



**Universidad**  
Zaragoza



Facultad de Ciencias  
**Universidad** Zaragoza

# **Clonación y sobreexpresión de genes localizados en el cromosoma 21 humano relacionados con la función OXPHOS**

---

Trabajo de Fin de grado

Biotecnología

Autor/es:

**Laura Gallego Ramírez**

Director/es:

Dra. Nuria Garrido Pérez

Departamento de Bioquímica,  
Biología Molecular y Celular

Facultad de ciencias

2021

## AGRADECIMIENTOS

*Escribo este apartado de agradecimientos a la **Dra. Nuria Garrido Pérez** por su dedicación, su apoyo, su tiempo y por darme la oportunidad de participar en este trabajo, que para mí ha sido un período de aprendizaje muy positivo personal y profesionalmente para poner fin a mi etapa académica.*

## Índice

1. Resumen/Abstract .....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1 Síndrome de Down .....	2
2.2 Fosforilación oxidativa (OXPHOS) y Síndrome de Down .....	2
2.3 Genes responsables del SD relacionados con función OXPHOS. ....	3
3. Objetivos.....	6
4. Planteamiento del trabajo.....	6
5. Material.....	7
5.1 Kits y reactivos comerciales .....	7
5.2 Cebadores.....	7
5.3 Vectores empleados.....	8
5.3.1 Vector ZERO BLUNT II TOPO® .....	8
5.3.2 Vector pWPLXD IRES NEO .....	8
6. Métodos .....	9
6.1 Preparación de cebadores .....	9
6.2 Técnicas de manipulación de RNA total .....	9
6.2.1 Técnicas de extracción de RNA total (Trizol RNA isolation).....	9
6.2.2 Técnicas de cuantificación de RNA mediante espectrofotometría .....	10
6.2.3 Obtención de cDNA a partir de RNA (RT-PCR) .....	10
6.3 Técnicas de manipulación de DNA .....	10
6.3.1 Amplificación de DNA por PCR utilizando como molde cDNA .....	10
6.3.2 Electroforesis horizontal de DNA en geles de agarosa .....	11
6.4 Clonación de los productos de PCR en el vector ZERO BLUNT II TOPO® .....	12
6.5 Transformación de bacterias competentes <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	12
6.6 PCR a partir de colonia bacteriana .....	12
6.7 Secuenciación automática del DNA y análisis de las secuencias .....	14
6.8 Clonación de los genes de interés en el vector lentiviral pWPLXD Ires Neo .....	14
7. Resultados y discusión .....	16
7.1 Análisis de la secuencia de los genes relacionados con SD .....	16
7.2 Análisis de la información obtenida de los geles de agarosa resultado de las electroforesis.....	17
7.2.1 Electroforesis horizontal en geles de agarosa 1% TAE tras la amplificación de DNA por PCR utilizando como molde cDNA .....	17

7.2.2 Electroforesis horizontal en geles de agarosa 1% TAE tras la PCR a partir de colonia bacteriana obtenidas al clonar los genes en el vector Zero Blunt II TOPO.....	18
7.2.3 Electroforesis horizontal en geles de agarosa 2% TAE para cuantificación .....	19
7.2.4 Electroforesis horizontal en geles de agarosa 1% TAE tras PCR de la colonia obtenida al clonar los genes en el vector pWPLXD IRES NEO .....	20
8. Conclusiones .....	21
Bibliografía .....	23
ANEXO I. Kits y reactivos comerciales empleados en este trabajo fin de grado	
ANEXO II. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos que codifica cada uno de los genes de estudio	
ANEXO III. Lista de cebadores y sus características	

## 1. Resumen/Abstract

El síndrome de Down es el trastorno genómico más común responsable de discapacidad intelectual y está causado por la trisomía del cromosoma 21. Este síndrome se asocia a dificultades intelectuales y cognitivas, pero hay múltiples sistemas involucrados.

En el Síndrome de Down la sobreexpresión de los genes del cromosoma 21 es la responsable de la patogénesis de esta enfermedad. Hay 222 genes que codifican para proteínas localizados en el cromosoma 21 pero en este trabajo fin de grado nos vamos a centrar en aquellos que afectan al sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) pudiendo producir un efecto negativo sobre la biogénesis mitocondrial y, por tanto, producen una disminución de la síntesis de ATP necesaria para la neurogénesis. Los genes en los que se centra este trabajo son: **BACH1**, **DYRK1A**, **RCAN1**, **NRIP1**, **PKNOX1** y **PFKL**.

El objetivo de este trabajo es conseguir clonar estos 6 genes localizados en el cromosoma 21 y relacionados con la patogénesis de la enfermedad de Síndrome de Down en vectores lentivirales de transferencia. Posteriormente, estos vectores lentivirales se usarán para la producción de partículas lentivirales y transducir con ellas células SH-SY5Y, una línea celular de neuroblastoma humano que puede diferenciarse a neurona. Finalmente, una vez clonados los genes se busca la sobreexpresión de los mismos en células SH-SY5Y, para estudiar el efecto de dicha sobreexpresión en la función OXPHOS y en la diferenciación de la línea celular SH-SY5Y a neurona.

*Down syndrome is the most common genomic disorder of intellectual disability and is caused by trisomy of chromosome 21. The syndrome is associated with intellectual and cognitive difficulties, but multiple systems are involved.*

*In Down syndrome, overexpression of genes on chromosome 21 is responsible for the pathogenesis of this disease. There are 222 genes coding for proteins located on chromosome 21, but in this final degree project we are going to focus on those that affect the oxidative phosphorylation system (OXPHOS), which can have a negative effect on mitochondrial biogenesis and therefore produce a decrease in ATP synthesis necessary for neurogenesis. The genes on which this work focuses are: BACH1, DYRK1A, RCAN1, NRIP1, PKNOX1 and PFKL.*

*The aim of this project is to clone these 6 genes located on chromosome 21 and related to the pathogenesis of Down's Syndrome disease in lentiviral transfer vectors. Subsequently, these lentiviral vectors will be used to produce lentiviral particles and transduce SH-SY5Y cells, a human neuroblastoma cell line that can differentiate into neurons. Finally, once the genes have been cloned, their overexpression in SH-SY5 cells will be sought in order to study the effect of this overexpression on OXPHOS function and the differentiation of the SH-SY5Y cell line into neurons.*

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Síndrome de Down**

El síndrome de Down (SD) es un trastorno multigénico y multisistémico cuya principal causa es una **tercera copia parcial o completa del cromosoma 21** (Hsa21) también llamada la trisomía 21 (T21). A nivel mundial, el síndrome de Down afecta a 1 de cada 1.000 a 1.100 nacidos vivos al año, siendo el trastorno genético del desarrollo más común en los seres humanos (1). A pesar de los importantes avances en el cribado prenatal no invasivo, la prevalencia del síndrome de Down se ha mantenido relativamente sin cambios durante los últimos 30 años, en parte debido al aumento de la edad de la madre gestante (2).

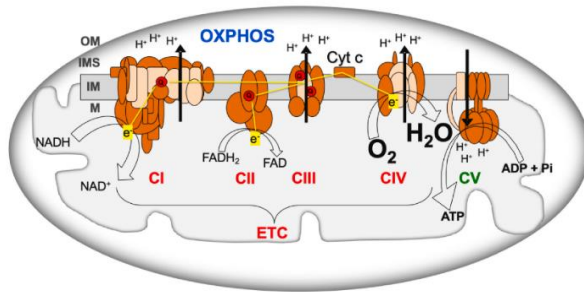
Este síndrome se asocia a dificultades intelectuales y cognitivas, pero por lo general hay múltiples sistemas involucrados, incluyendo defectos cardíacos congénitos (40-50%), hipotiroidismo, defectos de audición y visión, convulsiones y complicaciones musculares y gastrointestinales. En la edad adulta temprana, el deterioro cognitivo es común y el riesgo de demencia de inicio temprano y enfermedad de Alzheimer es alto (3).

La discapacidad intelectual es un aspecto clave en los individuos con SD ya que muestran, según los estudios una superficie cortical reducida, un volumen cerebral más pequeño y una neurogénesis deficiente (1). Además, hay una disminución de las capacidades de diferenciación neuronal y proliferación de las células progenitoras neurales y un aumento de la muerte celular que se observa ya en el periodo fetal (4). La mayoría de los estudios clínicos del síndrome de Down se centran en comprender la patogenia de la demencia de inicio temprano en adultos, mientras que los ensayos clínicos de fármacos se enfocan en mejorar la cognición y retrasar el desarrollo de la demencia en adolescentes y adultos (5).

### **2.2 Fosforilación oxidativa (OXPHOS) y Síndrome de Down**

El sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) consta de la cadena de transporte de electrones (ETC) y la ATP sintasa (complejo V, CV) localizados en la membrana mitocondrial interna. La ETC se compone de los complejos respiratorios I a IV (CI - CIV), el citocromo c y la coenzima Q. La mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas en los cromosomas nucleares (nDNA), incluidas todas las proteínas necesarias para la replicación, transcripción y traducción del DNA mitocondrial (mtDNA), las proteínas responsables del ensamblaje de los complejos OXPHOS y la mayoría de las subunidades estructurales del propio sistema. Sin embargo, en humanos, el mtDNA contiene 37 genes que codifican para 13 proteínas que forman parte del sistema OXPHOS, además de los 22 tRNAs y los 2 rRNAs necesarios para su traducción en el interior de la mitocondria. En el sistema OXPHOS los electrones de los nutrientes reducirán la coenzima flavina y nicotinamida (FAD/FADH<sub>2</sub> y NAD<sup>+</sup>/NADH) que, a través de los CI y CII respectivamente, reducirán al coenzima Q (ubiquinona/ubiquinol). Los electrones del ubiquinol reducen el oxígeno a agua a través de CIII, el citocromo c y el CIV. El flujo de electrones a través del ETC determina el consumo de oxígeno y el potencial de la membrana interna mitocondrial generado por el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (6).

Se ha demostrado que el sistema OXPHOS es el principal mecanismo que proporciona energía para alimentar la actividad neuronal (7). La función de OXPHOS también es esencial para la neurogénesis durante el desarrollo del cerebro en el periodo prenatal (8), siendo muy importante en la diferenciación neuronal (9). Por tanto, en enfermedades relacionadas con el



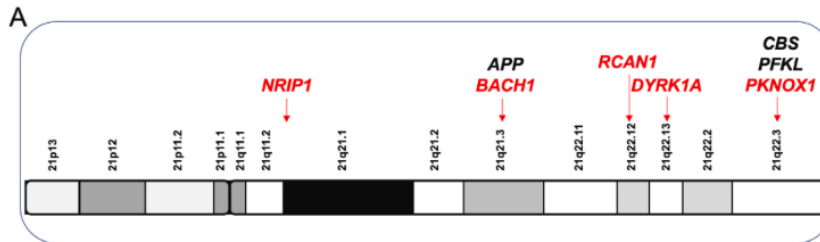
sistema OXPHOS, el sistema nervioso central se ve gravemente afectado (10). Se ha encontrado que las mutaciones patológicas en genes relacionados con la función OXPHOS en ratones y en humanos pueden alterar la diferenciación neuronal dando lugar a graves consecuencias (11).

