

Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

Anàlisi molecular de gens implicats a la síndrome de Down

M^a Francisca Sánchez-Font
2002

Anàlisi molecular de gens implicats a la síndrome de Down

Memòria presentada per
M^a Francisca Sánchez-Font

per optar al grau de
Doctor en Ciències Biològiques

Tesi realitzada sota la direcció de
la Dra. Roser González-Duarte i de la Dra. Gemma Marfany
al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia
de la Universitat de Barcelona
Programa de Genètica (Bienni 1996-1998)

Roser González-Duarte

Gemma Marfany

M^a Francisca Sánchez-Font

Barcelona, Febrer 2002

Introducció	1-40
1. Introducció general a la síndrome de Down	3
2. Trisomia del cromosoma 21	4
3. El cromosoma 21: seqüenciació	6
3.1. Altres malalties que mapen al cromosoma 21	9
4. El fenotip de la síndrome de Down: complexitat i variabilitat	10
4.1. Retard mental i estrés oxidatiu	12
4.2. Efecte de dosi <i>versus</i> inestabilitat homeostàtica durant el desenvolupament	13
4.3. Correlació genotip-fenotip	15
5. Expressió gènica diferencial d'individus SD	16
5.1. Expressió diferencial	17
5.2. Gens amb expressió diferencial localitzats al cromosoma 21	17
5.3. Gens amb expressió diferencial localitzats en altres cromosomes	19
6. Models animals	22
6.1. El model murí: Ts16	22
6.2. Trisòmics parcials: Ts65Dn, Ts1Cje i Ms1Ts65	24
6.3. Genoteques de ratolins <i>in vivo</i>	26
6.4. Ratolins transgènics que contenen un cromosoma 21 humà	27
6.5. Ratolins transgènics que sobre-expressen gens del cromosoma 21	27
7. Peroxiredoxines (<i>PRDXs</i>)	29
7.1. L'estrés oxidatiu i les peroxiredoxines	29
7.2. Membres de la família de les <i>PRDXs</i>	30
7.3. Possibles funcions de les <i>PRDXs</i>	31
7.4. <i>PRDX2</i> (<i>NKEFB</i> , o <i>TSA</i> , o <i>TDPX1</i>)	34
8. Proteïnes d'unió d'àcids grassos (<i>fatty-acid binding proteins, FABPcs</i>)	35
8.1. La família de les <i>FABPcs</i>	35
8.2. Membres de la família <i>FABPcs</i>	36
8.3. Possibles funcions	37
8.4. <i>FABP</i> de cervell (<i>BFABP</i> o <i>FABP7: brain fatty acid binding protein</i>)	38
Objectius	41-44
Objectius	43
Resultats	45-116

Capítol 1. Aproximació a l'estudi de l'expressió gènica diferencial en individus Down.

	Índex
Metodologies	49
A. <i>Differential Display-PCR</i> (DD-PCR)	49
Material i Mètodes	49
Resultats	51
B. <i>Suppression Subtractive Hybridization</i> (SSH)	53
Material i Mètodes	53
Resultats	59
Capítol 2. La subexpressió de PRDX2 en cervells fetals SD podria contribuir al fenotip neuronal associat a la SD	63
Capítol 3. La sobreexpressió de <i>BFABP</i> en els cervells fetals Down està relacionada amb l'excés de dosi gènica de <i>PREP1 (PKNOX1)</i>	87
Capítol 4. Efectes genètics derivats de la sobreexpressió de <i>FABP7 (BFABP)</i> en cèl.lules en cultiu	109
Material i Mètodes	109
A. Transfecció de cèl.lules SH-SY5Y	110
B. Quantificació de la sobreexpressió de <i>FABP7</i> mitjançant PCR quantitativa a temps real	111
C. <i>Differential display PCR</i>	111
D. Electroforesi bidimensional de proteïnes (2-D)	112
Resultats	114
Discussió	117-134
Discussió	119
1. Aproximació a l'expressió gènica diferencial: SSH i DD-PCR	120
2. Complexitat i variabilitat del fenotip Down	121
3. PRDX2	122
4. FABP7	128
5. Conclusions generals	133
6. Perspectives de treball futur	134
Conclusions	135-138
Conclusions	137
Bibliografia	139-154
Bibliografia	141
Annexe	155-158
Annexe: Abreviatures	157

1. Introducció general a la síndrome de Down



Figura 1. Imatge d'una nena amb síndrome de Down (extret de Kola & Hertzog, 1997)

El fenotip de la síndrome de Down (SD), retard mental i fàcies característiques, va ser descrit per John Langdon Down l'any 1866, però no fou fins l'any 1959 quan, Jerome Lejeune i Patricia Jacobs, de manera independent, van descriure l'associació d'aquesta malaltia amb la presència d'un cromosoma 21 addicional (Lejeune *et al.* 1959; Jacobs *et al.* 1959). Un any més tard es varen descriure clínicament els primers casos causats per translocacions (Polani *et al.* 1960) i seguidament, els primers individus mosaics, presència de cèl.lules disòmiques i trisòmiques en un mateix individu (Clarke *et al.* 1961).

Fites assenyalades en la història de la síndrome de Down són: el primer clonatge d'un gen mapat al cromosoma 21 (*SOD1*, superòxid dismutasa) (Lieman-Hurwitz *et al.* 1982); l'associació de mutacions en el gen de la integrina amb una entitat clínica descrita, la deficiència d'adhesió leucocitària (Kishimoto *et al.* 1989); l'elaboració del primer mapa de lligament amb marcadors polimòrfics (Warren *et al.* 1989) i la finalització, l'any 1992, del mapa físic del cromosoma 21 (Chumakov *et al.* 1992).

Finalment, la publicació de la seqüència de gairebé tota la regió 21q (99.7%; 33.5 Mb) va permetre identificar 225 gens, 127 dels quals ja havien estat caracteritzats prèviament (Hattori *et al.* 2000).

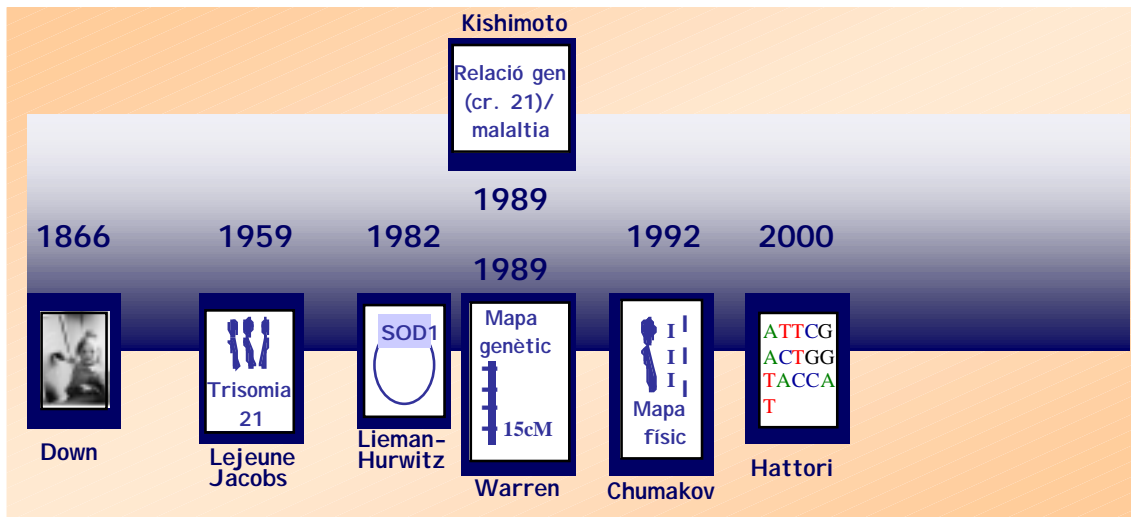


Figura 2. Fites històriques en l'estudi de la síndrome de Down

2. Trisomia del cromosoma 21

La majoria de les trisomies humanes (presència d'un cromosoma addicional sobre el complement diploid) són incompatibles amb la vida. Només les trisomies dels cromosomes 13 (síndrome de Patau), 18 (síndrome de Edwards), i 21 (síndrome de Down), juntament amb les que impliquen als cromosomes sexuals (47XXX, 47XXY, 47XYY), són parcialment viables.

La freqüència i els cromosomes implicats en les aneuploidies humanes varia molt en funció del període del desenvolupament que es considera. Així, entre els nounats, les anomalies cromosòmiques principals són les que afecten als cromosomes sexuals i al cromosoma 21, amb una freqüència del 0.3%. Aquesta freqüència s'incrementa un ordre de magnitud (4%) en fetus humans a partir de les 20 setmanes de gestació i fins el moment del naixement, essent els mateixos cromosomes esmentats els principalment afectats. Finalment, des de les 6-8 setmanes de gestació fins a la 20, la freqüència de les aneuploidies augmenta fins un 35%, i la major part corresponen a monosomies 45X, i trisomies dels cromosomes 16, 21 i 22 (Hassold & Hunt, 2001).

La trisomia total o parcial del cromosoma 21 és l'aneuploidia més freqüent en els nounats i es presenta en 1 de cada 700 naixements (Hassolds and Jacobs, 1984; Epstein, 1995).

Aproximadament, el 95% dels pacients de SD són trisòmics causats per processos de no disjunció, és a dir, manca de separació de cromosomes homòlegs a la meiosi I, o de cromàtides germanes a meiosi II i/o mitosi. Al voltant d'un 5% dels afectes presenten trisomies totals deguts a processos de translocació, principalment del tipus Robertsonià (fusió de dos cromosomes acrocèntrics per donar lloc a un cromosoma metacèntric) (revisat a Antonarakis *et al.* 1998). Finalment, menys de l'1% dels individus SD presenten trisomies parcials originades per translocacions no balancejades i duplicacions intersticials.



Figura 3. Cariotip que mostra una trisomia del cromosoma 21 (Revees, 2000)

Nombrosos estudis, darrerament confirmats, varen predir una forta associació entre l'edat materna i la freqüència de la trisomia 21 (Hassolds and Jacobs, 1984; Hassold & Hunt, 2001). Es tracta de trisomies totals degudes a una no disjunció, de les quals un 90% són d'origen matern per errors principalment a meiosi I (Antonarakis, *et al.* 1991; Antonarakis *et al.* 1992), la freqüència de les quals s'incrementa un ordre de magnitud, en dones majors de 37 anys (Hook *et al.* 1983). No s'ha trobat aquesta associació en els processos de no disjunció mitòtica (4.5% dels casos) (Antonarakis *et al.* 1993). Recentment, s'ha proposat un possible efecte de la sobreexpressió de *SOD1*, en triple dosi per la seva localització al cromosoma 21, per explicar la

correlació descrita entre la SD i l'edat materna. L'excés de *SOD1* protegiria els oòcits enfront l'apoptosi, incrementaria la proporció d'oòcits trisòmics i, en definitiva, provocaria un increment en la freqüència de la SD (Turrens, 2001).

3. El cromosoma 21: seqüenciació

El cromosoma 21 és el més petit dels autosomes (38 Mb) i representa entre un 1%-1.5% del genoma. La seqüenciació de quasi la totalitat del braç llarg (21q) d'aquest cromosoma (33.546.361 pb), ha permès identificar 225 gens i 59 pseudogens (Hattori *et al.* 2000). Segons els propis autors, la qualitat de la seqüència és molt alta (99.995% de fiabilitat) i sols han quedat per cobrir 3 discontinuïtats de seqüència d'unes 100 Kb de tot el braç 21q (Hattori *et al.* 2000). Comparativament es tracta d'una longitud molt inferior a les regions equivalents del cromosoma 22, aproximadament 1 Mb (Dunham *et al.* 2000).

La regió 21p, de la qual s'han seqüenciat 281.116 pb, està formada principalment per gens de RNA ribosomal i altres seqüències de DNA repetides no codificants (Reeves, 2000).

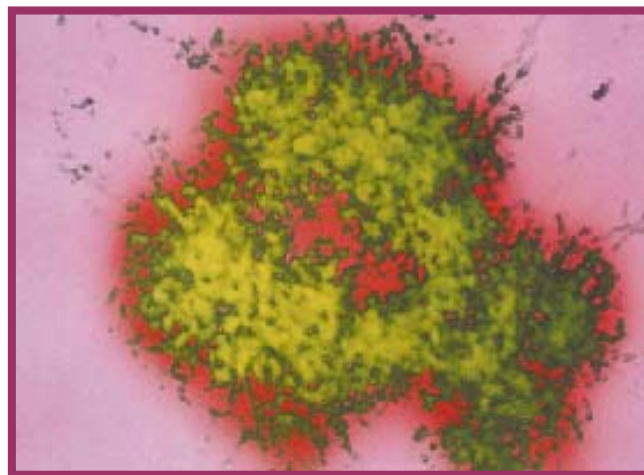


Figura 4. Micrografia de transmissió d'electrons del cromosoma 21 humà (Reeves, 2000)

La comparació de les seqüències dels cromosomes 21 (Hattori *et al.* 2000) i 22 (Dunham *et al.* 2000), ambdós acrocèntrics i de mida semblant, ha permès catalogar el primer, com un cromosoma pobre en gens (225 predits), en relació als 545 del 22.

Analitzant la seqüència del cromosoma 21, aquesta mostra una distribució no homogènia d'informació al llarg de tot el cromosoma. La meitat proximal de 21q només conté 58 gens, mentre que la distal en conté 167 (revisat a Antonarakis, 2001). A més, s'han identificat tres regions, que en total equivalen a 10 Mb (una tercera part del cromosoma 21), extremadament pobres en gens (Hattori *et al.* 2000).

Dels 225 gens predits, 127 ja eren coneguts. Els 98 restants han estat caracteritzats *in silico* a partir de l'anàlisi de la seqüència genòmica: 13 són similars a proteïnes conegudes, 17 ORFs anònimes que contenen dominis coneguts i 68 ORFs anònimes sense cap homologia detectable. A la taula 1 es mostra la classificació dels gens del cromosoma 21 segons la seva categoria funcional (Gardiner & Davisson, 2000).

La seqüenciació del cromosoma 21 ha posat de manifest la presència de llargs fragments de DNA repetit, regions especialment susceptibles als entrecreuaments desiguals causants de síndromes de duplicació/delecció (Antonarakis, 2001). A la regió més telomèrica de 21q s'ha identificat una seqüència de 93 parelles de bases, repetida 10 vegades. Per anàlisi de seqüència i assajos FISH, aquesta mateixa seqüència ha estat caracteritzada en altres cromosomes: per anàlisi comparativa de seqüències, als cromosomes 22, 10, 19; per anàlisi FISH a 5qter, 7pter; 15qter; 19pter; 19qter; 20pter; 21qter and 22qter. Aquest tipus de seqüències podria ser rellevant per a l'estudi de l'organització funcional, estructural i evolutiva dels telòmers (Hattori *et al.* 2000).

La seqüenciació completa del cromosoma 21 ha obert noves perspectives per a l'anàlisi de la variació d'aquestes seqüències en població no afecta i per a l'elucidació de la funció dels gens identificats, premises importants que conduiran a entendre: **i)** la patofisiologia de les malalties monogèniques que mapen al cromosoma 21; **ii)** la contribució dels diferents gens del cromosoma 21 al fenotip de la SD; i **iii)** les variants funcionals associades a malalties poligèniques freqüents.

Tots aquests descobriments proporcionaran les bases moleculars per a un nou diagnòstic i noves intervencions terapèutiques.

Taula 1. Categories funcionals dels gens del cromosoma 21 (Gardiner & Davisson, 2000)

Categories funcionals	Nº gens	Gens i Funcions assignades
Factors de transcripció, reguladors i moduladors	17	GABPA, BACH1, RUNX1, SIM2, ERG, ETS2 (factors de transcripció); ZNF294, ZNF295, Pred65, ZNF298, APECED (contenen dits de zenc); KIAA0136 (conté cremallera de leucines), GCFC (proteïna d'unió a dominis rics en GC), SON (domini d'unió al DNA), PKNOX1 (homeobox), HSP2BP (proteïna d'unió a factors de transcripció <i>heat shock</i>), NR1P1 (modulador de l'activació transcripcional per estrògens)
Estructura de la cromatina	4	H2BFS (histona 2B), HMG14 (grup d'alta mobilitat), CHAFB1 (factor d'engalament de la cromatina), PCNT (pericentrina)
Proteases i inhibidors de proteases	6	BACE (beta-secretasa), TMPRSS2, TMPRSS3 (serina proteases transmembrana), ADAMTS1, ADAMTS5 (metal·loproteïnases), CSTB (inhibidor de proteases)
Via ubiquïtina	4	USP25, USP16 (ubiquitin proteases), UBE2G2 (enzims conjudadors d'ubiquïtina), SMT3A (proteïna similar a la ubiquïtina)
Interferons i resposta immune	9	IFNAR1, IFNAR2, IL1ORB, IFNGR2 (factors auxiliars i receptors), MX1, MX2 (proteïnes induïdes per interferó), CCT8 (subunitat del complex T), TIAM1 (proteïna inductora de la invasió i metastasi del limfoma T), TCP10L (proteïna similar a la proteïna 10 del complex T)
Quinases	8	ENK (enteroquinasa), MAKV, MNB, KID2 (serina/treonina quinasa), PHK (piridoxal quinasa), PFKL (fosfofructoquinasa), ANKRD3 (proteïna similar a l'ankyrina amb dominis quinàsics), PRKCBP2 (proteïna que s'uneix a la proteïn-quinasa C)
Fosfatases	2	SYNJI (fosfatasa de polifosfinitol), PDE9A (fosfodiesterasa cíclica)
Processament del RNA	5	RA4 (proteïna SR), U2AF35 (factor de <i>splicing</i>), RED1 (editasa), PCB3P (proteïna d'unió a poli(C)-binding), RBM11 (motiu d'unió al RNA)
Adhesió	4	NCAM2 (de cèl.lules neurals), DSCAM, ITGB2 (de limfocits), c21orf43 (similar a la molècula de tight junction endotelial)
Canals	7	GRIK1 (receptor de glutamat, canal de calci), KCNE1, KCNE2, KCNJ5, KCNJ15 (de potassi), CLIC1 (de clor), TRPC7 (de calci)
Receptors	5	CXADR (del virus Coxsackie i adenovirus), Claudins 8, 14, 17 (de Claustridia), Pred12 (de manosa)
Transportadors	2	SLC5A3 (Na-miinositol), ABCG1 (cassette d'unió a ATP)
Metabolisme energètic	4	ATP50 (proteïna que confereix sensibilitat a l'ATP sintasa depenent d'oligomicina), ATP5A (factor 6 d'acoblament de l'ATPasa), NDUFV3 (precursor de la subunitat oxidoreductasa d'ubiquinona depenent de NADH), CRYZLI (quinona oxidoreductasa)
Estructurals	4	CRYA (proteïna de la lent), COL18, COL6A1, COL6A2 (col.làgen)
Metil transferases	3	DNMT3L (transferasa de metil citosina), HRMT111 (metil-arginina transferasa de proteïnes), Pred28 (AFI 39682), (metil transferasa de N6-DNA)
Domini SH ₃	3	ITSN, SH3BGR, UBASH3A
Metabolisme del carboni	4	GART (biosíntesi de purines), CBS (cistatió-β-sintetasa), FTCD (ciclodeaminasa forminotransferasa), SLC19A1 (portador de folat reduït)
Metabolisme de l'oxigen	3	SOD1 (superòxid dismutasa), CBR1, CBR3 (carbonil reductasa)
Diversos	28	HLCS (holocarboxilasa sintasa), LSS (lanosterol sintetasa), B3GALT5 (galactosil transferasa), AGPAT3 (aciltransferasa), STCH (proteïna de stress microsomal), ANA/BTG3 (control de cicle cel.lular), MCM3 (factor associat a replicació de DNA), APP (precursor β-amiloid), WDR4, WDR9 (proteïna que conté repeticions WD), TFF1, 2, 3 (factors trefoil), UMODLI (uromodulina), Pred5 (lipasa), Pred3 (factor de creixement de queratinòcits), KIAA0653, IgSF5 (domini Ig), S100b (unió a Ca), PWP2 (proteïna periòdica del triptofan), DSCR1 (rica en prolina), DSCR2 (rica en leucines), WRB (proteïna rica en triptòfan), Pred22 (tRNA sintetasa), SCL37A1 (glicerol fosfat permeasa)

3.1 Altres malalties que mapen al cromosoma 21

S'estima que el cromosoma 21, essent el més petit dels autosomes humans (38 Mb), conté l'1% dels gens del genoma. Per extensió, es podria assumir que l'1% de les malalties monogèniques humanes maparien en aquest cromosoma. Actualment, només un petit nombre de correlacions gen-malaltia han estat associades a gens del cromosoma 21 (revisat a Hattori *et al.* 2000; Antonarakis, 2001) (taula 2).

Taula 2. Malalties monogèniques mapades al cromosoma 21

Gen	Loci	Malaltia	Referència
APP	21q21.3	Alzheimer Familiar (FAD)	(Goate et al. 1991)
SOD1	21q22.1	Esclerosi lateral amiotròfica Familiar (FALS)	(Jones et al. 1994)
KCNE2	21q22.1	Aritmia cardíaca	(Abott et al. 1999)
KCNE1	21q22.1	Síndrome Jervell i Lange-Nielsen	(Tyson et al. 1997)
CLDN14	21q22.3	Sordesa recessiva no sindròmica (DFNB29)	(Wilcox et al. 2001)
TMPRSS3	21q22.3	Sordesa recessiva no sindròmica (DFNB10,DFNB8)	(Scott et al. 2001)
CBS	21q22.3	Homocistinúria	(Tsai et al. 1996)
CRYA	21q22.3	Catarates congènites	(Litt et al. 1998)
CSTB	21q22.3	Epilèpsia mioclònica progressiva	(Laloti et al. 1997)
AIRE	21q22.3	Malaltia poliglandular autoimmune	(Nagamine et al. 1997)
AML1	21q22.3	Leucèmia mieloide aguda	(Miyoshi et al. 1991)
ITGB2	21q22.3	Síndrome de deficiència d'adhesió leucocitària	(Etzioni, 1994)
COL18A1	21q22.3	Síndrome Knobloch	(Sertie et al. 2000)

D'entre els gens esmentats anteriorment com causants de malalties monogèniques ens ha semblat interessant ampliar la informació de dos d'ells. El gen *APP* (proteïna precursora del pèptid amiloid), mutacions en el qual s'han associat a la malaltia d'Alzheimer (en concret al tipus d'Alzheimer familiar o ADF), mapa a 21q21.3 (Korenberg *et al.* 1989; Goate *et al.* 1991; Murrell *et al.* 1991). La malaltia d'Alzheimer es caracteritza per l'aparició de dipòsits de plaques amiloidees i la formació de feixos neurofibrilars en el cervell (Nagy, 1999; Ianello *et al.* 1999). A més, la sobreexpressió d'*APP* en els individus SD, ha estat relacionada amb l'aparició d'una forma d'Alzheimer prematur (*early-onset Alzheimer's disease*, EOAD) (de la Monte, 1999; Cairns, 1999; Sawa, 1999; Neve *et al.* 2000).

D'altra banda, el gen *SOD1* (superòxid dismutasa 1, a 21q22.1) codifica per un enzim antioxidant clau en el metabolisme dels radicals lliures. Entre un 15%-25% dels pacients d'esclerosi amiotròfica lateral familiar (FALS) presenten mutacions que condueixen a un increment de funció de *SOD1* (Ianello *et al.* 1999). Ratolins transgènics que sobreexpressen el gen *SOD1* mutat desenvolupen anomalies en les neurones motores molt semblants a les que apareixen en l'esclerosi amiotròfica lateral familiar (de la Monte, 1999; Ianello *et al.* 1999). En suport d'aquest fet s'ha observat que quan aquests ratolins són exposats a alts nivells de peròxid d'hidrogen, desenvolupen una neurodegeneració de les neurones motores, entre d'altres trets fenotípics (Kola & Hertzog, 1997; Pritchard & Kola, 1999).

Finalment, també s'han mapat al cromosoma 21 un *locus* de susceptibilitat pel trastorn bipolar i un altre per la hiperlipidèmia familiar combinada.

4. El fenotip de la síndrome de Down: complexitat i variabilitat

El fenotip de la síndrome de Down és molt variable i complex, més de 80 trets fenotípics han estat associats a aquesta patologia, i les anomalies afecten gairebé a tots els seus òrgans. La causa d'ambdues característiques és l'elevat nombre de gens implicats, alguns d'ells situats a la regió triplicada. A més, cal considerar que els gens del cromosoma 21 no són els únics afectats per la presència d'un cromosoma 21 addicional. Hi ha gens, situats en d'altres cromosomes que, directa o indirectament, estan regulats per gens del cromosoma 21 (factors de transcripció, quinases, etc...). Aquests també es veuran afectats per l'estat trisòmic.

Els trets fenotípics més freqüents associats a la SD són (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>):

Alteracions neurològiques:

- Retard mental
- Malaltia d'Alzheimer
- Hipotonia muscular

Alteracions en el cap i fàcies:

- Cara plana
- Braquicefàlia
- Fissures palpebrals dirigides cap amunt
- Plecs epicàntics
- Taques Brushfield a l'iris
- Llengua protuberant
- Orelles petites i mal implantades
- Pèrdua auditiva

Alteracions en l'esquelet:

- Baixa estatura
- Inestabilitat de l'articulació de la cadera
- Displàsia acetabular greu
- Inestabilitat atlantoaxial
- Mans petites i amples
- Cinquè dit amb hipoplàsia de la falange
- Solc palmar transversal

Alteracions endocrines:

- Hipotiroidisme

Alteracions en l'ectoderm:

- Excés de pell en el clatell

Alteracions cardiovasculars:

- Alteracions congènites cardíques (CHD)
- Defecte en el tabic interventricular i interauricular

Alteracions gastrointestinals:

- Estenosi duodenal
- Anus no perforat
- Malaltia de Hirschprung

Neoplàsies:

- Leucèmia Mieloproliferativa Aguda (AML)
- Leucèmia Linfocitària Aguda (ALL)
- Leucèmia Mieloproliferativa Transitòria (TML)
- Leucèmia Aguda Megacariocítica

La variabilitat és una de les característiques més rellevants del fenotip Down. Els dos únics trets comuns dels pacients SD són el retard mental i la hipotonia muscular. Tot i així, la severitat d'aquests és molt variable. El retard mental, per exemple, pot presentar-se sota una àmplia gradació de gravetat, amb grans diferències entre els afectes. Per això, alguns autors consideren la SD com un factor de predisposició, més que un factor causal. Per exemple, el fet que la malaltia de Hirschprung es presenti en

1/20-30 d'individus SD, però només en 1/5000 de la població normal reforçaria la hipòtesi anterior. Arguments similars es poden utilitzar en el cas de les alteracions cardíacques (CHD), inestabilitat atlantoaxial, i molts altres trets associats a la SD.

Entre els diferents factors que explicarien la variabilitat fenotípica cal destacar: **1)** les diferents combinacions tri-alièliques dels gens del cromosoma 21 que, possiblement, alteren les relacions de dominància; **2)** el fons genètic individual (*genetic background*); **3)** les relacions epistàtiques i, finalment, **4)** la influència de l'ambient (Revees *et al.* 2001).

