



**Universidad**  
Zaragoza



Facultad de Ciencias  
**Universidad Zaragoza**

---

# **El sistema de fosforilación oxidativa en el Síndrome de Down**

Trabajo de Fin de Máster  
Biología Molecular y  
Celular

Autora:

**Laura Gallego Ramírez**

Directores:

Dra. Nuria Garrido Pérez

Dr. Eduardo Ruiz Pesini

Departamento de Bioquímica,  
Biología Molecular y Celular  
Facultad de Ciencias

2022

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
1. Resumen/Abstract.....	3
2. Introducción .....	4
2.1 Síndrome de Down.....	4
2.2 Sistema de fosforilación oxidativa .....	4
2.3 Sistema de fosforilación oxidativa y su relación con el Síndrome de Down.....	5
2.4 Genes responsables del Síndrome de Down relacionados con la función del Sistema de Fosforilación Oxidativa.....	6
2.5 Posibles terapias dirigidas a la fosforilación oxidativa en el Síndrome de Down .....	10
3. Objetivos .....	12
4. Planteamiento del trabajo .....	12
5. Material y métodos.....	13
5.1 Kits y reactivos comerciales .....	13
5.2 Cultivos celulares.....	13
5.2.1 Líneas celulares .....	13
5.2.2 Mantenimiento celular y recogida de pellets .....	13
5.2.3 Congelación y descongelación celular.....	14
5.2.4 Recuento celular .....	15
5.2.5 Detección de <i>Mycoplasma spp.</i> .....	15
5.2.6 Diferenciación neuronal de SH-SY5Y.....	16
5.2.7 Inmunofluorescencia.....	17
5.3 Técnicas de manipulación de RNA total.....	18
5.3.1 Técnicas de extracción de RNA total.....	18
5.3.2 Cuantificación de RNA total por espectrofotometría .....	19
5.3.3 Tratamiento de las muestras con DNasa .....	19
5.3.4 Obtención de cDNA a partir de RNA mediante RT-PCR .....	20
5.3.5 Diseño de primers para PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) .....	20
5.3.6 Análisis de expresión por qPCR (SYBR Green).....	20
5.3.7 Análisis de expresión por qPCR (Método Sondas Taqman) .....	22
5.3.8 Electroforesis horizontal de DNA en geles de agarosa .....	23
5.4 Técnicas de análisis de proteínas .....	24
5.4.1 Preparación de extractos celulares totales.....	24
5.4.2 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford .....	24

5.4.3 Western blot .....	25
5.4.3.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE .....	25
5.4.3.2 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF .....	26
5.4.3.3 Incubación de la membrana con los anticuerpos .....	27
5.4.3.4 Detección quimioluminiscente.....	29
5.5 Aplicaciones bioinformáticas análisis estadístico de los resultados. ....	29
6. Resultados .....	30
6.1 Medida de la expresión de los transcritos de los genes de interés .....	30
6.2 Comprobación de resultados de la qPCR mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa .....	31
6.3 Resultado de las PCR para descartar la contaminación por micoplasmas.....	32
6.4 Medida de la expresión de los genes de interés mediante Western Blot .....	33
6.5 Resultados de la diferenciación a neurona de las células SH-SY5Y que sobreexpresan BACH1.....	34
6.6 Resultados de la inmunofluorescencia .....	37
6.7 Medida de la expresión de <i>BACH1</i> tras la diferenciación neuronal mediante Western Blot .....	38
7. Discusión .....	40
8. Conclusiones.....	43
8.1 Conclusiones.....	43
8.2 Conclusions.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	45

## **ABREVIATURAS**

<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>β-GPA</b>	β-Guanidinopropiónico
<b>μl</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b><i>BACH1</i></b>	Dominio BTB y del homólogo CNC 1
<b>bp</b>	Pares de bases
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>CI</b>	Complejo I del sistema OXPHOS
<b>CII</b>	Complejo II del sistema OXPHOS
<b>CIII</b>	Complejo III del sistema OXPHOS
<b>CIV</b>	Complejo IV del sistema OXPHOS
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CV</b>	Complejo V del sistema OXPHOS
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMEM</b>	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNasa I</b>	Desoxirribonucleasa I
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleósido trifosfato
<b>DS</b>	Síndrome de Down
<b>dsDNA</b>	DNA bicatenario
<b><i>DYRK1A</i></b>	Quinasa 1 regulada por la fosforilación de tirosina de doble especificidad
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGCG</b>	Epigallocatequina-3-galato
<b>ETC</b>	Cadena de transporte de electrones
<b>FAD/FADH<sub>2</sub></b>	Flavina Adenina dinucleótido oxidada y reducida
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>g</b>	Fuerza centrífuga relativa (gravedad)
<b>h</b>	Hora
<b>Hsa21</b>	Cromosoma 21
<b>mA</b>	Miliamperios
<b>ml</b>	Militro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial

<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrógeno líquido
<b>NAD<sup>+</sup>/NADH</b>	Dinucleótido de Adenina y Nicotnamida oxidado y reducido
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sodio
<b>NCBI</b>	Centro nacional de información biotecnológica
<b>nDNA</b>	DNA nuclear
<b>NFATc</b>	Factor nuclear de las células T activadas
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NRIP1</b>	Proteína que interactúa con el receptor nuclear 1
<b>NFE2L2 (NRF2)</b>	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
<b>nt</b>	Nucleótidos
<b>OXPHOS</b>	Sistema de fosforilación oxidativa
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDB</b>	Banco de datos de proteínas
<b>PFKL</b>	Fosfofructoquinasa de tipo hepático
<b>PKNOX1</b>	PBX/knotted 1 homeobox 1
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PPARGC1A</b>	Transcriptional co-activator o PGC-1 $\alpha$
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa
<b>RCAN1</b>	Regulador de la calcineurina 1
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNasa A</b>	Ribonucleasa A
<b>rpm</b>	Revolución por minuto
<b>rRNA</b>	RNA ribosómico
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa
<b>s</b>	Segundo
<b>Sc</b>	Supercomplejos respiratorios del sistema OXPHOS
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TAE</b>	Disolución tampón formada por Tris, acetato y EDTA
<b>T21</b>	Trisomía 21
<b>TEMED</b>	Tetrametiletildiamina
<b>Tm</b>	Temperatura de hibridación o de melting
<b>tRNA</b>	RNA de transferencia
<b>V</b>	Voltios

## 1. Resumen/Abstract

---

El Síndrome de Down, una enfermedad causada por la trisomía del cromosoma 21, es el trastorno genómico más común de la discapacidad intelectual. En este trabajo fin de máster nos vamos a centrar en el estudio de varios genes localizados en el cromosoma 21 que están sobreexpresados en el Síndrome de Down. Su sobreexpresión reduce la biogénesis mitocondrial y la fosforilación oxidativa, lo que conlleva efectos negativos en la neurogénesis. Los genes objeto de estudio son *BACH1*, *DYRK1A*, *NRIP1*, *PFKL*, *PKNOX1* y *RCAN1*.

Mediante técnicas para medir la expresión génica, Real Time PCR y Western Blot, se ha comprobado la sobreexpresión de dichos genes en células SH-SY5Y, una línea celular de neuroblastoma humano que puede diferenciarse a neurona. Posteriormente, se ha estudiado el efecto de dicha sobreexpresión sobre la biogénesis y funcionalidad mitocondrial, la viabilidad celular y la diferenciación a neurona de estas células SH-SY5Y. Finalmente, en la búsqueda de fármacos que, mejorando la biogénesis mitocondrial, puedan ser utilizados en el tratamiento prenatal de fetos con Síndrome de Down se ha comprobado como la hemina, a una concentración 10  $\mu$ M, reduce los niveles de *BACH1* en células SH-SY5Y que sobreexpresan este gen sin afectar a la viabilidad celular.

*Down syndrome, a disease caused by trisomy of chromosome 21, is the most common genomic disorder of intellectual disability. In this master's thesis we will focus on the study of several genes located on chromosome 21 that are overexpressed in Down syndrome. Their overexpression reduces mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation, leading to negative effects on neurogenesis. The genes under study are BACH1, DYRK1A, NRIP1, PFKL, PKNOX1 and RCAN1.*

*Using techniques to measure gene expression, Real Time PCR and Western Blot, the overexpression of these genes in SH-SY5Y cells, a human neuroblastoma cell line that can differentiate into neurons, has been verified. Subsequently, the effect of such overexpression on mitochondrial biogenesis and functionality, cell viability and differentiation to neuron of these SH-SY5Y cells has been studied. Finally, in the search for drugs that, by improving mitochondrial biogenesis, can be used in the prenatal treatment of fetuses with Down syndrome, it has been shown that hemin, at a concentration of 10  $\mu$ M, reduces BACH1 levels in SH-SY5Y cells that overexpress this gene without affecting cell viability.*

## 2. Introducción

---

### 2.1 Síndrome de Down

El Síndrome de Down (DS) es un trastorno multigénico y multisistémico causado principalmente por una **tercera copia parcial o completa del cromosoma 21** (Hsa21), también conocida como trisomía 21 (T21). A nivel mundial, el DS afecta a 1 de cada 1000 a 1100 nacidos vivos cada año, lo que lo convierte en el trastorno genético del desarrollo más común en los seres humanos (1). A pesar de los avances significativos en la detección prenatal no invasiva, la prevalencia del DS se ha mantenido relativamente sin cambios durante los últimos 30 años, en parte debido a la edad cada vez mayor de las madres embarazadas (2). Está asociado con dificultades intelectuales y cognitivas, pero a menudo este síndrome involucra múltiples manifestaciones, incluidas: demencia, hipotiroidismo, defectos cardíacos congénitos, convulsiones, déficit auditivo y visual, y complicaciones musculares y gastrointestinales entre otras. El deterioro cognitivo aparece comúnmente en edades tempranas y el riesgo de demencia en este periodo y de enfermedad de Alzheimer es muy elevado (3).

Según la investigación, la discapacidad intelectual es un aspecto clave en el DS, ya que los afectados muestran una superficie cortical reducida, un menor volumen cerebral y una neurogénesis deficiente, ya en el periodo fetal (1). Además, la diferenciación neuronal y la capacidad proliferativa de las células progenitoras neurales disminuyen y se ha observado un aumento de la muerte celular durante la vida fetal (4).

Comprender la patogenia de la demencia de aparición temprana en adultos es el objetivo de la mayoría de ensayos clínicos relacionados con esta enfermedad, mientras que los programas de búsqueda de nuevos tratamientos se centran en mejorar la cognición y retrasar el desarrollo de la demencia en adolescentes y adultos (5).

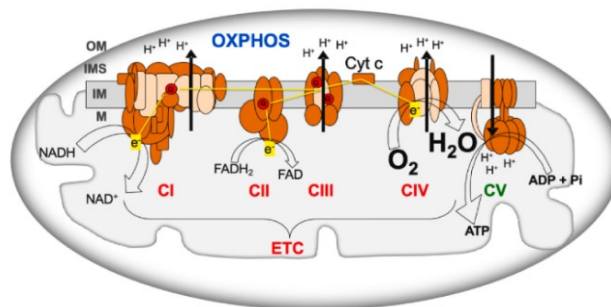
### 2.2 Sistema de fosforilación oxidativa

El **sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)** es el principal productor de ATP de la célula mediante el proceso de respiración celular. Se compone de cinco complejos protéicos que pueden aparecer asociados en supercomplejos o por separado en complejos individuales, según el estado metabólico celular (6).

El sistema OXPHOS se sitúa en la membrana mitocondrial interna y está formado por la cadena de transporte de electrones (ETC), compuesta por los complejos respiratorios I a IV (CI-CIV), citocromo c y coenzima Q; y la ATP sintasa (complejo V, CV) (Figura 1). En el sistema OXPHOS, los electrones de los nutrientes reducen las coenzimas de flavina y nicotinamida ( $FAD/FADH_2$  y  $NAD^+/NADH$ ), que reducen la coenzima Q (ubiquinona/ubiquinol) a través de CI y CII. Los electrones de ubiquinol reducen el oxígeno a agua a través de CIII, citocromo c y CIV. El flujo de electrones a través de la

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 (7).

El DNA mitocondrial (mtDNA) es una molécula circular, cerrada y superenrollada que, en humanos, contiene 37 genes de los cuales 13 codifican para subunidades de los complejos del sistema OXPHOS, además de 22 RNAs de transferencia (tRNAs) y 2 ribosomales (rRNAs) que se requieren para su traducción dentro de las mitocondrias. El resto de proteínas mitocondriales están codificadas en cromosomas nucleares (nDNA) (8).



**Figura 1. Representación del sistema de fosforilación oxidativa OXPHOS.**ADP: Adenosín difosfato;ATP: Adenosín trifosfato;Cyt c, citocromo c; CI-IV, complejos respiratorios I-IV; CV, ATP sintasa; ETC, cadena de transporte de electrones; $e^-$ ,electrones; FADH<sub>2</sub>/FAD, dinucleótido de flavina adenina reducido y oxidado; NADH/NAD<sup>+</sup>, dinucleótido de nicotinamida reducido y oxidado; IM; membrana interna mitocondrial; OM, membrana externa mitocondrial; IMS, espacio intermembrana; M, matriz mitocondrial; H<sub>2</sub>O, agua; H<sup>+</sup>, protones; O<sub>2</sub>, oxígeno; Pi, fosfato; Q, coenzima Q. Los colores marrón y rosa se usan para las subunidades codificadas por nDNA y mtDNA respectivamente. Las líneas amarillas para el flujo de electrones. Flechas negras para el bombeo de protones. Imagen obtenida de (7)

### **2.3 Sistema de fosforilación oxidativa y su relación con el Síndrome de Down**

La mitocondria es el orgánulo intracelular encargado de realizar la respiración celular y aportar la mayor parte de adenosín trifosfato (ATP) como fuente de energía para la célula, a través del sistema OXPHOS. En aquellas células eucariotas que necesitan mayor aporte energético, las mitocondrias son más abundantes, un ejemplo de estas células serían las neuronas. Por tanto el sistema OXPHOS suministra la mayor parte de la energía para alimentar la actividad neuronal (9), que es fundamental para la neurogénesis durante el desarrollo fetal del cerebro (10), siendo necesaria en la diferenciación neuronal (11). Las mutaciones patológicas en genes relacionados con la función OXPHOS en ratones y en humanos pueden alterar la diferenciación neuronal produciendo nefastas consecuencias (12). Se ha visto como en células humanas que sobreexpresan un gen mutante de la proteína ribosomal mitocondrial S12 (*MRPS12*) la diferenciación neuronal se encuentra reducida significativamente (13).

De este modo, el sistema nervioso central queda gravemente afectado en enfermedades relacionadas con el sistema OXPHOS (14). Se ha estudiado como un



deterioro en este metabolismo energético de la mitocondria contribuye a la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas tales como Parkinson o Alzheimer (15).

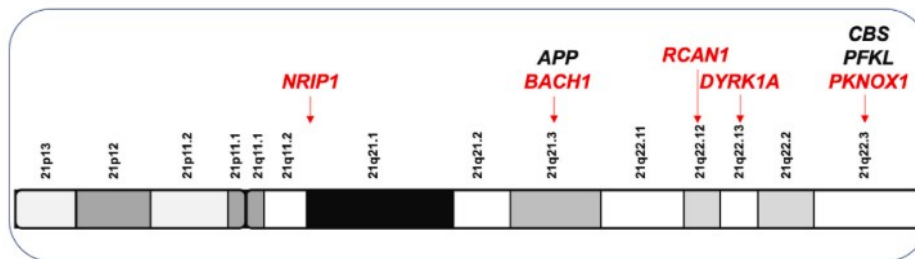
La sobreexpresión de genes en el cromosoma 21 es responsable de la patogenicidad del DS. En el cromosoma 21 hay 222 genes que codifican proteínas que pueden estar directa o indirectamente involucradas en la homeostasis de células, tejidos, órganos y sistemas (3). Se ha demostrado como algunos de estos genes intervienen en la expresión y actividad de otros genes, muchos de los cuales están implicados en la función del sistema OXPHOS (7). En modelos de ratón de DS, utilizados para estudiar la neurogénesis y diferentes parámetros mitocondriales, hubo una disminución del RNA mensajero (mRNA) de los genes relacionados con el sistema OXPHOS, de genes relacionados con la biogénesis mitocondrial y de la cantidad de mtDNA en el músculo esquelético (16).