**Figura 1.** Representación del sistema de fosforilación oxidativa OXPHOS. Imagen obtenida de (6).

Como se ha explicado anteriormente, en el Síndrome de Down la sobreexpresión de los genes del cromosoma 21 es la responsable de la patogénesis de esta enfermedad. Hay **222 genes** que codifican para proteínas localizados en el cromosoma 21 y pueden estar relacionados directa o indirectamente con la homeostasis de células, tejidos, órganos y sistemas (3). Se ha estudiado cómo algunos de estos genes juegan un papel en la expresión de otros genes y muchos de ellos están involucrados en la función del sistema OXPHOS (6). Además, en pacientes con SD, se ha observado una reducción de los niveles de ARNm de varias subunidades de los complejos del sistema OXPHOS en el cerebro y en fibroblastos. Existe también una disminución de la expresión de los genes de todos los complejos OXPHOS en corazón, fibroblastos y amniocitos en los fetos con SD de 8 a 22 semanas (12). En fetos de 14 a 22 semanas con SD se observó una reducción de la actividad de los complejos ETC y un menor consumo de oxígeno en fibroblastos, linfocitos y plaquetas (13) y una cantidad menor de coenzima Q en linfocitos, plaquetas y plasma, lo que provoca una deficiencia en la síntesis de novo de los nucleótidos de pirimidina (14). Se ha observado como todas estas modificaciones en el sistema OXPHOS producen una reducción en la producción de energía y en la función mitocondrial que se ve reflejada en diversos tejidos o tipos celulares a diferentes edades tanto en la edad adulta como en fetos. Por tanto, el SD puede ser considerado un trastorno del sistema OXPHOS (6).

### **2.3 Genes responsables del SD relacionados con función OXPHOS.**

Entre los genes del cromosoma 21 que se encuentran sobreexpresados en el SD nos vamos a centrar en aquellos que afectan a la fosforilación oxidativa pudiendo producir un efecto negativo sobre la biogénesis mitocondrial. La biogénesis mitocondrial se define como el proceso por el cual las células incrementan el número de mitocondrias mediante el crecimiento y división de las mitocondrias preexistentes. Durante el desarrollo neural, crecimiento y división de las neuronas, es necesario que las mitocondrias también crezcan y se dividan. Los genes relacionados con función OXPHOS de los que vamos a hablar son: **BACH1**, **DYRK1A**, **RCAN1**, **NRIP1**, **PKNOX1** y **PFKL**.



**Figura 2.** Localización en el cromosoma 21 de los genes que afectan a la fosforilación oxidativa OXPHOS. En color rojo aquellos que afectan de forma negativa a la biogénesis mitocondrial. Imagen obtenida de (6).

### **1) RCAN1**

El gen **RCAN1** es el **regulador de la calcineurina 1** y está localizado en el cromosoma 21 en la región 21q22.12. La proteína codificada por este gen interactúa con la calcineurina A e inhibe la vía de transducción de señales dependiente de calcineurina, que puede afectar a el desarrollo del sistema nervioso central. La sobreexpresión de RCAN1 reduce la actividad del factor nuclear de las células T activadas (NFATc) (15). Este factor nuclear actúa de forma positiva sobre el promotor del gen coactivador del receptor gamma activado por el peroxisoma (PGC-1 $\alpha$  o PPARGC1A) (16). Se ha observado que PPARGC1A es clave para la biogénesis mitocondrial y la función OXPHOS (17).

RCAN1 se expresa mayoritariamente en cerebro, corazón y músculo esquelético, en tejidos endocrinos como la glándula adrenal y el páncreas (18). RCAN1 se expande 45kb y tiene 7 exones y 6 intrones (19). Mediante splicing alternativo de los 4 primeros exones se generan las dos isoformas principales, RCAN1-1 y RCAN1-4, ya que existen dos AUG: uno en el marco del primer exón y otro en el cuarto exón (20). RCAN1-1 presenta una forma larga RCAN1-1L con 252 aminoácidos y una forma corta, RCAN1-1S de 197 aminoácidos que empieza en el exon 1 pero en un a ATG posterior. RCAN1-1S y RCAN1-4 aunque constan ambas de 197 aminoácidos, difieren en su N-terminal tal y como se ha explicado. Los últimos 168 aminoácidos de la región C-terminal, codificados por los exones 5-7, son los mismos en todas las isoformas. RCAN1-1 se expresa mayoritariamente en el sistema nervioso central mientras que RCAN1-4 se expresa principalmente en el músculo cardíaco y el riñón y en áreas del cerebro en las que la calcineurina se expresa en gran medida (21).

### **2) DYRK1A**

El gen **DYRK1A** es el gen de la **quinasa 1 regulada por la fosforilación de tirosina de doble especificidad** que se encuentra localizado en el cromosoma 21 en la posición 21q22.13(6). Este gen está sobreexpresado en diferentes tipos celulares, cerebros adultos y cerebros de fetos de individuos con SD (22). DYRK1A actúa catalizando su autofosforilación en residuos de serina/treonina y tirosina (23). La sobreexpresión de DYRK1A reduce la actividad del factor nuclear de las células T activadas (NFATc) por lo que niveles elevados de DYRK1A podrían reducir la biogénesis mitocondrial (15).

DYRK1A se expande 149.5kb y está compuesto de 17 exones. Este gen presenta dos sitios de inicio de la transcripción en los exones 1 y 2 que, mediante splicing alternativo, dan lugar a las dos isoformas mayoritarias de 763 y 754 aminoácidos. La isoforma más predominante de DYRK1A tiene 754 aminoácidos de longitud y carece de los exones 13b y 13c (22).



### **3) PFKL**

El gen de la **fosfofructoquinasa de tipo hepático (PFKL)** se encuentra localizado en el cromosoma 21 en la posición 21q22.3 (6). PFKL cataliza la conversión de D-fructosa 6-fosfato en D-fructosa 1,6-bisfosfato, que es un paso clave en el metabolismo de la glucosa (24). Se encuentra sobreexpresada en diferentes tipos de células y en el cerebro de los pacientes con SD (25). Se ha demostrado que su actividad enzimática aumenta en los glóbulos rojos y fibroblastos en individuos con SD (26). La sobreexpresión de PFK regula negativamente la neurogénesis de las células madre neurales ya que inhibe la expresión de los factores transcripcionales pro-neuronales impidiendo su diferenciación neuronal (27). Este gen desempeña un papel fundamental en la regulación del equilibrio metabólico entre la glucólisis y la función OXPHOS(28).

PFKL está compuesto por 27 exones y mediante splicing alternativo da lugar a múltiples variantes del transcrito, entre ellas las dos isoformas predominantes de 780 y 827 aminoácidos(24).

### **4) NRIP1**

El gen proteína que interactúa con el **receptor nuclear 1 (NRIP1)** se localiza en el cromosoma 21 en la posición 21q11.2-q21.1 (6). NRIP1 codifica una proteína co-represora transcripcional localizada en el núcleo que interactúa específicamente con el dominio de activación dependiente de hormonas AF2 de los receptores nucleares (29).

NRIP1 está sobreexpresado en diferentes tipos de células de individuos con SD, se ha encontrado en cerebros fetales y fibroblastos (30). La sobreexpresión de NRIP1 en estos fibroblastos fetales con SD inhibe PPARGC1A y reduce los niveles de ARNm de muchos genes relacionados con OXPHOS afectando, por tanto, a la biogénesis mitocondrial en diferentes células y tejidos (31).

El gen NRIP1 está compuesto de 10 exones y se han descrito en Ensembl 7 transcritos producto del splicing alternativo de la secuencia codificante consenso, que dan lugar a la proteína funcional de 1158 aminoácidos (32).

### **5) PKNOX1**

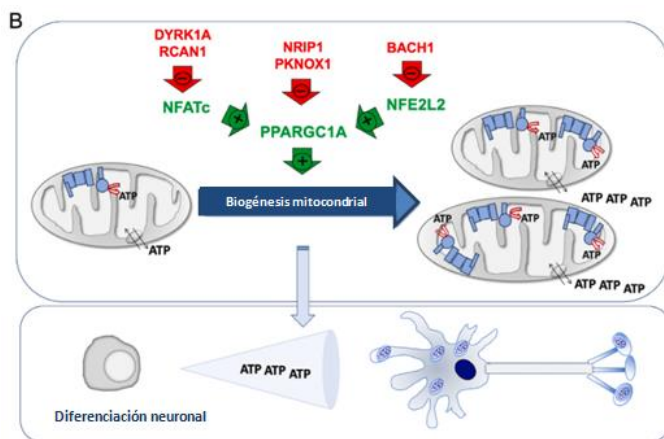
El gen **PBX/knotted 1 homeobox 1 (PKNOX1)** está localizado en el cromosoma 21 en la posición 21q22.3 (33). Este gen se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos celulares, en el cerebro fetal y fibroblastos de individuos con SD (34). PKNOX1 codifica el factor de transcripción de homeodominio Prep1 que pertenece a la familia de las proteínas TALE (three-amino-acid loop extension). Su supresión específica en el músculo conduce a una mayor expresión de las subunidades ETC, una mayor actividad enzimática y una alta expresión de PPARGC1A (35). Por lo tanto, la sobreexpresión de este gen se relaciona con un efecto negativo sobre la biogénesis mitocondrial y el sistema OXPHOS.

PKNOX se compone de 11 exones que por splicing alternativo dan lugar a 2 isoformas de 436 y 405 aminoácidos de la proteína funcional (36).

## 6) BACH1

El gen del **dominio BTB y del homólogo CNC 1 (BACH1)** está localizado en el cromosoma 21 en la banda cromosómica 21q21.3. Este gen está sobreexpresado en diferentes tipos celulares de individuos con SD y en el cerebro adulto y fetal de éstos (37). BACH1 es un factor de transcripción de unión al grupo hemo que se une a la región promotora del gen ETC y regula negativamente su transcripción, reduciendo así la respiración mitocondrial (38). BACH1 también es un represor de genes inducidos por el nuclear-eritroide 2-like 2 (NRF2 o NFE2L2) que desplaza a BACH1 y regula de forma positiva muchos genes. Además, el promotor PPARGC1A contiene secuencias consenso NFE2L2 por eso BACH1 regula negativamente la biogénesis mitocondrial (39).

El gen BACH1 está compuesto de 11 exones y se han descrito en Ensembl 13 transcritos producto del splicing alternativo de la secuencia codificante consenso que dan lugar a la proteína funcional de 736 aminoácidos (40).



**Figura 3.** Representación de los genes del cromosoma 21 que afectan de forma negativa la biogénesis mitocondrial y por tanto producen una disminución de la síntesis de ATP necesaria para la neurogénesis. Imagen obtenida de (6).

## 3. Objetivos

El objetivo de este trabajo fin de grado es conseguir clonar 6 genes localizados en el cromosoma 21 y relacionados con la patogénesis de la enfermedad de Síndrome de Down, en vectores lentivirales de transferencia.