4. 1. Retard mental i estrés oxidatiu

La pràctica totalitat dels pacients SD presenten anomalies en el sistema nerviós, que es manifesten, principalment, com a retard mental, hipotonia i un tipus de neurodegeneració similar a l'Alzheimer. La síndrome de Down és la principal causa genètica de retard mental en humans i es caracteritza per deficiències en l'aprenentatge i llenguatge, així com en la memòria a curt i llarg plaç (Korenberg, 1995; de la Monte, 1999). L'observació del cervell SD revela tota una sèrie de anomalies neuroanatòmiques, entre elles, una mida més petita i una forma més redondejada (Cairns *et al.* 1999). Altres alteracions freqüents inclouen: **1)** una disminució del nombre de cèl·lules, per tant de la densitat neuronal, **2)** una alteració de la diferenciació neuronal i connectivitat sinàptiques i, **3)** un desenvolupament prematur de plaques amiloidees i feixos de neurofibrilles que recorden als que s'associen a la malaltia d'Alzheimer (Nagy, 1999; Ianello *et al.* 1999).

Cada vegada pren més cos la hipòtesi de que els fenòmens d'apoptosi són els principals responsables de la mort neuronal en les malalties neurodegeneratives (SD, Alzheimer, Parkinson, Huntington, etc ...) i els processos d'envelliment (Nagy, 1999; Hallam *et al.* 2000). S'han descrit alteracions en els mecanismes de mort cel·lular programada o apoptosi en les neurones dels pacients SD (Busciglio & Yankner, 1995). De la mateixa manera, també s'ha observat una disminució de la viabilitat de les neurones en cultiu de fetus trisòmics del cromosoma 16 (Bambrick & Krueger, 1999; Hallam *et al.* 2000).

Altres trets fenotípics característics de la SD són l'estrés oxidatiu i l'envelliment prematur (Ianello *et al.* 1999; Neve *et al.* 2000). L'apoptosi descrita en cultius neuronals de fetus Down ha estat atribuïda a l'estrés oxidatiu i, el conseqüent increment (3-4 vegades) de les espècies reactives d'oxigen (ROS) intracel·lulars, a un possible metabolisme defectiu (Busciglio & Yankner, 1995; Nagy, 1999). Es generen radicals ROS com a conseqüència del metabolisme cel·lular normal i, a baixes concentracions, aquests poden actuar com a senyalitzadors i potents reguladors de l'expressió gènica. A concentracions elevades, en canvi, poden causar greus lesions al DNA, lípids i altres macromolècules cel·lulars. És interessant remarcar que alguns gens implicats en la modulació dels nivells de ROS a la cèl·lula han estat mapats al cromosoma 21 (*SOD1*, *CBS*, *CBR*, *STCH*, *DSCR1*) i, per tant, possiblement afectats per la trisomia. El trencament de l'equilibri de dosi gènica jugaria així un paper molt important en l'envelliment i l'Alzheimer prematurs dels pacients SD (Smith *et al.* 2000).

4.2. Efecte de dosi *versus* inestabilitat homeostàtica durant el desenvolupament

Actualment, el fenotip SD s'explica en base a dues hipòtesis no excloents: **a)** segons la primera, és el resultat de la sobreexpressió d'un gen o grups de gens "principals" presents en triple dosi (*gene dosage effect*) (revisat a Pritchard & Kola, 1999); **b)** d'acord amb la segona, les manifestacions clíniques s'explicarien per la disrupció de l'homeostasi causada per l'alteració en el nombre de cromosomes, durant el desenvolupament (*amplified developmental instability*) (Shapiro, 1983; Greber-Platzer *et al.* 1998; Shapiro, 1999). Aquesta segona hipòtesi va ser proposada en un intent d'explicar les següents observacions: **1)** les similituds trobades entre les manifestacions clíniques de diferents aneuploidies (retard mental, malformacions cardíques i retard en el desenvolupament); **2)** el fet que totes les manifestacions clíniques que es troben a la SD es troben també a la població no afecta, encara que a una freqüència molt menor, menys severes i, normalment, com a únic tret.

Simplificant molt, la diferència principal entre ambdues hipòtesis es basa en donar més importància a les semblances, o bé a les diferències, presents entre les diferents aneuploidies.

Els adeptes de la hipòtesi de l'efecte de dosi, expliquen les similituds entre les diferents aneuploïdes basant-se en el repertori limitat de malformacions observat front a l'ampli repertori de disrupcions (així, alteracions en diferents vies poden donar el mateix fenotip, per exemple, càncer). D'altra banda, els models animals que s'han anat generant recolzen aquesta darrera hipòtesi. Cap els anys 1970s, es va crear una bateria de ratolins trisòmics per cadascun dels 19 autosomes murins i, abans de conèixer la sintènia entre els cromosomes humans i murins, ja es va considerar el ratolí Ts16 com un bon model per a la SD humana. De la mateixa manera, els models murins que sobreexpressen alguns dels gens del cromosoma 21 (*SOD1*, *PFKL*, *HMG14*, *S100β*, *ETS2*, *APP*, *SIM2*, *DYRK1A*) donen lloc a fenotips molt diferents segons quin és el gen sobreexpressat (Kola & Hertzog, 1997; Kola, 1997; Kola & Hertzog, 1998; Pritchard & Kola, 1999).

Els partidaris de la hipòtesi de la disrupció homeostàtica expliquen les diferències fenotípiques entre les aneuploïdies basant-se en les diferències de quantitat de material triplicat (Shapiro *et al.* 1994, Pritchard & Kola, 1999). Conclouen que la major severitat de les trisomies 13 (síndrome de Patau) i 18 (síndrome d'Edwards), letals poc temps després del naixement, es deu a que els cromosomes afectats són de major tamany. En contraposició, els partidaris de l'efecte de dosi es basen en el fet de que els dobles trisòmics (48,XXY,+21; 48,XYY,+21; 48,XXX,+21; 46,X,+21) no tenen un fenotip més sever que els individus Down, i també en l'existència de pacients en els que no s'ha identificat la regió triplicada, degut a limitacions tècniques (la regió ha de ser, doncs, molt petita) i, en canvi, presenten un fenotip Down relativament sever (Ahlbom *et al.* 1996). Aquests autors no creuen que es tracti únicament d'un problema de quantitat de material triplicat i assumeixen l'efecte específic d'alguns gens.

Tot i que encara es desconeix, en gran part, la base molecular del fenotip SD, molt probablement conté elements barrejats de les dues hipòtesis anteriors. Possiblement, alguns dels gens implicats en la trisomia són fonamentals per l'aparició d'un fenotip determinat, però no es poden descartar els efectes epigenètics, epistàtics i ambientals que contribuirien a incrementar encara més la variabilitat entre els pacients SD.

4.3. Correlació genotip-fenotip

L'estudi de la correlació genotip-fenotip a la SD és complex, però molt útil a l'hora d'esbrinar quins són els gens del cromosoma 21 realment implicats en la patologia. Es tracta, d'una banda, de determinar l'extensió de la trisomia en trisòmics parcials, i d'altra, de fer una descripció clínica del pacient (Epstein *et al.* 1991). Mitjançant hibridacions *in situ* fluorescents (FISH) o anàlisi de dosi al·lèlica de marcadors polimòrfics per PCR quantitativa es pot delimitar força acuradament la regió triplicada i, reunint les dades dels pacients, construir el mapes fenotípics (Valero *et al.* 1999).

Seguint aquesta estratègia, es va proposar l'existència d'una regió crítica de la SD, 21q22 (*Down Syndrome Critical Region*, DSCR), associada a l'aparició dels principals trets fenotípics: retard mental, alteracions cardíques congènites i trets facials característics (Niebuhr, 1974; Epstein, 1986; Epstein, 1990). El segment inicial s'ha anat acotant progressivament fins a reduir-lo a la regió D21S55-MX1 (*interferon-induced protein p78*) (Korenberg *et al.* 1990; Korenberg *et al.* 1992; Delabar *et al.* 1993). Tot i això, l'anomenada regió crítica de la SD va quedar en entredit ja que, mitjançant l'anàlisi d'un conjunt d'individus trisòmics parcials, es va demostrar la contribució de gens situats fora de la DSCR a diferents trets fenotípics de la SD, incloent el retard mental, la hipotonia muscular i la presència de fàcies característiques (Korenberg *et al.* 1992; figura 5). Com a conseqüència d'aquests resultats, sorgeix el concepte de "*gene contiguous syndrome*", normalment reservat a síndromes causats per petites delecions (microdelecions) en un o més *loci* consecutius i que causen efectes fenotípics molt diversos, però que es creu encaixaria molt bé amb els trets fenotípics característics de la SD (Korenberg *et al.* 1994; Korenberg *et al.* 1995).

Mitjançant aquest tipus d'aproximacions (mapes feontípics), l'estenosi duodenal (DST) que afecta entre el 4%-7% dels pacients Down, i que suposa un 30%-50% dels afectes de DST, va ser mapada entre els marcadors D21S8 (21q22.2) i D21S15 (21q22.3) i el *locus* responsable de les alteracions congènites cardíques (CHD) que afecten al 50% dels individus Down, i el 70% dels casos d'alteracions de coixinets endocàrdics (ECDs), va ésser localitzat entre D21S55 i el telòmer (Korenberg *et al.* 1992).

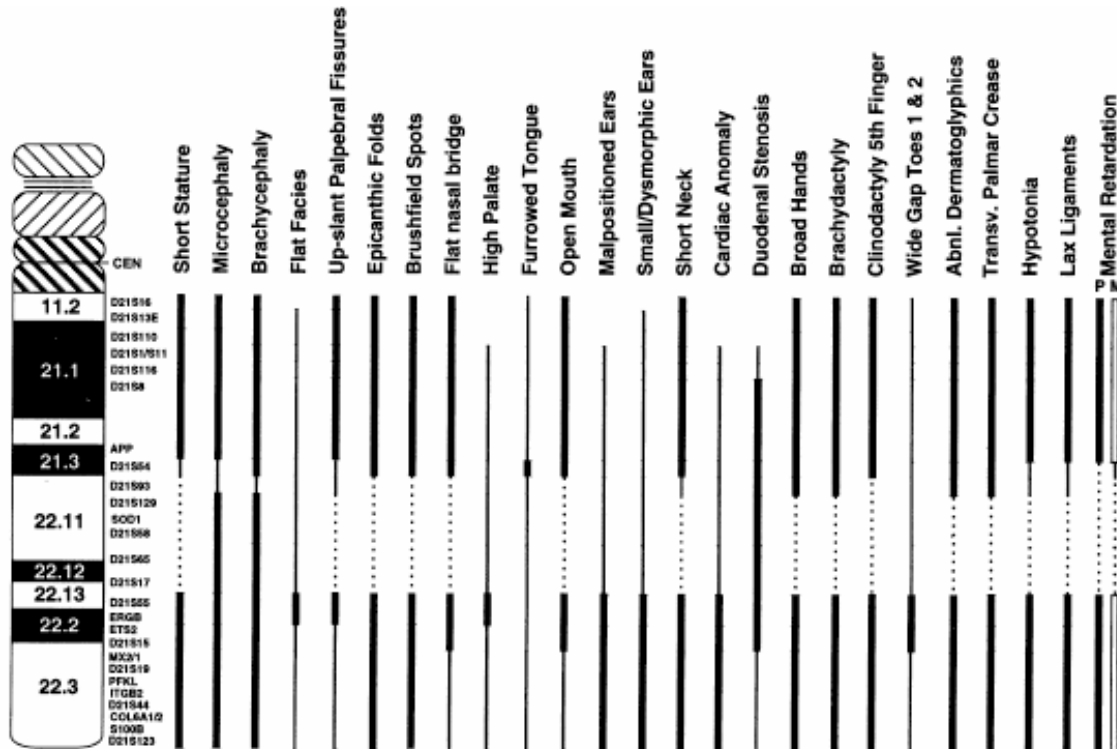


Figura 5. Mapa de correlació genotip-fenotip elaborat per Korenberg i col.laboradors (1994) que inclou 25 trets fenotípics característics de la SD analitzats sobre un total de 16 individus trisòmics parcials

Els models animals també poden ésser d'utilitat per generar un mapa fenotípic del cromosoma 21 (Kola & Hertzog, 1997; Kola, 1997; Smith & Rubin, 1997; Kola & Hertzog, 1998). Smith i col.laboradors (1995) van desenvolupar una nova tècnica per identificar gens candidats implicats en un determinat tret fenotípic mitjançant la generació de genoteques murines *in vivo* (veure subapartat 6.3).

Una altre aproximació per intentar dissecionar el fenotip Down és generar animals transgènics per gens concrets del cromosoma 21 i, així, analitzar quina és la contribució individual de cadascun al fenotip final, per determinar la relació genotip-fenotip. Actualment existeixen ratolins transgènics sobreexpressant els gens següents: *SOD1*, *APP*, *HMG14*, *S100β*, *PFKL*, *ETS2*, *SIM2*, *DYRK1A*.

5. Expressió gènica diferencial d'individus SD

L'estudi de l'expressió diferencial permet abordar moltes malalties humanes, especialment les multifactorials, l'anàlisi de les quals és difícil per la implicació de molts gens. Aquesta estratègia aplicada a la SD ens permet identificar alguns dels

gens implicats en el fenotip Down, independentment de la seva localització cromosòmica, sense que necessàriament siguin gens del cromosoma 21.

S'ha de remarcar que la principal limitació en aquest tipus d'estudi és l'heterogeneïtat fenotípica associada a la SD, això complica extraordinàriament l'anàlisi dels resultats.

5.1. Expressió diferencial

L'anàlisi de l'expressió diferencial permet identificar i posteriorment quantificar les diferències en els nivells de trànscrips o proteïnes entre dues mostres diferents. La majoria de les tècniques emprades tenen en comú que requereixen una posterior verificació addicional dels resultats. A nivell de trànscrip (mRNA) les metodologies en ús són la hibridació substractiva supressora (SSH) (Lisitsyn *et al.* 1993; Lisitsyn *et al.* 1995; Hedrick *et al.* 1984; Gurskaya *et al.* 1996; Diatchenko *et al.* 1996), el *differential display PCR* (DD-PCR) (Mc Clelland *et al.* 1995; Liversey *et al.* 1996), el SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) (Velculescu *et al.* 1995), l'assaig quantitatiu d'hibridacions *Northern* i les hibridacions sobre *microarrays* o *macroarrays* (cDNAs fixats sobre una membrana i hibridats amb sondes de les dues poblacions a comparar). A nivell de proteïna les estratègies utilitzades principalment són l'assaig quantitatiu d'hibridacions *Western*, les mesures d'activitat enzimàtica i l'electroforesi bi-dimensional de proteïnes (*2-D gel analysis*).

5.2. Gens amb expressió diferencial localitzats al cromosoma 21

D'acord amb la hipòtesi de l'efecte de dosi, el fenotip SD és el resultat de l'efecte acumulatiu de la sobreexpressió d'un grup de gens situats en el cromosoma 21. Tots els gens del cromosoma 21 són, *a priori*, candidats potencials. El fet que alguns d'ells presentin expressió diferencial respecte els controls pot ser indicatiu de la seva contribució a les bases moleculars de la patologia.

Mitjançant anàlisis *Northern* i/o *Western* quantitatius, RT-PCR quantitativa i, valoracions d'activitat enzimàtica sobre mostres d'individus disòmics i trisòmics s'ha analitzat l'expressió diferencial d'alguns dels gens del cromosoma 21 (Greber-Platzer *et al.* 1999a; Greber-Platzer *et al.* 1999b; Tassone *et al.* 1999; Fuentes *et al.* 2000; Saito *et al.* 2000).

A la taula 3 es resumeixen els resultats dels assajos *Northern* quantitius amb cèl.lules derivades de limfoblasts d'individus disòmics i trisòmics (Tassone *et al.* 1999), així com els resultats d'expressió obtinguts per altres gens del cromosoma 21 que també han estat objecte d'estudi:

1) mitjançant mesures d'activitat enzimàtica s'ha determinat un increment d'activitat fosfofructokinasa de fetge (**PFKL**) de 1.5 vegades a fibroblasts d'individus trisòmics (Annerén *et al.* 1987).

2) assajos *Northern* quantitius sobre individus Down i control han revelat una sobreexpressió de **DSCR1** (*Down Syndrome Critical Region 1*) (Fuentes *et al.* 1995; Fuentes *et al.* 1995; Fuentes *et al.* 2000) i de **DYRK1A** (l'homòleg de *MNB* de *Drosophila*) (Guimerà *et al.* 1999) en cervells fetals d'individus trisòmics.

3) assajos *Western* quantitius han posat de manifest la sobreexpressió de **DSCAM** (*Down Syndrome Cell Adhesion Molecule*) en individus Down (Saito *et al.* 2000).

Taula 3. Anàlisi de l'expressió diferencial d'alguns gens del cromosoma 21

Gen	Locus	Expressió SD/Control	Metodologia	Referència
STCH	21q11.1	5.4	<i>Northern</i> quantitatiu	Tassone <i>et al.</i> 1999
E4TF1-60	21q21.3	3.2	<i>Northern</i> quantitatiu	Tassone <i>et al.</i> 1999
SOD1	21q22.1	1.7	<i>Northern</i> quantitatiu	Tassone <i>et al.</i> 1999
GART	21q22.1	2.0	<i>Northern</i> quantitatiu	Tassone <i>et al.</i> 1999
DYRK1A(MNB)	21q22.1	3.0	<i>Northern</i> quantitatiu	Tassone <i>et al.</i> 1999
ERG	21q22.3	1.5	<i>Northern</i> quantitatiu	Tassone <i>et al.</i> 1999
CD18	21q22.3	1.9	<i>Northern</i> quantitatiu	Tassone <i>et al.</i> 1999
ETS2	21q22.3	no expressió diferencial	<i>Northern</i> quantitatiu	Tassone <i>et al.</i> 1999
PFKL	21q22.3	1.5	Activitat enzimàtica	Annerén <i>et al.</i> 1987
DSCR1	21q22.1	1.9	<i>Northern</i> quantitatiu	Fuentes <i>et al.</i> 2000
DYRK1A	21q22.1	1.5	<i>Northern</i> quantitatiu	Guimerà <i>et al.</i> 1999
DSCAM	21q22.2	1.8	<i>Western</i> quantitatiu	Saito <i>et al.</i> 2000

Així, **ETS2** seria l'únic gen que no compliria la teoria del efecte de dosi (resultats de Tassone *et al.* 1999 confirmats per Greber-Platzer *et al.* 1999a; Greber-Platzer *et al.* 1999b). En contraposició, els ratolins transgènics que sobreexpressen **ETS2** presenten anomalies craneofacials molt semblants a certs trets Down (Sumarsono *et al.* 1996;

Kola & Hertzog, 1997; Kola & Hertzog, 1998; Pritchard & Kola, 1999), el que sembla indicar que l'anàlisi quantitativa d'un gen en un estadi del desenvolupament o en un teixit concret no és suficient per descartar la seva implicació en la patologia. D'altra banda, estudis més recents mostren una clara sobreexpressió de *ETS2* en individus Down, superior a l'1.5 vegades esperable com a conseqüència de la trisomia del cromosoma 21. En aquests treballs s'ha demostrat una inducció del factor de transcripció *ETS2* en cultius cel·lulars per la presència de peròxid d'hidrogen, la qual cosa explicaria els valors de sobreexpressió de 5 a 7 vegades descrits recentment als Down (Sanij *et al.* 2001).

5.3. Gens amb expressió diferencial localitzats en altres cromosomes

Tot i que la identificació i caracterització dels gens situats al cromosoma 21 és necessària per entendre les bases moleculars de la patologia, hi ha gens situats en d'altres cromosomes que veuen alterada la seva expressió degut a l'efecte de dosi i que, com a conseqüència d'això, podrien intervenir en el fenotip Down.

Seguint les metodologies esmentades a l'apartat 5.1, diversos autors han analitzat l'expressió diferencial en individus Down i han demostrat expressió diferencial per un nombre important de gens, taula 4 (Hermon *et al.* 1998; Shatzmann-Turhani *et al.* 1998; Labudova *et al.* 1998ab; Lubec *et al.* 1999a, b, c; Labudova *et al.* 1999a, b, c, d; Yeghiazaryan *et al.* 1999; Greber-Platzer *et al.* 1999c; Kitzmueller *et al.* 1999; Fang *et al.* 1999; Gulesserian *et al.* 2000; Krapfenbauer *et al.* 2001; Seidl *et al.* 2001; Yoo *et al.* 2001a, b).

En alguns casos, quan la funció del gen alterat és coneguda, es pot inferir l'efecte de la seva desregulació i relacionar-ho amb algunes deficiències o disfuncions cel·lulars associades al fenotip SD. Així, la sobreexpressió de gens implicats en la reparació del DNA (*XRCC1*, *ERCC2*, *ERCC3*) afectaria els sistemes de reparació i recombinació en etapes molt prematures del desenvolupament (Kitzmueller *et al.* 1999); la subexpressió del gen *TRX* (tioredoxina), implicat en la modulació del estat *redox* de la cèl·lula i amb un paper neuroprotector, incrementaria els fenòmens apoptòtics (Kitzmueller *et al.* 1999); igualment, la subexpressió de *ALDH* (aldehid

deshidrogenasa) produiria una acumulació desfavorable d'aldehids en el cervell i en conseqüència una situació d'estrés oxidatiu (Lubec *et al.* 1999a).

Taula 4. Resum de l'anàlisi de l'expressió diferencial de gens no localitzats al cromosoma 21

Gen	Teixit	Tècnica	Expressió en SD	Referència
<i>ALDH</i> (aldehid dehidrogenasa)	cervell fetal/adult	SSH/2-D	subexpressió	(Lubec <i>et al.</i> 1999a)
<i>c-fos</i> (factor de transcripció)	cervell adult	RT-PCR	sobreexpressió	(Greber-Platzer <i>et al.</i> 1999c)
<i>DRP-2</i> (proteïna relacionada amb la dihidropirimidina 2)	cervell adult	Northern/2-D	sobreexpressió	(Lubec <i>et al.</i> 1999b)
<i>NADH3</i>	cervell adult (cervellet)	DD-PCR	subexpressió	(Krapfenbauer <i>et al.</i> 1999)
<i>PGI</i> (fosfoglucosa isomerasa)	cervell fetal/adult	SSH/activitat enzimàtica	subexpressió	(Labudova <i>et al.</i> 1999d)
<i>PGK</i> (fosfoglicerat quinasa)	cervell fetal/adult	SSH/activitat enzimàtica	subexpressió	(Labudova <i>et al.</i> 1999b)
<i>Scl</i> (escleraxis)	cervell fetal/adult	SSH/Northern	subexpressió	(Labudova <i>et al.</i> 1999a; Yeghiazaryan <i>et al.</i> 1999)
<i>DNAsa I</i>	cervell fetal/adult	SSH/Northern	sobreexpressió	(Shatzmann- <i>et al.</i> 1998)
<i>PLPT</i> (proteïna de transferència de fosfolípids)	cervell adult	DD-PCR	sobreexpressió	(Karapfenbauer <i>et al.</i> 2001)
<i>junD</i> (factor de transcripció)	cervell fetal/adult	SSH/Western	subexpressió	(Labudova <i>et al.</i> 1998a)
<i>TSH-R</i> (hormona estimulant del tiroides)	cervell fetal/adult	SSH/Western	sobreexpressió	(Labudova <i>et al.</i> 1999c)
<i>AVP</i> (vasopressina d'arginina)	cervell fetal/adult	SSH/activitat enzimàtica	sobreexpressió	(Labudova <i>et al.</i> 1998b)
<i>VDC1/2</i> (canals d'anions dependents de voltatge 1/2)	cervell adult	2-D	desregulació	(Yoo <i>et al.</i> 2001a)
Xaperones	cervell adult	2-D	desregulació	(Yoo <i>et al.</i> 2001b; Hermon <i>et al.</i> 1998)
<i>ERCC2, ERCC3, XRCC1</i> (gens de reparació)	cervell adult	Northern/activitat enzimàtica	sobreexpressió	(Fang-Kircher <i>et al.</i> 1999; Kitzmueller <i>et al.</i> 1999)
<i>SERT</i> (transportadors de serotonina)	cervell adult	Western	sobreexpressió	(Gulesserian <i>et al.</i> 2000)
<i>TRX</i> (tioredoxina)	cervell adult	SSH	subexpressió	(Kitzmueller <i>et al.</i> 1999)
<i>snRNP70K</i> (ribonucleoproteïna nuclear petita 70K)	cervell fetal/adult	SSH/2-D	subexpressió	(Seidl <i>et al.</i> 2001)
<i>GAPDH</i> (gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa)	cervell adult	2-D/activitat enzimàtica	sobreexpressió	(Lubec <i>et al.</i> 1999c)

D'altra banda, la subexpressió de *PLTP* (*phospholipid transfer protein*) s'ha relacionat amb una incorrecta biogènesi de membranes que podria explicar certes malformacions en el cervell (Krapfenbauer *et al.* 2001); la desregulació de gens implicats en el metabolisme de la glucosa, com són *PIG* (fosfoglucosa isomerasa) i *PGK* (fosfoglicerat quinasa) s'han relacionat amb un metabolisme defectiu de la glucosa (Labudova *et al.* 1999bd) i, finalment, la subexpressió del factor de transcripció *Scl*

(escleraxis) de la família bHLH (basic Helix-Loop-Helix) podria afectar la plasticitat neuronal (Yeghiazaryan *et al.* 1999). El mateix aplicaria a certes xaperones (HSP70.1, HSP70RY, HSC71, GRP75, GRP78, TCP-1, HSP60, GRP94, Alpha-crystallin B) associades a canvis patològics que s'observen en el cervellet (Yoo *et al.* 2001b).

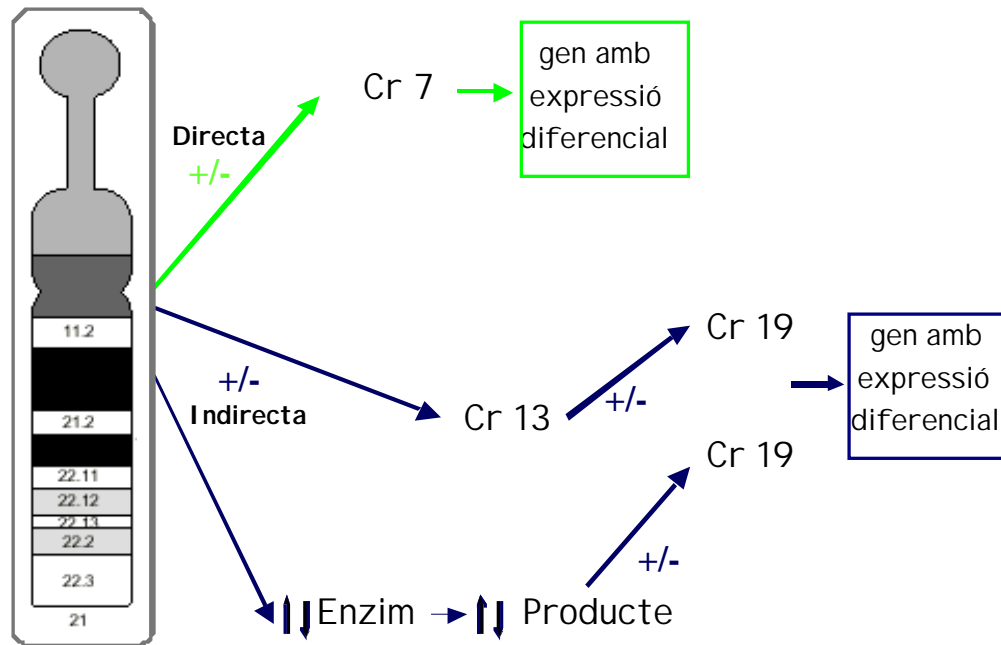


Figura 6. Possibles tipus de regulació mediat per gens del cromosoma 21 sobre gens d'altres cromosomes

Tenint en compte que la sobreexpressió dels gens del cromosoma 21 pot tenir un efecte sobre altres gens, no es pot descartar un conjunt d'alteracions en cascada per una desregulació de les xarxes gèniques intracel·lulars. Entre els candidats a promoure aquestes disfuncions es troben els 17 gens que codifiquen per factors de transcripció, així com els que codifiquen per quinases, glicosilases, etc... (veure taula 1 de l'apartat 3) (Gardiner & Davisson, 2000). A més de les regulacions directes, es poden hipotetitzar regulacions indirectes, ja sigui per l'actuació de gens intermediaris o alteracions en els nivells de substrat (figura 6).

