



Universidad de Valladolid

Trabajo Fin de Grado:

***SPLICING ALTERNATIVO EN EL
EXTREMO 5'UTR DEL GEN DE
APOD HUMANA***

Curso 2023-2024

Autor: **Alejandro Sánchez Díez**

Tutores: Diego Sánchez Romero y

María Dolores Ganfornina Álvarez

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1. Apolipoproteína D y su relevancia en procesos fisiológicos y patológicos.
- 1.2. El papel del extremo 5'UTR en la regulación de la expresión génica
- 1.3. Regulación de la expresión génica y extremo 5'UTR de ApoD

2. OBJETIVOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

- 3.1. Revisión bibliográfica
- 3.2. Búsqueda *in silico* de variantes del extremo 5'UTR de ApoD
- 3.3. Diseño de oligonucleótidos con NCBI-Primer BLAST
- 3.4. Cultivo celular en condiciones Control y de Estrés Oxidativo
- 3.5. Extracción de RNA y obtención del DNA complementario mediante retrotranscripción
- 3.6. Comprobación del funcionamiento de los oligonucleótidos mediante amplificación de DNA genómico
- 3.7. Amplificación mediante RT-PCR
 - 3.7.1. Optimización de la amplificación para el análisis de variantes 5'UTR de ApoD

4. RESULTADOS

- 4.1. Extracción del RNA: Cuantificación e integridad
- 4.2. Amplificación de fragmentos usando DNA genómico como molde
- 4.3. Optimización en la amplificación de variantes en condiciones control
- 4.4. Patrones de expresión de las diferentes variantes en células astrocíticas humanas en condiciones control y estrés oxidativo
- 4.5. Patrones de expresión en relación a genes control y a la expresión neta de la secuencia codificante de ApoD

5. DISCUSIÓN

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFÍA

8. AGRADECIMIENTOS

9. ANEXOS

ANEXO 1: MÉTODOS Y MATERIALES

Resumen

La regulación de la expresión génica en eucariotas es un procedimiento altamente complejo compuesto por numerosos mecanismos. Tras el proceso de transcripción, el pre-mRNA es sometido a modificaciones postranscripcionales que tienen como resultado un mRNA maduro divisible en 3 partes, la secuencia codificante y los dos extremos no codificantes, 5' y 3' "untranslated regions" (UTR). El segmento 5'UTR puede procesarse por "splicing" alternativo dando lugar a transcritos con diferente eficiencia de traducción y resistencia a la degradación, jugando un papel en la regulación de la expresión proteica final. El patrón de expresión de la pluralidad de transcritos podría variar en función de variables como el entorno celular. Por otro lado, la Apolipoproteína D (ApoD) es una lipoproteína transportadora de pequeños lípidos con una enorme variedad de funciones fisiológicas en diferentes tejidos, que ha demostrado tener un papel protector en el sistema nervioso, aumentando la supervivencia glial y neuronal ante situaciones de estrés oxidativo. Este trabajo pone de manifiesto la existencia de 3 variantes diferentes del extremo 5'UTR de la ApoD humana y las modificaciones en su expresión en presencia de estrés oxidativo, sustentando las bases para futuros estudios funcionales sobre la aportación de estas variantes a la estabilidad y capacidad de traducción del mRNA.

1. Introducción

1.1. Apolipoproteína D y su relevancia en procesos fisiológicos y patológicos.

La apolipoproteína D (ApoD) es una lipoproteína de la familia de las lipocalinas altamente conservada en términos filogenéticos (1). Se encuentra implicada en el metabolismo lipídico, siendo su función principal el transporte de pequeños lípidos. Es conocida su unión a ligandos como ácido araquidónico (AA), esfingomielina, retinol, ácido retinoico, lisofosfatidilcolina (LPC) o progesterona (2,3).

Se ha comprobado la presencia tanto del transcrito de RNA mensajero (mRNA) como de la proteína en múltiples tejidos (4,5). Por ejemplo, en el sistema cardiovascular ha sido de interés la expresión por parte de células musculares lisas y pericitos de las paredes de los vasos sanguíneos y el papel de esta proteína en el proceso de angiogénesis (6). También se ha visto que su pobre presencia en el tejido miocárdico normal rápidamente se torna en una abundante expresión en el tejido circundante a un daño isquémico, demostrando además que la anulación de su expresión resulta en una menor supervivencia celular (7). Asimismo, ApoD ejerce un rol en otros muchos procesos fisiológicos tales como el metabolismo lipídico, regulando sus concentraciones plasmáticas y hepáticas o el proceso de remodelación ósea, entre otros (6). Cobra especial importancia su complejo papel en el sistema nervioso central

(SNC), donde ApoD también ha demostrado estar presente en numerosas etapas del neurodesarrollo (8) y como factor neuroprotector ante diversas agresiones (9).

La expresión en SNC de ApoD puede encontrarse en varios tipos de células gliales, como los astrocitos o los oligodendrocitos (4,5). También puede darse en las células de Schwann, tratándose de una proteína implicada en el procesado y compactación de la mielina (10). Por otro lado, y aunque ha sido objeto de debate, su expresión en neuronas parece encontrarse limitada a ciertos momentos del desarrollo embrionario (6,8). Una de las características prominentes de su regulación en el sistema nervioso es su sobreexpresión en el envejecimiento y en situaciones que comportan un aumento de estrés oxidativo (EOx) (9,11,12). Este aumento en la expresión de ApoD confiere en situaciones de EOx un aumento de la resistencia y un incremento de la supervivencia de las células gliales y, de forma paracrina, también de las neuronas que internalizan la proteína (12,13). Esto apoya las observaciones que muestran a ApoD como un factor protector en el contexto de patologías como la enfermedad de Alzheimer (14,15). Esto, añadido a su papel antiinflamatorio, podría explicar también su potencial papel en la lesión de nervio periférico, donde su unión y transporte de LPC y AA parecen frenar la emisión de señales de reclutamiento y activación macrofágicas por las células de Schwann (16,17). Además, se ha visto que ApoD se encuentra sobreexpresada en enfermedades lisosomales de almacenamiento de lípidos, confiriendo también un papel protector (18,19).

El vasto número de localizaciones y la enorme variedad funcional de ApoD hacen esperable una compleja red de elementos reguladores que dirijan de forma sutil su expresión.

1.2. El papel del extremo 5'UTR en la regulación de la expresión génica

La regulación de la expresión génica en eucariotas es un proceso complejo compuesto por numerosos procesos tales como la síntesis del transcrito primario de RNA, su modificación postranscripcional, la degradación del mRNA mediada por microRNAs, la fase de traducción, modificaciones y degradación proteica postraduccional, etc. Toda esa variedad de procesos permite la existencia de múltiples métodos celulares de regulación (20).

El proceso de transcripción se encuentra estrechamente controlado por elementos promotores, silenciadores y potenciadores localizados en la propia secuencia del DNA, además de por elementos epigenéticos y señales extracelulares que activan y reprimen factores de transcripción. Los pre-mRNA resultantes son sometidos a modificaciones postranscripcionales como el corte y eliminación de intrones, la adición de la cola de poli(A) en el extremo 3' o la de 7-metil-guanilato en el 5', entre otros. Finalmente, el mRNA resultante es una estructura consistente en tres partes, dos secuencias no codificantes, los extremos 3'

y 5'- "untranslated regions" (UTR) y la propia secuencia codificante (CDS, "coding sequence") de la proteína (20,21).

Los segmentos 5'UTR parecen capaces de condicionar la estabilidad del mRNA, su eficiencia de traducción y su capacidad para abandonar el núcleo celular (21). Las estructuras primaria y secundaria del 5'UTR influyen el mecanismo que da lugar a la unión entre mRNA y el complejo de iniciación ribosómico. La longitud, el contenido G+C y la presencia de motivos particulares en la secuencia parecen tener impacto en la eficacia del proceso de traducción (22).

Se ha observado cómo el extremo 5'UTR puede procesarse por "splicing" alternativo de forma análoga a lo que ocurre con la CDS. Esto, sumado al posible uso de promotores alternativos, confiere a los 5'UTR una gran diversidad estructural (23,24). Este hecho, junto a las numerosas funciones previamente descritas sitúa al 5'UTR como un interesante objeto de estudio dentro de la regulación de la expresión génica.

La atención suscitada por esta región ha ido en incremento en los últimos años, ya que mutaciones en las regiones UTR podrían estar implicadas en ciertas patologías de mamíferos (25).

1.3. Regulación de la expresión génica y extremo 5'UTR de ApoD

El gen de ApoD en humanos se encuentra en la región 14.3 del brazo corto del cromosoma 3. Su CDS se compone de 4 exones, con una organización exón-intrón típica de la familia de las lipocalinas (26,27) (Figura 1).

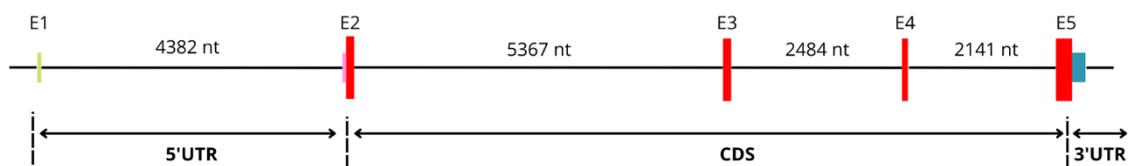


Figura 1 – Representación a escala de la secuencia de DNA del gen de ApoD (5'UTR, CDS y 3'UTR) y su estructura intrón-exón canónica. Se diferencian largas secuencias intrónicas de miles de pb entre las que se intercalan 5 regiones exónicas. El inicio de la región promotora y la caja TATA se encontrarían 3,8 kb y 30 pb "upstream" del inicio del E1, respectivamente. Se distinguen dos exones 5'UTR canónicos. El segundo (incluido en E2, de color rosa) se encuentra precediendo al inicio de la CDS. Existen 4 exones en la CDS, el último de ellos (E5) se continúa con el exón correspondiente al 3'UTR.