Los 6 genes objeto de estudio son: **BACH1**, **DYRK1A**, **RCAN1**, **NRIP1**, **PKNOX1** y **PFKL**, que afectan a la fosforilación oxidativa produciendo un efecto negativo sobre la biogénesis mitocondrial. A lo largo de este trabajo se va a hacer uso de distintas herramientas de ingeniería genética para conseguir clonar estos 6 genes en vectores de amplificación en bacterias y, posteriormente, transferirlos a vectores lentivirales para la producción de partículas lentivirales y transducir células SH-SY5Y, una línea celular de neuroblastoma humano que puede diferenciarse a neurona. Lo que se busca finalmente una vez clonados los genes es la sobreexpresión de los mismos en células SH-SY5Y, para estudiar el efecto de dicha sobreexpresión, al igual que ocurre en el caso de la trisomía del cromosoma 21, en la función OXPHOS y la diferenciación de la línea celular SH-SY5Y a neurona.

## 4. Planteamiento del trabajo

Para completar el objetivo, el trabajo se ha dividido en varias fases:

- 1) Diseño y preparación de los **primers** para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los 6 genes objeto de estudio.
- 2) Obtención de **RNA** a partir de células humanas en cultivo.
- 3) Amplificación de los genes de interés a partir de **cDNA**.
- 4) Clonaje de los productos de PCR en el vector **ZERO BLUNT II TOPO®** que es un vector plasmídico de clonaje utilizado en bacterias.
- 5) Clonaje de los genes de interés en el vector lentiviral, **pWPLXD Ires Neo**, que es un vector de expresión en mamíferos, para la posterior formación de partículas lentivirales listas para transducir las células SH-SY5Y.

## **5. Material**

### **5.1 Kits y reactivos comerciales**

Todos los reactivos químicos usados en la realización de este trabajo fin de grado fueron del área de biología molecular. Los kits y reactivos comerciales utilizados están incluidos en el Anexo I.

### **5.2 Cebadores**

Los cebadores utilizados en este trabajo se diseñaron de forma manual en base a la secuencia de consenso del gen de interés disponible de Ensemble (41) y de la base de datos CCDS Database de NCBI (42). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de cada gen se incluyen en el Anexo II.

Para cada gen a partir de su secuencia de nucleótidos se diseñó un cebador forward (F) y uno reverse (R) necesarios para la amplificación de DNA por PCR. En cada cebador forward se añadió delante del ATG de la secuencia codificante del gen de interés la secuencia KOZAC (GCCACC) que es la secuencia de unión al ribosoma en eucariotas y la secuencia de corte de una enzima de restricción que no corte dentro del gen de interés y que aparece en el polylinker del vector pWPLXD IRES NEO para facilitar su clonación en dicho vector. De igual forma, en cada cebador reverse (R) se añadió en el extremo 5' la secuencia de corte de una enzima de restricción que no corte dentro del gen de interés y que aparece en el polylinker del vector pWPLXD IRES NEO.

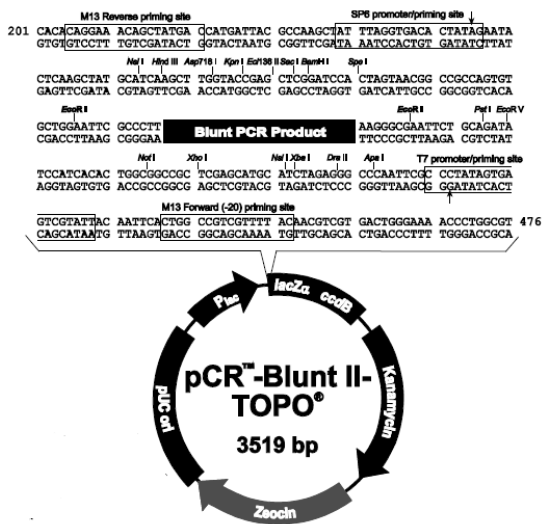
Se va a trabajar con la secuencia de dos enzimas de corte PmeI (5'GTTT/AAAC3') y BamHI (5'G/GATCC3') que aparecen en el polylinker del vector pWPLXD IRES NEO. El primer paso es estudiar para cada gen si estas enzimas cortan en su secuencia codificante. Para ello hacemos uso de la web NEBcutter2 de New England Biolabs (43). Si ninguna de las dos enzimas corta en la secuencia del gen, se añadirá la secuencia PmeI en el cebador forward y la secuencia de BamHI en el cebador reverse. Si una de estas dos enzimas corta en la secuencia codificante del gen, se introducirá la secuencia de la otra enzima de restricción que no presente sitio de restricción en el gen.

Además, para cada gen se diseñó otro cebador reverse (2R) localizado al principio de la secuencia y necesario para llevar a cabo la PCR de colonia bacteriana que será necesaria durante el proceso de verificación de la clonación. También se diseñaron para cada gen según su tamaño de nucleótidos diversos cebadores forward internos (F2, F3, F4...) para poder llevar a cabo la secuenciación completa del gen.

Para el diseño de estos cebadores se utilizó la aplicación web Oligo Analyzer de IDT (Integrated DNA Technology) (44). Esta aplicación permite verificar una temperatura de hibridación similar entre los pares de cebadores (Tm), evitar la formación de horquillas o elementos de estructura secundaria y dímeros entre oligonucleótidos. Además, se calculó la Tm de los pares de cebadores F y R de cada gen que recomienda la página web Thermo Fisher Tm Calculator (45) teniendo en cuenta la secuencia Kozac y de los sitios de restricción de las enzimas para el clonaje o sin tener en cuenta esta secuencia, ya que la polimerasa que se va a utilizar es la Phusion Hot Start de Thermo Fisher. El Anexo III contiene una tabla con todas las secuencias de los primers diseñados de cada gen donde se incluye la Tm teórica calculada con IDT, número de nucleótidos del primer y contenido en GC y otra tabla con la Tm calculada por Thermo Fisher Tm Calculator para los pares de primers sin sitios de corte y con sitios de corte incluidos.

### 5.3 Vectores empleados

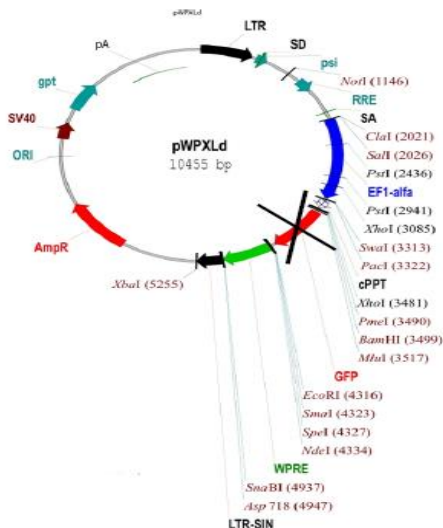
#### 5.3.1 Vector ZERO BLUNT II TOPO®



El vector plasmídico de clonaje utilizado para la clonación de los productos de PCR fue, en todos los casos el **Zero Blunt II TOPO®** suministrado en el kit de Invitrogen™ “PCR Cloning Kit, Bunt II”. Esta estrategia de clonación permite en un solo paso la inserción directa de productos de PCR de extremos romos en un vector plasmídico (46). Este vector confiere resistencia a dos antibióticos: kanamicina y zeocina. En este trabajo será usada la resistencia a kanamicina para la selección de las bacterias que han incorporado el vector de clonaje.

**Figura 4.** Mapa donde se muestran las características del vector pCR™- ZERO Blunt II- TOPO®. Los sitios de restricción están etiquetados para indicar el sitio de clonación real y las flechas indican el inicio de la transcripción para las polimerasas T7 y SP6. Imagen obtenida de (46).

#### 5.3.2 Vector pWPLXD IRES NEO



El objetivo final del proyecto es conseguir transferir los genes de interés a la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano a través de partículas lentivirales. Estos **vectores lentivirales** son modificados genéticamente para perder la capacidad de transcribirse una vez transferido el genoma vírico a la célula diana, evitando así que se formen partículas recombinantes competentes. En la construcción de estos lentivirus son necesarios varios elementos: un vector de transferencia, en el que se clona el gen de interés para su expresión en células diana, un vector de empaquetamiento y un vector de envoltura. En este trabajo de fin de grado

**Figura 5.** Mapa donde se muestran las características del vector pWPLXD Ires Neo. En esta imagen se ha marcado con una cruz el lugar donde se ha sustituido GFP por la resistencia a Neomicina. Imagen obtenida de (47).

se hará la ligación de los insertos de cada gen de interés con el vector lentiviral de transferencia **pWPLXD Ires Neo** que es el vector **pWPLXD de la casa Addgene™** modificado en nuestro laboratorio ya que se ha eliminado el gen que codifica GFP e introducido un gen de resistencia a neomicina en su secuencia quedando con un tamaño final de 11331pb.

## **6. Métodos**

### **6.1 Preparación de cebadores**

Los cebadores previamente diseñados se reciben de forma liofilizada de la casa comercial Metabion International AG por lo que se debe preparar la disolución adecuada para su uso posterior. Todos los cebadores se resuspendieron primero con Agua MiliQ para obtener una concentración final de 250  $\mu$ M. Posteriormente, se preparan desde esas disoluciones madre disoluciones de concentración 10  $\mu$ M que son las que serán empleadas de forma continuada para las PCRs y disoluciones de concentración 5  $\mu$ M para la comprobación de la secuencia de los genes clonados mediante su secuenciación. De esta forma se asegura el mantenimiento de la disolución original y se evita su deterioro por sucesivas descongelaciones y congelaciones.

### **6.2 Técnicas de manipulación de RNA total**

#### **6.2.1 Técnicas de extracción de RNA total (Trizol RNA isolation)**

Para la extracción de RNA de un pellet de células 293T o SH-SY5Y se utiliza el método basado en el reactivo TRIZOL® de Invitrogen. En primer lugar, se realiza el lisado de las células del pellet con 500  $\mu$ L de TRIZOL, que mantiene la integridad del RNA mientras afecta a las células y disuelve los componentes celulares. A continuación, se homogeneiza, se resuspende y se invierte fuertemente de forma manual. El homogeneizado se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente para completar la separación de complejos entre proteínas y ácidos nucleicos.

Posteriormente, se lleva a cabo la fase de separación del RNA del resto de compuestos celulares. Tras la adición de 100  $\mu$ L de cloroformo que separa la fase acuosa de la fase orgánica, incubación 2-3 min a 15-30°C y centrifugación a 12000 g durante 15 min a 4°C, se obtiene el RNA en la fase acuosa. Se obtienen 3 fases: una fase orgánica inferior con los lípidos, una interfase con proteínas desnaturalizadas y una fase acuosa superior con RNA sobretodo pero que también contendrá algo de DNA y de glúcidos. Para precipitar el RNA, se transfiere la fase acuosa a un nuevo eppendorf y se adicionan 250  $\mu$ L de isopropanol frío. De nuevo se incuba 10 min a 15-30°C y se centrifuga a 12000 g durante 10 min a 4°C.

