los resultados de secuenciación se analizaron con el software de alineamiento de secuencias **Codon code Aligner v3.7.1.** (tomando como base el transcrito 204. Tabla 1), estableciendo así las isoformas existentes y la presencia o ausencia de variaciones genéticas en las líneas estudiadas.

5. RESULTADOS

5.1 Cuantificación de los grupos de isoformas 3R y 4R de *MAPT* en las líneas celulares de estudio

A fin de cumplir los objetivos planteados en el presente trabajo en primer lugar se comprobó que en los modelos celulares de estudio, es decir, las líneas SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y y hNSC existe expresión del gen *MAPT* y se midió la **cuantificación relativa entre los grupos de isoformas de la proteína tau presentes en cerebro adulto humano (3R y 4R)** para verificar el ratio 1:1 de los mismos¹⁴. Para ello se realizó un ensayo por qPCR, incluyendo muestras de las tres líneas de estudio por triplicado técnico, *primers* para los grupos de isoformas 3R y 4R (Tabla 5) y para la β -actina (control interno) y tres controles negativos.

En particular, de todas ellas se analizó el Ct (ciclo en que, en escala logarítmica, el producto amplificado supera un determinado umbral) para establecer los diferentes niveles de expresión, teniendo presente que a **menor Ct** mayor amplificación del cDNA de partida, es decir, mayor cantidad de mRNA extraído y, por tanto, **mayor expresión de *MAPT*** y mayor activación de los mecanismos de *splicing* alternativo por los que se sintetizan las isoformas. En concreto, el mRNA obtenido se cuantificó con el **método de aproximación $2^{-\Delta\Delta Ct}$** (Tabla 12), que presupone una eficiencia del 100% de los *primers* utilizados (sinónimo de duplicación completa de la cantidad de DNA presente en cada ciclo) y se basa en realizar la diferencia entre el Ct obtenido para cada muestra ensayada y el Ct alcanzado por el control interno para la misma.

Tabla 12. Cuantificación del mRNA de los grupos de isoformas 3R y 4R en cada línea celular

	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (3R)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (4R)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (3R)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (3R)
SK-N-BE(2)-C	0,012488	0,002775	0,007625	0,001025
SH-SY5Y	0,001376	0,000215	0,002167	0,000194
hNSC	0,000034	0,000014	0,000049	0,000007

Los datos enmarcados son los obtenidos en el presente TFG (izda.). Los datos no marcados son los obtenidos previamente por el grupo de investigación Biogénesis y patología mitocondrial (dcha.).

Posteriormente se obtuvo la relación entre los valores obtenidos para el conjunto de isoformas 3R y 4R de cada línea celular (Figura 2).

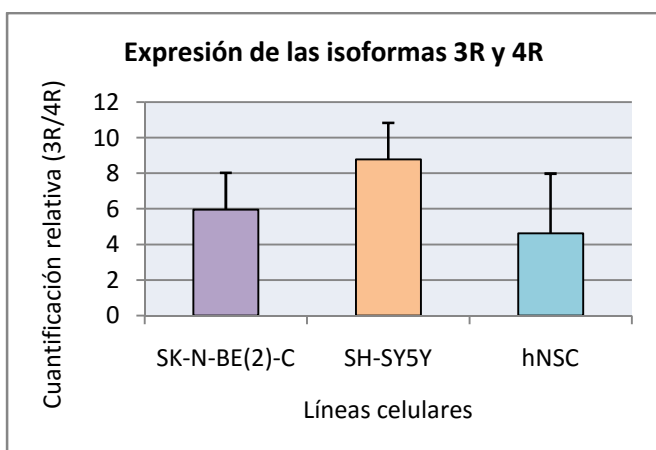


Fig. 2. Cuantificación relativa del ratio de expresión de los grupos de isoformas 3R y 4R en las líneas SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y y hNSC. Los datos ofrecidos proceden de triplicados técnicos para ambos grupos de isoformas en cada uno de los modelos de estudio y de un duplicado biológico. Valores obtenidos por relación de la cuantificación del mRNA entre los grupos de isoformas (Tabla 12).

A la vista de los resultados obtenidos puede establecerse que **las tres líneas presentan expresión del gen *MAPT*** y que dicha expresión es mayor en las SK-N-BE(2)-C y menor en las hNSC puesto que en todas se partió de la misma cantidad de mRNA (Tabla 12). Así mismo, se puede observar que las **isoformas 3R son más abundantes que las 4R en todas las líneas celulares** y que la mayor diferencia entre ambos grupos se presenta en la línea SH-SY5Y, después en la SK-N-BE(2)-C y, por último, en la hNSC.

Por otro lado, aunque los resultados obtenidos son satisfactorios **se detectó una alta desviación estándar en las tres líneas celulares (2,07763 para la SK-N-BE(2)-C, 3,36356 para la SH-SY5Y y 3,19185 para la hNSC)**. Esto puede deberse precisamente a que los datos proceden de un duplicado biológico y a que en nuestras manos la eficiencia de los *primers* de las isoformas 3R es del 83% en lugar del 100%, lo que afecta directamente a la validez del método de aproximación $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Además, en los controles negativos de los *primers* de la β -actina no se detectó amplificación, pero en los de los *primers* de las isoformas 3R y 4R se registraron amplificaciones a **Ct no demasiado elevados (33,08 para los de las isoformas 3R y 34,06 para los de las 4R)**, lo que sugiere la existencia de artefactos por hibridación de los *primers* de cada pareja entre sí.

En definitiva, el análisis por qPCR indica que en los tres modelos celulares existe expresión del gen *MAPT* y una mayor presencia de las isoformas 3R con respecto a las 4R.

5.2 Amplificación de las isoformas de la proteína tau y selección de las colonias transformadas

Establecida la presencia de los dos grupos de isoformas de la proteína tau el siguiente paso fue determinar qué isoformas de las 6 existentes en cerebro adulto humano (Figura 1; Tabla 1) se encuentran en los tres modelos de estudio. Para ello fue necesaria la **separación de los transcritos formados a partir de *MAPT* en diferentes unidades formadoras de colonias**. Primero se extrajo el RNA total de tres pellets de las líneas S-K-N-BE(2)-C, SH-SY5Y y hNSC, después se obtuvo el cDNA de los mismos por retrotranscripción y, posteriormente, dicho cDNA se amplificó por PCR con una polimerasa de alta eficiencia (PHS II polimerasa). A continuación se clonaron los productos amplificados en un vector de almacenamiento (pCR™-Blunt II-TOPO®) y se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α , de forma que por probabilidad cada unidad formadora de colonia sólo internalizó un vector, teniendo cada vector un sólo inserto y siendo así en principio cada colonia crecida representativa de una isoforma concreta, con verificación posterior mediante PCR de colonia.

En particular, tras obtener el cDNA por retrotranscripción se realizó una PCR con los *primers* TAU 4R y TAU 4F (Tabla 8) a distintas temperaturas de hibridación (Figuras 3A y 3B) y entre los amplificados obtenidos en las tres líneas se observó una en torno a 1200 pb que, teniendo en cuenta el reducido tamaño y la porosidad del gel (1% (p/v)), se esperaba que incluyese a los cDNAs de las 6 isoformas de interés (Anexos). Se obtuvo una mayor especificidad a una **Tm de hibridación de 66°C** (Figura 3A), próxima a la recomendada (Tabla 8), razón por la que se escogieron los productos de esta primera PCR a fin de minimizar el posterior clonaje de productos de no interés. Después se realizó una PCR de colonia de 10 colonias elegidas al azar de cada una de las tres placas de las *E. coli* DH5 α transformadas

(Figuras 4A-C) para seleccionar las **colonias positivas**, es decir, las que contuviesen un inserto en torno a 1200 pb (más algunas excepciones - colonia 4, figura 4A; colonia 5, figura 4B; colonias 2 y 9, figura 4C - con una banda de interés muy tenue).

Dados los resultados obtenidos tras secuenciar (Tabla 14) volvió a realizarse el ensayo por completo con los mismos *primers* a fin de **incrementar el número de colonias estudiadas y así la probabilidad de encontrar nuevas isoformas**. Primero se volvieron a realizar dos PCRs con las mejores temperaturas de hibridación del primer ensayo (Figura 3C), siendo en este caso los productos de PCR algo menos inespecíficos con la hibridación a 65°C, motivo por el fueron los clonados. Además, en este segundo ensayo se optó por no clonar el material amplificado de las hNSC, sobre todo por los resultados negativos obtenidos previamente con un amplificado de similar intensidad (Figura 3A). Después se realizó la PCR de colonia de otras 10 colonias seleccionadas al azar de cada una de las dos placas de *E. coli* DH5α generadas y se establecieron las colonias positivas siguiendo los mismos criterios que en el primer ensayo (figuras 4D y 4E).

