



Universidad
Zaragoza

Trabajo fin de Grado

Clonaje y expresión de *Syt1* en ratones y cultivo celular

Cloning and expression of *Syt1* in mice and cell culture

Autor/es

Carolina Vilches Medkouri

Director/es

Jesús de la Osada García
Luis Vicente Herrera Marcos

Facultad Medicina
2017

Índice

Abstract.....	2
Palabras clave.....	3
Introducción.....	3
Material y métodos.....	6
I. Diseño del plásmido y clonaje de <i>Syt1</i>	6
1. Obtención de la secuencia codificante de <i>Syt1</i> mediante amplificación con reacción en cadena de la polimerasa.	
1.1 Diseño de los cebadores.	
1.2 Reacción en cadena de la polimerasa.	
1.3 Extracción del gel.	
1.4 Miniprep.	
2. Linearización del plásmido receptor (pLIVE.luc)	
2.1 Digestión con BamH1	
2.2 Purificación por gel del plásmido linearizado	
2.3 Precipitación alcohólica del vector.	
3. Reacción de clonaje <i>In Fusion</i> ®.	
4. Transformación de las bacterias.	
5. Análisis de <i>coils</i> y <i>supercoils</i> .	
6. Análisis por PCR de las colonias.	
7. Análisis mediante enzimas de restricción.	
8. Secuenciación.	
II. Valoración funcional del plásmido pLIVE- <i>Syt1</i> .luc.....	17
1. Experimentos en cultivo celular.	
1.1 Obtención del plásmido a gran escala (maxiprep).	
1.2 Transfección del plásmido.	
1.3 Estudio actividad luciferasa.	
1.4 Expresión <i>Syt1</i> en HepG2.	
2. Modelo experimental animal: ratón <i>wildtype</i> de la estirpe C57BL/6J.	
2.1 Inyección hidrodinámica.	



- 2.2 Seguimiento actividad luciferasa
- 2.3 Sacrificio y toma de muestras
- 2.4 Estudio de la expresión hepática de *Syt1*.
 - 2.4.1 Extracción y purificación del ARN.
 - 2.4.2 Retrotranscripción.
 - 2.4.3 Reacción en cadena de polimerasa a tiempo real.

Resultados y discusión.....	29
Conclusiones.....	35
Bibliografía.....	36
Anexo (Abreviaturas, Definiciones).....	38

Abstract

Introduction: The synaptotagmine 1 is a synaptic vesicle integral membrane protein found in the nervous system which functions has been researched in other tissues and systems as well as its possible implications in neurological diseases and currently in hepatic steatosis.

Material, methods: murine hepatic *Syt1* was cloned in a plasmid containing a hepatic specific promoter, a luciferase gene reporter and a kanamycin resistance gene (pLIVE.luc) for bacteria selection by using the Takara Bio USA In-Fusion® HD Cloning kit. After that, *Syt1* presence and function was verified by different methods including cell culture and animal experimentation.

Results and discussion: *Syt1* was successfully cloned and the transfection proves control's expression and case's overexpression proving that *Syt1* is expressed in liver and a successful overexpression.

Conclusions: The plasmid design is satisfactory, the luciferase is a good plasmid functional marker prior to mRNA gathering and the pLIVE promotor proves to be hepatic tissue specific.



Resumen

Introducción: La sinaptotagmina1 es una proteína integral de membrana de las vesículas sinápticas encontrada en el sistema nervioso sobre la cual se ha investigado otras posibles funciones en distintos órganos y sistemas así como su implicación en distintos modelos de enfermedad a nivel neurológico y en la actualidad, en la esteatosis hepática.

Material, métodos: El gen hepático murino *Syt1* fue clonado en un plásmido que contenía un promotor específico de hepatocito, un gen reportero de luciferasa y un gen de resistencia a la kanamicina (pLIVE.luc) para la selección bacteriana utilizando el In-Fusion® HD Cloning kit de TakaraBio USA. Tras ello, la presencia y función de *Syt1* se verificó con diferentes métodos incluyendo cultivo celular y experimentación animal.

Resultados y Discusión: Se ha clonado con éxito *Syt1* y la transfección demuestra expresión en los controles y sobreexpresión en los casos demostrando la expresión normal hepática de *Syt1* y la sobreexpresión exitosa.

Conclusiones: El diseño del plásmido es satisfactorio, la luciferasa es un buen marcador del funcionamiento del plásmido previo a recolección del ARNm y el promotor pLIVE demuestra ser realmente específico de tejido hepático.

Palabras clave

Syt1, pLIVEluc, plásmido, clonaje, cultivo celular, ratón *wild type*

Introducción

El gen de la sinaptotagmina 1 codifica la proteína a la cual otorga su mismo nombre y que se vio por primera vez envuelta en la sinapsis neural como proteína integral de membrana vesicular capaz de detectar calcio, más adelante se conocería que se une al mismo, aparte de a otros compuestos,



para fusionar las vesículas inhabilitando el complejo CPX-SNARE (Complexina-Receptor de Proteína de fijación soluble de NSF) y favorecer la rápida liberación de neurotransmisores. Dicho complejo, de no neutralizarse, impide la unión de las vesículas a la membrana plasmática neuronal¹.

El gen de la sinaptotagmina 1 (a partir de ahora *Syt1* de hacer referencia *Mus musculus* y *SYT1* de hacer referencia al humano) varía su situación y cromosoma perteneciente según el organismo, siendo en el cromosoma 10 en el caso del ratón (*Mus musculus*) y en el cromosoma 12 en el humano (*Homo sapiens*)².

La familia de genes de la sinaptotagmina es amplia y variada respondiendo a dos definiciones clasificatorias, por un lado se puede establecer en función de la homología en sus secuencias, lo que daría lugar a una familia de 17 miembros numerados o bien, se podría definir en función de si codifica o no la estructura que se considera característica de las sinaptotagminas: un dominio amino N-terminal conectado mediante una secuencia de unión de extensión variable poco conservada a un tándem con los dominios bien conservados Carboxilo-terminal C2A y C2B que se unen al calcio³.

Las funciones de sinaptotagmina 1 así como la de sus homólogos se conocen de forma limitada. Acerca de la sinaptotagmina 1, su función más estudiada ha sido su participación en la sinapsis, no obstante, el continuo estudio de esta ha permitido conocer acción variable en el organismo de distintas especies, desde su actuación hipotalámica en el ciclo de apareamiento de la hembra del ganso⁴ hasta su aumento en la expresión en las neuronas liberadoras de gonadotropinas en el ratón macho⁵, pasando por su expresión en los podocitos renales⁶, y su regulación del poro de fisión de las células cromafines⁷ donde es indispensable para la rápida liberación de transmisores pero dispensable a la hora de unirse las vesículas⁸. Igualmente se conoce su función a nivel intestinal, donde se expresa en la zona apical de la célula regulando la endocitosis¹⁰, y su presencia a nivel hepático¹¹, donde es responsable de un aumento de la colesterolemia así como de una disminución de la esteatosis hepática, siendo su presencia regulada por el colesterol dietético y por la expresión hormonal de los ciclos ovulatorios¹². También se ha estudiado su



papel en el desarrollo del liposarcoma, donde se conoce que actúa como transportador de la vía no clásica de la proteína FGF1 (Factor de crecimiento de los fibroblastos 1), así como se especula que el gen codificante de SYT1 es tendente a la ruptura y que podría tener un papel mayor en la neoplasia⁹

En la actualidad se conoce la implicación de SYT1 en diversos modelos de enfermedad, en su mayoría neurológicos. En el caso del Alzheimer se postuló en un comienzo que favorecía la formación de depósitos de β amiloideos¹³, tras investigar más a fondo, se vio que afectaba a dicha formación si se neutralizaba su unión a la presenilina 1 lo que de facto generaba una presenilina 1 anómala que aumentaba el ratio de β amiloide^{14,15}, igualmente se conoce que está epigenéticamente disminuida la expresión de SYT1 en esta patología¹⁶. En la enfermedad de Parkinson en ratones se estudió que existía en los primeros estadios de la enfermedad un descenso del ARNm de *Syt1* en las neuronas dopaminérgicas en el núcleo estriado y la corteza motora lo cual era compatible con las alteraciones motoras observables en la misma^{17,18}. En la esquizofrenia se ha observado que el producto miR-137, asociado a factor de riesgo genético de la esquizofrenia, intenta anular a *Syt1*, además de a otros genes, disminuyendo su transcripción y por tanto alterando el tráfico sináptico vesicular además, al bloquear a miR-137, se recuperaba parte de la plasticidad neuronal¹⁹. En el trastorno de hiperactividad y déficit de atención, diferentes alelos del gen se han relacionado con susceptibilidad a la patología, comportamientos exteriorizados y heterogeneidad clínica²⁰. Se conoce incluso un caso de mutación de SYT1 en el cual el paciente adolece de distonía, corea, severo retraso del desarrollo motor y discapacidad intelectual severa pero se desconocen alteraciones de otros órganos y sistemas, lo cual sería de gran ayuda a la hora de valorar las funciones de la sinaptotagmina 1²¹.

Las funciones de *Syt1* en cerebro están ampliamente exploradas, pero no así sus funciones en el hígado, donde es una pieza clave en la regulación de la esteatosis hepática. De aumentarse su estudio en hígado como ha sucedido en el sistema neurológico, se podrían llegar a discernir vías fisiopatológicas tanto a nivel metabólico como a nivel de daño local hepatocitario. El presente experimento se enmarca dentro de un proyecto mayor que tiene como objetivo



estudiar el funcionamiento del gen murino *Syt1* a nivel hepático, su implicación sobre la esteatosis hepática y la movilización de colesterol.

Este Trabajo de Fin de Grado se focaliza no obstante en el clonaje (técnica mediante la cual se introduce un gen en un plásmido y este en bacterias para que multipliquen el plásmido y los productos codificados en este) de *Syt1* murino en un vector plasmídico y la demostración de su funcionamiento cultivo celular con células HepG2 y posteriormente en modelo animal experimental de ratón *wildtype* de la estirpe C57BL/6J.

Objetivo

Clonaje gen murino *Syt1* y demostración de su funcionamiento en cultivo celular con células HepG2 y modelo experimental animal de ratón *wildtype* de la estirpe C57BL/6J.

Material y métodos

I. Diseño del plásmido y clonaje de *Syt1*.

1. Obtención de la secuencia codificante de *Syt1* mediante amplificación con reacción en cadena de la polimerasa.

1.1 Diseño de los primers.

Material: plásmido pLIVEluc, secuencia *Syt1*, *SnapGene*, *BLAST*
El diseño de los cebadores o *primers* se ha realizado por visualización directa de las secuencias conocidas del plásmido y el gen deseado, teniendo en cuenta que se buscaba amplificar *Syt1* y añadirle colas para permitir la recombinación en el punto de corte concreto *BamH1* del plásmido pLIVEluc (imagen del mismo y puntos de corte en el anexo) donde se insertaría. Por tanto, el *primer* directo (PrD) presenta 15 nucleótidos en común con el [plásmido pLIVEluc](#) upstreaming en la zona de corte de *BamH1* en su zona 5', más 21 nucleótidos específicos del gen de estudio *Syt1* en su extremo 3' y para el *primer* reverso (PrR) presenta 15 nucleótidos en común con el plásmido pLIVEluc downstreaming en la zona

de corte de *BamH1* en su zona 5', más 20 nucleótidos específicos del gen de estudio *Syt1* en su extremo 3'.