El estudio en humanos reveló que la expresión de los genes de todos los complejos OXPHOS se encontraba reducida en corazones, fibroblastos y amniocitos fetales con DS de 8 a 22 semanas de gestación (17). En fetos de DS de 14 a 19 semanas, se observaron niveles reducidos de mRNA de varias subunidades de complejos del sistema OXPHOS en el cerebro y cerebelo, acompañadas de una menor transcripción de genes codificados por el mtDNA y una menor cantidad de este (18). La actividad de los complejos ETC en fetos con DS entre 14 y 22 semanas se observó disminuida en fibroblastos, linfocitos y plaquetas (19). Además, se comprobó una disminución del contenido de coenzima Q en linfocitos, plaquetas y plasma de individuos con DS, lo que implica que la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina está alterada (20). Se puede observar como todas estas modificaciones en el sistema OXPHOS dan lugar a una reducción de la producción de energía y de la función mitocondrial, reflejada en diferentes tejidos o tipos celulares a cualquier edad, ya sea en la edad adulta o en el desarrollo fetal, siendo un evento temprano y común en los individuos con DS. Es interesante también señalar que en pacientes con DS encontramos muchas condiciones médicas comunes a las asociadas a enfermedades mitocondriales tales como epilepsia, dismotilidad intestinal, hipotonía u otros síntomas inespecíficos de las enfermedades mitocondriales como baja estatura, pérdida de audición, hipotiroidismo o trastorno de espectro autista (21). Por tanto, por todo lo anterior, el DS puede considerarse un trastorno del sistema OXPHOS (7).

#### **2.4 Genes responsables del Síndrome de Down relacionados con la función del Sistema de Fosforilación Oxidativa.**

Entre los genes del cromosoma 21 sobreexpresados en DS y que afectan a la función OXPHOS nos vamos a centrar en este trabajo fin de máster en: ***BACH1***, ***DYRK1A***, ***NRIP1***, ***PFKL***, ***PKNOX1*** y ***RCAN1*** (Figura 2).

Estos genes afectan OXPHOS produciendo un efecto negativo sobre la biogénesis mitocondrial, es decir, en el proceso mediante el cual las células incrementan el número de mitocondrias por el crecimiento y división de las mitocondrias ya existentes. Es necesario que, durante el desarrollo neural, crecimiento y división de las neuronas, las mitocondrias además de crecer, se dividan.



**Figura 2.** Localización, en el cromosoma 21, de los genes que afectan a la fosforilación oxidativa. En color rojo aquellos que afectan de forma negativa a la biogénesis mitocondrial. Imagen obtenida de (7).

El gen **RCAN1** es el **regulador de la calcineurina 1** y se localiza en el cromosoma 21 en la región 21q22.12. La proteína que codifica este gen está interactuando con la calcineurina A e inhibiendo la vía de transducción de señales que dependen de la calcineurina, que puede afectar al desarrollo del sistema nervioso central. La sobreexpresión de RCAN1 disminuye la actividad del factor nuclear de las células T activadas (NFATc) (22). Este factor nuclear actúa positivamente sobre el promotor del gen coactivador 1 $\alpha$  del receptor gamma activado por el proliferador del peroxisoma (*PGC-1 $\alpha$*  o *PPARGC1A*) (23). Se observa que *PPARGC1A* es clave para la biogénesis mitocondrial y la función OXPHOS (24).

*RCAN1* se expresa principalmente en músculo esquelético, cerebro, corazón y en tejidos endocrinos como la glándula adrenal y el páncreas (25). *RCAN1* se expande 45 kb y tiene 7 exones y 6 intrones (26). Gracias al procesamiento alternativo de los 4 primeros exones se producen 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 (27). RCAN1-1 se presenta como una forma larga, RCAN1-1L con 252 aminoácidos, y una forma corta, RCAN1-1S de 197 aminoácidos, que comienza en el exon 1 pero en un ATG posterior. RCAN1-1S y RCAN1-4, aunque cuentan ambas de 197 aminoácidos, se diferencian en su N-terminal. 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 principalmente en el sistema nervioso central mientras que RCAN1-4 se expresa mayoritariamente en el músculo cardíaco y el riñón y en áreas del cerebro en las que la calcineurina se expresa en gran medida (28).

El gen **DYRK1A** es el gen de la **quinasa 1 regulada por la fosforilación de tirosina de doble especificidad** situado en el cromosoma 21 en la posición 21q22.13 (7). Este gen está sobreexpresado en distintos tipos celulares, cerebros de adultos y de fetos de individuos con DS (29). Su acción es catalizar su autofosforilación en residuos de serina/treonina y tirosina (30). La sobreexpresión de DYRK1A disminuye la actividad del factor nuclear de las células T activadas (NFATc) lo que implica que niveles elevados de DYRK1A podrían disminuir la biogénesis mitocondrial (22).

*DYRK1A* se expande 149.5 kb y está compuesto de 17 exones. Existen dos sitios de inicio de la transcripción en los exones 1 y 2 que, mediante procesamiento alternativo, constituyen las dos isoformas mayoritarias de 763 y 754 aminoácidos. La isoforma más predominante de *DYRK1A* carece de los exones 13b y 13c y presenta 754 aminoácidos de longitud (29).

El gen **PFKL** de la **fosfofructoquinasa de tipo hepático** se localiza en el cromosoma 21 en la posición 21q22.3 (7). PFKL cataliza la conversión de D-fructosa 6-fosfato en D-fructosa 1,6-bisfosfato, paso imprescindible en el metabolismo de la glucosa en las células (31). Este gen es fundamental en la regulación del equilibrio metabólico entre la glucólisis y la función OXPHOS (32). Se encuentra sobreexpresado en distintos tipos de células y en el cerebro de los pacientes con DS (33). Se ha comprobado que su actividad enzimática está aumentada en los glóbulos rojos y fibroblastos en individuos con DS (34). La sobreexpresión de PFK regula negativamente la neurogénesis de las células madre neurales ya que inhibe la expresión de los factores transcripcionales pro-neuronales no permitiendo así su diferenciación neuronal (35).

*PFKL* está formado por 27 exones y mediante procesamiento alternativo da lugar a múltiples variantes del transcrito, entre las cuales, se encuentran las dos isoformas predominantes de 780 y 827 aminoácidos (31).

El gen **NRIP1** de la **proteína que interactúa con el receptor nuclear 1** está localizado en el cromosoma 21 en la posición 21q11.2-q21.1 (7). *NRIP1* codifica una proteína co-represora transcripcional situada en el núcleo que interactúa específicamente con el dominio de activación que depende de hormonas AF2 de los receptores nucleares (36).

*NRIP1* está sobreexpresado en distintos tipos de células de individuos con DS, se ha encontrado en cerebros fetales y fibroblastos (37). La sobreexpresión de NRIP1 en estos fibroblastos fetales con DS inhibe PPARGC1A y disminuye los niveles de mRNA de gran cantidad de genes relacionados con OXPHOS afectando, por consiguiente, a la biogénesis mitocondrial en diferentes células y tejidos (38).

El gen *NRIP1* se compone de 10 exones y se han descrito en Ensembl 7 transcritos producto del procesamiento alternativo de la secuencia codificante consenso, que son el origen de la proteína funcional de 1158 aminoácidos (39).

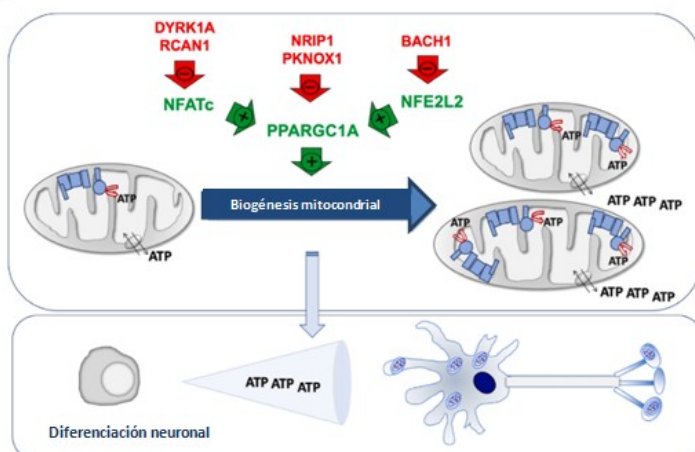
El gen ***PKNOX1*** o ***PBX/knotted 1 homeobox 1*** se localiza en el cromosoma 21 en la posición 21q22.3 (40). Este gen se encuentra sobreexpresado en distintos tipos celulares, en el cerebro fetal y fibroblastos de individuos con DS (41). *PKNOX1* codifica el factor de transcripción de homeodominio Prep1 que pertenece a la familia de las proteínas TALE (three-amino-acid loop extension). Su supresión específica en el músculo provoca una mayor expresión de las subunidades de cadena de transporte de electrones, una mayor actividad enzimática y una alta expresión de *PPARGC1A* (42). De este modo, la sobreexpresión de este gen está relacionada con un efecto negativo sobre la biogénesis mitocondrial y el sistema OXPHOS.

*PKNOX* se compone de 11 exones que por procesamiento alternativo conducen a 2 isoformas de 436 y 405 aminoácidos de la proteína funcional (43).

El gen ***BACH1*** del **dominio BTB y del homólogo CNC 1** se localiza en el cromosoma 21 en la banda cromosómica 21q21.3. Este gen está sobreexpresado en distintos tipos celulares de individuos con DS y en el cerebro adulto y fetal de éstos (44). *BACH1* es un represor de genes inducidos por el Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2 o NFE2L2) que desplaza a *BACH1* y regula de forma positiva muchos genes. *BACH1* también 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 (45). Además, en el promotor *PPARGC1A* encontramos secuencias consenso para NFE2L2 y por eso *BACH1* regula negativamente la biogénesis mitocondrial (46).

El gen *BACH1* se compone de 11 exones y se han descrito en Ensembl 13 transcritos producto del procesamiento alternativo de la secuencia codificante consenso que dan lugar a la proteína funcional de 736 aminoácidos (47).

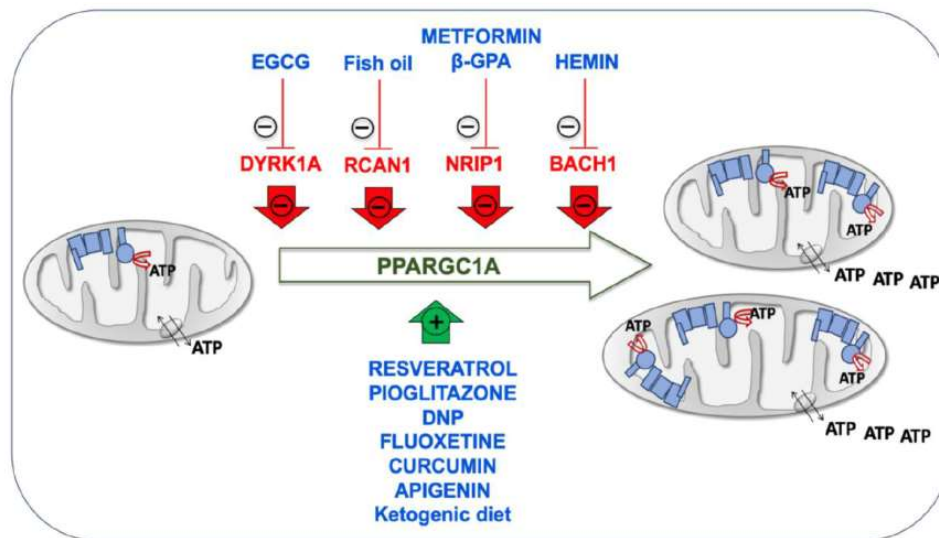
Por tanto, como se ha ido viendo, estos genes localizados en el cromosoma 21 regulan negativamente la expresión del factor *PPARGC1A* directa o indirectamente (48), reduciendo su actividad y provocando una disminución de la biogénesis mitocondrial que conlleva una alteración del sistema OXPHOS (Figura 3).



**Figura 3. Representación de los genes localizados en el cromosoma 21 que afectan de forma negativa a la biogénesis mitocondrial y, por tanto, producen una disminución de la síntesis de ATP necesaria para la neurogénesis.** ATP, adenosín trifosfato; NFATc, Factor nuclear de las células T activadas; PPARGC1A, transcriptional co-activador o PGC-1 $\alpha$ ; NFE2L2, Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2. Imagen obtenida de (7).

## 2.5 Posibles terapias dirigidas a la fosforilación oxidativa en el Síndrome de Down

En pacientes con DS sería interesante poder influir con tratamientos en las etapas prenatal y neonatal, ya que son los periodos críticos en los que se producen graves alteraciones neuromorfológicas durante su desarrollo cerebral. Se busca desarrollar posibles terapias para mejorar la neurogénesis y, con ello, el desarrollo cognitivo postnatal de estos enfermos (49) (Figura 4).



**Figura 4. Representación de las posibles terapias para mejorar la biogénesis mitocondrial.** ATP, adenosín trifosfat; EGCG, epigallocatequina-3-galato;  $\beta$ -GPA,  $\beta$ -guanadinopropiónico; Hemin, hemina; DPN, 2,4-dinitrofenol; PPARGC1A, transcriptional co-activador o PGC-1 $\alpha$ . En rojo aparecen los genes del cromosoma 21 que reprimen a biogénesis mitocondrial. PPARGC1A uno de los principales factores involucrados en la biogénesis mitocondrial es representado en verde. Los fármacos que mejoran la biogénesis mitocondrial están en color azul. *Imagen obtenida de (7).*

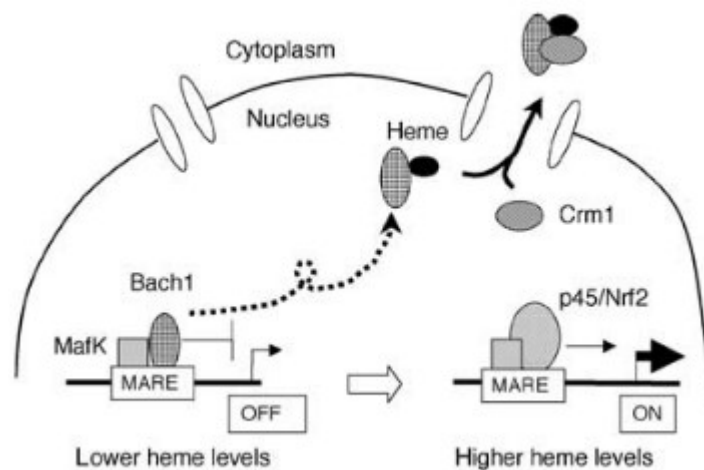
Se han propuesto como posibles terapias en pacientes con DS: la activación de PGC-1 $\alpha$ , que protege contra la lesión cerebral prenatal (50), usando fármacos como resveratrol, la pioglitazona o 2,4-dinitrofenol (DNP) que mejorarán la biogénesis mitocondrial; y la inhibición de proteínas sobreexpresadas en DS, que afectan de forma negativa la PGC-1 $\alpha$  y reducen la biogénesis mitocondrial (51).

La epigallocatequina-3-galato (EGCG) que es la catequina más abundante en el té, es un inhibidor de DYRK1A, mejorando con su efecto la función OXPHOS en fibroblastos de individuos con DS (52) y en modelos de ratón de DS se ha visto restaurada la neurogénesis mejorando su función cognitiva (53).

La administración de ácido alfa-linolénico omega-3 (54) y una dieta cetogénica (55) redujeron los niveles de proteína y mRNA del gen *RCAN1* en el hipocampo de ratones, lo que hizo aumentar la expresión de PPARGC1A y la biogénesis mitocondrial.

La sobreexpresión del gen *NR1P1* se vio reducida con la administración de metformina en una línea de mioblastos de ratón (56) y con alimentación con  $\beta$ -guanadinopropiónico ( $\beta$ -GPA) (57), aumentando en los dos casos los niveles de PPARGC1A.

El uso de la hemina, que es el principio activo del fármaco Panhematin aprobado por la FDA, funciona como inhibidor de BACH1. La hemina actúa atrapando a la proteína BACH1 y favorece su liberación del DNA para su exportación al citoplasma y posterior degradación. BACH1 se une a determinadas secuencias inhibiendo la transcripción cuando los niveles de hemina son bajos. Pero el aumento de los niveles de hemina desplaza a BACH1 de dichas secuencias y provoca su relocalización al citoplasma, haciendo que dichas secuencias sean accesibles a activadores (58). Uno de los genes cuya transcripción se ve inhibida por BACH1 es *PPARGC1A*. Por tanto, con el uso de la hemina se conseguiría reducir la sobreexpresión de *BACH1*, y con ello, reducir su efecto negativo sobre la expresión del factor PPARGC1A mejorando la biogénesis mitocondrial (Figura 5).