Al no conseguirse detectar nuevas isoformas (Tabla 14) se realizó un **tercer ensayo con los primers TAU 1bF y TAU 4R**, estableciendo una nueva puesta a punto del protocolo: se probaron diferentes T_m a partir de la recomendada (Tabla 8) y se partió de una mayor cantidad de RNA total para las hNSC (2 µl en lugar de 1 µl), así como de una mayor cantidad de cDNA en algunas de las mezclas de PCR (2 µl en lugar de 1 µl), en un intento de conseguir una mayor cantidad de amplificado y, por tanto, de los transcritos de interés. Con esta nueva pareja de *primers* se obtuvieron resultados **más específicos que en los dos primeros ensayos, pero con amplificados de menor intensidad** (Figura 3D). Por su parte, tras visualizar los resultados de las PCRs de colonia (Figuras 4F y 4G) se enviaron a secuenciar todas las colonias, incluida la 9, ya que en esta muestra probablemente no se obtuviese ningún amplificado por fallo a la hora de preparar la PCR de colonia. No se realizó PCR de colonia de las hNSC por ausencia de crecimiento bacteriano (Tabla 13).

Cabe destacar que la obtención de amplificados inespecíficos en las PCR de colonia (Figuras 4A-E) no constituye un resultado inesperado, sino al contrario, ya que se trata de **un ensayo cuyo fin es realizar un primer cribado**. A esta inespecificidad contribuye que el DNA molde de la misma se trate de un producto no purificado en el que se encuentra el inserto de interés entre otras moléculas, así como la aplicación de una temperatura de hibridación (Tabla 11) muy diferente a la recomendada (Tabla 8). Esto último permite explicar la **diferencia entre las PCR de colonia con los primers TAU F-TAU R (Figuras 4A-E) y TAU 1bF-TAU 4R (Figuras 4F e 4G)**, dado que la temperatura de fusión recomendada de estos últimos (Tabla 8) es más próxima a la T_m aplicada que la de los *primers* TAU 4F y TAU 4R, obteniéndose así productos mucho más específicos (Figuras 4F y 4G).

En resumen, las amplificaciones realizadas revelan que en las tres líneas celulares existe amplificado de interés representativo de todas las isoformas, que pueden existir colonias bacterianas con cDNA de las isoformas de las tres líneas y que se obtienen amplificados más específicos con los *primers* TAU 1bF y TAU 4R.

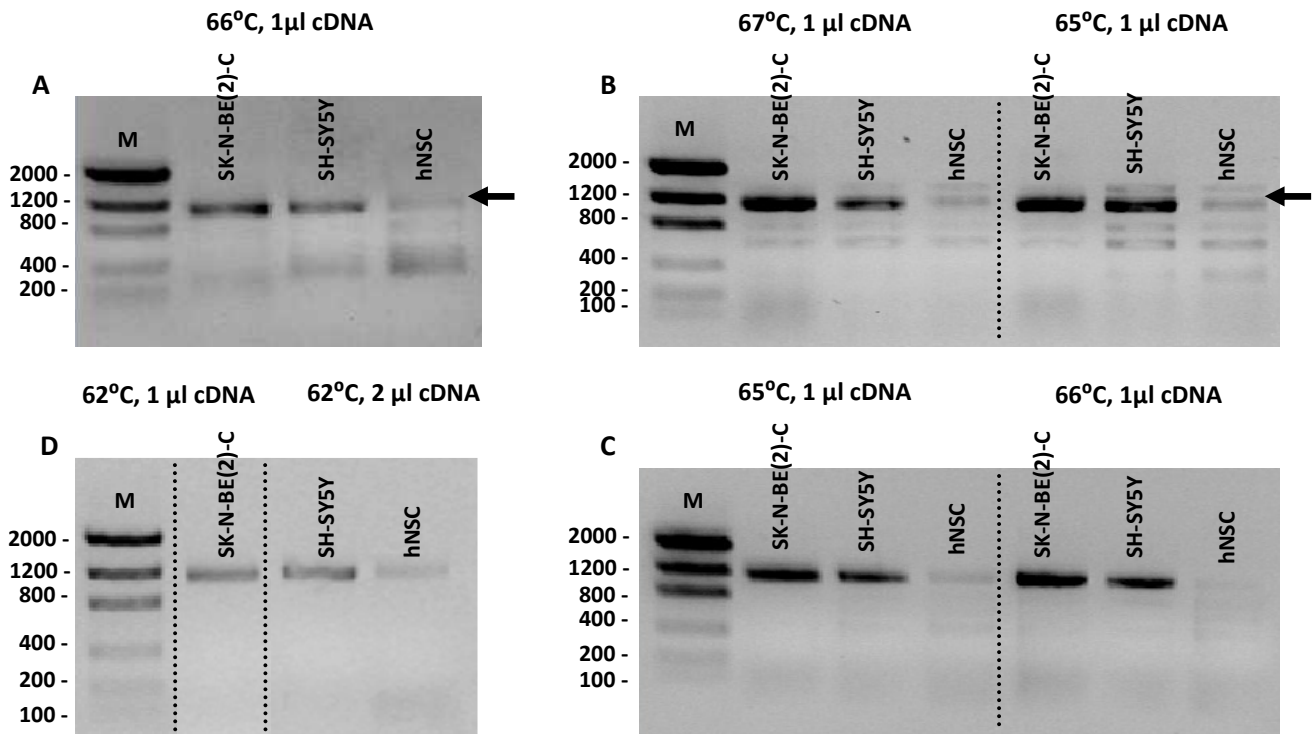
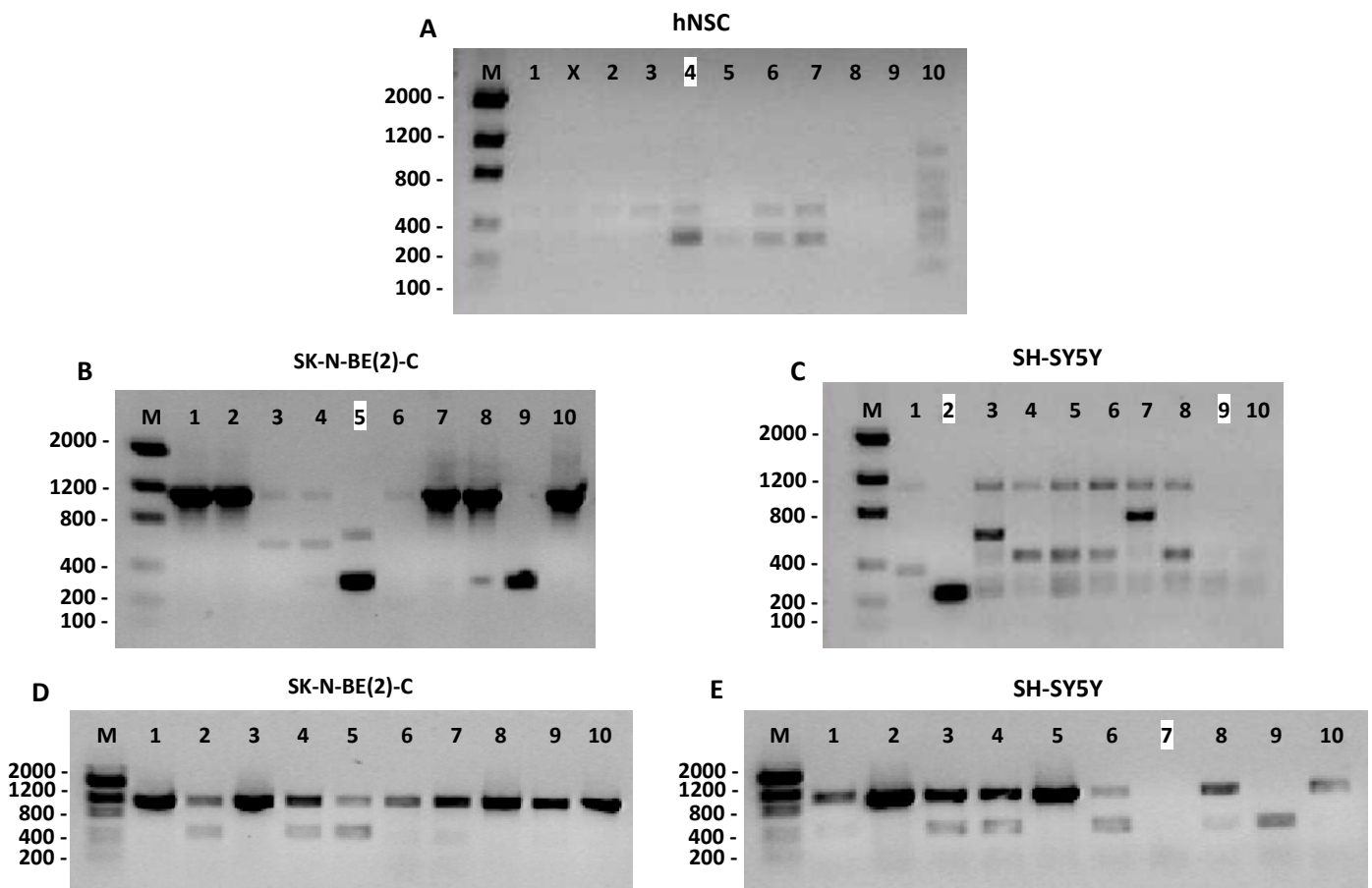