A continuación, se lava el RNA. Para ello se retira el sobrenadante y el pellet que queda se lava con 500  $\mu$ L de etanol al 75% en agua destilada estéril GIBCO (para evitar la degradación de RNA por RNAsas), y se centrifuga a 7500 g durante 5 min a 4°C. Para la redisolución de RNA se retira de nuevo el sobrenadante y el pellet se deja secar al aire durante unos minutos hasta evaporar completamente el etanol. Finalmente, se redisuelve el RNA en 100 $\mu$ L de agua libre de RNAsas y se incuba durante 30-45 min a 55-60°C en el termoblock *Thermomixer comfort* y agitación 450rpm para asegurar la correcta disolución.

### 6.2.2 Técnicas de cuantificación de RNA mediante espectrofotometría

Para determinar la concentración y pureza del RNA total extraído, se emplea el espectrofotómetro NanoVue™. La relación de las absorbancias obtenida a 260nm y a 280nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) debe ser =2 para la pureza del RNA. Para realizar las medidas se depositan 3  $\mu$ L de la disolución de RNA extraído del pellet de células 293T o SH-SY5Y obteniendo una concentración de 743 ng/ $\mu$ L y 891,2 ng/ $\mu$ L respectivamente. Posteriormente, las muestras de RNA se almacenan hasta su utilización a -80°C para mantener su estabilidad.

### 6.2.3 Obtención de cDNA a partir de RNA (RT-PCR)

Para obtener DNA complementario (cDNA) desde el RNA total extraído se usó el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* de ROCHE siguiendo las instrucciones del fabricante. Partiremos del RNA extraído de las células 293T (743ng/ $\mu$ L) y de RNA de células SHSY5Y (891,2 ng/ $\mu$ L). En este kit comercial se utilizó el oligonucleótido con cola poli-T Oligo dT18 que reconoce específicamente a los RNAs mensajeros presentes en la muestra. La cantidad de RNA de partida añadido a la reacción para obtener cDNA fue 1  $\mu$ g. El proceso se desarrolló en el termociclador 3000 Thermocycler de Biometra.

## 6.3 Técnicas de manipulación de DNA

### 6.3.1 Amplificación de DNA por PCR utilizando como molde cDNA

La reacción en cadena de la polimerasa se utilizó para obtener múltiples copias de los fragmentos de DNA de los genes de interés utilizando como molde el DNA complementario (cDNA) obtenido previamente. En estas reacciones de PCR se va a hacer uso de la ADN polimerasa Phusion Hot Start II de Thermo Fisher-Scientific™ que es una polimerasa de alta fidelidad con una baja tasa de errores que genera productos de PCR con extremos romos sin colas de poliA's en el extremo 3'. Los componentes de la mezcla de reacción de la PCR y las cantidades estándar de cada uno de ellos, se recogen en la tabla 1. Si la secuencia del gen que se quiere amplificar es muy rica en GC's se puede utilizar el tampón de reacción CG en lugar del tampón High Fidelity, HF.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Tampón HF o tampón CG	10	5 x
Mix dNTPs	1	0.2 mM
Cebador- F	1	0.2 $\mu$ M
Cebador- R	1	0.2 $\mu$ M
Phusion Hot Start	1	2 U/ $\mu$ L
cDNA molde	5	-
Agua miliQ	31	-
Total	50	-

*Tabla 1. Reactivos empleados en este trabajo fin de grado necesarios para llevar a cabo la PCR.*

La DNA polimerasa Phusion Hot Start II de Thermo Fisher Scientific™ trabaja a 98°C y la elongación a 72°C. Para la hibridación Thermo Fisher Scientific™ propone realizar primero unos ciclos a la temperatura de hibridación teórica de los cebadores ( $T_m$ ) recomendada para los primers sin tener en cuenta la secuencia Kozak ni la secuencia de los sitios de restricción y

posteriormente subir la temperatura a la T<sub>m</sub> que se recomienda para los primers incluyendo esas secuencias. Estas T<sub>m</sub>'s recomendadas por Thermo Fisher para cada pareja de primers quedan definidas en el Anexo III. El programa de PCR empleado en el termociclador 3000 Thermocycler de Biometra para amplificar los fragmentos deseados de DNA se recoge en la tabla 2.

Paso	Tiempo	Temperatura
1. Desnaturalización previa	5 min	98°C
2. Desnaturalización	10 s	98°C
3. Hibridación	20 s	T <sub>m</sub> correspondiente para cada pareja de cebadores sin los sitios de corte
4. Extensión	15 s por cada 1kb	72°C
<b>5 ciclos</b>		
5. Desnaturalización	10s	98°C
6. Hibridación	20 s	T <sub>m</sub> correspondiente para cada pareja de cebadores con los sitios de corte
7. Extensión	15 s por cada 1kb	72°C
<b>28 ciclos</b>		
8. Final de la reacción	5 min	72°C
9. Conservación	-	4°C

**Tabla 2.** Programa de PCR empleado en este trabajo para amplificar los fragmentos desde cDNA.

### 6.3.2 Electroforesis horizontal de DNA en geles de agarosa

Al final de la reacción de PCR el producto obtenido se visualiza en un gel de agarosa del 1% TAE. Para ello, se disuelve la cantidad correspondiente de agarosa en tampón de electroforesis TAE 1x<sup>1</sup> a 60°C. A continuación, se deja enfriar brevemente la disolución antes de añadir el reactivo SYBR® Green, necesario para la visualización de DNA. La mezcla se vierte sobre el molde del gel y se colocan los peines. Finalmente, se deja polimerizar a temperatura ambiente durante unos minutos.

Las muestras a cargar se mezclan con el colorante<sup>2</sup> para facilitar su carga en el gel y controlar mejor el transcurso de la electroforesis. Se van a cargar normalmente 15 µl de muestra de PCR con 5 µl de colorante en cada pocillo del gel. Como marcador de pesos moleculares se va a utilizar según el tamaño del producto de PCR esperado el marcador *Low DNA Mass Ladder* (4 µl) o el marcador *High DNA Mass Ladder* (4 µl), ambos de Invitrogen technology. La electroforesis se desarrolla en tampón TAE 1x, a un voltaje de 100 V y durante el tiempo necesario para que los fragmentos de DNA se hayan desplazado lo suficiente para poder visualizarlos y diferenciarlos entre si correctamente. Finalmente, se visualiza el gel en el transiluminador GelDoc de Bio-Rad para comprobar si han amplificado bien los fragmentos de interés.

<sup>1</sup> TAE 1x: Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM

<sup>2</sup> Tampón de carga colorante: Ficoll 400 al 30% y azul de bromofenol al 0,1 % (p/v) en TAE.

#### **6.4 Clonación de los productos de PCR en el vector ZERO BLUNT II TOPO®**

El vector plasmídico de clonaje utilizado para tal fin fue el **Zero Blunt II TOPO®** suministrado en el kit de Invitrogen™ “PCR Cloning Kit, Bunt II”. Las características de este vector están descritas en el apartado 5.3.1. La ligación se realiza utilizando los productos de PCR que habían amplificado correctamente siguiendo las instrucciones del kit. Los reactivos empleados se describen en la tabla 3. La cantidad de solución salina y vector son fijos y se completa el volumen final de 6 µL con el producto de PCR y con agua si es necesario. La mezcla de ligación se deja incubando 15 min a temperatura ambiente.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µL)</b>
<b>Producto PCR</b>	3-4 (varía en función de la cantidad de producto de PCR obtenido)
<b>Solución salina</b>	1
<b>Agua</b>	0-1
<b>ZERO BLUNT II TOPO® vector</b>	1
<b>Total</b>	6

*Tabla 3. Reactivos utilizados para llevar a cabo la reacción de ligación de los productos de PCR y el vector ZERO BLUNT II TOPO®.*

#### **6.5 Transformación de bacterias competentes *E. coli* DH5 α**

Una vez preparada la ligación, procedemos a transformar bacterias ***E. coli* DH5α** ya competentes que se suministran en el kit Max efficiency Invitrogen DH5α de Invitrogen Technology. Añadimos 2 µl de la reacción de ligación a 25 µl de bacterias competentes *E. coli* DH5α, resuspendemos la mezcla suavemente e incubamos en hielo 30 minutos. A continuación, se realiza el choque térmico 45'' a 42°C en el termoblock *Thermomixer comfort*, y se llevan al hielo de nuevo durante 2-3 minutos. Se añaden entonces 250 µl de medio SOC (20g/L triptón, 5 g/L extracto levadura, 4.8 g/L MgSO<sub>4</sub>, 3.603 g/L dextrosa, 0.5 g/L NaCl, 0.186 g/L KCl) y se dejan recuperar en el incubador LAB THERM de KÜHNER con agitación a 250 rpm a 37°C durante una hora. Para finalizar, se siembra todo el volumen de la transformación en placas de Kanamicina y se cultivan en la estufa MEMMERT a 37°C toda la noche. Al día siguiente se observan las colonias que han crecido en la placa ya que solo las que incorporan el plásmido con la resistencia a kanamicina serán capaces de crecer en la placa.

#### **6.6 PCR a partir de colonia bacteriana**

Para comprobar si las colonias que han crecido en las placas han incorporado el plásmido con el inserto de interés o sólo el plásmido, se pican algunas de esas colonias con una punta de pipeta y se inocula parte de cada colonia a un eppendorf con 50 µL de LB sin kanamicina y, el resto, en un tubo falcon con 6 mL de medio LB y de Kanamicina (50 mg/ml) que se llevan a incubar a 37°C toda la noche con agitación de 250 rpm en el incubador.

Los tubos eppendorf preparados se ponen a crecer a 37°C durante 30 minutos en agitación en el termoblock *Thermomixer comfort*. Una vez transcurridos los 30 minutos los tubos se llevan a 95°C durante 5 min para lisar las bacterias. Se centrifuga ahora el lisado bacteriano a 4000 rpm



5 min a RT en la centrífuga Sorvall legend Micro centrifuge 75003410 de ThermoScientific obtener un pellet bacterino de restos bacterianos: membranas, DNA y un sobrenadante donde se encuentran los plásmidos en suspensión. Se cogen 5 µl del sobrenadante donde se encuentra el DNA plasmídico para preparar la PCR de colonia para la cual vamos a utilizar la Taq polimerasa de IBIAN Technologies. El objetivo de esta PCR es saber si el inserto se ha clonado sin importar la dirección. Por eso para cada muestra se van a realizar dos PCR's: una con el cebador corto (2R) del gen de interés y el oligo M13Fw del vector ZERO BLUNT II TOPO® y otra con el cebador corto (2R) y el oligo M13Rv. Los cebadores utilizados M13Fw y M13Rv de Invitrogen Technology tienen las siguientes características calculadas con Oligo Analyzer de IDT:

M13Fw: GTAAAACGACGGCCAGT 17 pb, contenido GC = 52,9 %, Tm = 52,6 °C

M13Rv: CAGGAAACAGCTATGAC 17 pb, contenido GC = 47,1 %, Tm = 47 °C

Los componentes de la mezcla de reacción de estas PCR's y las cantidades estándar de cada uno de ellos, se recogen en la tabla 4.

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
Buffer	5	10 x
Mix dNTPs	1	0.2 mM
M13Fw o M13Rv	1	0.2 µM
Cebador- 2R	1	0.2 µM
Taq IBIAN	0,5	-
DNA	5	-
Agua miliQ	36,5	-
<b>Total</b>	<b>50</b>	-

**Tabla 4.** Reactivos empleados en este trabajo fin de grado necesarios para llevar a cabo la PCR de colonia bacteriana.