La región promotora y los elementos que regulan la expresión de ApoD en humanos son altamente complejos y han sido objeto de múltiples investigaciones. La caja-TATA se encuentra 30 pares de base (pb) "corriente arriba" o "upstream" (UPS) con respecto al lugar de inicio de la transcripción, y a algo más de 4.5 kb UPS del primer nucleótido de la CDS (28). Se ha predicho la presencia de múltiples elementos promotores y represores de la expresión,

como los elementos de respuesta a hormonas (estrógenos, progesterona o glucocorticoides); represores dependientes de colesterol o elementos de respuesta a fase aguda, además de secuencias de alternancia purina-pirimidina que han sido asociadas con el proceso de regulación génica (27). También son diversas las rutas metabólicas propuestas como reguladoras de su expresión en función del organismo, el tejido y los estímulos ambientales. Se ha observado como la ApoD se encuentra regulada por la vía JNK en células de astrocitoma humano sometidas a EOx (13) y por la vía MEK/ERK en fibroblastos de ratón (29).

Además de los procesos previamente descritos en el control de la expresión de ApoD, parece que las lipocalinas presentan una gran variabilidad en la eficiencia de traducción dependiente del 5'UTR (30). Los genes de ApoD en mamíferos han demostrado múltiples formas alternativas de expresión del 5'UTR (6,31). En el ratón, ha sido evidenciada de forma experimental la expresión alternativa de diferentes variantes de 5'UTR de ApoD. Estas variantes parecen tener diferentes patrones de expresión en función del tejido, estando algunas de ellas particularmente presentes en el SNC, y según las condiciones del medio, destacando la sobreexpresión selectiva de una de ellas por la presencia de EOx (32). Además, un análisis *in silico* ha sugerido la presencia de estas variantes 5'UTR en el humano (24), por lo que parece relevante la comprobación experimental de las mismas.

La presencia de diferentes variantes 5'UTR confirmaría este mecanismo en el proceso de regulación de la expresión de ApoD.

2. Objetivos

1. Estudiar las posibles variantes 5'UTR del gen de ApoD en humanos predichas *in silico* a través de la base de datos UTRdb (http://utrdb.cloud.ba.infn.it/utrdb/index_107.html).
2. Comprobar experimentalmente si las variantes predichas bioinformáticamente se expresan en células astrogiales humanas en distintas condiciones:
 - a. Control.
 - b. Estrés Oxidativo (modelo general de envejecimiento-neurodegeneración).

3. Materiales y métodos

3.1. Revisión bibliográfica

Para conocer el estado actual del conocimiento sobre el que versa este trabajo se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica a través del buscador PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se emplearon operadores booleanos y filtros de búsqueda en torno a los conceptos clave de este trabajo: ApoD y 5'UTR (Tabla 1).

Parámetros de Búsqueda	Filtros de Búsqueda	Resultados
((5'utr) OR (5'-utr)) AND ((Apolipoprotein D) OR (ApoD))	-	2*
(5'UTR[MeSH Terms]) OR (5'UTR[MeSH Major Topic])	- "Últimos 5 años" y "Review" o "Systematic Review"	8 324 40*
((ApoD) OR (Apolipoprotein D)) AND oxidative stress	-	70
	"Últimos 10 años" y "Review"	3*

Tabla 1 - Búsqueda bibliográfica. *: Artículos cuyo título y resumen han sido revisados.

Se comprobó la adecuación de los artículos al tema mediante la lectura de su título y resumen. Posteriormente se completó la revisión seleccionando en una segunda búsqueda basada en la bibliografía de los artículos anteriores, seleccionando finalmente 32 artículos para su lectura completa.

Durante el proceso se empleó el gestor bibliográfico Zotero (<https://www.zotero.org/>).

3.2. Búsqueda *in silico* de variantes del extremo 5'UTR de ApoD

Se obtuvo la secuencia del gen de ApoD humana y su extremo 5'UTR (hasta 6700 pb UPS) en la base de datos "Gene" del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Se consultó en la base de datos UTRdb la estructura exón-intrón predicha *in silico* para el extremo 5'UTR y las posibles variantes más probables de "splicing" alternativo. La base de datos UTRdb diferenciaba 4 posibles exones dentro del segmento 5'UTR que tras someterse al proceso de corte y empalme podrían dar lugar a 4 diferentes variantes (Figura 2).

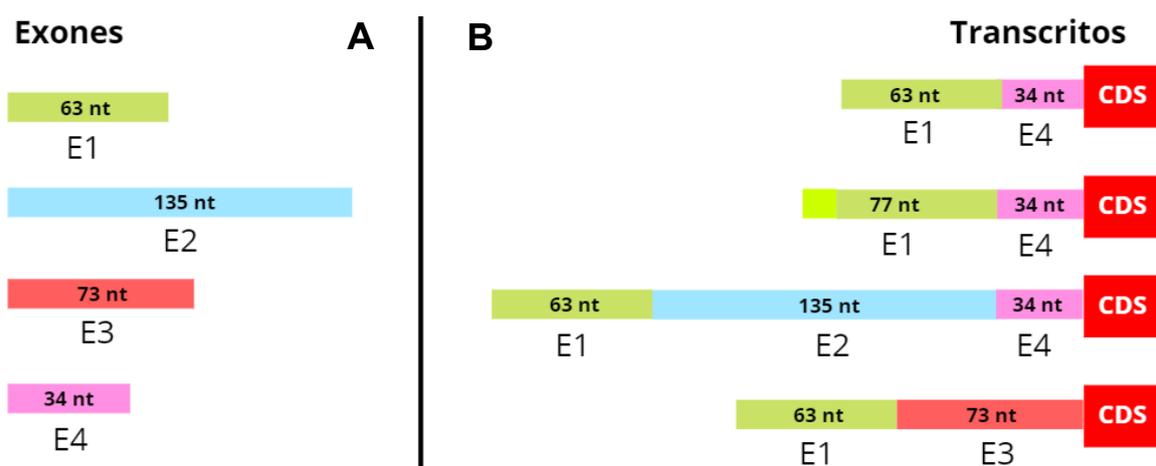


Figura 2 – Exones (A) y transcritos alternativos (B) del segmento 5'UTR del gen de ApoD humano predichos por UTRdb. Se predicen dos lugares de inicio de transcripción alternativos para el exón 1, representados con color amarillo al inicio del segundo transcrita. nt: nucleótidos.

Los transcritos 1 y 2 fueron considerados como homólogos debido a su alta similitud, ya que el transcrita 2 presentaba un lugar de inicio de transcripción alternativo 16 nucleótidos UPS

en el exón 1 con respecto al transcrito 1. De esta forma diferenciamos 3 variantes, cuyas secuencias se muestran en la Tabla 2.

- Variante A: incluye los exones 1 (61 nt) y 4 (34 nt).
- Variante B: incluye los exones 1 (61 nt), 2 (138 nt) y 4 (34 nt).
- Variante C: incluye los exones 1 (61 nt) y 3 (73 nt).

Variante	Secuencia
Variante A Exones 1 y 4.	AAGACAGGCATCTCAAATCGGCTGATTCTGCATCTGGAAACTGC CTTCATCTTGAAAGAAAAGCTCCAGGTCCCTTCTCCAGCCACCC AGCCCAAG
Variante B Exones 1, 2 y 4.	AAGACAGGCATCTCAAATCGGCTGATTCTGCATCTGGAAACTGC CTTCATCTTGAAAGAAAAGTTACCAGGAAGTAACCCGGGCAAA TCACCTCGTTGGTATGAAGAGAGTGTGACGAGAGTCCGCTCC AGAGGAGGTGCTGTGGAGACTGAGCGCATAGCACCCTTAAAT CCTGGGACCAGGGCTTCCACGGTCCAGGTCCCTTCTCCAG CCACCCAGCCCAAG
Variante C Exones 1 y 3.	AAGACAGGCATCTCAAATCGGCTGATTCTGCATCTGGAAACTGC CTTCATCTTGAAAGAAAAGATGGAGTTTTTGTCTGTGGCCAA GCTAGAGTGCAATGGTGTGATCTTGGCTTACTGCAACCTCTGCC TCCC

Tabla 2 - Secuencias de las variantes o transcritos alternativos del extremo 5'UTR de ApoD humana con código de colores para cada exón. Amarillo: exón 1. Azul: exón 2. Rojo: exón 3. Morado: exón 4.

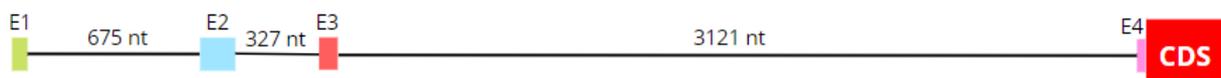


Figura 3 - Representación a escala de la estructura intrón-exón en la secuencia de DNA del extremo 5'UTR de ApoD humana.