Los mentados *primers* se han encargado a la casa ThermoFisher™Scientific y tienen una Tm de su parte específica de *Syt1* de 60°C para ambos, ello se debe a la cantidad de guanina y citosina presentes en los *primers* lo cuales importante a la hora de programar la PCR. A continuación se observa su diseño.

	Cola para recombinación.	Zona para amplificación de <i>Syt1</i>
PrD	5'- CCA GTC GAC TCC CGG	AAC TGT GTG TGC AGT CTG TGT -3'
PrR	5'- AAT TCG AGA GCT CTG	TAT GTG GGC AGA CGC AGA AA-3'

1.2 Reacción en cadena de la polimerasa.

Material: Inventariable: micropipetas, termocicladora PT-100 MJ Research.

Fungible: Taq HS polimerasa, Cl₂Mg, dNTPs, *Primer Directo*, *Primer Reverso*, *Buffer*, H₂O libre de nucleasas, *In-Fusion® HD Cloning kit*, puntas de pipeta libres de nucleasas, *ependorf®*.

Biológico: plásmido que contenía *Syt1* a 1 ng/μl

Se procedió a realizar una PCR (definición y explicación completa de la reacción en cadena de la Polimerasa en el anexo) para amplificar *Syt1* con el Clone Amp HiFi PCR premix del *In-Fusion® HD Cloning kit* de TakaraBio USA proporcionado a tales efectos y con los componentes para PCR convencional de Thermofisher™.

Se prepararon las reacciones por duplicado y se hizo un blanco para cada tipo de reacción con las siguientes medidas individuales y el programa utilizado en la termocicladora PTC-100 fue para la fase de inicialización (necesaria para la Taq polimerasa) a 95°C durante 1' seguido de 40 ciclos de 3 fases cada ciclo, la primera fase de desnaturalización a 95°C durante 30", la segunda fase de alineación a 60 °C durante 30" y la tercera fase de extensión a 65°C durante 3', una vez completados, se produjo la elongación a 72°C durante 15'.

In Fusion® Takara	Por componentes de ThermoFisher
10 µl Clone Amp HiFi PCR premix	0,125 µl Taq polimerasa
0,4 µl <i>Primer</i> Directo	1,6 µl Cl ₂ Mg
0,4 µl <i>Primer</i> Reverso	0,2 µl dNTPs
1 µl de <i>Syt 1a</i> 1ng/µl	0,4 µl <i>Primer</i> Directo
8,2 µl de H ₂ O	0,4 µl <i>Primer</i> Reverso
	2 µl <i>Buffer</i>
	1 µl de <i>Syt1</i> a 1ng/µl
	15,275 µl de H ₂ O
Total 20 µl	Total 20 µl

1.3 Verificación, purificación y extracción del gel del producto de PCR.

Verificación:

Material: Inventariable: material electroforesis (cubeta y fuente alimentación electroforesis, peine electroforesis, cama de gel de agarosa, soporte de gel de agarosa, matraz, probeta, báscula, microondas), Gel Doc™.

Fungible: fungible electroforesis (agarosa, *buffer* 1X TBE, bromuro de etidio, *loading buffer* X6, Marcador de peso molecular de 1kb de Thermo Fisher™, papel de aluminio, *parafilm*®), puntas de pipeta autoclavadas.

Se verificó la presencia de *Syt1* en el producto de PCR mediante una electroforesis.

Se preparó un gel de agarosa al 1% pesando en la báscula sobre un papel de aluminio ya tarado 0,45 g de agarosa, por otro lado, se midieron 45 ml de *buffer* 1X TBE en una probeta y se volcó en un matraz, se introdujo la agarosa en el mismo y se calentó en el microondas hasta que no se observaron partículas de agarosa. Se preparó y niveló el soporte con la cama de geles de agarosa. Una vez se enfrió el matraz como para no quemar el bromuro de etidio pero a su vez no gelificarse, se vertió la cantidad suficiente para obtener una dilución 1/25000 de bromuro de etidio en el gel, se mezcló suavemente y

se vertió sobre la cama de gel, se retiraron las burbujas con una punta de pipeta y se colocó el peine.

Mientras gelificaba, se depositó sobre un *parafilm*® 5 µl de producto de PCR y 1 µl de *loading buffer* X6 por cada muestra a evaluar (1, 2 y blanco para cada PCR) se mezclaron con la pipeta suavemente y se cargaron en el gel ya situado en la cubeta de electroforesis y bañado en *buffer* 1X TBE, se cargó además 1 µl de Gene ruler de 1kb de Thermo Fisher™ para valorar el peso de las bandas que apareciesen.

Se cerró la cubeta, se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación y se programó a 90 V durante 30 min tras lo cual se extrajo y valoró en el Gel Doc™ haciéndose una fotografía.

Purificación por gel del producto de PCR:

Se procedió a purificar la PCR resultante para eliminar productos de PCR no deseados, como pueden ser los fragmentos incompletos.

En primer lugar se procedió a la separación en gel del resto del producto de PCR (15 µl). Para la preparación de la electroforesis se siguieron los pasos anteriormente descritos, a diferencia de los tiempos, para esta ocasión fue de 1 hora. A la hora de recuperar el fragmento deseado se localizó con un transiluminador el producto de PCR de manera lo más rápida posible (para evitar el daño del ADN por la radiación UV) y se cortó con un bisturí un fragmento de gel que contuviese el producto de PCR. A continuación se procedió a la extracción del producto de PCR del gel mediante una incubación con yoduro potásico y purificación con columnas (GenJet Gel extraction kit de ThermoFisher).

-Extracción del producto de PCR.

Material:Inventariable: micropipetas, microcentrífuga.

Fungible: puntas de pipeta autoclavadas, GenJet Gel extraction kit de ThermoFisher™ (*Binding Buffer, Wash Buffer, Elution Buffer*, columnas con matriz de silica), tubo de microcentrífuga.



- 1) Se añadió *Binding Buffer* en proporción 1 µl/mg de agarosa, para medir la cantidad se taró un *ependorf®* en la báscula y a continuación se introdujo en éste el gel.
- 2) Se incubó a 50-60°C en baño hasta su disolución y observación del viraje de color a amarillo.
- 3) Todo el volumen del paso anterior se colocó en columnas para a continuación centrifugarlas 60 s a 14000 rpm y, se descartó el sobrante.
- 4) Se añadió a cada columna 700 µl de *Wash Buffer* para ir eliminando material no deseado (restos de agarosa y de bromuro de etidio) y se centrifugó 60 s a 14000 rpm, se descartó el sobrante.
- 5) Se tornó a centrifugar a 60 s a 14000 rpm para eliminar cualquier resto de etanol.
- 6) Se pasó la columna a un *ependorf®* de 1,5 ml y se añadieron 25 µl de *Elution Buffer* para elucionar el ADN de la matriz, se centrifugó 60 s a 14000 rpm, este último paso se repitió una vez más a fin de obtener más producto de PCR.
- 7) Previo a su almacenaje se valoró su concentración con el *Nanodrop™* en el programa para ADN dando un resultado de 14,3 ng/µl y se almacenó a -20°C.

2. Linearización del plásmido receptor pLIVEluc.

2.1 Digestión con *BamH1*.

Material: Inventariable: micropipetas, material electroforesis, bisturí, transiluminador, Gel Doc™.

Fungible: *buffer* de la enzima *BamH1*, *BamH1*, H₂O libre de endonucleasas, *ependorf®*, puntas pipeta autoclavadas, fungible electroforesis.

Biológico: plásmido pLIVEluc.

Primero se linearizó el vector plasmídico con *BamH1* y los siguientes volúmenes de reacción por duplicado en 2 *ependorf®*:



Linearización pLIVEluc
2 µl de <i>Buffer</i> de la enzima
0,2 µl de <i>BamH1</i>
2,5 µl de pLIVEluc
15,3 µl de H ₂ O
Total 20 µl

Para purificar el plásmido, se preparó un gel de agarosa al 1% para realizar una electroforesis (ya explicada en otro apartado) y se puso la muestra junto a un Generuler de 1kb a 70 V durante dos horas y media, luego a 120 V durante una hora y más adelante a 140 V durante otra hora, con comprobaciones periódicas en el transiluminador.

Cuando la muestra estuvo lo suficientemente nítida y se comprobó que el peso molecular era el esperado para el plásmido y que por tanto estaba adecuadamente linearizado, se procedió a recortarlo con bisturí y a comprobar el resto del gel para verificar su completa extracción.

El fragmento recortado se unió a un nuevo gel de agarosa de las mismas características que el gel previo, al que se le retiró una parte similar de gel para poder introducirlo. Se hizo una nueva electroforesis a 30 V durante 12 horas.

Tras recortar de ambos geles el material de interés y verificarse en el transiluminador se fotografió en el Gel Doc™ el gel restante.

Luego se extrajo el plásmido del gel de la agarosa con el mismo protocolo y materiales descritos en la purificación de PCR de *Syt 1*, pág. 10.

Tras valorar su concentración en el Nanodrop® con el programa para ADN de medida espectrofotométrica de la absorbancia a 260 resultando 3,6 ng/µl, y considerándose esta como una concentración baja, se procedió a la precipitación alcohólica del vector.

2.2 Precipitación alcohólica del vector.

Material: Inventariable: Nanodrop®, micropipeta, congelador, centrifugadora.

Fungible: *ependorf*®, puntas de pipeta autoclavadas, isopropanol, etanol 70%, H₂O libre de endonucleasas.



- 1) Se añadió un volumen igual al que teníamos (50 µl) de isopropanol a la muestra en un *ependorf*® y se guardó a -70°C durante 15 minutos.
- 2) Se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos, (esto hace que el ADN precipite y forme un pellet en el fondo), se descartó el sobrenadante.
- 3) Se lavó con etanol al 70% (para eliminar el isopropanol que es inhibidor de enzimas) y se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante. Este paso se repitió una vez más.
- 4) Se dejó secar bien el pellet y se añadió H₂O para obtener la concentración deseada.

3. Recombinación del inserto y el plásmido.

Material: Inventariable: Termociclador PT-100 MJ Research, micropipetas

Fungible: *ependorf*®, *In-Fusion Enzyme Premix*, vector linearizado, producto de PCR *Syt1*, puntas pipeta autoclavadas.