Un dels reptes més interessants és descobrir i analitzar aquestes xarxes de regulació gènica i esbrinar pas a pas els efectes de la seva desregulació.

6. Models animals

Una de les raons principals de la complexitat de la SD és que en els trisòmics (tant totals com parcials) l'efecte d'un conjunt de gens es projecta globalment sobre el fenotip. La freqüència de trisòmics parcials és molt baixa i la regió implicada en la trisomia és sovint massa gran. Els models animals, i molt especialment els ratolins transgènics, han permès sobrepassar aquesta limitació (apartat 4.2 Correlacions genotip-fenotip) (Kola & Hertzog, 1997; Kola, 1997; Smith & Rubin, 1997; Kola & Hertzog, 1998).

Els motius principals que fan del ratolí un bon model per la SD són: **1)** una sintènia molt conservada entre el cromosoma 21 humà i fragments dels cromosomes de ratolí 16, 17 i 10 (Irving *et al.* 1994; Cole *et al.* 1999; Hattori *et al.* 2000; Pletcher *et al.* 2001) (<http://www.informatics.jax.org/>). L'ordre gènic està molt conservat, tot i que s'observen algunes inversions que, probablement, es deuen a reordenacions durant l'evolució dels dos llinatges. A la figura 7 es presenta un mapa comparatiu dels gens del cromosoma 21 humà i els seus ortòlegs murins. **2)** Són animals de laboratori i per tant, es pot aconseguir minimitzar les diferències fenotípiques degudes al fons genètic analitzant soques isogèniques; **3)** El grau de coneixement del desenvolupament de ratolí és bastant elevat, la qual cosa facilita el descobriment de patrons aberrants. **4)** El coneixement del genoma de ratolí és també molt elevat i, **5)** es tracta d'un animal petit, fàcil de manipular i mantenir, de baix cost, i principalment, de temps de generació curt, la qual cosa facilita molt el treball.

Abans de conèixer les relacions de sintènia entre els cromosomes d'humà i de ratolí, ja es va sospitar que el ratolí trisòmic pel cromosoma 16 (MMU16) seria un bon model per la SD, basant-se en les semblances a diferents nivells: morfològic, bioquímic, hematològic, immunològic, etc...

6.1. El model murí: Ts16

Aquest model no emula totalment el fenotip Down. Això es deu a que els ratolins Ts16 són disòmics per alguns dels gens que es troben triplicats en els pacients SD. La regió 21cen fins 21qter, aproximadament 30 Mb, és homòloga al cromosoma MMU16 de ratolí, seguida de 2 Mb al cromosoma MMU17 i 2 Mb més al cromosoma

MMU10) (figura 7) (Irving *et al.* 1994; Reeves *et al.* 1995; Cole *et al.* 1999; Hattori *et al.* 2000; revisat a Gardiner & Davisson, 2001; Antonarakis, 2001).

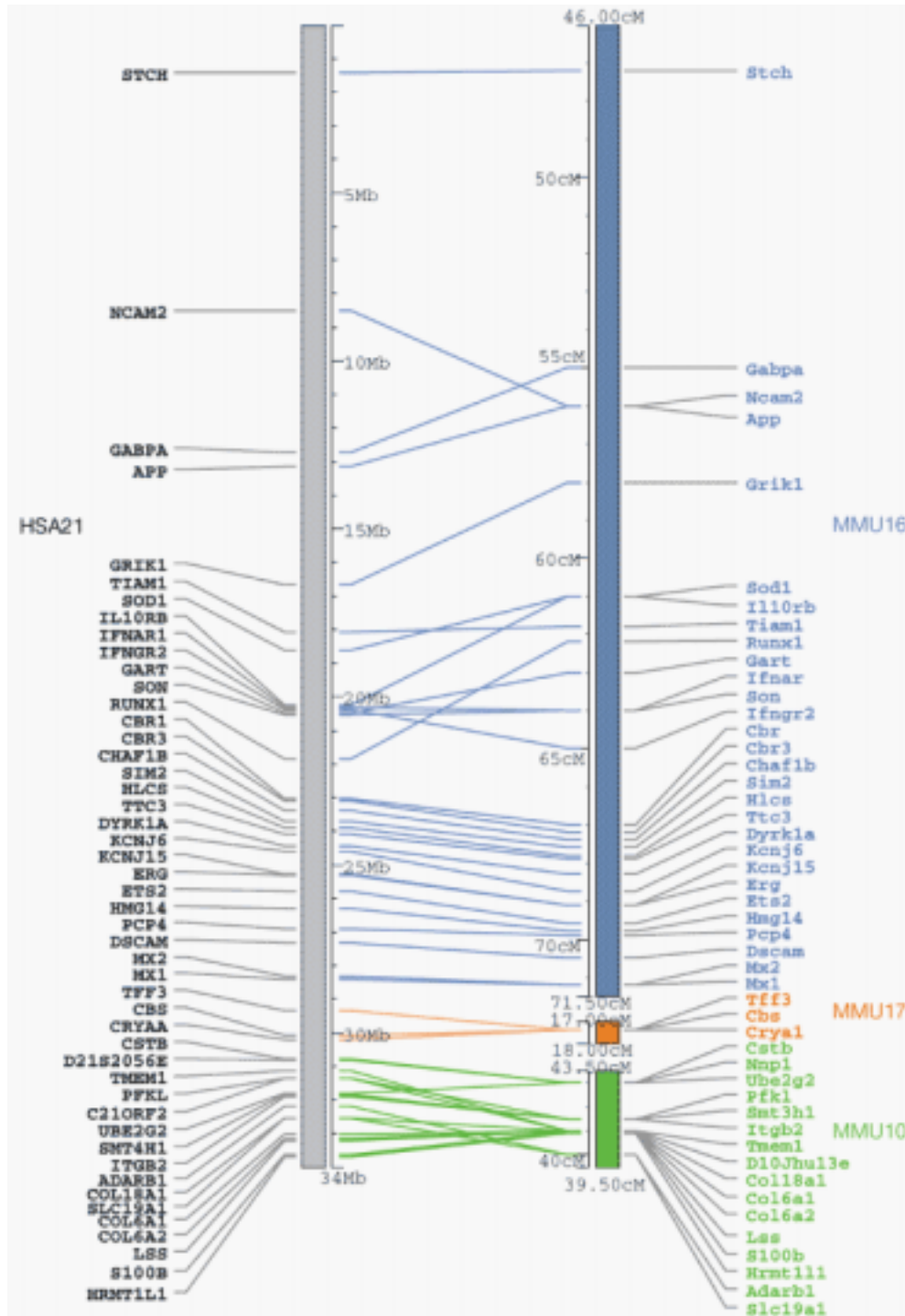


Figura 7. Relacions de sintènia entre el cromosoma 21 humà i els cromosomes 16, 17 i 10 de ratolí (extret de Hattori *et al.* 2000)

Una limitació a l'hora d'utilitzar Ts16 com a model, és que la gran majoria dels ratolins no arriben a néixer i, si ho fan, moren al poc temps, fet que dificulta molt l'anàlisi de molts trets fenotípics. La major part de les anomalies i disfuncions de la SD apareixen després del naixement i, fins i tot, a l'adult tardà, com són la formació de les plaques amiloidees, l'aparició de la leucèmia mieloproliferativa transitòria i la detecció de certs defectes cardíacs congènits. La mortalitat prenatal del ratolí Ts16 ha estat atribuïda a que el cromosoma 16 murí presenta homologia amb d'altres cromosomes humans -3, 8, 16, 22 - a més del 21 i per tant, la letalitat embrionària seria deguda a la triple dosi d'aquests altres gens (Kola & Hertzog, 1997; Kola & Hertzog, 1998).

La construcció de ratolins quimeres Ts16 (Cox *et al.* 1984), va pal·liar el problema de la mortalitat i va permetre el treball amb aquest model. D'acord amb els darrers experiments s'ha postulat que la neurogènesi cortical dels ratolins Ts16 és deficient degut a que la població de cèl·lules fundadores és insuficient (s'ha observat una reducció del 26% en relació als individus controls), així com per un increment de la taxa d'apoptosi (Haydar *et al.* 2000). Aquesta deficiència neuronal contribuirà a la hipocelularitat, laminació anormal i disminució de l'àrea de superfície típica del neocòrtex dels pacients SD.

Alguns autors no consideren el ratolí Ts16 un bon model per a l'estudi de les anomalies cardíques associades a SD i creuen que, en canvi, seria un model adient de la patogènesi conotruncal associada a la síndrome de DiGeorge (Waller *et al.* 2000). L'elevada similitud entre la regió proximal del cromosoma 16 de ratolí i la regió 22q11 humana, que conté la regió crítica de la síndrome de DiGeorge, és la base del seu argument. Per obviar l'elevada mortalitat prenatal dels ratolins Ts16, s'han esmerçat molts esforços en generar trisòmics parcials del cromosoma 16 de ratolí, i evitar així la indesitjada triple dosi de gens d'altres cromosomes.

6.2. Trisòmics parcials: Ts65Dn, Ts1Cje i Ms1Ts65

El model Ts65Dn, desenvolupat per Davisson l'any 1990 (Davisson *et al.* 1990), conté la regió *App-Mxl* triplicada. Això equival a 15.6 Mb i 108 gens predits del cromosoma 21 humà (Reeves *et al.* 1995; Sawa, 1999; Reeves *et al.* 2001). Els efectes fenotípics d'aquesta trisomia són múltiples: retard en el desenvolupament, mida

reduïda, hidrocefàlia, tremolors, defectes esquelètics i craneofacials, astrocitosi, esterilitat masculina, resposta disminuïda enfront el dolor, hiperactivitat, alteracions en el comportament i en l'aprenentatge visual i espacial (Reeves *et al.* 1995; Kola & Hertzog, 1998; Kola & Pritchard, 1999; Martínez-Cué *et al.* 1999; Gardiner & Davisson, 2001). Recentment, també s'ha descrit en aquest model una reducció del volum cerebelar, tret característic de molts afectes SD, associada a una baixa densitat de cèl.lules granulars (Baxter *et al.* 2000).

Un altre model és el ratolí Ts1Cje (Sago *et al.* 1998) trisòmic parcial per una regió més petita del cromosoma 16 que l'anterior. La regió triplicada comprèn 62 gens i abarca des de *Sod1* (encara que no és trisòmic funcional per la *Sod1*) fins *Mx1*. A nivell fenotípic és fèrtil, les deficiències d'aprenentatge són menys severes que les de TS65Dn, presenta hipoactivitat i no s'observa pèrdua de neurones colinèrgiques (revisat a Kola & Pritchard, 1999; Gardiner & Davisson, 2001).

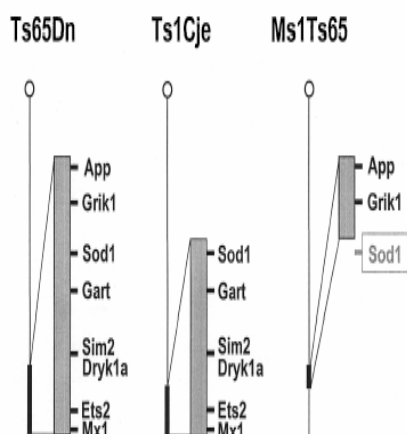


Figura 8. Esquema dels tres models murins trisòmics parcials pel cromosoma 16 (extret de Sago *et al.* 2000)

El model més recent és Ms1Ts65, conté triplicada la regió des de *App* fins *Sod1* (Sago *et al.* 2000). Aquest fragment correspon a la regió de diferència entre els dos models anteriors. La comparació d'aquests tres models (figura 8) permetrà excloure gens com a causants de determinats trets fenotípics: així, si un tret fenotípic és igual de sever a Ts65Dn que a Ts1Cje, es podria excloure la regió *App-Sod1* com a causant d'aquest tret.

Els estudis realitzats amb els models transgènics han permès identificar la regió *Sod1-Mx1* com la realment important per les deficiències d'aprenentatge, malgrat la regió

App-Sod1 també hi contribuiria, encara que el grau d'afectació és molt menor (els ratolins Ms1Ts65 presenten deficiències d'aprenentatge menys severes). Així mateix, la regió *App-Sod1* podria ser responsable de la hiperactivitat observada en Ts65Dn, encara que hi hauria una certa interacció amb els gens de la regió *Sod1-Mxl* ja que el ratolí Ms1Ts65 (amb només triple dosi de *App-Sod1*) no és hiperactiu (Sago *et al.* 2000).

Tot i que els trisòmics parcials analitzats presenten semblances amb el fenotip Down, cap dels models desenvolupats presenten les anomalies cardíques típiques de la SD, així com tampoc s'observen les plaques amiloidees.

6.3. Genoteques de ratolins *in vivo*

Una nova tècnica per identificar gens candidats de trets fenotípics concrets és generar genoteques de ratolins *in vivo* de grans regions genòmiques mitjançant la utilització de YACs (Smith *et al.* 1997). Es van utilitzar 4 YACs solapats de la regió 21q21.2 (152F7, 230E8, 141G6 i 285E6), que en total cobrien una regió de 2Mb, per crear una genoteca de ratolins transgènics i avaluar-ne les deficiències d'aprenentatge i memòria (Test del laberint d'aigua de Morris). Aquesta anàlisi va permetre determinar que els ratolins transgènics pel YAC 152F7 (180 kb) presentaven alteracions importants en l'aprenentatge. Posteriorment, es va identificar el gen *DYRK1A* (homòleg del *minibrain* de *Drosophila*), localitzat en el YAC 152F7, com un possible candidat causant de les deficiències d'aprenentatge (Chen & Antonarakis, 1997; Guimerà *et al.* 1997).

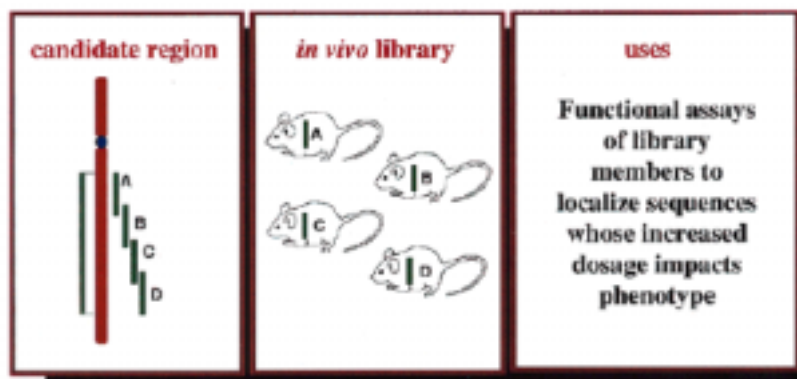


Figura 9. Esquema de l'estratègia de les genoteques *in vivo* (extret de Smith & Rubin, 1997)

Aquesta estratègia té l'avantatge que permet analitzar una regió gran del genoma per tal d'identificar possibles gens candidats de determinades anomalies (Rubin & Smith, 1997; Smith *et al.* 1997; Kola, 1997; Kola & Hertzog, 1998) (figura 9).

D'altra banda, també cal esmentar que mitjançant aquesta estratègia és pot aconseguir una correcta regulació del gen d'interés, ja que s'inclouen les regions reguladores pròpies (Lamb *et al.* 1993; Reeves *et al.* 2001).

6.4. Ratolins transgènics que contenen un cromosoma 21 humà

Una aproximació molt recent consisteix en generar ratolins que continguin un cromosoma 21 humà addicional, mitjançant transferència cromosòmica (*microcell-mediated chromosome transfer*, MMCT). Així, es generen cèl.lules ES amb el cromosoma 21 humà, que són posteriorment emprades per a generar ratolins quimeres (Hernández *et al.* 1999; Shinohara *et al.* 2001). El model obtingut emula molt bé el fenotip Down (incloent els defectes cardíacs que no s'havien observat en d'altres models), però la seva anàlisi resulta complexa, pel fet que cada ratolí quimera presenta un patró diferent de cèl.lules trisòmiques i disòmiques.

6.5. Ratolins transgènics que sobreexpressen gens del cromosoma 21

Ratolins transgènics que sobreexpressin gens concrets del cromosoma 21 poden ser molt útils per determinar la contribució de determinats gens al fenotip SD. Fins el moment, s'han generat ratolins transgènics que sobreexpressen els gens: *ETS2*, *APP*, *HMG14*, *S100β*, *SOD1*, *PFKL*, *SIM2*, *DYRK1A*. La sobreexpressió de *SOD1* a ratolins, un enzim clau en el metabolisme dels radicals lliures, provoca hipoplàsia tímica, un increment en els nivells de serotonina al plasma, i anomalies a la llengua i juntes neuromusculars (Epstein *et al.* 1987; Ceballos-Picot *et al.* 1991; Peled-Kamar *et al.* 1995; Kola & Hertzog, 1998; Pritchard & Kola, 1999). S'ha vist que els ratolins que sobreexpressen *SOD1* desenvolupen malaltia neuronal motora quan són exposats a alts nivells de peròxid d'hidrogen (Kola & Hertzog, 1997). Així mateix, la sobreexpressió de la *SOD1* mutada provoca una neurodegeneració motora en l'animal similar a la desenvolupada a la esclerosi lateral amiotròfica (ALS). Els ratolins

transgènics pel factor neurotròfic S100 β desenvolupen astrocitosi, presenten defectes d'aprenentatge i memòria espacial i un desenvolupament dendrític anormalment accelerat (Whitaker-Azmitita *et al.* 1997; Kola & Hertzog, 1998; Pritchard & Kola, 1999). A més, en aquests ratolins s'observen signes evidents de processos d'envelliment, la qual cosa s'ha relacionat amb un envelliment accelerat i l'aparició prematura de la malaltia d'Alzheimer en pacients SD (Whitaker-Azmitita *et al.* 1997; de la Monte, 1999). En ratolins transgènics que sobreexpressen el factor de transcripció *ETS2* s'hi observen alteracions craneofacials que inclouen braquicefàlia, alteracions en la forma del cap i disgènesi esquelètica. En conjunt, els animals transgènics són més petits i tenen el coll més curt (Sumarsono *et al.* 1996; Kola & Hertzog, 1997; Kola & Hertzog, 1998; Pritchard & Kola, 1999). Els ratolins transgènics per *HMG14*, una proteïna implicada en la regulació de l'estructura de la cromatina, desenvolupen cists epitelials i presenten un timus anòmal (Kola & Hertzog, 1997; Kola & Hertzog, 1998; Pritchard & Kola, 1999). La sobreexpressió de *PFKL*, que és un dels enzims claus de la via glicolítica, causa una glicòlisi anòmala al fetge i un metabolisme accelerat de la glucosa al cervell dels ratolins transgènics, trets observats en els individus amb SD (Peled-Kamar *et al.* 1998; Pritchard & Kola, 1999).

Actualment es generen models murins que sobre- i subexpressen *DYRK1A* (l'homòleg humà del gen *Minibrain* de *Drosophila*) (Guimerà *et al.* 1996; Guimerà *et al.* 1997; Guimerà *et al.* 1999). Mentre que els ratolins *Dyrk1A* (-/-) no són viables, els ratolins *Dyrk1A* (+/-) són viables fins l'etapa juvenil i, a més, són fèrtils, però de mida i pes reduïts respecte els controls de la mateixa lludrigada. Els ratolins que sobreexpressen *Dyrk1A* mostren un retard en el desenvolupament neuromotor, una latència retardada en l'activitat motora i una marcada hiperactivitat. Es dedueix per tant, que la sobreexpressió de *Dyrk1A* és suficient per provocar alteracions de comportament i aprenentatge similar al Down.

Finalment, una altra estratègia per poder avaluar els efectes d'un únic gen en el fenotip del ratolí consisteix en deleccionar una còpia d'un gen triplicat mitjançant entrecreuaments amb ratolins *knockout* pel gen en qüestió, com s'ha fet amb el gen IFNAR (Mauron *et al.* 2000; Hallam *et al.* 2000).

7. Peroxiredoxines (PRDXs)

7. 1. L'estrés oxidatiu i les peroxiredoxines

L'estrés oxidatiu ha estat implicat en nombroses malalties neurodegeneratives humanes com són la SD (Busciciglio & Yanker, 1995; Iannello *et al.* 1999), les malalties d'Alzheimer (Smith *et al.* 2000), Parkinson i Huntington, l'esclerosi lateral amiotròfica (ALS) (Jones *et al.* 1994; Iannello *et al.* 1999), distròfies musculars, arteriosclerosi i els processos d'envelliment en general (revisat a Matés, 2000; Forsberg *et al.* 2001).

Les espècies reactives d'oxigen (ROS) i els radicals lliures es produeixen com a resultat del metabolisme cel.lular normal. A baixes concentracions poden actuar com a molècules senyalitzadores i potents reguladors de l'expressió gènica (revisat a Finkel 1998; Iannello *et al.* 1999), però a concentracions elevades, és a dir, quan la producció de ROS sobrepassa les possibilitats dels sistemes antioxidants cel.lulars, aquestes molècules poden tenir efectes deleteris sobre proteïnes, lípids, carbohidrats i DNA. En un esforç de minimitzar aquests danys, els organismes han desenvolupat tota una bateria d'enzims antioxidants per fer front a aquest dany oxidatiu.

Les Peroxiredoxines (PRDXs) constitueixen una família d'enzims descoberta recentment, amb una funció antioxidant. Redueixen el peròxid d'hidrogen i els alquil hidroperòxids a aigua i alcohol respectivament, utilitzant els equivalents reductors derivats específicament de molècules donadores que contenen un grup tiol (Lim *et al.* 1993; Chae *et al.* 1994abc). És tracta d'una família gènica amb més de 100 membres descrits, i molt conservada des de bacteris fins a humans. El nom de la família indica que són peroxidases que utilitzen residus cisteïnics conservats en els dominis actius (Chae *et al.* 1994c; revisat a Oberley *et al.* 2001). Les PRDXs es coneixien abans com peroxidases de tioredoxina (TPXs) perquè la reducció del peròxid d'hidrogen es produïa amb els electrons proporcionats per la tioredoxina (TRX) (Lim *et al.* 1993; Chae *et al.* 1994 a, b, c). De fet, alguns membres no utilitzen la TRX com agent reductor, per tant no totes són TPXs propiament dites i d'aquí sorgeix la nomenclatura actual de peroxiredoxines (Chae *et al.* 1994c).

En quant a la seva funció *in vivo*, a més de la seva activitat antioxidant, les PRDXs han estat associades a la proliferació i diferenciació cel.lulars, l'estimulació de limfòcits T assassins, la protecció de proteïnes sensibles als radicals lliures, al

metabolisme del grup hemo i a la senyalització cel.lular (Ishii *et al.* 1995; Jin *et al.* 1997; Haridas *et al.* 1998; Lim *et al.* 1998; Sarafian *et al.* 1999).

7. 2. Membres de la família de les PRDXs

La família de les peroxiredoxines es divideix en dos grans grups (taula 5). Totes les *PRDXs* tenen un residu cisteïna (*Cys*) a la regió NH₂-terminal (homòleg a *Cys*₄₇ de llevat) i a més, la majoria presenten una segona *Cys* a la regió COOH-terminal (homòloga a *Cys*₁₇₀ de llevat). Ambdues estan separades per 120-123 aminoàcids i el nivell de conservació en les seqüències que envolten ambdós residus *Cys* és molt elevat. Així, la família *PRDX* d'acord amb la seva estructura primària es subdivideix en: *PRDXs* amb 2-*Cys* (*PRDX1-5*) i amb 1-*Cys* (*PRDX5-6*) (Chae *et al.* 1994c; Kang *et al.* 1998b; Lee *et al.* 1999; Seo *et al.* 2000).

Taula 5. Organització dels membres de peroxiredoxines segons la seva seqüència aminoacídica. Entre parèntesi s'indica la diversitat de noms descrits per a cada un dels membres de la família. Així mateix, es mostra la controvèrsia a l'hora de classificar la *PRDX5*

PRDXs 2-Cys	PRDXs 1-Cys
PRDX1 (NKEFA, MSP23, PAG)	
PRDX2 (NKEFB, TSA, TDPX1)	
PRDX3 (SP22, AOP1, MER5)	
PRDX4 (AOE372, TRANK)	
PRDX5 (AOP2, ACR1, PMP20)	↔ PRDX5 (AOP2, ACR1, PMP20)
	PRDX6

Les *PRDXs* redueixen el peròxid d'hidrogen utilitzant els equivalents reductors derivats específicament de molècules donadores que contenen un grup tiol. La *Cys* de l'extrem N-terminal constitueix el lloc d'oxidació pels peròxids. Quan aquest residu (*Cys-SH*) és oxidat passa a àcid sulfènic (*Cys-SOH*), i immediatament forma un dímer antiparalel amb la *Cys-SH* d'una altra *PRDX* mitjançant un pont disulfur (Chae *et al.* 1994b) (figura 10). Aquest enllaç es posteriorment reduït per una molècula del tipus de la tioredoxina (*TRX*).

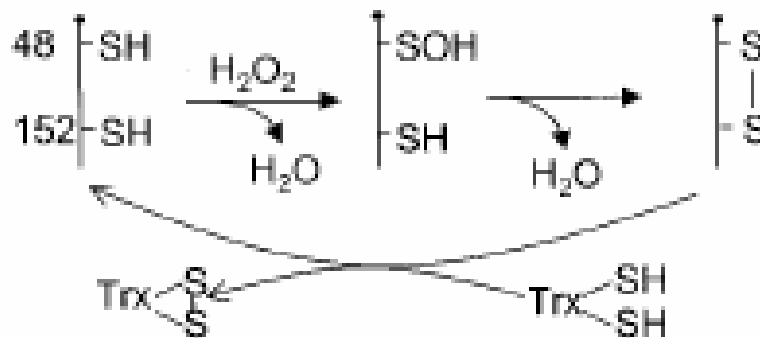


Figura 10. Esquema d'actuació de les PRDXs (extret de Kang *et al.* 1998)

7. 3. Possibles funcions de les PRDXs

Tot i que l'activitat peroxidasa és general per a tots els membres de la família, s'han postulat d'altres funcions no relacionades directament amb l'activitat enzimàtica.

PRDX1, també anomenada *NKEFA* (*natural killer enhancing factor A*), o *MSP23* (*mouse stress inducible protein 23Kd*) o *PAG* (*proliferator associated gene*), va ésser descrita inicialment com una proteïna capaç d'enllaçar grups hemo i d'estimular l'activitat citotòxica de cèl.lules assassines (Ishii *et al.* 1995). Recentment, s'ha observat un increment en l'expressió de *PRDX1* a pulmó de primats recent nascuts, probablement important per la transició d'un ambient relativament anaeròbic a un aeròbic, durant el naixement (Das *et al.* 2001). Així mateix, s'ha descrit que la sobreexpressió de *PRDX1*, detectada en cèl.lules transfectades amb *TRX-1* (*thioredoxin 1*), causa un efecte protector de l'apoptosi induïda per H_2O_2 , però no per altres agents citotòxics (Berggren *et al.* 2001).

PRDX2, també anomenada *NKEFB* (*natural killer enhancing factor B*), o *TSA* (*tiol specific antioxidant*) (Chae *et al.* 1994abc; Kim *et al.* 1997), al igual que *PRDX1*, també va ser inicialment descrita per la seva capacitat d'estimular l'activitat de les cèl.lules assassines. En un principi també se la va anomenar *TDPX1* (*thioredoxin dependent peroxide reductase 1*), però en canviar el nom de la família va passar a

anomenar-se *PRDX2*. El gen de *PRDX2* en humans va ser mapat a 13q12 mitjançant PCR sobre un pannel d'híbrids somàtics i FISH sobre preparacions de limfòcits (Pahl *et al.* 1995).

PRDX3, també anomenada *MER5* (*murine eritroleukemia-related 5*) o *AOP1* (*antioxidant protein 1*) o *SP22* (*22kD protein ADP dependent protease substrate*), es va identificar originàriament com un gen implicat en la diferenciació de cèl.lules MEL (*murine eritroleukemia cells*), i també com un substrat de la proteasa mitocondrial depenent de ATP (Watabe *et al.* 1997). A més, s'ha demostrat que la ciclofilina 18 (*Cyp18*) és capaç d'unir-se a *AOP1* i estimular la seva activitat (Jänschke *et al.* 1998). *PRDX1* i *PRDX2* són de localització citoplasmàtica, mentre que *PRDX3* es localitza majoritàriament als mitocondris i és capaç d'inhibir la permeabilitat transitòria de membrana, considerat un dels primers passos en el procés d'apoptosi (Kowaltowski *et al.* 1998).

PRDX4, també anomenada *AOE372* (*antioxidant enzyme clon 372*) o *TRANK* (*thioredoxin peroxidase-related activator of NFκβ i c-Jun N-terminal kinase*), actua com a citokina en l'activació de NFκβ i en la inducció de la sintetasa d'òxid nítric en astròcits de rata mitjançant un mecanisme mediat per receptor (Jin *et al.* 1997; Haridas *et al.* 1998). La *PRDX4* és una forma secretora que funciona en l'espai extracel.lular (Matsumoto *et al.* 1999). Recentment, ha estat implicada en la formació de l'acrosoma durant l'espermioogènesi de rata gràcies a la seva conversió de forma soluble a lligada a membrana (Sasagawa *et al.* 2001).

PRDX5, o també *AOP2* (*Antioxidant 2*) o *ACR1* o *PMP20* (Berggren *et al.* 2001), presenta un mecanisme de reacció diferent al de les altres *PRDXs* amb 2-Cys (Seo *et al.* 2000). Es localitza al citosol, mitocondris i peroxisomes (Seo *et al.* 2000). Com a intermediari de la reacció de la peroxidasa, es forma un pont disulfur intramolecular en lloc del intermolecular que dona lloc al típic dímer antiparalel (Seo *et al.* 2000) (figura 11). Aquest fet ha generat controvèrsia a l'hora de classificar-la en el conjunt de les *PRDXs* (veure taula 5) ja que només presenta conservada la Cys NH₂-terminal (Cys₄₇ de llevat), però a més presenta una altre Cys₁₅₂ (que no correspon a la Cys₁₇₀ de llevat) i que també és necessària per l'activitat reductora de peròxids depenent de *TRX* (Seo *et al.* 2000).

PRDX6, només presenta 1 de les Cys conservades i sembla que no és capaç de rebre els electrons de la **TRX** per realitzar la seva activitat peroxidasa (Kang *et al.* 1998b). Es tracta d'un enzim bifuncional perquè presenta activitat fosfolipasa 2 a més d'activitat glutatió peroxidasa (Kang *et al.* 1998b; Lee *et al.* 1999; Chen *et al.* 2000). Aquesta activitat glutatió peroxidasa *in vitro* és molt inferior a la que presenta en utilitzar molècules no fisiològiques, com ara DTT (Chen *et al.* 2000; Lee *et al.* 2001) (figura 11).

Per aquest motiu, en un intent de buscar un altre possible donador fisiològic d'electrons per la reacció de la peroxidasa, s'ha identificat la ciclofilina A (*CypA*) com una proteïna capaç d'interaccionar amb **PRDX6** i d'estimular la seva activitat peroxidasa (Lee *et al.* 2001).

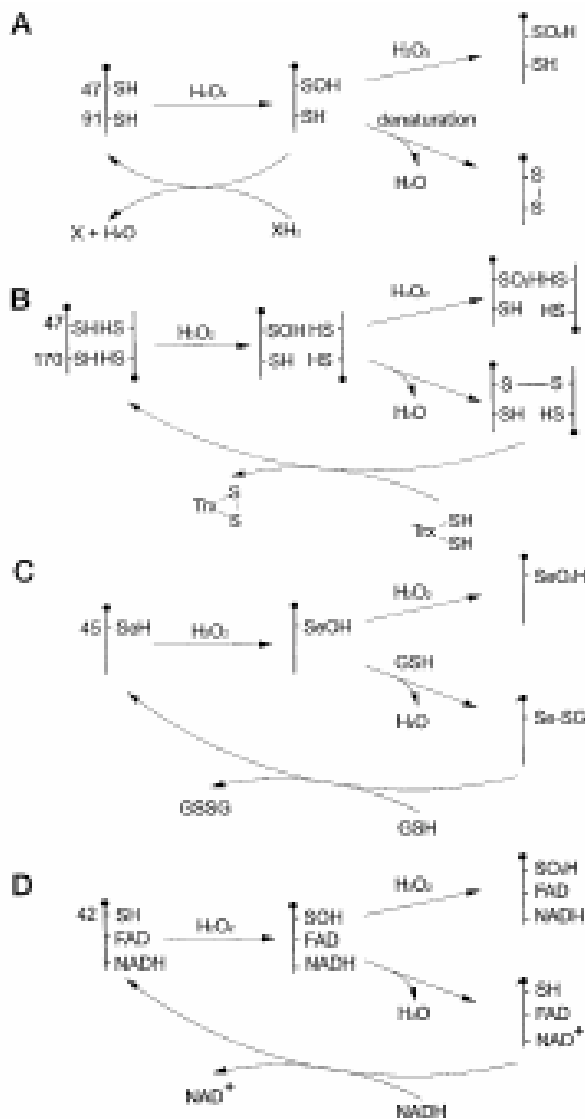


Figura 11. Esquema general d'actuació de les peroxidases: **A.** **PRDX5 (2-Cys)** i formació del atípic pont disulfur intramolecular; **B.** **PRDX5 mutada (R152S)**; **C.** **PRDX1** (representativa de la família de **PRDXs** amb 2-Cys) i formació del típic dímer antiparalel; **D.** **PRDX6** (representativa de la família de **PRDXs** amb 1-Cys) utilitzant DTT o un donador fisiològic desconegut encara (extret de Seo *et al.* 2000)

7. 4. *PRDX2* (*NKEFB*, o *TSA*, o *TDPX1*)

PRDX2 o *TSA* va ser inicialment aïllat a llevats (*tsa*), on mitjançant mutants disrupcionats per *tsa* es va demostrar un creixement més lent en condicions aeròbiques (especialment en presència d' H_2O_2) (Chae *et al* 1993). Així mateix, es va determinar una inducció de 3-4 vegades més en l'expressió de *tsa* en condicions d'estrés oxidatiu (Chae *et al* 1993). Posteriorment, s'ha demostrat la seva inducció en presència d' H_2O_2 (Kim *et al.* 1997; Mitsumoto *et al.* 2001).

En 1994 es va clonar l'homòleg de *tsa* a mamífers, en concret a cervell de rata, i es va posar de manifest la seva capacitat de protecció de la glutamina sintetasa, un enzim molt sensible a l'estrés oxidatiu, per tant es proposà la seva implicació en la protecció de macromolècules en front del dany oxidatiu, fenomen associat a la seva capacitat d'eliminar H_2O_2 (Lim *et al.* 1993; Chae *et al* 1994a; Yim *et al.* 1994; Netto *et al.* 1996).

L'anàlisi de mutacions dels dos residus *Cys* (R47S, R170S) de *tsa* de llevats va demostrar que la *Cys*₄₇ era el lloc actiu d'oxidació, però que ambdues *Cys* eren necessàries per a la formació d'un dímer antiparal·lel amb una altre subunitat de peroxiredoxina en la forma oxidada (Chae *et al* 1994b). També s'ha demostrat que la molècula donadora dels electrons per a que tingui lloc la reacció de peroxidasa és la tioredoxina (*TRX*) (Chae *et al* 1994c; Chae *et al.* 1999) (figura 10).

Diversos autors han demostrat que la sobreexpressió de *PRDX2* en cultius cel·lulars evita l'acumulació de peròxid d'hidrogen a les cèl·lules, inhibint així els fenòmens apoptòtics (Kim *et al.* 1997; Zhang *et al.* 1997; Kang *et al.* 1998a; Shau *et al.* 1998; Kim *et al.* 2000).

Un conjunt d'evidències experimentals semblen indicar que les peroxiredoxines, en general, tenen com a funció principal l'eliminació de l' H_2O_2 que es produeix freqüentment en els processos intracel·lulars i que exerceix un paper de missatger secundari. Aquesta afirmació es basa en: i) l'afinitat de les peroxiredoxines per l' H_2O_2 , molt superior a la de la catalasa, ii) la inhibició de l'activitat peroxidasa de les *PRDXs* a concentracions elevades d' H_2O_2 (>100 μM), i iii) l'abundància i varietat de *PRDXs* en diferents cèl·lules i teixits (Lee *et al.* 2001).

8. Proteïnes citoplasmàtiques d'unió a àcids grassos (*fatty acid binding proteins, FABPcs*)

8. 1. La família de les FABPcs

Les proteïnes citoplasmàtiques d'unió a àcids grassos (FABPcs) formen una gran família de proteïnes que enllacen lípids (*lipid binding protein: LBP*) on, a més de les FABPcs, s'inclouen les proteïnes d'unió a àcid retinoic (*cellular retinoic acid-binding proteins: CRABPs*), a retinol (*cellular retinol-binding proteins: CRBPs*), a α -tocoferol (*α -tocoferol-binding proteins: TBPs*) i a acil-CoA (*acylCoA binding proteins: ACBPs*) (Dutta-Roy, 2000).

Les FABPcs, proteïnes abundants amb una masa molecular compresa entre 14 i 16 kD, s'uneixen a lligands hidrofòbics de tipus àcid gras, d'una manera no covalent i reversible (revisat a Bernlohr *et al.* 1997; Coe & Bernlohr, 1998; Hertzell & Bernlohr, 2000).

L'estructura gènica de la família FABPc està molt conservada. Tots els membres estudiats presenten 4 exons de mida constant i 3 introns més variables. L'única excepció és la FABP muscular de *Drosophila* amb una estructura genòmica de 3 exons/2 introns (Stewart, 2000). Aquesta conservació es manté també en les CRBPs i CRABPs (Bernlohr *et al.* 1997).

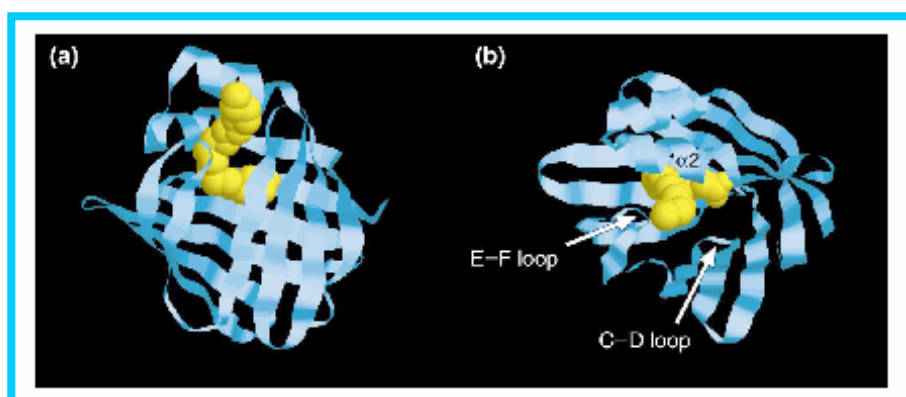


Figura 12. Estructura tridimensional de les FABPcs (extret de Hertzell & Bernlohr, 2000)

La identitat de seqüència aminoacídica entre els 9 membres de la família FABPcs varia entre un 20% i un 70%. El tret més característic d'aquestes proteïnes és la formació d'una estructura de barril β (figura 12a).

Aquest barril està format per 10 cadenes β unides mitjançant ponts d'hidrogen i formant dues làmines β ortogonals. Encara que la cavitat formada per aquesta estructura és gran (entre 300 o 600 Å), la majoria de les FABPc només lliguen un àcid gras per cavitat (a excepció de FABPI, de fetge, que en lliga dos) (Coe & Bernlohr, 1998; Stewart, 2000). Cap a l'extrem N-terminal les FABPcs tenen un motiu *helix-loop-helix* en forma de capell a la part de dalt del barril, que s'obriria per facilitar l'entrada de l'àcid gras (figura 12b) (Bernlohr *et al.* 1997; Coe & Bernlohr, 1998; Hertzell & Bernlohr, 2000).

8. 2. Membres de la família FABPcs

En humans s'han identificat 9 membres d'aquesta família que es van anomenar X-FABPc segons el teixit d'origen (on X: teixit on primer es va caracteritzar i c: citoplasmàtica) (Bernlohr *et al.* 1997; Coe & Bernlohr, 1998; Hertzell & Bernlohr, 2000; Veerkamp *et al.* 2000). Actualment, però, segons el comitè HUGO de nomenclatura del genoma humà, els membres d'aquesta família reben el nom de FABPn (éssent n un numeral).

La majoria dels membres d'aquesta família tenen en comú que són abundants en el citosol de molts tipus cel·lulars. L'expressió gènica està molt regulada i restringida a cèl·lules on hi ha un flux actiu d'àcids grassos. L'expressió s'incrementa sota condicions d'activitat metabòlica i/o demanda elevada (Coe & Bernlohr, 1998).

A la taula 6 es descriu el patró d'expressió dels diferents membres de la família. Alguns presenten un patró específic, mentre que d'altres s'expressen de forma molt més genèrica. El fet de trobar més d'un tipus de FABPc en un mateix teixit, sembla indicar altres funcions addicionals a més de la d'una simple molècula transportadora (Stewart, 2000).

Taula 6. La família multigènica de FABPcs (extret de Hertzell & Bernlohr, 2000)

Nom gen	Teixit
FABP1	Fetge, intestí, ronyó, pulmó
FABP2	Intestí
FABP3	Cor, múscul esquelètic, glàndula mamària
FABP4	Teixit adipós, macròfags
FABP5	Pell , teixit adipós, cèl.lules endotelials i mamàries, pulmó, cervell, estómac, llengua, placenta, cor, múscul esquelètic, intestí, testicle, retina
FABP6	I leum
FABP7	Cervell, bulb olfatori
FABP9	Testicle
MP2	Cèl.lules de Schwann

8. 3. Possibles funcions

La insolubilitat dels àcids grassos en ambients aquosos fa necessària la presència de molècules específiques que permetin el seu trànsit segons les necessitats cel.lulars. S'han presentat diverses hipòtesis sobre les funcions de les FABPcs, com ara la captació, emmagatzematge i alliberació dels àcids grassos en el nucli, facilitant així que aquestes molècules funcionin com a cofactors reguladors de la transcripció de gens involucrats en el metabolisme lipídic i la diferenciació cel.lular (Revisat a Bernlohr *et al.* 1997; Stewart, 2000).

Experiments amb liposomes i àcids grassos marcats radioactivament o per fluorescència han demostrat una transferència d'àcids grassos des de les FABPcs cap a les membranes, de les membranes cap a les FABPcs i finalment entre membranes via FABPcs (Veerkamp *et al.* 2000). D'aquesta manera, les FABPs protegrien les cèl.lules dels efectes deleteris d'un excés d'àcids grassos i participarien activament en la ubicació dels àcids grassos en determinats espais intracel.lulars (Bernlohr *et al.* 1997). Alguns autors consideren que, en determinades situacions, les FABPcs podrien actuar com a segrestadores del seu lligand, en lloc d'emmagatzemar-lo, regulant també així la seva funció. Aquestes observacions permeten considerar que les

FABPcs actuarien com a xaperones més que com a simples tamponadores dels nivells d'àcids grassos cel.lulars (Hertzel & Bernlohr, 2000).

Recentment s'ha descrit que alguns membres de la família regulen la diferenciació i proliferació cel.lular gràcies a la seva interacció amb el complex de traducció de proteïnes, tot i que el mecanisme d'actuació és encara desconegut (Zimmerman & Veerkamp, 1998).

En quan a evidències experimentals recents, s'ha descrit que fibroblasts transfectats amb *FABP1* incrementen la captació d'àcids grassos i la capacitat d'esterificació de lípids específics; *FABP2*, en canvi, sols es capaç d'incrementar l'esterificació lipídica. Els estudis amb el ratolí *knockout* per *FABP3* (*HFABPc*) han revelat dades interessants. Aquests animals presenten un descens del 45% en la captació de palmític i, com a conseqüència d'aquest fet, el múscul cardíac fa servir sucre (glucosa) com a font d'energia, fet que provoca un dramàtic increment en el transport de glucosa en els miòcits (Schaap *et al.* 1999).

Els ratolins deficientes per *FABP4* no presenten anomalies en els adipòcits. Aquesta deficiència però, va acompanyada d'un increment en l'expressió de *FABP5*, 20-40 vegades. A més, la sobreexpressió de *FABP5* es troba sovint associada a diversos tipus d'alteracions en la composició de lípids com són: papil.lomes benignes, carcinomes, queratinòcits psoriàtics, així com també, en la glia de l'hipocamp del cervell després d'un tractament amb àcid caínic (Hertzel & Bernlohr, 2000).

8. 4 FABP de cervell (*FABP7* o *BFABP: brain fatty acid binding protein*)

FABP7 (*BFABP*) s'expressa en les cèl.lules dels sistema radial de fibres glials durant el desenvolupament del sistema nerviós central de ratolins i també en algunes poblacions de cèl.lules glials adultes, com les cèl.lules de Bergmann i un conjunt de línies cel.lulars de gliomes malignes (Feng *et al.* 1994; Kurtz *et al.* 1994; Godbout *et al.* 1998; Bisgrove *et al.* 2000).

Es considera que *FABP7* té un paper molt important en la formació del sistema radial de fibres glials, ja que és necessari per a la correcta migració de les neurones immadures cap a les capes corticals (Feng *et al.* 1994; Kurtz *et al.* 1994; Feng

&Heintz, 1995). En suport a la hipòtesi anterior cal assenyalar que els anticossos anti-FABP7 inhibeixen la formació del sistema radial esmentat, així com la diferenciació glial i neuronal en cultius primaris, sense afectar l'adhesió i proliferació cel.lular (Feng *et al.* 1994; Feng & Heintz, 1995).

Mitjançant el crivellatge d'una genoteca de cDNAs de cervell fetal humà es va aïllar el cDNA de *FABP7* (o *BFABP*) (Shimizu *et al.* 1997). Aquest cDNA (754 pb) codifica per una proteïna de 132 aminoàcids (15 Kd). El gen *FABP7* ha estat mapat al cromosoma 6q22-23 mitjançant FISH sobre preparacions de limfòcits humans (Godbout *et al.* 1998).

El lligand de *FABP7 in vivo* és l'àcid docosahexanoic (DHA), el principal àcid gras de cadena llarga (LCFA) de la barreja de fosfolípids del cervell (Xu *et al.* 1996). Deficiències en DHA s'associen a desordres neurològics greus i progressius (Innis *et al.* 1991; Martínez *et al.* 1996). Donada la correlació existent entre el requeriment de DHA i el patró d'expressió de *FABP7* durant el desenvolupament del SNC s'hipotetitza que *FABP7* juga un paper important en el transport i metabolisme de DHA (Xu *et al.* 1996).

Objectius

Les malalties hereditàries monogèniques són les més accessibles a l'anàlisi genètic-molecular i, per tant, són les que han estat més estudiades i es coneixen millor. No obstant, les malalties multifactorials i les patologies que tenen una base complexa són menys conegudes, però molt més prevalents en els humans.

La SD és una patologia genètica complexa, causada per la trisomia del cromosoma 21. En aquest cromosoma s'han predit 225 gens, dels quals 127 han estat caracteritzats. Malgrat conèixer la completa seqüència del cromosoma 21, la base molecular de la patologia és encara desconeguda.

En aquest contexte, ens varem proposar aplicar metodologies específiques per abordar els objectius següents:

1. Cercar gens amb expressió diferencial en cervells de fetus Down (trisòmics) respecte controls (disòmics), mitjançant hibridació substractiva supressora i *differential display* PCR
2. Analitzar funcionalment els gens identificats, per tal d'esbrinar la seva relació amb la trisomia del cromosoma 21 i la seva contribució al fenotip Down

Capítol 1. Aproximació a l'estudi de l'expressió gènica diferencial entre individus Down i controls. Metodologies

La síndrome de Down és una malaltia genètica molt complexa. L'anàlisi de l'expressió gènica diferencial és una estratègia complementària a la cerca de gens situats en el cromosoma 21. Aquesta aproximació permet identificar gens d'altres cromosomes que, degut a l'efecte de dosi gènica associat a la trisomia, presenten alteracions en la seva expressió. L'anàlisi funcional d'aquests gens pot desvetllar nous mecanismes i interaccions moleculars que incideixen en el fenotip SD. Amb aquesta finalitat es van posar a punt les següents tècniques:

A. *Differential display-PCR* (DD-PCR)

B. *Suppression Subtractive hybridization* (SSH)

A. Differential display-PCR (DD-PCR)

La tècnica del *Differential Display PCR* (Mc Clelland *et al.* 1995; Liversey *et al.* 1996) permet comparar dues poblacions de cDNAs i identificar els gens que s'expressen diferencialment. En aquest treball es va posar a punt la tècnica seguint les instruccions dels proveïdors (Clontech) per al *kit Delta-TM Differential Display PCR*.

MATERIAL I MÈTODES

1. OBTENCIÓ DE MOSTRES

Es varen emprar cervells fetals humans de mascles Down i control, de 18 a 23 setmanes de gestació (inicialment, 3 individus de cada població). Les mostres van ser cedides per l'Hospital de la Vall d'Hebron i gaudeixen de l'aprovació del Comitè Ètic de l'Hospital.

2. EXTRACCIÓ DE RNA TOTAL

El mètode d'extracció de RNA total es basa en una homogeneïtzació del teixit en una solució amb elevada concentració de tiocianat de guanidina, que és un potent inhibidor de les ribonucleases, i posterior aïllament de RNA mitjançant tractaments amb fenol a pH àcid (Chomczynski i Sacchi, 1987).

3. SÍNTESI DE cDNA

Es va retrotranscriure el RNA total (2 µg) a 42°C durant 1.5 h amb l'enzim MMLV-RT (Promega), en un volum final de 10 µl, fent servir un encebador oligo-d(T) (1 µl) i seguint les condicions indicades pels proveïdors (Clontech).

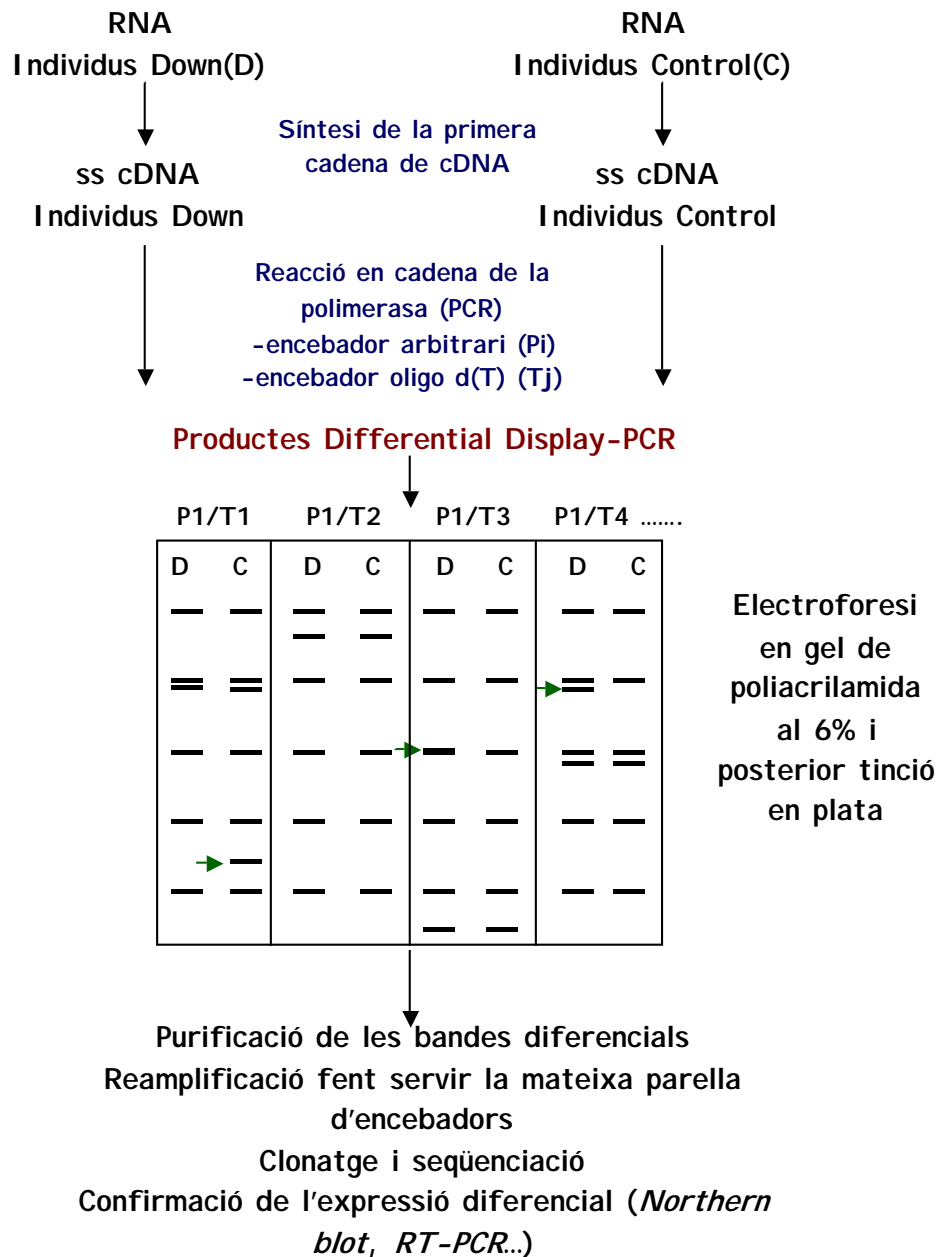


Figura 1. Esquema del *differential display PCR*

Un cop finalitzada la reacció es van preparar dues concentracions diferents per a cada una de les mostres: **A**= 8 µl de la solució de cDNAs en 72 µl d'H₂O i **B**= 2 µl de la solució de cDNAs en 78 µl d'H₂O. Un cop al·liquotats, els cDNAs es van mantenir a -80°C per evitar la seva degradació.

4. AMPLIFICACIÓ MITJANÇANT LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacció d'amplificació no és una PCR convencional. Es van utilitzar diverses parelles d'encebadors formades cadascuna per un encebador que contenia una seqüència oligo-d(T)NN (**Ti**) i un altre arbitrari (**Pj**) (taula 1). Es van fer duplicats de cada mostra (dilucions A i B) i es va introduir un control negatiu per a cada parella d'encebadors.

Les condicions de PCR van ser: 3 cicles a baixa temperatura (40 °C), per tal de permetre l'anellament imprecís dels encebadors arbitraris, i 25 cicles a una temperatura d'anellament més elevada (60 °C) per a l'amplificació del producte.

Taula 1. Encebadors arbitraris (Pi) i (Tj)

ENCEBADORS ARBITRARIS

P1: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA-3'
 P2: 5'-ATTAACCCTCACTAAATCGGTCATAG-3'
 P3: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTGG-3'
 P4: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG-3'
 P5: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGATCTGACTG-3'
 P6: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG-3'
 P7: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGTATG-3'
 P8: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGGAGCTGG-3'
 P9: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGTGGCAGG-3'
 P10: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGCACCGTCC-3'

ENCEBADORS OLIGO d(T)-NN

T1: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAA-3'
 T2: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAC-3'
 T3: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAG-3'
 T4: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCA-3'
 T5: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCC-3'
 T6: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCG-3'
 T7: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGA-3'
 T8: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGC-3'
 T9: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGG-3'

5. ELECTROFORESI EN GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALITZANT

Els productes de PCR van ser separats en un gel de seqüenciació al 6% de poliacrilamida (29:1) i 8 M de urea en TBE x0.5 en el *Sequencing Gel Electrophoresis Apparatus* Model S2001 (GIBCO-BRL). Els gels d'acrilamida van ser tenyits en plata (seguint protocols convencionals) per visualitzar les bandes, a diferència de les instruccions del proveïdor, on es recomana marcar radioactivament els productes de la PCR amb [α -³³P]-dATP i visualitzar les bandes per autoradiografia.

RESULTATS

Malgrat els esforços esmerçats, no es van trobar diferències consistents entre les dues poblacions. En total es van analitzar més de 30 parelles d'encebadors sense poder extreure'n cap resultat consistent i repetitiu degut a la gran variabilitat interindividual existent. De fet, aquesta tècnica ha esdevingut molt eficaç per l'estudi de l'efecte de diverses substàncies o diferents situacions estressants sobre cèl.lules en cultiu, on les diferències de fons genètic són mínimes. En el nostre cas, les diferències entre individus Down i control, degudes al fons genètic, eren massa importants per facilitar l'obtenció d'algun resultat repetitiu (figura 2). Per aquest motiu es va decidir posar a punt la hibridació substractiva supressora.

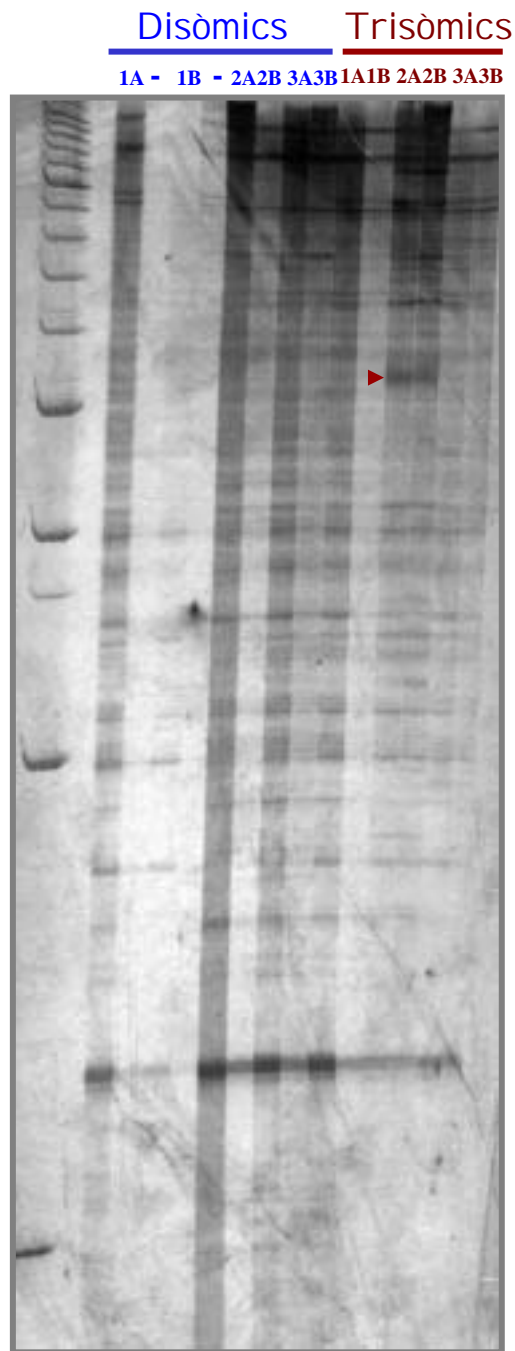


Figura 2. Imatge d'un gel de DD-PCR fent servir la parella T7/P7. A la part superior s'indica el nombre d'individus analitzats per a cada una de les poblacions. Per cada mostra es van analitzar dues concentracions de cDNA diferents: A i B. La fletxa indica una banda diferencial conseqüència de les diferències en el fons genètic (només present en un individu de la població trisòmica)

B. Suppression Subtractive hybridization (SSH)

La tècnica de la hibridació substractiva (Lisitsyn *et al.* 1993; Lisitsyn *et al.* 1995; Hedrick *et al.* 1984; Gurskaya *et al.* 1996; Diatchenko *et al.* 1996), al igual que la de *Differential Display PCR* permet comparar dues poblacions de cDNA i identificar els gens que s'expressen de manera diferencial en ambdues poblacions.

La hibridació substractiva supressora, és una modificació de la hibridació substractiva convencional. Aquesta tècnica es basa en: **a)** dues rondes successives d'hibridació entre els cDNAs de les dues poblacions a comparar (sempre en excés el de la població control) i **b)** posterior amplificació, de manera selectiva, mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa d'aquells fragments de cDNA que es sobreexpressen (experiment *forward*) o subexpressen (experiment *reverse*) (figura 3).

En aquest treball, s'ha posat a punt la hibridació substractiva supressora seguint el protocol del *PCR-SELECT cDNA subtraction kit* (Clontech) amb lleugeres modificacions, que s'esmenten a continuació a l'apartat de Material i Mètodes.

MATERIAL I MÈTODES

1. OBTENCIÓ DE MOSTRES

Es varen emprar cervells fetals humans de mascles Down (3) i control (3) de 18 a 23 setmanes de gestació. Aquestes mostres han estat cedides per l'Hospital de la Vall d'Hebron i gaudeixen de l'aprovació del Comitè Ètic d'aquest hospital. En total, entre els experiments d'hibridació substractiva i posteriors confirmacions dels resultats, s'han utilitzat 22 mostres diferents.

Es va treballar només amb individus mascles per tal d'evitar un biaix dels resultats conseqüència de les possibles diferències degudes al sexe. A més, es va decidir analitzar l'expressió diferencial en cervell tenint en compte que el retard mental, juntament amb la hipotonia muscular, és un tret fenotípic present en la totalitat dels individus Down.

2. EXTRACCIÓ DEL mRNA

El mètode d'extracció de RNA total va ésser el descrit per Chomczynski i Sacchi (1987). Per a la purificació del mRNA poli A⁺ (2 µg) es va utilitzar oligo-d(T) biotinitat (Promega) i boletes magnètiques d'estreptavidina (Dyna) seguint les instruccions dels proveïdors. A partir del mRNA purificat es va sintetitzar el cDNA de doble cadena.

3. SÍNTESI DE cDNA

La síntesi va ser realitzada en dos passos. Per fer la primera cadena del cDNA es va retrotranscriure el RNA total a 42°C durant 1.5 h, fent servir un encebador oligo-d(T) i l'enzim MMLV-RT (Promega). La segona cadena de cDNA va ser obtinguda utilitzant la barreja enzimàtica (RNAsaH, DNA polimerasa I i DNA lligasa de *E. coli*) segons les instruccions del *kit PCR-SELECT cDNA subtraction*. Un cop sintetitzada la segona cadena es va realitzar una incubació amb T4 DNA polimerasa per omplir les discontinuïtats. S'anomena *driver*, la població que s'utilitza de referència (població control), i *tester*, la que conté els transcrits específics (població Down).

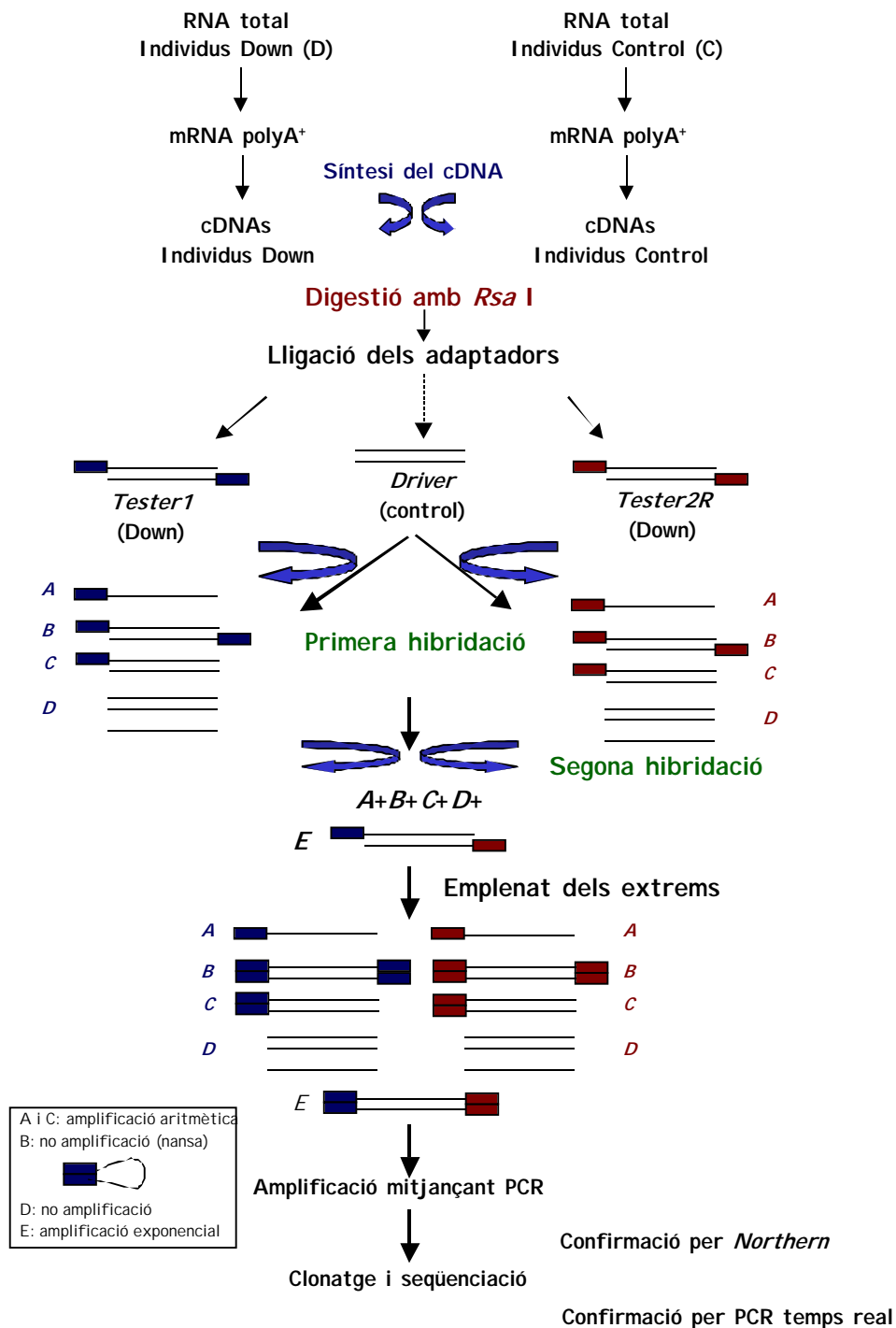


Figura 3. Esquema de la hibridació substractiva supressora fent servir la població control com a població de referència

4. DIGESTIÓ AMB *Rsa* I

Per tal d'obtenir fragments petits i d'extremes roms es van digerir els cDNAs amb *Rsa*I (GTAC) (Maniatis *et al.* 1982; Sambrook *et al.* 1989). Per garantir una bona digestió de la població de cDNAs, es va incrementar el temps de la digestió fins a 4 h. Es va comprovar l'eficiència de la

digestió en un gel d'agarosa a l'1%. Així mateix, es va afegir un pas adicional d'emplenat d'extrems (30 min a 37°C) abans de la lligació, per assegurar l'obtenció dels extrems roms necessaris per a una correcta lligació dels adaptadors.

En aquest punt es va reservar una alíquota (6 µl), de cada població (control i Down), de la solució que contenia els cDNAs digerits per ésser utilitzada com a població *driver* en els experiments *forward* i *reverse*, respectivament.

5. LLIGACIÓ DELS ADAPTADORS I CONFIRMACIÓ MITJANÇANT PCR

La població que conté els transcrits específics (*tester*) es va dividir en dues parts, per tal de lligar-hi un adaptador diferent (adaptador 1 i adaptador 2R) a cada una de les subpoblacions. Els adaptadors estan defosforilats a 5' per evitar la formació de concatenàmers. La seqüència més externa (5') dels adaptadors és comuna, però la part més interna (3') és diferent.

En aquest punt es va utilitzar una alíquota (2 µl) de cadascuna de les solucions de lligació de les poblacions *tester1* i *tester2R* (Down i control) per obtenir una població *tester* amb els dos tipus d'adaptadors i utilitzar-la com a control de no substracció a l'hora de fer les PCRs supresores.

Adaptador 1

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCGGGCAGGT-3'
3'-GGCCCGTCCA-5'

Adaptador 2R

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'
3'-GCCGCTCCA-5'

Figura 4. Adaptadors utilitzats per generar les poblacions *tester 1* i *tester 2R*

La lligació dels adaptadors es va realitzar segons protocols convencionals (incubació tota la nit a 16°C, més 2 h a 37°C). Per confirmar la lligació dels adaptadors es van realitzar dues amplificacions per a cadascuna de les subpoblacions dels *testers*, fent servir en un dels casos, encebadors específics per a un gen d'expressió constitutiva (*GAPDH*), per avaluar el nombre de molècules totals, i a l'altre, un encebador específic de *GAPDH* i l'encebador PCR1, corresponent a la part comuna dels dos adaptadors (1 i 2R) (figura 4, indicat en verd), per avaluar la proporció de molècules lligades a l'adaptador. Per continuar amb l'experiment s'aconsella que aquest nombre no sigui inferior al 25%.

6. HIBRIDACIONS (experiment *forward* i *reverse*)

La hibridació subtractiva pot realitzar-se en dos sentits (figura 3). Si es realitza de manera directa (*forward*), és a dir, utilitzant la població de cDNAs dels individus control com a població de referència (*driver*), s'obtenen els cDNAs que estan sobreexpressats a la població dels individus Down. Si, en canvi, s'utilitza la població de cDNAs dels individus Down com a població de referència (*driver*), al final s'obtenen els cDNAs subexpressats a la població Down (experiment *reverse*).

- ❖ A la primera hibridació, es va afegir un excés de *driver*, a cadascuna de les dues parts de cDNAs del *tester* (1 i 2R). A continuació, es van desnaturalitzar les mostres incubant 1.5 min a 98°C i després es van incubar a 68°C en una estufa durant 10 h per tal de permetre la hibridació (figura 3). Durant aquesta primera hibridació es generen 5 tipus de molècules. Les molècules del tipus A (veure figura 3) són les que estan enriquides en fragments de cDNAs expressats diferencialment, ja que són aquell tipus de molècules de la població *tester* que no han trobat un fragment de cDNA per hibridar a la població *driver*.
- ❖ A la segona hibridació, es posen en contacte el producte de les dues hibridacions primàries, on cada una de les poblacions de *tester* (1 i 2R) s'havien hibridat per separat amb un excés de *driver*, i s'afegeix un altre cop un excés de *driver* desnaturalitzat. La incubació es va realitzar també a 68°C durant tota la nit (aproximadament 16 h). En aquesta segona

hibridació es formen un nou tipus de molècules (*E*), que seran amplificables al final del procés. Aquestes molècules provenen de la hibridació de les molècules tipus *A* de la població *tester1* que no havien hibridat amb les molècules del *driver*, però que ara ho han fet amb les molècules de tipus *A* de la població *tester 2R* (veure figura 3).

En paral·lel a l'experiment es va realitzar un control per tal de garantir una bona substracció. En aquest control es va utilitzar una barreja de cDNAs de cervells fetals d'individus Down i control com a població *driver* i, com a població *tester*, aquesta mateixa barreja de cDNAs suplementat amb DNA de $\phi 174$ digerit amb *HaeIII*.

7. AMPLIFICACIÓ MITJANÇANT PCR DELS FRAGMENTES DE cDNA AMB POSSIBLE EXPRESSIÓ DIFERENCIAL

El primer pas de la PCR primària és un pas d'omplenat d'extrems, que es va realitzar a 75°C durant 10 min. D'aquesta manera, s'omplen els extrems dels adaptadors i s'aconsegueix crear el lloc complementari necessari per a que pugui tenir lloc l'amplificació mitjançant PCR (figura 5). Es va decidir incrementar el temps d'emplenat de 5 min a 10 min per assegurar una correcta polimerització dels extrems. La DNA polimerasa utilitzada va ser la *Advantage KlenTaq polymerase* de Clontech. A la PCR primària es va utilitzar l'encebador que correspon a la part comuna dels dos adaptadors, anomenat PCR1, i es van realitzar 20 cicles, variant així el nombre de cicles però seguint les condicions indicades pel proveïdor:

20 x	{	94°C	30 s
		68°C	30 s
		72°C	1.5 min

A la PCR secundària es van utilitzar com a encebadors els Nested 1 i Nested 2R, que corresponen a la part no comuna dels dos adaptadors i es van realitzar 30 cicles a les condicions indicades anteriorment. En aquesta segona PCR només són amplificables de manera exponencial aquells fragments de cDNA amb un adaptador diferent a cada extrem (d'acord amb les bases moleculars de la PCR supressora). Aquells cDNAs amb el mateix adaptador als dos extrems no s'amplificaran degut a la formació d'una estructura en forma de nansa, donada la complementarietat de bases (figura 3).

Adaptador 1

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'
3'-GGCCCGTCCA-5'

Adaptador 2R

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTTCGCGGCCGAGGT-3'
3'-GCCGGCTCCA-5'

Figura 5. Encebadors utilitzats en les dues reaccions en cadena de la polimerasa (PCR1, Nested1, Nested 2R)

Els productes de l'amplificació es van separar en un gel d'agarosa a l'1.5% i es van purificar les bandes per tal de clonar-les i seqüenciar-les. El patró de bandes que es va observar en el control de substracció corresponia al patró de bandes normal del marcador de pes molecular $\phi 174$ *HaeIII*, parcialment retingudes degut a la presència dels adaptadors enganxats als extrems.

8. CLONATGE I SEQÜENCIACIÓ DELS FRAGMENTES DE cDNA AMB POSSIBLE EXPRESSIÓ DIFERENCIAL

Les bandes purificades del gel d'agarosa es varen fosforilar i clonar en un vector SK+ *Sma*I defosforilat seguint protocols convencionals (Maniatis *et al.* 1982). La seqüència dels diferents clons (Sanger *et al.* 1977) es va realitzar de manera automàtica emprant els kits: *Termo Sequenase* (Amersham-Pharmacia Biotech) i *Big Dye* (Applied Biosystems) i els aparells de seqüenciació ABI PRISM 373 i ABI PRISM 377. Les seqüències obtingudes es van comparar amb la base de dades de DNA utilitzant els programes de comparació de seqüències del BCM search launcher (<http://kiwi.imgen.bcm.tmc.edu:8088/searchlauncher/launcher.html>) i NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

9. ANÀLISI PER TRANSFERÈNCIA NORTHERN DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DIFERENCIAL

Per confirmar els resultats obtinguts mitjançant la tècnica de SSH, els diferents fragments putativament expressats diferencialment, marcats amb [α^{32} -P]-dCTP, van ésser emprats com a sonda sobre una transferència *Northern* de RNA total de cervell fetal humà d'un individu trisòmic i un disòmic (figura 6). Les hibridacions obtingudes es van mesurar densitomètricament (ULTROSCAN Enhanced Laser Densitometer, LKB) i es van normalitzar els resultats relativitzant aquests valors pels obtinguts hibridant la mateixa transferència *Northern* amb una sonda d'un gen d'expressió constitutiva com és *GAPDH*. Només aquells cDNAs dels que s'havia confirmat l'expressió diferencial es van tornar hibridar contra un *Northern* de RNA total de cervell fetal humà de 5 individus Down i 5 controls (treball presentat als capítols 2 i 3). Un altre cop es van normalitzar els resultats relativitzant aquests valors pels obtinguts amb el gen *GAPDH*.

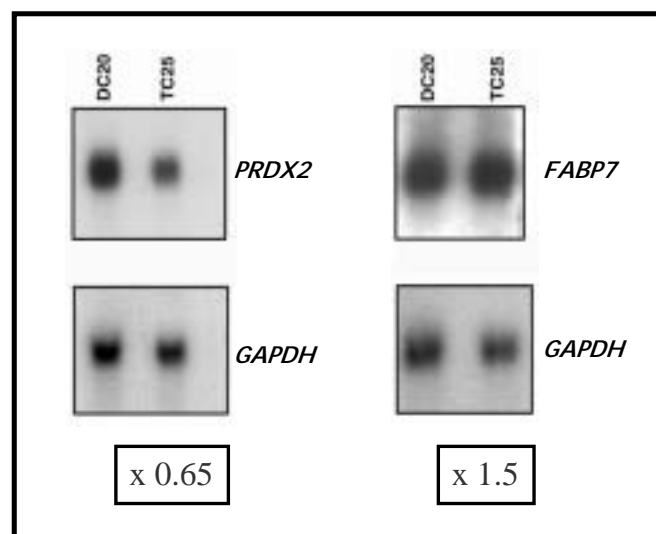


Figura 6. Hibridació *Northern* (1 individu disòmic DC i 1 trisòmic TC) utilitzant com a sonda els cDNAs identificats com a gens expressats diferencialment: *PRDX2* i *FABP7*. La hibridació de la part inferior correspon al mateix *Northern* hibridat amb el cDNA de *GAPDH*. El valor numèric correspon a la subexpressió o sobreexpressió obtingudes per *PRDX2* i *FABP7*, després de normalitzar amb *GAPDH*

10. PCR QUANTITATIVA A TEMPS REAL (*quantitative real-time PCR*)

Aquells cDNAs dels que s'havia confirmat per *Northern* la seva expressió diferencial varen ésser analitzats mitjançant PCR quantitativa a temps real. Es va aïllar RNA total i es va sintetitzar el cDNA amb el robot *ABI PRISM 6700 Automated Nucleic Acid Workstation* (Applied Biosystems). Per realitzar la PCR quantitativa a temps real es va emprar el *ABI PRISM 7700 sequence detection system* (Applied Biosystems). Es va utilitzar una parella d'encebadors i sonda específica del gen del que s'havia de confirmar la seva expressió diferencial, dissenyats amb el programa *PrimerExpress 1.0* (Applied Biosystems), i els resultats van ser normalitzats utilitzant *GAPDH* com a control intern.

La tècnica de la PCR a temps real permet mesurar la quantitat de producte de PCR en qualsevol moment de la reacció. Es basa en la utilització d'una parella d'encebadors convencionals (específics del gen a confirmar) i una sonda Taqman, seqüència de DNA d'unes 30 parelles de bases que s'anella enmig del fragment amplificat (amplicó) i que està marcada amb dos fluorocroms. A l'extrem 5' de la sonda tenim el fluorocrom informatiu o *reporter* (tipus FAM, JOE, VIC...) i a l'altre costat el que actua de *quencher* (TAMRA). La fluorescència del *reporter* no es detectada fins que la polimerasa, amb la seva activitat exonucleasa 5' → 3', es capaç d'alliberar el *reporter* de la influència del *quencher* i, per tant, la fluorescència present en el tub de PCR depèn en tot moment de la quantitat de producte (figura 7).

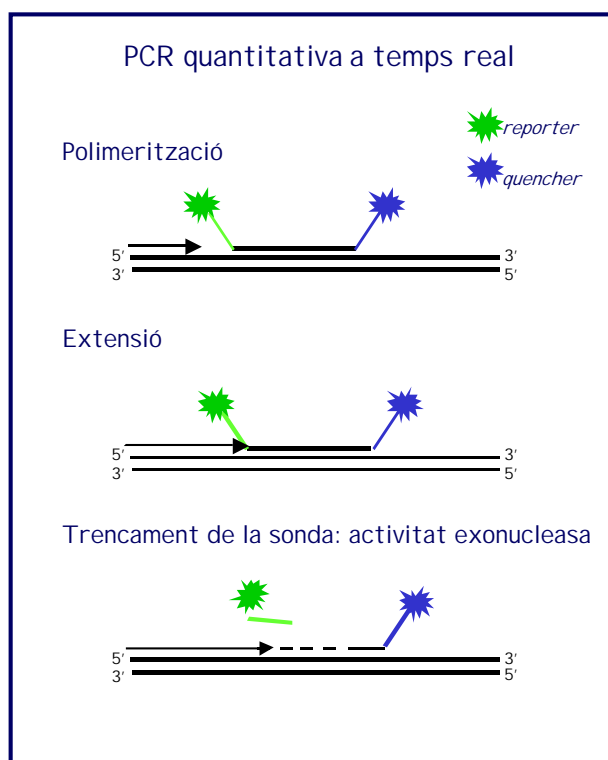


Figura 7. Esquema de la PCR quantitativa a temps real

Aquesta tècnica permet marcar un llindar de fluorescència en aquell punt de l'amplificació on totes les mostres estan en fase exponencial i on les pendents per a l'amplificació de diferents gens són paral·leles. L'aparell indica quin és el cicle en el que cada una de les diferents mostres travessa aquest llindar de fluorescència (Ct= threshold Cycle) (figura 8). Seguint el mètode del $\Delta\Delta Ct$ (Butlletí nombre #2 de Applied Biosystems), que es basa en la diferència del Ct obtingut per cada una de les mostres pel gen específic i del Ct obtingut per el *GAPDH*, i aplicant les

formules adients es van poder calcular les diferències d'expressió entre individus Down i control.

Mitjançant aquesta tècnica, i utilitzant encebadors específics de cadascun dels gens expressats diferencialment, es van analitzar mostres de cervells fetals de 9 individus Down i 9 controls (en aquestes mostres estan incloses les mostres ja analitzades per anàlisi de transferència *Northern*). Els resultats de la PCR quantitativa a temps real també van ser normalitzats amb el gen *GAPDH* (ref: 4310858 PE Applied Biosystems), emprat com a control endogen.

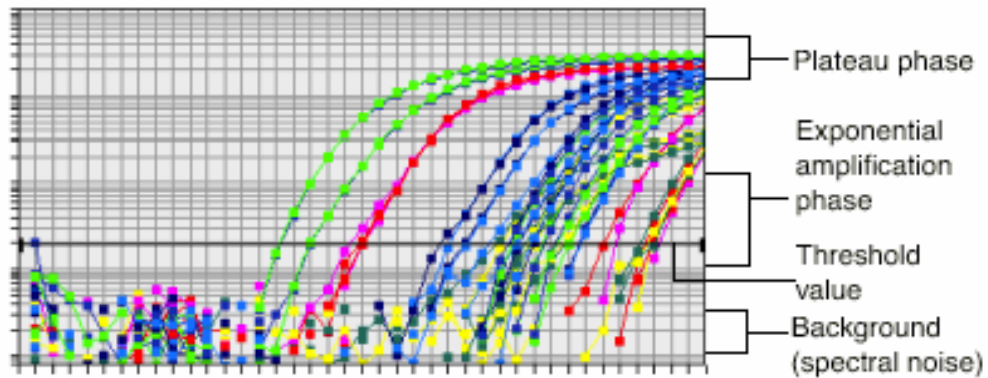


Figura 8. Representació gràfica de la PCR a temps real (exemple extret del butlletí #2 de PE Applied Biosystems)

RESULTATS

Els resultats obtinguts amb la hibridació substractiva supressora es recullen en els capítols 2 i 3 d'aquest mateix apartat. D'una banda es va identificar el gen *PRDX2* (peroxiredoxina 2), també anomenat *TDPX1* (*thioredoxin dependent peroxide reductase*), subexpressat en individus Down i, d'altra, *FABP7* també anomenat *BFABP* (*brain fatty acid-binding protein*), sobreexpressat en individus Down.