3.3. Diseño de oligonucleótidos con NCBI-Primer BLAST

Para el diseño de los oligonucleótidos cebadores para la amplificación por PCR se empleó el buscador PrimerBLAST de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Se diseñaron oligonucleótidos que fueran selectivos de variante, buscando complementariedad con exones diferenciales. Además, se estableció como requisito de búsqueda la formación de un amplicón en una longitud de 180-220 pb, con un contenido en GC de entre el 40 y el 60%. Se buscó un óptimo en el que la temperatura de fusión (T_m , en la que se espera que el 50% de los oligonucleótidos estén unidos a la cadena molde) teórica fuera de 60°C, permitiendo un intervalo de entre 57°C hasta 63°C.

Se seleccionaron 6 oligonucleótidos cuyas secuencias y características se encuentran en la Tabla 3, y cuya distribución en el transcrito de mRNA del 5'UTR se muestra en la Figura 4.

Primer	Secuencia	Tm (°C)	GC %
HApoD-Ex1-For:	AGACAGGCATCTCAAATCGG	58.18	50.00
HApoD-Ex2-For:	CTGAGCGCATAGCACCCCTTA	60.40	55.00
HApoD-Ex3-For:	TTACTGCAACCTCTGCCTCC	60.19	55.00
HApoD-Ex2-Rev:	TTTAAGGGTGCTATGCGCTC	58.84	50.00
HApoD-Ex3-Rev:	AGGCAGAGGTTGCAGTAAGC	60.32	55.00
HApoD-CDS-Rev:	CGTCAAAATTCTCCTGCACCG	60.63	52.38
HrPL18-For:	GTCCCTTTCCCGGATGAT	50.8	55.60
HrPL18-Rev:	GACAGTGCCACAGCCCTTAG	52.2	60.00
HApoD-ATP-For:	CCACCCCAGTTAACCTCACA	60	55.00
HApoD-TVD-Rev:	CCACTGTTTCTGGAGGGAGA	60	55.00

Tabla 3 – Secuencias, Tm y %GC de los cebadores empleados para las variantes 5'UTR, para el gen normalizador L18 y para la secuencia codificante de ApoD (presente en cualquiera de las variantes).

No fue posible el diseño de oligonucleótidos dentro del exón 4 con los requisitos descritos anteriormente.

3.4. Cultivo celular en condiciones de Control y Estrés Oxidativo

Las líneas celulares de astrocitos humanos (U87 o 1321N1) se sembraron en pocillos de 1.9 cm² a una densidad de 75.000 células/pocillo. Tras un día en cultivo en medio completo se cambió al medio experimental (con bajo suero) y la mitad de los pocillos fue tratada con el agente oxidante paraquat (0,5 M). El tratamiento, de 24 horas, se concluyó retirando el medio y recogiendo las células como se detalla en el protocolo de QIAzol (Anexo 1).

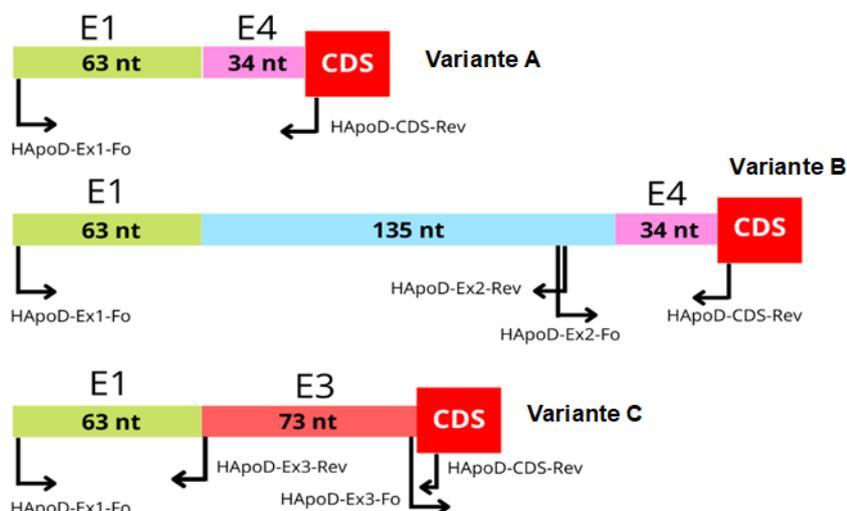


Figura 4 - Esquema de distribución de los cebadores diseñados en PrimerBLAST (NCBI) para diferenciar en el mRNA las diferentes variantes del 5'UTR de ApoD humana.

3.5. Extracción de RNA y obtención del DNA complementario mediante retrotranscripción

Se empleó el protocolo de QIAzol (QIAGEN), descrito en el Anexo 1, para la obtención de RNA purificado que fue resuspendido en 50 μ l de H₂O a una concentración de 2 ng/ μ l. Se cuantificó mediante espectrofotometría (absorbancia a 260 nm) con el dispositivo Nanodrop ND1000 (ThermoScientific). Se comprobó la calidad del RNA extraído con dos métodos: (i) a través de las ratios espectrofotométricas 260 nm/230 nm y 260 nm/280 nm y (ii) mediante electroforesis a 120 V en gel de agarosa 2%. Tras la electroforesis se visualizó la muestra mediante exposición a radiación UV, obteniéndose una imagen digital de la misma con el sistema GelDoc XR (BioRad).

Se usaron 500 ng de RNA para la obtención del DNA complementario (cDNA) mediante transcripción inversa con el kit PrimeScript RT Enzyme Mix I (Takara Bio, Japan) a 42°C durante 60 minutos, previa incubación con DNase I (Takara) para la eliminación de restos de DNA genómico (gDNA).

3.6. Comprobación del funcionamiento de los oligonucleótidos mediante amplificación de DNA genómico

El gDNA fue obtenido mediante el protocolo de QIAzol (QIAGEN) descrito en el Anexo 1. Su concentración fue medida mediante espectrofotometría (absorbancia a 260 nm) con Nanodrop ND 1000 (ThermoScientific) y fue diluido hasta una concentración de 2 ng/ μ l.

Para la confirmación del correcto funcionamiento de los oligonucleótidos se llevó a cabo la amplificación usando gDNA como molde con las combinaciones de parejas de oligonucleótidos mostradas en la Tabla 4.

Amplificación	Primers	Longitud
A 1	Ex1-For Ex2-Rev	860 nt
A 2	Ex2-For Ex3-Rev	355 nt
A 3	Ex3-For CDS-Rev	3300 nt

Tabla 4 - Amplicones esperables a partir gDNA con el uso de 3 combinaciones de oligonucleótidos.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el dispositivo termociclador Rotor Gene 3000, empleando el kit de polimerasa Dream Taq Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Cada muestra de ácido nucleico (1 μ L) fue añadida a 19 μ L de mix siguiendo la receta mostrada en la Tabla 5. Las muestras fueron sometidas a 35 ciclos de amplificación (ver ejemplo en Figura 5) y 10 μ L de los productos resultantes se mezclaron con tampón de carga (conteniendo un marcador fluorescente de ácidos nucleicos, RedSafe™) y se separaron electroforéticamente durante 15 min a 120 V en un gel de agarosa al 2%. Se adquirió una imagen digital del gel mediante exposición a radiación UV en el sistema GelDoc XR (BioRad).

Mezcla de reacción de PCR con los sustratos y la polimerasa (Dream Taq)					
Dream Taq	dH ₂ O	Primer 1	Primer 2	Muestra	Total
10 μ L	8,2 μ L	0,4 μ L	0,4 μ L	1 μ L	20 μ L

Tabla 5 - Composición de la reacción de PCR.

Las reacciones de PCR a partir de gDNA se llevaron a cabo con tiempos de elongación de 45" y 60" para asegurar la replicación de los transcritos de mayor tamaño (860 y 3300 nt). Además, para la amplificación del amplicón 3 se exploró un gradiente de temperaturas de anillamiento desde 55°C a 65°C con el objetivo de encontrar la temperatura óptima para el funcionamiento de estos cebadores.

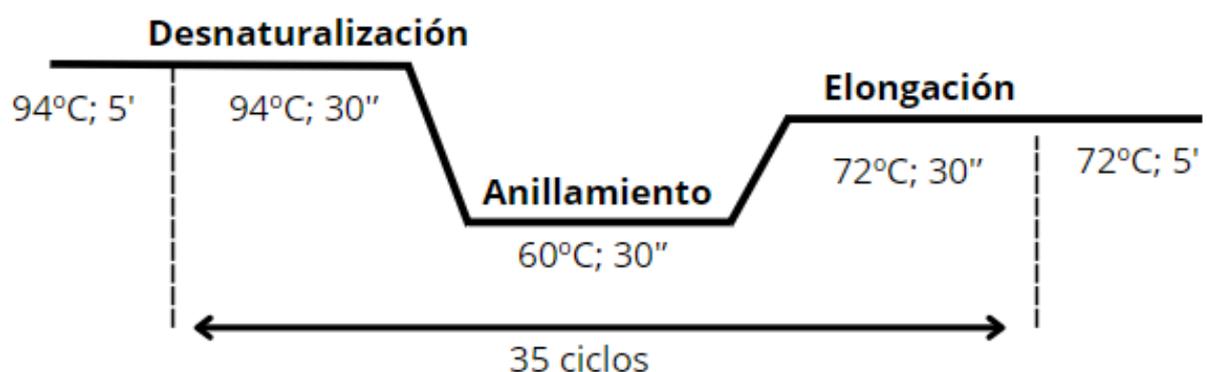


Figura 5 - Tiempos y temperaturas del programa de termociclado. Se muestra un ejemplo de RT-PCR con temperatura de anillamiento de 60°C.