Las condiciones de las PCR se indican en la tabla 5 teniendo en cuenta la TM de los oligos correspondientes a cada inserto.

Paso	Tiempo	Temperatura
1. Desnaturalización previa	5 min	94°C
2. Desnaturalización	1 min	94°C
3. Hibridación	1min	57-59°C (Tm correspondiente para cada pareja de cebadores debe estar entre estas temperaturas)
4. Extensión	30s por cada 0,5kb	72°C
	<b>30 ciclos</b>	
5. Final de la reacción	5 min	72°C
6. Conservación	-	4°C

**Tabla 5.** Programa de PCR empleado en este trabajo para llevar a cabo la PCR de colonia bacteriana.

Al final de la reacción de PCR el producto obtenido se visualiza en un gel de agarosa del 1% TAE y si la PCR de colonia es positiva para el inserto de interés, al día siguiente se centrifugan las bacterias correspondientes inoculadas en los tubos falcon a 4000 rpm 10 min a RT en la centrífuga Alegria X-30R de Beckman coulter con rotor SX 4400, se elimina el sobrenadante y se

resuspende el precipitado bacteriano para a continuación realizar la miniprep a fin de obtener el plásmido con nuestro inserto de interés en mayor concentración con el kit Nucleo Spin Plasmid EasyPure de Sigma. Para determinar la concentración y pureza del DNA plasmídico en las muestras, se empleó el espectofotómetro NanoVue™.

### **6.7 Secuenciación automática del DNA y análisis de las secuencias**

La secuenciación de los fragmentos de DNA clonados en el vector se realizó en el Servicio de Secuenciación de DNA de la empresa Secugen S.L. Para cada reacción de secuenciación se requieren 15 µl de DNA, a una concentración de 100 ng/µl además de 1.5 µl de los cebadores específicos de cada gen a una concentración 5 µM y los oligos del vector ZERO BLUNT II TOPO®, M13Fw y M13Rv. Los resultados de la secuenciación se analizan con el programa *Codon code Aligner* v3.7.1.

### **6.8 Clonación de los genes de interés en el vector lentiviral pWPLXD Ires Neo**

Cuando se ha comprobado que la secuencia de un gen de interés es la correcta en el vector ZERO BLUNT II TOPO®, se procede a su transferencia a el **vector lentiviral pWPLXD Ires Neo** preparado en nuestro laboratorio a partir del de la casa Addgene™, cuyas características han sido explicadas en el apartado 5.3.2.

Primero se realiza la digestión del vector pWPLXD Ires Neo para linealizarlo usando las enzimas PmeI y BamHI dependiendo de si el inserto que se va ligar posteriormente tiene los sitios de corte para las dos enzimas o solo para una de ellas lo que dará lugar a extremos romos o cohesivos. Los reactivos y cantidades para la digestión del vector pWPLXD IRES NEO se recogen en la tabla 6.

Reactivo	Volumen (µL)		Concentración final
<b>PWPLXD IRES NEO o Zero Bunt+inserto</b>	X	X	<b>1000 ng</b>
<b>PmeI</b>	2	2	
<b>BamHI</b>	1	0	
<b>Buffer cut smart</b>	5	5	
<b>Agua miliQ</b>	Resto hasta 50		
<b>Total</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	

**Tabla 6.** Reactivos empleados en este trabajo fin de grado necesarios para llevar a cabo la digestión del vector pWPLXD IRES NEO o la digestión del vector ZERO BLUNT II TOPO® que contiene el inserto de interés .

La mezcla de digestión se deja incubando a 37°C 1 hora sin agitación en el termoblock *Thermomixer comfor* de acuerdo con las especificaciones de la casa comercial. Al terminar este tiempo se añade 1 µL de CIAP y se incuba durante 30 min más a 37°C ya que es una fosfatasa alcalina que elimina los fosfatos de los extremos del vector impidiendo que éste vuelva a recircularizarse.

A continuación, se lleva a cabo la digestión de los plásmidos que contienen nuestros genes de interés en el vector ZERO BLUNT II TOPO®. Para liberar el inserto de interés usamos las enzimas PmeI y BamHI dependiendo de los sitios de corte que presente cada gen. La cantidad de muestra de DNA que se añade a la mezcla de reacción depende de la concentración

obtenida en el espectrofotómetro NanoVue™ en el apartado 6.6. Los reactivos y cantidades para la digestión del vector ZERO BLUNT II TOPO® que contiene el inserto de interés se recogen en la tabla 6. La mezcla de digestión se incuba a 37°C durante 1 hora sin agitación en el termoblock *Thermomixer comfort*.

Una vez transcurrido el tiempo necesario preparamos un gel de agarosa al **0,7% TAE** siguiendo los mismos pasos que se han descrito en el apartado 6.3.2. Las muestras obtenidas de las digestiones (25 µL) se cargan en los diferentes pocillos de este gel mezcladas con 5 µL de tampón de carga y además se cargan los marcadores de pesos moleculares *Low Mass Ladder* y *High Mass Ladder*. Se lleva a cabo la electroforesis de este gel en tampón TAE 1x nuevo a un voltaje de 100 V durante 1 hora. Finalmente se visualiza el gel en el transiluminador con la luz ultravioleta GEL DOC de Biorad y se cortan directamente del gel con bisturí las bandas que corresponden al vector pWPLXD Ires Neo linealizado (11331 pb) y la banda que corresponde al inserto de interés para su purificación. Es importante que este gel 0,7% TAE esté el menor tiempo posible bajo el efecto de la luz ultravioleta del transiluminador para que el material genético no se vea afectado. Para purificar el DNA de las bandas de agarosa cortadas del gel se usa el DNA gel extraction Kit de Norgen Biotekcorp.

Los productos obtenidos de la purificación se cargan en un gel de agarosa al **2% TAE** para cuantificar la cantidad de cada muestra obtenida. Cargaremos 4 µL de marcador Low mass y high mass y 2 µL de cada muestra con 2 µL del tampón de carga. La electroforesis se desarrolla en tampón TAE 1x, a un voltaje de 100 V, durante aproximadamente media hora. Finalmente, se visualiza el gel en el aparato GelDoc de Bio-Rad. Para cuantificar se comparan las bandas del marcador de pesos moleculares con las bandas del inserto y el vector y se obtiene la concentración de cada uno en ng/µL.

A continuación, se lleva a cabo la ligación del inserto y el vector pWPLXD Ires Neo. Para calcular los volúmenes a utilizar hay que tener en cuenta que si los extremos a unir son cohesivos, la relación vector:inserto debe ser 1:3, mientras que si son romos, la relación debe ser 3:9, o lo que es lo mismo, calculado en fentomoles será 10:30 ó 30:90. A continuación, calculamos los µL de DNA de inserto y de vector necesarios con la siguiente fórmula:  $\text{Microgramos de DNA} = \text{fentomoles de DNA} / 3000 \times \text{el tamaño en Kb} = \text{resultado ng} \rightarrow \text{ng} / \text{concentración obtenida del gel de 2\% (ng/\mu\text{L})} = \mu\text{L en la reacción}$ .

Para la ligación añadimos a los volúmenes calculados de inserto y de vector pWPLXD Ires Neo, 1 µL de enzima T4 DNA ligasa, 2 µL de Buffer T4 ligasa y agua hasta completar 20 µL y dejamos incubar la muestra a 16°C toda la noche. Al día siguiente procedemos a transformar bacterias ***E. coli DH5α*** ya competentes con el mismo método descrito en el apartado 6.5. En este caso sembraremos las bacterias en placas de Ampicilina ya que las bacterias resistentes a este antibiótico serán las que hayan incorporado el vector pWPLXD Ires Neo. El siguiente paso es realizar una PCR de colonia con las bacterias que han crecido en las placas de ampicilina siguiendo el método descrito en el apartado 6.6, pero esta vez la pareja de cebadores a utilizar será el cebador corto (2R) del gen de interés y oligo PWI (oligo del vector pWPLXD Ires Neo). Si el resultado de la PCR es positivo, se realiza la miniprep para aislar el plásmido de interés con el kit Nucleo Spin Plasmid EasyPure de Sigma y se envía al Servicio de Secuenciación de DNA de la empresa Secugen S.L para finalmente comprobar que la secuencia de nuestro gen de interés está completa y en la orientación adecuada dentro del vector pWPLXD Ires Neo.

## **7. Resultados y discusión**

Siguiendo los métodos explicados en el apartado anterior se consiguió clonar los genes **BACH1**, **DYRK1A**, **NRIP1**, **PKNOX1**, **PFKL** y la **isoforma larga de RCAN1 1L** en el vector plasmídico Zero Blunt II TOPO®. Cuando se comprobó que la secuencia de estos genes de interés era la correcta en este vector plasmídico se pasó a su clonación en el vector lentiviral pWPLXD Ires Neo con éxito.

La isoforma corta del gen **RCAN1 1S** que codifica para la proteína de 197 aminoácidos no se consiguió finalmente clonar en el vector Zero Blunt II TOPO®. En los múltiples intentos fallidos que se realizaron se probó a amplificar el gen partiendo de cDNA obtenido de otros tipos celulares además de las células 293T y SHSY5Y: una línea de fibroblastos inmortalizados 2997VI, línea de neuroblastoma humano SKN-BE2 y una línea de células madre neurales NSC, pero no se obtuvieron los resultados esperados. También se probó a optimizar los pares de cebadores F y R de este gen utilizados en la amplificación de DNA por PCR utilizando como molde cDNA, pero no se consiguieron resultados satisfactorios tampoco.

También se presentaron muchos problemas en la clonación de los genes en el vector **pWPLXD IRES Neo**, hasta que se comprobó que la ligación no ocurría dado que la concentración de sales del buffer de purificación a partir de gel del kit DNA gel extraction Kit de Norgen inhibía a la T4 DNA ligasa. Los problemas terminaron cuando los purificados se eluyeron directamente en agua.

Este apartado de resultados se va a dividir en dos partes. Una primera parte donde se van a exponer los resultados que se han obtenido del análisis de secuencia de los genes una vez clonados correctamente en el vector Zero Blunt II TOPO®; y una segunda parte donde se va a explicar cómo se ha ido analizando la información obtenida de los distintos geles de agarosa resultado de las electroforesis a lo largo de todo el proceso.

### **7.1 Análisis de la secuencia de los genes relacionados con SD**

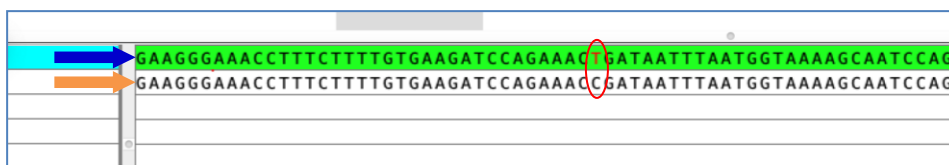
El estudio de las secuencias obtenidas de los genes **BACH1**, **DYRK1A**, **NRIP1**, **PKNOX1**, **PFKL** y la **isoforma larga de RCAN1 1L** en el vector plasmídico Zero Blunt II TOPO® se ha basado en la comparación con las secuencias de nucleótidos obtenidas desde Ensembl (41) y de la base de datos CCDS Database de NCBI (42) que se recogen en el Anexo II.