Reacción de recombinación
2 µl 5x <i>In-Fusion Enzyme Premix</i>
6,5 µl del vector linearizado
1,5 µl de <i>Syt 1</i>
Total 10 µl

Se realizó la reacción de recombinación pipeteando las medidas especificadas y se dejó incubar durante 15 minutos a 50 °C en el termociclador.

4. Transformación de las bacterias

Material: Inventariable: cubeta hielo, micro pipetas, baño, incubador con agitador orbital, asa de siembra, estufa, mechero bunsen.

Fungible: hielo, *ependorf*®, *falcon*® de 15 ml, medio SOC, placas de cultivo de LB agar con kanamicina (50 µg/ml), puntas de pipeta autoclavadas, STE.

Biológico: *Stellar*TM *Competent Cells*.

Se siguió el protocolo de *StellarTMCompetentCells PT5055-2* de Clontech que se describe, trabajando en la sala de bacterias en proximidad a la llama por el mechero bunsen para evitar la contaminación y previa desinfección de la poyata con lejía:

- 1) Se descongeló en un baño de hielo las *StellarTMCompetentCells*.
- 2) Se extrajeron 50 µl de células *StellarTMCompetentCells* y se introdujeron en un *eppendorf*® de 1,5 ml.
- 3) Se introdujeron 2,5 µl de ADN plasmídico en el *eppendorf*®.
- 4) Se puso el *eppendorf*® al hielo durante 30 minutos.
- 5) Se proporcionó un shock térmico a las células de 45 segundos a 42°C en baño.
- 6) Se puso el *eppendorf*® al hielo 1-2 minutos.
- 7) Se precalentó medio SOC a 37°C y se le añadió a las bacterias 300µl.
- 8) Posteriormente se pasaron a un falcon® de 15 ml para incubar 1 hora a 37°C en agitación.
- 9) Tras la incubación se sembró en dos placas de LB agar con kanamicina (50 µg/ml) a dos cantidades distintas con un asa de siembra pasada por el mechero bunsen antes de cada uso para asegurar la esterilidad, una con 20 µl y otra con 200 µl. Esto se hizo para asegurar que se podría seleccionar una colonia, tanto si hubiese habido una gran respuesta a la transformación como si no.
- 10) Se incubó en estufa a 37°C durante 16 horas.

Al día siguiente se seleccionaron las colonias a estudiar de las placas y se les hizo un duplicado de seguridad a otra placa con kanamicina donde se dibujó un cuadrante, numerado en vertical y marcado con letras en horizontal.

Para hacer el traslado se tomó con una punta de pipeta cada colonia de interés, se mojó en STE y se tocó la nueva placa en el cuadrante. Se repitió esta operación con nuevas puntas de pipeta para todas las colonias seleccionadas.

Se procedió a incubar las nuevas placas a 37°C durante la noche.



5. Análisis de formas *coils* y *supercoils*.

Material: Inventariable: gradilla, vórtex, micropipeta, centrifugadora, nevera, material electroforesis, Gel Doc™.

Fungible: cloroformo, alcohol isoamílico, fenol, etanol 100%, etanol 70%, STE, TE, *eppendorf*®, fungible electroforesis agarosa, puntas de pipeta autoclavadas.

Biológico: bacterias transformadas.

Para realizar este análisis primero se procedió a la extracción mediante una bifase cloroformo-fenol del ADN de las bacterias la siguiente fórmula:

Mezcla
24 partes de cloroformo
1 parte de alcohol isoamílico
25 partes de fenol

- 1) Se resuspende cada colonia a analizar en 25 μ l de STE en un *eppendorf*® y se le añade el mismo volumen de la mezcla fenol-cloroformo descrita.
- 2) Se vortea para forzar la lisis de las bacterias.
- 3) Se centrifugó a temperatura ambiente (15 minutos a 13 000 g).
- 4) Tras la centrifugación se observan dos fases y una interfase, Se tomó la fase superior que es la que contiene el ADN plasmídico y se transfiere a un nuevo *eppendorf*®.

Una vez obtenido el ADN plasmídico se procedió a realizar el análisis de *coils* y *supercoils* mediante electroforesis.

Para ello, se tomaron muestras de 12 colonias a las que se les realizó el procedimiento, se pusieron por separado en un gel de agarosa al 1%, poniéndose 10 μ l de cada muestra con 2 μ l de *loading buffer*. Uno de los pocillos se reserva para el marcador de peso molecular de 1 kb de Termo



Fisher™ y se programó la electroforesis a 90 V por 40 minutos, visualizándose en el Gel Doc™.

6. PCR de las colonias

Material: Inventariable: micropipetas de PCR, termocicladora PT-100 MJ Research, material electroforesis, Gel Doc™.

Fungible: Taq polimerasa, Cl₂Mg, dNTPs, *Primer Directo*, *Primer Reverso*, *Buffer*, plásmido, H₂O libre de nucleasas, puntas de pipeta autoclavadas, *ependorf*®, fungible electroforesis.

A continuación se procedió a realizar una PCR específica para *Syt1* con primers diseñados en el interior del gen de *Syt1*:

PrD: ACCGTGGATTTTGGCCACGTCA

PrR: ACGTAGCGGAGGGAGAAGCAGA

Exon 7-8

Las condiciones de la PCR son las mismas que las anteriormente mencionadas en la anterior PCR a excepción de la fase de elongación, siendo esta vez mucho más corta (1 minuto), dado que el producto a amplificar era solamente de 103 nt.

Tras obtener las PCRs se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% a 90 V durante 20 minutos y con un marcador de peso molecular de 100 pb de Thermo Fisher™ en uno de los pocillos. Con ello se esperaba hallar una banda del tamaño correspondiente a *Syt1*.

7. Enzimas de restricción.

Material: Inventariable: micropipeta, microcentrífuga, Nanodrop®, baño, material electroforesis, Gel Doc™.

Fungible: puntas de pipeta autoclavadas, *kit miniprep de favorgen*®, *ependorf*®, *NdeI*, *buffer NdeI*, *EcoRI*, *buffer EcoRI*, *XhoI*, *buffer XhoI*, fungible electroforesis, Gel Doc™.



Tras la PCR, se escogió tres colonias para crecer en un volumen de 10 ml *overnight*. Al día siguiente, 850 µl de ese cultivo se almacenaron a -80 °C en presencia de glicerol al 15%. El resto del volumen se centrifugo 7 min a 6 500 g para precipitar las bacterias. Tras esto, se siguió el protocolo del *kit miniprep de favorgen®*:

- 1) Una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante, y se resuspendió el pellet en el *buffer* FAPD1 de *favorgen®* y se prosiguió tras observarse su homogenización
- 2) Se añadieron 200 µl del FAPD2 *Buffer*, se invirtió varias veces y se dejó incubar hasta que se lisaron las células sin sobrepasar 5 min.
- 3) Se añadieron 300 µl del FAPD3 *Buffer* y se invirtió para neutralizar el lisato.
- 4) Se centrifugó a 18,000 x durante 15 min.
- 5) Se transfirió el sobrenadante a una columna FAPD sobre un *ependorf®* y se centrifugó a 11,000 x g por 60 segundos. Se descartó el líquido filtrado a través de la columna.
- 6) Se añadieron 400 µl de W1 *Buffer* a la columna FAPD y se centrifugó a 11,000 x g por 60 segundos. Se descartó el líquido filtrado.
- 7) Se añadieron 700 µl de Wash *Buffer* a la columna FAPD y se centrifugó a 11,000 x g durante 60 segundos y se descartó el líquido filtrado para volver a centrifugar a 18,000 x g durante 3 minutos para secar la columna FAPD.
- 8) Se puso la columna FAPD en un *ependorf* y se añadieron 50 µl de *Elution Buffer* al centro de la membrana de la columna, se dejó incubar por un minuto y se centrifugó a 18,000 x g durante 1 minuto para elucionar el ADN plasmídico y se prosiguió con el siguiente paso.

Una vez obtenidos los plásmidos con la miniprep de *favorgen®* y con las concentraciones conocidas mediante el *Nanodrop®*, se procedió al análisis mediante enzimas de restricción.

Se prepararon las enzimas con su respectivo *buffer* a 37°C en baño y se añadieron 650 ng de plásmido y se ajustó el volumen final de la reacción a 20 µl. Se permitió su funcionamiento durante 1 hora y se procedió a evaluar las



muestras mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 90 V durante 1 hora utilizando el marcador de peso molecular *Generuler* de 1kb de Thermo Fisher™ en uno de los pocillos.

Se utilizaron las siguientes enzimas con sus respectivos *buffers* esperándose los cortes que se indican:

NdeI: genera dos fragmentos, uno de 2619 bp y otro de 5373 bp.

EcoRI, da lugar a dos fragmentos, uno de 2058 bp y otro de 5934 bp.

XhoI: lineariza el plásmido: 7992 pb.

8. Secuenciación.

Material: *NCBI Blast*, Inventariable: pipeta.

Fungible: plásmido, primer, puntas, pipeta, eppendorf®.

Tras un tamaño en el análisis de coils y supercoils adecuados, una PCR de *Syt1* positiva y un análisis por restricción también positivo Se selección una colonia para verificar finalmente por secuenciación la presencia de *Syt1*. De esta colonia se enviaron 15 ul de plásmido a una concentración de 120 ng/μl y con dos primers, para llevar a cabo la reacción de secuenciación tanto desde el extremo 5' como del extremos 3', a la unidad de secuenciación de la Universidad Complutense de Madrid.

Las secuencias obtenidas se alinearon al 95 % con el gen de estudio con el programa *NCBI Blast* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

II. Valoración funcional del plásmido *pLIVE-Syt1.luc*

1. Experimentos en cultivo celular.

1.1 Obtención del plásmido a gran escala, maxiprep.

Material:Inventariable: micropipetas, centrifugadora, incubador orbital, vórtex, recipientes de 0,5 l, recipiente para hielo,



Fungible: puntas de pipeta autoclavadas, LB, falcon®, kanamicina, hielo, kit para purificación de ADN *EndofreePlasmid Maxi* de QIAGEN® (*Buffer P1, Buffer P2, Buffer P3, QIAfiter*, émbolo, *ER Buffer, QIAGEN-tip 500, QBT Buffer, QC Buffer, QNBuffer*) isopropanol, etanol.

Biológico: bacterias

Para proseguir con el estudio se precisaba un volumen con un alto número de copias del plásmido, para ello, había que preparar cantidades ingentes de ADN plasmídico, lo cual se hizo con el kit para purificación de ADN *EndofreePlasmid Maxiprep* de QIAGEN®,.