Como control negativo se utilizó un plásmido, del cual se tiene la certeza de la ausencia de secuencias homologas al transcrito de ApoD.

3.7. Amplificación mediante RT-PCR

Para explorar la existencia de variantes de mRNA de ApoD que difieran en su extremo 5'UTR, se llevaron a cabo amplificaciones del cDNA obtenido por retrotranscripción (RT). Se usó la misma metodología que para la amplificación a partir de gDNA (Figura 5; Tabla 5), así como su análisis posterior en gel de agarosa.

También se usó como control negativo el plásmido que no contiene secuencias homologas al transcrito de ApoD.

3.7.1. Optimización en la amplificación para el análisis de variantes 5'UTR de ApoD

Con el objetivo de conocer la expresión de las diferentes variantes en las dos condiciones experimentales, primero se realizaron una serie de experimentos para seleccionar las temperaturas de anillamiento y las concentraciones de DNA molde óptimas para la amplificación en cada caso. Primero se llevaron a cabo PCRs con diluciones 1:10 del producto de la retrotranscripción (cDNA), programando gradientes de temperatura (entre 55 y 65°C) para la fase de anillamiento. De esta forma se establece la temperatura experimental óptima en relación con las T_m teóricas de cada pareja de oligonucleótidos.

Tras ello, se llevaron a cabo diluciones progresivas del cDNA (1:10, 1:50 y 1:200) para la temperatura óptima seleccionada (61,2°C). Se emplearon 3 parejas de oligonucleótidos propias de cada variante (Figura 4; Tabla 6): Variante A: Ex1For/CDS-Rev; Variante B: Ex2-For/CDS-Rev y Variante C: Ex3-For/CDS-Rev).

Finalmente se empleó cDNA retrotranscrito a partir de muestras de RNA obtenidas de cultivos de células astrocíticas humanas (1321N1) cultivadas en condiciones de Control y EOx.

Además de los oligonucleótidos que permiten la distinción inequívoca de las variantes (Figura 4), se usaron otros dos tipos de controles.

1. Oligonucleótidos para el gen L18, un gen ribosomal de expresión constitutiva cuya expresión no varía con el EOx, que servirá como normalizador para valorar de forma semicuantitativa las posibles diferencias de expresión de las variantes.
2. Oligonucleótidos dentro de la CDS de ApoD, con el objetivo de conocer posibles cambios de expresión totales del mRNA en cualquiera de sus variantes.

4. Resultados

4.1. Extracción del RNA: Cuantificación e integridad

El resultado de la electroforesis tras la extracción del RNA se muestra en la Figura 6A. Se obtuvieron 3 bandas coincidentes con las subunidades del RNA ribosómico, demostrando la integridad del RNA en la muestra.

El resultado de la cuantificación del RNA mediante electroforesis se muestra en la Figura 6B. Se obtuvieron unos valores y ratios de absorbancia adecuados.

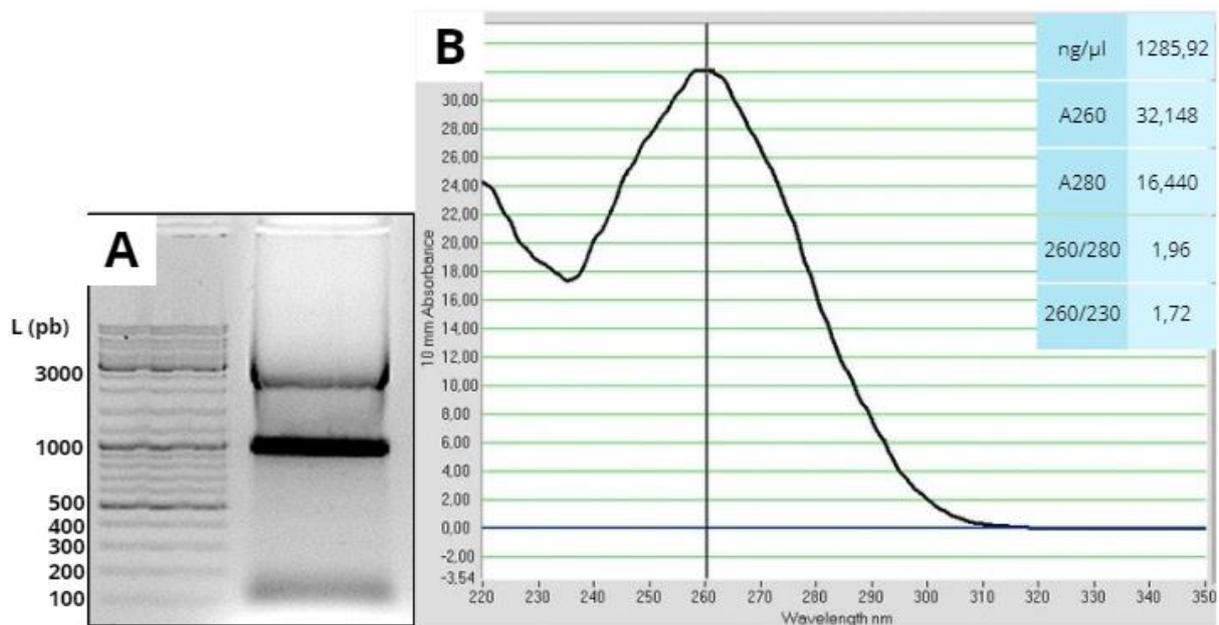


Figura 6 – Calidad y cantidad del RNA extraído. (A) Gel de agarosa 2% con 10 μ l de muestra de RNA purificado. (B) Espectro de absorción tras la purificación de RNA con el protocolo QiAzol. Se muestran los valores de absorbancia a 260 y 280 nm y las ratios 260/280 y 260/230.

4.2. Amplificación de fragmentos usando DNA genómico como molde

Para comprobar que el diseño de oligonucleótidos había sido correcto y reconocían las secuencias esperadas, se probó su funcionamiento usando gDNA como molde (Figura 7), dado que es seguro que estas secuencias están presentes.

Los amplicones A1 y A2 aparecieron de forma recurrente con las longitudes esperables, 355 y 860 pb, respectivamente. Sin embargo, pese a las estrategias para la obtención del amplicón A3, no se consiguió.

Dado que la causa más probable es la limitación de la técnica para amplificar transcritos de 3,3 kb con una polimerasa estándar, se optó por su prueba directa en los experimentos de RT-PCR

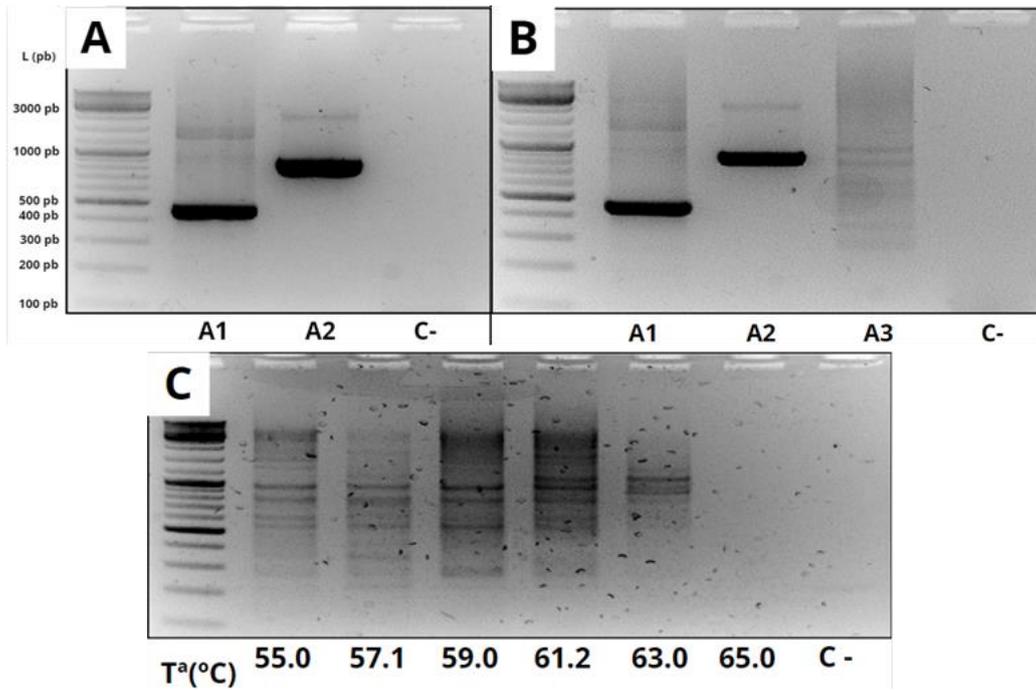


Figura 7 – Prueba de los nuevos oligonucleótidos con gDNA como molde. (A) PCR con el intervalo de elongación prolongado a 45 seg. (B) PCR con elongación prolongada a 60 seg para probar un tiempo mayor de síntesis del amplicón A3 (3300 pb). (C) PCR dedicada al amplicón A3 con gradiente de temperaturas de anillamiento y periodo de elongación de 60 seg.

4.3. Optimización en la amplificación de variantes en condiciones control

Las muestras de cDNA obtenidas de células astrocíticas 1321N1 en condiciones control se usaron en primer lugar para optimizar las condiciones de amplificación de cada variante. Los tamaños esperados se muestran en la Tabla 6 y Figura 8.