Al alinear en el programa Codon Code Aligner las secuencias modelo de cada gen con las secuencias proporcionadas por el Servicio de Secuenciación de DNA de la empresa Secugen S.L se obtuvieron los siguientes resultados:

- **BACH1**, **NRIP1**, **PFKL** y **RCAN1 1L**: se confirmó que la secuencia de nucleótidos de estos genes estaba completa en el vector Zero Blunt II TOPO® y coincidía correctamente con las secuencias de nucleótidos obtenidas desde Ensembl de cada gen incluidas en el Anexo II.
- **DYRK1A**: en la secuencia obtenida de este gen en comparación con la secuencia modelo de 2292 nucleótidos se observó que no aparecía un segmento de 27 nucleótidos al comienzo del tercer exón del gen. Consultando la bibliografía sobre este gen, se encontró que existen

dos isoformas mayoritarias de 763 y 754 aminoácidos obtenidas mediante splicing alternativo de los primeros exones de gen (22). Por tanto, la isoforma del gen DYRKA1 que se ha conseguido clonar en este trabajo es la de 754 aminoácidos ya que es la isoforma más predominante.

- **PKNOX1:** en la secuencia obtenida se encontró que el nucleótido 342 en lugar de ser una T era una C. Este cambio corresponde a un polimorfismo descrito en Ensembl de la proteína en la posición 114 que codifica para una treonina. En nuestra secuencia de nucleótidos tenemos por tanto el codón ACC en lugar ACT, pero la **treonina** está codificada en el ARN mensajero como ACU, ACC, ACA o ACG y, por lo tanto, no se ve modificada. El polimorfismo detectado (rs234781) en la posición 114 de la proteína es una variante de tipo sinónima T/A/C como se recoge en la base de datos Ensembl (41).



**Figura 6.** Representación del alineamiento de la secuencia consenso del gen PKNOX1 (flecha azul) con la secuencia proporcionada por el Servicio de Secuenciación de DNA de la empresa Secugen S.L (flecha naranja). Se ha marcado con un círculo rojo el polimorfismo encontrado en la secuencia, el nucleótido 342 en lugar de ser una T era una C. Esta imagen ha sido obtenida del alineamiento de secuencias realizado con el programa Codon Code Aligner v3.7.1.

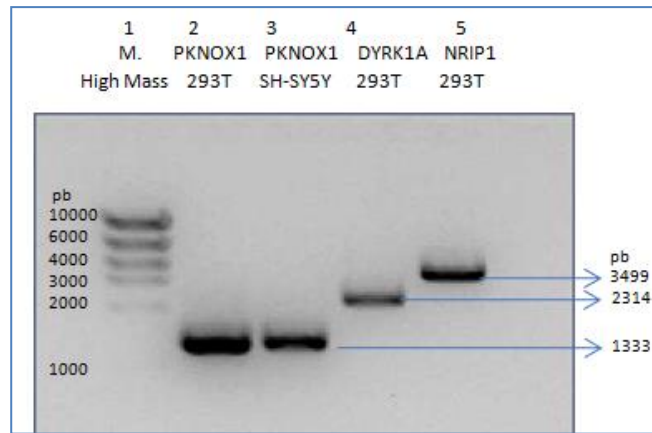
## **7.2 Análisis de la información obtenida de los geles de agarosa resultado de las electroforesis**

### **7.2.1 Electroforesis horizontal en geles de agarosa 1% TAE tras la amplificación de DNA por PCR utilizando como molde cDNA**

Al final de la reacción de PCR utilizando como molde cDNA para la amplificar los genes de interés se visualiza el producto obtenido en una electroforesis horizontal en geles de agarosa del 1% TAE. A modo de ejemplo del resultado de estos geles, en la figura 7 se muestra el gel del resultado de la PCR de PKNOX1 a partir de cDNA de las líneas celulares 293T y SHSY5Y; DYRK1A a partir de cDNA de la línea celular 293T y NRIP1 a partir de cDNA de la línea celular 293T. En este gel se cargan 15 µl de muestra de PCR con 5 µl de colorante para cada gen y 4 µl de marcador de pesos moleculares *High DNA Mass Ladder*, ya que los tamaños de los productos de PCR esperados son grandes. Los fragmentos que se esperan visualizar tienen que tener el número de nucleótidos del gen más el número de nucleótidos que supone la secuencia Kozac que se ha añadido y el número de nucleótidos de las secuencias de las enzimas de restricción que también se han incorporado en el diseño de cebadores. Para los genes de este gel se esperan los siguientes tamaños:

- **PKNOX1** → 1311 (nt del gen) + 8 (nt Pmel) + 6 (nt Kozac) + 8 (nt Pmel) = 1333 nt
- **DYRK1A** → 2292 (nt del gen) + 8 (nt Pmel) + 6 (nt Kozac) + 8 (nt Pmel) = 2314 nt
- **NRIP1** → 3477 (nt del gen) + 8 (nt Pmel) + 6 (nt Kozac) + 8 (nt Pmel) = 3499 nt

Comparando el tamaño de los fragmentos de DNA obtenidos de cada gen con el tamaño de los fragmentos de DNA del marcador de pesos moleculares *High DNA Mass Ladder* se comprueba que los amplificados han sido correctos.



**Figura 7.** Gel de agarosa 1% TAE tras la amplificación de DNA por PCR utilizando como molde cDNA para los genes PKNOX1, DYRK1A y NRIP1. La calle 1 corresponde al marcador de pesos moleculares High DNA Mass Ladder. La calle 2 corresponde al producto de la PCR de PKNOX1 a partir de cDNA de la línea celular 293T. La calle 3 al producto de la PCR de PKNOX1 a partir de cDNA de la línea celular SH-SY5Y. La calle 4 al producto de la PCR de DYRK1A a partir de cDNA de la línea celular 293T y la calle 5 al producto de la PCR de NRIP1 a partir de cDNA de la línea celular 293T. El tamaño de los fragmentos de DNA se indica en pb.

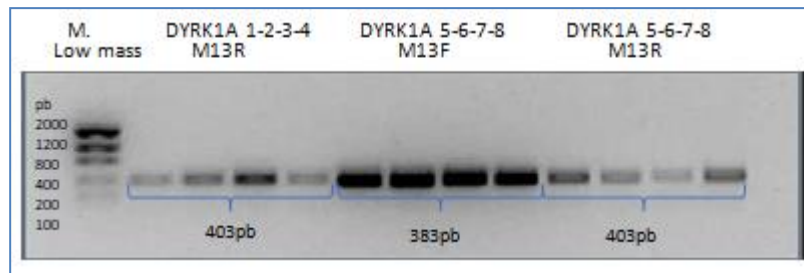
### **7.2.2 Electroforesis horizontal en geles de agarosa 1% TAE tras la PCR a partir de colonia bacteriana obtenidas al clonar los genes en el vector Zero Blunt II TOPO.**

El objetivo de esta PCR es saber si el inserto se ha clonado en el vector Zero Blunt II TOPO sin importar la dirección de clonaje. En la figura 8, a modo de ejemplo, se muestra el resultado del gel de la PCR de colonia bacteriana obtenida tras transformar las bacterias con la reacción de clonación del gen DYRK1A en el vector Zero Blunt II TOPO. Se picaron 8 colonias, para las 4 primeras colonias se realizó una PCR usando el cebador corto DYRK1A-2R y el oligo M13Rv del vector ZERO BLUNT II TOPO® y para las 4 colonias restantes se realizó una PCR usando el cebador corto DYRK1A-2R y el oligo M13Fw y otra PCR usando el cebador corto DYRK1A-2R y el oligo M13Rv. Las bandas que se esperan obtener deben de tener los siguientes tamaños:

- **DYRK1A-2R y el oligo M13Fw = 383 pb** (Se cuentan los nucleótidos desde el oligo M13Fw hasta el inicio del inserto y desde donde termina el cebador DYRK1A-2R hasta el inicio del gen)
- **DYRK1A-2R y el oligo M13Rv = 403 pb** (Se cuentan los nucleótidos desde el oligo M13Rv hasta el inicio del inserto y desde donde termina el cebador DYRK1A-2R hasta el inicio del gen)

En este gel se cargan 15 µl de muestra de PCR con 5 µl de colorante y 4 µl de marcador de pesos moleculares *Low DNA Mass Ladder*. Finalmente, comparando los tamaños de los amplificados obtenidos a partir de cada colonia con los tamaños de los fragmentos de DNA del marcador de pesos moleculares *Low DNA Mass Ladder* se comprueba que todos los amplificados han sido correctos. Sin embargo, han amplificado mejor los obtenidos de las

colonias 5, 6, 7 y 8 en los que ha sido usando el cebador corto DYRK1A-2R y el oligo M13Fw por lo que estas serían las colonias elegidas para proceder a su procesamiento y secuenciación.



**Figura 8.** Gel de agarosa 1% TAE tras PCR de colonia bacteriana obtenida tras transformar las bacterias con la reacción de clonación del gen DYRK1A en el vector Zero Blunt II TOPO. La calle 1 corresponde al marcador de pesos moleculares Low DNA Mass Ladder. Las calles 2, 3, 4 y 5 corresponden a las 4 primeras colonias a partir de las cuales se preparó una PCR usando el cebador corto DYRK1A-2R y el oligo M13Rv del vector ZERO BLUNT II TOPO®. Las calles 6, 7, 8 y 9 corresponden a las colonias 5,6,7 y 8 a partir de las cuales se preparó una PCR usando el cebador corto DYRK1A-2R y el oligo M13Fw del vector ZERO BLUNT II TOPO®. Las calles 10, 11, 12 y 13 corresponden a las colonias 5, 6, 7 y 8 de DYRK1A a las que se realizó una PCR usando el cebador corto DYRK1A-2R y el oligo M13Rv del vector ZERO BLUNT II TOPO®. El tamaño de los fragmentos de DNA se indica en pb

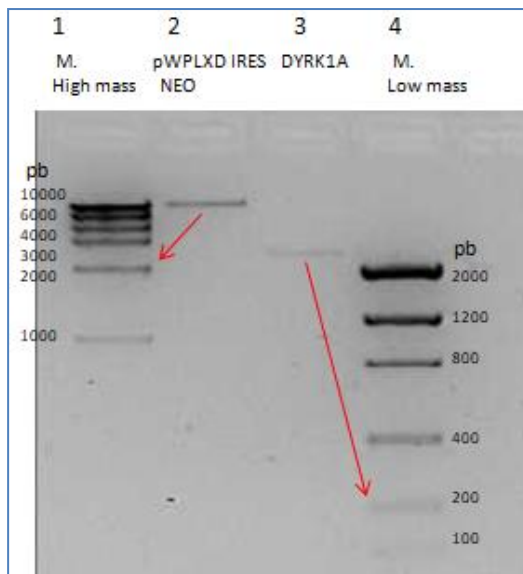
### **7.2.3 Electroforesis horizontal en geles de agarosa 2% TAE para cuantificación**

Una vez se ha comprobado que la secuencia del gen de interés es la correcta en el vector ZERO BLUNT II TOPO®, se procede a su transferencia al vector lentiviral pWPLXD Ires Neo preparado en nuestro laboratorio a partir del de la casa Addgene™.

Como se ha explicado en el apartado 6.8 es necesario digerir el vector pWPLXD Ires Neo para linealizarlo y el vector Zero blunt para liberar el inserto y purificarlos en gel. Ha sido necesario realizar un gel de agarosa al 0,7 % TAE para la purificación de vector pWPLXD IRES NEO y de inserto porque tiene menos porcentaje de agarosa y facilita la purificación del DNA a partir del gel. Una vez purificados, se debe realizar una electroforesis en un gel de agarosa al 2 % TAE, donde se cargan los productos obtenidos de la purificación del inserto y del vector pWPLXD Ires Neo para cuantificar la cantidad de cada muestra obtenida para la ligación. Para cuantificar la cantidad de vector pWPLXD IRES NEO y de inserto se decide realizar este gel de agarosa al 2 % TAE porque dejándolo correr el tiempo adecuado permite separar entre sí fragmentos de DNA de tamaño cercano mucho mejor que el del 1 % o del 0,7 % y, por tanto, comprobar la pureza de nuestro aislamiento.

En la figura 9 se muestra el resultado del gel donde se ha cargado el purificado del gen DYRK1A y el vector pWPLXD Ires Neo. Se han cargado 4 µL de marcador Low mass y high mass y 2 µL de cada muestra con 2 µL del tampón de carga. Para cuantificar, se comparan las bandas del marcador de pesos moleculares con las bandas del inserto y el vector viendo a cuál se parece más. Primero nos fijamos en la intensidad de color de la banda del vector pWPLXD IRES NEO y la comparamos con las bandas del marcador High mass, en este caso es similar a la banda de 2000 pb, que según nos indica el fabricante Invitrogen, corresponde a 20 ng para 2 µL. Por tanto, del vector pWPLXD IRES NEO tendremos una concentración de 10 ng/µL en nuestra muestra purificada. En el caso del inserto la banda obtenida es similar a la banda de 200 pb del marcador Low mass que, según nos indica el fabricante Invitrogen, esta banda corresponde a

10 ng para 2 µL. Por tanto, de inserto DYRK1A tendremos una concentración de 5 ng/µL en nuestra muestra purificada. A continuación, se calcularán los µL de DNA de inserto y de vector necesarios para preparar su ligación.



**Figura 9.** Gel de agarosa 2% TAE para cuantificación de la cantidad de vector pWPLXD IRES NEO y de inserto DYRK1A. La calle 1 corresponde al marcador de pesos moleculares High DNA Mass Ladder y la calle 4 al marcador de pesos moleculares Low mass. En la calle 2 se ha cargado el producto purificado del vector pWPLXD Ires Neo y en la calle 3 se ha cargado el producto purificado del gen DYRK1A. Con flechas rojas se ha señalado la comparación de las bandas del marcador de pesos moleculares con las bandas del inserto y el vector. El tamaño de los fragmentos de DNA se indica en pb.

#### **7.2.4 Electroforesis horizontal en geles de agarosa 1% TAE tras PCR de la colonia obtenida al clonar los genes en el vector pWPLXD IRES NEO**

El objetivo de esta PCR es saber si el inserto se ha clonado en la dirección correcta que permita su expresión en la línea celular SHSY-5Y a partir del vector pWPLXD IRES NEO. En la figura 10, a modo de ejemplo, se muestra el resultado del gel de la PCR de las colonias obtenidas tras transformar las bacterias con la ligación del gen DYRK1A en el vector pWPLXD IRES NEO. Se picaron 10 colonias y se realizó una PCR de cada una usando el cebador corto DYRK1A-2R y el oligo pWI del vector pWPLXD IRES NEO. Las bandas que se esperan obtener deben de tener el siguiente tamaño: **DYRK1A-2R y el oligo pWI = 271 pb + 100 pb = 371 pb.**

En este gel se cargan 15 µl de muestra de PCR con 5 µl de colorante y 4 µl de marcador de pesos moleculares Low DNA Mass Ladder. Finalmente, comparando el tamaño de los fragmentos obtenidos a partir de cada colonia con el tamaño de los fragmentos de DNA del marcador de pesos moleculares Low DNA Mass Ladder se comprueba que los amplificados de las colonias 3 y 9 son positivos y presentan el tamaño adecuado. Por tanto, en estas colonias se ha conseguido clonar correctamente el gen DYRK1A en el vector lentiviral pWPLXD IRES NEO y en la orientación adecuada para su expresión en la línea celular diana. Para estar seguros de este resultado, el plásmido de interés, una vez purificado, se envía al Servicio de Secuenciación de DNA de la empresa Secugen S.L.



**Figura 10.** Gel de agarosa 1% TAE tras PCR de las colonias obtenidas al clonar el gen DYRK1A en el vector pWPLXD IRES NEO. La calle 1 corresponde al marcador de pesos moleculares Low DNA Mass Ladder. Las calles 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 corresponden a las colonias 1 a 10 a partir de las cuales se preparó una PCR usando el cebador corto DYRK1A-2R y el oligo pWI del vector pWPLXD IRES NEO. El tamaño de los fragmentos de DNA se indica en pb.



## **8. Conclusiones**

Con los resultados obtenidos se puede afirmar que se cumplió el objetivo de este trabajo fin de grado que era clonar correctamente los genes: **BACH1**, **DYRK1A**, **RCAN1**, **NRIP1**, **PKNOX1** y **PFKL**, localizados en el cromosoma 21 y relacionados con la patogénesis de la enfermedad de Síndrome de Down, en el vector lentiviral de transferencia pWPLXD Ires Neo.

El objetivo final del proyecto es conseguir transferir los genes de interés a la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano a través de partículas lentivirales para su sobreexpresión en la misma. Por tanto, el siguiente paso del proyecto será producir las partículas virales usando los vectores lentivirales de transferencia pWPLXD Ires Neo con los insertos de cada uno de los 6 genes, un vector de empaquetamiento psPAX2 y un vector de envoltura pMD2G. Estos vectores lentivirales están modificados genéticamente para perder la capacidad de transcribirse una vez transferido el genoma vírico a la célula diana, evitando así que se formen partículas recombinantes competentes. Los tres vectores lentivirales se añaden primero a células de la línea celular 293T, para que ellas fabriquen las partículas lentivirales que serán liberadas al medio de cultivo de donde se recogen, se filtran y se congelan o añaden directamente a las células diana, en este caso las SH-SY5Y.

Las partículas lentivirales una vez formadas, se usarán para transferir los genes de interés (**BACH1**, **DYRK1A**, **RCAN1**, **NRIP1**, **PKNOX1** y **PFKL**) a la línea celular SH-SY5Y, una línea celular de neuroblastoma humano que puede diferenciarse a neurona. Una vez introducidos en las células por separado, se comprobará la sobreexpresión de los mismos en células SH-SY5Y mediante Real Time PCR y western blot. Una vez comprobado que los genes se están sobreexpresando, se estudiará el efecto de dicha sobreexpresión, al igual que ocurre en el caso de la trisomía del cromosoma 21 del Síndrome de Down, sobre la función de respiración celular, síntesis de ATP, dinámica mitocondrial, biogénesis mitocondrial y, en general, la viabilidad celular y la diferenciación a neurona de estas células SH-SY5Y.

Este tipo de estudios están encaminados a buscar posibles terapias dirigidas a incrementar la biogénesis mitocondrial y por tanto la fosforilación oxidativa mitocondrial en los enfermos con Síndrome de Down. Por ejemplo, se ha estudiado como la administración prenatal de ácido alfa-linolénico omega-3 (48) y de una dieta cetogénica (49) aumentaron la expresión de PPARGC1A y la biogénesis mitocondrial siendo una opción terapéutica potencial para los individuos con SD. La discapacidad intelectual es un aspecto clave del SD, la disminución de las capacidades de proliferación y diferenciación neuronal de las células progenitoras neurales puede observarse ya desde el periodo fetal. Por lo tanto, este puede ser el periodo para influir positivamente en la neurogénesis y mejorar significativamente el resultado cognitivo postnatal en el SD (50).

*With the results obtained, it can confirm that the objective of this final degree project, which was to correctly clone the genes: **BACH1**, **DYRK1A**, **RCAN1**, **NRIP1**, **PKNOX1** and **PFKL**, located on chromosome 21 and related to the pathogenesis of Down's Syndrome disease, in the lentiviral transfer vector pWPLXD Ires Neo, was achieved.*

*The ultimate goal of the project is to transfer the genes of interest to the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y via lentiviral particles for their overexpression in the cell line.*

*Therefore, the next step of the project will be to produce the viral particles using the lentiviral transfer vectors pWPLXD Ires Neo with each gene, a packaging vector psPAX2 and an envelope vector pMD2G. These lentiviral vectors are genetically modified to lose the ability to transcribe once the viral genome is transferred into the target cell, thus preventing the formation of competent recombinant particles. The three viral vectors are first added to cells of the 293T cell line, so that they make the lentiviral particles that will be released into the culture medium from where they are collected, filtered and either frozen or added directly to the target cells, in this case SH-SY5Y.*

*The lentiviral particles once formed will be used to transfer the genes of interest (BACH1, DYRK1A, RCAN1, NRIP1, PKNOX1 and PFKL) into the SH-SY5Y cell line, a human neuroblastoma cell line that can differentiate into a neuron. Once introduced into the cells separately, they will be tested for overexpression in SH-SY5Y cells by Real Time PCR and western blot. Once it has been verified that the genes are overexpressing, the effect of this overexpression will be studied, as occurs in the case of Down's Syndrome chromosome 21 trisomy, on: cellular respiration function, ATP synthesis, mitochondrial dynamics, mitochondrial biogenesis and, in general, cell viability and differentiation to neuron of the SH-SY5Y cells.*

*These types of studies are aimed at searching for possible therapies aimed at increasing mitochondrial biogenesis and therefore mitochondrial oxidative phosphorylation in Down's syndrome patients. For example, it has been studied how prenatal administration of omega-3 alpha-linolenic acid (48) and a ketogenic diet (49) increased PPARGC1A expression and mitochondrial biogenesis as a potential therapeutic option for individuals with DS. Intellectual disability is a key aspect of DS, the decreased capacities for neuronal proliferation and differentiation of neural progenitor cells can be observed as early as the foetal period. Therefore, this may be the period to positively influence neurogenesis and significantly improve postnatal cognitive outcome in DS (50).*