Fig 3. Amplificación mediante retrotranscripción y PCR de los transcritos de *MAPT* en las líneas SK-N-BE(2)-C, SH-SY5Y y hNSC. (A) y (B) Primer ensayo con los *primers* TAU F y TAU R (Tabla 8) y a distintas T_m , con banda de interés representativa de las 6 isoformas de tau en cerebro adulto humano en torno a 1200 pb. Menor inespecificidad a 66°C; (C) Segundo ensayo con los mismos *primers* que en el primer ensayo y mayor especificidad a 65°C; (D) Tercer ensayo con distintos volúmenes de cDNA y nueva pareja de *primers* (TAU 1bF y TAU 4R (Tabla 8)). Se obtienen los resultados más específicos. Ensayo: electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v); M marcador de pesos moleculares Low DNA Mass Ladder.



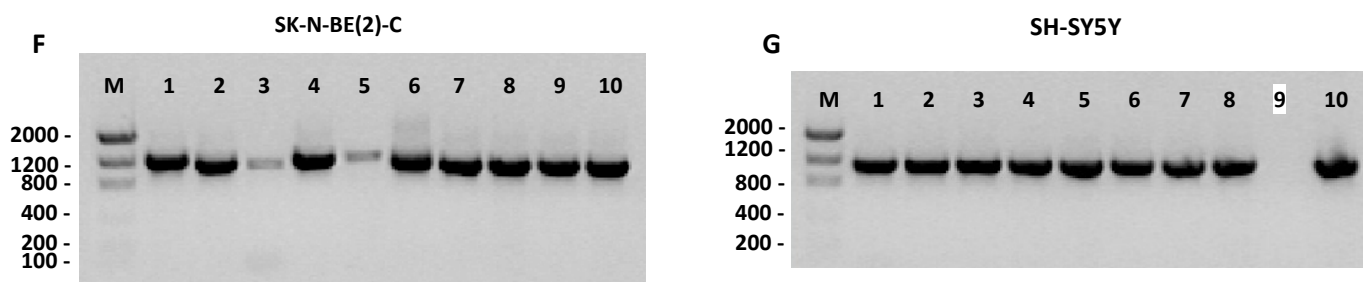


Fig. 4. Amplificación de las isoformas de tau en colonias bacterianas transformadas con material genético de las líneas SK-N-BE(2)-C, SH-SY5H y hNSC. (A), (B) y (C) Primer ensayo con los *primers* TAU F y TAU R (Tabla 8). Prácticamente no aparece ninguna banda de interés (≈ 1200 pb) en las colonias del análisis A (línea hNSC), pero sí en los experimentos B y C (líneas SK-N-BE(2)-C y SH-SY5Y). Se obtienen bandas inespecíficas como resultado de realizarse con muestras de DNA no purificado y aplicar una T_m poco restrictiva (Tabla 11); (D) y (E) Segundo ensayo. Mismos *primers* que en el primer ensayo. Aparece banda de interés en algunas colonias de ambas experiencias; (F) y (G) Tercer ensayo utilizando nuevos *primers* (TAU 1bF y TAU 4R (Tabla 8)) en el que se obtienen los resultados más específicos, con banda de interés en todas las colonias analizadas excepto en la novena del análisis G. Ensayo: electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v); M marcador de pesos moleculares Low DNA Mass Ladder. Marcadas en blanco colonias enviadas a secuenciar pese a apenas apreciarse banda de interés.

5.3 Comparación del crecimiento de colonias según el material genético inicial

De forma previa a la realización de la PCR de colonia, las bacterias *E. coli* DH5 α fueron transformadas con los productos de PCR clonados en el vector pCR™-Blunt II-TOPO® y se cultivaron en medio LB con kanamicina para poder seleccionarlas positivamente. A las 24 horas se llevó a cabo un recuento de las colonias formadas en cada placa para valorar el crecimiento bacteriano según la procedencia celular del material genético clonado.

Tabla 13. Recuento aproximado de las colonias de *E. coli* DH5 α

	SK-N-BE(2)-C	SH-SY5Y	hNSC
Primer ensayo	>400	50	>>400
Segundo ensayo	>400	40	-
Tercer ensayo	90	30	0

Los resultados obtenidos (Tabla 13) permiten establecer que, **en el caso del material genético procedente de las SK-N-BE(2)-C y las SH-SY5Y**, el número de colonias obtenido de las *E. coli* DH5 α fue similar en los dos primeros ensayos y diferente en el tercero. Además, para ambas líneas **los resultados obtenidos son coincidentes con las electroforesis realizadas** (Figuras 3A, 3C y 3D) por obtenerse una mayor cantidad de amplificado y, por tanto, más cDNA de interés, en los dos primeros ensayos que en el tercero. En este último, el menor crecimiento puede deberse a la menor obtención de productos inespecíficos y, por tanto, menor el crecimiento bacteriano por haber menos amplificados inespecíficos que pudieran clonarse e introducirse después en las bacterias competentes.

Por su parte, **en el caso de las colonias crecidas con insertos de las hNSC los datos obtenidos fueron muy dispares**: en el primer ensayo fue la placa de mayor crecimiento bacteriano, mientras que en el tercero no creció ninguna colonia. En el primero se observó una

fuerte inespecificidad de amplificadas en torno a 400 pb en las hNSC (Figura 3A), lo que sugiere que se clonaron muchos de estos productos inespecíficos por ser más sencilla la integración de los mismos que de otros fragmentos de DNA de mayor tamaño, y que estos fueron los introducidos por las bacterias, de ahí su elevado crecimiento. Esta observación se ve reafirmada por los amplificadas a unas 400 pb obtenidas por PCR de colonia (Figura 4A) y la ausencia de isoformas detectadas al analizar las secuencias obtenidas (Tabla 14).

En síntesis, el análisis del crecimiento bacteriano reafirma la mayor especificidad dada por los *primers* TAU 1bF y TAU 4R y justifica el gran número de colonias formadas de las *E. coli* DH5α con material genético de las hNSC por posible transformación con insertos de no interés.

5.4 Isoformas y variaciones encontradas de *MAPT* en los modelos celulares

Tras realizar el primer cribado por PCR de colonia era necesaria una prueba confirmatoria de la existencia de las isoformas de la proteína tau en las bacterias transformadas y que a su vez permitiese establecer las isoformas concretas presentes en cada línea, así como el análisis de sus secuencias con objeto de validar los modelos celulares utilizados para estudios posteriores. Para ello, se extrajo el DNA plasmídico de las colonias positivas para la banda de interés y se mandaron todas las muestras obtenidas a secuenciar.

Tabla 14. Isoformas detectadas en las líneas de estudio

Colonia	SK-N-BE(2)-C ₁	SH-SY5Y ₁	hNSC	SK-N-BE(2)-C ₂	SH-SY5Y ₂	SK-N-BE(2)-C ₃	SH-SY5Y ₃
1	Fetal	-	0	Fetal	-	B	Fetal
2	Fetal	-	0	-	Fetal	Fetal	Fetal
3	-	-	0	Fetal	-	Fetal	Fetal
4	-	-	-	-	-	D	Fetal
5	-	-	0	-	Fetal	B	Fetal
6	-	-	0	-	-	Fetal	Fetal
7	Fetal	-	0	-	-	Fetal	Fetal
8	Fetal	-	0	Fetal	-	Fetal	Fetal
9	0	Fetal	0	-	0	Fetal	-
10	Fetal	0	-	Fetal	-	Fetal	Fetal

_{1, 2, 3} = número de ensayo al que pertenecen los resultados; 0 = colonia picada, pero no secuenciada por ausencia de banda de interés en la PCR de colonia; - = colonia picada y secuenciada, pero secuencia obtenida no correspondiente a ninguna isoforma de tau; rojo = variaciones detectadas.