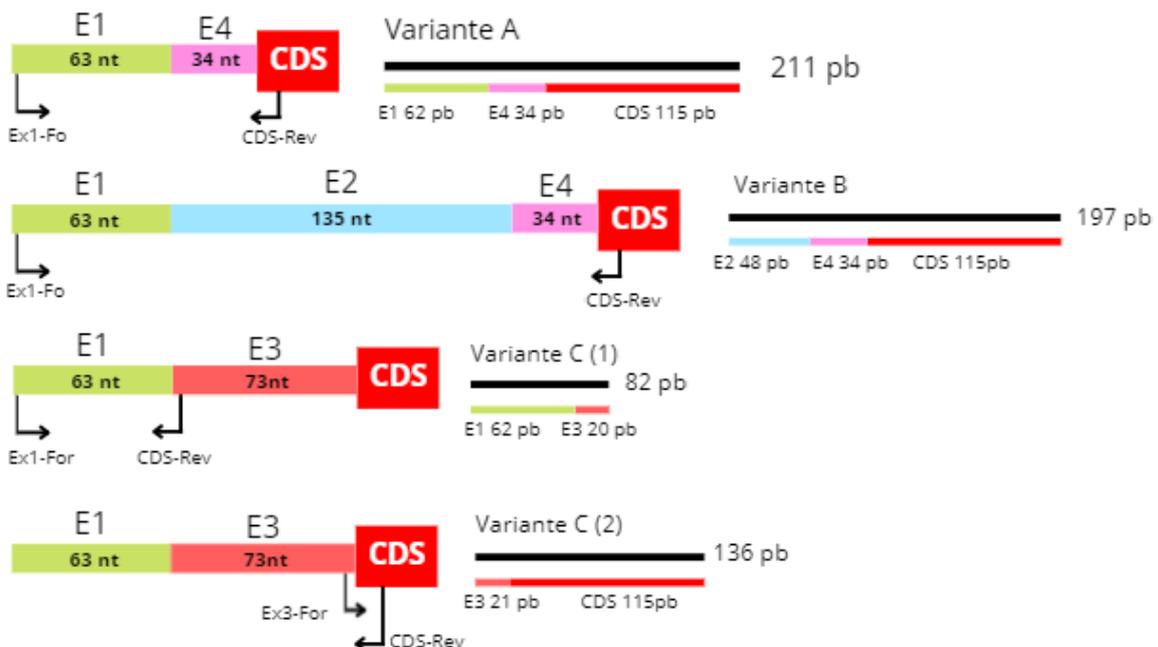


Figura 8 - Representación de la distribución de los oligonucleótidos en el mRNA y los fragmentos de amplificación (amplicones) esperados según las predicciones de UTRdb.

Variante	A	B	C (1)	C (2)
Primers	Ex1-For/CDS-Rev	Ex2-For/CDS-Rev	Ex1-For/Ex3-Rev	Ex3-For/CDS-Rev
Longitud	211 nt	197 nt	82 nt	136 nt

Tabla 6 - Oligonucleótidos empleados para cada variante y longitudes del fragmento esperado.

Se observó la expresión en condiciones control de la Variante A, con una banda atribuible al transcrito esperado de 210 pb para casi cualquier temperatura, considerándose óptima su visualización entre los 59°C y 61,2°C (Figura 9A). Se observó también restos del exceso de ácidos nucleicos en la zona superior. Éstos desaparecían cuando se usaban diluciones 1:50 y 1:200 del cDNA (Figura 9C), sin embargo, con esas diluciones no fue posible poner de manifiesto la presencia de la variante A.

Por otro lado, las variantes B y C no pudieron ser detectadas en ninguna de las condiciones probadas (Figura 9B y 9C), sugiriendo que no deben tener una expresión significativa en estas células en la condición control.

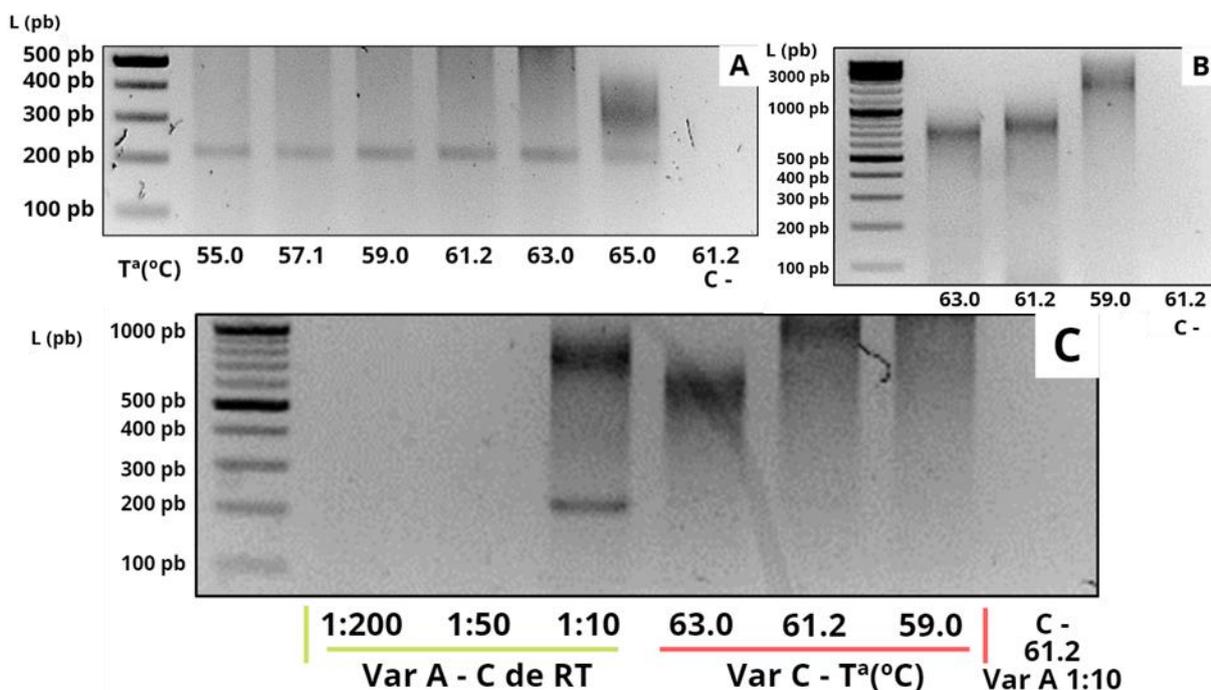


Figura 9 – Optimización de la RT-PCR de células astrocíticas 1321N1 en condiciones control. (A) Amplificación con la pareja de oligonucleótidos de la variante A con diferentes temperaturas de anillamiento (55°C-65°C). (B) Amplificación de la variante B con anillamiento entre 59°C y 63°C. (C) Amplificación de la variante A a partir de concentraciones diferentes de molde (1:10, 1:50, 1:200) y de la variante C (1) con gradiente de temperatura de anillamiento (59°C-63°C).

4.4. Patrones de expresión de las diferentes variantes en células astrocíticas humanas en condiciones control y estrés oxidativo.

Para indagar por primera vez si el estrés oxidativo podría cambiar la expresión de las diferentes variantes se amplió la búsqueda usando dos líneas diferentes de astrocitoma

humano (1321N1 y U87) (Figura 10). Además, se empleó como molde una RT-PCR de 1321N1 diferente a la utilizada para la optimización de oligonucleótidos. Tanto la variante A como la B demostraron cierta expresión en condiciones control con un aumento aparente de la expresión en condiciones de EOx. Ambas mostraron la longitud esperada para los fragmentos (Tabla 6; Figura 8). Dado que para ambas variantes no se detectó expresión en las células astrocitarias U87, se realizó una amplificación aumentando los ciclos a 40 (Figura 11).

A pesar del aumento del número de ciclos de amplificación, no se detectó expresión de la variante B en las células U87. Por otro lado, en las células 1321N1 se confirmó la presencia de las variantes A y B en condiciones control y el aumento aparente de la cantidad de transcrito B en condiciones de EOx.

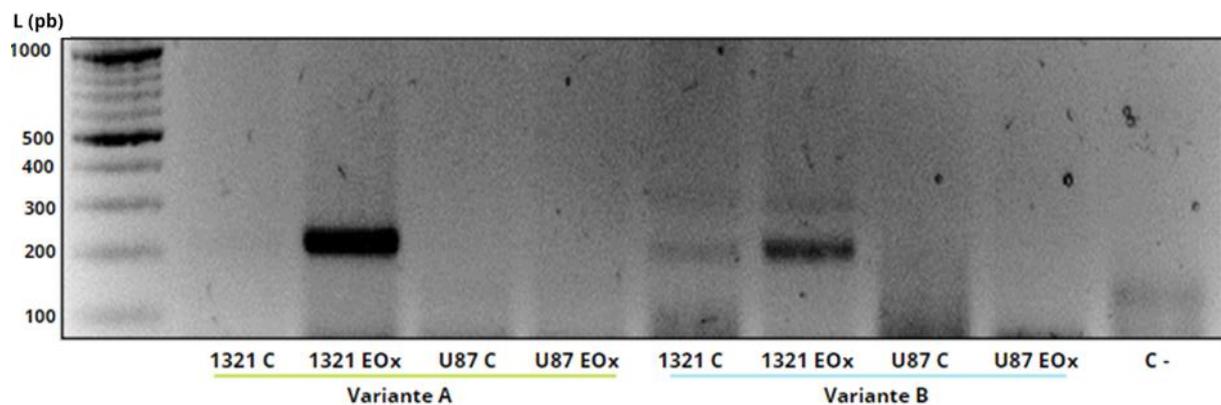


Figura 10 - Electroforesis tras amplificación de las variantes A y B a partir de cDNA de células astrocitarias 1321N1 y U87 en condiciones Control y de EOx.