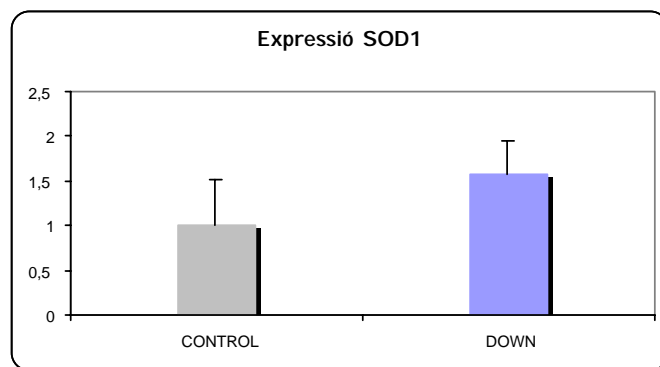


Figura 9. Anàlisi de l'expressió de *SOD1* mitjançant RT-PCR quantitativa a temps real

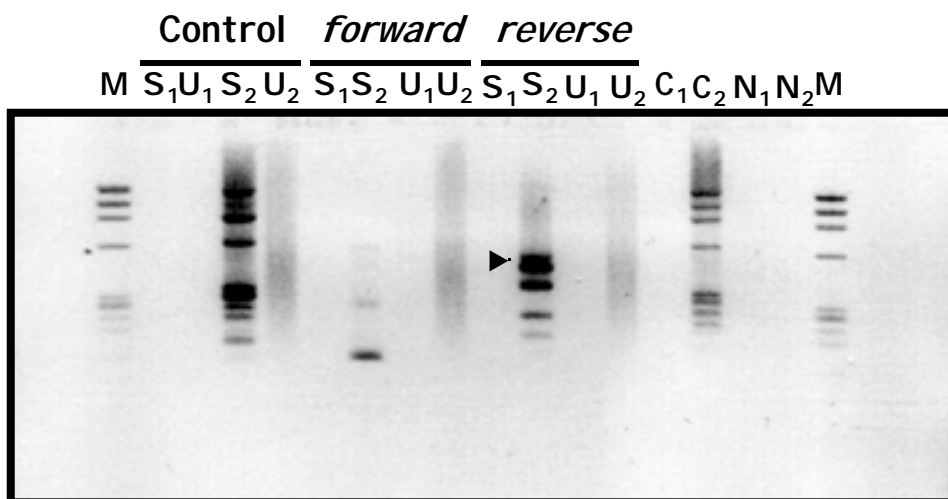


Figura 10. Exemple PCR supresora. Electroforesi en agarosa 1% dels fragments amplificats **M:** marcador de pes molecular ϕ X174 *Hae* III; **Control:** control de substracció; **Forward:** experiment directe per identificar cDNAs sobreexpressats en individus Down, **Reverse:** experiment indirecte per identificar cDNAs subexpressats en individus Down **C:** DNA control (Clontech); **S:** experiment de substracció; **U:** experiment de no substracció; **1:** PCR primària; **2:** PCR secundària. La fletxa indica la banda corresponent al fragment de cDNA de *PRDX2* obtingut en un dels experiments *reverse*, resultats recollits al capítol 2

Tanmateix, es va aïllar un fragment de cDNA corresponent al gen de la *SOD1* (superòxid dismutasa), que mapa a 21q21.3, i del qual es va confirmar la seva sobreexpressió en cervell fetal de individus Down mitjançant, **1) Northern**, (sobreexpressió d'1.3 vegades més, analitzant 1 mostra de cada població) i, **2) PCR** quantitativa a temps real (1.6 ± 0.35 vegades més, analitzant 4 mostres de cada població)(figura 9).

A més d'aquests gens que van ser confirmats com a gens expressats diferencialment mitjançant tècniques addicionals, es van aïllar molts d'altres fragments de cDNA mitjançant la tècnica SSH que no varen donar resultats consistents (taula 2, resultats corresponents a dos experiments independents de SSH).

Taula 2. Resultats obtinguts per SSH que no han estat posteriorment confirmats

Experiment forward:
(sobreexpressió en Down)

Dihydropirimidase related protein 1
S9 ribosomal protein
MHC class I
Similar to L36 ribosomal protein
Laminin binding protein
 β -satelit sequence
KIAA0158

Experiment reverse:
(subexpressió en Down)

L37a ribosomal protein
MHC class III
H. sapiens cytochrome c oxidase sub II
L23 ribosomal protein
Human clk Rs cyclophilin CARS Cyp
Wilms' Tumor-1 (WT-1)
Similar to Gallus domesticus for collagen type VI
Glutamate descarboxilase

Capítol 2. La subexpressió de PRDX2 en cervells fetals SD podria contribuir al fenotip neuronal associat a la SD

L'objectiu principal d'aquest treball era la cerca de gens amb expressió diferencial en individus Down. Experiments d'hibridació substractiva supressora sobre cervells fetals d'individus Down d'entre 18 i 23 setmanes de gestació (3 de cada població), van desvetllar la subexpressió de *PRDX2* (o *TDPX1*) als individus Down. Aquesta subexpressió es va confirmar mitjançant: i) anàlisi de transferència *Northern* sobre un total de 10 mostres (5 disòmics i 5 trisòmics) i ii) RT-PCR quantitativa a temps real sobre un total de 13 mostres (6 disòmics i 7 trisòmics). Els resultats obtinguts amb els dos tipus d'anàlisis varen indicar una subexpressió *PRDX2* de 0.7 i 0.73 vegades, respectivament.

Per avaluar els possibles efectes de la subexpressió de *PRDX2* a nivell cel.lular es van transfectar de manera estable cèl.lules de neuroblastoma (SH-SY5Y) amb cDNA antisentit de *PRDX2*. En base a la funció antioxidant de *PRDX2* es va analitzar la viabilitat cel.lular i els nivells d'apoptosi, tant en condicions estàndards, com en presència de diferents agents citotòxics oxidatius (peròxid d'hidrogen, etoposide i timerosal). Per tal d'aconseguir una sobreexpressió de *SOD1* es va dur a terme una transfecció amb cDNA sentit de *SOD1*. La inclusió de *SOD1* com a control en aquesta aproximació es deu a que els individus Down presenten, com a resultat de la trisomia del cromosoma 21, una sobreexpressió d'aquest gen.

Les mesures de viabilitat cel.lular sobre les dues línies transfectades (mitjançant iodur de propidi i assaig de reducció del MTT) demostren un descens en condicions basals, així com en presència de peròxid d'hidrogen, però no en presència d'etoposide. D'altra banda, el timerosal sembla afectar més la viabilitat dels clons que subexpressen *PRDX2* que la dels que sobreexpressen *SOD1*.

Els resultats obtinguts mesurant els nivells d'apoptosi sobre ambdues línies transfectades (tant per anàlisi *Western* i detecció amb l'anticòs anti-fodrina, com per mesures de l'activitat caspasa-3) indiquen un increment en els nivells d'apoptosi en condicions basals i un "efecte protector" (menor inducció) en presència d'elevades concentracions de peròxid d'hidrogen (100 µM, 3 hores). Donat que en els experiments de viabilitat cel.lular no s'observa aquest "efecte protector", es dedueix

que la subexpressió de *PRDX2*, o la sobreexpressió de *SOD1*, en condicions d'estrés oxidatiu causat per presència d' H_2O_2 , indueixen, al menys parcialment, una mort cel.lular independent de la caspasa-3.

D'altra banda, la immunodetecció directa de caspasa-3 en els clons que subexpressen *PRDX2* ha demostrat que la presència de timerosal en el medi provoca un increment en la mort cel.lular. Segons aquests resultats, aquest increment de vulnerabilitat semblaria estar associat a una apoptosi mediada per caspasa-3.

En conjunt, tots aquests resultats apunten cap a una possible implicació de *PRDX2* en l'estrés oxidatiu neuronal associat a la SD.

Peroxiredoxin 2 (*PRDX2*), an antioxidant enzyme, is subexpressed in Down Syndrome (DS) fetal brains and could contribute to DS-associated neuronal phenotype

M^a Francisca Sánchez-Font¹, Jordi Sebastià², Coral Sanfeliu², Rosa Cristòfol², Gemma Marfany¹ and Roser González-Duarte^{1*}

¹Departament de Genètica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Avda. Diagonal, 645. 08028 Barcelona (Spain)

²Departament de Farmacologia i Toxicologia. Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona CSIC. IDIBAPS. Roselló 161. 08036 Barcelona (Spain)

* to whom correspondence should be addressed

Telf: 34-93-4021494

FAX: 34-93-4110969

e-mail: roser@bio.ub.es

Abstract

Suppression Subtractive Hybridization performed on Down Syndrome (DS) fetal brains identified a differentially expressed gene, peroxiredoxin 2 (*PRDX2*). Subexpression of *PRDX2* in DS was confirmed by densitometric analysis of Northern blots (0.7-fold) and real-time PCR (0.73-fold). Peroxiredoxins are antioxidant enzymes, which play important cellular roles including protein and lipid protection against oxidative injury and signaling pathways regulating apoptosis. Although several genes on chromosome 21 have been postulated to be involved in the regulation of cell redox state (i.e. *SOD1*), we hypothesized that genes located on other chromosomes could also contribute to the DS phenotype. To investigate whether down-regulation of *PRDX2* (mapped at 13q12) was associated to enhanced sensitivity of DS neurons to ROS, we under-expressed *PRDX2* through stable transfections on SH-SY5Y neuroblastoma cells. Similarly, we over-expressed *SOD1* and compared the effects of both genes in cell viability and resistance against oxidative injuries. Transfected cells with both constructs showed increased apoptotic cell death in basal conditions and after treatment with oxidative cytotoxic agents. Overall, *PRDX2* antisense-expressing clones showed a slightly higher sensitivity to oxidative stress than clones over-expressing *SOD1*. Therefore, subexpression of *PRDX2* could contribute to a similar or even greater extent to the DS-altered redox state than *SOD1* overexpression.

Keywords: Down syndrome, peroxiredoxin, antioxidant, oxidative stress, suppression subtractive hybridization

Running title: PRDX2 is subexpressed in DS fetal brains

Introduction

Down Syndrome (DS), the most common chromosomal aneuploidy in liveborn infants (Hassold and Jacobs, 1984; Epstein, 1995), is caused by total or partial trisomy of chromosome 21. According to the gene dosage effect hypothesis, the DS phenotype results from the cumulative imbalance of a triplicated gene, or groups of genes, located on chromosome 21. At the molecular level, the additional gene copies could produce a cascade effect of disruptions and/or specific interactions, which would involve further genes, not necessarily located on the same chromosome. Concerning the phenotype, a broad spectrum of abnormalities related to the oxidative stress, including mental retardation, early-onset Alzheimer's disease and premature aging, have been associated to DS. Moreover, several genes at chromosome 21 have been involved in the regulation of the redox state in the cell, such as Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), cystathione- β -synthase (CBS), carbonyl reductase (CBR), DSCR1 and the heatshock protein family member STCH (reviewed by Iannello *et al.*, 1999). Following the gene dosage effect hypothesis, the deregulation of some of these genes could be responsible for the disruption of the steady state levels of intracellular reactive oxygen species (ROS), thus causing oxidative stress. ROS are generated during ordinary metabolic activities of aerobically living organisms and some of them may play signaling roles. However, when cell defences are overcome, ROS turn into powerful damaging agents which lead to apoptotic or necrotic cell death (Finkel, 1998). A battery of antioxidant enzymes prevent the harmful effects of ROS on DNA, proteins and lipids (Matés, 2000).

We have performed suppression subtractive hybridization (SSH) on DS and control fetal brain samples to identify DS differentially expressed genes putatively involved in the DS phenotype. Our results show under-expression of *PRDX2* in DS fetal brains, a human homologue of yeast thioredoxin peroxidase (*TPX*) (Chae *et al.*, 1993; Lim *et al.*, 1993; Chae *et al.*, 1994c; Chae *et al.*, 1994a; Chae *et al.*, 1994b; Yim *et al.*, 1994; Netto *et al.*, 1996; Sarafian *et al.*, 1997) also known as thioredoxin-independent peroxide reductase 1 (*TDPXI*) or natural killer enhancing factor-B (*NEKF-B*), which is expressed in human neurons but not in glial cells (Sarafian *et al.*, 1999) and is located on chromosome 13q12 (Pahl *et al.*, 1995). Peroxiredoxins (PRDXs) are a family of antioxidant proteins initially discovered in yeast (Chae *et al.*, 1994c; Chae

et al., 1993; Yim *et al.*, 1994) that show no homology with the conventional antioxidant proteins. More than a hundred homologues from bacteria to mammals, showing highly conserved protein domains, have been described in this family (Chae *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000). They were firstly named thioredoxin peroxidases, after H₂O₂ reduction to water using thioredoxin as an intermediate electron donor, but were later renamed peroxiredoxins (PRDXs) because some members did not need the intermediate thioredoxin (Chae *et al.*, 1994c). PRDXs appear to play an important role in several cellular functions including protein and lipid protection against oxidative injury (Yim *et al.*, 1994; Netto *et al.*, 1996; Sarafian *et al.*, 1997), cell proliferation, differentiation (Lim *et al.*, 1998) and intracellular signaling pathways regulating apoptosis (Kang *et al.*, 1998a; Kim *et al.*, 2000).

The cellular levels of antioxidant enzymes are involved in protection against apoptosis. Cultured cells over-expressing *PRDX2* are more resistant to apoptosis due to serum deprivation, presence of hydrogen peroxide, ceramide and etoposide (Zhang *et al.*, 1997). *PRDX2* prevents H₂O₂ accumulation, and thus contributes upstream BCL2 in protecting from apoptosis. *PRDX1* and *PRDX2* over-expression also protect thyroid cells from H₂O₂-induced apoptosis (Kim *et al.*, 2000).

To investigate whether down-regulation of *PRDX2* in DS brains could be associated to the oxidative stress reported for DS cultured neurons, we under-expressed *PRDX2* through stable transfections on SH-SY5Y neuroblastoma cells. Similarly, we over-expressed *SOD1* (located at 21q22.3 and known to be over-expressed 1.3 to 1.6-fold in DS) and compared the effects of both genes in basal cell viability and in the resistance against oxidative injuries produced by several cytotoxic agents. Transfected cells with both constructs showed increased apoptotic cell death in basal conditions and after some of the oxidative cytotoxic injuries. Overall, *PRDX2* antisense-expressing clones showed a slightly higher sensitivity to these agents than clones over-expressing *SOD1*.

Material and methods

Samples

Nineteen male fetal brains obtained from pregnancy weeks 18-23 were used in this study. Ten of these tissue samples were diagnosed as trisomic for chromosome 21 by amniocentesis. The remaining samples (9) did not show any chromosomal aberration and were used as controls. Six samples (3 disomic vs 3 trisomic) were used for SSH. Differential expression was confirmed using 10 samples (5 disomic vs 5 trisomic) for densitometric analysis of Northern blot hybridizations and 13 samples (6 disomic vs 7 trisomic) for real-time PCR quantification.

The use of all human material in this research was approved by the Ethics Committee of the Universitat of Barcelona.

mRNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from 6 samples (3 DS vs 3 control) according to Chomczynski and Sacchi (1987). Two micrograms of mRNA were obtained from total RNA using biotinylated oligod(T) (Promega) and streptavidin-magnetic beads (Dynal), following the manufacturer's instructions. PolyA⁺ RNA was retrotranscribed at 42°C for 1.5 h using MMLV-RT (Promega) according to the manufacturer's instructions. The cDNA second-strand was obtained using the enzyme-cocktail and protocol provided by the PCR-SELECT cDNA subtraction kit (Clontech).

Subtractive Hybridization

Suppression Subtractive Hybridization (SSH) was performed on DS and control mRNAs (obtained as described above) using the PCR-SELECT cDNA subtraction kit (Clontech) following the manufacturer's instructions. The following minor modifications were introduced: *RsaI* digestion time was increased to ensure a complete digestion, treatment with the Klenow enzyme was performed previously to the adaptor ligation, which was performed overnight at 13°C and then, 2h at room temperature. Differentially expressed cDNAs were amplified by two rounds of suppression PCR amplification using the Advantage KlenTaq polymerase (Clontech). Twenty primary PCR cycles and thirty secondary PCR cycles were performed according to the manufacturer's instructions.

Cloning and sequencing of putative differentially expressed cDNAs

PCR products generated by SSH were subcloned into pBLUESCRIPT SK+ vector (Stratagene) by standard procedures. Sequencing was performed using an automated ABI PRISM 377 DNA sequencing system (Applied Biosystems). DNA sequence comparisons were performed at BLAST servers at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), BCM (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/>) and links therein.

Quantification of differential gene expression by Northern blot

Total RNA of male human fetal brains (5 control and 5 DS samples) from 18-23 gestational weeks was isolated (Chomczynski and Sacchi, 1987). Samples were electrophoresed on formaldehyde agarose (1.2%) gels, transferred onto Hybond nylon membranes (Amersham) and UV cross-linked. After pre-hybridization, blots were hybridized with a random-primed $\alpha^{32}\text{P}$ CTP labelled human *PRDX2* cDNA probe at 50% (v/v) formamide for 18 hours at 42°C. The filters were washed at 65°C (twice in 2x SSPE/0.1%SDS and twice in 1x SSPE/0.1% SDS) and autoradiographed. The differential expression was confirmed by densitometry (ULTROSCAN Enhanced Laser Densitometer, LKB) of the autoradiographed blots. A *GAPDH* probe was also hybridized and analyzed as a control for loading and integrity of RNA.

Quantification of differential gene expression by real-time quantitative PCR

Seven DS and six control male human fetal brain samples were analyzed. Total RNA from 5 mg of tissue was obtained using the ABI PRISM 6700 Automated Nucleic Acid Workstation (Applied Biosystems). RT-PCRs were produced using the Taqman Reverse transcription reagents (Roche molecular systems). Quantitative PCRs were performed with the Universal Master Mix (Applied Biosystems) under the manufacturer's conditions. The real time amplification was analyzed by the ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems). The primers and Taqman probe (using FAM as reporter and TAMRA as quencher) were designed following the Primer Express software. To normalize the *PRDX2* quantitative determinations, *GAPDH* (primers and probe from Applied Biosystems) was used as an endogenous control. Relative expression values were obtained following the manufacturer's instructions.

DNA constructs

The pBI-*PRDX2* antisense-enhanced green protein (EGFP) construct was obtained by cloning the human *PRDX2* cDNA into the pBI-EGFP vector (Clontech) in an antisense direction. The pBI-*SOD1* sense-EGFP construct was obtained by cloning the human *SOD1* cDNA into pBI-EGFP. The pBI-EGFP vector allows the co-expression of the gene of interest and the EGFP under a bidirectional tetracycline-responsive promoter (TRE). The pTet-on vector (Clontech) is used to develop Tet-on cell lines which constitutively express the Tet-transcription factor (rtTA). This factor becomes an activator when tetracycline is added to the media. After each construct derived from pBI-EGFP is transfected into a Tet-on cell line, the rtTA will bind to the TRE, thus activating the transcription of the gene of interest (in our case, *SOD1* sense and *PRDX2* antisense constructs).

Cell culture and transfection

The human neuroblastoma SH-SY5Y cell line was purchased from the European Collection of Cell Culture. Cells were grown in MEM-F12 (GibcoBRL) supplemented with 2 μ M glutamine, 1 % non-essential amino acids, 50 μ g/ml gentamicin and 10 % Tet-system approved fetal calf serum (Clontech) in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂ at 37°C. DNA constructs were transferred into cells (40 μ g for 5x10⁶ cells) by electroporation using a Gene Pulser II (950 μ F, 300 V; Bio-Rad). Tet-on cell lines were obtained by electroporation with the pTet-on vector (Clontech), and subsequent selection with G418 (GibcoBRL) after 2-3 days. Several independent lines were established and selected for the expression of the rtTa gene. These lines were further cotransfected with a 1:40 mix, respectively, of pTK-Hygromycin empty vector and either pBI-*PRDX2* antisense-EGFP or pBI-*SOD1* sense-EGFP. After 2-3 days in culture, transfected cells were selected with G418 and hygromycin (GibcoBRL). Resistant and fluorescent clones were isolated, expanded and used in future experiments. Cells transfected with the pTet-on vector were used as a control.

SOD1 activity measures

Total SOD activity was determined in cell homogenates by the xantine/xantine oxidase method using a commercial kit (Ransod, Randox).

Western immunodetection

Cells (5x10⁵) from each selected clone were collected, pelleted by centrifugation, rinsed once with PBS and resuspended in 75 μ l of total protein extraction buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 1% NP40 plus a cocktail of protease inhibitors). After 10 minutes on ice, samples were centrifuged 15 minutes at 4°C to separate soluble protein extracts from cellular debris. Protein extracts were quantified according to the Bradford method (reagents purchased from Bio-Rad), loaded (30 μ g/lane) onto a 7.5% SDS-polyacrylamide gel, electrophoresed, semi-dry transferred onto a PVDF membrane, immunodetected with a polyclonal antibody (1:5.000) raised against PRDX2, gently provided by Dr. H. Z. Chae, and detected with either SuperSignal (Pierce) or ECL (Amersham Pharmacia). Relative quantification of PRDX2 was performed with the NIH Image 1.62f software. For caspase-3 activity detection, an anti-fodrine antibody (Chemicon) (1:2000) was used.

Viability assays

For all experiments, growing cells were harvested after a mild trypsinization and seeded at a concentration of 2 or 3x10⁵ cell/ml in 30-mm Petri dishes, 96-well plates or 8-chamber slides (NUNC) in grown media. Tetracycline was added the next day and experiments were performed after 24 h or 48 h, when the cell lines reached approximately 80 % of confluence. Basal levels of cell death in the control, *PRDX2* antisense and *SOD1* sense transfected cell lines were determined by propidium iodide staining. The fluorescent dye propidium iodide is relatively excluded from living cells, but it rapidly enters cells with damaged membrane and binds to nucleic acids rendering them highly fluorescent (Macklis and Madison, 1990).

Propidium iodide dissolved in PBS was directly added to the culture medium of the cells in 96-well dishes to give a final concentration of 7 $\mu\text{g/ml}$. After one-hour incubation, fluorescence was quantified using a Cytofluor 2350 fluorescence scanner (Millipore) (485 nm (20 nm band-pass) excitation and 530 nm (40 nm band pass) emission). Basal levels of cell death were calculated as a percentage of the maximum fluorescence obtained in culture wells incubated with 0.02 % Triton X-100. Blank values were obtained in wells with culture medium and propidium iodide in the absence of cultured cells.

Differential effects of several neurotoxic agents: hydrogen peroxide, thimerosal and etoposide (Sigma), on growth and survival of the control and gene transfected cell lines were analyzed by the 2-(4,5-dimethylthiazo-1-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. Reduction of MTT by the cell mitochondrial activity gives blue formazan crystals (Mosmann, 1983). The method was performed according to the modifications introduced by Hansen *et al.*, 1989. Absorbances were measured at 560 nm with a 620 nm reference wavelength in an iEMS (Labsystems) plate reader. Results were expressed as a percentage of control. To corroborate MTT results, determination of both lactate dehydrogenase released into the medium and propidium iodide staining were performed in the same wells than MTT reduction assay in a set of experiments for each tested agent. Results were normalized to maximum LDH release/propidium iodide staining from cells exposed to Triton X-100 (Rosa *et al.*, 1997). Responses for these assays were statistically similar to those of MTT (data not shown).

Percentages of basal cell death and response to cytotoxic agents were obtained in 4-7 independent experiments. Data were pooled and the results given as mean \pm SE. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test (SPSS software). The significance level used was $p < 0.05$.

Microscopic observation of propidium iodide stained and TUNEL processed (see below) cultures in chamber slides was also performed.

Caspase-3 immunostaining

Control and transfected cell lines were immunostained for the presence of cleaved caspase-3 in basal conditions and after exposure to hydrogen peroxide or thimerosal. Cells in coverslips were rinsed in phosphate buffered saline (PBS) and fixed in 4 % paraformaldehyde for 30 min at room temperature. Fixed cells were incubated in PBS containing 5 % goat serum and 0.1 % Triton X-100 for 60 min. Incubation with rabbit polyclonal antibody specific for cleaved caspase-3 (17 kDa) antibody (Cell Signalling) was performed at 1:100 dilution, overnight at 4°C. The bound immunoglobulins were detected using biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector) at 1:200 dilution for 1 hr at room temperature, followed by avidin-biotin complex (Vectastain ABC-kit, Vector) also at 1:200 for 1 h. Color was developed by adding diaminobenzidine as substrate.

Caspase activity quantification

Protein extracts from cells (1×10^6) of each selected clone were obtained as mentioned in western immunodetection but for the lysis buffer, which in this case contained 200 nM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% sucrose, 1 mM PMSF and 1% NP-40 at pH 7.4. Caspase activity measures were performed in a 96-well plate. Twenty-five micrograms of protein extract was loaded per well. Three different measures were obtained for each extract: a) the caspase activity on the DEVD-AFC substrate (final concentration 10 μM); b) the same as a) but adding DEVD-FMK (an inhibitor of caspase activity) diluted in DMSO (final concentration 10 μM), and c) a control value of b) by adding DMSO instead of inhibitor to the lysis buffer, in a total volume of 40 μl in a 96-wells plate. After incubating the 96-well plate containing all protein extracts and reagents (except the substrate) 15 min at 37°C, the substrate DEVD-AFC was added to each well. Fluorescence (excitation λ at 400 nm; emission λ at 505 nm,) was measured at different incubation times at 37°C (0 h, 0.5 h, 1 h, 3 h and 6 h).

Tunel assays

Tunel experiments were performed using DeadEnd Colorimetric Apoptosis Detection System (Promega) following manufacturer's instructions. Different clones for each construct (*SOD1* sense and *PRDX2* antisense) were assayed.

Results

Down-regulation of *PRDX2* gene in DS fetal brains

To isolate differentially down-regulated genes in DS, SSH was performed on brain tissue samples from DS and control male fetuses. After two rounds of hybridization to enrich the sample in differentially expressed cDNAs, two subsequent rounds of PCR were performed, and a pattern of bands ranging from 570 to 190 bp was obtained. All the bands were cloned and sequenced and their differential expression was verified by densitometric analysis of Northern blot hybridizations. Brain total RNA from 5 individuals of each population was blotted and hybridized with the corresponding cDNA probe. A *GAPDH* probe was used as a control to normalize RNA loading differences.

The lowest migrating band (570 bp) corresponded to a fragment of *PRDX2* cDNA. Under-expression (0.7 fold \pm 0.21) of *PRDX2* was confirmed by Northern blot analysis of DS vs control fetal brains (5 samples each). The results obtained by real-time PCR on 6 disomic and 7 trisomic individuals also confirmed this trend (0.73 fold \pm 0.08) (Figure 1).

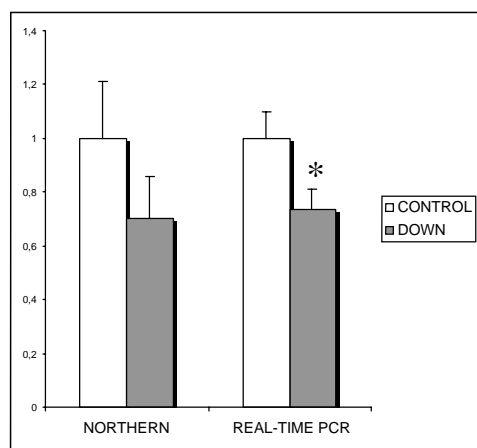


Figure 1. Average differential *PRDX2* expression of Down samples, by Northern blot hybridization (1) and real-time quantitative PCR (2). Values in arbitrary units are normalized using in all cases *GAPDH* as an endogenous control. The statistical error is also shown. The asterisk indicates statistical significance according to the Mann-Whitney test ($p < 0.05$).

Transfection of SH-SY5Y cells and selection of clones

To analyze the effect of *PRDX2* under-expression in cultured neuronal cells, we designed an antisense strategy to sequester the endogenous transcript, so that an effective reduction in *PRDX2* enzyme production should be achieved. We also designed a sense strategy to increase the cellular levels of *SOD1* transcript, which lead to increased SOD1 enzymatic activity.

The pTet-on inducible system was used to avoid a possible deleterious effect caused by changes in the *PRDX2* and *SOD1* expression levels in stable cell lines. Tetracycline-dependant induction of transcription should be attained for both, the gene of interest and the EGFP, when using plasmids with a bidirectional promoter (pBI-EGFP, from Clontech). In a first round of transfection, several Tet-on independent clones were isolated and maintained after confirmation of the expression of the rtTA transcription factor by RT-PCR (data not shown). In a second round of transfection, two of these positive Tet-on proficient cell lines were electroporated with a plasmid encoding hygromicine resistance together with either the *PRDX2* antisense or the *SOD1* sense constructs. Between 40 and 50 clones for each construct were first selected by growth on media supplemented with G418 and hygromicin. Following addition of tetracyclin, at least twenty fluorescent cell lines of each type were isolated and maintained. Although we performed two sequential rounds of transfections, as recommended by the manufacturer to avoid cross-talk of the promoters, a tightly regulated expression was not achieved as the reporter EGFP showed basal expression from the bidirectional promoter. Thus, the expression levels were constitutively low but could be induced after addition of tetracycline, in accordance to recent reports analyzing the efficiency of the Tet-on system (Mizuguchi and Hayakawa, 2001). All experiments, unless the contrary is stated, were performed in induced cells.

Clones showing lower levels of endogenous *PRDX2* (as detected by quantitative immunodetection) (Figure 2) or higher *SOD1* expression as detected by enzymatic activity (Table 1) were selected for subsequent analyses.

Viability studies

Both transfectant clonal cell types have a slightly higher spontaneous mortality than control cells, as shown by propidium iodide staining (Figure 3a-e). One-way ANOVA demonstrated an effect of *SOD1* gene overexpression ($F_{3,76}=5.734$, $p=0.001$) (Figure

3a) and *PRDX2* gene underexpression ($F_{5,155}=2.611$, $p=0.026$) (Figure 3b) in this increased mortality.

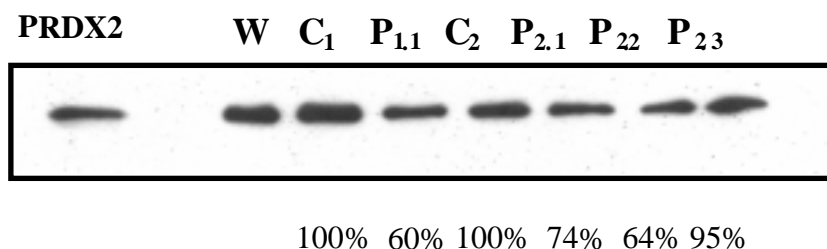


Figure 2. Western blot PRDX2 immunodetection to assess *PRDX2* under-expression. PRDX2: protein control; W: wild type SH-SY5Y cells; C₁ and C₂: different control cells transfected with pTeton vector only; P_{1.1}, P_{2.1}, P_{2.2}, P_{2.3} cells transfected with *PRDX2* antisense construct.

TABLE 1. SOD1 activity in control cell line SH-SY5Y and in *SOD1* transfected clons.

Cell lines	SOD1 activity (U/mg protein)
Control	4.40 ± 0.54 (5)
S1	17.56 ± 5.27 ^a (4)
S2	12.46 ± 3.25 ^a (3)
S3	19.25 ± 2.28 ^a (4)

Data are mean ± SEM values (no. of independent determinations).

^a $p < 0.05$, statistically different from control line by Student's *t* test.

Cytotoxicity of hydrogen peroxide, thimerosal and etoposide were tested at two concentrations of the toxic agents, those giving low and intermediate cell death in control cultures. MTT response of the clones differed according to the construct transfected and the agent tested. Overall, transfected clones (either with *PRDX2* antisense or *SOD1* sense) showed higher sensitivity than controls to cytotoxic agents at the highest concentration tested. In the *PRDX2* antisense transfectants, two-way (agent concentration and clone) ANOVA showed a significant effect of the toxic agent concentration for hydrogen peroxide ($F_{2,807}=1180.16$, $p<0.001$), thimerosal ($F_{2,432}=512.63$, $p<0.001$) and etoposide ($F_{2,424}=239.49$, $p<0.001$). However, a significant effect of the clonal cell line factor was detected only for hydrogen peroxide ($F_{5,807}=22.77$, $p<0.001$) and thimerosal ($F_{3,432}=12.998$, $p<0.001$). On the other hand,

SOD1 transfectants also showed a significant effect of the toxic agent concentration for hydrogen peroxide ($F_{2,509}=1086.83$, $p<0.001$), thimerosal ($F_{2,295}=299.23$, $p<0.001$) and etoposide ($F_{2,578}=39.09$, $p<0.001$). In this case, significance of clonal cell type was only observed for hydrogen peroxide ($F_{3,509}=44.78$, $p<0.001$). However, one-way ANOVA demonstrated an effect of the thimerosal at the high concentration tested ($F_{3,104}=4,825$, $p<0.0035$). MTT results of hydrogen peroxide and thimerosal exposure are shown in Figures 4a-b, 5a-b, respectively. For each concentration of the toxic agents, significant sensitivity differences with respect to controls were obtained by one-way ANOVA followed by Duncan's test as indicated in the figures (Figures 4a-b, 5a-b). Images of *SOD1* sense and *PRDX2* antisense transfectant cultures stained with propidium iodide to show dead cells after treatment with hydrogen peroxide and thimerosal are shown in Figures 4c-e and 5c-e, respectively. Transfected cells treated with etoposide did not show significant differences with respect to control cells (datanot shown) and were not further studied.

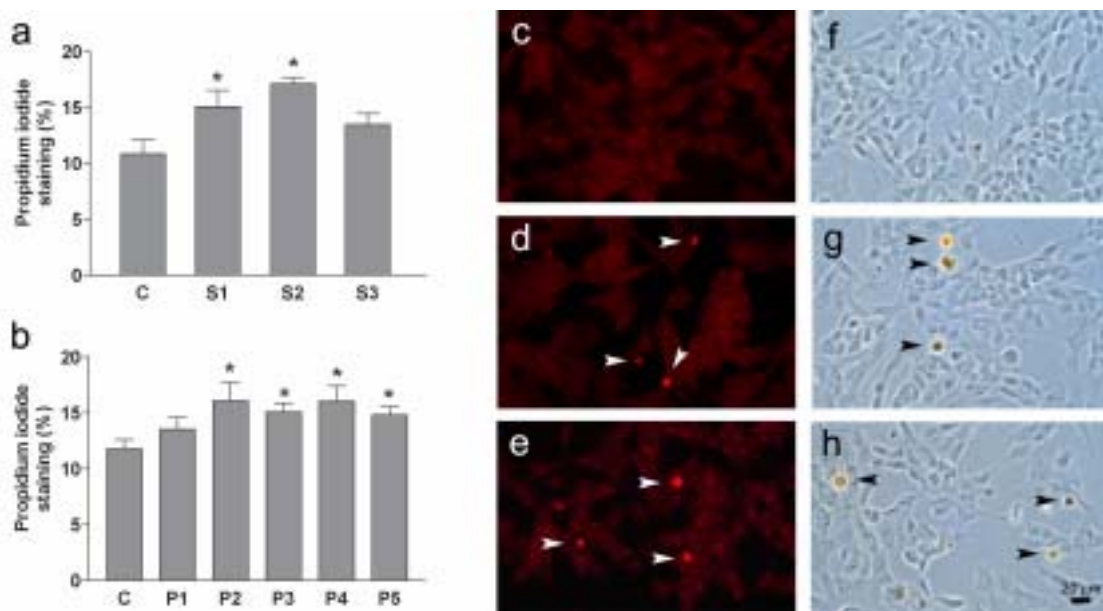


Fig. 3 Basal death in SH-SY5Y neuroblastoma cells stably transfected with human *SOD1* sense or *PRDX2* antisense constructs. **(a)** Percentage of propidium iodide fluorescence of *SOD1* transfected clones (S1-S3) as related to controls (C). **(b)** Percentage of propidium iodide fluorescence of *PRDX2* antisense clones (P1-P5) as related to controls (C). * $p<0.05$ as compared to controls, see Results for statistics. **(c,d,e)** Microphotographs of cells fixed after propidium iodide staining. Faint basal staining of living cells is detectable in control cultures (c), while highly fluorescent dead cells, indicated by arrowheads, appear both in S (d) and P (e) clones. **(f,g,h)** Microphotographs of TUNEL processed cultures of controls (f), S (g) and P (h) clones, with several positive cells for DNA fragmentation, marked by arrowheads, in both transfected clon types. Scale bar = 20 μ m.

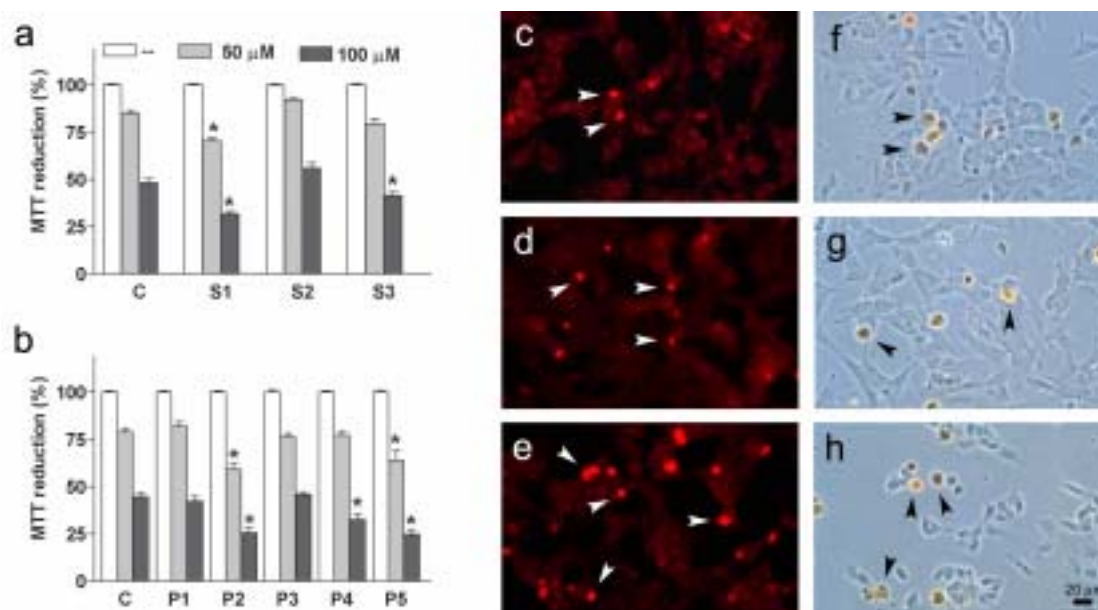


Fig. 4 Effect of 24-h exposure to 50 μM or 100 μM hydrogen peroxide on the viability of SH-SY5Y stably transfected with human *SOD1* sense or *PRDX2* antisense constructs. **(a)** Cytotoxicity as indicated by a decrease of the percentage of MTT reduction in *SOD1* transfected clones (S1-S3). * $p < 0.05$ as compared to the corresponding treatment in controls (C). **(b)** Cytotoxicity as indicated by a decrease of the percentage of MTT reduction in *PRDX2* antisense clones (P1-P5), * $p < 0.05$ as compared to the corresponding treatment in controls (C). **(c,d,e)** Microphotographs of cells stained with propidium iodide after 24-h exposure to 50 μM hydrogen peroxide. Some highly fluorescent dead cells are indicated by arrowheads in control cultures **(c)**, whereas a higher number of stained cells appear both, in S **(d)** and P **(e)** clones. **(f,g,h)** Microphotographs of TUNEL processed representative cultures of control **(f)**, S **(g)** and P **(h)** clones, also exposed to 50 μM hydrogen peroxide for 24 h, with positive cells indicated by arrowheads. The effect of hydrogen peroxide on cell morphology and culture disorganization is mainly apparent on P cells. Scale bar = 20 μm . (see the Results section for statistics).

Cell apoptosis in normal or oxidative stressful condition

Cells sensitive to oxidative radicals, in addition to poorer performance, usually show higher levels of apoptosis under oxidative stress conditions. In order to find out whether under-expression of *PRDX2* or over-expression of *SOD1* increased apoptosis in transfected neuroblastoma cells in basal or oxidative conditions, four different approaches were followed: i) TUNEL assay; ii) immunostaining of caspase-3; iii) immunodetection of caspase-3 activity upon a substrate (fodrine) and iv) direct quantification of caspase 3 activity.

In standard basal conditions, dead cells in both, *SOD1* sense and *PRDX2* antisense, clones suffered nuclear fragmentation as evidenced by the TUNEL assay (Figure 3f-h). Also, TUNEL positive cells were obtained after treatment with hydrogen peroxide (Figure 4f-h) or thimerosal (data not shown). Cell death due to thimerosal was caused, at least partially, through caspase-3 activation as shown by immunostaining of the cleaved caspase-3 17kD fragment (Figure 5f-h).

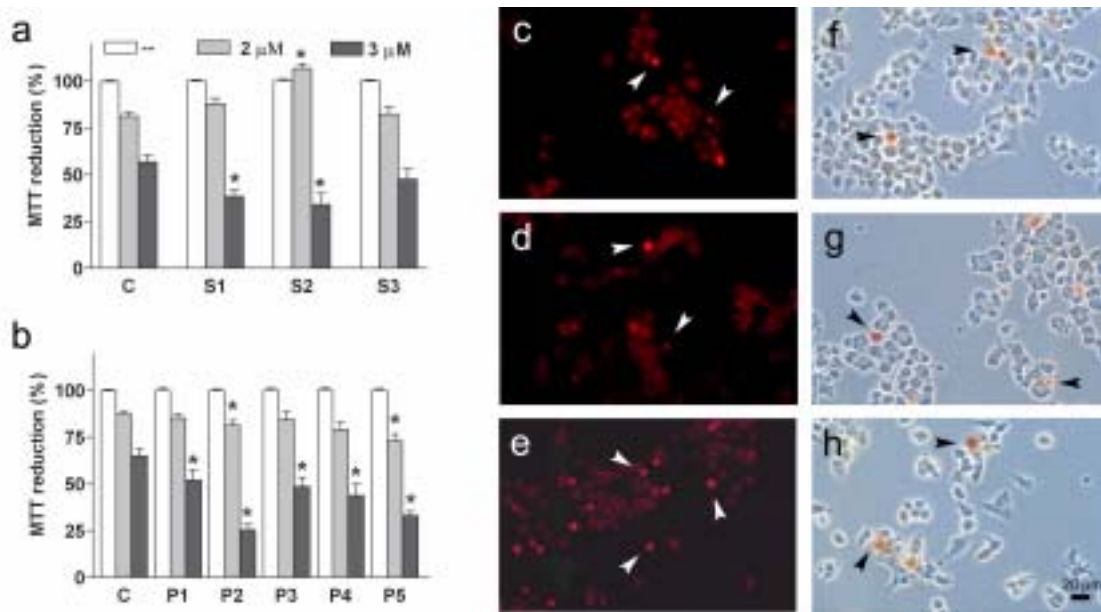
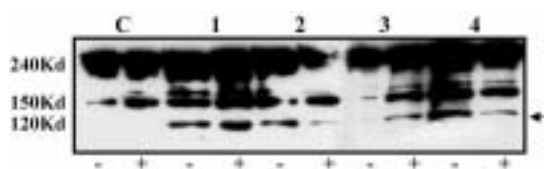


Fig. 5 Effect of 24-h exposure to 2 μM or 3 μM thimerosal on the viability of SH-SY5Y cells stably transfected with human *SOD1* sense or *PRDX2* antisense constructs. **(a)** Cytotoxicity as indicated by a decrease of the percentage of MTT reduction in *SOD1* transfected clones (S1-S3). * $p < 0.05$ as compared to the corresponding treatment in controls (C), see Results for statistics. **(b)** Cytotoxicity as indicated by a decrease of the percentage of MTT reduction in *PRDX2* antisense clones (P1-P5). * $p < 0.05$ as compared to the corresponding treatment in controls (C), see Results for statistics. **(c,d,e)** Microphotographs of cells stained with propidium iodide after 24-h exposure to 2 μM thimerosal. Some highly fluorescent dead cells are indicated by arrowheads in control cultures (c) and S clones (d), whereas a higher number of dead cells are evident in P clones (e). **(f,g,h)** Microphotographs of cleaved caspase-3 immunostaining of representative cultures of control (f), S (g) and P (h) clones after 24 h exposure to 2 μM thimerosal, with positive cells indicated by arrowheads. A similar harmful effect of thimerosal on cell morphology and culture organization of control and S clones, and a clearly more disruptive effect on P cells. Scale bar = 20 μm .

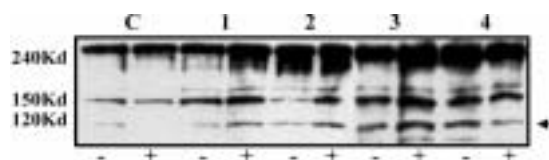
Immunodetection of caspase-3-dependant fodrine cleavage is considered an evidence of cellular apoptosis. Fodrine is produced as a 240 kD precursor protein, which is normally processed to an active 150 kD form. Upon activation of caspase-3, a 120 kD proteolytic product appears. In standard conditions, the cleaved 120 Kd fragment was barely detectable in the control cell lines (SH-SY5Y cells transfected only with the pTeton vector) (lanes C in Figure 6a-b). In contrast, a higher level of cleaved fodrine was detected in protein preparations from all *SOD1* sense (Figure 6a) and *PRDX2* antisense (Figure 6b) transfected cells, thus indicating an increase in apoptosis above the basal level. The same immunodetection was performed after treatment with hydrogen peroxide (100 μM) during three hours. Remarkably, a lower level of caspase-3 mediated apoptosis was apparent for both, *PRDX2* antisense and *SOD1*

sense clones, at 100 μ M of hydrogen peroxide (Figure 6c) when compared to controls: untransfected SH-SY5Y cells (Figure 6c, lanes SH) and control SH-SY5Y cells transfected with pTeton vector (Figure 6c, lanes C). Clone 4 from *PRDX2* antisense clones produced a faint band after longer-exposure times (data not shown).

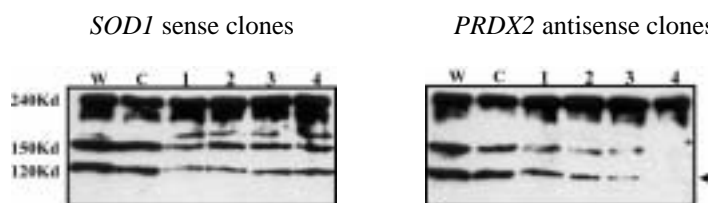
a) *SOD1* sense clones (S)



b) *PRDX2* antisense clones (P)



c) *SOD1* sense clones (S) and *PRDX2* antisense (P), 100 μ M hydrogen peroxide



d) caspase activity

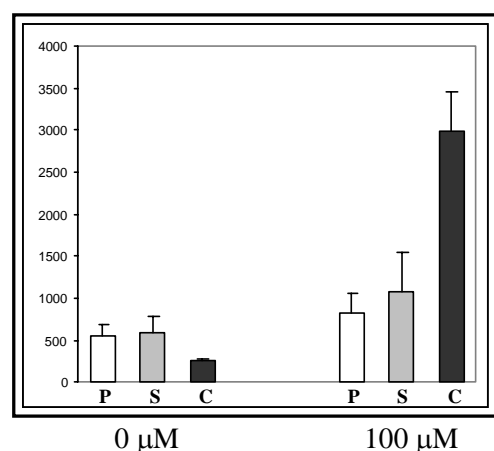


Figure 6. Detection of substrate cleavage by caspase-3 activity. Immunodetection of fodrine in protein extracts from *SOD1* sense (a) and (b) *PRDX2* antisense transfected clones, in basal conditions (the symbols - and + indicate the presence of tetracycline in the medium). (c) Immunodetection of fodrine in protein extracts from *PRDX2* antisense and *SOD1* sense clones in medium supplemented with 100 μ M H₂O₂; (d) Fluorimetric quantification of caspase-3 activity quantified in protein extracts from untreated and treated (100 μ M H₂O₂) cells.

The same tendency was observed by direct immunostaining of the cleaved caspase-3 17 kD fragment in hydrogen peroxide-treated cultures (data not shown). To validate the

immunodetection results, caspase-3 activity after of *PRDX2* under-expression and *SOD1* over-expression in conditions of oxidative stress was directly measured by fluorimetry using a fluorescent substrate. The values shown in Figure 6d (average of four clones from each population) further confirmed, 1) a slight increase of caspase-3 activation in transfectant clones as related to control cells under basal conditions and, 2) a remarkable lower increase of caspase-3 activation upon addition of high concentration of hydrogen peroxide.

Discussion

Obviously, many genes may contribute to the complex DS phenotype and, the gene dosage imbalance, in contrast with the impact of mutations, may introduce changes with subtle effects on the pathological outcome. Many strategies should be explored to understand the DS pathogenesis. To this end, the search for DS-differentially expressed genes, although not devoid from pitfalls, seems a valuable complementary approach to the identification of genes in chromosome 21.

SSH performed on DS and control fetal brains (18 to 23 gestational weeks) revealed that the *PRDX2* gene is under-expressed in DS samples. Densitometric Northern blot and real-time PCR analysis further confirmed this under-expression. The individual variability inherent to differences in the genetic background should be taken into account when considering the significance of differential gene expression between affected and non-affected individuals. In fact, DS patients have been reported to show a higher variability in gene expression, i.e. most phenotypic features are not displayed by every individual with trisomy 21 and the severity of those that are present is very variable (Reeves *et al.*, 2001). In this context, the number of samples analyzed is crucial to validate the SSH results but the difficulty of obtaining suitable fetal samples is a major drawback. Three individuals of each population were used for SSH and as many as seven DS and six controls were used to validate the results. In total, a set of 19 different samples was analyzed. Although *PRDX2* is not located on chromosome 21, its antioxidant activity and its role in the regulation of the cell redox status made it a good candidate to contribute to the oxidative stress vulnerability reported in DS neurons.

Gene transfection in human neuroblastoma SH-SY5Y under standard and stressful conditions allowed us to assess the presumed *PRDX2* under-expression contribution

to the increased neuronal oxidative stress associated to DS (Busciglio and Yankner, 1995; Nagy, 1999) and compare it with that of *SOD1* over-expression. Previous reports on over-expression of several members of the PRDX family have shown protection from apoptosis caused by oxidative agents such as hydrogen peroxide and etoposide (Kim *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Sarafian *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 1998a; Shau *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000; Simzar *et al.*, 2000). Moreover, treatment with antisense *PRDX2* oligonucleotides, which effectively prevented *PRDX2* expression, sensitized cells to oxidative stress caused by radiation (Park *et al.*, 2000).

According to our results, the use of an antisense construct did not absolutely block *PRDX2* expression, but caused a reduction on *PRDX2* levels to 0.6-0.9-fold, depending on the clones. In this respect, the *PRDX2* expression attained is within the range of that detected in DS fetal brains. Under-expression of *PRDX2* increases slightly the rate of cultured cells undergoing apoptosis in basal conditions, as deduced from our data on caspase-3 activity (both, immunodetection and fluorescence of cleaved substrates). This is in agreement with a higher spontaneous death rate, as seen by propidium iodide staining. Under oxidative stress conditions by hydrogen peroxide and thimerosal *PRDX2* antisense clones showed a higher mortality than control cells, although through different pathways depending on the toxic agent. In the case of thimerosal, caspase-3 was activated. In presence of hydrogen peroxide, there was a lower level of caspase 3 activity in comparison to controls and, therefore, death proceeded partially through caspase-3 independent apoptosis pathways and/or necrosis.

Previous studies on over-expression of *SOD1* have produced controversial data. While some authors argue that the over-expression could generate a deregulation of the cell redox status leading to increased oxidative damage (Iannello *et al.*, 1999), others have shown increased cell viability and organism longevity (Parkes *et al.*, 1998). The latter were mainly attributed to a concomitant glutathione peroxidase (GPx) activation that would balance the activity of both enzymes (de Haan *et al.*, 1996; de Haan *et al.*, 1992). In our work, the effect of *SOD1* over-expression on cell viability was deleterious both, in standard culture conditions and under oxidative stress caused by hydrogen peroxide (in agreement with Lee *et al.*, 2001), consistent with a lack of activation of GPX enzymatic activity (unpublished results). A partial shift to a caspase-3-independent mediated death at 100 μ M hydrogen peroxide was observed, similar to that observed in the *PRDX2* antisense clones.

Mental retardation in DS has been often associated to higher sensitivity of neurons to physiological oxidative radicals and increased neuronal apoptosis (Busciglio and Yankner, 1995; Iannello *et al.*, 1999; Nagy, 1999; Sawa, 1999). Also, in DS, *PRDX2* (our data) and *SOD1* appear under- and over-expressed, respectively. It is suggestive that the effect of both gene expression alterations cause lower cell viability in standard growth conditions. These results support that decreased oxidative stress defence mechanisms may be in the basis of the apoptosis observed in DS brains. It also is noteworthy that underexpression of *PRDX2* in DS (according to our data) may contribute to a similar or even greater extent to neuron oxidative alterations than the already described *SOD1* overexpression.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona for the use of the 377 ABI PRISM, the ABI PRISM 6700 Automated Nucleic Acid Workstation and the ABI PRISM 7700 sequence detection system. We are indebted to Dr. N. Torán (Hospital de la Vall de Hebrón) for providing the fetal brain samples. We also thank O. González-Angulo and M. Martín for technical assistance, Dr. G. Mengod for advice on cell transfection procedures, V. Yuste, J.R. Bayascas and J.X. Comella for advice in caspase activity detection, Dr. R. Grau for providing fluorimeter facilities and Robin Rycroft for revising the English. The pure PRDX2 protein and polyclonal antibody against PRDX2 were a kind gift from Dr. H. Z. Chae. M^a F. S.-F. was in receipt of a FPI fellowship from the MEC (Ministerio de Educación y Ciencia) and J. S. received an IDIBAPS fellowship. This study was funded by BIO4-CT97-2123, PB96-0220 and PM99-0168 (Ministerio de Ciencia y Tecnología) to R.G.-D. and Grant 00-1094 from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) to C.S.

References

- Busciglio, J., and Yankner, B. A. (1995). Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* **378**, 776-9.
- Chae, H. Z., Chung, S. J., and Rhee, S. G. (1994c). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* **269**, 27670-27678.
- Chae, H. Z., Kim, H. J., Kang, S. W., and Rhee, S. G. (1999). Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diab Res Clin Pract* **45**, 101-112.
- Chae, H. Z., Kim, L.-H., Kim, K., and Rhee, S. G. (1993). Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**, 16815-16821.
- Chae, H. Z., Robison, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G., and Rhee, S. G. (1994a). Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: Alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 7017-7021.