La secuenciación permitió establecer que con los *primers* TAU F y TAU R se obtuvieron amplificadas de ≈ 1200 pb (Figuras 4A-E) que no eran isoformas (Tabla 14), posiblemente porque el tampón HF (Tabla 6) estuviera contaminado con algún DNA con el que hibridasen los *primers*, generando una secuencia de dicho tamaño. **Además, no se consiguió establecer ninguna isoforma ni estudiar ninguna variación en la línea hNSC por ausencia de secuencias de interés, pero sí en la SH-SY5Y y SK-N-BE(2)-C.** Concretamente, en las SH-SY5Y sólo se detectó la isoforma fetal, mientras que en las SK-N-BE(2)-C se consiguieron encontrar las isoformas B, D y fetal, siendo ésta última la mayoritaria. Concretamente, **los mejores**

resultados se obtuvieron con los primers TAU 1bF y TAU 4R por ser en el tercer ensayo en el que se detectó una mayor cantidad y variedad de isoformas, de forma que según lo explicado en el apartado 4.5.1 *Selección de los primers utilizados*, la información correcta es la disponible en NCBI por haberse detectado precisamente las isoformas D y fetal. Además, **la amplificación obtenida con dichos primers fue más específica** con prácticamente sólo aparición de la banda de interés (Figura 3D), lo que, junto a una menor expresión de las isoformas (Figura 2), justifica que no creciese ninguna colonia con cDNA de las hNSC (Tabla 13): en el tercer ensayo no hubo amplificados inespecíficos que se clonasen en el vector comercial y con el que las bacterias pudiesen transformarse y crecer posteriormente en las placas de kanamicina.

En cuanto a las variaciones de *MAPT*, **tanto en la línea de las SK-N-BE(2)-C como en la de las SH-SY5Y se detectaron posibles variaciones con respecto a la secuencia consenso en dos colonias** (Tabla 14). En concreto, dos cambios puntuales, generando cada uno un contrasentido: K267E en las SK-N-BE(2)-C y Q244R en las SH-SY5Y (Figura 5), ambos cambios en principio en heterocigosis por no aparecer en otras secuencias obtenidas en estas líneas y muy invalidantes para ambas por pasar de un residuo con carga positiva a negativa (SK-N-BE(2)-C) o sin carga a carga positiva (SH-SY5Y). Sin embargo, ni en la bibliografía¹¹ ni en las bases de datos (Figura suplementaria 4) existen dichas variaciones en la isoforma F de referencia (Tabla 1), lo que unido a haberlas detectado en una única colonia para cada línea sugiere que dichos cambios no se tratan de variaciones genéticas, sino errores cometidos por la PHS II polimerasa (a pesar de ser de alta fidelidad).

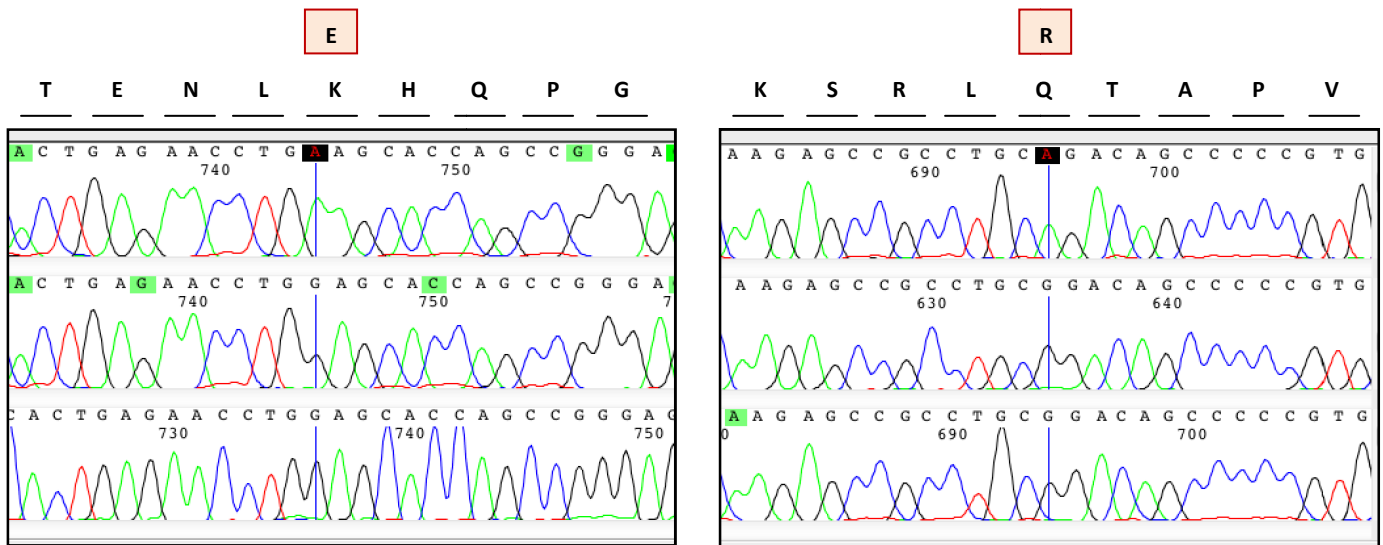


Fig. 5. Alineamiento entre las secuencias de isoformas obtenidas de las líneas SK-N-BE(2)-C (izda.) y SH-SY5Y (dcha.) con los primers F17 y R19 (secuencias inferiores) y la secuencia consenso de la isoforma F (secuencia superior). En ambos casos cambia una A por una G en el exón 9 (Figura suplementaria 5) en posiciones no registradas (K267E, izda. Q244R, dcha.) y tanto en las secuencias obtenidas con los primers directo (F17) y reverso (F19) en el vector pCR™-Blunt II-TOPO®, luego no son variaciones ni un error de secuenciación, sino un fallo previo de la PHS II polimerasa.

En conclusión, el análisis de las secuencias amplificadas y clonadas revela la ausencia de variaciones en los transcritos secuenciados de las líneas SK-N-BE(2)-C y SH-SY5Y, la presencia en las mismas de, al menos, las isoformas fetal (en ambas), B y D (en SK-N-BE(2)-C) y la necesidad de repetir el ensayo completo en distintas condiciones con las hNSC.

6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha caracterizado el gen *MAPT* en las líneas celulares hNSC, SH-SY5Y y SK-N-BE(2)-C para validarlas como modelo de estudio de la EA en ensayos posteriores. Por qPCR se ha analizado la expresión de *MAPT* y la presencia de los grupos de isoformas 3R y 4R de cada una de las líneas, obteniéndose un **incremento de las isoformas 3R con respecto de las 4R en los tres modelos celulares de estudio** (Figura 2) y, por tanto, diferente a la proporción 1:1 esperada¹⁴. Estos resultados coinciden con la posterior amplificación por PCR con polimerasa de alta fidelidad, clonaje en bacterias *E. coli* DH5 α y secuenciación de las isoformas presentes en las tres líneas celulares por detectarse especialmente la **isoforma fetal en la línea SK-N-BE(2)-C y exclusivamente en la línea SH-SY5Y** (Tabla 14), perteneciendo dicha isoforma al grupo de las 3R (Figura 1; Tabla 1). **En la línea hNSC no se detectó ninguna secuencia de interés**, posiblemente por la menor expresión del gen *MAPT* en la misma (Tabla 12) y amplificación y posterior clonaje de productos de PCR inespecíficos (Figura 3A; Tabla 13).

En el caso de la línea hNSC la mayor expresión de la isoforma fetal puede deberse a que derivan de células madre embrionarias humanas (hESC), cuando durante el desarrollo fetal dicha isoforma es la única expresada⁸. Sin embargo, tras el nacimiento su expresión se ve disminuida, incrementándose la del resto de isoformas hasta alcanzar el ratio igual a 1 de las isoformas 3R y 4R presente en el cerebro adulto humano^{9,14}. Por tanto, **es posible que la mayor presencia de la isoforma fetal en las líneas SK-N-BE(2)-C y SH-SY5Y se deba a que dichas células son neuroblásticas**, es decir, originadas a partir de células cancerosas del tejido nervioso simpático y aisladas de dos niños (2 y 4 años, respectivamente) y no de un cerebro humano completamente adulto. Otra posibilidad deriva de la observación de que la isoforma fetal es una isoforma 3R y se encuentra en equilibrio entre altamente fosforilada y con baja fosforilación, lo que se debe a la reversibilidad del proceso durante el desarrollo embrionario¹¹. En consecuencia, la isoforma fetal es menos afín a los microtúbulos que otras isoformas, pero no genera agregados patológicos⁸, motivo por el que se cree que estas características de la isoforma fetal conducen a una plasticidad celular que favorece la proliferación celular²⁰. Esto sugiere que **las líneas SK-N-BE(2)-C y SH-SY5Y expresan en mayor cantidad la isoforma fetal con objeto de adquirir un fenotipo embrionario y ganar así capacidad proliferativa**.