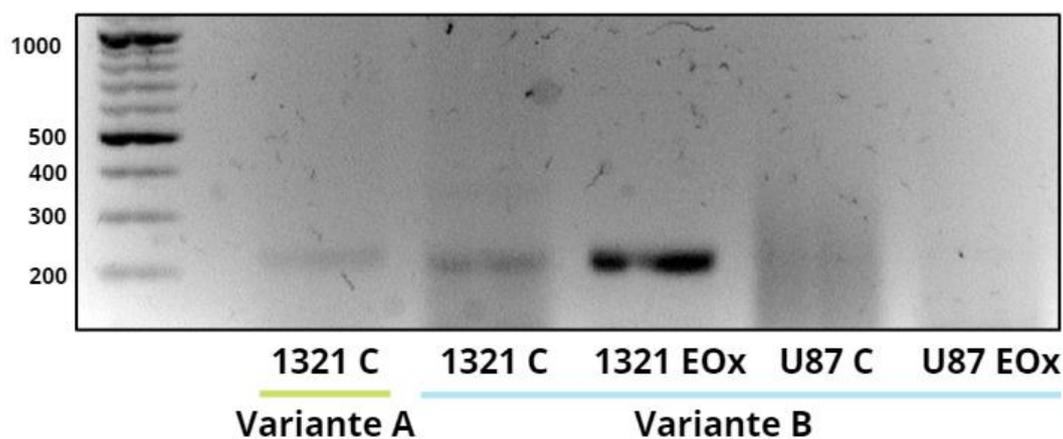


Figura 11 - Electroforesis tras amplificación con 40 ciclos de cDNA de células astrocitarias 1321N1 y U87 en condiciones control y de EOx

En la Figura 12, la amplificación con los oligonucleótidos para la variante C muestra transcritos de en torno a las 130 y 200 pb (amplificados con dos parejas diferentes de oligonucleótidos (Tabla 4; Figura 8). Estos fragmentos tienen tamaños superiores a los esperados. Ambos transcritos mostraron una mayor cantidad aparente en presencia de EOx.

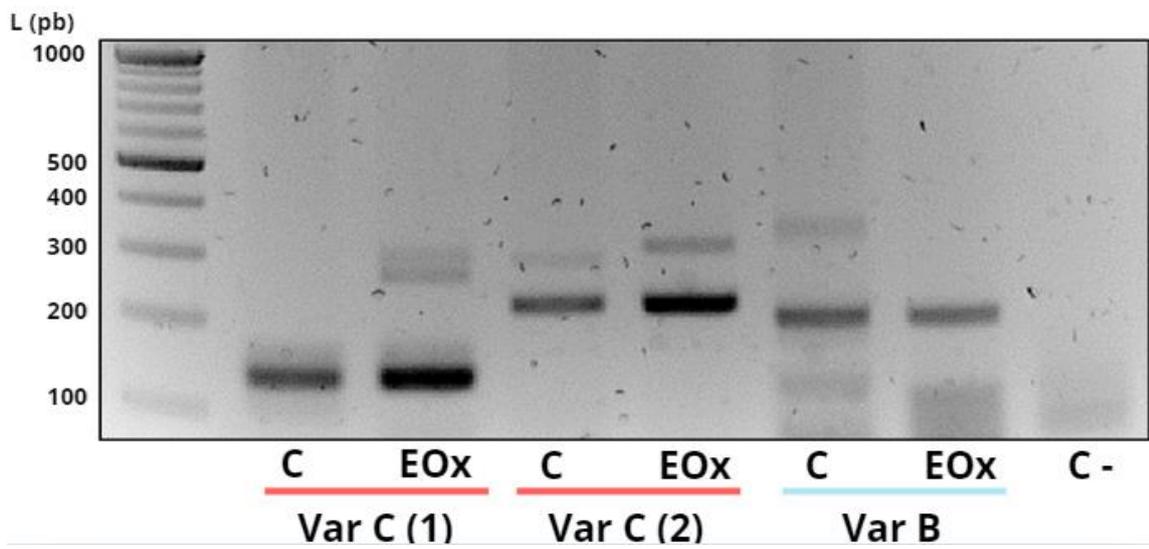


Figura 12 – Electroforesis tras amplificación de cDNA de células astrocitarias 1321N1 en condiciones control y de EOx con cebadores para las variantes C y B. Para la variante C se usaron dos parejas de oligonucleótidos diferentes (Tabla 4; Figura 8).

4.5. Patrones de expresión en relación a genes control y a la expresión neta de la secuencia codificante de ApoD

Para confirmar las observaciones de expresión y posibles cambios cuantitativos en la misma, se llevaron a cabo PCRs incluyendo la amplificación del gen L18 en las dos condiciones experimentales (Figuras 13 y 14).

Esto nos permitió determinar que la concentración de cDNA en la reacción de muestras control era más elevada que en las muestras sometidas a EOx. Por lo tanto, el resto de resultados para las variantes debe ser analizado teniendo esto en cuenta.

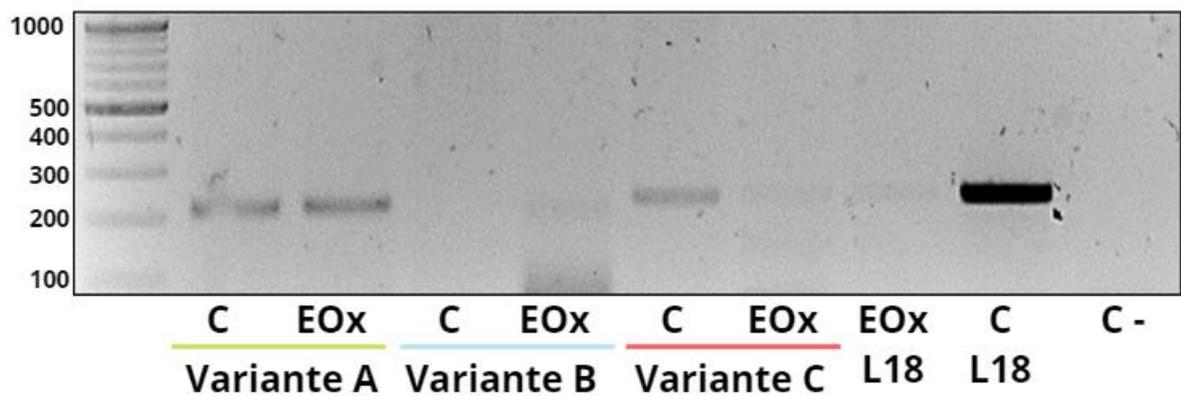


Figura 13 - Electroforesis tras amplificación de las 3 variantes de ApoD y el gen L18 que permite determinar la concentración del DNA molde en las muestras Control y EOx.

Tras estos resultados quisimos comprobar el nivel de expresión del gen ApoD (en cualquiera de sus variantes de mRNA) en las muestras analizadas (Figura 14).

Se obtuvieron bandas del tamaño esperado, similares en cantidad aparente en ambas condiciones, pese a la concentración de cDNA molde muy superior de las muestras control.

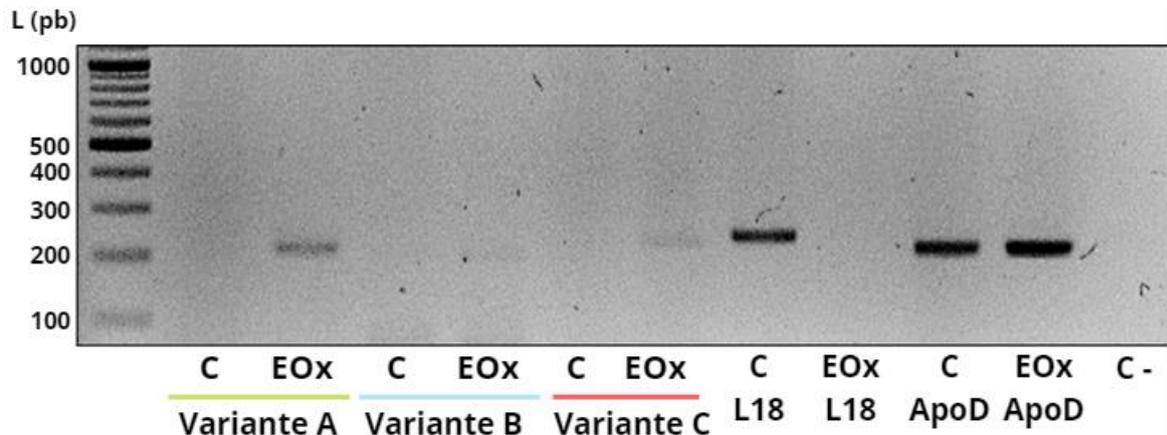


Figura 14 - Electroforesis tras amplificación de las 3 variantes de ApoD, el gen L18, y un fragmento de la CDS de ApoD que permite determinar la expresión del mRNA de ApoD en cualquiera de sus variantes.