**Figura 5. Representación de la actuación de la hemina sobre la proteína BACH1.**

Heme, hemina; MARE, elemento de reconocimiento de Maf; MafK, factor de transcripción; Crm1, gen de mantenimiento de la región cromosómica 1; p45 NFE2, proteína de 45 kDa de nuclear factor erythroid 2; Nrf, factor nuclear derivado de eritroide 2. *Imagen obtenida de (58).*

### 3. Objetivos

---

El **primer objetivo** de este trabajo fin de máster es comprobar la sobreexpresión de 6 genes localizados en el cromosoma 21 y relacionados con la patogénesis del DS en células SH-SY5Y, una línea celular de neuroblastoma humano que puede diferenciarse a neurona, 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 DS sobre la biogénesis y funcionalidad mitocondrial, la viabilidad celular y la diferenciación a neurona de estas células SH-SY5Y. El objetivo final es buscar fármacos que puedan ser utilizados en el tratamiento prenatal de fetos con DS mejorando la biogénesis mitocondrial. Para ello, se tratarán las células que sobreexpresan estas proteínas que reprimen la biogénesis mitocondrial con diferentes inhibidores de las mismas para analizar su efecto sobre la función OXPHOS y la capacidad de diferenciación neuronal.

Los 6 genes objeto de estudio son: **BACH1, DYRK1A, NRIP1, PFKL, PKNOX1 y RCAN1** que afectan la función OXPHOS produciendo un efecto negativo sobre la biogénesis mitocondrial.

### 4. Planteamiento del trabajo

---

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

- 1) Obtención de **RNA** a partir de células SH-SY5Y que sobreexpresan los genes de interés y líneas celulares control para llevar a cabo el análisis de expresión por **qPCR** de los 6 genes objeto de estudio.
- 2) Extracción de **proteínas totales** a partir de células SH-SY5Y que sobreexpresan los genes de interés y líneas celulares control para comprobar la sobreexpresión de los 6 genes mediante **Western Blot**.
- 3) Trabajo en **cultivos celulares** con las líneas celulares de SH-SY5Y que sobreexpresan los genes de interés y líneas celulares control, para realizar experimentos de **diferenciación** celular de SH-SY5Y a neurona y estudio de inhibidores.

## 5. Material y métodos

---

### 5.1 Kits y reactivos comerciales

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

### 5.2 Cultivos celulares

#### 5.2.1 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas durante este trabajo fueron las siguientes:

- **SH-SY5Y (ATCC CRL-2266™)**: es una línea celular de neuroblastoma procedente de médula ósea de una niña de 4 años (59).
- **SH-SY5Y que sobreexpresan los genes de interés (*BACH1*, *DYRK1A*, *NRIP1*, *PFKL*, *PKNOX1* y *RCAN1*)**: previamente al presente trabajo se consiguió clonar correctamente estos 6 genes en vectores lentivirales de transferencia. Se obtuvieron **partículas lentivirales** usando los vectores lentivirales de transferencia pWPLXDIres Neo con los insertos de cada uno de los 6 genes, un vector de empaquetamiento psPAX2 y un vector de envoltura pMD2G. Los tres vectores lentivirales se introdujeron primero en células de la línea celular 293T, para que ellas fabricaran las partículas lentivirales que fueron liberadas al medio de cultivo de donde se recogieron, se filtraron y se añadieron directamente a las células diana, en este caso las SH-SY5Y. Se consiguió así transferir los genes de interés (*BACH1*, *DYRK1A*, *NRIP1*, *PFKL*, *PKNOX1* y *RCAN1*) a la línea celular SH-SY5Y.

#### 5.2.2 Mantenimiento celular y recogida de pellets

El trabajo de cultivo celular se realiza en una sala específica, equipada con una campana de flujo laminar vertical modelo *Biological Safety Cabinet Class II* de Nuair para mantener las muestras en condiciones de esterilidad y evitar contaminaciones. Además, esta sala de cultivos dispone de un microscopio invertido para observar el estado de los cultivos celulares. Las superficies de trabajo de esta campana y los instrumentos utilizados fueron preesterilizados antes de introducirlos a la campana con luz ultravioleta y etanol al 70 %. Los medios utilizados para el cultivo, lavado, tripsinización y centrifugación de las células se precalientan en un baño de agua a 37 °C. El medio utilizado es aspirado por una bomba de vacío y tratado con lejía al 20 % después de cada uso y al final de cada sesión de trabajo. Finalmente, todos los



materiales en contacto directo con el cultivo celular son desechados en contenedores apropiados para ser procesados por la empresa de limpieza.

Las líneas celulares SH-SY5Y son adherentes y forman monocapas. Se crecieron en el medio de cultivo DMEM de Gibco (ThermoFisher) con D-glucosa 4,5 g/l, piruvato de sodio 1 mM y L-glutamina 584 mg/l, entre otros, suplementado al 10 % con suero fetal bovino (FBS de Invitrogen) para favorecer el crecimiento celular. A este medio lo llamaremos medio DMEM completo.

Los cultivos se mantienen creciendo en placas de Petri de 100 mm de diámetro en un incubador de Nuair a 37 °C en atmósfera húmeda al 5 % de CO<sub>2</sub> y renovando el medio periódicamente cada 2-3 días con 10 ml de medio DMEM completo, según la confluencia alcanzada por las células. Cuando las células alcanzan el 80 % de confluencia se subcultivaron mediante tripsinización, es decir, el uso de tripsina-EDTA para interrumpir las interacciones proteicas que mantienen unidas a las células en la superficie de la placa. Consiste en retirar el medio por succión, lavar las células con 5 ml de tampón fosfato alcalino (PBS de Gibco®) para eliminar las proteínas del suero que inhiben la tripsina. Después, añadir 500 µl de solución de tripsina por placa (mezcla de PBS, 0,05 % de tripsina (Sigma) y 0,02 % en EDTA (Panreac), que favorece la desestabilización de la membrana por la quelación de sus iones divalentes), se incuban a temperatura ambiente durante varios minutos para favorecer la acción de la tripsina y se confirma que se han despegado las células al microscopio invertido. A continuación, se añadieron 5 ml de medio DMEM completo para detener la acción de la tripsina. Se resuspenden correctamente las células y se distribuyen a otras placas con DMEM completo añadido anteriormente para obtener un volumen final de 10 ml en cada placa.

Para llevar a cabo la recogida de pellets, las células en cultivo se tripsinizaron, se detuvo la tripsinización con 5 ml de medio DMEM completo y, después de la homogeneización, se transfirió todo el contenido de la placa a un tubo Falcon de 15 ml. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min en la centrífuga Hermile Z300 y se retiró el medio de los tubos. Se lavó el pellet resuspendiendo los sedimentos celulares en 500 µl de PBS cada uno y se transfirió a tubos eppendorf. A continuación, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min en una centrífuga Mini Spin eppendorf, se aspiró el PBS y el pellet se volvió a lavar con 500 µl de PBS. Finalmente, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se almacenó el pellet a - 80 °C hasta su futuro uso.

### **5.2.3 Congelación y descongelación celular**

Las células a congelar se cultivaron hasta una confluencia del 70-80 % en placas de 100 mm, se tripsinizaron y se recogieron por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. Cada pellet celular obtenido se resuspendió en el volumen adecuado de medio de

congelación: 60 % medio completo, 30 % FBS y un 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO que es un compuesto orgánico que funciona como crioprotector) según la cantidad de células a congelar. Una vez resuspendido correctamente el pellet se pasa a un criotubo que contenía ese 10 % de DMSO previamente. Los criotubos se almacenaron juntos a - 80 °C en un soporte de congelación con 250 ml de isopropanol para facilitar la congelación gradual y uniforme (disminución de aproximadamente 1 °C/min en el soporte). Después de 24 h, se almacenan los criotubos en una caja a - 80 °C hasta su uso posterior o son trasladados al contenedor de N<sub>2</sub> a - 196 °C (donde pueden mantenerse sin sufrir deterioro durante largos periodos de tiempo).

Para la descongelación de los criotubos almacenados primero se pasan unos minutos por el baño termostatzado a 37 °C. Después se diluye la suspensión celular con 5 ml de medio DMEM completo en un tubo de 15 ml y se centrifuga a 1500 rpm (en una centrifuga Hermle Z300) durante 3 min, eliminamos el sobrenadante para eliminar el DMSO completamente que es tóxico a temperatura ambiente para las células. Se resuspende el pellet obtenido en 10 ml de DMEM y se siembran las células en una placa de petri adecuada.

#### **5.2.4 Recuento celular**

El recuento de células se realizó utilizando un contador de células automático Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific). Este dispositivo está diseñado para el recuento de células y la evaluación de la viabilidad utilizando la técnica estándar de azul tripán, que es un tinte/colorante que puede penetrar en las células muertas, ya que tienen dañadas sus membranas plasmáticas. Por lo tanto, se mezclaron 20 µl de la suspensión celular con la misma cantidad de azul de tripán (20 µl) y se pipetea 10 µl en una cámara desechable (Countess™ cell counting chamber slides de Invitrogen Thermo Fisher Scientific) por duplicado, de modo que las células se contaron automáticamente por el dispositivo. Se obtiene el número de células por mililitro.

#### **5.2.5 Detección de *Mycoplasma spp.***

Es importante realizar un control de la contaminación por *Mycoplasma spp.* antes de llevar a cabo cualquier análisis de los cultivos celulares.

Se recoge una alícuota de 500 µl de medio de cultivo por cada placa que se quiera analizar tras 48-72 horas de contacto con las células a 90-100 % de confluencia. Se sacan las muestras recogidas con los medios de cultivos de la campana y se inactivan las DNAsas por calor en el thermoblock a 95 °C y durante 10 minutos. Después hay que realizar un pulso durante 10-30 segundos para eliminar los restos celulares. A continuación, se comprueba la presencia o no de micoplasmas mediante reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) con primers específicos para el genoma del microorganismo.

Los primers utilizados para esta PCR son: **N370SF** (5'-GCC TTTGTCCTTACC CTC GA-3') y **N370SR** (5'-ACG AAAGTTACG CAC CCA ATT-3'). Los componentes de la mezcla de reacción de la PCR y las cantidades estándar de cada uno de ellos (Tabla 1).

*Tabla 1. Reactivos empleados necesarios para llevar a cabo la PCR para detección de Mycoplasma spp.*

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer IBIAN	5
Mix dNTPs 10mM	1
Cebador- F	2,5
Cebador- R	2,5
Taq polimerasa IBIAN	0,5
Muestra de medio	2
Agua miliQ GIBCO	36,5
<b>Total</b>	<b>50</b>

Las condiciones de las PCR se indican en la tabla 2 teniendo en cuenta la temperatura de hibridación (T<sub>m</sub>) de los primers correspondientes.

*Tabla 2. Programa de PCR para llevar a cabo la detección de Mycoplasma*

Paso	Tiempo	Temperatura
<b>1. Desnaturalización previa</b>	5 min	94 °C
<b>2. Desnaturalización</b>	1 min	94 °C
<b>3. Hibridación</b>	1min	60 °C (T <sub>m</sub> correspondiente para la pareja de cebadores)
<b>4. Extensión</b>	1 min 30 s	72 °C
	<b>30 ciclos</b>	
<b>5. Final de la reacción</b>	5 min	72 °C
<b>6. Conservación</b>	-	4 °C

Al final de la reacción de PCR, el producto obtenido se visualiza por electroforesis horizontal de un gel de agarosa del 1 % TAE.

### **5.2.6 Diferenciación neuronal de SH-SY5Y**

Las células SH-SY5Y que se quieren diferenciar a neurona se sembraron en placas de cultivo en medio de cultivo comercial DMEM de Gibco de baja glucosa (Thermo Fisher Scientific), 1 g/l D-glucosa, 4 mM L-glutamina y 1 mM de Piruvato de sodio, suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %. Se deben sembrar a una densidad adecuada para que al comenzar la diferenciación estén al 50-60 % de confluencia.

Cuando las placas sembradas estén a la confluencia deseada se debe cambiar el medio a medio de diferenciación que tendrá la composición indicada en la tabla 3, compuesto por medio neurobasal y suplementos necesarios para la diferenciación a neurona. El medio neurobasal de baja glucosa que forma parte del medio de diferenciación está formado por: 50 ml de medio Neurobasal sin D-glucosa sin piruvato sódico (Neurobasal™-A de ThermoFisher) con 555 µl de glucosa 90 g/L (Sigma) y 110 µl de piruvato 50 mg/L (Sigma). Se debe cambiar el medio a las células cada 2-3 días y la diferenciación durará 7 días, aunque podría continuarse si se cree adecuado.

**Tabla 3.** Composición del medio de diferenciación neuronal de SH-SY5Y.

Producto	Volumen	Casa comercial	Código
Medio neurobasal baja glucosa	47,5 ml	Thermo Fisher	A2477501
Suplemento B27 (50x)	1 ml	Thermo Fisher	17504044
Suplemento Culture One (100x)	0,5 ml	Thermo Fisher	A3320201
Suplemento N2	0,5 ml	Thermo Fisher	17502048
GlutaMAX	0,5 ml	Thermo Fisher	35050061
Ácido retinoico 10 mM	50 µl	Sigma	R2625

Las células SH-SY5Y que sobreexpresan las proteínas que reprimen la biogénesis mitocondrial se pueden diferenciar en presencia de diferentes inhibidores para analizar su efecto sobre la función OXPHOS y la capacidad de diferenciación neuronal. En este trabajo nos vamos a centrar en la diferenciación de las SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1* y como inhibidor de BACH1 se va a usar Hemina (Merk) a 10 µM disuelto en NaOH a 20 mM, para estudiar su efecto sobre la biogénesis mitocondrial y la diferenciación neuronal en esta línea celular.

### **5.2.7 Inmunofluorescencia**

Para determinar la presencia, cantidad y la localización subcelular de proteínas de interés, en este caso la β3-Tubulina en las células SH-SY5Y sin diferenciar y diferenciadas se utiliza la inmunofluorescencia en las diferentes líneas celulares. Las células SH-SY5Y diferenciadas y no diferenciadas se tripsinizaron y sembraron en los pocillos de la placa de 6 pocillos a una concentración baja para no llegar a confluencia. Tras alcanzar una confluencia de entre el 30 y el 50 %, se retiró el medio de las células

y se efectuó un lavado con PBS para, posteriormente, fijar las células con paraformaldehído (Panreac) al 4 % durante 15 min a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos dos veces con PBS. Para permeabilizar las membranas celulares, las células se incubaron con Tritón X-100 (Sigma) al 0,1 % durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, se incuban con BSA (Roche) al 5 % durante 30 min a temperatura ambiente para bloquear la superficie de las células y evitar uniones inespecíficas.

Tras fijar y permeabilizar las células para el marcaje de las proteínas, las células se incuban con anticuerpo primario Anti  $\beta$ 3-Tubulina (TUBB3 abcam ab18207, dilución 1:500) diluido en una solución de BSA y Tritón X-100 al 0,1 % durante 1 h a temperatura ambiente. La proteína  $\beta$ 3-Tubulina es una proteína del citoesqueleto y su cantidad aumenta con la diferenciación neuronal.

Se lavaron las preparaciones tres veces con PBS en las mismas condiciones. A continuación, tras la incubación, se lavó dos veces con Tritón X-100 al 0,1 %. Entonces, se incubó con el anticuerpo secundario de conejo (Alexa Fluor 488 Rabbit Thermo Scientific A-11008e, dilución 1:1000) en oscuridad durante una hora a temperatura ambiente. Se lavan las células dos veces con Tritón X-100 al 0,1 % y se dejó en PBS con DAPI (ThermoFisher) que es el 4',6-diamidino-2-fenilindol que emite fluorescencia azul al unirse a las regiones enriquecidas de adenina y timina del DNA. Finalmente, se visualiza la fluorescencia de las células en la estación de imágenes Flod (Flod cell imaging station de Life Technology).

### **5.3 Técnicas de manipulación de RNA total**

#### **5.3.1 Técnicas de extracción de RNA total**

Para la extracción de RNA total a partir de pellet de células SH-SY5Y se utiliza el método basado en el reactivo TRIZOL® (Invitrogen). Este método consiste en una solución de fenol y tiocianato de guanidinio que mantiene la integridad del RNA para purificarlo del resto de componentes celulares.

Primero, se realiza el lisado de los pellets celulares con 500  $\mu$ L de TRIZOL, se homogeniza, se resuspende y se invierte fuertemente de forma manual. El TRIZOL mantendrá la integridad del RNA mientras rompe las células y disuelve los componentes celulares. La mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para completar la separación de complejos entre proteínas y ácidos nucleicos.

Tras la añadir 100  $\mu$ L de cloroformo se lleva a cabo la fase de separación del RNA del resto de compuestos celulares. El cloroformo separa la fase acuosa de la fase orgánica generando una bifase de extracción. La mezcla se incubó 2-3 min a 15-30 °C y

centrifugación a 12000 x g durante 15 min a 4 °C para obtener el RNA en la fase acuosa. Se obtienen 3 fases que de abajo arriba serían: una fase orgánica con lípidos, una interfase con proteínas desnaturalizadas y una fase acuosa con RNA, algo de DNA y glúcidos. Obtenido todo el volumen posible de la fase acuosa, se precipita el RNA al adicionar 250 µL de isopropanol frío, se incuba 10 min a temperatura ambiente y se centrifuga durante 10 min a 4 °C a 12000 x g.

Se eliminó el sobrenadante y el pellet que queda se lava con 500 µL de etanol al 75 % en agua destilada estéril GIBCO para evitar la degradación de RNA por RNAsas. Posteriormente, se centrifuga a 7500 x g durante 5 min a 4 °C para mezclar las muestras por inversión y se descarta el sobrenadante. Para la redisolución de RNA, el pellet obtenido se deja secar al aire protegido durante unos minutos hasta evaporar completamente el etanol. Finalmente, se añadieron 100 µL de agua libre de RNAsas y se incubaron durante 30-45 min a 55 °C en el thermoblock *Thermomixer confort* con agitación 450 rpm para favorecer la disolución del RNA.

### **5.3.2 Cuantificación de RNA total por espectrofotometría**

Para determinar la concentración y la pureza del RNA total extraído en las distintas muestras, se utiliza el espectrofotómetro NanoVue™ de GE Healthcare. NanoVue™ mide la absorbancia de 2 µl muestra a diferentes longitudes de onda. La relación de las absorbancias obtenida a 260 nm y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) es la que indica la pureza del RNA y debe ser próxima a 2. Posteriormente, las muestras de RNA se almacenan hasta su utilización a - 80 °C para mantener su estabilidad.

### **5.3.3 Tratamiento de las muestras con DNasa**

Se debe realizar un tratamiento con DNasa I, que es una endonucleasa que degrada DNA monocatenario y bicatenario, para asegurar una mayor pureza de RNA en las muestras de RNA total extraído. De esta manera evitaremos una amplificación inespecífica al hibridar incorrectamente los primers con restos de DNA en lugar de con los transcritos de interés.

Se parte de 50 µl de las muestras de RNA extraído, aquellas muestras de RNA que tengan más de 200 ng/µl se diluyen con H<sub>2</sub>O GIBCO libre de RNAsas para tener un volumen final de 50 µl también. A continuación, se usará el kit TURBO DNA-free (Invitrogen), se añaden 5 µl de 10 X TURBO DNase Buffer y 1 µl de TURBO DNasa a cada una de las muestras de 50 µl de RNA y se incuban 30 min a 37 °C en un Thermoblock. Después, se añaden 5 µl de DNase Inactivation Reagent, se resuspenden las muestras en un vórtex y se incuban 5 min a 22-26 °C. Finalmente, se centrifugan las muestras 1 min y 30 s a 10000 x g y se recoge el sobrenadante en un nuevo tubo. Para concluir el proceso hay que cuantificar el RNA en el espectrofotómetro NanoVue™.

### **5.3.4 Obtención de cDNA a partir de RNA mediante RT-PCR**

A partir del RNA total extraído y tratado con DNasa se obtiene DNA complementario (cDNA) haciendo uso el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* de ROCHE siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realiza la retrotranscripción de los mRNAs maduros con cola de poliA en 3' a cDNA monocatenario usando como primer un oligo (dT)<sub>18</sub>. En este kit comercial se utiliza este oligonucleótido con cola poli-T Oligo dT18 que reconoce específicamente a los RNAs mensajeros presentes en la muestra. La reacción de RT-PCR se lleva a cabo en el termociclador 3000 Thermocycler de Biometra usando una cantidad inicial de RNA de partida de 1 µg para obtener cDNA.

### **5.3.5 Diseño de primers para PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)**

Para diseñar los oligonucleótidos que serán usados en la qPCR, se accedió a la secuencia de consenso del gen de interés disponible de Ensemble (60) y de la base de datos CCDS Database de NCBI (61) de todos los transcritos se eligió el canónico según la base de datos Uniprot (62). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de cada gen se incluyen en el Anexo II.

En base a estas secuencias, se diseñaron manualmente cada pareja de oligonucleótidos utilizando la herramienta Primer Quest tool para diseño de qPCR de la aplicación web OligoAnalyzer de IDT (Integrated DNA Technology) (63). Se puede introducir la secuencia del gen manualmente o a través del número Gen Bank o Accesion ID. En el diseño de los primers para qPCR es importante que exista un intrón entre los dos exones donde se localiza la secuencia de los oligos forward y reverse respectivamente, para evitar que la amplificación sea a partir del DNA que pueda quedar en la muestra de RNA al aislarlo (incluso después de haber tratado con DNasa) y que se arrastra al obtener el cDNA y que, por tanto, se podría usar como molde en la qPCR.

Cada pareja de primers que van a ser utilizados quedan definidos en el Anexo III.

### **5.3.6 Análisis de expresión por qPCR (SYBR Green)**

La PCR cuantitativa o PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional que permite cuantificar de manera absoluta el producto de amplificación. Se utiliza en el proceso SYBR Green Master mix 2X (Roche) que es un fluorocromo que se une inespecíficamente al DNA de doble cadena, permitiendo detectar la generación de productos específicos. La qPCR se llevó a cabo en el termociclador Quant-Studio 5 System Real-Time PCR. Tras cada ciclo de amplificación, se midió el incremento de fluorescencia producido conforme se fue sintetizando DNA. La intensidad de fluorescencia se representó frente al número de ciclo de la PCR. El ciclo Ct o Cq es aquel en el que la fluorescencia emitida supera el nivel umbral. También se obtuvo la

T<sub>m</sub> del producto de reacción, que informa del grado de especificidad de la amplificación.

Previamente al análisis de la expresión por qPCR hay que realizar una validación de la eficacia de los primers utilizados (Anexo III) según las indicaciones del manual Real-time PCR: understanding Ct ofrecido por Applied Biosystems.

Una vez validados los primers, se procede a preparar la reacción de qPCR, para ello vamos a trabajar en una campana de flujo laminar, para evitar contaminaciones que puedan dar lugar a amplificadas inespecíficas. Previamente se desinfectan todos los materiales a utilizar mediante radiación UV durante 15 min dentro de la campana de flujo laminar. Las mezclas de reactivos se muestran en la tabla 4, teniendo en cuenta que el volumen final de cada pocillo donde va a tener lugar la reacción es de 10 µl (9 µl de la mezcla de reactivos y 1 µl de cada muestra de cDNA). Es importante trabajar en oscuridad para evitar dañar el SYBR Green (por su naturaleza fluorescente).

**Tabla 4.** Reactivos para la realización de la qPCR usando SYBR Green.

Reactivos	Volumen
Mezcla de oligonucleótidos 5µM	0,5 µl
SYBR Green Master mix 2X	5 µl
Agua	3,5 µl
cDNA	1 µl
Volumen final	10µl

El reactivo SYBR Green Master mix 2X contiene el resto de componentes necesarios para el correcto funcionamiento de la qPCR: DNA polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y tampón.

Las muestras siempre se miden en triplicados biológicos y de cada triplicado biológico, tres triplicados técnicos. Es necesario normalizar todos los datos obtenidos con respecto al gen β-actina (*ACTB*), que va actuar de gen constitutivo o *housekeeping* como control interno para validar la técnica, cuantificar los niveles de transcritos de interés presentes y poder comparar la expresión entre las distintas líneas celulares utilizadas.

Una vez preparadas las mezclas de reacción, la placa de 96 pocillos se introdujo en el termociclador y se amplificaron las muestras siguiendo un programa estándar de qPCR que consiste en: desnaturalización inicial a 95 °C (10 min), 50 ciclos de amplificación



(desnaturalización a 95 °C 10 s, hibridación a 58 °C 10 s y extensión a 72 °C 10 s). Finalmente, de cada producto de la qPCR se analizó su Ct y su Tm, que informa de la especificidad de la amplificación.

### **5.3.7 Análisis de expresión por qPCR (Método Sondas Taqman)**

La expresión de los genes de interés también se puede cuantificar mediante una PCR cuantitativa o PCR a tiempo real en el sistema Quant-Studio 5 System Real-Time PCR utilizando las sondas TaqMan® de Thermo Fisher Scientific.

La sonda TaqMan® posee un *primer* central, unido en su extremo 3' a un fluoróforo y a un *quencher* en su extremo 5' que apantalla la fluorescencia del fluoróforo, y por los *primers forward* y *reverse*, diseñados previamente para un determinado gen. La técnica se fundamenta en que cuando se lleva a cabo la PCR, la sonda hibridará en el amplicón. Sin embargo, debido a lo próximos que están el fluoróforo del quencher, no se emite fluorescencia. Pero cuando la polimerasa se une al primer central de la sonda al amplificar el gen, la sonda la hidrolizará mediante su actividad exonucleasa 5'-3' lo que produce la separación del *quencher* del fluorocromo y la emisión de fluorescencia de este. De esta manera, se consigue relacionar la intensidad de fluorescencia medida por cantidad de cDNA de un determinado transcrito presente. En este método no es necesario realizar previamente una RT-PCR para obtener el cDNA ya que se realiza todo en un solo paso: el primer forward incluido en la sonda es usado para la síntesis de cDNA del RNA y junto al primer reverse se cuantificará el cDNA formado.

Para cada muestra, en cada pocillo además de los genes deseados se debe realizar la amplificación de un gen de referencia, en nuestro caso la  $\beta$ -actina que actúa como en el caso anterior de gen *housekeeping* como control interno para normalizar todos los resultados obtenidos.

Se prepararon las mezclas de reacción necesarias para cada gen, que se muestran en la tabla 5, y posteriormente a cada pocillo se le añadió 6  $\mu$ l de master mix TaqMan 2X y 4  $\mu$ l de cDNA diluida 1/5 por pocillo. Una vez sellada la placa de 96 pocillos se inicia el programa de qPCR que consiste en: incubación 900 s a 48 °C, desnaturalización inicial 600 s a 95 °C y repetición de 40 ciclos de denaturalización 15 s a 95 °C y extensión 60 s a 60 °C. Las muestras siempre se miden en triplicados biológicos y de cada triplicado biológico se miden tres triplicados técnicos y se analiza finalmente los Ct conseguidos para cada producto de PCR. Las referencias de las sondas Taqman utilizadas en este trabajo se recogen en el Anexo I.

**Tabla 5.** Reactivos utilizados para la qPCR con sondas TaqMan

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
Master MixTaqMan 2X	5
Sonda FAM	0,5
Sonda VIC	0,5
Volumen final	6

### **5.3.8 Electroforesis horizontal de DNA en geles de agarosa**

Al final de la reacción de qPCR mediante el método de SYBR Green y Sondas Taqman, se puede extraer el producto obtenido y se visualiza en un gel de agarosa del 1 % TAE para comprobar que los primers han funcionado correctamente y no hay amplificados inespecíficos. También se realiza electroforesis en gel de agarosa para el análisis de los productos de la PCR de *Micoplasma spp.* Para ello, se disuelve una cantidad correspondiente de agarosa en tampón de electroforesis TAE 1x (TAE 1x: Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM) a 60 °C. Se deja enfriar la disolución antes de añadir el reactivo SYBR® Green, necesario para la visualización de DNA posteriormente. La mezcla se vierte sobre el molde del gel, se colocan los peines y se deja polimerizar a temperatura ambiente durante unos minutos.

Las muestras a cargar se mezclan con el colorante (Tampón de carga colorante: Ficoll 400 al 30% y azul de bromofenol al 0,1 % (p/v) en TAE) para facilitar su carga en el gel y controlar mejor el proceso de la electroforesis. Se van a cargar 15  $\mu$ l de muestra de qPCR con 5  $\mu$ l de colorante en cada pocillo del gel. Como marcador de pesos moleculares se va a utilizar según el tamaño del producto de qPCR esperado el marcador *Low DNA MassLadder* (4  $\mu$ l) o el marcador *High DNA MassLadder* (4  $\mu$ l) de Invitrogen.

La electroforesis se lleva a cabo 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 en el gel y diferenciarlos entre sí correctamente. Finalmente, se visualiza el gel en el transiluminador GelDoc de Bio-Rad para comprobar si han amplificado bien los fragmentos de interés.

## **5.4 Técnicas de análisis de proteínas**

### **5.4.1 Preparación de extractos celulares totales**

La extracción de proteínas consiste en resuspender el pellet de células obtenido del cultivo celular SH-SY5Y hasta el 80 % de confluencia en un buffer de lisis RIPA (Tris HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tritón x100 1 %, desoxicolato de sodio 0,5 % y EDTA 5 mM, esterilizado en autoclave) con 1X de la mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Protease Inhibitor Cocktail Tablets providad in EASY pack de Roche). El RIPA permite aislar tanto proteínas solubles como de membrana de células de mamífero y la mezcla de inhibidores de proteasas impide la degradación de las proteínas de interés por la liberación de las propias proteasas endógenas.

Por tanto, los pellets de células SH-SY5Y se resuspenden en 100 µl de volumen total de una mezcla formada por RIPA 1X e inhibidores de proteasas en proporción 1:25 y se incubaron en una rueda giratoria a 4 °C durante 15 min, se lleva a cabo en frío para favorecer la extracción y evitar la desnaturalización de las proteínas. A continuación, esta suspensión se centrifugó a 13000 x g durante 15 min a 4 °C (Eppendorf centrifuge 5415 R) para eliminar los restos celulares y se recogió el sobrenadante para medir su concentración de proteínas por el método de Bradford.

### **5.4.2 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford**

La concentración de las proteínas de extractos celulares de SH-SY5Y se determina según el método de Bradford (Bio-Rad) basado en técnicas de espectrofotometría usando un espectrofotómetro (UNICAM UV 500, de Thermo Spectronic). Esta técnica consiste en medir la cantidad de proteínas totales mediante una reacción colorimétrica entre un colorante y las proteínas en disolución. El reactivo de Bradford contiene el colorante azul de Coomassie que en disoluciones acuosas tiene un color pardo, cuyo máximo de absorción está a 465 nm, pero en presencia de proteínas se vuelve de color azul, con máximo de absorción a 595 nm. Por tanto, el complejo colorante-proteína causa un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm y la cantidad de absorción es proporcional a la cantidad de proteína presente (es decir, más azul cuanta más concentración de proteína hay).

Primero se construye una recta de calibrado de valores de absorbancia a 595 nm, formada por 7 diluciones patrón con diferente concentración conocida de seroalbúmina bovina (BSA). Se partió de una solución de 1 mg/ml de BSA y se prepararon distintas diluciones por duplicado con 0, 1, 2, 3, 5, 10 y 15 µl de BSA en 200 µl del reactivo de Bradford y H<sub>2</sub>O miliQ hasta un volumen final de 1 ml.

Las muestras problema se preparan por duplicado usando 2 µl de la solución de proteínas, 200 µl del reactivo Bradford y 798 µl de H<sub>2</sub>O Gibco.

Tanto las muestras, como los patrones se mezclan fuertemente, se dejan incubar 5 min a temperatura ambiente y, finalmente, se procede a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Se construye una recta de calibrado con los valores de absorbancia de las diluciones patrón y se interpolan las absorbancias medidas de las muestras problema para obtener la concentración proteica presente en ellas.

### **5.4.3 Western blot**

#### **5.4.3.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE**

La separación electroforética de proteínas presentes en extractos celulares se lleva a cabo en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (geles SDS-PAGE) en base a su peso molecular utilizando el sistema de Mini-PROTEAN de Bio-Rad.

Para esta electroforesis, se preparan dos tipos de geles con diferentes composiciones y funciones: en la parte inferior estará gel separador o *running gel*, para la separación de las proteínas, y en la parte superior encontramos el gel concentrador o *stacking gel*, para la concentración o apilamineto de las muestras en el gel. Ambos geles presentan diferentes concentraciones de poliacrilamida. El gel *stacking* presenta un 8 % de porosidad para generar un tamaño de poro adecuado para poder concentrar todas las proteínas en un mismo punto. Los geles separadores preparados para separar proteínas de la línea SH-SY5Y son del 10 % en acrilamida/bisacrilamida. Los componentes para ambos geles y el volumen requerido de cada uno se recogen en la tabla 6. Ambos geles se prepararon añadiendo sus respectivos reactivos a la vez, con excepción del APS (Amonio persulfato) y el TEMED que son los que inician y propagan la reacción de polimerización y son los últimos que hay que añadir a la mezcla.

**Tabla 6.** Reactivos utilizados para la preparación de los geles *stacking* y *running*.

Componente	Gel separador (10 %)	Gel concentrador
Acrilamida:bisacrilamida 30:0.8	1,7 ml	0,33 ml
Tampón 4x*	1,25 ml	0,5 ml
Agua destilada	2 ml	1,1 ml
APS 20%	30 µL	20 µL
TEMED	5 µL	5 µL

*Tampón 4x\*:* *Tampón 4X del gel stacking:* Tris HCl 0,5M pH 6,8, SDS 0,4 %, EDTA 8 mM; *Tampón 4X del gel running:* Tris HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4 % y EDTA 8 mM.

En primer lugar, se prepara la mezcla del gel *running* y se vierte entre dos cristales de 1 ó 0,75 mm de separación, colocados sobre el soporte adecuado, dejando 1,5 cm por encima libres para añadir después el gel concentrador. Seguidamente, se adiciona una capa de isopropanol frío para que el gel polimerice de forma recta y evitar la posible entrada de oxígeno que afectaría a la polimerización. Una vez el gel ha polimerizado correctamente se elimina el isopropanol y se lava la superficie del gel con agua destilada.

A continuación, se añade el gel *stacking* y se coloca el peine de 1 ó 0,75 mm de grosor para la formación de los pocillos. Una vez el gel polimeriza, se colocan los cristales en el interior de la cubeta de electroforesis que se llena de buffer de electroforesis 1x (preparado a partir de buffer de electroforesis 10x compuesto de Tris HCl 250 mM, glicina 1.92 M, SDS 1 % (p/v)). Antes de cargar las muestras, se quita el peine del gel concentrador y se lavan los pocillos a presión con tampón de electroforesis 1x usando una jeringuilla para retirar restos de acrilamida que hayan podido quedar en los pocillos y evite la entrada de las proteínas.

Se cargan las muestras de proteínas (20 µg por calle) mezcladas con tampón de carga *Laemmli Buffer 4X* (Glicerol 10 %, Tris-HCl 160 mM pH 6.8, SDS 8 % (p/v), azul de bromofenol 0.04 % (p/v), β-mercaptoetanol 4 % (v/v)). El β-mercaptoetanol que contiene es un agente reductor de los puentes disulfuro de las proteínas. Como marcador de peso molecular de proteínas se emplea Precision Plus Protein Standards de Bio Rad. En concreto, se cargaron 6 µl de marcador en el primer pocillo y 12 µl de las muestras de interés en los siguientes, de esos 12, 3 µl corresponden al tampón de carga 4X y el resto a las diferentes proporciones entre las muestras de proteínas problema y H<sub>2</sub>O GIBCO, según la cantidad de proteína a cargar (en µg) y los valores de concentración calculados previamente por el método de Bradford.

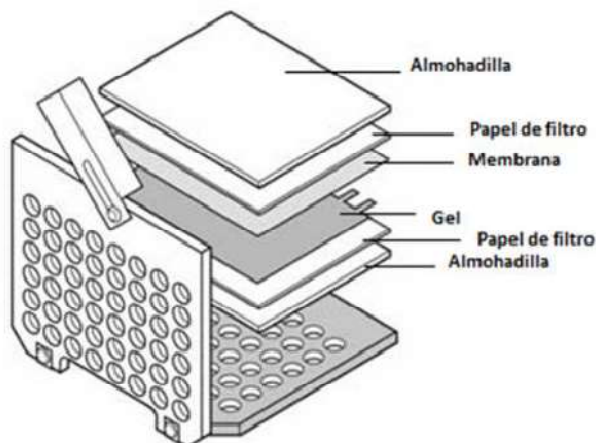
La electroforesis se desarrolla a una intensidad de corriente constante de 12 mA por gel hasta que las muestras atraviesan el gel concentrador y llegan al separador. En este momento, se incrementa la intensidad a 20 mA por gel hasta que el frente alcance la parte más inferior del gel.

#### **5.4.3.2 Transferencia de proteínas a membranas de PVDF**

Una vez realizada la electroforesis SDS-PAGE, se desea identificar y visualizar las proteínas de interés entre todas las separadas. Para ello hay que llevar a cabo la transferencia de las proteínas del gel a membranas de PVDF (Fluoruro de polivinilideno). Se va a realizar una electrotransferencia húmeda y utilizando el sistema *Mini Trans-Blot® Cell* de Bio-Rad.

Primero se corta un rectángulo de membrana de PVDF (de la casa comercial *Hybond-P de Amersham*) que sea del tamaño adecuado para gel y cuatro trozos de papel

Whatman® de Sigma. Para activar la membrana, se incubó durante 10 s en metanol y se lava con agua destilada. Posteriormente, tanto el gel, la membrana como los papeles y las esponjas del montaje se sumergen en BSN frío a 4 °C (Tris 48 mM; glicina 39 mM y metanol 20 % (v/v)). A continuación, se procedió a montar el sistema de electrotransferencia de Bio-Rad de acuerdo con las instrucciones del fabricante según la figura 6 y se llevó a cabo la transferencia a 80 V durante 2 h a 4 °C en agitación.



**Figura 6.** Montaje del sistema para la transferencia húmeda.

Una vez pasado el tiempo, se incubó la membrana con una disolución de leche desnatada en polvo al 5 % en PBS-T (detergente Tween20 al 0,1 % en PBS, Tampón Fosfato Salino, PBS 1X: NaCl 150 mM,  $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$  8 mM,  $K_2HPO_4$  1,6 mM, pH 7,4) toda la noche en cámara fría a 4 °C con agitación suave o 1 hora a TA. Este paso es importante para bloquear la superficie de la membrana sin proteínas y evitar así las uniones inespecíficas de los anticuerpos que serán usados con la membrana.

#### **5.4.3.3 Incubación de la membrana con los anticuerpos**

Previamente a realizar la incubación con el anticuerpo primario se debe eliminar el exceso de disolución bloqueante mediante 3 lavados de 5 min cada uno de la membrana con PBS-T. Tanto los lavados como la posterior incubación se llevan a cabo en cubetas con agitación suave a TA.

A continuación, la membrana se incubó durante 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario específico para la proteína de interés que se diluye en PBS-T con un 0,25 % en leche desnatada en polvo para conseguir la concentración sugerida por la casa comercial como óptima (tabla 7). Tras el tiempo de incubación se retira la disolución y se hacen tres lavados de 5 minutos de la membrana con PBS-T en agitación suave.

Posteriormente, se incubaba la membrana con el anticuerpo secundario que es una anti IgG de ratón o conejo (según el origen del anticuerpo primario) conjugada con peroxidasa de rábano. Se diluye a la proporción correspondiente (tabla 7) en PBS-T con 0,25 % en leche desnatada en polvo. La membrana se incubaba con esta dilución durante 30 min a 1 h y, tras este tiempo, se retira la disolución y se lava la membrana 3 veces con PBS-T, 5 min cada lavado antes de revelar los resultados.

**Tabla 7.** Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas de interés (Western blot)

Anticuerpo	PM Proteína (kDa)	Dilución de trabajo	Origen biológico	Monoclonal /Policlonal	Casa comercial y código
<b>DYRK1A</b> <b>(DYRK1A RR.7)</b>	86	1:1000	Ratón	Monoclonal	Santa Cruz Sc-100376
<b>RCAN1-1L</b> <b>(RCAN2/3 B-9)</b>	27	1:200	Ratón	Monoclonal	Santa Cruz Sc-374454
<b>NRIP1</b> <b>(RIP140 F-2)</b>	160-180	1:100	Ratón	Monoclonal	Santa Cruz Sc-518071
<b>BACH1</b> <b>(BACH1 F9)</b>	92	1:1000	Ratón	Monoclonal	Santa cruz Sc-271211
<b>PFKL</b> <b>(PFKL A-6)</b>	80	1:1000	Ratón	Monoclonal	Santa cruz Sc-393713
<b>PKNOX1</b> <b>(PREP-1 B2)</b>	64	1:1000	Ratón	Monoclonal	Santa cruz Sc-25282
<b>Anti-Actinantibody</b>	42	1:5000	Conejo	Policlonal	Sigma A2066
<b>Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody</b>	-	1:5000	Cabra	Policlonal	ThermoScientific 31460
<b>Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody</b>	-	1:5000	Cabra	Policlonal	ThermoScientific 31430

#### **5.4.3.4 Detección quimioluminiscente**

Para la detección de las proteínas de interés presentes en la membrana se utilizó un sistema de revelado por inmunodetección indirecta basado en la utilización de un anticuerpo primario para localizar la proteína de interés, y un anticuerpo secundario que detecta al primario y que, además, está conjugado con una peroxidasa. La peroxidasa tiene dos sustratos el luminol y el peróxido de hidrógeno. Por tanto, cuando entra en contacto la peroxidasa con sus sustratos quimioluminiscente (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate de Thermo Scientific), se produce la reducción del peróxido de hidrógeno a agua y la oxidación del luminol que produce una señal luminosa.

La membrana se incubó durante 2 min con el sustrato quimioluminiscente, previamente se mezclaron los dos reactivos del kit ECL de Thermo Fisher (peróxido de hidrógeno y luminol). A continuación, se coloca la membrana en una funda de plástico y se introduce en el equipo de detección de quimioluminiscencia. La luz emitida en dicha reacción fue detectada por el aparato Amersham Imager 600 de GE Health care Life Science programado para realizar exposiciones de distinta duración. El tiempo de exposición de cada membrana dependió de la cantidad de muestra cargada en cada gel y de la alta o baja sensibilidad del anticuerpo utilizado para cada proteína. Una vez obtenidas las imágenes, las bandas fueron cuantificadas con el programa Image QuantTL de Amersham. Es importante normalizar todas las membranas con anticuerpo de actina, que actúa como control interno para comprobar que se ha cargado la misma cantidad de proteína en todos los carriles y poder hacer el análisis de las bandas de las proteínas de interés.

#### **5.5 Aplicaciones bioinformáticas análisis estadístico de los resultados.**

A lo largo de este trabajo se hace uso de las siguientes aplicaciones para el análisis estadístico de los resultados:

- **ImageQuant TL:** software para cuantificar las bandas obtenidas por electroforesis como resultado de los Western Blot.
- **Graphpath:** para la obtención de las gráficas donde se muestran los resultados de los análisis y la obtención de la desviación estándar de los datos
- **StatView 6.0:** el análisis estadístico de los resultados de este trabajo se llevó a cabo con este programa en concreto, mediante Test-t. Los valores *p value* menores de 0,05 (\* $p < 0,05$ ) se consideraron estadísticamente significativos.



## 6. Resultados

---

### 6.1 Medida de la expresión de los transcritos de los genes de interés

Para analizar la sobreexpresión en las células SH-SY5Y de los 6 genes objeto de estudio **BACH1**, **DYRK1A**, **NRIP1**, **PFKL**, **PKNOX1** y **RCAN1**, se cuantificó la expresión del transcrito de cada gen tanto en la línea celular control SH-SY5Y como en las células SH-SY5Y que sobreexpresan los diferentes genes de interés mediante qPCR.

Se extrajo RNA de pellets celulares provenientes de células control SH-SY5Y y de células SH-SY5Y que sobreexpresan los genes de interés y se obtuvo el cDNA por retrotranscripción. Para los 6 genes se llevó a cabo la amplificación por qPCR usando como fluorocromo SYBR Green (Roche) que se une inespecíficamente al DNA de doble cadena, permitiendo detectar la generación de productos específicos. Se realizaron triplicados biológicos de cada muestra y de cada triplicado biológico tres triplicados técnicos. Además, para normalizar los resultados se usó el gen  $\beta$ -actina (**ACTB**), que va actuar de gen *housekeeping* como control interno.

Se obtuvieron buenos resultados de la amplificación para los genes **BACH1**, **DYRK1A**, **PFKL**, **PKNOX1** y **RCAN1**. Sin embargo, para el gen **NRIP1** no se consiguió ningún resultado coherente de la qPCR usando como fluorocromo SYBR Green.

En función de los resultados obtenidos para los genes **BACH1**, **DYRK1A**, **PFKL**, **PKNOX1** y **RCAN1**, se analizó el Cq o ciclo donde, en escala logarítmica, el producto amplificado supera el umbral fijado por el dispositivo, recordando que a menor Cq, mayor amplificación del cDNA y mayor cantidad de mRNA extraído, es decir, mayor será el nivel de expresión del gen de interés. En concreto, la cuantificación se fundamenta en el método de aproximación  $2^{-\Delta\Delta t}$ , que supone una eficacia del 100 % de los cebadores utilizados y se basa en la comparación del Cq obtenido del gen de interés para cada muestra, con el obtenido por el control de actina.

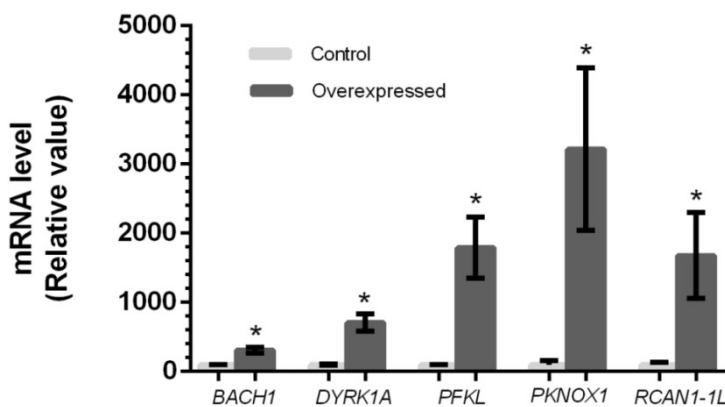
Al analizar los niveles de mRNA obtenido de los 5 genes **BACH1**, **DYRK1A**, **PFKL**, **PKNOX1** y **RCAN1** en células transducidas se comprobó que había diferencias significativas con respecto a los correspondientes controles como se muestra en la figura 7. Por tanto, se había conseguido comprobar la correcta sobreexpresión de estos genes de interés.

Dado que para el gen **NRIP1** no se habían obtenido resultados coherentes en la qPCR, se revisó la secuencia de este gen para comprobar que, al carecer de intrones, era imposible mantener la premisa de que los primers para la qPCR deben estar situados en dos exones consecutivos, pero separados por un intrón para evitar la amplificación a partir del DNA genómico en lugar del RNA mensajero. Por ello, se decidió realizar el tratamiento de las muestras con DNAasa I, previamente a la obtención del cDNA para

la qPCR. Así mismo, se diseñaron dos nuevas parejas de primers para intentar aumentar su especificidad.

Tras tratar con DNAasa I las muestras de *NRIP1*, se repitió la qPCR con SYBR Green usando todas las parejas de primers diseñadas para este gen. Se prepararon varias diluciones de las muestras: 1, 1/10, 1/100 y 1/1000. Pero los resultados obtenidos tampoco fueron coherentes y mostraron que no había una relación lineal entre las diluciones y los Cq obtenidos. Por tanto, se decidió probar para este gen una qPCR usando sondas TaqMan para intentar mejorar la sensibilidad de la técnica, pero los resultados tampoco fueron satisfactorios: usando 1 µl de cDNA, las Cq resultantes salían demasiado altas y si se realizaba una dilución de las muestras las Cq salían indeterminadas.

Por eso, para este gen *NRIP1* no se consiguió comprobar la sobreexpresión mediante la técnica de qPCR pero, como se mostrará más adelante, si que se consiguió comprobar el incremento en la cantidad de proteína sintetizada mediante Westernblot.



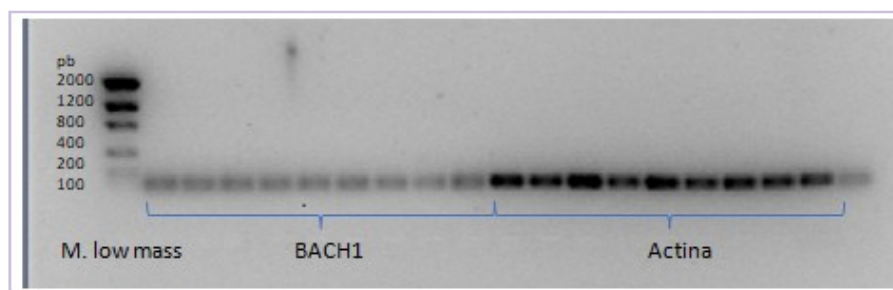
**Figura 7. Niveles de RNA en células neuronales SH-SY5Y. C: células control SH-SY5Y; overexpressed: células SH-SY5Y sobreexpresando los correspondientes genes de estudio.** Los datos ofrecidos son la media de un triplicado biológico (cada uno por triplicado técnico), junto a su desviación estándar. Los transcritos de las células control SH-SY5Y aparecen representados en un color diferente a los de las células SH-SY5Y que sobreexpresan los correspondientes genes. Existe significancia estadística para los 5 genes *BACH1*, *DYRK1A*, *PFKL*, *PKNOX1* y *RCAN1* (\*,  $p < 0,05$ ).

## **6.2 Comprobación de resultados de la qPCR mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa**

Al final de la reacción de qPCR mediante el método de SYBR Green y Sondas Taqman, se puede recoger el producto obtenido y visualizarlo en un gel de agarosa del 1 % TAE para comprobar que los primers han funcionado correctamente y no hay amplificadores inespecíficos.

En la figura 8 se muestra el resultado de la electroforesis horizontal obtenida del producto resultado de la qPCR con SYBR Green realizada para la amplificación del gen *BACH1*. En este gel se cargan 10 µl del producto de qPCR de los 3 triplicados técnicos de una muestra de *BACH1* y Actina con 5 µl de colorante y 4 µl de marcador de pesos

moleculares *Low DNA MassLadder*. Finalmente, comparando los tamaños de los amplificadores obtenidos a partir de cada muestra con los tamaños de los fragmentos de DNA del marcador de pesos moleculares *Low DNA Mass Ladder* se comprueba que todos los amplificadores han sido correctos y no hay bandas de amplificadores inespecíficos. Por tanto, los primers diseñados para este gen son correctos.



**Figura 8. Gel de agarosa 1 % TAE tras qPCR con SYBR Green realizada para la amplificación del gen BACH1.** La calle 1 corresponde al marcador de pesos moleculares Low DNA MassLadder. Las siguientes 9 calles corresponden al producto de qPCR de los tres triplicados técnicos de triplicados biológicos de muestra de cDNA de células SH-SY5Y que sobreexpresan *BACH1*. Las 9 últimas calles corresponden al producto de qPCR de los tres triplicados técnicos de triplicados biológicos de muestra de cDNA de células SH-SY5Y que sobreexpresan *BACH1* usando los primers de Actina para amplificar este gen. El tamaño de los fragmentos de DNA se indica en bp.

### **6.3 Resultado de las PCR para descartar la contaminación por micoplasmas**

Es importante realizar un control de la contaminación por *Mycoplasma spp.* antes de llevar a cabo cualquier análisis de los cultivos celulares. Para ello se comprobó la presencia o ausencia de micoplasmas mediante PCR con primers específicos para el genoma del microorganismo en todos los cultivos celulares de trabajo. El producto obtenido de esta PCR se visualiza en un gel de agarosa del 1 % TAE.

En la figura 9 se muestra el resultado de la electroforesis horizontal obtenida del producto resultado de la PCR para la detección de micoplasmas en muestras de cultivo de células SH-SY5Y control y células SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1*. Para detectar la ausencia o presencia de *Mycoplasma spp* se introducen dos controles positivos para la presencia de micoplasmas. En este gel se cargan 8  $\mu$ l del producto de PCR de las muestras con 2  $\mu$ l de colorante y 4  $\mu$ l de marcador de pesos moleculares *Low DNA MassLadder*. El tamaño del amplificado que demuestra la presencia de micoplasmas es de 500 bp. En este gel ejemplo que se muestra en la figura 9 se observa que no hay amplificado en el caso de la muestra de células SH-SY5Y control y de células SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1* lo que indica que no están contaminadas por *Mycoplasma spp.* Sin embargo, en los dos controles positivos sí que aparece una banda de 500 bp ya que fueron obtenidos de muestras contaminadas con micoplasmas.

De esta forma se comprobó que en ninguno de los cultivos celulares usados tanto de SH-SY5Y control como sobreexpresando *BACH1* a lo largo de este trabajo fin de máster había contaminación por *Mycoplasma spp.*



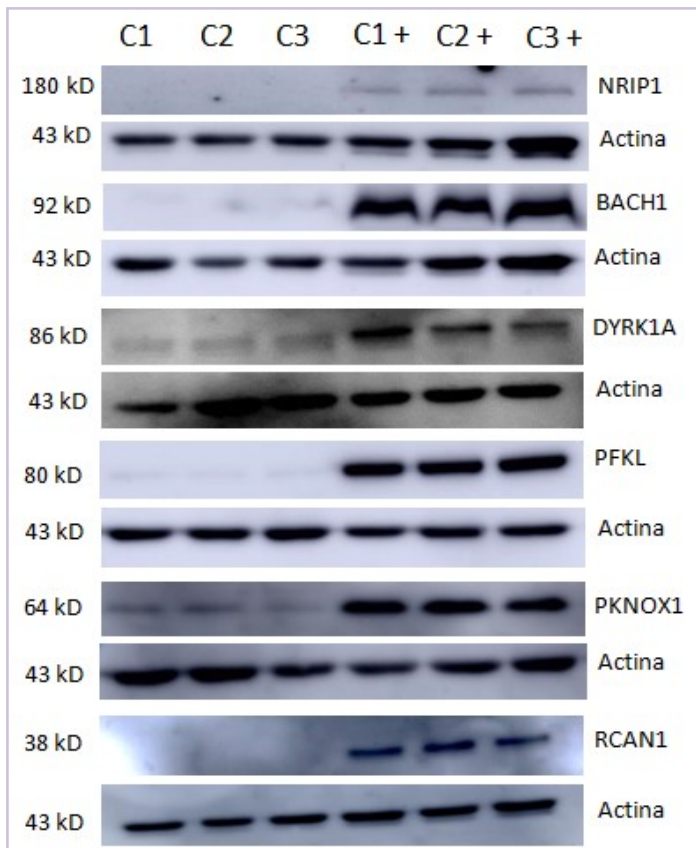
**Figura 9. Gel de agarosa 1 % TAE para comprobar la PCR de detección de micoplasmas.** La calle 1 corresponde al marcador de pesos moleculares Low DNA MassLadder. La calle 2 corresponde a la muestra de medio de cultivo de células SH-SY5Y control y la calle 3 a la muestra de medio de cultivo de células SH-SY5Y células que sobreexpresan *BACH1*. Las calles 4 y 5 corresponden a la muestra de los dos controles positivos para micoplasmas. El tamaño de los fragmentos de DNA se indica en bp.

#### **6.4 Medida de la expresión de los genes de interés mediante Western Blot**

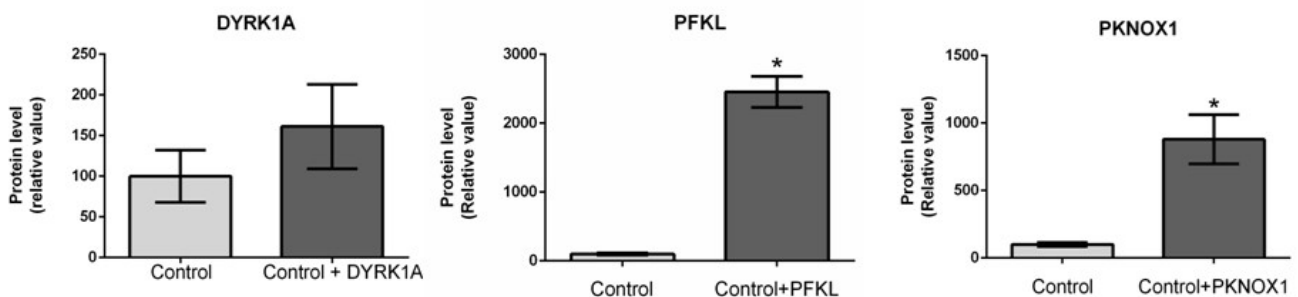
Para comprobar la sobreexpresión de los 6 genes de interés se llevó a cabo la extracción total de proteínas de pellets celulares de las líneas de interés (células control SH-SY5Y y de células SH-SY5Y que sobreexpresan los genes de interés), se cuantificaron las proteínas extraídas por el método de Bradford y se llevó a cabo un Western blot para cada gen, utilizando para la inmunodetección los anticuerpos de la Tabla 7. La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida SDS-PAGE de 1 mm de grosor.

Analizando los resultados de los Western blots realizados para los 6 genes de interés se pudo comprobar un incremento en los niveles de proteína en las células transducidas con respecto a los controles.

Se obtuvo señal de la proteína sobreexpresada para todos los genes *BACH1*, *DYRK1A*, *PFKL*, *NRIP1*, *PKNOX1* y *RCAN1* como se puede ver en la figura 10. Sin embargo, solo para los genes *DYRK1A*, *PFKL* y *PKNOX1* se obtuvo una buena señal del gen endógeno en los controles y, por tanto, se pudo realizar el análisis estadístico de los niveles de proteína como se muestra en la figura 11. Para poder cuantificar las bandas de cada membrana de los Western blots se necesita hibridarlas con el anticuerpo de actina como control interno.



**Figura 10. Imágenes de la inmunodetección de las proteínas analizadas mediante Western blots,** donde C: células control SH-SY5Y; C+: células SH-SY5Y sobreexpresando los correspondientes genes de estudio. Se muestran las membranas obtenidas tras la hibridación con el anticuerpo correspondiente para proteína. Los tres primeros carriles de cada membrana (C1, C2, C3) corresponden a las muestras de células control SH-SY5Y y los tres siguientes carriles (C1+, C2+, C3+) a las muestras de células SH-SY5Y sobreexpresando cada gen. La actina fue utilizada como estándar interno.



**Figura 11. Cuantificación de los niveles de proteína obtenidos para los genes DYRK1A, PFKL y PKNOX1.** Las gráficas muestran la cuantificación relativa de la cantidad de proteína detectada las células control SH-SY5Y y en las células SH-SY5Y sobreexpresando los correspondientes genes. \*,  $p < 0,05$ .

### **6.5 Resultados de la diferenciación a neurona de las células SH-SY5Y que sobreexpresan BACH1**

En este trabajo se lleva a cabo un experimento de diferenciación neuronal donde se van a analizar diferencias entre células control SH-SY5Y y células SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1*. Además, se quiere analizar el efecto sobre la diferenciación neuronal que puede tener un inhibidor de BACH1 a 10  $\mu$ M disuelto en NaOH.

Previamente a realizar el experimento de diferenciación, el cultivo celular de células SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1* se mantuvo en crecimiento en medio de cultivo DMEM completo con una dosis de geneticina de selección para forzar a las células a expresar el gen *BACH1*. La geneticina es el antibiótico que se utiliza para la selección de las células que fueron correctamente transfectadas ya que en el vector lentiviral con el que se consiguió transferir el gen de interés a la línea celular SH-SY5Y contenía un gen de resistencia a geneticina.

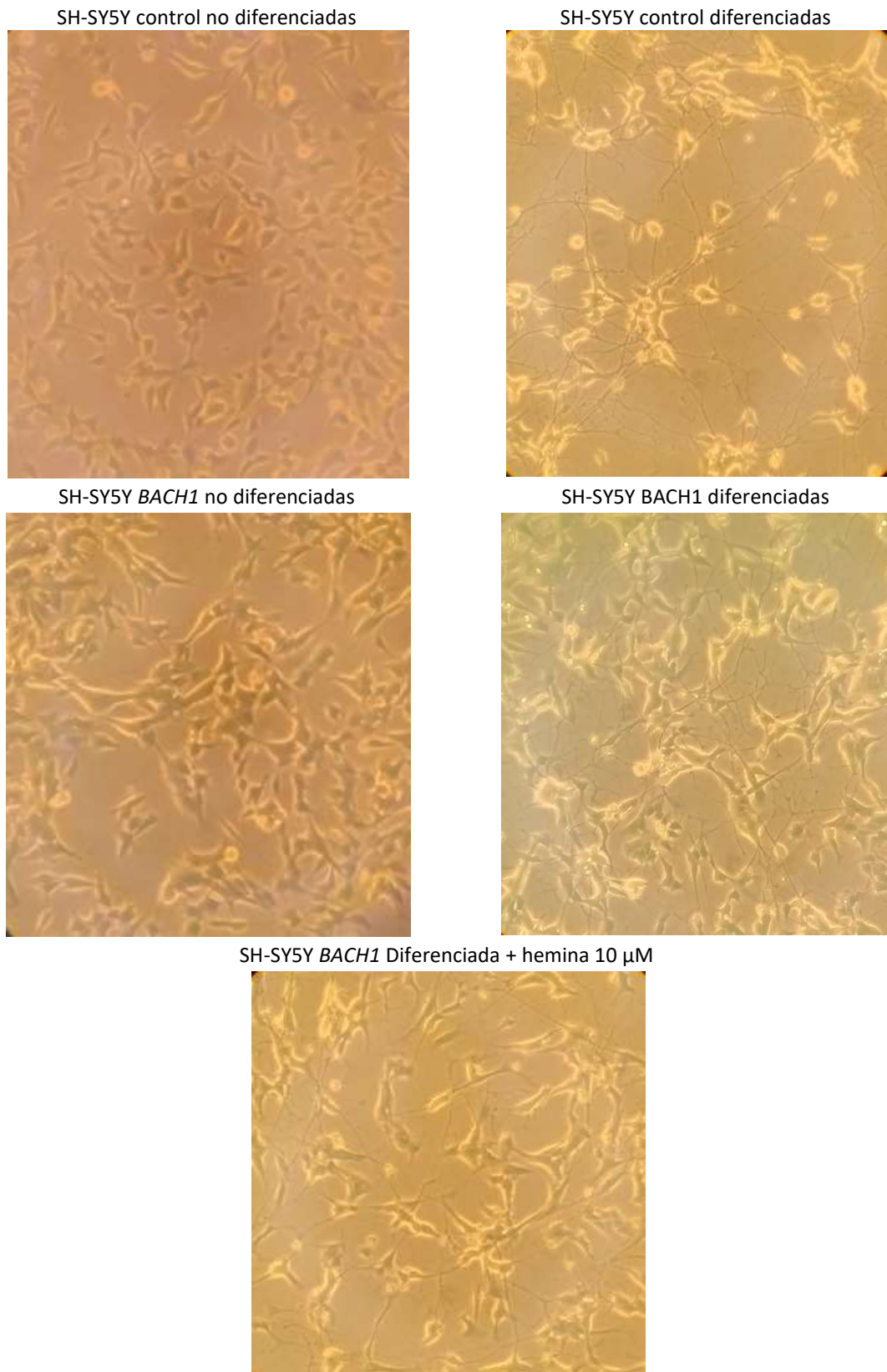
En el experimento se siembran inicialmente 500.000 células por placa de 10 mm. Se preparan las siguientes placas:

- 3 placas de células control SH-SY5Y que no se van a diferenciar y se mantendrán en crecimiento en medio DMEM de baja glucosa durante la semana que dura la diferenciación.
- 3 placas de células control SH-SY5Y que se van a diferenciar.
- 3 placas de células SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1* que no se van a diferenciar y se mantendrán en crecimiento en medio DMEM de baja glucosa durante la semana que dura la diferenciación.
- 3 placas de células SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1* que se van a diferenciar.
- 3 placas de células SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1* que se van a diferenciar y a las que se va a añadir hemina a 10  $\mu$ M en NaOH.

Tras 7 días de llevar a cabo el experimento de diferenciación como se ha explicado en el apartado 5.2.6 se visualizaron los cultivos en el microscopio invertido, las imágenes obtenidas se muestran en la figura 12, para analizar las diferencias visuales que puedan aparecer.

En las imágenes obtenidas se puede comprobar como las células SH-SY5Y diferenciadas toman un aspecto de neurona, su forma es más alargada que las células SH-SY5Y no diferenciadas y además producen neuritas entre ellas similares a las conexiones neuronales que encontramos en las neuronas. A simple vista no se ven diferencias en la diferenciación neuronal entre las células control SH-SY5Y y las células SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1*, todas ellas presentan un aspecto muy similar y la formación de neuritas entre las células.