Se siguió el protocolo que se describe a continuación:

- 1) Se tomó 1 µl de bacterias congeladas y se inoculó en un falcon® con 5 ml de LB, se añadió kanamicina y se puso a incubar a 37°C durante 8h con agitación que permitiese el intercambio, en este caso 300 rpm.
- 2) Se diluyó el cultivo en 250 ml de LB en un recipiente de 0,5 l y se reintrodujo a incubar durante la noche con las mismas características previas.
- 3) Se centrifugó a 6000 g durante 15 min y se descartó el líquido dejando el *pellet*.
- 4) Se añadió al mismo tubo 10 ml de *Buffer P1* y se usó el vórtex dando lugar a un tono azulado.
- 5) Se añadieron 10 ml de *Buffer P2* y se invirtió varias veces dejándose a incubar a temperatura ambiente menos de 5 min tornándose blanquecino y viscoso.
- 6) Se añadieron 10 ml de *Buffer P3* al lisato y se mezcló por inversión.
- 7) Se puso en la mezcla en el cartucho *QIAfiter* y se dejó incubar durante 10 min.
- 8) Se quitó el tapón del cartucho y se introdujo un émbolo, se apretó y se extrajeron 25 ml a un falcon® de 50 ml.
- 9) Se añadieron 2,5 ml del *ER Buffer* al falcon® y se mezcló por inversión, luego se incubó en hielo por 30 min.
- 10) Mientras incubaba se preparó un *QIAGEN-tip 500* con 10 ml de *QBT buffer* dejando que pasase por gravedad.



- 11) Se tomó el contenido del falcon® y se introdujo en el QIAGEN-tip 500 dejando que cayese por gravedad, se repitió hasta vaciar la totalidad del falcon®.
- 12) Se lavó el QIAGEN-tip 500 dos veces con QC Buffer 30 ml cada vez dejando que pasase por gravedad. Se descartó el líquido filtrado.
- 13) Se elucionó el ADN con 15 ml de QN Buffer.
- 14) Se precipitó el ADN con 10,5 ml de isopropanol a temperatura ambiente y se almacenó a 4°C.
- 15) Posteriormente, se sacó lo almacenado y se centrifugó a 15000 g durante 30 min desechándose el sobrenadante.
- 16) Se lavó el *pellet* de ADN con 5 ml de etanol libre de toxinas a T ambiente y se centrifugó a 15000 g durante 10 min y se descartó el sobrenadante.
- 17) Se dejó desecar el *pellet* al aire durante unos minutos y se redisolvió en TE *buffer* libre de endotoxinas.
Se alicuotó el volumen en *eppendorf*® de 1,5 ml.

1.2 Transfección de células.

Material: Inventariable: campana de flujo laminar, micropipetas, pipetas pasteur, microscopio.

Fungible: puntas de pipeta autoclavadas, placas, medio esencial *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino, penicilina, estreptomycin, L-glutamina, aminoácidos no esenciales, botellas de plástico para cultivos de 25 cm², reactivo *Tri-reagent*.

Biológico: células HepG2.

Tras obtener los resultados de la secuenciación favorables se procedió a los experimentos en cultivo celular con la línea celular HepG2.

Para el experimento las células HepG2 se sembraron en placas de 6 pocillos con 60 mm Ø, a una confluencia del 60% con medio de crecimiento de mantenimiento compuesto por el medio esencial *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina al



1%, estreptomina al 1%, L-glutamina 4 mM, aminoácidos no esenciales al 1%.

Tras unos días de crecimiento en el que se alcanzó el 80% de confluencia se retiró el medio de mantenimiento, se hizo un lavado con PBS y se transfectó cada pocillo con 300 µl del siguiente mix:

- 1) 5 µg de pLIVEluc-Syt1 en 480 µl de medio DMEM. (sería 3 µg en 300 µl)
- 2) 15 µl de *FuGENE® HD reagent* gota a gota. (9 µl)
- 3) Se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Se añadió el mix gota a gota con leve agitación.
- 5) Se completo el volumen a 2,5 ml/pocillo con medio de mantenimiento

Las células HepG2 fueron recogidas a las 48 horas tras la transfección aspirando el medio de cultivo y recogiendo las células con el reactivo *Tri-reagent* para el estudio de la expresión de *Syt1* aumentada tras la transfección.

1.3 Estudio actividad luciferasa.

Material: Inventariable: micropipetas, pipetas pasteur, placa de 96 pocillos opaca de nunc, espectómetro SPECTROstar Omega de BMG LABTECH.

Fungible: puntas de pipeta autoclavadas, Dual-Glo®Luciferase Assay System kit.

Una vez realizado el cultivo celular y recolectado, se procedió a valorar el funcionamiento de la luciferasa como marcador de expresión eficiente del plásmido y, por tanto, de ser positivo se avanzaría con el estudio de la expresión del gen de interés.

- 1) Se añadió a cada pocillo tanta cantidad de *Dual-Glo® Reagent* como volumen de cultivo se pusiese colocándolo sobre 3 muestras y 3 blancos
- 2) Se esperaron 10 minutos a que sucediese la lisis celular.
- 3) Se valoró la luminiscencia en el espectómetro SPECTROstar Omega de BMG LABTECH.



1.3.1 Expresión *Syt1* por HepG2.

Para valorar dicha expresión se siguieron los pasos descritos:

- Extracción del ARN, purificación y valoración de la calidad del ARN.
- Retrotranscripción a ADNc.
- Valoración mediante electroforesis de la banda de *Syt1*.

- **Extracción del ARN, purificación y valoración de la calidad del ARN.**

Material: Inventariable: micropipetas, centrifugadora, Nano Drop®, material electroforesis.

Fungible: puntas de pipeta autoclavadas, RNA *lysis Buffer*, *Quick-RNA™ MiniPrep* de Zymoresearch, fungible electroforesis.

Biológico: células transfectadas HepG2.

La extracción del ARN de las células se obtuvo con el RNA *lysis Buffer*.

A continuación se procedió a su purificación con el protocolo *Quick-RNA™ MiniPrep* de Zymoresearch que se muestra:

- 1) Se limpió la muestra centrifugándola a 10000 g durante 60 s.
- 2) Se añadió etanol en proporción 1:1 teniendo como muestras 2 tubos, uno con 650 µl y otro con 620 µl.
- 3) Se traspasó la mezcla a un tubo colector con una columna *Zymo-Spin™* y se centrifugó a 10000 g durante 60 segundos, se descartó y se repitió hasta filtrar la totalidad del líquido.
- 4) Para remover trazas de ADN se prelavó la columna con 400 µl con *RNA Wash Buffer* y se centrifugó a 10000 g durante 60 s.
- 5) Se añadieron 40 µl de *DNase I ReactionMix* y se dejó incubar durante 15 min para centrifugar a 10000 g durante 60 s a continuación.
- 6) Se añadieron 400 µl de *RNA Prep Buffer*, se centrifugó a 10000 g durante 60 s y se descartó.
- 7) Se añadieron 700 µl de *RNA Wash Buffer*, se centrifugó a 10000 g durante 60 s y se descartó.



- 8) Se añadieron 400 μ l de RNA *Wash Buffer*, se centrifugó a 10000 g durante 150 s y se pasó la columna a un *eppendorf*® libre de ARNasa.
- 9) Se añadieron 50 μ l de agua libre de ARNasa a la columna y se dejó 2 min antes de centrifugar a 10000 g durante 60 s. Este paso se repitió dos veces.
- 10) Se almacenó a -70°C .

- ❖ Valoración de la concentración y contaminación con sales y/o ADN, se realizó con el Nano Drop®
- ❖ Valoración de la integridad del ARN, se puso una muestra en electroforesis con un gel de agarosa libre de ARNasa (esto se consigue con tampón y agarosa exclusivos para ARN) al 1% a 90 V durante 25 min.

- **Retrotranscripción a ADNc.**

Material: Inventariable: termocicladora PT-100 MJ Research, pipetas, material electroforesis.

Fungible: puntas de pipeta, *random primer*, *Syt1*, agua libre de endonucleasas, fungible electroforesis, material PCR, *M-Mul Reverse Transcriptase*, *React Buffer*, *Ribolock RNasa*.

Una vez concluidos estos pasos preliminares, se procede a retrotranscribir el ARN linearizándolo a 65°C durante 5 min en la termocicladora con la siguiente reacción por duplicado, siendo una para *Syt1* y otra para su control:

Reacción linearización ARN	
1 μ l <i>random primer</i>	1 μ l <i>random primer</i>
500 ng de <i>Syt1</i> a 92 ng/ μ l, 5,44 μ l	500 ng de c. <i>Syt1</i> 200 ng/ μ l, 2,5 μ l
4,56 μ l de H ₂ O	7,5 μ l H ₂ O
Total 11 μl	Total 11 μl

Luego se procedió a sumar el mix descrito en la tabla azul a cada una de las reacciones anteriores una vez terminaron de linearizarse, debiendo completar entre ambos volúmenes 20 μ l para posteriormente introducirse en la termocicladora con el programa para retrotranscripción que consiste en incubación a 25°C durante 5 min seguido de 60 min a 37°C y se finaliza a 70°C durante 5 min.

Retrotranscripción
2 μ l de dNTPs
2 μ l de <i>M-Mul Reverse Transcriptase</i>
4 μ l de <i>React Buffer</i>
1 μ l de <i>Ribolock</i>
Total 9 μ l

Tras obtener el ADNc se procede realizar una PCR con los componentes por separado (medidas y tiempos en pág.7 lado derecho de la tabla, cambiando el μ l de *Syt1* por 1 de ADNc o blanco) del mismo por duplicado, una para el ADNc y otra para su control.

Se procedió a preparar un gel de electroforesis al 1% donde se puso 1 μ l de cada muestra obtenida de la PCR para valorar la presencia de *Syt1* a 90 V durante 30 min con *Generuler* de 1kb de Thermo Fisher™.

2. Experimentos en el modelo animal: ratón.

Tras comprobarse el funcionamiento del plásmido en cultivo celular se prosiguió el estudio enfocándose en la expresión de este en ratones *wildtype*.

Se adquirieron 14 ratones *wildtype* de la estirpe C57BL/6J de 7 semanas de edad siendo la mitad para control sin transfección del plásmido y la otra mitad casos con transfección.

Se mantuvieron durante la preparación previa y la totalidad del experimento en un hábitat con enriquecimiento ambiental así como alimento y agua *ad libitum* en el animalario del CIBA (Centro de Investigación Biomédica



de Aragón) y un mantenimiento acorde a la legislación vigente sobre protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 53/2013) siendo los procedimientos aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. Todos los procesos del estudio con el modelo experimental en ratón se realizaron exclusivamente en el CIBA.

A las 8 semanas de edad tuvo comienzo el experimento, el calendario seguido una vez comenzado fue el siguiente:

- 1) Día 0 Control pesos + Inicio *Western Diet* (20% grasas, 65% glúcidos, 15% proteínas) + inyección hidrodinámica.
- 2) Día 3 Inyección luciferina.
- 3) Día 5 Inyección luciferina + inyección hidrodinámica.
- 4) Día 7 Control pesos + inyección luciferina.
- 5) Día 12 Control pesos + inyección luciferina + sacrificio y toma de muestras.