5. Discusión

A través de las investigaciones llevadas a cabo, parece razonable afirmar que el extremo 5'UTR del gen de ApoD es procesado por “splicing” alternativo, tal y como ya había sido observado por otros autores en modelos de ratón (32).

Dichas variantes parecen tener un patrón de expresión cambiante en función de las condiciones del medio celular, habiéndose observado un aumento aparente de todas ellas con la presencia de EOx, sin hallarse de forma clara una variante dominante bajo condiciones de EOx. La amplificación del fragmento propio de la CDS de la proteína de ApoD también muestra la sobreexpresión de esta en condiciones de EOx. Esta circunstancia puede considerarse compatible con los cambios de expresión observados en el ratón y la sobreexpresión que ApoD sufre en condiciones de EOx en células y tejidos de ratón (12,13).

Pese a la no amplificación con la pareja de oligonucleótidos Ex3-For y CDS en las pruebas con DNA genómico, la presencia reiterada de la banda correspondiente al amplicón Ex3-For/CDS-Rev en torno a las 200 pb en las RT-PCR realizadas posteriormente invita a pensar que su ausencia en el genómico es más debida a las limitaciones propias de la DNA polimerasa ante la excesiva longitud del transcrito (3300pb). Nuevas investigaciones con una polimerasa adecuada a la longitud del transcrito deberían ser suficientes para la amplificación de la banda a partir de gDNA.

La variante A, considerada históricamente como canónica, ha sido la única en demostrar su presencia en condiciones C y EOx en todas las PCRs realizadas (con dos reacciones de RT independientes a partir de células 1321N1). Además, la longitud del fragmento se ajustó a las

predicciones *in silico*. Otros autores (24) y la base de datos UTRdb han sugerido la presencia de inicios de transcripción alternativos para el exón 1, presente en todas las variantes, lo que podría ser indagado en nuevas investigaciones mediante el diseño de nuevos oligonucleótidos.

Las variantes B y C han sido clásicamente clasificadas como variantes alternativas, cuya presencia estaría sujeta a ciertos factores promotores o inhibidores que modularan el “splicing”.

Hemos demostrado la presencia de la variante B en condiciones control y EOx en la segunda reacción de RT de 1321N1 usada, demostrando un aumento aparente de su presencia en las células sometidas a EOx. La longitud del fragmento demostrado de forma experimental fue la esperada para los oligonucleótidos empleados (Ex2For/CDS-Rev).

En cuanto a la Variante C, las predicciones *in silico* de UTRdb parecen mostrar ciertas discrepancias con las longitudes que hemos hallado de forma experimental. La longitud predicha para el transcrito Ex3For/CDS-Rev (136 pb) dista alrededor de 60 pb de la banda que se observa de forma reiterada en los geles (en torno a las 200 pb). Otros autores han considerado al exón 4 del 5'UTR como un exón constitutivo (24). La presencia de este exón adyacente al inicio de la CDS podría responder, en parte, al disenso que se observa entre las predicciones por UTRdb y nuestra observación experimental.

Además, la pareja de oligonucleótidos Ex1-For/Ex3-Rev amplifica un fragmento de alrededor de 50 pb, superior a las predicciones *in silico*. Otros autores han señalado que el tamaño de E3 podría ser superior a las 73 pb predichas por UTRdb, identificando para él multitud de lugares de “splicing” alternativo a lo largo de su secuencia. Estimaciones basadas en otras bases de datos y predictores de corte/empalme estiman como tamaño más probable 113 pb (24). Este hecho, además de la posibilidad de la incorporación de E4 a la variante C, podrían dar respuesta a la discrepancia de ambos transcritos específicos de la variante C.

6. Conclusiones

- Este trabajo demuestra que el extremo 5'UTR del mRNA de ApoD humana es procesado por “splicing” alternativo, evidenciándose 3 variantes diferentes.
- El patrón de expresión de dichas variantes es cambiante ante condiciones de EOx.
- Las discrepancias entre las predicciones *in silico* y las observaciones experimentales para la variante C, pueden deberse a un mayor tamaño del E3, además de la inclusión del E4, considerado clásicamente como constitutivo.

- El presente estudio sienta las bases sobre las que sustentan estudios funcionales de las diferentes variantes y de su aportación a la estabilidad y capacidad de traducción del mRNA de ApoD en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas.

7. Bibliografía:

1. Ganfornina MD, Gutiérrez G, Bastiani M, Sánchez D. A phylogenetic analysis of the lipocalin protein family. *Mol Biol Evol.* enero de 2000;17(1):114-26.
2. Morais Cabral JH, Atkins GL, Sánchez LM, López-Boado YS, López-Otin C, Sawyer L. Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function. *FEBS Lett.* 5 de junio de 1995;366(1):53-6.
3. Ruiz M, Sanchez D, Correnti C, Strong RK, Ganfornina MD. Lipid-binding properties of human ApoD and Lazarillo-related lipocalins: functional implications for cell differentiation. *FEBS J.* 2013;280(16):3928-43.
4. Boyles JK, Notterpek LM, Wardell MR, Rall SC. Identification, characterization, and tissue distribution of apolipoprotein D in the rat. *J Lipid Res.* diciembre de 1990;31(12):2243-56.
5. Provost PR, Villeneuve L, Weech PK, Milne RW, Marcel YL, Rassart E. Localization of the major sites of rabbit apolipoprotein D gene transcription by in situ hybridization. *J Lipid Res.* 1 de diciembre de 1991;32(12):1959-70.
6. Sanchez D, Ganfornina MD. The Lipocalin Apolipoprotein D Functional Portrait: A Systematic Review. *Front Physiol.* 7 de octubre de 2021;12:738991.
7. Tsukamoto K, Mani DR, Shi J, Zhang S, Haagenen DE, Otsuka F, et al. Identification of apolipoprotein D as a cardioprotective gene using a mouse model of lethal atherosclerotic coronary artery disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 de octubre de 2013;110(42):17023-8.
8. Sánchez D, Ganfornina MD, Martínez S. Expression pattern of the lipocalin Apolipoprotein D during mouse embryogenesis. *Mech Dev.* 1 de enero de 2002;110(1):225-9.
9. Dassati S, Waldner A, Schweigreiter R. Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. *Neurobiol Aging.* 1 de julio de 2014;35(7):1632-42.
10. García-Mateo N, Pascua-Maestro R, Pérez-Castellanos A, Lillo C, Sanchez D, Ganfornina MD. Myelin extracellular leaflet compaction requires apolipoprotein D membrane management to optimize lysosomal-dependent recycling and glycocalyx removal. *Glia.* marzo de 2018;66(3):670-87.
11. Kalman J, McConathy W, Araoz C, Kasa P, Lacko AG. Apolipoprotein D in the aging brain and in Alzheimer's dementia. *Neurol Res.* junio de 2000;22(4):330-6.
12. Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM, Torres-Schumann S, Vogel M, Allhorn M, et al. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell.* 2008;7(4):506-15.
13. Bajo-Grañeras R, Ganfornina MD, Martín-Tejedor E, Sanchez D. Apolipoprotein D mediates autocrine protection of astrocytes and controls their reactivity level, contributing to the functional maintenance of paraquat-challenged dopaminergic systems. *Glia.* 2011;59(10):1551-66.
14. Terrisse L, Poirier J, Bertrand P, Merched A, Visvikis S, Siest G, et al. Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J Neurochem.* octubre de 1998;71(4):1643-50.
15. Li H, Ruberu K, Muñoz SS, Jenner AM, Spiro A, Zhao H, et al. Apolipoprotein D modulates amyloid pathology in APP/PS1 Alzheimer's disease mice. *Neurobiol Aging.* mayo de 2015;36(5):1820-33.
16. Ganfornina MD, Do Carmo S, Martínez E, Tolia J, Navarro A, Rassart E, et al. ApoD, a glia-derived apolipoprotein, is required for peripheral nerve functional integrity and a timely response to injury. *Glia.* 15 de agosto de 2010;58(11):1320-34.