Tampoco se observan diferencias morfológicas a simple vista entre las células SH-SY5Y diferenciadas que sobreexpresan el gen *BACH1* y las células SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1* tratadas con hemina 10  $\mu$ M disuelto en NaOH.



**Figura 12. Resultados de la diferenciación neuronal.** Se muestran las imágenes tomadas de células control SH-SY5Y no diferenciadas, células control SH-SY5Y diferenciadas, células SH-SY5Y BACH1 no diferenciadas, células SH-SY5Y BACH1 diferenciadas y tratadas con hemina 10  $\mu$ M. Imágenes obtenidas mediante microscopio óptico invertido usando un filtro de contraste de fases y el objetivo 20X.

## **6.6 Resultados de la inmunofluorescencia**

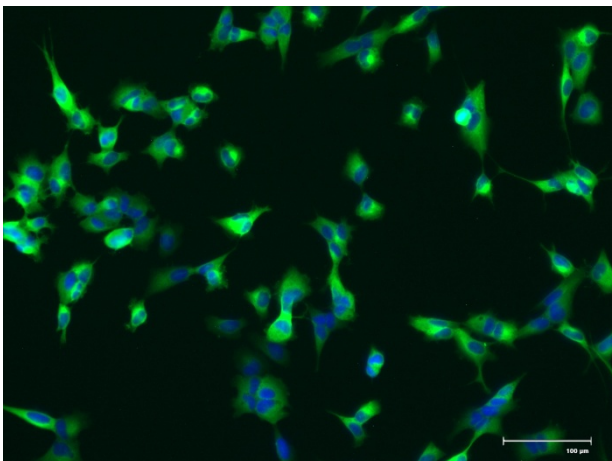
Para realizar un análisis más completo de la diferenciación neuronal de las células SH-SY5Y control y las células SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1*, se llevó a cabo un experimento de inmunofluorescencia. Mediante esta técnica se va a determinar la presencia, cantidad y la localización subcelular de la  $\beta$ 3-Tubulina en las células SH-SY5Y sin diferenciar y diferenciadas. Las muestras de células SH-SY5Y control no diferenciadas, células SH-SY5Y control diferenciadas y células SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1* diferenciadas, se preparan como se explica en el apartado 5.2.7. Finalmente, se visualiza la fluorescencia de las células en la estación de imágenes Fluid (Fluid cellimaging station de LifeTechnology).

Los resultados obtenidos de la inmunofluorescencia se muestran en la figura 13 (células SH-SY5Y control no diferenciadas), figura 14 (células SH-SY5Y control diferenciadas) y figura 15 (células SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1* diferenciadas).

Las zonas con fluorescencia verde nos indican la presencia de  $\beta$ 3-Tubulina que como es una proteína del citoesqueleto aparece en el citosol de las células SH-SY5Y sin diferenciar y diferenciadas a neurona. La diferencia la encontramos en que en el caso de las células SH-SY5Y que ha se han diferenciado a neurona presentan  $\beta$ 3-Tubulina en las neuritas que se han formado y unen las células entre sí ya que es parte de su citoesqueleto. Comparando las imágenes de las células SH-SY5Y sin diferenciar y diferenciadas se puede observar como la cantidad de  $\beta$ 3-Tubulina aumenta con la diferenciación neuronal, tal y como era esperado.

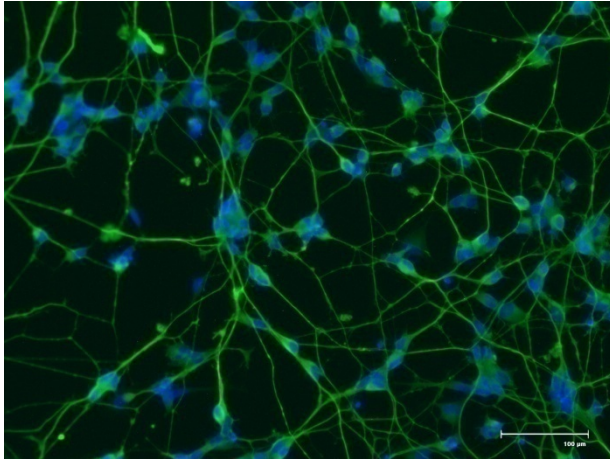
Las zonas con fluorescencia azul son debidas al uso del reactivo DAPI (ThermoFisher) que es el 4',6-diamidino-2-fenilindol que emite fluorescencia azul al unirse a las regiones enriquecidas de adenina y timina del DNA, es decir, que marca el núcleo de las células.

Por tanto, con esta técnica de inmunofluorescencia podemos demostrar que la  $\beta$ 3-Tubulina es una proteína del citoesqueleto y su cantidad aumenta con la diferenciación neuronal.

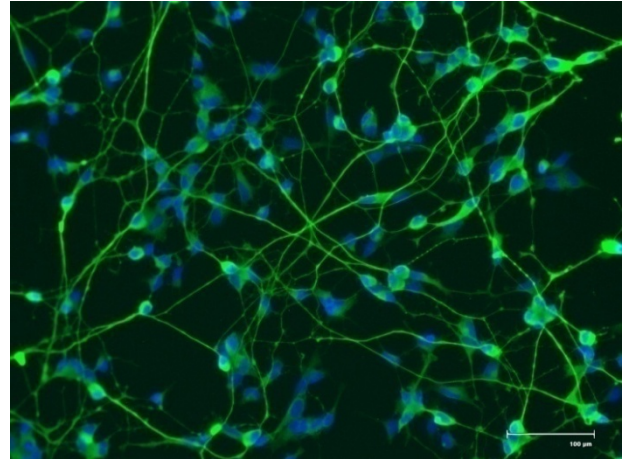


**Figura 13. Inmunofluorescencia de células control SH-SY5Y no diferenciadas.** En verde se marca la  $\beta$ 3-Tubulina del citoesqueleto. En azul queda marcado el núcleo de las células. Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia Fluid cell imaging station de Life Technology.





**Figura 14. Inmunofluorescencia de células control SH-SY5Y diferenciadas.** En verde se marca la  $\beta$ 3-Tubulina del citoesqueleto sobre todo en las neuritas. En azul queda marcado el núcleo de las células. Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia Fluid cell imaging station de Life Technology.



**Figura 15. Inmunofluorescencia de células control SH-SY5Y que sobreexpresan el gen BACH1 diferenciadas.** En verde se marca la  $\beta$ 3-Tubulina del citoesqueleto sobre todo en las neuritas. En azul queda marcado el núcleo de las células. Imágenes obtenidas mediante microscopio de fluorescencia Fluid cell imaging station de Life Technology.

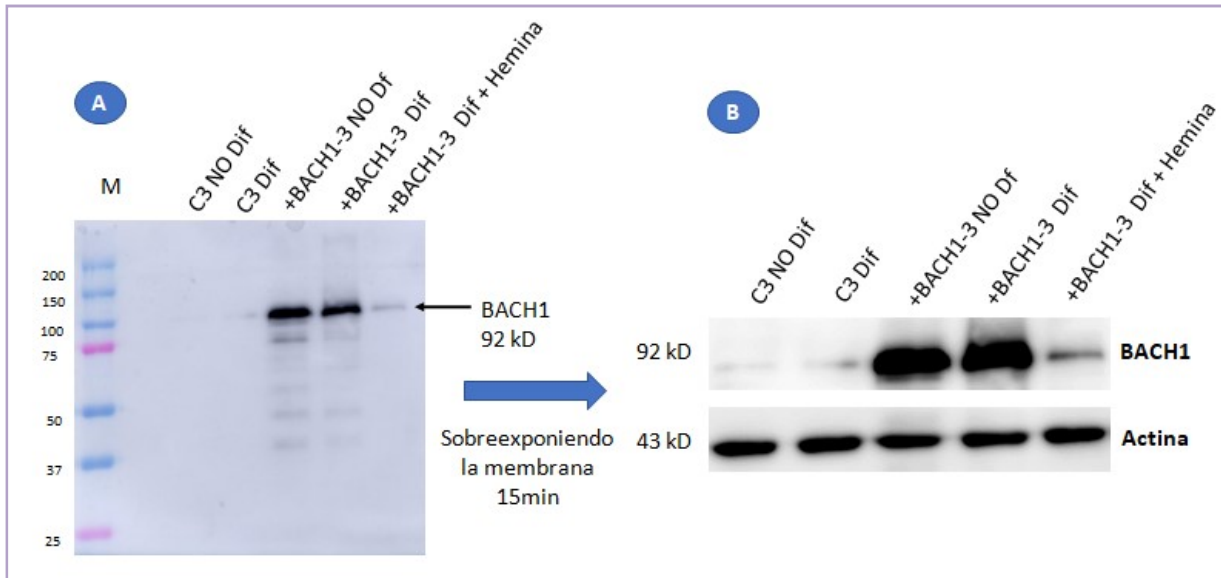
Entre las imágenes de las células SH-SY5Y control diferenciadas (figura 14) y células SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1* diferenciadas (figura 15) no se observan a simple vista diferencias en la cantidad ni en la localización de la  $\beta$ 3-Tubulina.

### **6.7 Medida de la expresión de BACH1 tras la diferenciación neuronal mediante Western Blot**

Para analizar la diferenciación a neurona de las células SH-SY5Y se han realizado Western blots para medir los niveles de proteína BACH1 en las células SH-SY5Y control diferenciadas y no diferenciadas, células SH-SY5Y que sobreexpresan *BACH1* diferenciadas, no diferenciadas y diferenciadas con hemina. Se han empleado muestras de 4 replicados biológicos. La inmunodetección se realizó con el anticuerpo BACH1 cuyas características se recogen en la tabla 7. La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida SDS-PAGE de 0,75 mm de grosor, para mejorar los resultados de la transferencia de proteínas.

Exponiendo la membrana en el detector de quimioluminiscencia 2 min se obtuvo señal del gen sobreexpresado para *BACH1* como se puede ver en la figura 16A para células SH-SY5Y que sobreexpresan BACH1 no diferenciadas, diferenciadas y diferenciadas en presencia de hemina 10 micromolar. Para poder visualizar el gen endógeno en los controles SH-SY5Y diferenciados y no diferenciados se sobreexpusieron las membranas 15 min en el detector de quimioluminiscencia y se obtuvo una imagen como la de la figura 16B.

Gracias a esta inmunodetección podemos analizar el efecto que tiene la hemina sobre la sobreexpresión de BACH1. La expresión de BACH1 en las células SH-SY5Y que sobreexpresan BACH1 diferenciadas en presencia de hemina 10 micromolar se ve reducida a niveles semejantes a los de BACH1 en los controles de SH-SY5Y. La hemina actúa por tanto inhibiendo/secuestrando BACH1 y reduciendo su cantidad en las células SH-SY5Y tratadas.



**Figura 16. Imagen de la inmunodetección de la proteína BACH1 en células SH-SY5Y no diferenciadas y diferenciadas a neurona.** M: marcador de pesos moleculares Precision Plus Protein Standards de Bio Rad. C3 No Df = SH-SY5Y Control replicado biológico 3 no diferenciadas. C3 Df = células SH-SY5Y control replicado biológico 3 diferenciadas. +BACH1-3 NO Df = células SH-SY5Y que sobreexpresan BACH1 replicado biológico 3 no diferenciadas. +BACH1-3 Df = células SH-SY5Y que sobreexpresan BACH1 replicado biológico 3 diferenciadas. +BACH1-1 Df + Hemina = células SH-SY5Y que sobreexpresan BACH1 replicado biológico 3 diferenciadas en presencia de hemina 10 micromolar. A) Imagen de la inmunodetección de la proteína BACH1 en células SH-SY5Y no diferenciadas y diferenciadas a neurona por exposición de la membrana durante 2 minutos. B) Imagen de la inmunodetección de la proteína BACH1 en células SH-SY5Y no diferenciadas y diferenciadas a neurona por exposición de la membrana durante 15 min.

Sin embargo, no se pudo realizar el análisis estadístico de los niveles de proteína BACH1 en todas las muestras, ya que, por falta de tiempo no se pudieron repetir las membranas del resto de replicados biológicos quedando pendiente este análisis para un futuro.

## 7. Discusión

---

Se ha descrito que la sobreexpresión de los genes *BACH1*, *DYRK1A*, *NRIP1*, *PFKL*, *PKNOX1* y *RCAN1* en el DS afecta a la biogénesis mitocondrial. Nosotros debíamos comprobar por tanto en primer lugar, si estos genes se estaban sobreexpresando en nuestro sistema de células en cultivo para analizar a continuación si esta sobreexpresión está afectando a la biogénesis mitocondrial y de ser así ver si los inhibidores de estos genes, restablecen la biogénesis y la función mitocondrial y, por tanto, sería interesante administrarlos a hembras gestantes. Los resultados que se quieren conseguir son:

1º **Comprobar sobreexpresión** a nivel RNA y proteína.

2º Comprobar si dicha sobreexpresión tiene un efecto en la biogénesis y funcionalidad mitocondrial y la **diferenciación a neurona** de las células SH-SY5Y.

3º Si hay un efecto adverso de la sobreexpresión, ver si con los inhibidores se revierte dicho efecto y, por tanto, **mejora la biogénesis** mitocondrial y su funcionalidad.

En primer lugar, con los resultados obtenidos en este trabajo fin de máster se puede afirmar que se cumplió el primer objetivo que era comprobar la sobreexpresión de los 6 genes de estudio localizados en el cromosoma 21 y relacionados con la patogénesis de DS en células SH-SY5Y mediante qPCR y Western Blot.

Al analizar los niveles de mRNA obtenidos mediante qPCR de los 5 genes *BACH1*, *DYRK1A*, *PFKL*, *PKNOX1* y *RCAN1* en células transducidas se comprobó que la expresión aumentaba con respecto a los correspondientes controles tal como se muestra en la figura 7, y que el incremento es significativo. Por tanto, se había conseguido demostrar la correcta sobreexpresión de estos genes de interés. Sin embargo, para el gen *NRIP1* como se ha explicado previamente, los niveles de transcrito obtenido mediante qPCR con SYBR green o con sondas TaqMan eran indeterminados y no se consiguieron resultados favorables con ninguna de estas técnicas para comprobar la sobreexpresión. Analizando la base de datos The human protein atlas (64), se comprobó que la expresión de este gen en la línea celular SH-SY5Y es indetectable. Los niveles de sobreexpresión varían para cada gen en cada línea celular. Por eso se debería de haber comprobado, previamente a los experimentos, en la base de datos The human protein atlas si en la línea celular de trabajo, en nuestro caso SH-SY5Y, los niveles de expresión de cada gen de interés eran detectables.

Además de comprobar el incremento en la expresión de los genes de interés, es importante comprobar el efecto de la sobreexpresión en la cantidad de proteína correspondiente. Para ello otra forma de comprobar la sobreexpresión de *NRIP1* y la sobreexpresión del resto de los genes, en las células SH-SY5Y, fue analizar el

incremento en los niveles de cada proteína en las células transducidas con respecto a los controles como observamos en la figura 10. Gracias a esta técnica se consiguió cuantificar los niveles de proteínas para los genes *DYRK1A*, *PFKL* y *PKNOX* ya que pudo ser detectada una buena señal de la proteína endógena en los controles sobreexponiendo las membranas en el detector de quimioluminiscencia.

Para intentar visualizar los niveles de proteína endógena en los controles para todos los genes se probó a cargar más cantidad de muestra por pocillo en la electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE o se aumentó el tiempo de exposición de las membranas en el detector de quimioluminiscencia, pero los resultados no mejoraron. Otra estrategia que se podría haber utilizado es hacer geles de poliacrilamida para la electroforesis SDS-PAGE en lugar de 1 mm de grosor de 0,75 mm que mejora los resultados de la posterior transferencia de proteínas a la membrana de PVDF.

Una vez comprobado que los genes se están sobreexpresando y el incremento de la cantidad de proteína, se ha estudiado dicho efecto, al igual que ocurre en el caso de la trisomía del cromosoma 21 del DS sobre la diferenciación a neurona de estas células SH-SY5Y. En la figura 12 se puede comprobar como las células SH-SY5Y diferenciadas toman un aspecto de neurona, con una morfología más alargada que las células SH-SY5Y no diferenciadas y además producen gran cantidad de neuritas entre ellas. La formación de neuritas en las células SH-SY5Y diferenciadas también ha quedado demostrada mediante inmunofluorescencia, en la que se ha comprobado que la  $\beta$ -Tubulina es una proteína del citoesqueleto y su cantidad aumenta con la diferenciación neuronal sobre todo localizada en las neuritas (figura 14 y 15).