Finalmente, **la ausencia de variaciones en los transcritos secuenciados respecto a la secuencia consenso de *MAPT*** (Tabla 14; Figura 5) **en las líneas celulares SK-N-BE(2)-C y SH-SY5Y las valida para ser diferenciadas a neuronas colinérgicas y utilizadas como modelo de estudio de la EA**, pudiendo estudiar y comparar la diferencia de expresión de las isoformas en estado diferenciado y sin diferenciar, así como analizar las bases moleculares de la proteína tau. Además, al presentar una mayor expresión de la isoforma fetal y encontrarse fosforilada en residuos descritos en la EA (como S199, S202 y T205), pero no en el cerebro adulto humano sano^{20,28} lleva a proponerlas como modelos de estudio en sí mismas para estudiar la regulación de dicha isoforma y su papel concreto en diferentes etapas del desarrollo. **Por su parte, habría que repetir el ensayo completo en distintas condiciones con la línea hNSC**, modelo que merece la pena estudiar por ser el más similar a las neuronas sanas del cerebro humano y por

haber detectado previamente las 6 principales isoformas en neuronas derivadas de células madre embrionarias (hESC, que se diferencian a hNSC y éstas a las neuronas finales)²⁹, así como en neuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC)³⁰.

7. CONCLUSIONES

7.1 Conclusiones

- I. Las líneas celulares hNSC, SH-SY5Y y SK-N-BE(2)-C presentan expresión del gen *MAPT*, siendo en todas ellas **mayor el conjunto de transcritos 3R con respecto a los 4R**.
- II. En las líneas SK-N-BE(2)-C y SH-SY5Y la mayor presencia de las isoformas 3R se corresponde con una mayor expresión de la **isoforma fetal**, posiblemente debida al favorecimiento de la **plasticidad celular** por parte de la misma y, por tanto, la proliferación de las células tumorales.
- III. **No se han detectado variaciones genéticas en los transcritos secuenciados de *MAPT* ni en la línea SK-N-BE(2)-C ni en la SH-SY5Y**, validando así su uso para estudios posteriores de las bases moleculares de la proteína tau en la enfermedad de Alzheimer.
- IV. Es necesario **completar el análisis de la línea hNSC** antes de poder utilizarla como modelo de estudio de la enfermedad de Alzheimer.

7.2 Conclusions

- I. hNSC, SH-SY5Y and SK-N-BE(2)-C cell lines show *MAPT* gene expression with **more 3R transcripts with respect to 4R transcripts synthesis**.
- II. In SK-N-BE(2)-C y SH-SY5Y cell lines 3R isoforms presence is greater than 4R isoforms because of a higher **fetal isoform** expression, which might stimulates **cell plasticity** and hence tumoral cells proliferation.
- III. **No genetic variations have been found in SK-N-BE(2)-C and SH-SY5Y lines *MAPT* sequenced transcripts**. Consequently both cells lines are suitable to study tau protein molecular basis in Alzheimer's disease.
- IV. **More research is necessary in order to use hNSC cell line** as a study model for Alzheimer's disease.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Goedert, M. & Spillantini, M. G. A Century of Alzheimer's Disease. *Science*. **314**, 777–781 (2006).
2. Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatrie Psychisch-gerichtl. Med.* **64**, 146–148 (in German) (1907).
3. Pesini, A. *et al.* OXPPOS, Pyrimidine Nucleotides, and Alzheimer's Disease: A Pharmacogenomics Approach. *J. Alzheimer's Dis.* **42**, 87–96 (2014).
4. Zempel, H. & Mandelkow, E. Lost after translation: Missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease. *Trends Neurosci.* **37**, 721–732 (2014).
5. Wang, Y. & Mandelkow, E. Tau in physiology and pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 22–35 (2015).
6. Wade-Martins, R. The MAPT locus—a genetic paradigm in disease susceptibility. *Nat. Rev. Neurol.* **8**, 477–478 (2012).
7. Caillet-Boudin, M.-L., Buée, L., Sergeant, N. & Lefebvre, B. Regulation of human MAPT gene expression. *Mol. Neurodegener.* **10**, 28 (2015).
8. Jovanov-Milošević N, Petrović D, Sedmak G, Vukšić M, Hof PR, S. G. Human fetal tau protein isoform: Possibilities for Alzheimer's disease treatment. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 1290–1294 (2012).
9. Kang, H. J. *et al.* Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature* **478**, 483–9 (2011).
10. Boutajangout, A., Boom, A., Leroy, K. & Brion, J. P. Expression of tau mRNA and soluble tau isoforms in affected and non-affected brain areas in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* **576**, 183–189 (2004).
11. Spillantini, M. G. & Goedert, M. Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* **12**, 609–622 (2013).
12. Foster, N. L. *et al.* Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *Ann. Neurol.* **41**, 706–715 (1997).
13. Goedert, M., Spillantini, M. C., Rutherford, D. & Crowther, R. A. Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease. *Neuron* **3**, 519–526 (1989).
14. Goedert, M. & Jakes, R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* **9**, 4225–4230 (1990).
15. Ingelsson, M. *et al.* No alteration in tau exon 10 alternative splicing in tangle-bearing neurons of the Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol.* **112**, 439–449 (2006).
16. Niblock, M. & Gallo, J. Tau alternative splicing in familial and sporadic tauopathies. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 677–680 (2012).
17. Andreadis, A. Tau gene alternative splicing: Expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1739**, 91–103 (2005).
18. Martin, L., Latypova, X. & Terro, F. Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **58**, 458–471 (2011).
19. Morris, M., Maeda, S., Vossel, K. & Mucke, L. The Many Faces of Tau. *Neuron* **70**, 410–

- 426 (2011).
20. Simic, G. *et al.* Does Alzheimer's disease begin in the brainstem? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **35**, 532–554 (2009).
 21. Iqbal, K., Liu, F. & Gong, C.-X. Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat. Rev. Neurol.* **12**, 15–27 (2016).
 22. Sontag, J.-M. *et al.* Folate Deficiency Induces In Vitro and Mouse Brain Region-Specific Downregulation of Leucine Carboxyl Methyltransferase-1 and Protein Phosphatase 2A B Subunit Expression That Correlate with Enhanced Tau Phosphorylation. *J. Neurosci.* **28**, 11477–11487 (2008).
 23. Tapia-Rojas, C. *et al.* Is L-methionine a trigger factor for Alzheimer's-like neurodegeneration?: Changes in A β oligomers, tau phosphorylation, synaptic proteins, Wnt signaling and behavioral impairment in wild-type mice. *Mol. Neurodegener.* **10**, 62 (2015).
 24. Usenovic, M. *et al.* Internalized Tau Oligomers Cause Neurodegeneration by Inducing Accumulation of Pathogenic Tau in Human Neurons Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Neurosci.* **35**, 14234–50 (2015).
 25. Schaefer, C. M., Schäfer, M. K.-H. & Löffler, M. Region-Specific Distribution of Dihydroorotate Dehydrogenase in the Rat Central Nervous System Points to Pyrimidine De Novo Synthesis in Neurons. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **29**, 476–481 (2010).
 26. Takuma, H., Arawaka, S. & Mori, H. Isoforms changes of tau protein during development in various species. *Dev. Brain Res.* **142**, 121–127 (2003).
 27. Gumucio, A., Lannfelt, L. & Nilsson, L. N. G. Lack of exon 10 in the murine tau gene results in mild sensorimotor defects with aging. *BMC Neurosci.* **14**, 2–25 (2013).
 28. Goedert, M. *et al.* The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 5066–5070 (1993).
 29. Iovino, M., Patani, R., Watts, C., Chandran, S. & Spillantini, M. G. Human stem cell-derived neurons: A system to study human tau function and dysfunction. *PLoS One* **5**, (2010).
 30. Iovino, M. *et al.* Early maturation and distinct tau pathology in induced pluripotent stem cell-derived neurons from patients with MAPT mutations. *Brain* **138**, 3345–3359 (2015).
 31. Ensembl. Gene: MAPT ENSG00000186868 (Human). Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000186868;r=17:45894382-46028334 (2015)
 32. NCBI. Nucleotide: MAPT. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=MAPT> (2015).
 33. NCBI. Protein: tau. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=tau> (2015).
 34. UniProt. P10636. Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P10636> (2015).