17. García-Mateo N, Ganfornina MD, Montero O, Gijón MA, Murphy RC, Sanchez D. Schwann cell-derived Apolipoprotein D controls the dynamics of post-injury myelin recognition and degradation. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 11 de noviembre de 2014 [citado 7 de abril de 2024];8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2014.00374>
18. Pascua-Maestro R, Corraliza-Gomez M, Fadrique-Rojo C, Ledesma MD, Schuchman EH, Sanchez D, et al. Apolipoprotein D-mediated preservation of lysosomal function promotes cell survival and delays motor impairment in Niemann-Pick type A disease. *Neurobiol Dis.* octubre de 2020;144:105046.
19. Suresh S, Yan Z, Patel RC, Patel YC, Patel SC. Cellular cholesterol storage in the Niemann-Pick disease type C mouse is associated with increased expression and defective processing of apolipoprotein D. *J Neurochem.* enero de 1998;70(1):242-51.
20. Lehninger principles of biochemistry. Eighth edition, 2nd printing. New York: Macmillan International Higher Education; 2022. 1239 p.
21. Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* 2002;3(3):reviews0004.1-reviews0004.10.
22. Leppék K, Das R, Barna M. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nat Rev Mol Cell Biol.* marzo de 2018;19(3):158-74.
23. Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(21):3613-34.
24. Mejías Romero A. Caracterización de las UTR 5' y 3' de las lipocalinas de mamíferos: estudios predictivos sobre su papel en la regulación post-transcripcional. Tesis Dr [Internet]. 12 de febrero de 2016 [citado 10 de abril de 2024]; Disponible en: <https://idus.us.es/handle/11441/39153>
25. Hinnebusch AG, Ivanov IP, Sonenberg N. Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science.* 17 de junio de 2016;352(6292):1413-6.
26. Sánchez D, Ganfornina MD, Gutiérrez G, Marín A. Exon-intron structure and evolution of the Lipocalin gene family. *Mol Biol Evol.* mayo de 2003;20(5):775-83.
27. Rassart E, Bedirian A, Do Carmo S, Guinard O, Sirois J, Terrisse L, et al. Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta.* 18 de octubre de 2000;1482(1-2):185-98.
28. Lambert J, Provost PR, Marcel YL, Rassart E. Structure of the human apolipoprotein D gene promoter region. *Biochim Biophys Acta.* 20 de febrero de 1993;1172(1-2):190-2.
29. Levros LC, Carmo SD, Edouard E, Legault P, Charfi C, Rassart E. Characterization of nuclear factors modulating the apolipoprotein D promoter during growth arrest: Implication of PARP-1, APEX-1 and ERK1/2 catalytic activities. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1 de septiembre de 2010;1803(9):1062-71.
30. Mejias A, Diez-Hermano S, Ganfornina MD, Gutierrez G, Sanchez D. Characterization of mammalian Lipocalin UTRs in silico: Predictions for their role in post-transcriptional regulation. *PLoS ONE.* 6 de marzo de 2019;14(3):e0213206.
31. Provost PR, Tremblay Y, el-Amine M, Bélanger A. Guinea pig apolipoprotein D RNA diversity, and developmental and gestational modulation of mRNA levels. *Mol Cell Endocrinol.* 1 de abril de 1995;109(2):225-36.
32. Diez-Hermano S, Mejias A, Sanchez D, Gutierrez G, Ganfornina MD. Control of the neuroprotective Lipocalin Apolipoprotein D expression by alternative promoter regions and differentially expressed mRNA 5' UTR variants. *PLoS ONE.* 19 de junio de 2020;15(6):e0234857.

8. Agradecimientos

A Diego y Lola por compartir su saber, transmitir su vitalidad y darme la oportunidad estos años de conocer de un modo más profundo la ciencia básica desde su laboratorio. A Jorge por su plena disponibilidad y simpatía. A David por guiarme en mis primeros pasos.

A mis hermanos por ser fuente de inspiración y a mis padres, por todo. A los compañeros de un largo viaje que se cierra con este trabajo. Gracias.

9. Anexos

Anexo 1: Métodos y materiales

1. Protocolo de extracción de RNA con QIAzol

Las células sembradas en placas de 1,9 cm² se levantaron con tripsina 0,25% y se sometieron a centrifugación a 200 G 5 minutos. Al pellet obtenido se le añadió reactivo de lisis QIAzol (QIAGEN) para la desnaturalización de las proteínas. Se añadió cloroformo (1:5) y se agitó con fuerza manualmente para segregar el RNA del resto de elementos celulares. Se centrifuga la muestra (12 000 G, 15 minutos, 4°C), Posteriormente fue posible diferenciar en la muestra dos fases, una más inferior correspondiente a las proteínas y DNA, y otra superior, de consistencia acuosa, correspondiente al RNA. Entre ellas se situaba una interfase blanquecina con el proteínas desnaturalizadas y DNA (que debe descartarse). Se recogió la fase superior con el RNA y se mezcló con isopropanol 1:1. Tras su incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente se ratificó su precipitación centrifugándose 10 minutos a 12 000 G. Se descartó el sobrenadante y se lavó el RNA con etanol al 70 % en dos ocasiones con 15 minutos de intervalo entre ellas. Finalmente se añadieron 50 µL de agua purificada (pre-tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC) para la eliminación de las RNAsas).

Splicing Alternativo en el Extremo 5'UTR del Gen de ApoD Humana

Autor: Alejandro Sánchez Díez.

Tutores: Diego Sánchez Romero y María Dolores Ganfornina Álvarez



Introducción

La regulación de la expresión génica en eucariotas es altamente compleja y se compone de numerosos procesos. Las modificaciones postranscripcionales tienen como resultado un mRNA maduro divisible en 3 partes, la secuencia codificante (CDS) y los dos extremos no codificantes, 5'UTR y 3'UTR.

El segmento 5'UTR puede procesarse por splicing alternativo dando lugar a transcritos con diferente eficiencia de traducción y resistencia a la degradación, jugando un papel en la regulación de la expresión proteica final. El patrón de expresión de la pluralidad de transcritos podría variar en función de variables como el entorno celular.

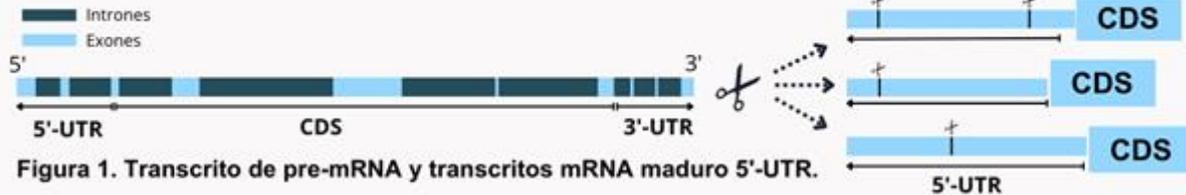
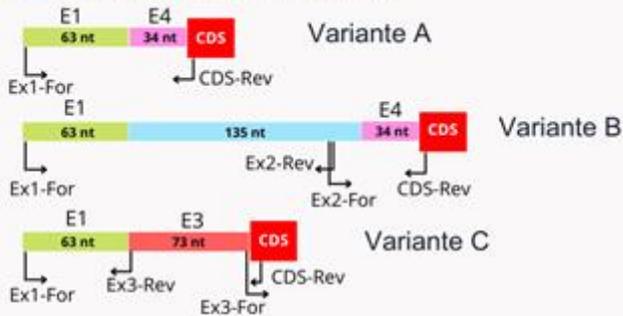


Figura 1. Transcrito de pre-mRNA y transcritos mRNA maduro 5'UTR.

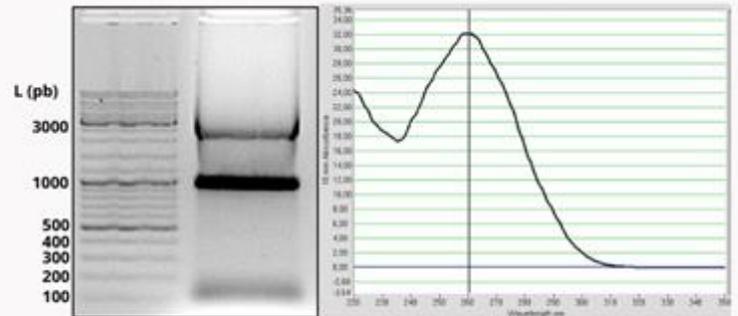
Por otro lado, ApoD es una lipoproteína transportadora de pequeños lípidos que ha demostrado tener un papel neuroprotector, aumentando la supervivencia glial y neuronal ante situaciones de estrés oxidativo (EOx).

Métodos y Resultados

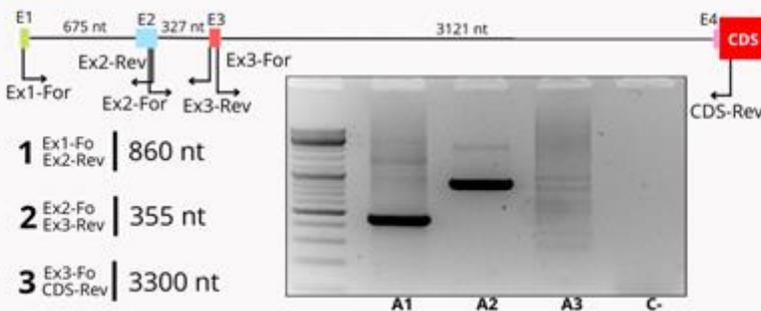
1 Búsqueda de variantes (UTRdb) y diseño de primers (PrimerBLAST).



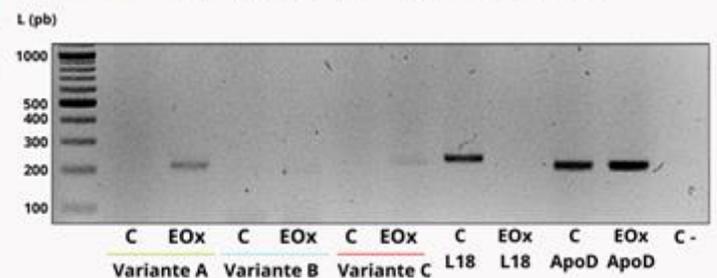
2 Extracción, cuantificación y control de calidad del RNAm.



3 Comprobación de primers con DNA genómico



4 Expresión de diferentes variantes en astrocitos y dependencia del EOx



Conclusiones

1. Este trabajo demuestra que el extremo 5'UTR del mRNA de ApoD humana es procesado por "splicing" alternativo, evidenciándose 3 variantes diferentes.
2. El patrón de expresión de dichas variantes es cambiante ante condiciones de EOx.
3. Existen ciertas discrepancias entre las predicciones in silico y las observaciones experimentales para la variante C que podrían ser abordadas en futuras investigaciones.
4. El presente estudio sienta las bases sobre las que sustentar estudios funcionales de las diferentes variantes y de su aportación a la estabilidad y capacidad de traducción del mRNA de ApoD en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas.