

Trabajo Fin de Máster

Máster en Biología
Molecular y Celular
Facultad de Ciencias

2018-2019

FOSFORILACIÓN OXIDATIVA Y PROTEINOPATÍAS NEURODEGENERATIVAS

**OXIDATIVE PHOSPHORYLATION AND NEURODEGENERATIVE
PROTEINOPATHIES**

Irene Jiménez Salvador

Directores

Eldris Iglesias Huerta

Eduardo Ruiz Pesini



Universidad
Zaragoza

ABREVIATURAS

A β : Péptido β -amiloide

AD: Enfermedad de Alzheimer

APP: Proteína precursora de amiloide

ATO: Atovacuna

AZT: Azidotimidina

BSA: Albumina sérica bovina

CIBA: Centro de Investigación Biomédica de Aragón

D: Células diferenciadas

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Media

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ETC: Cadena de transporte de electrones

IMS: Espacio intermembrana

LIN: Linezolid

MIM: Membrana interna mitocondrial

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

PD: Enfermedad de Parkinson

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

RA: Ácido retinoico

RIPA: Ensayo de radioinmunoprecipitación

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SD: Células sin diferenciar

SDS: Dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SN: Sustancia negra

SNC: Sistema nervioso central

SNpc: Sustancia negra pars compacta

TH: Tirosina hidroxilasa

TPA: 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato

TUBB3: β III-tubulina

ÍNDICE

1. RESUMEN Y ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	4
2.1. Sistema de fosforilación oxidativa	4
2.1.1. El sistema OXPHOS y la mitocondria en las neuronas	5
2.1.2. Implicación del sistema OXPHOS en la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson	5
2.2. Proteinopatías y disfunción mitocondrial	6
2.3. Enfermedad de Alzheimer	7
2.3.1. Papel de la proteína tau	8
2.4. Enfermedad de Parkinson	10
2.4.1. Papel de la proteína α -sinucleína	12
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	14
4. METODOLOGÍA	15
4.1. Líneas celulares.....	15
4.2. Cultivo celular	16
4.2.1. Medios de cultivo	16
4.2.2. Mantenimiento de la línea celular	17
4.2.3. Congelación y descongelación	17
4.2.4. Recuento celular.....	18
4.3. Diferenciación de la línea SH-SY5Y a neurona dopaminérgica	18
4.4. Detección de proteínas	19
4.4.1. Inmunofluorescencia en cultivos celulares	19
4.4.2. Citometría de flujo	20

4.5. Consumo de oxígeno en células intactas	20
4.6. Análisis de proteínas	21
4.6.1. Extracción de proteína total.....	21
4.6.2. Cuantificación de proteína total por espectrofotometría. Método de Bradford	22
4.6.3. Western Blot	23
4.7. Análisis estadístico	25
5. RESULTADOS	26
5.1. Diferenciación neuronal dopaminérgica de la línea SH-SY5Y	26
5.1.1. Análisis de morfología neuronal.....	26
5.1.2. Análisis de marcadores neuronales y dopaminérgicos.....	27
5.2. Análisis de la disfunción mitocondrial en células tratadas.....	29
5.3. Expresión de la proteína TAU	30
5.4. Expresión de la proteína α-sinucleína	34
6. DISCUSIÓN	36
6.1. Modelo neuronal con disfunción mitocondrial.....	36
6.2. Expresión de proteínas.....	37
7. CONCLUSIONES Y CONCLUSIONS	40
8. BIBLIOGRAFÍA	41
ANEXO	46
1. Huella genética de la línea SH-SY5Y	46
2. Estudio de la disfunción mitocondrial en las líneas mutantes	47

1. RESUMEN Y ABSTRACT

Resumen

Numerosos indicios sugieren que alteraciones del sistema de fosforilación oxidativa están implicadas en la patogénesis de las dos enfermedades neurodegenerativas más comunes, las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. Estas enfermedades pueden ser definidas como proteinopatías neurodegenerativas. En ellas se producen alteraciones estructurales, y errores de plegamiento, de determinadas proteínas. La oligomerización del péptido β -amiloide y la proteína tau hiperfosforilada contribuyen al fenotipo observado en la enfermedad de Alzheimer y la de la proteína α -sinucleína contribuye al de la enfermedad de Parkinson. Las proteínas mal plegadas pueden afectar adversamente la fosforilación oxidativa pero, igualmente, una alteración de la fosforilación oxidativa puede provocar la sobreproducción y la oligomerización de estas proteínas. Por tanto, es plausible que ambos eventos dañinos interactúen y, junto con los factores genéticos y ambientales que desencadenan estos mecanismos, culminen en degeneración y muerte neuronal, ya que las neuronas son particularmente sensibles a esta disfunción metabólica.

Para analizar la influencia de la disfunción mitocondrial sobre la acumulación tóxica de tau hiperfosforilada y α -sinucleína, se han utilizado líneas celulares con distintas proteínas mitocondriales mutadas, como son la DNA polimerasa, la proteína ribosomal S12 y la proteína de Rieske. Además, se han realizado tratamientos con azidotimidina, linezolid y atovacuna, que afectan a los mismos procesos que estas proteínas mutantes, y que son drogas administradas actualmente para el tratamiento de otras enfermedades.

Tanto en el análisis por Western blot de tau fosforilada como de α -sinucleína se observa un nuevo patrón de bandas en las células con déficits mitocondriales. Estos resultados parecen indicar que alteraciones en el sistema OXPHOS pueden intervenir en una agregación proteica perjudicial para la célula.

Abstract

Numerous evidences suggest that alterations of the oxidative phosphorylation system are involved in the pathogenesis of the two most common neurodegenerative diseases, Alzheimer disease and Parkinson disease. These diseases can be defined as neurodegenerative proteinopathies. Structural alterations, and folding errors, of certain proteins are produce in both of them. The oligomerization of amyloid β peptide and hyperphosphorylated tau protein contributes to the phenotype observed in Alzheimer disease. The aggregation of α -synuclein protein contributes to Parkinson disease. Misfolded proteins can adversely affect oxidative phosphorylation function but, likewise, an alteration of oxidative phosphorylation function can cause overproduction and protein oligomerization. Therefore, it is plausible that both harmful events interact and, together with the genetic and environmental factors that trigger these mechanisms, culminate in neuronal degeneration and death, since neurons are particularly sensitive to this metabolic dysfunction.

In order to analyze the effect of mitochondrial dysfunction on the toxic accumulation of hyperphosphorylated tau and α -synuclein, cell lines with different mutated mitochondrial proteins have been used, such as DNA polymerase, S12 ribosomal protein and Rieske protein. In addition, there have been treatments with azidotimidine, linezolid and atovaquone, which affect the same process than those affected by mutant proteins, and which are drugs currently administered for the treatment of other diseases.

In Western blot analysis, phosphorylated tau and α -synuclein have shown a new band pattern in cells with mitochondrial deficits. These results might indicate that alterations in the OXPHOS system can join in a protein aggregation that is harmful to the cell.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1. Sistema de fosforilación oxidativa

El sistema OXPHOS, ubicado en la membrana interna mitocondrial (MIM), incluye la cadena de transporte de electrones (ETC), que contiene los complejos respiratorios I (CI) a IV (CIV), y la ATP sintasa (complejo V, CV) (Figura 1), además de la coenzima Q (CoQ) y el citocromo C. Los electrones de la mayoría de los nutrientes se extraen y pasan a la ETC a través de coenzimas reducidas de adenina y la mayor parte del oxígeno inhalado recoge estos electrones. El flujo de electrones ETC está acompañado por el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (IMS). Esta actividad genera un gradiente electroquímico utilizado para la producción de energía y muchos otros propósitos. Entre ellos, el ajuste de los niveles de las moléculas de señalización tales como ATP, calcio (Ca^{2+}), NAD^+ y especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo tanto, la modulación de muchas vías celulares. OXPHOS también regula la apoptosis y la diferenciación celular.

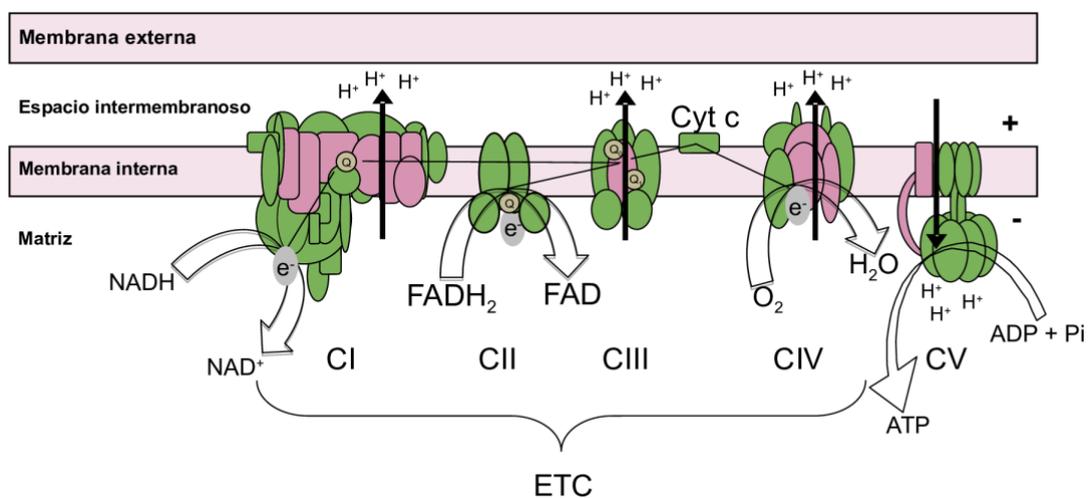


Figura 1. Sistema de fosforilación oxidativa. Las subunidades del sistema OXPHOS están codificadas en el DNA nuclear (verdes) y el DNA mitocondrial (rosas).

La mayoría de las subunidades OXPHOS están codificadas en cromosomas nucleares. Sin embargo, 13 polipéptidos esenciales están codificados en DNA mitocondrial (mtDNA).

Dado que el mtDNA se halla menos protegido en el interior de la matriz mitocondrial, apenas contiene secuencias no codificantes y se encuentra en un ambiente redox, presenta una alta tasa de mutación. Además, el sistema de reparación resulta mucho menos eficiente que en el DNA nuclear (nDNA), de forma que se pueden acumular más mutaciones.

2.1.1. El sistema OXPHOS y la mitocondria en las neuronas

Las neuronas se caracterizan por ser células con morfologías complejas, formadas por largos axones y ramificaciones dendríticas. Estas prolongaciones poseen unos requisitos energéticos elevados, entre otros motivos, para un correcto funcionamiento del transporte de vesículas y orgánulos endocíticos. Como consecuencia, la localización de las mitocondrias en dendritas, axones y terminales sinápticos resulta importante para poder adaptarse a las demandas de energía de forma rápida. Por tanto, la disfunción mitocondrial podría tener un mayor impacto en neuronas respecto a otros tipos celulares.^{1,2}

2.1.2. Implicación del sistema OXPHOS en la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson

Existen numerosas evidencias que sitúan la disfunción mitocondrial como un elemento clave en la patogénesis de ambas enfermedades.

En muchos pacientes con AD, se han visto alteraciones en componentes de la ETC, concretamente la disminución de la actividad del CI y CIV en regiones del cerebro como la corteza temporal o el hipocampo, especialmente afectadas en la AD.³⁻⁵ En estudios de cerebros de pacientes con PD, también se observaron actividades y niveles disminuidos del CI y CIV en distintas regiones y un aumento de la proporción de neuronas deficientes para dichos complejos principalmente en la sustancia negra (SN), apoyando la participación del sistema OXPHOS en el desarrollo de la PD.⁶⁻⁸ En ambos casos, las alteraciones de los complejos del sistema OXPHOS se observan en otros tejidos no neuronales, lo que sugiere que las deficiencias de estos actuarían como posible causa de la patología, no como consecuencia de la neurodegeneración. Igualmente, se han encontrado niveles elevados de ROS en el cerebro de individuos afectados tanto en la AD como en la PD.⁹⁻¹¹

2.2. *Proteinopatías y disfunción mitocondrial*

El sistema OXPHOS se considera la principal fuente de energía celular y ROS, por tanto, la disfunción mitocondrial puede contribuir a la disminución de los niveles de energía y a la generación excesiva de estrés oxidativo en ambas patologías neurodegenerativas. Estos niveles alterados provocan alteraciones funcionales en la célula como la activación de factores de transcripción que podrían modificar la expresión de los genes de proteínas tóxicas o de enzimas implicadas en su síntesis, procesamiento o degradación. Además, ROS puede favorecer la oligomerización de estas proteínas tóxicas de forma directa como resultado del daño oxidativo. La producción de ROS en exceso también conduce a mayores tasas de mutación en el mtDNA, agravando el deterioro del sistema OXPHOS.^{10,12}

Desde otra perspectiva, la oligomerización o, incluso, la acumulación en exceso de monómeros puede causar daños mitocondriales variados, como el deterioro del funcionamiento de la cadena respiratoria. Como consecuencia, la disfunción mitocondrial provocaría niveles alterados de moléculas que impulsaría la oligomerización y provocaría mutaciones en el mtDNA.^{10,12}

Por tanto, el deterioro funcional mitocondrial y la oligomerización serían procesos interrelacionados, que actuarían potenciándose unos a otros hasta alcanzar un estado insostenible que conduciría a la muerte celular.^{1,2} De hecho, existen evidencias de que la exposición a inhibidores mitocondriales, como MPTP, rotenona o paraquat, conduce a la hiperfosforilación y agregación de tau y a la oligomerización de α -sinucleína.¹³⁻²⁰

2.3. *Enfermedad de Alzheimer*

La enfermedad de Alzheimer (AD) es el trastorno neurodegenerativo progresivo y crónico más frecuente, que afecta a distintas áreas del sistema nervioso central (SNC).

Aspectos clínicos de la enfermedad de Alzheimer. La fase sintomática de la AD se prolonga en torno a 8-10 años, aunque esta se encuentra precedida de etapas preclínicas y prodrómicas, todas con diferente progresión en cada individuo. Los síntomas característicos de la enfermedad son pérdida de memoria, deterioro cognitivo y funcional, trastornos del comportamiento y anormalidades motoras. Distintas anormalidades neuropsiquiátricas como la depresión, las alucinaciones o la agitación también se encuentran presentes en los pacientes de Alzheimer.^{11,21}

El tratamiento actual se basa en mejorar algunos síntomas y paliar posibles enfermedades comórbidas, como la enfermedad cerebrovascular, pero no existen métodos para modificar el curso de la AD.²²

Patología de la enfermedad de Alzheimer. La pérdida sináptica y la muerte neuronal selectiva, junto con la presencia de depósitos proteicos anormales en las neuronas y en el espacio extracelular, conforman las características neuropatológicas de la enfermedad. La AD afecta inicialmente a los lóbulos frontal y temporal, y progresa lentamente a otras áreas del neocórtex. Dicha afectación se basa en la acumulación de formas insolubles del péptido A β , derivado de la escisión proteolítica de la proteína precursora de amiloide (APP), en placas en el espacio extracelular y la agregación de la proteína tau asociada a microtúbulos en ovillos neurofibrilares en las neuronas (Figura 2a).^{11,23}

El depósito de A β comúnmente sucede en los lóbulos frontal y temporal, el hipocampo y el sistema límbico (Figura 2b, fila superior). Con un origen más tardío al depósito de A β , se produce la formación de ovillos neurofibrilares de tau y la degeneración neurítica, comenzando por los lóbulos temporales mediales y el hipocampo; con el trascurso de la enfermedad, estas acumulaciones se extienden a áreas del neocórtex (Figura 2b, fila inferior).^{11,23}

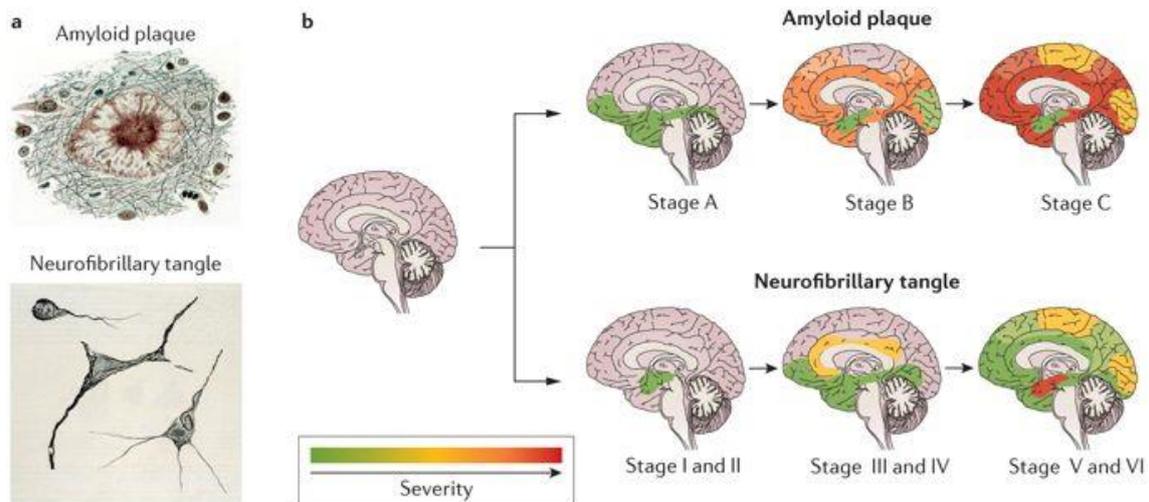


Figura 2. Signos neuropatológicos principales de la AD. **(a)** Método de impregnación de plata para visualizar las proteínas agregadas en placas amiloides extracelulares y ovillos neurofibrilares intracelulares. **(b)** Progresión típica de la deposición de β -amiloide (fila superior) y la acumulación de tau (fila inferior) en la AD.¹¹

Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer. La incidencia global se encuentra entre 1 y 3 % de afectados, junto con una prevalencia de 10 a 30 % en la población mayor de 65 años. La determinación precisa de la epidemiología de la enfermedad puede verse mejorada en los próximos años debido a la creación de nuevas tecnologías, como las imágenes moleculares de PET (tomografía por emisión de positrones) o los niveles de biomarcadores para $A\beta$ y tau, ya que actualmente el diagnóstico resulta difícil por la similitud con otras demencias.¹¹

La AD parece que se manifiesta aproximadamente con las mismas tasas en todas las poblaciones del mundo. En cambio, la AD y otras demencias prevalecen más en las mujeres, aunque no se puede afirmar que este directamente relacionado con la enfermedad en sí.²⁴

2.3.1. Papel de la proteína tau

Uno de las características neuropatológicas de la AD es la formación de ovillos neurofibrilares constituidos por una forma anormalmente hiperfosforilada de la proteína tau. Esta es una proteína soluble que presenta seis isoformas en el cerebro humano adulto resultantes del procesamiento por splicing alternativo.

La proteína tau asociada a microtúbulos, que se expresa de forma abundante en el sistema nervioso central, desempeña un papel importante en el crecimiento y la polaridad neuronal, por lo que se localiza predominantemente en los axones. Se trata de una proteína multifuncional cuyas funciones incluyen el ensamblaje y la estabilización de los microtúbulos, la organización del citoesqueleto y el transporte axonal, la transducción de señales, la generación de la polaridad y la forma neuronal y el anclaje de fosfatasa y quinasas.²⁵⁻²⁷

La fosforilación de tau regula la unión y el ensamblaje de los microtúbulos. Como consecuencia de la hiperfosforilación, se induce un cambio de conformación en la proteína provocando su disociación de los microtúbulos. Esto conlleva a la formación de agregados solubles de tau, filamentos helicoidales insolubles que, en última instancia, conforman los ovillos neurofibrilares característicos de la enfermedad. El efecto tóxico de estas acumulaciones y la pérdida de transporte axonal, debida a la desestabilización de los microtúbulos, parecen estar implicados en la patología de la AD.²⁵⁻²⁷

Se ha propuesto que la disfunción mitocondrial puede conllevar al desarrollo de la patología de la AD. Dicha teoría se conoce como la hipótesis de la cascada mitocondrial, que propone que la función basal del sistema OXPHOS puede verse disminuida por cambios mitocondriales relacionados con la edad. Al traspasar un umbral determinado, se produce un deterioro funcional de la mitocondria que induce histopatologías características de la AD. Existen evidencias de que la energía celular reducida promueve la fosforilación de tau. Este suceso parece ocurrir por la reentrada de la neurona en el ciclo celular a causa de una estimulación de diversas proteínas por alteraciones en el sistema OXPHOS y, por tanto, en los niveles de energía. Algunas de estas proteínas fosforilan la proteína tau para desmontar el citoesqueleto, ya que no es ventajoso para la división celular. Finalmente, este reinicio del ciclo celular se ve interrumpido probablemente por este déficit mitocondrial subyacente.^{5,28} En otros casos, también se ha observado que el aumento del estrés oxidativo derivado de una disfunción del sistema OXPHOS puede influir en la modificación de la proteína tau, promoviendo la agregación de esta hasta los ovillos neurofibrilares.^{2,10}

2.4. **Enfermedad de Parkinson**

La enfermedad de Parkinson (PD) es el segundo trastorno neurodegenerativo más común, que afecta al sistema nervioso central de manera crónica y progresiva, siendo la forma más frecuente de parkinsonismo.

Aspectos clínicos de la enfermedad de Parkinson. Esta enfermedad presenta diferentes síntomas en función del estadio siendo la bradikinesia, la rigidez muscular y el temblor en reposo los indicadores principales para el diagnóstico de la enfermedad. Además de los síntomas motores, los enfermos de Parkinson presentan diferentes síntomas no motores como gastrointestinales, neuropsiquiátricos o afecciones del sistema autónomo.²⁹

Se trata de una enfermedad sin cura y, actualmente, los tratamientos se basan en restablecer el contenido de dopamina en el cerebro y paliar los síntomas.²⁹

Patología de la enfermedad de Parkinson. Los rasgos característicos de la PD incluyen la pérdida neuronal en la vía nigrostriatal dopaminérgica y la acumulación generalizada de proteínas intracelulares, mayoritariamente la proteína α -sinucleína.^{30,31}

Los síntomas motores de la enfermedad radican en una pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNpc), lo cual se refleja en una despigmentación de esta por pérdida de neuromelanina (Figura 3a). Con la tinción inmunohistoquímica para tiroxina hidroxilasa (TH), enzima limitante de la síntesis de dopamina, se puede observar una evidente pérdida de estas neuronas en el cerebro de pacientes de Parkinson (Figura 3b-d).³⁰

Los diferentes agregados de proteínas encontrados en el citoplasma se conocen como cuerpos de Lewy, compuestos en gran parte de α -sinucleína (Figura 3e-g). La formación de estos acúmulos se produce inicialmente en neuronas colinérgicas y monoaminérgicas del tronco encefálico y en neuronas del sistema olfativo, pero también se encuentran en regiones cerebrales límbicas y neocorticales con la progresión de la enfermedad (Figura 3h).³¹

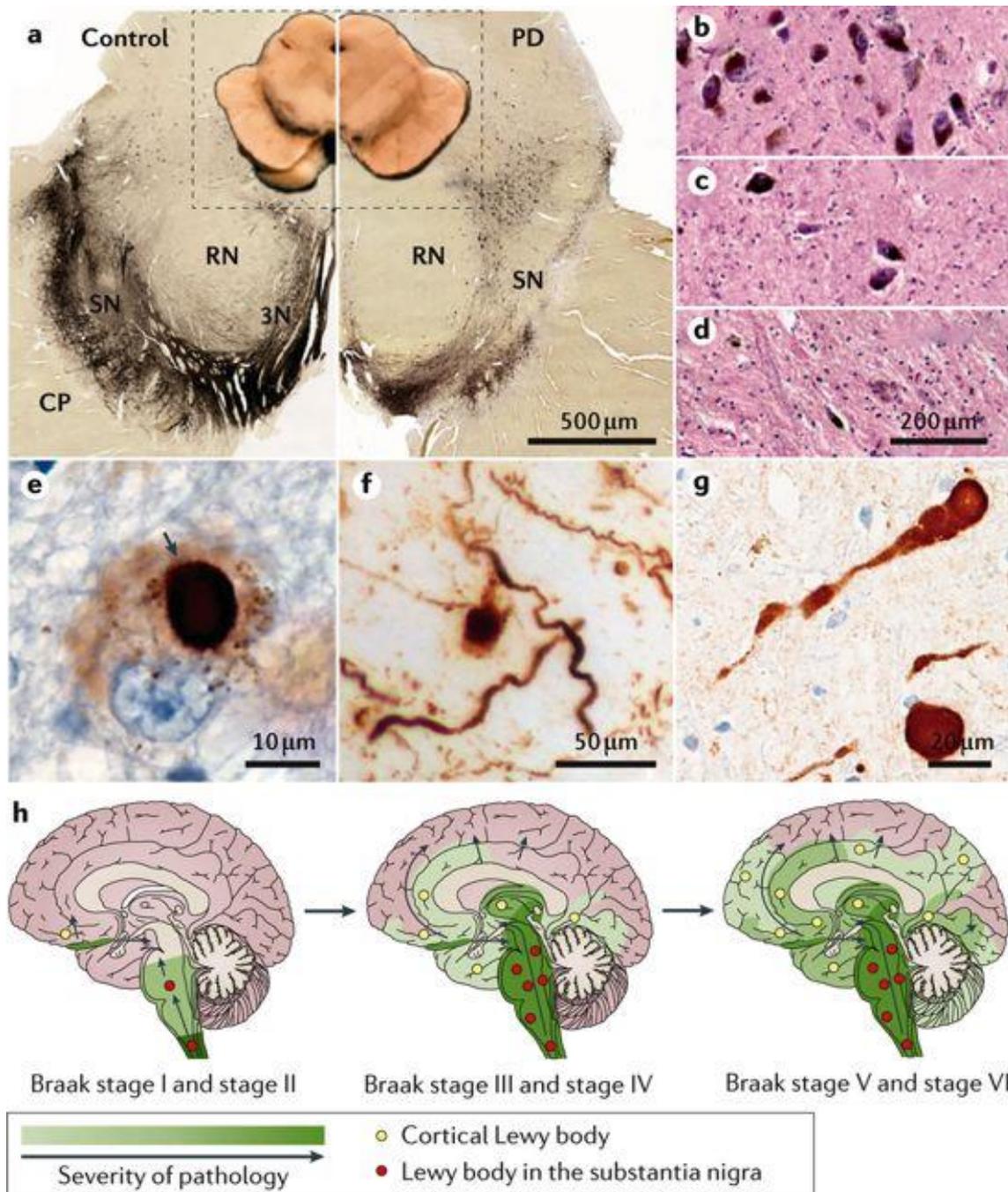


Figura 3. Signos neuropatológicos principales de la PD. **(a)** Despigmentación de la sustancia negra (SN) en un paciente de Parkinson (derecha) respecto del control (izquierda). **(b-d)** Tinción hematoxilina-eosina de la SN que muestra una distribución normal de neuronas pigmentadas en un control (parte b) y pérdida de células pigmentadas significativa (parte c) o grave (parte d) en la PD. **(e-g)** Tinción inmunohistoquímica de α -sinucleína que muestra distintas morfologías de los cuerpos de Lewy. **(h)** Progresión teorizada de la agregación de α -sinucleína en la PD. Las inclusiones de α -sinucleína ocurren en neuronas colinérgicas y monoaminérgicas del tronco cerebral en casos asintomáticos (estadio I y II de Braak), infiltran neuronas similares en el cerebro medio y el prosencéfalo basal en pacientes con síntomas motores (estadio III y IV de Braak), y más tarde se encuentran en regiones cerebrales límbicas y neocorticales con progresión de la PD (estadio V y VI de Braak).³⁰

Epidemiología de la enfermedad de Parkinson. Actualmente la incidencia anual se encuentra entre 5 y 30 afectados por 100.000 individuos. Respecto a la prevalencia, se estima en torno a 300 enfermos por cada 100.000. Estas tasas aumentan considerablemente de forma proporcional a la edad, de 5 a 10 veces a partir de los 60 años. Además, la incidencia parece variar en función de la raza, la etnia, el genotipo y el entorno. La PD resulta dos veces más común en hombres que en mujeres en la mayoría de las poblaciones, pero se desconoce el motivo.^{30,32}

2.4.1. Papel de la proteína α -sinucleína

En todos los pacientes con PD se encuentran agregados de proteínas intraneuronales, los cuerpos de Lewy, que están compuestos predominantemente de α -sinucleína. Esta pequeña proteína de 140 aminoácidos resulta muy abundante en el cerebro, especialmente en los terminales presinápticos. Su función fisiológica no se conoce al completo, pero parece estar implicada en la liberación de neurotransmisores, la dinámica vesicular y el transporte axonal.³³⁻³⁵ También existen evidencias que relacionan la mitocondria con la proteína α -sinucleína. Debido a la presencia de una secuencia de señalización mitocondrial en el extremo N-terminal de la proteína y a diversos estudios que describen interacción física entre esta y la mitocondria, existe un amplio consenso de que parte de la α -sinucleína celular se localiza en la mitocondria. Además, se ha descrito contacto directo de la α -sinucleína con complejos del sistema OXPHOS, por lo que su localización podría ser en la MIM o cerca en la matriz o en el IMS, aunque todavía no se conoce la función que puede tener esta proteína sobre la mitocondria o el sistema OXPHOS.^{1,2}

La α -sinucleína en su forma nativa se considera una proteína intrínsecamente desordenada, pero su interacción con lípidos provoca un cambio conformacional a hélice α . Parece ser que la formación de las fibrillas de α -sinucleína se basa en un mecanismo de nucleación que implica la conversión de los monómeros de una estructura desordenada o hélice α a una estructura de hoja β . El proceso de ensamblaje comienza por la formación de un dímero inestable que finalmente genera fibrillas, pasando por oligómeros y protofibrillas, de manera que existen varios estados que conviven en el interior celular.^{36,37}

La causa principal de esta agregación proteica no está totalmente definida. Posiblemente varios desencadenantes etiológicos puedan conducir a una cascada de eventos que impliquen un plegamiento incorrecto de la α -sinucleína. La disfunción mitocondrial se considera uno de los mecanismos causantes de la acumulación de esta proteína. Las evidencias que apoyan la hipótesis de que la disfunción mitocondrial precede a la acumulación de la α -sinucleína se basa principalmente en estudios sobre la exposición a tóxicos, por ejemplo, pesticidas como el paraquat o la rotenona.⁸ Diversos factores genéticos o ambientales pueden conducir a un deterioro mitocondrial debido a mutaciones o deleciones en el mtDNA o daños sobre el sistema OXPHOS. Como consecuencia de un mal funcionamiento de la fosforilación oxidativa, se produce un aumento dramático de especies reactivas y, por tanto, un elevado estrés oxidativo. El aumento de ROS puede dañar de forma directa prácticamente todas las macromoléculas biológicas, incluidas las proteínas. Como resultado, se promueve la agregación de α -sinucleína. Así mismo, el daño oxidativo de proteínas lisosomales ocasiona disfunción lisosomal, de manera que se produce una proteostasis alterada que influye en los niveles y los depósitos de α -sinucleína celular.^{30,38,39}

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La AD y la PD son proteinopatías neurodegenerativas que se caracterizan, entre otros signos patológicos, por la acumulación tóxica de proteínas. Nuestra hipótesis propone que una disfunción mitocondrial provocada por diferentes causas, como serían algunas drogas de uso humano y mutantes, conduce a una deficiencia del sistema OXPHOS que puede desencadenar el depósito de proteínas determinadas.

Los objetivos propuestos en este trabajo de fin de master para comprobar la hipótesis planteada serían:

- Generación de modelo neuronal con disfunción del sistema de fosforilación oxidativa.
- Análisis del impacto de la disfunción mitocondrial sobre la hiperfosforilación y la acumulación de la proteína tau.
- Análisis del impacto de la disfunción mitocondrial sobre la acumulación de la proteína α -sinucleína.

4. METODOLOGÍA

4.1. Líneas celulares

Para el presente proyecto final de máster, se utiliza como modelo celular principal la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Se trata de una línea con capacidad para diferenciarse hacia neurona dopaminérgica. Por ello, se ha escogido como modelo celular para analizar estas enfermedades.

Para conseguir simular la disfunción mitocondrial presente en las enfermedades estudiadas, se utilizaron líneas mutantes y se trató con distintas drogas. El objetivo de ello es reproducir fallos en varios procesos mitocondriales importantes, la replicación, la traducción y el transporte de electrones en el sistema OXPHOS.

Líneas mutantes. Se emplean líneas mutantes generadas a partir de la línea SH-SY5Y (Tabla 1). Las distintas proteínas mutadas serían la DNA polimerasa mitocondrial (POLG), que se encarga de la replicación del mtDNA; la proteína ribosomal S12 (MRPS12), que es una de las proteínas ribosomales mitocondriales más importantes; y la proteína de Rieske (RISP) que es un componente clave del complejo III.

Tabla 1. Líneas celulares empleadas durante el proyecto de final de máster.

Línea celular	Procedencia
SH-SY5Y	Línea aneuploide, derivada de neuroblastoma (ATCC® CRL-2266™), obtenidas en Sigma-Aldrich
SH-SY5Y POLG WT	Creadas en nuestro laboratorio
SH-SY5Y POLG Y955C	
SH-SY5Y MRPS12 WT	
SH-SY5Y MRPS12 K72L	
SH-SY5Y RIESKE WT	
SH-SY5Y RIESKE C222S	

Tratamientos. Se utilizan distintas drogas actualmente administradas a una proporción importante de la población para el tratamiento de otras enfermedades. La azidotimidina (AZT) se usa para el tratamiento del SIDA como inhibidor de la transcriptasa reversa, pero también inhibe la DNA polimerasa mitocondrial. El antibiótico linezolid (LIN), recomendado para la tuberculosis resistente a múltiples drogas, muestra efectos adversos sobre el ribosoma mitocondrial. La atovacuona (ATO), fármaco empleado en la lucha contra la malaria, inhibe el complejo III del sistema OXPHOS.

Para estos compuestos se utilizaron concentraciones proporcionales a las que se alcanzan en la sangre de las personas tratadas (Tabla 2). Los tratamientos se realizaron durante la diferenciación a neurona dopaminérgica.

Tabla 2. Concentración de las diferentes drogas utilizadas.

Drogas	Concentración (μM)
Azidotimidina (AZT)	5
Linezolid (LIN)	30
Atovacuona (ATO)	0,5

4.2. Cultivo celular

El trabajo de cultivo celular se realizó en campanas de flujo laminar vertical (Nuair UN-437-400E) bajo condiciones estériles. El material de vidrio se sometió a un autoclavado y las disoluciones se filtran con filtros $0.22 \mu\text{m}$; además, todo el material se esterilizó con etanol 70 % previamente a su uso.

4.2.1. Medios de cultivo

Para el crecimiento de la línea celular SH-SY5Y se utilizó como medio Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) 4,5 g/L de glucosa (Life Technologies); por otro lado, para la diferenciación dopaminérgica el medio de crecimiento utilizado fue Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) libre de glucosa (Life Technologies), al cual se añadió galactosa (Sigma-Aldrich) y piruvato (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 5 y 1 mM, respectivamente.

En ambos casos se suplementó con suero fetal bovino (SFB) (Life Technologies) (10 %), consiguiendo la complejidad necesaria para el crecimiento celular mediante proteínas y factores de crecimiento incluidos en este. Durante todos los procesos de cultivo, las células crecieron en ausencia de antibióticos, para reproducir con mayor fidelidad las condiciones fisiológicas.

4.2.2. Mantenimiento de la línea celular

Las células se sembraron en placas de 100 mm y se mantuvieron en incubadores (Nuaire DHD AutoFlow Incubator) a 37 °C con humedad al 90 % y un 5 % de CO₂. Al cabo de 2-3 días, el medio se cambió para mantener las condiciones de crecimiento.

Para el mantenimiento de la línea celular, al alcanzar un 80 % de confluencia las placas se doblaron. Dado que la línea celular SH-SY5Y crece adherida a la superficie, para proceder a su subcultivo en primer lugar se eliminó el medio y se sometieron a un tratamiento con TrypLE (Life Technologies), previo lavado con PBS (Life Technologies) para eliminar restos de medio que puedan interferir en la tripsinización. Transcurridos unos minutos, las células quedaron en suspensión, entonces se añadió el medio de crecimiento correspondiente para neutralizar la acción del TrypLE, recogiénolo en un tubo Falcon. Posteriormente, se centrifugaron (Allegra X-22 Centrifuge, Beckman Coulter) durante 5 min a 1400 rpm para resuspender en la cantidad de medio adecuado para proceder a su división, su recuento o su congelación.

4.2.3. Congelación y descongelación

Para la congelación celular, tras tripsinizar las células, se recogió el pellet celular resultante de la centrifugación con DMEM 4,5 g/L de glucosa suplementado con 20 % SFB y 10 % dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). A continuación, el criotubo se introdujo en un contenedor con isopropanol (Mr. Frosty, Sigma-Aldrich) aproximadamente durante 24 h a -80 °C, lo que permite un descenso gradual de la temperatura de 1 °C/min, favoreciendo una buena conservación celular. Finalmente, se pasaron a nitrógeno líquido donde se pueden almacenar durante largos periodos de tiempo hasta su uso.

Para la descongelación de los criotubos, el contenido de estos se resuspendió con 5 ml de medio DMEM 4,5 g/L de glucosa. Tras homogeneizar el contenido, se centrifugó en un Falcon durante 5 min a 1400 rpm para eliminar el medio con DMSO, ya que este resulta perjudicial para las células. El pellet obtenido se resuspendió en el medio de cultivo pertinente para proceder a su siembra en placa.

4.2.4. Recuento celular

El recuento celular se realiza con el contador Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen), que analiza la viabilidad celular y el conteo de células utilizando el método del azul tripán. El azul tripán es un colorante capaz de penetrar en las células muertas, que presentan la membrana plasmática desestructurada, de forma que solo se tiñen de azul estas células. Para ello, se mezclan 20 µl de suspensión celular con 20 µl de azul tripan (Invitrogen).

4.3. *Diferenciación de la línea SH-SY5Y a neurona dopaminérgica*

Para la diferenciación de la línea SH-SY5Y a neurona dopaminérgica se siguió una adaptación del protocolo de Presgraves.⁴⁰ Se sembraron $0,1 \times 10^6$ células/placa en DMEM 4,5 g/L de glucosa. Al cabo de 24 h, el medio se cambió por DMEM con 5 mM de galactosa y 1 mM de piruvato, suplementado con ácido retinoico (RA) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 10 µM durante 6 días; dicho medio se reemplazó por medio fresco cada dos días. Al finalizar los 6 días, el medio con RA se cambió por medio con 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 180 nM durante 2 días. De forma paralela, se realizaron cambios de medio sin RA o TPA en placas adicionales para tomar como control. Para la diferenciación se utiliza medio con galactosa, libre de glucosa, con el fin de favorecer el uso del sistema OXPHOS y evidenciar los posibles defectos de este. Una vez se terminó la diferenciación, se tripsinizaron las células y se recogieron para su análisis o su almacenaje a -80 °C.

4.4. Detección de proteínas

4.4.1. Inmunofluorescencia en cultivos celulares

Para la detección de proteínas por inmunofluorescencia, las células se sembraron 2×10^5 células/pocillos en placas de 6 pocillos. Entonces, se llevó a cabo el proceso de diferenciación a neurona dopaminérgica ya comentado.

Al finalizar la diferenciación, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4 % a temperatura ambiente durante 15 min. Pasado este tiempo, se lavó dos veces con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1 % durante 15 min a temperatura ambiente. Con el fin de evitar uniones inespecíficas, se bloqueó con BSA al 5 % durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó a 4 °C durante la noche con el anticuerpo primario correspondiente diluido en una solución de BSA al 1 % y Tritón X-100 al 0,1 % (Tabla 3). Tras la incubación, se lavó dos veces con Triton X-100 al 0,1 %. Entonces, se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente (Tabla 3). Finalmente, se tiñó el núcleo celular con DAPI.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la inmunofluorescencia.

Anticuerpos primarios			
Anticuerpo	Características	Dilución	Referencia
Anti-Beta-III-Tubulina	Policlonal conejo	1:1000	abcam ab18207
Anti-Tirosina Hidroxilasa	Policlonal conejo	1:100	Sigma-Aldrich T8700
Anticuerpos secundarios			
Anticuerpo	Características	Dilución	Referencia
Alexa Fluor 488	Policlonal cabra	1:1000	Termo Scientific R37116
Alexa Fluor 594	Policlonal cabra	1:1000	Termo Scientific A32740

Para captar las imágenes se utilizó EVOS™ FLoid™ Cell Imaging Station de ThermoFisher Scientific, que permite obtener las imágenes directamente de la placa de cultivo.

4.4.2. Citometría de flujo

Tras la tripsinización de las células sometidas a diferenciación, se realizó un lavado con PBS y se añadieron 200 µl de paraformaldehído al 4 % durante 15 min a 4 °C con el objetivo de fijar el contenido celular. Posteriormente, se lavó con PBS y se centrifugó (Eppendorf Mini Spin® PLUS) a 5000 rpm durante 4 min. El pellet celular se resuspendió en 200 µl de tampón de permeabilización (1x) (Invitrogen) con el anticuerpo primario correspondiente y se incubó a 4 °C durante la noche (Tabla 4). Tras la incubación, se lavó con PBS y se centrifugó 4 min a 5000 rpm. Entonces, se añadió el anticuerpo secundario (Tabla 4), igualmente diluido en 200 µl de tampón de permeabilización (1x), para incubar durante 1 h a temperatura ambiente protegido de la luz. Por último, se añadió PBS para lavar y se centrifugó a 5000 rpm durante 4 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en PBS para analizar en el citómetro.

Las muestras fueron analizadas en el servicio de citometría del CIBA. El canal del citómetro utilizado fue FL1, en base a la excitación (488 nm) y a la emisión (525 nm) del anticuerpo secundario.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas por citometría de flujo.

Anticuerpos primarios			
Anticuerpo	Características	Dilución	Referencia
Anti-Beta-III-Tubulina	Policlonal conejo	1:1000	abcam ab18207
Anti-Tirosina Hidroxilasa	Policlonal conejo	1:100	Sigma-Aldrich T8700
Anticuerpos secundarios			
Anticuerpo	Características	Dilución	Referencia
Alexa Fluor 488	Policlonal cabra	1:1000	Termo Scientific R37116

4.5. Consumo de oxígeno en células intactas

El principio de la respirometría señala que una muestra celular que consume el oxígeno presente en una cámara cerrada hará disminuir la concentración del mismo, y si se representa esta disminución frente al tiempo, se puede obtener la velocidad de consumo de oxígeno.⁴¹

El consumo de oxígeno se midió con un oxígrafo de alta resolución (Oroboros®). Las características del oxígrafo de alta resolución permiten medir velocidades de consumo de oxígeno con muy poca difusión del mismo y con una gran estabilidad de las señales, a diferencia de otros métodos. El oxígrafo está asociado al software DatLab utilizado para la adquisición y análisis de datos.

Para esta técnica se recogieron células sometidas a diferenciación, que se tripsinizaron y se centrifugaron a 378 xg durante 5 min. A continuación, se contaron y el pellet celular obtenido se diluyó de forma que en 2 ml (volumen introducido en la cámara de medida) hubiera 1×10^6 de células/ml. Después de introducir la muestra, se cerró la cámara y, tras estabilizarse el flujo, se obtuvo la respiración endógena o basal. Por último, se determinó la respiración no dependiente de cadena respiratoria, inhibiendo el complejo IV con KCN.

4.6. *Análisis de proteínas*

4.6.1. Extracción de proteína total

Tras la tripsinización y la centrifugación de las células tratadas, se recogió el pellet celular y se lavó con PBS para su almacenamiento a -80 °C hasta su uso.

Para la extracción de la proteína total, el pellet se homogeneizó con tampón de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0,5 % Na-deoxicolato, 5 mM EDTA, 1 % Tritón X-100) junto con inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich), para evitar la digestión de las proteínas por enzimas celulares. El homogenado se incubó durante 15 min a 4 °C en una rueda giratoria para conseguir romper correctamente las membranas celulares con el detergente. Entonces, la muestra se centrifugó (MPW-150R, MPW MED. INSTRUMENTS) a 13000 rpm 15 min a 4 °C para separar los restos celulares. Finalmente, se recuperó el sobrenadante para congelar a -80 °C hasta su análisis.

4.6.2. Cuantificación de proteína total por espectrofotometría. Método de Bradford

La cuantificación de proteínas totales se realizó por espectrofotometría, empleando el método de Bradford. Esta técnica permite medir la cantidad de proteínas, mediante una reacción colorimétrica con reactivo Bradford (Bio-Rad), para calcular la cantidad de muestra necesaria en las técnicas de detección de proteínas. Para ello, se realizó una recta patrón con una serie de diluciones de concentración conocida de BSA (albúmina sérica bovina) (Sigma-Aldrich) que permitió relacionar la concentración proteica con la absorbancia (Tabla 5).

Tabla 5. Cantidades necesarias para las diluciones de BSA para la recta de calibrado.

Concentración BSA (mg/ml)	Volumen agua (μ l)	Volumen BSA (μ l)
Blanco	1000	0
0,05	950	50
0,1	900	100
0,2	800	200
0,3	700	300
0,4	600	400
0,5	500	500

En una placa de 96 pocillos se añadieron por triplicado 10 μ l por pocillo tanto de las muestras como de las diluciones estándar de la recta patrón. Entonces, se adicionaron 200 μ l de reactivo Bradford diluido con agua destilada en proporción 1:5. Tras incubar durante 5 min en ausencia de luz, se determinaron las absorbancias a 595 nm en el lector Novostar (BMG-Labtech).

Al representar los valores de absorbancia de las diluciones estándar frente a la concentración de BSA, se obtiene una recta patrón que permite interpolar los datos obtenidos de las muestras problema para determinar su concentración, teniendo en cuenta el factor de dilución de las mismas.

4.6.3. Western Blot

Preparación de muestras para cargar en gel. A partir del cálculo de la concentración proteica realizado mediante Bradford, se determinó el volumen de muestra a cargar según la cantidad de proteína deseada (20-60 µg de proteína). Entonces, se preparó una mezcla 1:1 de la muestra con tampón de carga 2x (62,5 mM Tris-HCl, 2 % SDS, 25 % glicerol, 0,01 % azul de bromofenol, 355 mM β-mercaptoetanol). Antes de cargar las muestras, se incubó durante 5 min a 98 °C y se centrifugó durante 15 s.

Electroforesis desnaturalizante de proteínas en gel SDS-PAGE. Para el proceso de electroforesis, se utilizaron geles de poliacrilamida 4-15 % comerciales (Mini-PROTEAN® TGX™ Gels, Bio-Rad) con el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). Tras llenar la cubeta con tampón de electroforesis (2,5 mM Tris-HCl, 19,2 mM glicina; 0,01 % SDS), se cargaron las muestras junto con el marcador de pesos moleculares (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad). Finalmente, la electroforesis se realizó a 50 V hasta que las muestras alcanzaron el gel separador, momento en que se aumentó el voltaje a 200 V hasta que las muestras llegaron a la parte inferior del gel.

Transferencia a membrana PVDF. Tras el proceso de separación proteica, se procedió a la transferencia semi-seca de dichas proteínas desde el gel de electroforesis a la membrana de PVDF mediante el sistema Trans-Blot® Turbo™ Transfer (Bio-Rad). Para ello, se desmontó el sistema de electroforesis y se separó el casete para sacar el gel, del cual se eliminó la parte superior correspondiente a los pocillos de carga. Con los paquetes Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs (Bio-Rad) se preparó el sándwich que se colocó dentro del cassette. Finalmente, se introdujo en el sistema para realizar la transferencia usando el programa MIXED MW para proteínas de peso molecular entre 5 y 150 kDa.

Bloqueo e inmunodetección. Al finalizar la transferencia, se procedió a desmontar el sistema para obtener la membrana, la cual se trató con 5 % leche en PBS durante 1 h a temperatura ambiente con el fin de bloquear la superficie de membrana restante y evitar uniones inespecíficas.

Tras el bloqueo, se incubó overnight a 4 °C en 1 % leche en PBS-Tween20 0,1 % con el anticuerpo primario para la proteína de interés (Tabla 6). La membrana se sometió a tres lavados cada uno de 5 min en PBS-Tween20 0,1% para eliminar posibles restos de anticuerpo primario. Posteriormente, se incubó tapado con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente en 0,1 % leche en PBS-Tween20 0,1 % (Tabla 6). La membrana se sometió a dos lavados cada uno de 5 min en PBS-Tween20 0,1 % y a otro lavado de 10 min de PBS para evitar las posibles interferencias del detergente Tween20 en el revelado. Todas las incubaciones se realizaron en agitación.

Tabla 6. Anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas por Western blot.

Anticuerpos primarios			
Anticuerpo	Características	Dilución	Referencia
Anti-Beta-III-Tubulina	Policlonal conejo	1:1000	abcam ab18207
Anti-Tirosina Hidroxilasa	Policlonal conejo	1:100	Sigma-Aldrich T8700
Anti-Alfa Sinucleína	Monoclonal Ratón	1:100	Abcam ab27766
Anti-Tau	Monoclonal Ratón	1:100	ThermoFisher Scientific MN1000
Anti-Phospho-Tau (Thr231)	Monoclonal Ratón	1:100	ThermoFisher Scientific MN1040
Anti-Beta-Actina	Monoclonal Ratón	1:1000	Sigma-Aldrich A5441
Anti-Beta-Tubulina	Monoclonal Ratón	1:1000	Sigma-Aldrich T0198
Anticuerpos secundarios			
Anticuerpo	Características	Dilución	Referencia
Anti-conejo IgG DyLight 680	Cabra	1:15000	ThermoFisher Scientific 35568
Anti-ratón IgG DyLight 800	Cabra	1:15000	ThermoFisher Scientific SA5-35521
Anti-ratón IgG DyLight 680	Cabra	1:15000	ThermoFisher Scientific 35518

Revelado. Para el revelado de la membrana, se utilizó el sistema de imágenes Odyssey[®] que utiliza dos canales fluorescentes infrarrojos (700 y 800 nm) para la detección y el análisis simultaneo de proteínas. Tras obtener las imágenes, las bandas fueron cuantificadas con el programa ImageJ versión 2.0.

4.7. *Análisis estadístico*

El análisis estadístico se realizó con el programa StatView 5.0. donde se utilizó el test no paramétrico Mann Whitney. Se estableció un valor de p menor a 0,05 para determinar diferencias significativas entre las muestras.

5. RESULTADOS

5.1. *Diferenciación neuronal dopaminérgica de la línea SH-SY5Y*

Previamente al desarrollo de los experimentos, en el laboratorio se había confirmado que efectivamente la línea celular utilizada se trataba de la línea SH-SY5Y. Para ello la autenticación de esta línea celular se llevó a cabo mediante la realización de perfiles short tandem repeat (STR), consistente en el análisis de secuencias cortas en tándem altamente polimórficas dispersadas por el genoma (Anexo 1).

5.1.1. **Análisis de morfología neuronal**

Para tratar de reproducir las condiciones patológicas de las enfermedades estudiadas, durante el trabajo, los experimentos se han realizado con las distintas líneas celulares diferenciadas a neuronas, concretamente a neuronas dopaminérgicas. Como consecuencia de la diferenciación hacia neurona, la célula disminuye su tasa de crecimiento y cambia su morfología, creando proyecciones desde el soma denominadas neuritas. Estas neuritas, ya sean dendritas o axones, se pueden observar fácilmente al microscopio (Figura 4).

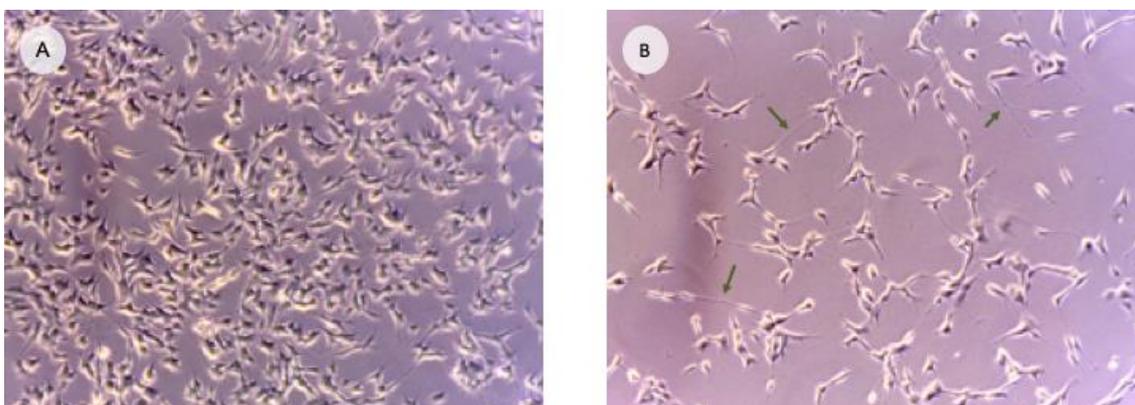


Figura 4. Imágenes de células SH-SY5Y sin diferenciar (A) y diferenciadas a neurona dopaminérgica (B). Con las flechas verdes se señalan las neuritas.

5.1.2. Análisis de marcadores neuronales y dopaminérgicos

Además del análisis morfológico, se estudiaron marcadores neuronales y dopaminérgicos mediante inmunofluorescencia (Figura 5), y citometría de flujo (Figura 6). Los marcadores utilizados fueron la β III-tubulina (TUBB3) que forma parte de los microtúbulos para guiar y mantener los axones neuronales, y la tirosina hidroxilasa (TH) que es específica de neurona dopaminérgica, ya que se trata de la enzima limitante en la síntesis de dopamina.

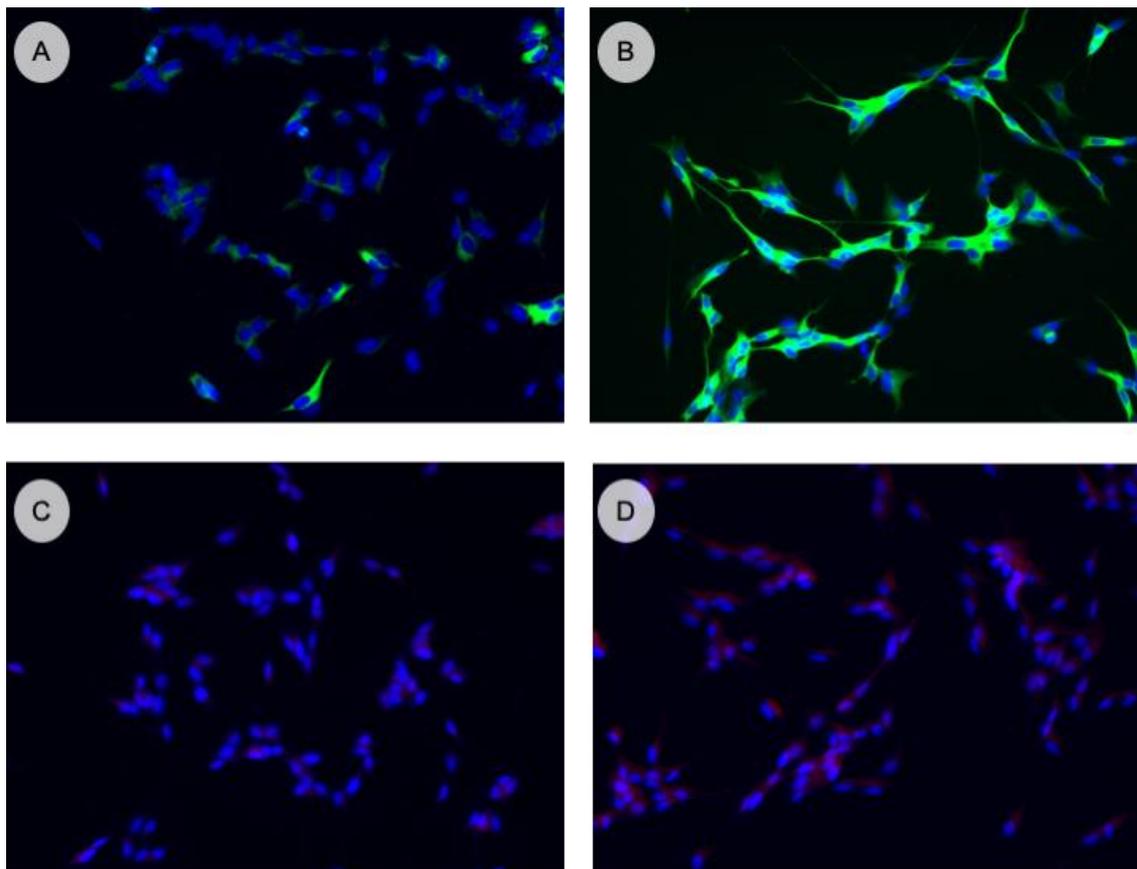


Figura 5. Imágenes de la inmunofluorescencia en células SH-SY5Y. Células sin diferenciar (A) y diferenciadas (B) marcadas con anti-TUBB3. Células sin diferenciar (C) y diferenciadas (D) marcadas con anti-TH.

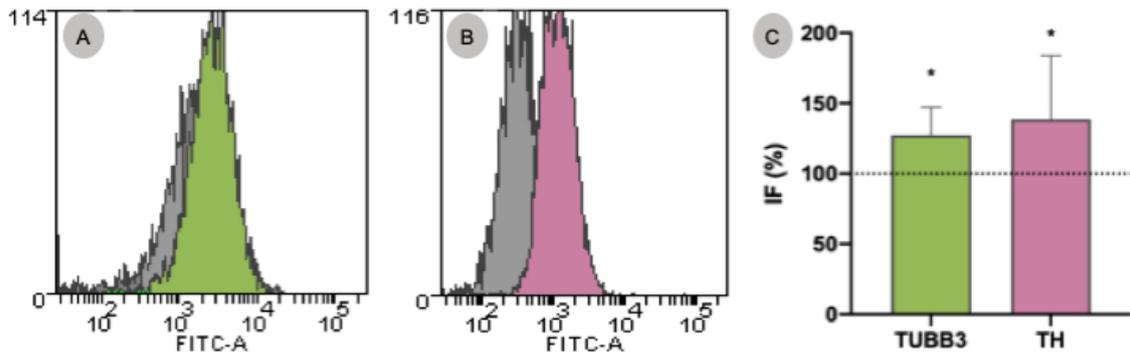


Figura 6. Niveles de marcadores neuronales de la línea celular SH-SY5Y analizados mediante citometría de flujo. Se muestran imágenes representativas de los histogramas (A y B) y una gráfica de la media de intensidad de fluorescencia (IF) (C) tanto de la TUBB3 (verde) como de la TH (rosa) de las células diferenciadas respecto a las sin diferenciar (gris). La media de los valores de IF de las células sin diferenciar se considera el 100 %, representado en la gráfica por una línea discontinua. Los valores de las medias de la IF fueron obtenidos de 9 experimentos independientes y analizados mediante el test de Mann Whitney, * $p < 0,05$ (D vs SD).

Como se puede observar en las imágenes, la intensidad de fluorescencia tanto para la TUBB3 como para la TH aumentó en las células diferenciadas a neuronas dopaminérgicas (Figura 5). Igualmente, mediante citometría, se confirmaron estos resultados al obtenerse incrementos significativos ($p = 0,0005$) para ambas proteínas en las células diferenciadas respecto a las sin diferenciar (Figura 6).

5.2. Análisis de la disfunción mitocondrial en células tratadas

Para corroborar que efectivamente el tratamiento con drogas estaba provocando un fallo en el funcionamiento del sistema OXPHOS y, por consiguiente, una disfunción mitocondrial, se realizó el análisis del consumo de oxígeno de las células tratadas mediante respirometría de alta resolución.

Como se observa en la Figura 7, las células diferenciadas tratadas presentan una disminución en el consumo de oxígeno respecto a las células SH-SY5Y diferenciadas, no tratadas. Por tanto, se confirma que el tratamiento con las tres drogas empleadas provoca una disminución de la eficiencia de la cadena respiratoria mitocondrial.

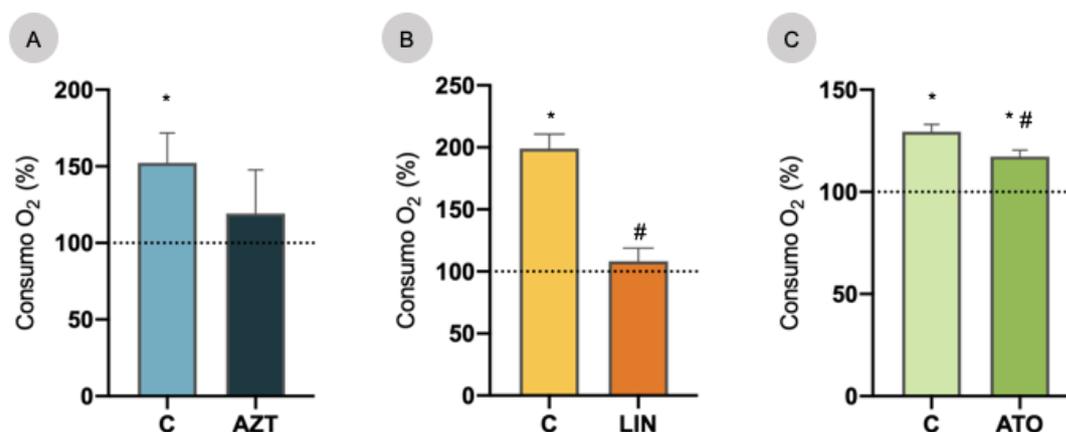


Figura 7. Porcentaje del consumo de oxígeno de la línea SH-SY5Y utilizada como control (C) y de las células tras los tratamientos con AZT (A), LIN (B) y ATO (C). En todos los casos, las barras representan las células diferenciadas. La media de los valores de las células sin diferenciar se considera el 100 %, representados en la gráfica por una línea discontinua. Los valores de las medias fueron obtenidos de 3 experimentos independientes para cada droga y analizados mediante el test de Mann Whitney. * $p < 0,05$ (D vs. SD); # $p < 0,05$ (D-C vs. D tratadas).

En las líneas mutantes, generadas con anterioridad en el laboratorio, ya se había confirmado la expresión de los genes introducidos mediante transfección en la línea SH-SY5Y. Los niveles de mRNA de dichos genes eran considerablemente superiores a los niveles de mRNA de sus correspondientes genes endógenos (Anexo 2). En este caso, también disminuyó el consumo de oxígeno, lo que corrobora que las líneas mutantes presentan fallos en el sistema OXPHOS (Anexo 2).

5.3. Expresión de la proteína TAU

La proteína TAU se encuentra expresada de forma abundante en las neuronas debido a su participación en el crecimiento, la forma y la polaridad neuronal y en el transporte axonal.

En primer lugar, se analizó la presencia de dicha proteína en células SH-SY5Y. Como se observa en el análisis por Western blot (Figura 8), aparece un bandeo que podría deberse a isoformas descritas de la proteína tau.⁴² En concreto, aparece una banda a 25 kDa con una intensidad considerablemente mayor al resto y otra leve banda en torno a unos 60 kDa. Al realizar la cuantificación, no se determinan diferencias significativas entre las células sin diferenciar y las diferenciadas (Figura 8).

Posteriormente, se analizó el efecto de las mutaciones en los genes de proteínas con función mitocondrial y de las drogas empleadas (Figura 9). En este caso, a pesar de la disfunción mitocondrial provocada, se obtiene el mismo patrón en todas las condiciones patológicas respecto al control.

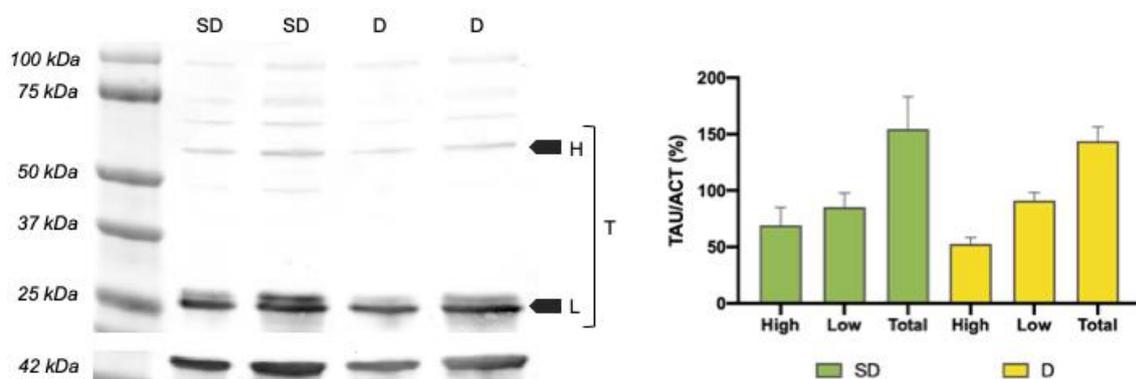


Figura 8. Expresión de tau y β -actina (42 kDa) analizada por Western blot. Cuantificación de la intensidad de las bandas de tau normalizadas por β -actina. H: High, L: Low, T: Total.

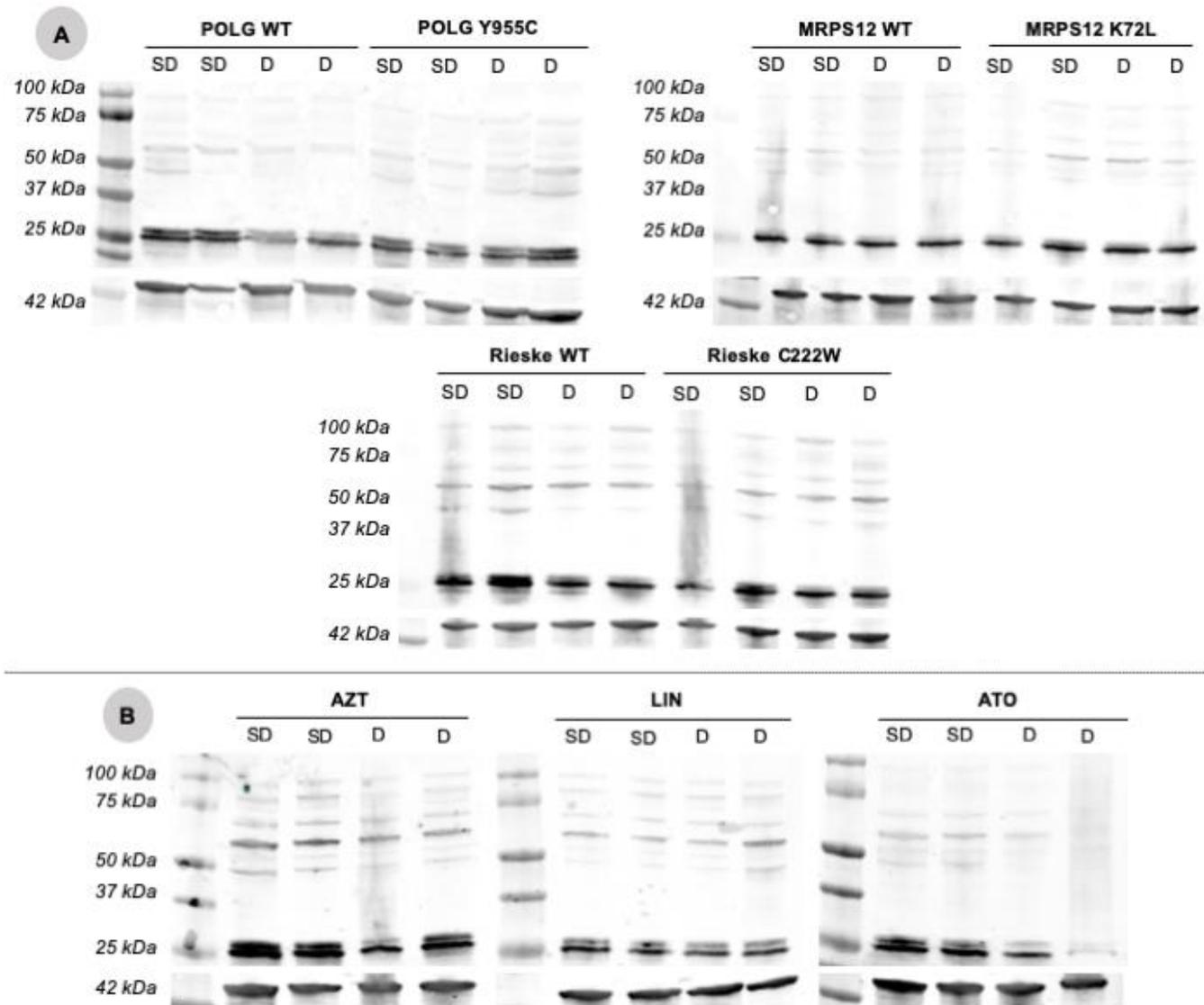


Figura 9. Expresión de tau y β -actina (42 kDa) en las distintas líneas transfectadas (A) y los tratamientos con drogas (B).

Durante la patología de la AD se produce una acumulación de tau hiperfosforilada. La agregación de esta forma de la proteína lleva a la formación de ovillos neurofibrilares que resultan tóxicos para las células. Por ello, se decidió evaluar la presencia de tau fosforilada.

Al analizar la proteína tau fosforilada en la línea SH-SY5Y, se observa únicamente una banda entre 37 y 50 kDa (Figura 10). Esta puede deberse a alguna de las isoformas de tau que concuerdan con el peso molecular obtenido.^{43,44} Igualmente, no se observan diferencias significativas entre la cuantificación de las células sin diferenciar y las diferenciadas (Figura 10).

Por otro lado, al comparar con las líneas mutantes y las tratadas se muestra un nuevo patrón (Figura 11). Concretamente, en casi todas las condiciones aparece una banda aproximadamente a 25 kDa, y en algunos casos aparece otra banda a la altura de 50 kDa y desaparece la banda inicial encontrada en el control.

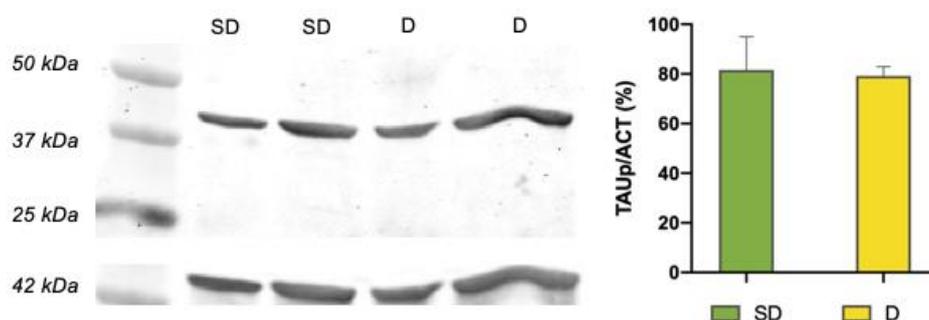


Figura 10. Expresión de tau fosforilada y β -actina (42 kDa) analizada por Western blot. Cuantificación de la intensidad de las bandas de tau fosforilada normalizadas por β -actina.

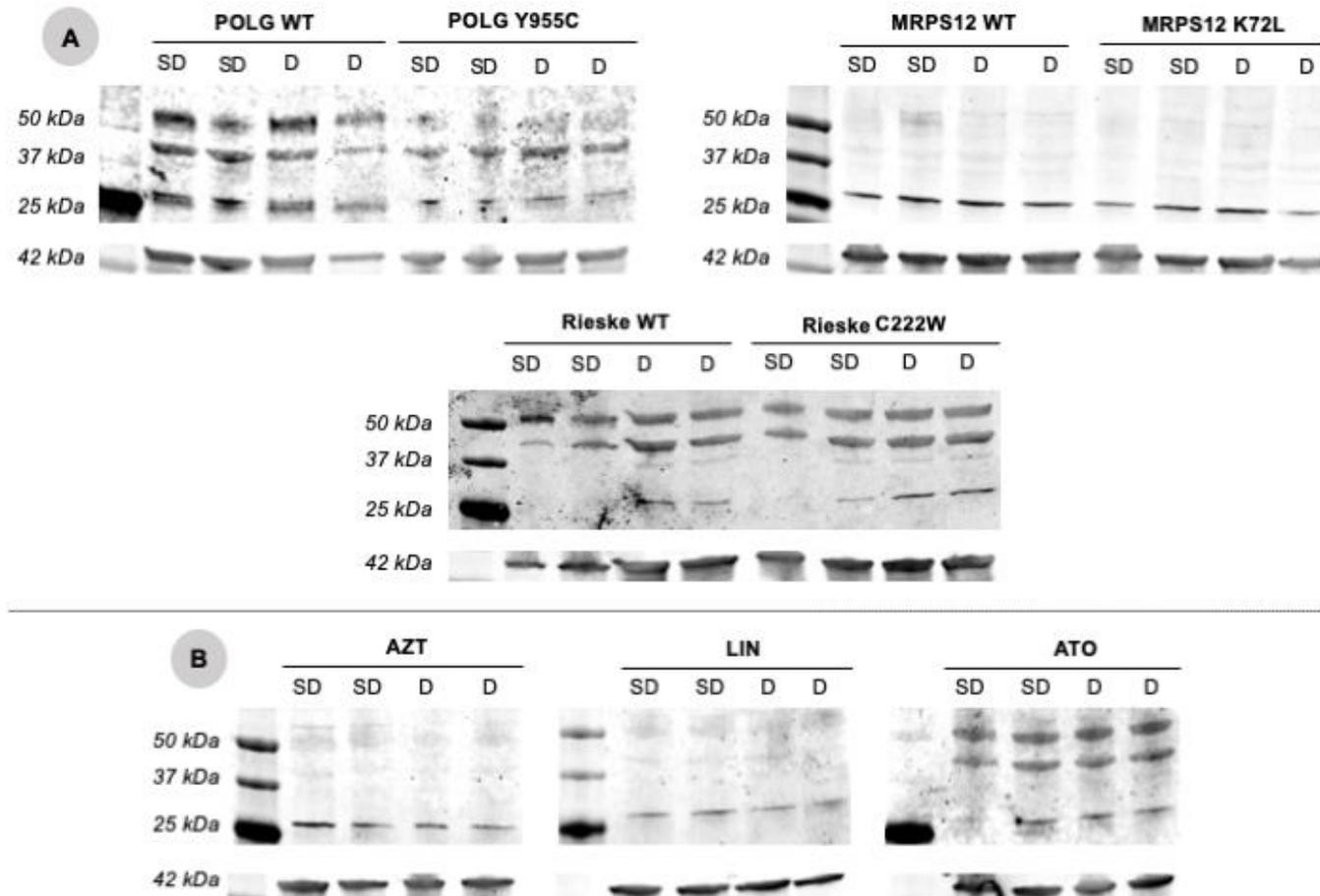


Figura 11. Expresión de tau fosforilada y β -actina (42 kDa) en las distintas líneas transfectadas (A) y los tratamientos con drogas (B).

5.4. Expresión de la proteína α -sinucleína

La proteína α -sinucleína está implicada en la liberación de neurotransmisores, la dinámica vesicular y el transporte axonal, por lo que se localiza en gran cantidad en los terminales sinápticos de las neuronas. En la PD la α -sinucleína forma agregados tóxicos conocidos como cuerpos de Lewy.

El análisis de α -sinucleína en la línea SH-SY5Y mediante Western blot muestra una banda entre 37 y 50 kDa. Al cuantificar las bandas, no se observan diferencias entre las células sin diferenciar y diferenciadas (Figura 12).

Al analizar la expresión en las líneas transfectadas se observa un patrón de bandeo diferente (Figura 13A). Aparecen nuevas bandas de mayor peso molecular lo que podría indicar la formación de oligómeros de orden superior. Cabe destacar que en el caso de las líneas transfectadas control, es decir, las líneas transfectadas con genes wild-type de las proteínas a mutar, también aparecen estas nuevas bandas. Esto podría poner en duda la hipótesis de la disfunción mitocondrial como promotora de la deposición tóxica de proteínas.

En cambio, en las células tratadas con drogas las bandas muestran la misma pauta que las líneas mutantes (Figura 13B). En este caso, las células tratadas efectivamente presentan fallos en el sistema OXPHOS y en el funcionamiento de la mitocondria.

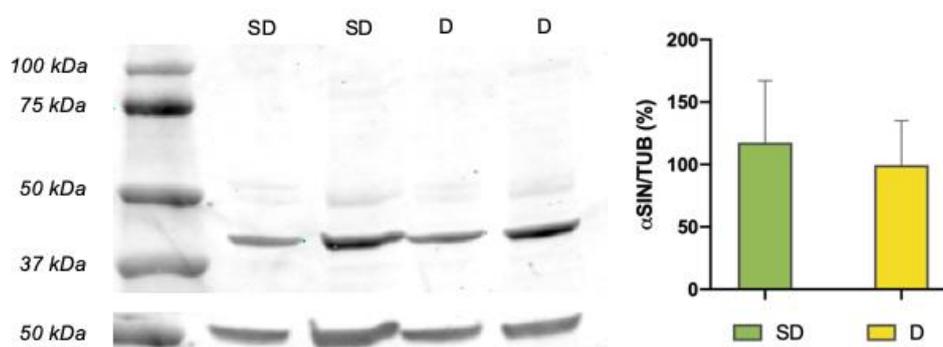


Figura 12. Expresión de α -sinucleína y β -tubulina (50 kDa) analizada por Western blot. Cuantificación de la intensidad de las bandas de α -sinucleína normalizadas por β -tubulina.

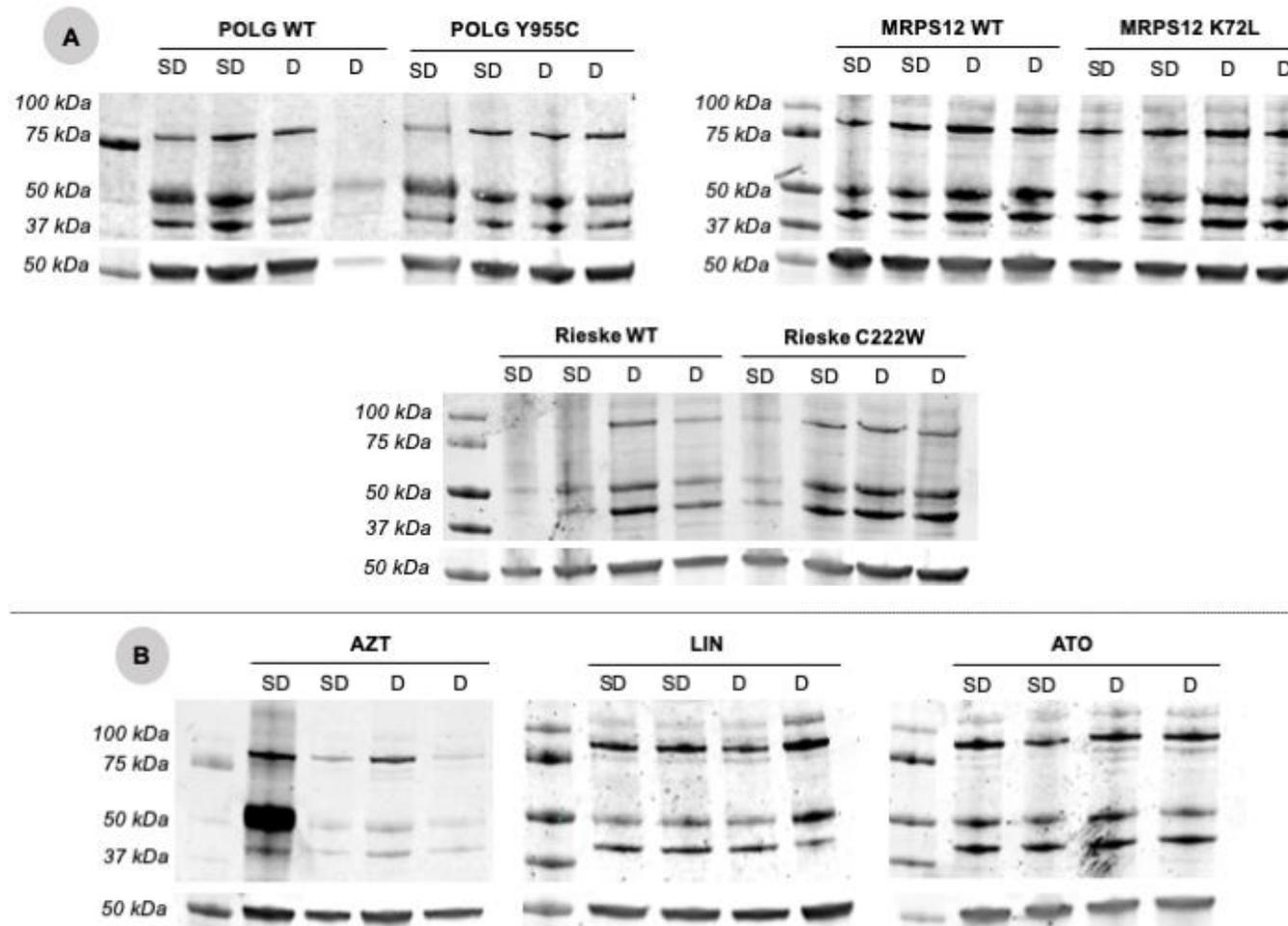


Figura 13. Expresión de α -sinucleína y β -tubulina (50 kDa) en las distintas líneas transfectadas (A) y los tratamientos con drogas (B).

6. DISCUSIÓN

6.1. *Modelo neuronal con disfunción mitocondrial*

Para estudiar la influencia de la mitocondria en la AD y la PD se quiso desarrollar un modelo neuronal mediante la diferenciación de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y a neurona dopaminérgica. Durante la diferenciación se evidenciaron cambios morfológicos y bioquímicos como consecuencia de la especialización celular. Concretamente, se produjo una extensión de las neuritas y se aumentó la expresión de marcadores neuronales y dopaminérgicos, TUBB3 y TH, respectivamente. Varios autores han encontrado que la diferenciación conduce a un aumento de expresión de estos marcadores, además de otras proteínas específicas de neurona.⁴⁵⁻⁴⁸ Los resultados sugieren que el protocolo de diferenciación utilizado consigue producir poblaciones de neuronas dopaminérgicas homogéneas con características similares a las neuronas primarias.

Para analizar el efecto de la disfunción mitocondrial sobre la acumulación de proteínas en la AD y la PD. Se decidió utilizar azidotimidina, linezolid y atovacuona que son drogas que interfieren en procesos mitocondriales como la replicación, la traducción y la ETC, respectivamente. Actualmente, estas drogas se administran a la población para el tratamiento de diversas enfermedades como son el SIDA, la tuberculosis multiresistente y la malaria. La finalidad era provocar un fallo mitocondrial que condujera a una deficiencia del sistema OXPHOS. Ya se han descrito diversas alteraciones del sistema OXPHOS provocadas por el tratamiento de estas drogas. En concreto se ha observado la disminución de niveles y actividades de los complejos de la ETC y de la capacidad de consumo de oxígeno en cultivos celulares, modelos animales e, incluso, en biopsias de pacientes tratados con dichos fármacos.⁴⁹⁻⁵⁵ Para confirmar el deterioro mitocondrial se analizó el consumo de oxígeno de las células tratadas mediante respirometría evidenciando que, tras el tratamiento con las drogas, las células diferenciadas presentaban una disminución en el consumo de oxígeno basal respecto a las células no tratadas.

6.2. *Expresión de proteínas*

La AD y la PD son consideradas proteinopatías neurodegenerativas donde se produce la acumulación tóxica de tau y α -sinucleína, respectivamente. Por tanto, para reproducir con mayor fidelidad la patología de las enfermedades, la línea celular utilizada se diferenció a neurona dopaminérgica.

Se evaluó la expresión de ambas proteínas entre las células sin diferenciar y diferenciadas. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los niveles de proteínas de las células diferenciadas respecto a las sin diferenciar. Otros autores también han descrito que la expresión de estas proteínas no sufre cambios asociados a la diferenciación.⁴⁷ En contraste con nuestros resultados, existen evidencias de un aumento de la expresión de estas proteínas en células diferenciadas a neurona.⁴⁴ Aunque ambas tienen funciones asociadas a neuronas maduras, por lo cual se esperaría un aumento de la expresión en las células diferenciadas, otras de sus funciones no son específicas de neurona. Por tanto, es posible que las condiciones de diferenciación y el tiempo de cultivo de las células influyan en la expresión diferencial de tau y α -sinucleína.

Existen algunas evidencias de que la exposición a inhibidores mitocondriales conduce a la hiperfosforilación y agregación de tau y a la oligomerización de α -sinucleína.¹⁴⁻²⁰

Al analizar la expresión de tau bajo condiciones patológicas, es decir, en condiciones de disfunción mitocondrial provocada por mutantes o drogas, no se observaron cambios en la expresión de la proteína. El patrón obtenido presenta diversas bandas de pesos moleculares variados. Otros autores han descrito la aparición de este bandeo, que refleja la variedad de isoformas de la proteína tau en humanos.^{47,56} En cambio, al evaluar la presencia de la proteína tau fosforilada, en algunos casos aparecen nuevas bandas que sugieren un efecto de la alteración del sistema OXPHOS sobre la hiperfosforilación de dicha proteína.

Cabe destacar que tau posee 79 posibles sitios de fosforilación de serina y treonina en la isoforma más larga, de los cuales se han verificado en torno a la mitad.⁵⁷ Cuales de todos ellos resultan fosforilados en el inicio o durante el desarrollo de la AD todavía está sin resolver. Teniendo en cuenta estas observaciones, junto con las distintas isoformas y la gran cantidad de modificaciones postraduccionales que puede sufrir, la proteína tau presenta una heterogeneidad bastante compleja.⁴²

En general, el peso molecular de las bandas de tau no se corresponde con el peso molecular esperado de acuerdo con los anticuerpos utilizados, ya que estos deberían reconocer una de las isoformas de 79 kDa. En muchos casos, los análisis con estos anticuerpos han mostrado bandas de diferente peso molecular.⁵⁸⁻⁶² De hecho, existen otras isoformas de tau las cuales poseen pesos moleculares variados, entre 30 y 80 kDa (Código Uniprot: P10636). Además, la revisión del estado actual del análisis de tau resulta complicada debido a la falta de concreción en los pesos moleculares de las bandas descritas.⁶³⁻⁶⁵ Por tanto, no se puede confirmar que las bandas se corresponden con la proteína de interés. Así pues, para poder identificar con seguridad la naturaleza de estas, se va a realizar el análisis proteómico.

Finalmente, se analizó la expresión de α -sinucleína en los diversos modelos patológicos. En ningún caso aparece el monómero de la proteína descrito en torno a 14 kDa, aunque otros autores ya han manifestado la dificultad para detectar el monómero de α -sinucleína endógena mediante inmunotransferencia.^{66,67} A pesar de ello, la disfunción mitocondrial conlleva a la aparición de bandas respecto a la línea SH-SY5Y control. Este patrón con nuevas bandas, de peso molecular superior a la banda del control SH-SY5Y, puede indicar la presencia de oligómeros de α -sinucleína o la presencia de modificaciones postraduccionales propiciadas por la disfunción del sistema OXPHOS.⁶⁸

Al examinar la implicación de la disfunción mitocondrial generada en las líneas transfectadas tanto con el gen wild-type como con el gen mutante se observan los mismos cambios en el patrón de bandas de las proteínas. Estos resultados podrían indicar que la disfunción mitocondrial no es la responsable de la aparición de bandas. Por tanto, los cambios en las células transfectadas podrían deberse a alteraciones en la mitocondria provocadas por la sobreexpresión de proteínas mitocondriales, a pesar de no ser proteínas mutantes.

En cambio, al analizar los resultados de las células tratadas con drogas, en las cuales se ha confirmado la afectación del sistema OXPHOS, también se aprecian cambios en las bandas observadas. En definitiva, estos resultados confirman que efectivamente la disfunción mitocondrial conduce a una alteración en la expresión de las proteínas.

7. CONCLUSIONES Y CONCLUSIONS

Conclusiones

- Se consiguió generar un modelo neuronal mediante la diferenciación de la línea SH-SY5Y a neurona dopaminérgica. Además, se confirmó que el tratamiento con las distintas drogas afecta al sistema OXPHOS. Por tanto, se obtuvo un modelo neuronal con disfunción mitocondrial para el estudio de la AD y PD.
- Se determinaron cambios en los patrones de expresión de la proteína tau fosforilada en algunos tratamientos y líneas mutantes. Estos resultados parecen relevantes, ya que la proteína tau hiperfosforilada conlleva a la formación de ovillos neurofibrilares en la AD.
- Se confirmó la aparición de nuevas bandas de mayor peso molecular en el análisis de α -sinucleína en todas las líneas tratadas y mutantes. Estas bandas podrían indicar la formación de oligómeros de la proteína o de modificaciones postraduccionales bajo condiciones de disfunción mitocondrial.

Conclusions

- It was possible to generate a neuronal model by differentiating the SH-SY5Y line from a dopaminergic neuron. In addition, it was confirmed that treatment with different drugs affects the OXPHOS system. Therefore, a neuronal model with mitochondrial dysfunction was obtained for the study of AD and PD.
- Changes were determined in expression patterns of phosphorylated tau protein in some treatments and mutant lines. These results seem relevant, since hyperphosphorylated tau protein leads to the formation of neurofibrillary tangles in AD.
- New bands of higher molecular weight appeared in the analysis of α -synuclein in every treated and mutant lines. These bands could indicate the formation of oligomers or post-translational modifications of this protein under mitochondrial dysfunction conditions.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Kawamata, H. & Manfredi, G. Proteinopathies and OXP HOS dysfunction in neurodegenerative diseases. *J. Cell Biol.* **216**, 3917–3929 (2017).
2. Briston, T. & Hicks, A. R. Mitochondrial dysfunction and neurodegenerative proteinopathies: mechanisms and prospects for therapeutic intervention. *Biochem. Soc. Trans.* **46**, 829–842 (2018).
3. Fukuyama, R., Hatanpää, K., Rapoport, S. I. & Chandrasekaran, K. Gene expression of ND4, a subunit of complex I of oxidative phosphorylation in mitochondria, is decreased in temporal cortex of brains of Alzheimer's disease patients. *Brain Res.* **713**, 290–293 (1996).
4. Eckert, A. *et al.* Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1627–1634 (2003).
5. Swerdlow, R. H. & Khan, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: An update. *Exp. Neurol.* **218**, 308–315 (2009).
6. López-Gallardo, E., Iceta, R., Iglesias, E., Montoya, J. & Ruiz-Pesini, E. OXPHOS toxicogenomics and Parkinson's disease. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **728**, 98–106 (2011).
7. Subramaniam, S. R. & Chesselet, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* **106–107**, 17–32 (2013).
8. Grünewald, A., Kumar, K. R. & Sue, C. M. New insights into the complex role of mitochondria in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* **177**, 73–93 (2019).
9. Prasad, K. N. *et al.* Multiple antioxidants in the prevention and treatment of Alzheimer disease: Analysis of biologic rationale. *Clin. Neuropharmacol.* **23**, 2–13 (2000).
10. Lin, M. T. & Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 787–795 (2006).
11. Masters, C. L. *et al.* Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 15056 (2015).
12. Ganguly, G., Chakrabarti, S., Chatterjee, U. & Saso, L. Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: Cross talk in alzheimer's disease and parkinson's disease. *Drug Des. Devel. Ther.* **11**, 797–810 (2017).
13. Langston, J. W. *et al.* Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann. Neurol.* **46**, 598–605 (1999).
14. Chaves, R. S., Melo, T. Q., Martins, S. A. & Ferrari, M. F. R. Protein aggregation containing beta-amyloid, alpha-synuclein and

- hyperphosphorylated tau in cultured cells of hippocampus, substantia nigra and locus coeruleus after rotenone exposure. *BMC Neurosci.* **11**, (2010).
15. Sherer, T. B. *et al.* An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J. Neurosci.* **22**, 7006–15 (2002).
 16. Lee, H. J., Shin, S. Y., Choi, C., Lee, Y. H. & Lee, S. J. Formation and removal of α -synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. *J. Biol. Chem.* **277**, 5411–5417 (2002).
 17. Lee, S. α -Synuclein Aggregation: A Link Between Mitochondrial Defects and Parkinson's Disease? *Antioxid. Redox Signal.* **5**, 337–348 (2003).
 18. Hashimoto, M., Rockenstein, E., Crews, L. & Masliah, E. Role of Protein Aggregation in Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *NeuroMolecular Med.* **4**, 21–35 (2003).
 19. Laurencé, C. *et al.* A new human pyridinium metabolite of furosemide, inhibitor of mitochondrial complex I, is a candidate inducer of neurodegeneration. *Biochem. Pharmacol.* **160**, 14–23 (2019).
 20. Escobar-Khondiker, M. *et al.* Annonacin, a Natural Mitochondrial Complex I Inhibitor, Causes Tau Pathology in Cultured Neurons. *J. Neurosci.* **27**, 7827–7837 (2007).
 21. Drew, L. An Age-Old Story. *Nat. Outlook* **559**, S2–S3 (2018).
 22. Rountree, S. D., Atri, A., Lopez, O. L. & Doody, R. S. Effectiveness of antidementia drugs in delaying Alzheimer's disease progression. *Alzheimer's Dement.* **9**, 338–345 (2013).
 23. MP, M. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **430**, 631–9 (2004).
 24. Kawas, C., Gray, S., Brookmeyer, R., Fozard, J. & Zonderman, A. Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease: The Baltimore longitudinal study of aging. *Neurology* **54**, 2072–2077 (2000).
 25. Citron, M. Alzheimer's disease: Strategies for disease modification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 387–398 (2010).
 26. Reddy, P. H. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **1415**, 136–148 (2011).
 27. Silva, D. F., Esteves, A. R., Oliveira, C. R. & Cardoso, S. M. Mitochondria: the common upstream driver of amyloid-beta and tau pathology in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **8**, 563–572 (2011).
 28. Kozlov, S., Afonin, A., Evsyukov, I. & Bondarenko, A. Alzheimer's disease: as it was in the beginning. *Rev. Neurosci.* **28**, 825–843 (2017).

29. Sveinbjornsdottir, S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 318–324 (2016). doi:10.1111/jnc.13691
30. Poewe, W. *et al.* Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **3**, 17013 (2017).
31. McCann, H., Cartwright, H. & Halliday, G. M. Neuropathology of α -synuclein propagation and Braak hypothesis. *Mov. Disord.* **31**, 152–160 (2016).
32. Tysnes, O. B. & Storstein, A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* **124**, 901–905 (2017).
33. Bellucci, A. *et al.* Parkinson's disease: From synaptic loss to connectome dysfunction. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **42**, 77–94 (2016).
34. Lassen, L. B., Reimer, L., Ferreira, N., Betzer, C. & Jensen, P. H. Protein Partners of α -Synuclein in Health and Disease. *Brain Pathol.* **26**, 389–397 (2016).
35. Koprach, J. B., Kalia, L. V. & Brotchie, J. M. Animal models of α -synucleinopathy for Parkinson disease drug development. *Nat. Rev. Neurosci.* **18**, 515–529 (2017).
36. Goedert, M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 492–501 (2001).
37. Oliveri, V. Toward the discovery and development of effective modulators of α -synuclein amyloid aggregation. *Eur. J. Med. Chem.* 10–36 (2019). doi:10.1016/j.ejmech.2019.01.045
38. Perier, C. & Vila, M. Mitochondrial biology and Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, (2012).
39. Surmeier, D. J. Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease. *FEBS J.* **285**, 3657–3668 (2018).
40. Presgraves, S. P., Ahmed, T., Borwege, S. & Joyce, J. N. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox. Res.* **5**, 579–598 (2003).
41. Gnaiger, E., Steinlechner, R., Mendez, G., Eberl, T. & Margreiter, R. Control of Mitochondrial Respiration By Oxygen. *J Bioenerg. Biomembr.* **27**, 583–596 (1995).
42. Hampel, H. *et al.* Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Exp. Gerontol.* **45**, 30–40 (2010).
43. Smith, C. J., Anderton, B. H., Davis, D. R. & Gallo, J. M. Tau isoform expression and phosphorylation state during differentiation of cultured neuronal cells. *FEBS Lett.* **375**, 243–248 (1995).
44. Jämsä, A., Hasslund, K., Cowburn, R. F., Bäckström, A. & Vasänge, M. The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-

- SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 993–1000 (2004).
45. Iglesias, E. Disfunción del sistema de fosforilación oxidativa en la Enfermedad de Parkinson: Desarrollo de un modelo celular. (Universidad de Zaragoza, 2014).
 46. Borland, M. K. *et al.* Chronic, low-dose rotenone reproduces lewy neurites found in early stages of Parkinson's disease, reduces mitochondrial movement and slowly kills differentiated SH-SY5Y neural cells. *Mol. Neurodegener.* **3**, 1–12 (2008).
 47. Agholme, L., Lindström, T., Kgedal, K., Marcusson, J. & Hallbeck, M. An in vitro model for neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J. Alzheimer's Dis.* **20**, 1069–1082 (2010).
 48. Bell, N., Hann, V., Redfern, C. P. F. & Cheek, T. R. Store-operated Ca²⁺ entry in proliferating and retinoic acid-differentiated N- and S-type neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1833**, 643–651 (2013).
 49. Modica-Napolitano, J. S. AZT causes tissue-specific inhibition of mitochondrial bioenergetic function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **194**, 170–177 (1993).
 50. Hobbs, G. A., Keilbaugh, S. A., Rief, P. M. & Simpson, M. V. Cellular targets of 3'-azido-3'-deoxythymidine: an early (non-delayed) effect on oxidative phosphorylation. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 381–390 (1995).
 51. Pereira, L. F., Oliveira, M. B. M. & Carnieri, E. G. S. Mitochondrial sensitivity to AZT. *Cell Biochem. Funct.* **16**, 173–181 (1998).
 52. Petit, C. *et al.* Oxygen consumption by cultured human cells is impaired by a nucleoside analogue cocktail that inhibits mitochondrial DNA synthesis. *Mitochondrion* **5**, 154–161 (2005).
 53. Pacheu-Grau, D. *et al.* Mitochondrial antibiograms in personalized medicine. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1132–1139 (2013).
 54. Abou Hassan, O. K. *et al.* Linezolid toxicity and mitochondrial susceptibility: A novel neurological complication in a lebanese patient. *Front. Pharmacol.* **7**, 1–5 (2016).
 55. Protti, A. *et al.* Changes in whole-body oxygen consumption and skeletal muscle mitochondria during linezolid-induced lactic acidosis. *Crit. Care Med.* **44**, e579–e582 (2016).
 56. Luo, M. H., Tse, S. W., Memmott, J. & Andreadis, A. Novel isoforms of tau that lack the microtubule-binding domain. *J. Neurochem.* **90**, 340–351 (2004).
 57. Johnson, G. V. W. Tau phosphorylation in neuronal cell function and

- dysfunction. *J. Cell Sci.* **117**, 5721–5729 (2004).
58. Neddens, J. *et al.* Phosphorylation of different tau sites during progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* **6**, 52 (2018).
 59. Wang, H. *et al.* Time-course global proteome analyses reveal an inverse correlation between A β burden and immunoglobulin M levels in the APPNL-F mouse model of Alzheimer disease. *PLoS One* **12**, (2017).
 60. Bodea, L. G. *et al.* Accelerated aging exacerbates a pre-existing pathology in a tau transgenic mouse model. *Aging Cell* **16**, 377–386 (2017).
 61. Fitzpatrick, A. W. P. *et al.* Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature* **547**, 185–190 (2017).
 62. Roher, A. E. *et al.* Chemical and neuropathological analyses of an Alzheimer's disease patient treated with solanezumab. *Am. J. Neurodegener. Dis.* **5**, 158–170 (2016).
 63. Hu, X. *et al.* Tau pathogenesis is promoted by A β 1-42 but not A β 1-40. *Mol. Neurodegener.* **9**, 52 (2014).
 64. Joo, I. L. *et al.* Early neurovascular dysfunction in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **7**, 1–14 (2017).
 65. Winston, C. N. *et al.* Dendritic spine loss and chronic white matter inflammation in a mouse model of highly repetitive head trauma. *Am. J. Pathol.* **186**, 552–567 (2016).
 66. Lee, B. R. & Kamitani, T. Improved immunodetection of endogenous α -synuclein. *PLoS One* **6**, (2011).
 67. Preterre, C. *et al.* Optimizing western blots for the detection of endogenous α -synuclein in the enteric nervous system. *J. Parkinsons. Dis.* **5**, 765–772 (2015).
 68. Kalivendi, S. V. *et al.* α -Synuclein Up-regulation and Aggregation during MPP + -induced Apoptosis in Neuroblastoma Cells . *J. Biol. Chem.* **279**, 15240–15247 (2004).

ANEXO

1. Huella genética de la línea SH-SY5Y

Previamente a la realización de los experimentos, para confirmar que la línea utilizada se trataba de la línea SH-SY5Y, en el laboratorio ya se habían comparado los perfiles STR de la línea en cuestión con los encontrados en ATCC. Efectivamente, los perfiles coinciden, por lo que se puede afirmar que la línea empleada es la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

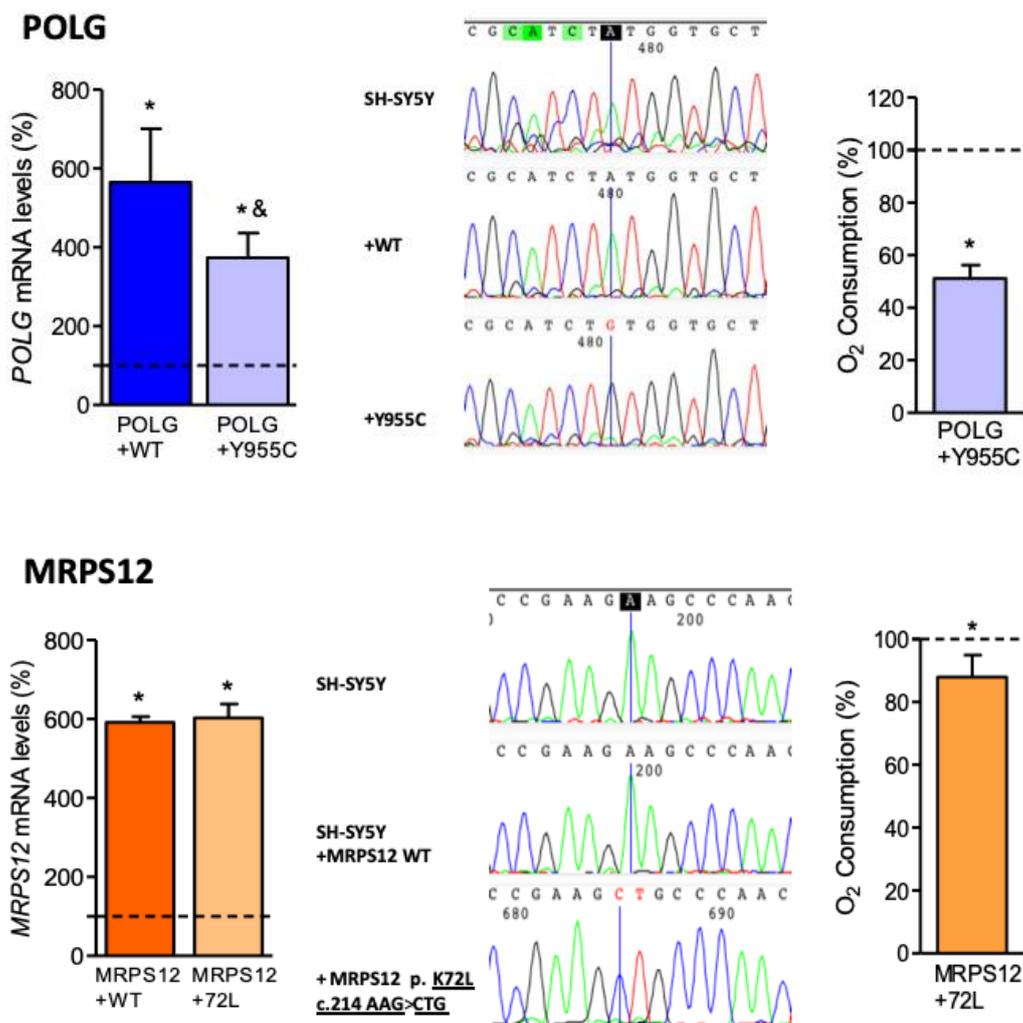
Loci	SH-SY5Y	SH-SY5Y ATCC*
D8S1179	15	-
D21S11	31, 31.2	-
D7S820	7, 10	7, 10
CSF1PO	11	11
D3S1358	15, 16	-
TH01	7, 10	7, 10
D13S317	11	11
D16S539	8, 13	8, 13
D2S1338	17, 19	-
D19S433	13, 14	-
vWA	14, 18	14, 18
TPOX	8, 11	8, 11
D18S51	13, 16	-
AMEL	X, Y	-
D5S818	12	12
FGA	23.2, 24	-

*Perfiles STR encontrados en ATCC

2. Estudio de la disfunción mitocondrial en las líneas mutantes

Tras realizar la transfección, en el laboratorio se analizó la transcripción de los genes transfectados mediante el análisis de los niveles de mRNA. Se puede observar como tanto en los transfectados con el gen wild-type como con el gen mutante, los niveles de mRNA correspondientes a los genes introducidos son significativamente mayores que la transcripción del gen endógeno, considerada el 100 % (* $p < 0,05$). Además, también se secuenciaron confirmando el cambio de las bases de los genes mutantes.

Finalmente, midieron mediante respirometría el consumo de oxígeno en las células mutantes. Efectivamente, la respiración endógena de dichas líneas disminuye significativamente respecto a la línea SH-SY5Y utilizada como control, considerada el 100 % (* $p < 0,05$).



Rieske