2.1 Inyección hidrodinámica.

Material: Inventariable: jaulas, cepo, lámpara infrarroja.

Fungible: agujas, jeringuillas, plásmido.

Biológico: modelo experimental ratón.

Se realizaron dos inyecciones hidrodinámicas a lo largo del estudio ya que la expresión de luciferasa se había observado en experimentos previos que decaía al quinto día.

Para la realización de la misma se procedió a:

- Exponer cada jaula de ratones a luz infrarroja para promover la vasodilatación.
- Introducir cada ratón en un cepo con la cola en el exterior y proseguir la exposición a luz infrarroja hasta obtener una vasodilatación óptima.
- Localización de la vena caudal de la cola, no en los controles.
- Inyección de 2,5 ml (20 µl de plásmido) del volumen preparado, no en los controles.



- Liberación del cepo y vigilancia del estado del ratón.
- Retorno a jaula.

2.2 Seguimiento actividad luciferasa.

Material: Inventariable: cámara de cristal, bomba de isofluorano, cámara de detección de fluorescencia, jaulas.

Fungible: agujas, jeringuillas, isofluorano, luciferina.

Biológico: modelo experimental ratón.

Para valorar el funcionamiento del plásmido *in vivo* se recurrió a demostrar el funcionamiento de la región codificante de luciferasa del mismo, la forma de conseguirlo fue inyectando 1 ml luciferina en el espacio intraperitoneal del ratón previamente sedado con isofluorano a flujo 4,5, se mantuvo sedado a flujo de 2 y se introdujo por pares a los ratones en una cámara habilitada para la detección de fluorescencia, se fotografiaron verificando que los casos emitían fluorescencia mientras que los controles no y se retornaron a sus respectivas jaulas tras valorar su estado de salud. Se inyectaron un total de 4 veces siendo la última el día de sacrificio.

2.3 Sacrificio y toma de muestras.

Material: Inventariables: cámara de cristal, bomba de CO, bisturí, pinzas.

Fungibles: PBS, EDTA, formaldehído, paraformaldehído, CO, N₂ líquido.

Biológicos: modelo experimental animal ratón.

El sacrificio se realizó el día 12 del experimento tras ayuno en una cámara de cristal acoplada a una salida de CO₂. Fueron inmovilizados en posición de decúbito supino, se cortó y rebatió la piel abdominal procediéndose a la extracción de la sangre por aspiración intracardiaca.

Por centrifugación de la sangre se obtuvieron el suero y el plasma (recogido con EDTA), que se emplearon para las determinaciones bioquímicas correspondientes.

A continuación se perfundió con PBS el sistema circulatorio del animal. Rápidamente, se extrajo el hígado, se pesó y una parte se conservó en

formaldehído y/o paraformaldehído al 4% para el análisis histológico. El resto se congeló en N₂ líquido y posteriormente se almacenó a -80°C hasta el momento de su análisis.

2.4 Estudio de la expresión hepática de *Syt1*.

La expresión de *Syt1* en el tejido hepático de los modelos animales de ratón *wildtype* se valoró mediante los siguientes pasos.

2.4.1 Extracción y purificación del ARN.

Material: Inventariable: punzón, pinzas, micropipetas, centrifugadora, vórtex, recipiente para nieve, mortero para *ependorf*®, espectómetro SPECTROstar Omega de BMG LABTECH, placa para ARN.

Fungible: criotubos, nieve carbónica, papel de filtro, aluminio, puntas para pipeta autoclavadas, *kit de Quick-RNA MiniPrep Plus* de ZymoResearch™ (RNA *Lysis Buffer*, *Spin-Away*™ *Filter*, columna amarilla, columna verde *Zymo-Spin*™ *IIICG Column*, RNA *Wash Buffer*, *DNase I*, *DNA Digestion Buffer*, RNA *Prep Buffer*, RNA *Wash Buffer*, agua libre de ARNasa).

Biológico: hígados de modelos experimentales de ratón.

Para verificar la expresión de *Syt1* en el organismo de los modelos animales, se procedió a realizar una extracción del ARNm hepático mediante el protocolo descrito en el *kit de Quick-RNA MiniPrep Plus* de ZymoResearch™.

Primero se tomaron las muestras hepáticas almacenadas a -80°C en criotubos y se transportaron en un recipiente con nieve carbónica. El objetivo era conseguir una muestra menor, se conseguiría con un punzón y unas pinzas tratadas con calor seco a 120°C envueltas en papel de filtro y este a su vez en papel de aluminio que se introducirían en la nieve carbónica para descender su temperatura de modo que no aumentase la de las muestras durante su manejo, ya que de aumentar podría iniciarse la necrosis de las mismas siendo inválidas para el estudio de *Syt1*.

Se rompieron fragmentos hepáticos con el punzón y se depositaron sobre papel de aluminio enfriado en la nieve carbónica, se les puso un trozo de nieve



encima y se envolvieron. Se repitió el proceso con cada criotubo y una vez finalizado se devolvieron a su almacenaje a -80°C .

A partir de este punto, se inició el protocolo del kit Quick-RNA MiniPrep Plus de QIAGEN®.

- 1) Los fragmentos de muestras del aluminio se trataron individualmente introduciéndose en *eppendorf*® de 1,5 ml y sumergiéndose en 220 μl de RNA Lysis Buffer para ser tratados además mecánicamente con un mortero para *eppendorf*® de ese tamaño. Tras comprobación visual de la homogeneización, se introdujeron en la centrifuga a 13500 g durante 1 min. Se tomó el sobrenadante y se pasó a la columna amarilla Spin-Away™ Filter del kit previamente colocada sobre el tubo de colección (*eppendorf*® 2)
- 2) Se añadió al *eppendorf*® otros 220 μl de RNA Lysis Buffer y se volvió a centrifugar a 13500 g durante 1 min. Se transfirió el sobrenadante a la columna amarilla.
- 3) Se centrifugó la columna amarilla con el tubo colector a 13500 g durante 1 minuto 30 segundos.
- 4) Se retiró la columna y se introdujo en cada tubo colector 400 μl de etanol, se invirtió varias veces, se vorteoó y se introdujo en la centrífuga a 13500 g durante 1 minuto. Se volcó el sobrenadante a la columna verde Zymo-Spin™ IIICG Column.
- 5) Se centrifugó la columna verde a 13500 g durante 1 minuto.
- 6) Se añadieron 400 μl RNA Wash Buffer a cada columna y se centrifugó a 13500 g durante 1 minuto. Se descartó el líquido filtrado.
- 7) Se preparó un mix con 5 μl de DNase I y 75 μl de DNA Digestion Buffer por muestra, sumando un total de 65 μl de DNase I y 975 μl de DNA Digestion Buffer. Se añadieron 80 μl a la matriz de cada columna y se dejó incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 8) Se centrifugó a 13500 g durante 1 minuto y se descartó el líquido filtrado.
- 9) Se añadió a cada columna 400 μl de RNA Prep Buffer, se centrifugó a 13500 g durante 1 minuto y se descartó.



- 10) Se añadió a cada columna 400 µl de RNA Prep Buffer, se centrifugó a 13500 g durante 1 minuto y se descartó.
- 11) Se añadió a cada columna 700 µl de RNA Wash Buffer, se centrifugó a 13500 g durante 1 minuto y se descartó.
- 12) Se añadió a cada columna 400 µl de RNA Wash Buffer, se centrifugó a 13500 g durante 2 minutos y se descartó.
- 13) Se transfirió la columna a un *ependorf*® y se añadió a cada columna 40 µl de agua libre de ARNasa, se incubó 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13500 g durante 1 minuto.
- 14) Se repitió el paso previo, se desechó la columna y se llevaron a analizar las muestras.

Se introdujo en el espectrofotometro SPECTROstar Omega de BMG LABTECH 1 µl de agua en cada pocillo para limpiar la placa, luego se retiró y se introdujo por duplicado 1 µl de agua para el blanco más 1 µl por duplicado de cada muestra para su análisis de la concentración y el ratio de pureza, tomándose como aceptable para el último de ser mayor de 1,7.

2.4.2 Retrotranscripción.

Igual que en pág 21 para cada componente.

2.4.3 Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa.

Material: Inventariable: micropipetas, Real Time PCR system, Step One plus™.

Fungible: puntas de pipeta autoclavadas, placas de tubos de 200 µl aptos para uso RT-PCR y tapas de tubos optical caps kit de SYBR Green® de *Applied Biosystems*™.

Biológico: DNAc.

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el kit de SYBR Green® de Applied Biosystems™. En cada pocillo de la placa se puso 1 µl de ADNc a la dilución elegida y se añadió el mix (11,5 µl) con el resto de los reactivos, (SYBRgreen®, agua y los primers) durante su preparación se hubo de proteger el SYBR green® de la luz cubriéndolo con papel de aluminio. Una vez cargada la placa, se centrifugó y se puso en el equipo para PCR cuantitativa.



Se analizaron los datos obtenidos normalizándolos con una recta de calibrado hecha con un gen *housekeeping*, en este caso fue el de la ciclofilina B, valorando el promedio de cada muestra y su desviación estándar por si hubiese resultados contradictorios para un mismo ADNc de un mismo modelo experimental de ratón, realizándose este proceso con las 13 muestras existentes.

Resultados y discusión.

Los resultados de las distintas fases del experimento se describen a continuación haciendo mención de su pertenencia a los diferentes apartados sopesando el valor de los mismos y su relevancia.

I, Apartado 1.2. PCR.

Dado que el inserto de *Syt1* tiene un peso de 1334 pares de bases y se sitúa en la imagen entre las franjas 1000 y 1500 pero más próxima a esta última, se consideró la PCR satisfactoria. Igualmente se pueden observar múltiples bandas de menor relevancia por encima y por debajo de los pares de bases adecuados, se deduce que son productos de exceso de unión de dNTPs o carencia no siendo útiles para el estudio.



Fig.1 Gel de electroforesis de *Syt1* con reseña de GeneRuler.

Apartado 1.3. Extracción del gel.

Podría parecer en la imagen que la banda extraída tiene diferente franja que la de *Syt1* expuesta previamente, en realidad, al mantener durante una mayor periodo de tiempo la electroforesis se han “escapado” del gel algunas bandas siendo las que se observan más oscuras la franja para 1000 bp y para 3000 bp.

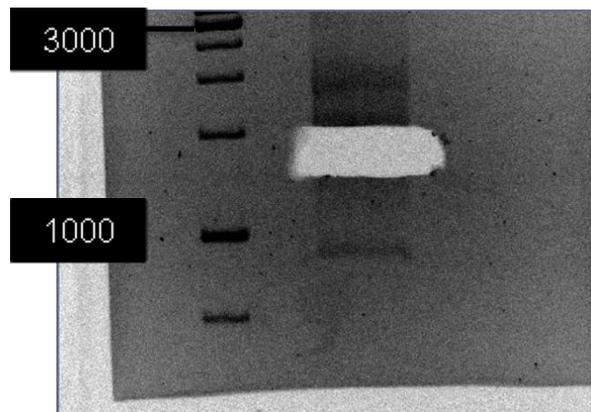


Fig.2 Gel de electroforesis con banda de *Syt1* extraída.