## **Bibliografía**

1. Baburamani AA, Patkee PA, Arichi T, Rutherford MA. New approaches to studying early brain development in Down syndrome. *Dev Med Child Neurol* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2021 Jul 8];61(8):867–79. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/dmcn.14260>
2. Wu J, Morris JK. Trends in maternal age distribution and the live birth prevalence of Down's syndrome in England and Wales: 1938–2010. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2013 Sep [cited 2021 Jul 9];21(9):943. Available from: [/pmc/articles/PMC3746264/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24157201/)
3. Antonarakis SE, Skotko BG, Rafii MS, Strydom A, Pape SE, Bianchi DW, et al. Down syndrome. *Nat Rev Dis Prim* 2020 61 [Internet]. 2020 Feb 6 [cited 2021 Jul 9];6(1):1–20. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41572-019-0143-7>
4. Guidi S, Bonasoni P, Ceccarelli C, Santini D, Gualtieri F, Ciani E, et al. Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome. *Brain Pathol*. 2008 Apr;18(2):180–97.
5. Wert G de, Dondorp W, Bianchi DW. Fetal therapy for Down syndrome: an ethical exploration. *Prenat Diagn* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2021 Jul 9];37(3):222–8. Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pd.4995>
6. Bayona-Bafaluy MP, Garrido-Pérez N, Meade P, Iglesias E, Jiménez-Salvador I, Montoya J, et al. Down syndrome is an oxidative phosphorylation disorder. *Redox Biol*. 2021;41.
7. Hall CN, Klein-Flügge MC, Howarth C, Attwell D. Oxidative Phosphorylation, Not Glycolysis, Powers Presynaptic and Postsynaptic Mechanisms Underlying Brain Information Processing. *J Neurosci* [Internet]. 2012 Jun 27 [cited 2021 Jul 9];32(26):8940–51. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/32/26/8940>
8. Keeley TP, Mann GE. Defining Physiological Normoxia for Improved Translation of Cell Physiology to Animal Models and Humans. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2017> [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 Jul 11];99(1):161–234. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/physrev.00041.2017>
9. Khacho M, Clark A, Svoboda DS, MacLaurin JG, Lagace DC, Park DS, et al. Mitochondrial dysfunction underlies cognitive defects as a result of neural stem cell depletion and impaired neurogenesis. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2021 Jul 11];26(17):3327–41. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/26/17/3327/3865114>
10. Garone C, Minczuk M, Keshavan N, Rahman S. Natural history of mitochondrial disorders: a systematic review. *Essays Biochem* [Internet]. 2018 Jul 20 [cited 2021 Jul 9];62(3):423–42. Available from: [/essaysbiochem/article/62/3/423/78646/Natural-history-of-mitochondrial-disorders-a](https://academic.oup.com/essaysbiochem/article/62/3/423/78646/Natural-history-of-mitochondrial-disorders-a)
11. Yokota M, Hatakeyama H, Ono Y, Kanazawa M, Goto Y. Mitochondrial respiratory dysfunction disturbs neuronal and cardiac lineage commitment of human iPSCs. *Cell Death Dis* 2017 81 [Internet]. 2017 Jan 12 [cited 2021 Jul 11];8(1):e2551–e2551. Available from: <https://www.nature.com/articles/cddis2016484>
12. Salemi M, Giambirtone M, Barone C, Salluzzo MG, Russo R, Giudice M Lo, et al. Mitochondrial mRNA expression in fibroblasts of Down syndrome subjects. *Hum Cell* 2018 312 [Internet]. 2018 Mar 3 [cited 2021 Jul 12];31(2):179–81. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13577-018-0205-2>
13. Qiu J jun, Liu Y na, Ren Z rui, Yan J bin. Dysfunctions of mitochondria in close association with strong perturbation of long noncoding RNAs expression in down syndrome. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017 Nov 1;92:115–20.
14. Zaki ME, El-Bassyouni HT, Tosson AMS, Youness E, Hussein J. Coenzyme Q10 and pro-inflammatory markers in children with Down syndrome: clinical and biochemical aspects. *J Pediatr (Rio J)*. 2017 Jan 1;93(1):100–4.
15. Arron JR, Winslow MM, Polleri A, Chang C-P, Wu H, Gao X, et al. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nat* 2006 4417093 [Internet]. 2006 Mar 22 [cited 2021 Jul 12];441(7093):595–600. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature04678>
16. Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2003 Jun 10 [cited 2021 Jul 13];100(12):7111–6. Available from: <https://www.pnas.org/content/100/12/7111>

17. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 $\alpha$ . *Cardiovasc Res* [Internet]. 2008 Jul 15 [cited 2021 Jul 12];79(2):208–17. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovasres/article/79/2/208/271402>
18. Peiris H, Dubach D, Jessup CF, Unterweger P, Raghupathi R, Muyderman H, et al. RCAN1 regulates mitochondrial function and increases susceptibility to oxidative stress in mammalian cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014.
19. Fuentes JJ, Pritchard MA, Estivill X. Genomic organization, alternative splicing, and expression patterns of the DSCR1 (Down Syndrome Candidate Region 1) gene. *Genomics*. 1997;44(3):358–61.
20. Wu Y, Song W. Regulation of RCAN1 translation and its role in oxidative stress-induced apoptosis. *FASEB J*. 2013;27(1):208–21.
21. Sun X, Wu Y, Chen B, Zhang Z, Zhou W, Tong Y, et al. Regulator of calcineurin 1 (RCAN1) facilitates neuronal apoptosis through caspase-3 activation. *J Biol Chem*. 2011;286(11):9049–62.
22. Guimera J, Casas C, Estivill X, Pritchard M. HumanMinibrainHomologue (MNBH/DYRK1): Characterization, Alternative Splicing, Differential Tissue Expression, and Overexpression in Down Syndrome. *Genomics*. 1999 May 1;57(3):407–18.
23. Homo sapiens dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinas - Nucleotide - NCBI [Internet]. [cited 2021 Jul 13]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NG\\_009366.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NG_009366.1)
24. PFKL phosphofructokinase, liver type [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2021 Jul 13]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5211>
25. Bally BP, Farmer WT, Jones E V, Jessa S, Kacerovsky JB, Mayran A, et al. Human iPSC-derived Down syndrome astrocytes display genome-wide perturbations in gene expression, an altered adhesion profile, and increased cellular dynamics. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2020 [cited 2021 Jul 13];29(5):785–802. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/29/5/785/5704976>
26. Annerén KG, Korenberg JR, Epstein CJ. Phosphofructokinase activity in fibroblasts aneuploid for chromosome 21. *Hum Genet* 1987 761 [Internet]. 1987 May [cited 2021 Jul 13];76(1):63–5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00283052>
27. Zhang F, Qian X, Qin C, Lin Y, Wu H, Chang L, et al. Phosphofructokinase-1 Negatively Regulates Neurogenesis from Neural Stem Cells. *Neurosci Bull* 2016 323 [Internet]. 2016 May 4 [cited 2021 Jul 13];32(3):205–16. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12264-016-0032-y>
28. Kobayashi H, Hatakeyama H, Nishimura H, Yokota M, Suzuki S, Tomabechi Y, et al. Chemical reversal of abnormalities in cells carrying mitochondrial DNA mutations. *Nat Chem Biol* 2020 173 [Internet]. 2020 Nov 9 [cited 2021 Jul 13];17(3):335–43. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41589-020-00676-4>
29. NRIP1 nuclear receptor interacting protein 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2021 Jul 13]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8204>
30. Wang X, Ren S, Yu W, Mu Q, Ye S, Cui C, et al. Cognitive impairments in adult mice with RIP140 overexpression in neural stem cells. *Behav Brain Res*. 2020 Sep 1;393:112777.
31. Izzo A, Manco R, Bonfiglio F, Cali G, De Cristofaro T, Patergnani S, et al. NRIP1/RIP140 siRNA-mediated attenuation counteracts mitochondrial dysfunction in Down syndrome. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2014 Aug 15 [cited 2021 Jul 13];23(16):4406–19. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/23/16/4406/628381>
32. Gene: NRIP1 (ENSG00000180530) - Summary - Homo\_sapiens - Ensembl genome browser 104 [Internet]. [cited 2021 Jul 13]. Available from: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000180530;r=21:14961235-15065936](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000180530;r=21:14961235-15065936)
33. PKNOX1 PBX/knotted 1 homeobox 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2021 Jul 13]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5316>
34. Sánchez-Font MF, Bosch-Comas A, González-Duarte R, Marfany G. Overexpression of FABP7 in Down syndrome fetal brains is associated with PKNOX1 gene-dosage imbalance. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2021 Jul 13];31(11):2769–77. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/31/11/2769/1220664>
35. Kanzleiter T, Rath M, Penkov D, Puchkov D, Schulz N, Blasi F, et al. Pknox1/Prep1 Regulates Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Components in Skeletal Muscle. *Mol Cell Biol*

- [Internet]. 2014 Jan 15 [cited 2021 Jul 13];34(2):290–8. Available from: <https://journals.asm.org/journal/mcb>
36. PKNOX1 - Homeobox protein PKNOX1 - Homo sapiens (Human) - PKNOX1 gene & protein [Internet]. [cited 2021 Jul 13]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P55347-1>
  37. Ferrando-Miguel R, Cheon MS, Yang J-W, Lubec G. Overexpression of transcription factor BACH1 in fetal Down Syndrome brain. *J Neural Transm Suppl* [Internet]. 2003 [cited 2021 Jul 13];(67):193–205. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7091-6721-2\\_17](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7091-6721-2_17)
  38. Lee J, Yesilkanal AE, Wynne JP, Frankenberger C, Liu J, Yan J, et al. Effective breast cancer combination therapy targeting BACH1 and mitochondrial metabolism. *Nat* 2019 5687751 [Internet]. 2019 Mar 6 [cited 2021 Jul 13];568(7751):254–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-019-1005-x>
  39. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, et al. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell* [Internet]. 2006 Oct 20 [cited 2021 Jul 13];127(2):397–408. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867406012281/fulltext>
  40. Gene: BACH1 (ENSG00000156273) - Summary - Homo\_sapiens - Ensembl genome browser 104 [Internet]. [cited 2021 Jul 13]. Available from: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000156273;r=21:29194071-29630751](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000156273;r=21:29194071-29630751)
  41. Ensembl genome browser 104 [Internet]. [cited 2021 Aug 27]. Available from: <https://www.ensembl.org/index.html>
  42. CCDS Report for Consensus CDS [Internet]. [cited 2021 Sep 1]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi>
  43. NEBcutter V2.0 [Internet]. [cited 2021 Aug 28]. Available from: <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>
  44. OligoAnalyzer Tool - primer analysis | IDT [Internet]. [cited 2021 Aug 28]. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>
  45. Tm Calculator - ES. [cited 2021 Aug 31]; Available from: <http://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>
  46. Blunt Z. Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing. Reactions. 2003;
  47. Addgene: Lentivirus Plasmids [Internet]. [cited 2021 Aug 29]. Available from: <https://www.addgene.org/viral-vectors/lentivirus/>
  48. Zmijewski PA, Gao LY, Saxena AR, Chavannes NK, Hushmendy SF, Bhoiwala DL, et al. Fish oil improves gene targets of Down syndrome in C57BL and BALB/c mice. *Nutr Res*. 2015 May 1;35(5):440–8.
  49. Kaneko KN, Wong M, Corley MJ, Lee RWY. The Ketogenic Diet as a Potential Therapy in Down syndrome. *J Pediatr Pediatr Med*. 2018;2(1):11–7.
  50. Stagni F, Giacomini A, Guidi S, Ciani E, Bartesaghi R. Timing of therapies for Down syndrome: the sooner, the better. *Front Behav Neurosci*. 2015 Oct 6;9(OCT):265.