9. ANEXOS

9.1 Secuencias de las isoformas (NCBI)

Transcript: MAPT-203 (Isoform G)

Nucleotide Sequence (2331 nt):

ATGGCTGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGATGGAAGATCACGCTGGGACGTACGGGTGGGGGACAGGA
AAGATCAGGGGGGTACACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGAATCTCC
CCTGCAGACCCCCACTGAGGACGGATCTGAGGAACCGGGCTCTGAAACCTCTGATGCTAAGAGCACTCCA
ACAGCGGAAGATGTGACAGCACCCCTTAGTGGATGAGGGAGCTCCCGCAAGCAGGCTGCCGCGCAGCCCC
ACACGGAGATCCAGAAAGGAACCACAGCTGAAGAAGCAGGCATTTGGAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGA
AGCTGCTGGTACGTGACCCAAGAGCCTGAAAGTGGTAAGGTGGTCCAGGAAGGCTTCCCTCCGAGAGCCA
GGCCCCCAGGTCTGAGCCACCAGCTCATGTCCGGCATGCCCTGGGGCTCCCCCTCCGCTGAGGGCCCCA
GAGAGGCCACACGCCAACCTTCGGGGACAGGACCTGAGGACACAGAGGGCGGCCACGCCCTGAGCT
GCTCAAGCACCAGCTTCTAGGAGACCTGCACCAGGAGGGGCCCGCCGCTGAAGGGGGCAGGGGGCAAAGAG
AGGCCGGGGAGCAAGGAGGAGGTGGATGAAGACCGCGACGTCGATGAGTCCCTCCCCCAAGACTCCCCCTC
CCTCCAAGGCCTCCCCAGCCAAAGATGGGCGGCCCTCCCCAGACAGCCGCCAGAGAAGCCACCAGCATCCC
AGGCTTCCCAGCGGAGGGTGCCATCCCCCTCCCTGTGGATTTCCCTCTCCAAAGTTTCCACAGAGATCCCA
GCCTCAGAGCCCCGACGGGCCAGTGTAGGGCGGGCCAAAGGGCAGGATGCCCCCTGGAGTTCACGTTTC
ACGTGGAAATCACACCCAACGTGCAGAAAGGAGCAGGCGCACTCGGAGGAGCATTTGGGAAGGGCTGCATT
TCCAGGGGGCCCTGGAGAGGGGGCCAGAGGCCCGGGGCCCTCTTTGGGAGAGGACACAAAAGAGGCTGAC
CTTCCAGAGCCCTCTGAAAAGCAGCCTGCTGCTGCTCCGCGGGGAAGCCCGTCAGCCGGGTCCCTCAAC
TCAAAGCTCGCATGGTCACTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGACATCCAC
ACGTTCTCTGCTAAAACCTTGAAAAATAGGCCTTGCCCTTAGCCCCAAACACCCCACTCCCTGGTAGCTCA
GACCTCTGATCCAACCTCCAGCCCTGCTGTGTGCCAGAGCCACCTTCCCTCCCTAAATACGTCTCTT
CTGTCACTTCCCAGACTGGCAGTTCTGGAGCAAAGGAGATGAAACTCAAGGGGGCTGATGGTAAAACGAA
GATCGCCACACCCGCGGGGAGCAGCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAGGATTCCAGCA
AAAACCCCCGCCGCTCCAAAAGACACCACCCAGCTCTGCGACTAAGCAAGTCCAGAGAAGACCACCCCTG
CAGGGCCAGATCTGAGAGAGGTGAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTC
CCCAGGCACTCCCGCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAG
GTGGCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGCTTCCGCCAAGAGCCGCTGCAGACAGCCCCCGTGC
CCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCCTGAAGCACCAGCCGGGAGG
CGGGAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGAT
AATATCAAACACGTCCCGGAGGCGGCAGTGTGCAAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGA
CCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGC AACATCCATCATAAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGA
GAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCCGAAGATTGGTCCCTGGACAATATACCCACGTCCCTGGC
GGAGGAAAATAAAAAAGATTGAAAACCAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCAG
GGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGGGACACGCTTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTC
CTCCACCGGACAGCATCGACATGGTAGACTCGCCCCAGCTCGCCACGCTAGCTGACGAGGTGTCTGCCTCC
CTGGCCAAGCAGGGTTTGTGA

Exón 4a

Exón 6

Exón 8

Transcript: MAPT-201 (Isoform PNS)

Nucleotide Sequence (2277 nt):

ATGGCTGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGATGGAAGATCACGCTGGGACGTACGGGTGGGGGACAGGA
AAGATCAGGGGGGTACACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGAATCTCC
CCTGCAGACCCCCACTGAGGACGGATCTGAGGAACCGGGCTCTGAAACCTCTGATGCTAAGAGCACTCCA
ACAGCGGAAGATGTGACAGCACCCCTTAGTGGATGAGGGAGCTCCCGCAAGCAGGCTGCCGCGCAGCCCC
ACACGGAGATCCAGAAAGGAACCACAGCTGAAGAAGCAGGCATTTGGAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGA
AGCTGCTGGTACGTGACCCAAGAGCCTGAAAGTGGTAAGGTGGTCCAGGAAGGCTTCCCTCCGAGAGCCA
GGCCCCCAGGTCTGAGCCACCAGCTCATGTCCGGCATGCCCTGGGGCTCCCCCTCCGCTGAGGGCCCCA
GAGAGGCCACACGCCAACCTTCGGGGACAGGACCTGAGGACACAGAGGGCGGCCACGCCCTGAGCT
GCTCAAGCACCAGCTTCTAGGAGACCTGCACCAGGAGGGGCCCGCCGCTGAAGGGGGCAGGGGGCAAAGAG
AGGCCGGGGAGCAAGGAGGAGGTGGATGAAGACCGCGACGTCGATGAGTCCCTCCCCCAAGACTCCCCCTC
CCTCCAAGGCCTCCCCAGCCAAAGATGGGCGGCCCTCCCCAGACAGCCGCCAGAGAAGCCACCAGCATCCC

AGGCTTCCCAGCGGAGGGTGCCATCCCCCTCCCTGTGGATTTCCCTCTCCAAAGTTTCCACAGAGATCCCA
GCCTCAGAGCCCCGACGGGCCAGTGTAGGGCGGGCCAAAGGGCAGGATGCCCCCTGGAGTTCACGTTTC
ACGTGGAAATCACACCCAACGTGCAGAAAGGAGCAGGCGCACTCGGAGGAGCATTGGGAAGGGCTGCATT
TCCAGGGGCCCTTGAGAGGGGCCAGAGGCCCGGGGCCCTCTTTGGGAGAGGACACAAAAGAGGGCTGAC
CTTCCAGAGCCCTTGAAAAAGCAGCTGCTGCTGCTCCGCGGGGGAAGCCCGTCAGCCGGGTCCCTCAAC
TCAAAGCTCGCATGGTCAGTAAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGACATCCAC
ACGTTCCCTCTGCTAAAAACCTTGAAAAATAGGCCTTGCCCTTAGCCCCAACACCCCACTCCTGGTAGCTCA
GACCCTCTGATCCAACCTCCAGCCCTGCTGTGTGCCAGAGCCACCTTCCCTCTCCTAAATACGTCTCTT
CTGTCACTTCCCAGACTGGCAGTTCTGGAGCAAAGGAGATGAAACTCAAGGGGGCTGATGGTAAAACGAA
GATCGCCACACCGCGGGAGCAGCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAGGATTCAGCA
AAAACCCCGCCCGCTCCAAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCT
ACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCGGCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCAC
CCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCTG
CAGACAGCCCCCGTGCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGA
AGCACCAGCCGGGAGGCGGAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCAA
GTGTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTT
GACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGG
TGAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCAAGATTGGGTCCCTGGACAATAT
CACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAA
GCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGGGACACGTCTCCACGGC
ATCTCAGCAATGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGACTCGCCCCAGCTCGCCACGCTAGCTGA
CGAGGTGTCTGCCTCCCTGGCCAAGCAGGGTTTGTGA

Transcript: MAPT-204 (Isoform F)

Nucleotide Sequence (1326 nt):

ATGGCTGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGATGGAAGATCACGCTGGGACGTACGGGTGGGGGACAGGA
AAGATCAGGGGGGTACACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGAATCTCC
CCTGCAGACCCCCACTGAGGACGGATCTGAGGAACCGGGCTCTGAAACCTCTGATGCTAAGAGCACTCCA
ACAGCGGAAGATGTGACAGCACCCCTTAGTGGATGAGGGAGCTCCCGGCAAGCAGGCTGCCGCGCAGCCCC
ACACGGAGATCCAGAAGGAACCACAGCTGAAGAAGCAGGCATTGGAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGA
AGCTGCTGGTCACGTGACCCAAGCTCGCATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAA
AAAGCCAAGGGGGCTGATGGTAAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAG
GCCAGCCAAACGCCACCCAGGATTCAGCAAAAACCCCGCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGA
ACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCGGACACTCCCGGCAGCCGCTCC
CGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTACTCCACCCA
AGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCTGCAGACAGCCCCCGTGCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAA
GTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCACCAGCCGGGAGGCGGAAGGTGCAGATAATTAATAAG
AAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCG
GCAGTGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAA
CATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTC
CAGTCAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCC
ACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCC
AGTGGTGTCTGGGGACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTA
GACTCGCCCCAGCTCGCCACGCTAGCTGACGAGGTGTCTGCCTCCCTGGCCAAGCAGGGTTTGTGA