A simple vista en la figura 12 no se ven diferencias en la diferenciación neuronal entre las células control SH-SY5Y y las células SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1*, todas ellas presentan un aspecto muy similar. Por ello se ha pensado repetir el experimento de diferenciación utilizando el sistema Incucyte, que es un programa que permite medir el número y la longitud de las neuritas y, por tanto, analizar más cuantitativamente la diferenciación a neurona de las líneas celulares.

El objetivo final de esta investigación es buscar fármacos que puedan ser utilizados en el tratamiento prenatal de fetos con DS mejorando la biogénesis mitocondrial. Para cumplir este propósito se ha realizado un experimento de diferenciación neuronal de células SH-SY5Y que sobreexpresan el gen *BACH1* tratándolas con hemina. El objetivo es que al tratar con hemina las células SH-SY5Y que sobreexpresan *BACH1*, la hemina actúa secuestrando la proteína y dirigiéndola a degradación. De esta forma, esta proteína que reprime la biogénesis mitocondrial sería en parte degradada y con ello mejoraría la función OXPHOS y la diferenciación a neurona en las células que la sobreexpresan.

La hemina actúa uniéndose a la proteína BACH1 y favorece su liberación del DNA para su exportación al citoplasma y posterior degradación. BACH1 se une a secuencias del DNA reprimiendo su transcripción cuando los niveles de hemina son bajos. Pero el aumento de los niveles de hemina desplaza a BACH1 de dichas secuencias y provoca su relocalización al citoplasma, haciendo que sean accesibles a activadores (58).

En este trabajo se ha comprobado como la hemina (10  $\mu$ M) reduce los niveles de BACH1 (figura 16) en células SH-SY5Y que sobreexpresan este gen, siendo reducida la cantidad de proteína a niveles semejantes a los de BACH1 que encontramos en los controles de SH-SY5Y. La dosis utilizada ha sido descrita en la bibliografía previamente, usando dosis de hemina de 10  $\mu$ M en células de fibroblastos de ratón (65), en estudios con células SH-SY5Y (66) y en muestras de plasma humano (67); y no afectando a la viabilidad de nuestras células.

Como **perspectivas futuras** se deberá seguir estudiando el efecto de la sobreexpresión de los genes *BACH1*, *DYRK1A*, *NRIP1*, *PFKL*, *PKNOX1* y *RCAN1* al igual que ocurre en el caso de la trisomía del cromosoma 21 del DS, sobre la función de respiración celular, síntesis de ATP, dinámica mitocondrial, biogénesis mitocondrial y, en general, la viabilidad celular. Se analizará la actividad específica de la citocromo-c-oxidasa CIV y del consumo de oxígeno; estudio de la biogénesis mitocondrial mediante la determinación de la actividad citrato sintasa (CS) y de los niveles de mtDNA. Si se ve un efecto en estos parámetros, se estudiará el efecto de inhibidores de estos genes para la búsqueda de posibles tratamientos del DS.

También se plantea comprobar mediante qPCR y Western blot el efecto de la sobreexpresión de nuestros genes de interés sobre la expresión de otros genes, tanto antes como después de la diferenciación neuronal:

- SDHA (succinato deshidrogenasa subunidad A) para comprobar la biogénesis mitocondrial ya que se usa para comprobar la masa mitocondrial por célula.
- CO1 (citocromo c oxidasa I) para analizar diferencias en la respiración celular y el consumo de oxígeno celular. Es un buen marcador para biogénesis mitocondrial, ya que se puede medir la cantidad de mtDNA por nDNA y ver si varía con la diferenciación a neuronas de las células SH-SY5Y.
- PGC1 $\alpha$ : buen marcador de la biogénesis mitocondrial, será útil para medir el efecto de los inhibidores sobre los genes de interés sobreexpresados.
- $\beta$ 3-tubulina: como marcador de diferenciación.
- TOM20: es un complejo de traslocación de membrana externa mitocondrial y sirve para ver cantidad de mitocondrias en las células.
- MAP2 (Microtubule Associated Protein 2) para comprobar la diferenciación celular.

Este tipo de estudios buscan posibles tratamientos destinados a aumentar la biogénesis mitocondrial y, por tanto, la fosforilación oxidativa mitocondrial en personas con DS. La discapacidad intelectual es un aspecto clave del DS, con una disminución en la proliferación neuronal y la capacidad de diferenciación neuronal observados desde la vida fetal. Por lo tanto, este puede ser un período que afecte positivamente la neurogénesis del DS y mejore significativamente los resultados cognitivos después del nacimiento (68).

## 8. Conclusiones

---

### 8.1 Conclusiones

Las conclusiones que pueden extraerse en base a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos en el presente trabajo fin de máster son las siguientes:

- I. Se ha conseguido **comprobar la sobreexpresión de los 6 genes** de estudio (*BACH1*, *DYRK1A*, *NRIP1*, *PFKL*, *PKNOX1* y *RCAN1*) en células SH-SY5Y. Estos genes localizados en el cromosoma 21 y relacionados con la patogénesis del DS afectan con su sobreexpresión a la biogénesis mitocondrial y OXPHOS pudiendo producir un efecto negativo sobre la diferenciación neuronal durante el desarrollo.
- II. Se ha estudiado el efecto de dicha sobreexpresión, al igual que ocurre en el caso de la trisomía del cromosoma 21 del DS sobre la **diferenciación a neurona de estas células SH-SY5Y**, viendo como se produce la aparición de neuritas conectando las células SHSY5Y diferenciadas entre sí.
- III. El objetivo final es buscar fármacos que puedan ser utilizados en el tratamiento prenatal de fetos con DS mejorando la biogénesis mitocondrial. En este trabajo se ha comprobado como **la hemina** a una concentración 10  $\mu$ M **reduce los niveles de BACH1** en células SH-SY5Y que sobreexpresan este gen sin afectar a la viabilidad celular.

### 8.2 Conclusions

Based on the objectives set and the results achieved in this work, conclusions obtained in this Master's thesis are the following:

- I. The **overexpression of the 6 study genes** (*BACH1*, *DYRK1A*, *NRIP1*, *PFKL*, *PKNOX1* and *RCAN1*) in SH-SY5Y cells has been verified. These genes, located on chromosome 21 and related to the pathogenesis of DS, affect mitochondrial

biogenesis and oxidative phosphorylation with their overexpression and may have a negative effect on neuronal differentiation during development.

- II. We have studied the effect of this overexpression, as occurs in the case of DS chromosome 21 trisomy, on the **differentiation of SH-SY5Y cells into neurons**, showing the appearance of neurites connecting differentiated SHSY5Y cells to each other.
- III. The final objective is to search for drugs that can be used in the prenatal treatment of DS focus to improve mitochondrial biogenesis. In this work we have shown how **haemin** at a concentration of 10  $\mu\text{M}$  **reduces BACH1 levels** in SH-SY5Y cells overexpressing this gene without affecting cell viability.

## **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;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;21(9):943. Available from: </pmc/articles/PMC3746264/>
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;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;37(3):222–8. Available from: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pd.4995>
6. Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Latorre-Pellicer A, Colaś C, Balsa E, et al. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* (80- ) [Internet]. 2013 Jun 28;340(6140):1567–70. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1230381>
7. 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.
8. Montoya J, Solano A, López-Gallardo E, Dahmani Y, Dolores Herrero Eduardo Ruiz-Pesini M. Biogénesis y Patología Mitocondrial \*.
9. 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;32(26):8940–51. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/32/26/8940>
10. Keeley TP, Mann GE. Defining Physiological Normoxia for Improved Translation of Cell Physiology to Animal Models and Humans. <https://doi.org/10.1152/physrev000412017> [Internet]. 2018 Jan 1;99(1):161–234. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/physrev.00041.2017>
11. 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;26(17):3327–41. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/26/17/3327/3865114>
12. 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;8(1):e2551–e2551. Available from: <https://www.nature.com/articles/cddis2016484>
  13. Iglesias E, Bayona-Bafaluy MP, Pesini A, Garrido-Pérez N, Meade P, Gaudó P, et al. Uridine Prevents Negative Effects of OXPHOS Xenobiotics on Dopaminergic Neuronal Differentiation. *Cells* 2019, Vol 8, Page 1407 [Internet]. 2019 Nov 8;8(11):1407. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/11/1407/htm>
  14. Garone C, Minczuk M, Keshavan N, Rahman S. Natural history of mitochondrial disorders: a systematic review. *Essays Biochem* [Internet]. 2018 Jul 20;62(3):423–42. Available from: [/essaysbiochem/article/62/3/423/78646/Natural-history-of-mitochondrial-disorders-a](https://essaysbiochem/article/62/3/423/78646/Natural-history-of-mitochondrial-disorders-a)
  15. Beal MF. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* [Internet]. 2005 Oct;58(4):495–505. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16178023/>
  16. Brault V, Duchon A, Romestaing C, Sahun I, Pothion S, Karout M, et al. Opposite Phenotypes of Muscle Strength and Locomotor Function in Mouse Models of Partial Trisomy and Monosomy 21 for the Proximal Hspa13-App Region. *PLOS Genet* [Internet]. 2015 Mar 24;11(3):e1005062. Available from: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1005062>
  17. 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;31(2):179–81. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13577-018-0205-2>
  18. 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.
  19. 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.
  20. 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.
  21. Haas RH, Parikh S, Falk MJ, Saneto RP, Wolf NI, Darin N, et al. Mitochondrial Disease: A Practical Approach for Primary Care Physicians. *Pediatrics* [Internet]. 2007 Dec 1;120(6):1326–33. Available from:

- /pediatrics/article/120/6/1326/70572/Mitochondrial-Disease-A-Practical-Approach-for
22. 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;441(7093):595–600. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature04678>
  23. 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;100(12):7111–6. Available from: <https://www.pnas.org/content/100/12/7111>
  24. 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;79(2):208–17. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovasces/article/79/2/208/271402>
  25. 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.
  26. 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.
  27. Wu Y, Song W. Regulation of RCAN1 translation and its role in oxidative stress-induced apoptosis. *FASEB J*. 2013;27(1):208–21.
  28. 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.
  29. Guimera J, Casas C, Estivill X, Pritchard M. Human Minibrain Homologue (MNBH/DYRK1): Characterization, Alternative Splicing, Differential Tissue Expression, and Overexpression in Down Syndrome. *Genomics*. 1999 May 1;57(3):407–18.
  30. Homo sapiens dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase - Nucleotide - NCBI [Internet]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG\\_009366.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_009366.1)
  31. PFKFB3 phosphofructokinase, liver type [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5211>
  32. 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;17(3):335–43. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41589-020-00676-4>
  33. Bally BP, Farmer WT, Jones E V, Jessa S, Kaceroovsky 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;29(5):785–802. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/29/5/785/5704976>
34. Annerén KG, Korenberg JR, Epstein CJ. Phosphofructokinase activity in fibroblasts aneuploid for chromosome 21. Hum Genet 1987 761 [Internet]. 1987 May;76(1):63–5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00283052>
  35. 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;32(3):205–16. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12264-016-0032-y>
  36. NRIP1 nuclear receptor interacting protein 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8204>
  37. 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.
  38. 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;23(16):4406–19. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/23/16/4406/628381>
  39. Gene: NRIP1 (ENSG00000180530) - Summary - Homo\_sapiens - Ensembl genome browser 104 [Internet]. 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)
  40. PKNOX1 PBX/knotted 1 homeobox 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5316>
  41. 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;31(11):2769–77. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/31/11/2769/1220664>
  42. 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;34(2):290–8. Available from: <https://journals.asm.org/journal/mcb>
  43. PKNOX1 - Homeobox protein PKNOX1 - Homo sapiens (Human) - PKNOX1 gene & protein [Internet]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P55347-1>
  44. 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;(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)

45. 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;568(7751):254–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-019-1005-x>
46. 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;127(2):397–408. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867406012281/fulltext>
47. Gene: BACH1 (ENSG00000156273) - Summary - Homo\_sapiens - Ensembl genome browser 104 [Internet]. 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)
48. Mollo N, Cicatiello R, Aurilia M, Scognamiglio R, Genesio R, Charalambous M, et al. Targeting Mitochondrial Network Architecture in Down Syndrome and Aging. *Int J Mol Sci* 2020, Vol 21, Page 3134 [Internet]. 2020 Apr 29;21(9):3134. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/9/3134/htm>
49. Guedj F, Bianchi DW, Delabar JM. Prenatal treatment of Down syndrome: A reality? *Curr Opin Obstet Gynecol* [Internet]. 2014;26(2):92–103. Available from: [https://journals.lww.com/co-obgyn/Fulltext/2014/04000/Prenatal\\_treatment\\_of\\_Down\\_syndrome\\_\\_a\\_reality\\_.8.aspx](https://journals.lww.com/co-obgyn/Fulltext/2014/04000/Prenatal_treatment_of_Down_syndrome__a_reality_.8.aspx)
50. Jia L, Wang J, Cao H, Zhang X, Rong W, Xu Z. Activation of PGC-1 $\alpha$  and Mitochondrial Biogenesis Protects Against Prenatal Hypoxic–ischemic Brain Injury. *Neuroscience*. 2020 Apr 15;432:63–72.
51. Feki A, Hibaoui Y. DYRK1A Protein, A Promising Therapeutic Target to Improve Cognitive Deficits in Down Syndrome. *Brain Sci* 2018, Vol 8, Page 187 [Internet]. 2018 Oct 16;8(10):187. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3425/8/10/187/htm>
52. Valenti D, De Rasmio D, Signorile A, Rossi L, de Bari L, Scala I, et al. Epigallocatechin-3-gallate prevents oxidative phosphorylation deficit and promotes mitochondrial biogenesis in human cells from subjects with Down's syndrome. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2013 Apr 1;1832(4):542–52.
53. Zhang JC, Xu H, Yuan Y, Chen JY, Zhang YJ, Lin Y, et al. Delayed Treatment with Green Tea Polyphenol EGCG Promotes Neurogenesis After Ischemic Stroke in Adult Mice. *Mol Neurobiol* 2016 545 [Internet]. 2016 May 20;54(5):3652–64. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-016-9924-0>
54. Zmijewski PA, Gao LY, Saxena AR, Chavannes NK, Hushmندی 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.
55. 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.

56. Ljubicic V, Jasmin BJ. Metformin increases peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  Co-activator-1 $\alpha$  and utrophin a expression in dystrophic skeletal muscle. *Muscle Nerve* [Internet]. 2015 Jul 1;52(1):139–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mus.24692>
57. Williams DB, Sutherland LN, Bomhof MR, Basaraba SAU, Thrush AB, Dyck DJ, et al. Muscle-specific differences in the response of mitochondrial proteins to  $\beta$ -GPA feeding: An evaluation of potential mechanisms. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* [Internet]. 2009 Jun;296(6):1400–8. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.90913.2008>
58. Suzuki H, Tashiro S, Hira S, Sun J, Yamazaki C, Zenke Y, et al. Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1. *EMBO J*. 2004;23(13):2544–53.
59. SH-SY5Y | ATCC [Internet]. Available from: [https://www.atcc.org/products/crl-2266?geo\\_country=es](https://www.atcc.org/products/crl-2266?geo_country=es).
60. *Drosophila\_melanogaster* - Ensembl genome browser 104 [Internet]. Available from: [https://m.ensembl.org/Drosophila\\_melanogaster/Info/Annotation](https://m.ensembl.org/Drosophila_melanogaster/Info/Annotation)
61. CCDS Report for Consensus CDS [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi>
62. UniProt [Internet]. Available from: <https://www.uniprot.org/>
63. OligoAnalyzer Tool - primer analysis | IDT [Internet]. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>
64. Cell line - NRIP1 - The Human Protein Atlas [Internet]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000180530-NRIP1/cell+line>
65. Sun J, Hoshino H, Takaku K, Nakajima O, Muto A, Suzuki H, et al. Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* [Internet]. 2002 Oct 1;21(19):5216–24. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1093/emboj/cdf516>
66. Ye F, Li X, Liu Y, Chang W, Liu W, Yuan J, et al. Hemin provides protection against lead neurotoxicity through heme oxygenase 1/carbon monoxide activation. *J Appl Toxicol* [Internet]. 2018 Oct 1;38(10):1353–64. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jat.3646>
67. Miller YI, Shaklai N. Kinetics of hemin distribution in plasma reveals its role in lipoprotein oxidation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 1999 Jul 7;1454(2):153–64. Available from: [www.elsevier.com/locate/bba](http://www.elsevier.com/locate/bba)
68. 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;0(OCT):265.