Apartado 3 Reacción de clonaje.

Las siguientes imágenes muestran como el plásmido obtenido presentaba un tamaño congruente con lo esperado y que en el segundo recorte quedó material.

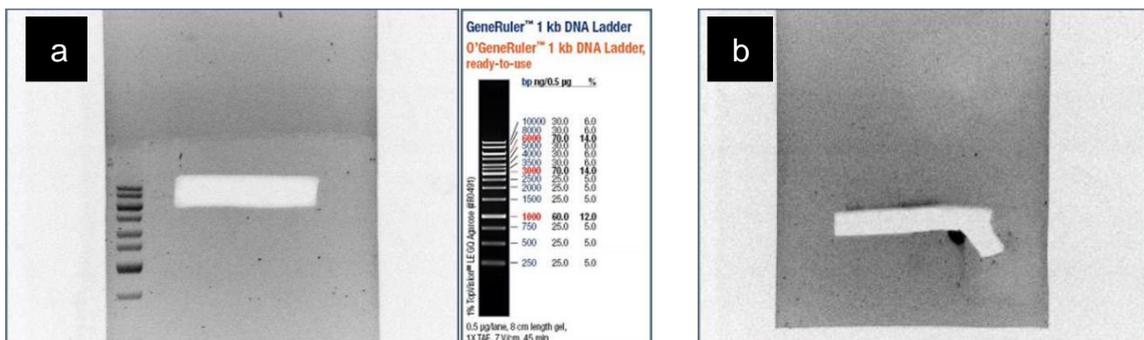


Fig. 3a) Gel de electroforesis del plásmido y recorte de éste, situándose por encima y por debajo de las bandas 6000 bp y 8000 bp. b) Segundo gel de electroforesis del plásmido y recorte.

Apartado 5 Análisis de coils y supercoils.

La electroforesis de coils y supercoils fue la de la siguiente imagen, como se puede observar, no fue el resultado esperado, lo cual se consideró que se

debía a un exceso de sales y de fenol en la muestra por lo que se prosiguió con el estudio.

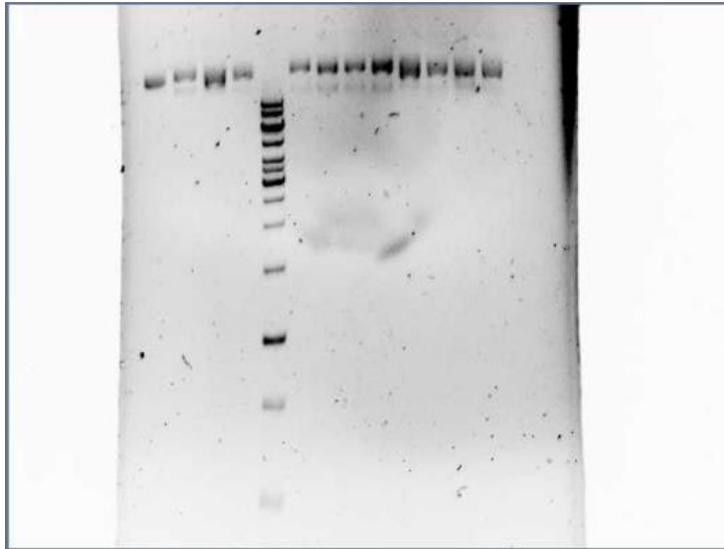


Fig. 4. Gel de coils y supercoils no concluyente.

Apartado 6 PCR de las colonias.

La banda de *Syt1* que se observa es de un tamaño menor al esperado, se prosigue con el estudio.



Fig. 5. Gel de electroforesis de la PCR de las colonias con banda de *Syt1*.

Apartado 7 Enzimas de restricción.

Se procedió a analizar las colonias b2, b3 y c4 con las enzimas de restricción observando los cortes esperados para las respectivas enzimas aunque debido a un exceso de carga de material, las bandas se observan más gruesas de lo que debiesen, no obstante se prosiguió con el estudio.

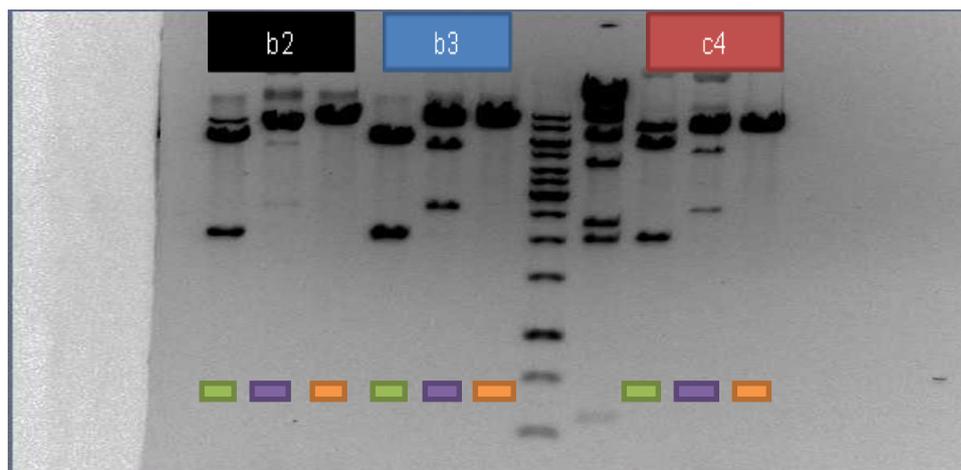


Fig. 6. Gel de electroforesis del plásmido de las colonias b2, b3 y c4 tratado con las enzimas de restricción *NdeI*, *EcoRI* y *XhoI*.

Apartado 8 Secuenciación.

Se obtuvo la secuenciación de *Syt1* y se introdujo en el programa BLAST de la NCBI recuperando en los resultados concordancia con las distintas transcripciones de *Syt1* en *Mus musculus* con un *querycover* (cuánto se ha abarcado) del 99% y una identidad (cuánto se asemeja) del 95% por lo que se puede afirmar que el plásmido alberga *Syt1*.

Aparatado 1.3 Estudio actividad luciferasa.

Los resultados obtenidos en la medición con el espectrofotómetro se estimaron satisfactorias y se prosiguió a la extracción del ARNm.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3
1 Medida	75	138	93	0	0	0
2 Medida	125	138	131	1	0	4

Apartado 1.4 Expresión *Syt1* por HepG2.

Tras extraer el ARNm se valoró la calidad del mismo obteniendo una concentración de 92 ng/μl y un ratio de contaminación de 1,99.

La electroforesis demostró la integridad del ARNm apareciendo dos bandas correspondientes al ARN ribosómica y una del tamaño que se esperaría para el ARNm de *Syt1*.

Una vez realizada la retrotranscripción, se valoró mediante electroforesis la aparición de una banda congruente con *Syt1*, aparece banda en el blanco porque no sobreexpresa el gen pero sí lo expresa, nótese la diferencia entre ambas.

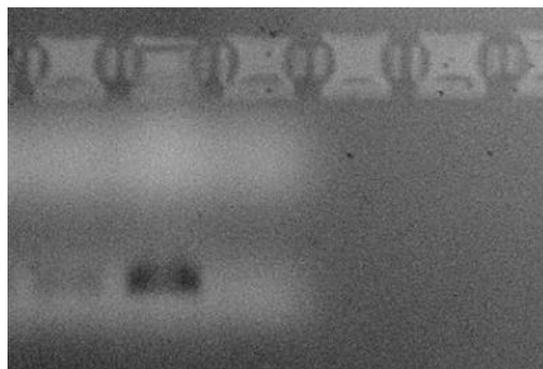


Fig. 7. Gel de electroforesis del ADNc donde se observa banda compatible con *Syt1*.

Apartado 2.2 Seguimiento actividad luciferasa.

Se demostró la expresión del plásmido en modelo animal de ratón y por tanto, una inyección hidrodinámica satisfactoria evaluando la capacidad de fluorescencia del tejido hepático tras la administración de luciferina.

	2º DÍA		4º DÍA	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
<i>Syt1</i>	3589142,86	3130021,85	747812,143	677652,664
Control	7717	2936,11904	7501,16667	1293,12996
	7º DÍA		12º DÍA	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
<i>Syt1</i>	2386742,86	1938031,63	303897,857	256622,47
Control	7583,83333	1865,41727	6307,55	0

Tabla que muestra los valores promedio y las derivaciones estándar de luz captada tras la inyección de luciferina

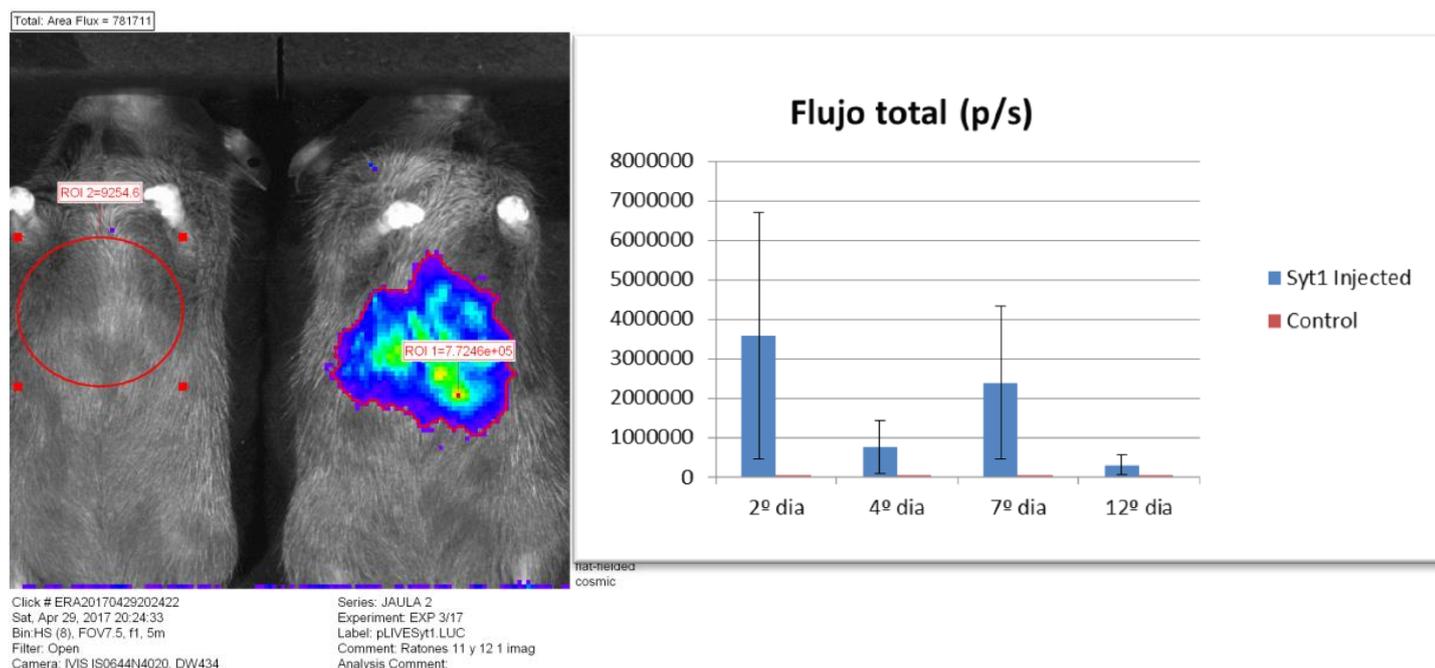


Fig. 8 Izq. Expresión de luciferasa en modelo experimental de ratón mediante el uso de luciferina. Dcha gráfica representativa de la captación de luz para casos y controles.

Los datos obtenidos muestran además la necesidad de una segunda inyección hidrodinámica y por tanto, una segunda transfección hepática al decaer la capacidad de uso de la luciferina inyectada, lo que implica una menor expresión del plásmido que a su vez repercutiría en la sobreexpresión de *Syt1*.

Apartado 2.4.3 Reacción en cadena de polimerasa a tiempo real.

La gráfica normalizada de la qPCR con el gen *housekeeper* de la ciclofilina B demuestra una sobreexpresión satisfactoria de *Syt1* en los casos y una expresión significativamente menor en los controles, lo cual se debe a que el hígado de los modelos experimentales, ya sean casos o controles, expresan *Syt1*, reafirmando la existencia de un gen hepático *Syt1*.

La utilidad de la sobreexpresión se debe a la posibilidad de estudio tanto del hígado como de otras muestras tomadas como son los sueros para delimitar las funciones de *Syt1* en modelos experimentales de ratón *wildtype*.

Desgraciadamente no se han podido analizar dichas muestras en el presente TFG por falta de tiempo.

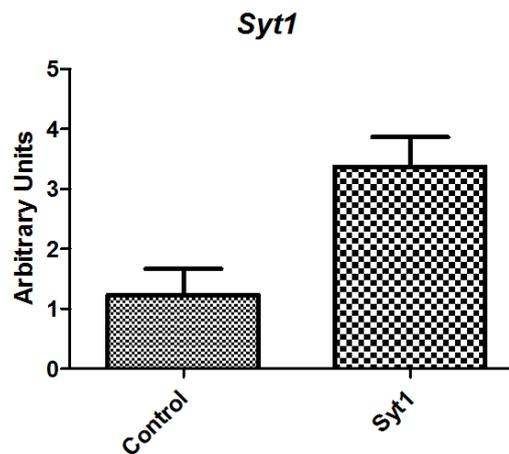


Fig 12. Gráfica normalizada expresión de *Syt1* con el gen housekeeper de la ciclofilina B.

Conclusiones

1. La expresión de *Syt1* se produce en distintos órganos y sistemas siendo los modelos de enfermedad un interesante punto de referencia para la investigación.
2. El promotor pLIVE funciona satisfactoriamente permitiendo la entrada del plásmido en hígado y el diseño plásmídico actual garantiza el clonaje.
3. El cultivo celular es de gran ayuda preliminar para verificar el funcionamiento del plásmido previa a la transfección de modelos experimentales.
4. El gen codificante de luciferasa es útil a la hora de valorar el funcionamiento del plásmido previa toma de muestras para evitar sacrificios de modelos experimentales sin transfectar.
5. La inyección hidrodinámica permite la entrada de suficiente plásmido a hígado y se requiere para estudios superiores a cuatro días una segunda inyección.
6. El sacrificio con CO₂ es adecuado y humano así como útil para la toma de muestras.
7. La qPCR permite valorar y comparar las muestras de ADNc de forma satisfactoria.
8. Los hepatocitos expresan *Syt1* y se ha conseguido producir una sobreexpresión del gen.



Bibliografía

1. Krishnakumar S, Kümmel D, Jones S, Radoff D, Reinisch K, Rothman J. Conformational Dynamics of Calcium-Triggered Activation of Fusion by Synaptotagmin. *Biophysical Journal*. 2013;105(11):2507-2516
2. Craxton M. Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes. *BMC Genomics* [Internet]. 2004;5(1):43. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/5/>.
3. Craxton M. A manual collection of Syt, Esyt, Rph3a, Rph3al, Doc2, and Dblc2 genes from 46 metazoan genomes - an open access resource for neuroscience and evolutionary biology. *BMC Genomics* [Internet]. 2010;11(1):37. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/37>.
4. Luan X, Luo L, Cao Z, Li R, Liu D, Gao M et al. Molecular cloning and expression analysis of the Synaptotagmin-1 gene in the hypothalamus and pituitary of Huoyan goose during different stages of the egg-laying cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology* [Internet]. 2014;12(1):83. Available from: <http://www.rbej.com/content/12/1/83>.
5. Vastagh C, Rodolosse A, Solymosi N, Farkas I, Auer H, Sárvári M et al. Differential Gene Expression in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons of Male and Metestrous Female Mice. *Neuroendocrinology*. 2015;102(1-2):44-59.
6. Pattaro C, De Grandi A, Vitart V, Hayward C, Franke A, Aulchenko Y et al. A meta-analysis of genome-wide data from five European isolates reveals an association of COL22A1, SYT1, and GABRR2 with serum creatinine level. *BMC Medical Genetics* [Internet]. 2010;11(1). Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/11/41>.
7. McAdam R, Varga K, Jiang Z, Young F, Blandford V, McPherson P et al. The juxtamembrane region of synaptotagmin 1 interacts with dynamin 1 and regulates vesicle fission during compensatory endocytosis in endocrine cells. *Journal of Cell Science*. 2015;128(12):2229-2235.
8. Kedar G, Munch A, van Weering J, Malsam J, Scheutzwow A, de Wit H et al. A Post-Docking Role of Synaptotagmin 1-C2B Domain Bottom Residues

- R398/399 in Mouse Chromaffin Cells. *Journal of Neuroscience*. 2015;35(42):14172-14182.
9. Egan J, Barrett M, Champion M, Middha S, Lenkiewicz E, Evers L et al. Whole Genome Analyses of a Well-Differentiated Liposarcoma Reveals Novel SYT1 and DDR2 Rearrangements. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e87113.
 10. Musch M, Arvans D, Wang Y, Nakagawa Y, Solomaha E, Chang E. Cyclic AMP-mediated endocytosis of intestinal epithelial NHE3 requires binding to synaptotagmin 1. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2009;298(2):G203-G211.
 11. Sancho-Knapik S, Guillén N, Osada J. Cloning and expression of hepatic synaptotagmin 1 in mouse. *Gene*. 2015;562(2):236-243.
 12. Osada J. Diet and sexual hormones regulate hepatic synaptotagmin 1 mRNA in mice. *Frontiers in Bioscience*. 2016;8(1):129-142.
 13. Gautam V, D'Avanzo C, Berezovska O, Tanzi R, Kovacs D. Synaptotagmins interact with APP and promote A β generation. *Molecular Neurodegeneration*. 2015;10(1).
 14. Kuzuya A, Zoltowska K, Post K, Arimon M, Li X, Svirsky S et al. Identification of the novel activity-driven interaction between synaptotagmin 1 and presenilin 1 links calcium, synapse, and amyloid beta. *BMC Biology*. 2016;14(1).
 15. Zoltowska K, Maesako M, Lushnikova I, Takeda S, Keller L, Skibo G et al. Dynamic presenilin 1 and synaptotagmin 1 interaction modulates exocytosis and amyloid β production. *Molecular Neurodegeneration*. 2017;12(1).
 16. Gräff J, Rei D, Guan J, Wang W, Seo J, Hennig K et al. An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature*. 2012;483(7388):222-226.
 17. Mingazov E, Ugrumov M. Gene expression of proteins of the vesicle cycle in dopaminergic neurons in modeling of Parkinson's disease. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2016;468(1):206-208.
 18. Mingazov E, Ugrumov M. Gene expression of proteins of the vesicle cycle in the striatum and motor cortex under functional failure of nigrostriatal system. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2016;470(1):313-315.

19. Siegert S, Seo J, Kwon E, Rudenko A, Cho S, Wang W et al. The schizophrenia risk gene product miR-137 alters presynaptic plasticity. *Nature Neuroscience*. 2015;18(7):1008-1016.
20. Cupertino R, Schuch J, Bandeira C, da Silva B, Rovaris D, Kappel D et al. Replicated association of Synaptotagmin(SYT1) with ADHD and its broader influence in externalizing behaviors. *European Neuropsychopharmacology*. 2017;27(3):239-247.
21. Baker K, Gordon S, Grozeva D, van Kogelenberg M, Roberts N, Pike M et al. Identification of a human synaptotagmin-1 mutation that perturbs synaptic vesicle cycling. *Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(4):1670–1678.

ANEXO.

Abreviaturas.

Syt 1, sinaptotagmina 1.

ARNm, ácido ribonucleico mensajero.

CPX-SNARE, Complejina-Receptor de Proteína de fijación soluble de NSF.

FGF1, Factor de crecimiento de los fibroblastos 1.

miR-137, micro ARN 137.

PrD, primer directo.

PrR, primer reverso.

T_m, temperatura de fusión.

C, citosina.

G, guanina.

A, adenina

T, timina.

Taq HS, Taq polimerasa *Hot Start*.

DNTPs, nucleótidos.

PCR, reacción en cadena de la polimerasa.



TBE, tris borato y EDTA.

ADN, ácido desoxirribonucleico.

UV, ultravioleta.

LB, medio Luria Bertani.

SOC, *Super Optimal Broth*.

STE, *sodium cloruro-Tris-EDTA*.

TE, Tris-EDTA.

nt, nucleótido.

pb, pares de bases.

kb, kilobase.

NCBI National Center for Biotechnology Information.

DMEM, medio esencial *Eagle* modificado por Dulbecco.

ADNc, complementario.

CIBA, Centro de Investigación Biomédica de Aragón.

EDTA, Ácido etilendiaminotetraacético.

PBS, *Phosphate-buffered saline*.

qPCR, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

Definiciones

Sinaptotagmina 1, proteína integral de membrana vesicular capaz de detectar calcio con un dominio amino N-terminal conectado mediante una secuencia de unión a un tándem con los dominios Carboxilo-terminal C2A y C2B que se unen al calcio.

Complejo CPX-SNARE, la complexina sincroniza la liberación de neurotransmisores arrojando el proceso de ensamblaje de SNARE (Receptor de Proteína de fijación soluble de NSF), se ha visualizado mediante cristalografía con rayos X que cuando v-SNAREs (VAMP2) está a mitad camino de ensamblarse la complexina se une a esta y otras SNARE para bloquearlas.



Presenilinas 1. codifica la presenilina 1 una subunidad catalítica de un complejo gamma-secretasa, la cual cataliza la escisión intramembrana de proteínas integrales de membrana como la APP o proteína precursora de b amiloide.

Epigenética, regulación génica que actúa sobre los genes modificando su expresión pero no su secuencia, como podría ser mediante metilación de histonas.

RNA_m, ácido ribonucleico procedente de la transcripción génica para la síntesis de proteínas.

Producto miR-137, molécula de micro RNA no codificante que regula la expresión de algunos genes de forma postranscripcional afectando a la traducción y estabilidad del RNA_m.

Clonaje, técnica mediante la cual se introduce un gen en un plásmido y este en bacterias para que multipliquen el plásmido y los productos codificados en este.

Vector plasmídico, molécula de DNA circular bacteriano en el que se introducen genes para su replicación.

Cultivo celular, conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células 'in vitro', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

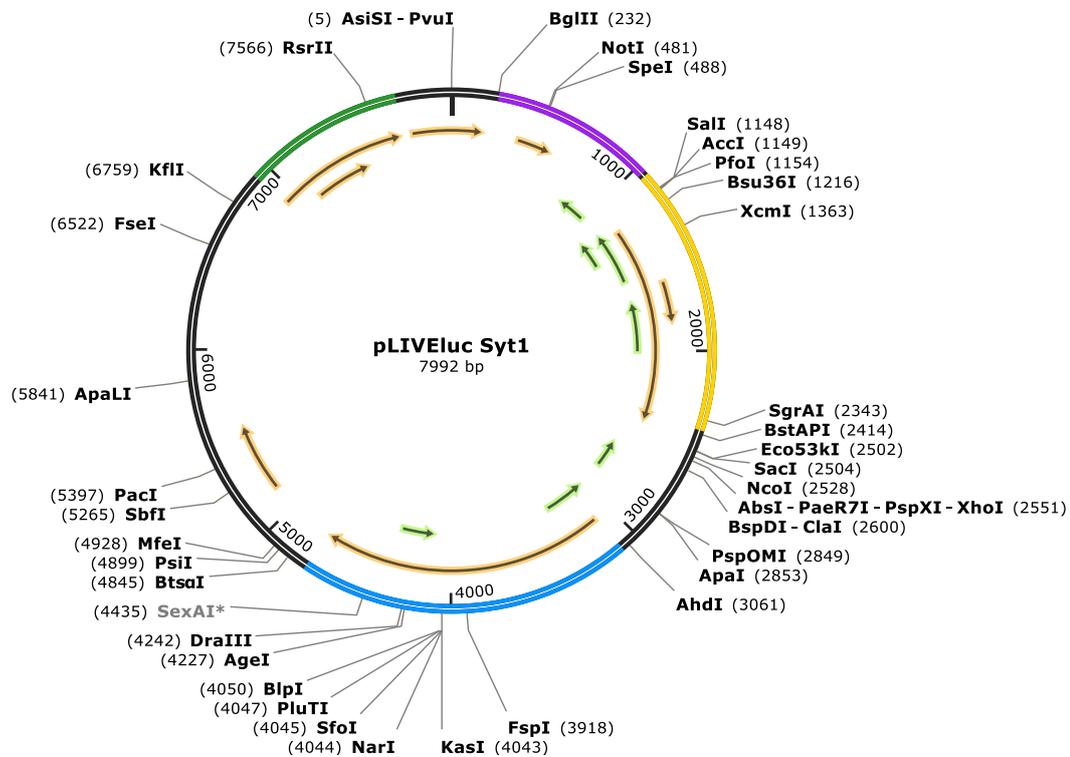
Células HepG2, línea celular perpetua que deriva de un tejido extraído de un hígado de un varón Caucásico Americano de 15 años bien diagnosticado con carcinoma hepaticocelular.

Ratón wild type, modelo experimental de ratón no modificado genéticamente.

Estirpe C57BL/6J, estirpe endogámica de ratón con expression aumentada frente a mutaciones y susceptibles mediante dieta a obesidad, diabetes mellitus 2 y arterioesclerosis.

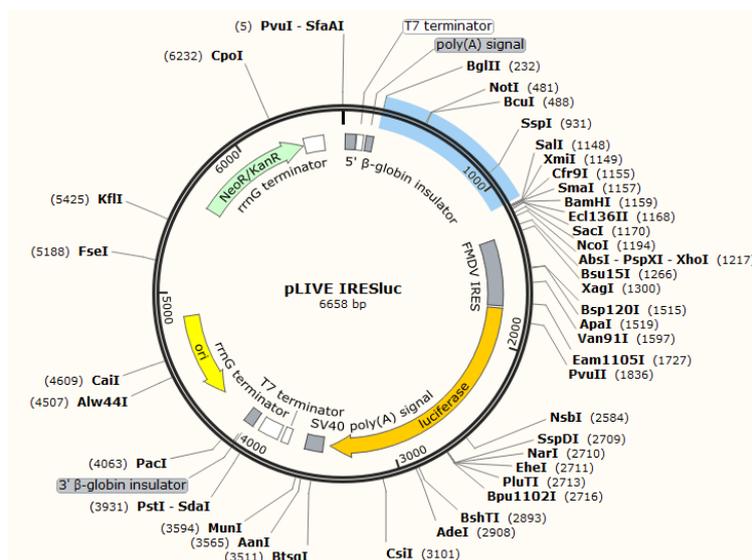


pLIVElucSyt1,. Las características inherentes de este plásmido son las siguientes con 7992 pares de bases (bp) en total



- Promotor de alta afinidad por el tejido hepático, morado.
- Resistencia a kanamicina, verde.
- Región codificante de luciferasa para evaluar si el cultivo celular y los animales expresan o no el plásmido, azul.
- Gen *Syt1*, amarillo.

Para obtener el plásmido previo se ha partido del plásmido pLIVE IRESluc para introducir el gen *Syt1*.



PCR o reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica de amplificación que precisa de Taq polimerasa, su *buffer*, primers, DNA objeto de estudio y dNTPs o nucleótidos y Cl_2Mg , luego se completa con H_2O .

A lo largo del trabajo las PCR realizadas ha sido según el siguiente esquema:

PCR
0,125 µl Taq polimerasa
1,6 µl Cl_2Mg
0,2 µl dNTPs
0,4 µl Primer Directo
0,4 µl Primer Reverso
2 µl Buffer
1 µl de DNA objetivo
15,275 µl de H_2O
Total 20 µl

Se han seguido las siguientes fases:

- Fase inicialización para aquellas Taq polimerasa (enzima ADN polimerasa) que sean Hot Start a 95 °C durante 1', esta fase sirve para activar la Taq polimerasa ya que está unida a un anticuerpo que impide su activación hasta que este se separe de la misma a dicha temperatura.
- 40 ciclos que permiten la obtención de 2^{40} copias del DNA objetivo mediante:
- La primera fase de desnaturalización a 95 °C durante 30", sirve para convertir el DNA bicatenario en monocatenario.
- La segunda fase de alineación a 60 °C durante 30", sirve para el anillamiento que implica la unión de los primers al DNA diana

- La tercera fase de extensión a 65 °C durante 3', sirve para que se unan los dNTPs a las hebras por medio de la actuación de la Taq polimerasa y se copie el DNA.
- Una vez completados, se produce la elongación a 72 °C durante 15', donde se permite la amplificación de cualquier hebra incompleta.
- Tras esto el programa entra en una fase a 4 °C por tiempo indefinido a la espera de su guardado ya que a esta temperatura se paraliza cualquier reacción.

Electroforesis, es una técnica que se basa en la carga de las moléculas y su peso, sobre un gel de agarosa, en este caso, se colocan las muestras que avanzan hacia el polo atraídas por la carga positiva y separándose las moléculas por tamaño.

Para estimar el tamaño molecular se recurren a marcadores de electroforesis de las casas comerciales donde se conoce que bandas corresponden a qué tamaño molecular.

Las muestras se cargan con el *loading buffer* que incrementa la densidad de la muestra.

El gel se forma en TBE y agarosa jugando con esta última para hacer un gel más o menos espeso y que por tanto, ofrezca una menor o mayor resistencia a su paso. A este se le añade bromuro de etidio, un agente intercalante del ADN que mediante su fluorescencia exaltada al unirse a éste permite su visualización.

Gel doc, equipo de laboratorio que permite valorar y estudiar geles de electroforesis.

Nanodrop, equipo de laboratorio que permite medir las concentraciones de ADN, ARN y proteínas con un µl de muestra, para ello se ha de hacer primero un blanco con un µl de la sustancia en la que se encuentre disuelto, limpiarlo, depositar la muestra y darle al programa de análisis que corresponda.

BamH1, enzima de restricción utilizada en laboratorio que reconoce y corta la secuencia G^AGATCC.

Medio SOC, medio de cultivo para el crecimiento de bacterias rico en nutrientes.

Placa cultivo LB medio utilizado para el mantenimiento de las cepas de E.coli recombinante en procesos de microbiología molecular

STE, *buffer* que favorece la extracción de ADN.



NdeI, enzima de restricción que reconoce la secuencia CA[^]TATG

EcoRI, enzima de restricción que reconoce la secuencia G[^]AATTC

XhoI, enzima de restricción que reconoce la secuencia C[^]TCGAG

Secuenciación, conjunto de técnicas de laboratorio que permiten conocer el orden de los nucleótidos de un fragmento de ADN.

Transfección, introducción de material genético externo en células eucariotas.

DMEM, medio de cultivo celular.

Luciferasa, enzima que en presencia de luciferina y ATP genera luz.

Espectrofómeto, equipo que mide la absorción de la luz.

Retrotranscripción, conversión de ARN en ADN.

RNAsa, enzima que destruye el ARN.

Inyección hidrodinámica, técnica que consiste en inyectar un gran volumen en la vena caudal de la cola de ratón para forzar la entrada de material a las células hepáticas.

PBS, buffer isotónico utilizado para diluir o lavar células por ser neutro para estas.

EDTA, quelante.

qPCR, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, a diferencia de la PCR mide la cantidad de ADN después de cada ciclo mediante el uso de marcadores fluorescentes que se incorporan al producto de PCR, se pueden utilizar de distintas casas comerciales y su incremento de señal es proporcional al número de copias que se generen.

La qPCR precisa para su análisis de un gen *housekeeper*, es decir que apenas se modifique en las condiciones en las que sí lo haría el gen de estudio, para realizar una recta de calibrado y normalizar los datos promedios y desviaciones estándar obtenidas mediante los procesos estadísticos que se estimen oportunos.