Transcript: MAPT-205 (Isoform C)

Nucleotide Sequence (1233 nt):

ATGGCTGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGATGGAAGATCACGCTGGGACGTACGGGTGGGGGACAGGA
AAGATCAGGGGGGTACACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGAATCTCC
CCTGCAGACCCCCACTGAGGACGGATCTGAGGAACCGGGCTCTGAAACCTCTGATGCTAAGAGCACTCCA
ACAGCGGAAGATGTGACAGCACCCCTTAGTGGATGAGGGAGCTCCCGGCAAGCAGGCTGCCGCGCAGCCCC
ACACGGAGATCCAGAAGGAACCACAGCTGAAGAAGCAGGCATTGGAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGA
AGCTGCTGGTCACGTGACCCAAGCTCGCATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAA
AAAGCCAAGGGGGCTGATGGTAAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAG
GCCAGGCCAAACGCCACCCAGGATTCAGCAAAAACCCCGCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGA
ACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCGGACACTCCCGGCAGCCGCTCC

CGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTACTCCACCCA
AGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCTGCAGACAGCCCCCGTGCCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAA
GTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCACCAGCCGGGAGGCGGAAGGTGCAAAATAGTCTACAAA
CCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTG
GCCAGGTGGAAGTAAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTTCGAAGATTGGGTCCCTGGA
CAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAAC
GCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGGGACACGTCTC
CAGGCATCTCAGCAATGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGACTCGCCCCAGCTCGCCACGCT
AGCTGACGAGGTGTCTGCCTCCCTGGCCAAGCAGGGTTTGTGA

Transcript: MAPT-202 (Isoform E)

Nucleotide Sequence (1239 nt):

ATGGCTGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGATGGAAGATCACGCTGGGACGTACGGGTGGGGGACAGGA
AAGATCAGGGGGCTACACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGAATCTCC
CCTGCAGACCCCCACTGAGGACGGATCTGAGGAACCGGGCTCTGAAACCTCTGATGCTAAGAGCACTCCA
ACAGCGGAAGCTGAAGAAGCAGGCATTGGAGACACCCACGCTGGAAGACGAAGCTGCTGGTCACGTGA
CCCAAGCTCGCATGGTTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGA
TGGTAAAAACGAAGATCGCCACACCCGCGGGGAGCAGCCCCCTCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACC
AGGATTCCAGCAAAAAACCCGCCCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGTTGAACCTCCAAAATCAGGGG
ATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGTCCCCAGGCACTCCCGGCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCC
AACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCC
AAGAGCCGCTGCAGACAGCCCCCTGCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCA
CTGAGAACCTGAAGCACCAGCCGGGAGGCGGAAGGTGCAGATAAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCAA
CGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAAATAGTC
TACAAAACAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAG
GAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTTCGAAGATTGGGT
CCTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGC
GAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGGGACA
CGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGACTCGCCCCAGCTCGC
CAGCTAGCTGACGAGGTGTCTGCCTCCCTGGCCAAGCAGGGTTTGTGA

Transcript: MAPT-002 (Isoform D)

Nucleotide Sequence (1152 nt):

ATGGCTGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGATGGAAGATCACGCTGGGACGTACGGGTGGGGGACAGGA
AAGATCAGGGGGCTACACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGCTGAAGA
AGCAGGCATTGGAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGAAGCTGCTGGTACGTCACCCCAAGCTCGCATGGTC
AGTAAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATGGTAAAACGAAGATCG
CCACACCCGCGGGGAGCAGCCCCCTCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAGGATTCAGCAAAAAC
CCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGTTGAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGC
AGCCCCGGCTCCCAGGCACTCCCGGCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGG
AGCCCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCTGCAGAC
AGCCCCGTGCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCAC
CAGCCGGGAGGCGGAAGGTGTCAGATAAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCAAGTGTG
GCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAAATAGTCTACAAAACAGTTGACCT
GAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAA
GTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCC
ACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAA
GACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGGGACACGTCTCCACGGCATCTC
AGCAATGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGACTCGCCCCAGCTCGCCACGCTAGCTGACGAGG
TGTCTGCCTCCCTGGCCAAGCAGGGTTTGTGA

Transcript: MAPT-001 (Fetal isoform)

Nucleotide Sequence (1059 nt):

ATGGCTGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGATGGAAGATCACGCTGGGACGTACGGGTGGGGGACAGGA
AAGATCAGGGGGGCTACACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGCTGAAGA
AGCAGGCATTGGAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGAAGCTGCTGGTCACGTGACCCAAGCTCGCATGGTC
AGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAAAGCCAAGGGGGCTGATGGTAAAACGAAGATCG
CCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAGGATTCAGCAAAAAC
CCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGTGAACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGC
AGCCCCGGCTCCCAGGCACTCCCGGCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGG
AGCCCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCTGCAGAC
AGCCCCCGTGCCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAAGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCCTGAAGCAC
CAGCCGGGAGGCGGAAGGTGCAAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTG
GCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTT
CAAGGACAGAGTCCAGTTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAA
AAGATTGAAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCG
TGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGGGACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCCTCCACCGGCAG
CATCGACATGGTAGACTCGCCCCAGCTCGCCACGCTAGCTGACGAGGTGTCTGCCTCCCTGGCCAAGCAG
GGTTTGTGA

9.2 Mapa genético del vector PCR™-BLUNT II-TOPO®

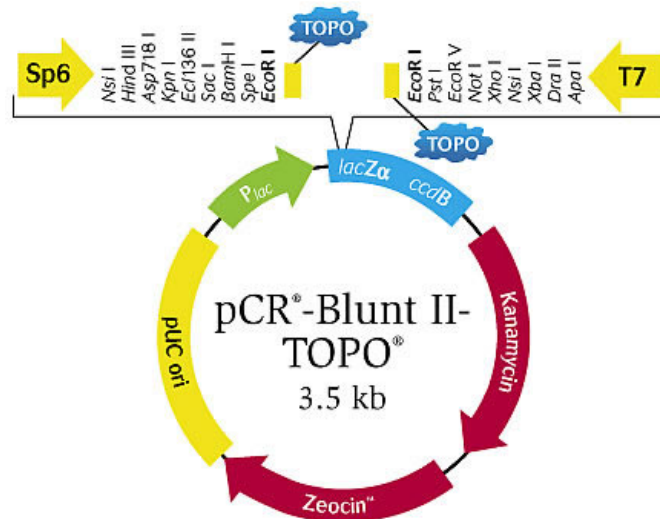


Fig. S1. Mapa del vector comercial pCR™-Blunt II-TOPO®. Presenta un origen de replicación pUC (origen de replicación más común de los plásmidos utilizados en Ingeniería Genética), gen de resistencia a kanamicina (aminoglucósido y, por tanto, capaz de actuar tanto sobre bacterias gram positivas como gram negativas), gen de resistencia a zeomicina (permite selección tanto en células procariontas como en eucariotas), promotor del operón lac, el fragmento α del gen lacZ (codificante para β -galactosidasa en caso de estar completo y que, por tanto, permite selección por α -complementación si la cepa de trabajo posee la delección $\Delta M15$ en su genoma), el gen letal *ccdB* (permite selección positiva. La proteína resultante secuestra a la DNA girasa de *E. coli*) y las secuencias SP6 y T7 de los fagos homónimos que permiten la síntesis de RNA directo o antisentido *in vitro*, respectivamente. Además, presenta dos secuencias del fago M13 (no presentes en la figura) con las que puede secuenciarse el inserto de interés utilizando los *primers* F17 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') y R19 (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3').

9.3 Alineamiento de isoformas en Ensembl

Ensembl: Transcript comparison --> Select transcripts

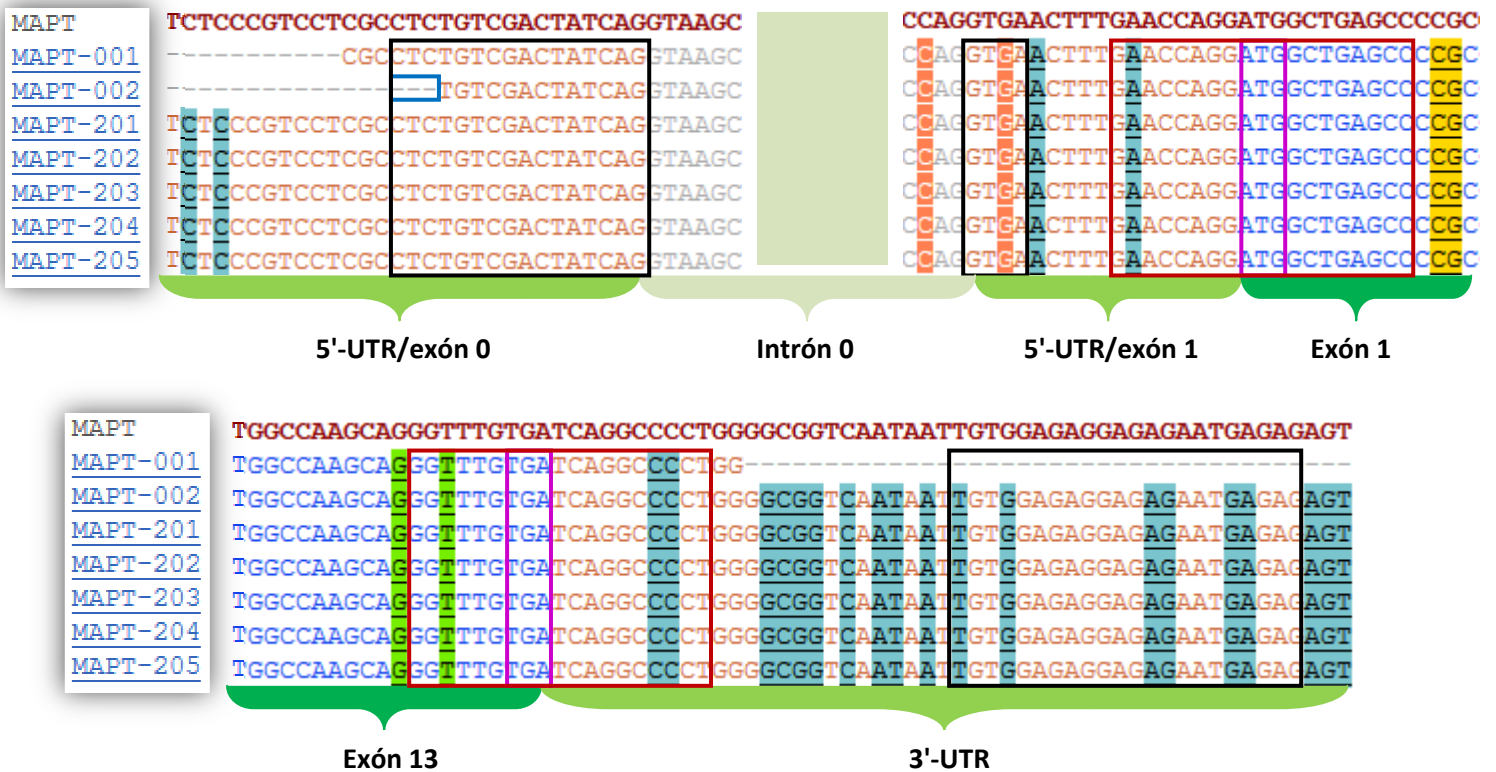


Fig. S2. Alineamientos obtenidos por Ensembl de todos los transcritos de interés. Enmarcadas en sendos rectángulos negros aparecen recogidas las bases que constituyen la secuencia con la que hibridan los *primers* TAU 1bF y TAU 4R, mientras que en azul se muestra la usencia del triplete CTC en el transcrito MAPT-002. En rectángulos rojos se muestran las secuencias con las que hibridan los *primers* TAU F y TAU R, mientras que en violeta aparecen los codones de inicio de la traducción (ATG) y stop (TGA).

9.4 Alineamiento de isoformas en NCBI

NCBI: BLAST --> nucleotide blast --> similar sequences (megablast)

MAPT-001	Query	241	CGCCACCACAGCCACCTTCTCCTCCTCCGCTGTCTCTCCCGTCCTCGCCTCTGTCGACT	300
MAPT-203	Sbjct	241	CGCCACCACAGCCACCTTCTCCTCCTCCGCTGTCTCTCCCGTCCTCGCCTCTGTCGACT	300
MAPT-002	Query	241	CGCCACCACAGCCACCTTCTCCTCCTCCGCTGTCTCTCCCGTCCTCGCCTCTGTCGACT	300
MAPT-203	Sbjct	241	CGCCACCACAGCCACCTTCTCCTCCTCCGCTGTCTCTCCCGTCCTCGCCTCTGTCGACT	300
MAPT-001	Query	1376	TTGTGATCAGGCCCCCTGGGGCGGTCAATAATTGTGGAGAGGAGAGAATGAGAGAGTGTGG	1435
MAPT-203	Sbjct	2648	TTGTGATCAGGCCCCCTGGGGCGGTCAATAATTGTGGAGAGGAGAGAATGAGAGAGTGTGG	2707

MAPT-002 Query 1484 TGGGGCGGTCAATAAT TGTGGAGAGGAGAGAATGAGAG AGTGTGGAAAAAAAAA GAATAA 1543
 MAPT-203 Sbjct 2663 TGGGGCGGTCAATAAT TGTGGAGAGGAGAGAATGAGAG AGTGTGGAAAAAAAAA AGAATAA 2722

Fig. S3. Alineamientos obtenidos de NCBI de los transcritos 001 y 002 con el transcrito 203. Enmarcadas en azul aparecen las secuencias con las que hibridan los primers TAU 1bF (parte de la total con la que hibrida), en el primer y segundo alineamiento, y TAU 4R, en los dos siguientes.

9.5. Variaciones del gen MAPT presentes en Ensembl

241	rs775903937	Missense variant		A/G	R	S, G	AGC, GGC	0.06	0.986
242	rs749827621	Synonymous variant		C/G	S	R	CGC, CGG	-	-
246	rs35960144	Frameshift variant		-/C	-	A, AX	GCC, GCCC	-	-
246	rs543282557	Missense variant		G/A	R	A, T	GCC, ACC	0.09	0.997
247	rs563586090	Synonymous variant		C/T	Y	P	CCC, CCT	-	-
265	rs754981824	Synonymous variant		C/T	Y	N	AAC, AAT	-	-
266	rs63750349	Missense variant		C/G/T	B	L, V	CTG, GTG	0.03	0.992
266	rs373081497	Synonymous variant		G/A	R	L	CTG, CTA	-	-
266	CM030233	Coding sequence variant		HGMD_MU...	-	-	-	-	-
270	rs11568305	Synonymous variant		G/A	R	P	CCG, CCA	-	-

Fig. S4. Algunos de los residuos de la estructura proteica codificada por el transcrito 204 (isoforma F) asociados a variaciones detectadas y registradas en la base de datos Ensembl.

9.6 Cambios realizados por la PHS II polimerasa en dos experiencias

ATGGCTGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGATGGAAGATCACGCTGGGACGTACGGGTGGGGGACAGGA
 AAGATCAGGGGGGCTACACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCGAAAGAATCTCC
 CCTGCAGACCCCCACTGAGGACGGATCTGAGGAACCGGGCTCTGAAACCTCTGATGCTAAGAGCACTCCA
 ACAGCGGAAGATGTGACAGCACCCCTTAGTGGATGAGGGAGCTCCCGCAAGCAGGCTGCCGCGCAGCCCC
 ACACGGAGATCCAGAAAGGAACCCACAGCTGAAGAAGCAGGCATTGGAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGA
 AGCTGCTGGTTCACGTGACCCCAAGCTCGCATGGTTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAA
 AAAGCCAAGGGGGCTGATGGTAAAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGCAGCCCCCTCCAGGCCAGAAG
 GCCAGGCCAACGCCACCAGGATTCAGCAAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCAGCTCTGTGA
 ACCTCCAAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCCTCCCGGCAGCCGCTCC
 CGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTACTCCACCCA
 AGTCGCCGTCTTCCGCAAGAGCCGCTGCAGACACCCCGCTGCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAA
 GTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTCAGCACCAGCCGGGAGGCGGAAGGTGCAGATAATTAATAAG
 AAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCG
 GCAGTGTGCAAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAA
 CATCCATCATAAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAACTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTC
 CAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAACCC
 ACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCC
 AGTGGTGTCTGGGGACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTA
 GACTCGCCCCAGCTCGCCACGCTAGCTGACGAGGTGTCTGCCCTCCCTGGCCAAGCAGGGTTTGTGA

Exón 9

Fig. S5. Secuencia del cDNA de la isoforma F (Tabla F). Cambio de CAG a CGG en las SKN (colonia 2 de la primera clonación) y de AAG a GAG en las SH (colonia 6 de la tercera clonación), ambas en el exón 9.