- Chae, H. Z., Uhm, T. B., and Rhee, S. G. (1994b). Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 7022-7026.
- Chen, J.-W., Dodia, C., Feinstein, S. I., Jain, M. K., and Fisher, A. B. (2000). 1-Cys Peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. *J Biol Chem* **275**, 28421-28427.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-169.
- de Haan, J., Cristiano, F., Iannello, R., Bladier, C., Kelner, M. J., and Kola, I. (1996). Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum Mol Genet* **5**, 283-92.
- de Haan, J., Newman, J. D., and Kola, I. (1992). Cu/Zn superoxide dismutase mRNA and enzyme activity, and susceptibility to lipid peroxidation, increases with aging in murine brains. *Brain Res Mol Brain Res* **13**, 179-87.
- Epstein, C. J. (1995). Epilogue: toward twenty-first century with Down Syndrome -a personal view of how far we have come and how far we can reasonably expect to go. *Prog Clin Biol Res* **393**, 241-246.
- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 248-253.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E., and Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* **119**, 203-210.
- Hassold, T., and Jacobs, P. (1984). Trisomy in man. *Annu Rev Genet* **18**, 69-97.
- Iannello, R. C., Crack, P. J., de Haan, J. B., and Kola, I. (1999). Oxidative stress and neuronal dysfunction in Down Syndrome. *J Transm Suppl* **57**, 257-268.
- Kang, S. W., Chae, H. Z., Seo, M. S., Kim, K., Baines, I. C., and Rhee, S. G. (1998a). Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and Tumor Necrosis Factor- α . *J Biol Chem* **273**, 6297-6302.
- Kim, A. T., Sarafian, T. A., and Shau, H. (1997). Characterization of antioxidant properties of Natural Killer-Enhancing Factor-B and induction of its expression by hydrogen peroxide. *Toxicol Appl Pharmacol* **147**, 135-142.
- Kim, H., Lee, T.-H., Park, E. S., Suh, J. M., Park, S. J., Chung, H. K., Kwon, O.-Y., Kim, Y. K., Ro, H. K., and Shong, M. (2000). Role of peroxideroxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-induced apoptosis in thyroid cells. *J Biol Chem* **275**, 18266-18270.
- Lee, M., Hyun, D.-H., Halliwell, B., and Jenner, P. (2001). Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative stress and cell death induced by hydrogen peroxide, 4-hydroxynonenal or serum deprivation: potentiation of injury by ALS-related mutant superoxide dismutases and protection by Bcl-2. *J Neurochem* **78**, 209-220.
- Lim, M. J., Chae, H. Z., Rhee, S. G., Yu, D.-Y., Lee, K.-K., and Yeom, Y. I. (1998). The type II peroxiredoxin gene family of the mouse: molecular structure, expression and evolution. *Gene* **216**, 197-205.
- Lim, Y. S., Cha, M. K., Kim, H. K., Uhm, T. B., Park, J. W., Kim, K., and Kim, I. H. (1993). Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role *in vivo*. *Biochem Biophys Res Comm* **192**, 273-280.
- Macklis, J. D., and Madison, R. D. (1990). Progressive incorporation of propidium iodide in cultured neurons correlates with declining electrophysiological status: A fluorescence scale of membrane integrity. *J Neurosci Methods* **3**, 43-46.
- Matés, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol* **153**, 83-104.
- Mizuguchi, M., and Hayakawa, T. (2001). Characteristics of adenovirus-related tetracycline-controllable expression system. *Biochim Biophys Acta* **1568**, 21-29.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.

- Nagy, Z. (1999). Mechanisms of neuronal death in Down's syndrome. *J Neural Transm Suppl* **57**, 233-247.
- Netto, L. E. S., Chae, H. Z., Kang, S.-W., Rhee, S. G., and Stadtman, E. R. (1996). Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. *J Biol Chem* **271**, 15315-15321.
- Pahl, P., Berger, R., Hart, I., Chae, H. Z., Rhee, S. G., and Patterson, D. (1995). Localization of TDPX1, a human homologue of the yeast Thioredoxin-Dependent Peroxide Reductase gene (TPX), to chromosome 13q12. *Genomics* **26**, 602-606.
- Park, S.-H., Chung, Y. M., Lee, Y.-S., Kim, H. J., Kim, J. S., Chae, H. Z., and Yoo, Y. D. (2000). Antisense of human peroxiredoxin II enhances radiation-induced cell death. *Clin Cancer Res* **6**, 4915-4920.
- Parkes, T. L., Elia, A. J., Dickinson, D., Hilliker, A. J., Phillips, J. P., and Boulianne, G. L. (1998). Extension of Drosophila lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nat Genet* **19**, 171-174.
- Reeves, R. H., Baxter, L. L., and Richtsmeier, J. T. (2001). Too much of a good thing mechanisms of gene action in Down Syndrome. *Trends in Genet* **17**, 83-87.
- Rosa, R., Sanfeliu, C., Suñol, C., Pomés, A., Rodríguez-Farré, E., Schousboe, A., and Frandsen, A. (1997). The mechanism for hexachlorocyclohexane-induced cytotoxicity and changes in intracellular Ca²⁺ homeostasis in cultured cerebellar granule cell neurons is different for the g and d isomers. *Toxicol Appl Pharmacol* **142**, 31-39.
- Sarafian, T. A., Rajper, N., Grigorian, B., Kim, A., and Shau, H. (1997). Cellular antioxidant properties of human natural killer enhancing factor B. *Free Rad Res* **26**, 281-289.
- Sarafian, T. A., Verity, M. A., Vinters, H. V., Shih, C. C.-Y., Shi, L., Ji, X. D., Dong, L., and Shau, H. (1999). Differential expression of peroxiredoxin subtypes in human brain cell types. *J Neurosci Res* **56**, 206-212.
- Sawa, A. (1999). Neuronal cell death in Down's syndrome. *J Neural Transm Suppl* **57**, 87-98.
- Shau, H., Huang, A. C. J., Faris, M., Nazarian, R., Vellis, J. D., and Chen, W. (1998). Thioredoxin Peroxidase (Natural Killer Enhancing Factor) regulation of activator protein-1 function in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* **249**, 683-686.
- Simzar, S., Ellyin, R., Shau, H., and Sarafian, T. A. (2000). Contrasting antioxidant and cytotoxic effects of peroxiredoxin I and II in PC12 and NIH3T3 cells. *Neurochem Res* **25**, 1613-1621.
- Yim, M. B., Chae, H. Z., Rhee, S. G., Chock, P. B., and Stadtman, E. R. (1994). On the protective mechanism of the thiol-specific antioxidant enzyme against the oxidative damage of biomacromolecules. *J Biol Chem* **269**, 1621-1626.
- Zhang, P., Liu, B., Kang, S. W., Seo, M. S., Rhee, S. G., and Obeid, L. M. (1997). Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J Biol Chem* **272**, 30615-30618.

Capítol 3. La sobreexpressió de *FABP7* en els cervells fetals Down està relacionada amb l'excès de dosi gènica de *PKNOX1* (*PREP1*)

Mitjançant l'anàlisi d'hibridació substractiva supressora es va detectar la sobreexpressió de *FABP7* (mapat a 6q22-23) en cervells fetals d'individus Down d'entre 18 i 23 setmanes de gestació. Aquesta sobreexpressió es va confirmar mitjançant tècniques d'anàlisi de transferència *Northern* sobre un total de 10 mostres (5 disòmics i 5 trisòmics) i RT-PCR quantitativa a temps real sobre un total de 16 mostres (7 disòmics i 9 trisòmics). Els resultats obtinguts indicaven un increment de l'expressió de *FABP7* de 1.3 (*Northern*) i 1.63 (RT-PCR) vegades.

Per determinar la relació entre la trisomia del cromosoma 21 i la sobreexpressió de *FABP7* es va aïllar i clonar, mitjançant la tècnica de la PCR inversa, la regió promotora de *FABP7*. La seqüenciació d'aquesta regió va permetre confirmar la conservació d'un domini d'unió dels factors Pbx/POU que ja havia estat descrit a ratolins. Les proteïnes PBX formen complexos amb proteïnes que contenen dominis homeobox, com és el cas de *PKNOX1* (també anomenat *PREP1*) que mapa a 21q22.3. Mitjançant RT-PCR quantitativa a temps real es va confirmar la sobreexpressió de *PKNOX1* en cervells fetals humans (1.8 vegades més). Experiments d'electroforesi de retardament de bandes (EMSA) van posar de manifest la unió de la proteïna PKNOX1 recombinant purificada a la seqüència promotora de *FABP7* (concretament al domini d'unió Pbx/POU). Finalment, els experiments d'assaig luciferasa sobre cèl.lules en cultiu de neuroblastoma revelaren una transactivació de *FABP7* deguda a la sobreexpressió de *PKNOX1*.

Els nostres resultats indiquen clarament que la sobreexpressió de *FABP7* en individus Down és, molt probablement, causada per la sobreexpressió de *PKNOX1*, degut a l'efecte de dosi gènica associat a la trisomia del cromosoma 21.

Overexpression of *FABP7* in Down Syndrome fetal brains is related to *PKNOX1* gene-dosage imbalance

M^a Francisca Sánchez-Font, Roser González-Duarte, Gemma Marfany¹
Departament de Genètica. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.
Avda. Diagonal, 645. 08028 Barcelona. Spain

Running title: Overexpression of FABP7 in DS fetal brains

Keywords: Down syndrome/ chromosome 21 trisomy/ FABP7/ PKNOX1/ PBX

- ¹ to whom correspondence should be addressed
- e-mail: gemma@bio.ub.es
- Phone: 34-93-4021502
- FAX: 34-93-4110969

Summary

Suppression Subtractive Hybridization performed on Down Syndrome (DS) fetal brains allowed to identify a differentially expressed gene, *FABP7*, mapped at 6q22-23. *FABP7* overexpression in DS brains was verified by densitometric analysis of Northern blots (1.3-fold) and real-time PCR (1.63-fold). To elucidate the molecular basis of the differential expression and establish the relationship with the 21-chromosome trisomy, the *FABP7* promoter was cloned by genomic inverse-PCR. Comparison to the mouse orthologue revealed conservation of reported regulatory elements, among them a Pbx/POU binding site, known to be the target of PBX heteromeric complexes. PBX partners are homeobox-containing proteins, such as PKNOX1 (PREP1), a transcription factor mapping at 21q22.3. Interestingly, we showed: i) over-expression of *PKNOX1* in DS fetal brains, ii) *in vitro* specific binding of recombinant PKNOX1 to the Pbx/POU site and iii) *in vivo* *FABP7* promoter transactivation in cultured neuroblastoma cells associated to *PKNOX1* over-expression. To our knowledge, this is the first report illustrating a direct link between overexpression of a gene not mapping on chromosome 21 and the gene-dosage imbalance generated by the chromosome 21 trisomy.

Introduction

The Down Syndrome (DS) is the most common autosomal aneuploidy in human, affecting up to 1 in 700 newborns (1,2). Caused by total or partial trisomy of chromosome 21, it appears associated with a variety of more than 80 clinical traits, including typical facial features, anomalies of the intestinal tract, muscular hypotonia, increased risk of leukemia, congenital heart defects and mental retardation (3).

According to the gene dosage effect hypothesis, the imbalance of a single gene or group of genes located at the trisomic region would be responsible for a particular DS feature. Besides, the presence of three copies of some of these genes may alter the expression of genes located at other chromosomes, which therefore would also contribute to the development of the DS phenotype.

The molecular basis of DS can be approached through cloning and functional characterization of chromosome 21 genes. Recently, the completion of the 21-chromosome sequence has added 98 predicted ORFs and 59 pseudogenes to the already reported 127 genes (4). Nonetheless, after a huge amount of effort the molecular basis of DS is still far from being understood. Among the new complementary approaches, the identification of differentially expressed genes -irrespective of their chromosomal location- could provide very valuable insights into the complexity of DS pathogenesis. Current strategies to attain this aim are subtractive hybridization (SH) (5-9), serial analysis of gene expression (SAGE) (10), and differential display PCR (DD-PCR) (11-12).

To date, only a handful of differentially expressed genes in DS have been reported. Some of them are located on chromosome 21, i.e. Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1), a key enzyme in the metabolism of oxygen free radicals (13-14), and the amyloid precursor protein (APP), most probably involved in the DS associated early-onset Alzheimer's disease (15). Also, several genes located on other chromosomes have shown an altered expression in DS, such as TRX (involved in cell oxidative satuts), XRCC1 (repair functions) and dynamin (neural tissue development) (16).

As mental retardation is a DS universal phenotypic feature, we have focussed on differential gene expression in fetal brains and performed suppression subtractive hybridization (SSH). Our data, also verified by Northern analysis and real-time PCR, clearly showed DS-associated over-expression of *BFABP* or *FABP7* (brain fatty acid-binding protein). This gene, also named *BLBP* (brain lipid binding protein), had been previously located at 6q22-23 by FISH (17-20).

Fatty acid-binding proteins (FABPs) are small peptides (14-16 kD), named according to the tissue of origin, which bind long chain polyunsaturated fatty acids. At least eight FABP forms, each encoded by a different gene, have been characterized (brain or retina, liver, heart or muscle, intestine, epidermis, adipocyte, ileon and myelin). The dual cytoplasmic and nuclear localization of most family members (including FABP7) (20) supports their involvement in the uptake, storage and/or delivery of fatty acids and retinoids into the nucleus (21-23). In particular, FABP7 initially expressed in the radial glial cells of the developing central nervous system becomes later restricted to the glial limitant and Bergman glial cells, in agreement with its predicted role in the organization of the radial glial fiber system required for the correct migration of immature neurons (17, 18). Besides, FABP7 shows high affinity for docosahexaenoic acid (DHA), the major polyunsaturated long chain fatty acid in the brain phospholipid pool (24). Deficiencies in DHA cause severe and progressive neurological disorders (25, 26).

To understand the molecular basis underlying *FABP7* over-expression in DS we have undertaken a functional analysis of the promoter region. In the *Fabp7* murine counterpart three distinct regulatory elements have been highlighted: a radial glial specific element (RGE located at -800 to -300 bp); a sequence controlling *Fabp7* expression in dorsal root ganglion and notocord (DRGE located at -800 to -1200 bp); and a silencer for transcriptional suppression in dorsal spinal cord (DSCS located at -1200 to -1600 kb) (27). Only the region spanning -800 to -300 bp is required to attain developmentally regulated expression throughout the fetal central nervous system (27) and it contains a hybrid Pbx/POU binding site (-370 to -362), recognized by PBX-1,

BRN-1 and BRN-2 (28). The PBX transcription factors form stable heterodimeric complexes with other homeobox-containing proteins (29-32). Among them, human *PKNOX1* (Pbx/knotted homeobox1), named *Prep1* (Pbx regulating protein 1) in mice, interestingly maps at 21q22.3 (30, 33). Evidence on the conservation of this site in the human *FABP7* promoter and on the regulatory involvement of PKNOX1 would strongly support a direct link between trisomy 21 and *FABP7* over-expression.

Experimental procedures

Samples

Twenty-two male fetal brains obtained from pregnancy weeks 18-23 were used in this study. Twelve of these tissue samples were diagnosed as trisomic for chromosome 21 by amniocentesis. The remaining samples (10) did not show any chromosomal anomaly and were used as controls. Six samples (3 disomic vs 3 trisomic) were used for SSH. Differential expression was confirmed using 10 samples (5 disomic vs 5 trisomic) for densitometric analysis of Northern blot hybridizations and 16 samples (7 disomic vs 9 trisomic) for real-time PCR quantification. This research followed the tenets of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all the parents involved in this study.

mRNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from 6 samples (3 DS vs 3 control) according to (34). Two micrograms of mRNA were obtained from total RNA using biotinylated oligod(T) (Promega) and streptavidin-magnetic beads (Dynal), following the manufacturer's instructions. Poly A+ RNA was retrotranscribed at 42°C for 1.5 h using MMLV-RT (Promega) according to the supplier's instructions. The cDNA second-strand was obtained using the enzyme-cocktail and protocol provided by the PCR-SELECT cDNA subtraction kit (Clontech).

Subtractive Hybridization

Suppression Subtractive Hybridization (SSH) was performed on DS and control mRNAs (obtained as described above) using the PCR-SELECT cDNA subtraction kit (Clontech) following the manufacturer's instructions. These minor modifications were introduced: *RsaI* digestion time was increased to ensure complete digestion, treatment with the Klenow enzyme was performed previously to the adaptor ligation, which was performed overnight at 13°C and then 2h at room temperature. Differentially expressed cDNAs were amplified by two rounds of suppression PCR amplification using the Advantage KlenTaq polymerase (Clontech). Twenty primary PCR cycles and thirty secondary PCR cycles were performed according to the manufacturer's instructions.

Cloning and sequencing of putative differentially expressed cDNAs

PCR products generated by SSH were subcloned into pBLUESCRIPT SK+ vector (Stratagene) by standard procedures. Sequencing was performed using an automated ABI 377 DNA sequencing system (Applied Biosystems). DNA sequence comparisons were performed at BLAST servers at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), BCM (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/>) and links therein.

Quantification of differential gene expression by Northern blot

Total RNA of male human fetal brains (5 control and 5 DS samples) from 18-23 gestational weeks was isolated according to (34). Total RNA samples were electrophoresed on

formaldehyde agarose (1.2%) gels, transferred onto Hybond nylon membranes (Amersham) and UV cross-linked. After pre-hybridization, blots were hybridized with a random-primed $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP labelled human *FABP7* cDNA probe at 50% (v/v) formamide for 18 hours at 42°C. The filters were washed (twice in 2x SSPE/0.1%SDS and twice in 1x SSPE/0.1%SDS both at 65°C) and autoradiographed. The differential expression was confirmed by densitometry (ULTROSCAN Enhanced Laser Densitometer, LKB) of the autoradiographed blots. A *GAPDH* probe was also hybridized and analyzed as a control for loading and integrity of RNA.

Quantification of differential gene expression by real-time (quantitative) PCR

Nine DS and seven control male human fetal brain samples were analyzed. Total RNA from 5 mg of tissue was obtained using the ABI PRISM 6700 Automated Nucleic Acid Workstation (Applied Biosystems). RT-PCRs were produced using the Taqman Reverse transcription reagents (Roche molecular systems). Quantitative PCRs were performed with the Universal Master Mix (Applied Biosystems) under the manufacturer's conditions. The real time amplification was analyzed by the ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems). The primers and Taqman probe (using FAM as reporter and TAMRA as quencher) were designed following the Primer Express software. To normalize the *FABP7* and *PKNOX1* quantitative determinations, *GAPDH* (primers and probe from Applied Biosystems) was used as an endogenous control.

Inverse PCR amplification

The protocol used for iPCR is adapted from (35). Human blood genomic DNA (1 μg) was digested overnight with *EcoRI*. After heat-inactivation of the restriction enzyme, the digested DNA was diluted to a final concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The circularisation of molecules was obtained in a 1 ml final volume by an overnight ligation at 13°C and then 2 hours at room temperature. Inverse PCR conditions were: 94°C for 20s and 68°C for 5 min during 40 cycles using LE High Fidelity Taq polymerase (Roche). The amplified band was cloned into pBLUESCRIPT SK+ vector (Stratagene), sequenced and compared to DNA databases as described above.

Primers used to perform the inverse PCR amplification:

FABP7.1 (reverse) 5'-CACAGAAAGCCTCCACCATCCT-3' (complementary to the ATG codon)

FABP7.2 (forward) 5'-GCTACCTGGAAGCTGACCAACA-3' (sequence from the first exon, downstream the ATG codon)

Nuclear cell extracts

Nuclear SH-SY5Y extracts were obtained according to (36) with minor modifications (Buffer C: 10% glycerol and 1.5mM MgCl₂). Protein concentration was measured by the Bradford method (reagents purchased from Bio-Rad).

Recombinant PKNOX1 purification

Human *PKNOX1* cDNA was obtained by PCR on total human brain cDNA (obtained as described) and forward and reverse primers containing the ATG and STOP codons, respectively. The coding region of *PKNOX1* was cloned into the pGEX-4T-1 expression vector (Amersham Pharmacia) to synthesize a GST-PKNOX1 fusion protein. BL21 *E.coli* cells were transformed with this construct and induced with IPTG (100mM) for 3 hours at 30°C. Cells were sonicated for 3 minutes and the GST-PKNOX1 protein was purified according to the manufacturer's instructions, using glutathione-sepharose 4B followed by thrombin cleavage to separate PKNOX1 from GST.

EMSA

A double-stranded (ds) oligonucleotide probe was designed on the human *FABP7* promoter sequence, and it encompassed the 9-bp Pbx/POU binding site reported in the homologous mouse promoter (28). The annealing reaction was performed in 100 mM NaCl during 5 min at 80°C and then, was allowed to reach room temperature. The ds-probe was end-labelled using

³² γ P-dATP and T4 polynucleotide kinase (Promega). Protein binding reactions were performed in a total volume of 20 μ l for 20 min at 37°C by combining 100.000 cpm of ds oligonucleotide probe, 2 μ g poly (dI-dC) (Amersham Pharmacia Biotech), 6 μ g acetylated BSA (Promega), 0,01% Nonidet-40 and 8 μ g of SH-SY5Y nuclear extract either alone or supplemented with purified recombinant PKNOX1 protein. The binding buffer contained 20 mM HEPES pH7.9, 60 mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT and 10% glycerol. Samples were loaded onto non-denaturing 5% acrylamide/bis-acrylamide (29:1) and 2.5% glycerol gels and resolved at 20 mA at 4°C. Gels were dried and autoradiographed. Competition assays were performed in molar excess of unlabelled ds oligonucleotides. In specific competitions, the non-labelled ds oligonucleotide containing the Pbx/POU binding site was used at 5000-fold excess. In non-specific competitions, non-labelled ds oligonucleotide containing the GRE binding site was used at 5000-fold excess. To further confirm the specificity of the binding, a mutated ds oligonucleotide containing the same *FABP7* promoter sequence with a deletion comprising the 9-bp of the Pbx/POU binding site was used at 5000-fold excess. Sequences of the ds oligonucleotides used (only forward strands are shown):

Pbx/POU binding site: 5'-CATTAACGGAAAATCAATCTGAATGCCCCAT-3'

Mutated Pbx/POU binding site: 5'-CATTAACGGAAAATGCCCCAT-3'

GRE: 5'-TAATGAGAGAAGATTCTGTTCTAATGACCA-3'

Luciferase activity assay

Human SH-SY5Y neuroblastoma cells were grown in DEMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin and 1 μ g/ml of streptomycin (reagents from GIBCO-BRL) in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. Approximately 2x10⁶ cells in a 60mm plate were transiently transfected with 8.5 μ g of DNA (see DNA constructs below) and 12.5 μ l of FuGENETM Transfection Reagent (Roche). Twenty-four hours after transfection, luciferase (Luciferase assay system from Promega) and β -Galactosidase (chemiluminescent β -Gal reporter gene assay, Roche) activities were measured in a TD-20/20 Luminometer (Turner Designs).

DNA constructs for the luciferase assay

The pGL3-*FABP7*prom-luciferase was obtained by cloning the 1,2 kb *Pst I* fragment (nt 442 to nt 1684, according to numeration of Fig. 2) from the human *FABP7* promoter (including the Pbx/POU binding site) into the pGL3 Basic luciferase reporter vector (Promega), in order to drive the luciferase expression from the *FABP7* promoter. The pGL3-mutant*FABP7*prom-luciferase, which lacked the Pbx/POU binding site (9bp), was obtained by site-directed mutagenesis. To generate this deletion, a first PCR using a forward (5'-TTTAATTGGGAGGGGAGAG-3') and a reverse mutated primer (5'-ATGGGGCATTTCCTTAATG-3') was performed to amplify 846 bp of the promoter 5' region. A second PCR using a forward mutated (5'-CATTAACGGAAAATGCCCCAT-3') and a reverse primer (5'-CTCAGAAGACCCTTACACCT-3') allowed to amplify 418 bp of the promoter 3' region. Both PCR products were purified, mixed in equimolecular concentrations, denatured, allowed to anneal for 30 min at room temperature and filled-in with Taq polymerase plus nucleotides (5 min). After addition of the non-mutated forward and reverse primers, a 25 cycles PCR (94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 2 min) was performed to amplify the final 1.2 kb promoter fragment with the deletion.

The pSV-*PKNOX1* construct was obtained by substituting the β -galactosidase gene of the pSV- β -Gal vector (Promega) by the coding region of *PKNOX1*. In this construct, *PKNOX1* expression was controlled by the constitutive CMV promoter. The pSV- β -Gal vector (Promega) was used to measure the efficiency of each transfection and the pSV-empty vector (without the β -galactosidase gene) was used to equilibrate the DNA concentrations as well as a control for basal luciferase activity in transfections without the *PKNOX1* construct.

Results

FABP7 over-expression in DS patients

Fetal brain samples from three DS and three control individuals were used for SSH forward and reverse experiments. The forward assay allowed the identification of presumably over-expressed mRNAs in DS brains, whereas the reverse strategy would amplify down-regulated transcripts. Two rounds of the forward SSH -to enrich the sample in the differentially expressed transcripts- were followed by two rounds of PCR amplification. After this procedure, two bands of approximately 100 bp and 550 bp were clearly observed. The shortest corresponded to a fragment of the ribosomal L36 protein cDNA and the longest (550 bp) to a *FABP7* cDNA fragment. Then, efforts were concentrated on the latter.

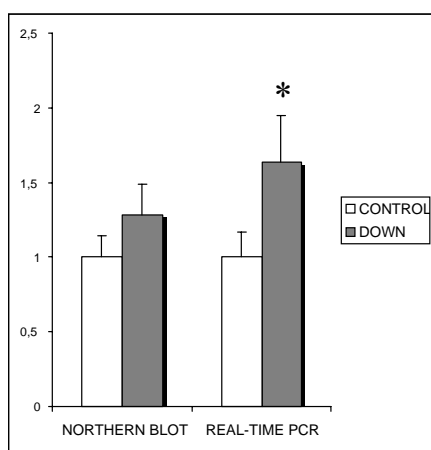


Figure 1. Average *FABP7* expression in control and DS fetal brains by Northern blot hybridization and real-time PCR. All values are given in arbitrary units and normalized using *GAPDH* as an endogenous control. The statistical error is also shown. The expression difference detected between trisomic and disomic brains by real-time PCR is statistically significant (Man-Whitney test, $p \leq 0.05$)

FABP7 over-expression in DS fetal brains was further confirmed by densitometric analysis of Northern blots from total RNA as well as by quantitative PCR. Ten age-matched samples from DS and controls (five individuals each) were subjected to Northern analysis hybridized with a human *FABP7* probe. *GAPDH* was used to normalize RNA loading differences. The results obtained are depicted on Fig.1. Sixteen samples (the previous ten plus four DS and two controls) were also quantified by real-time PCR. Again, *GAPDH* was used as an internal control. According to the

densitometric and quantitative PCR analyses, DS fetal brains overexpressed *FABP7* by 1.3 fold and 1.63 fold, respectively. The results are also depicted on Fig. 1.

Cloning of the human FABP7 promoter

To further investigate the *FABP7* over-expression associated to DS, we intended to analyze the promoter region of this gene. In the murine counterpart three distinct transcriptional regulatory elements have been described: a radial glial specific element (RGE), a region controlling *Fabp7* expression in dorsal root ganglion and notocord (DRGE), and a silencer required for correct transcription suppression in dorsal spinal cord (DSCS) (27).

The region stretching from -300 to -800 bp is necessary and sufficient for developmentally regulated expression throughout the fetal central nervous system (27). Two domains have been described within this region: a hormone responsive element (HRE) and a Pbx/POU binding site. The hybrid Pbx/POU binding site located in this promoter at -370 to -362 bp is the target of PBX-1, BRN-1 and BRN-2 (28).

As the human genomic sequence of this promoter was not then available, an inverse PCR was set up to isolate and clone this genomic fragment (GenBank Accession number AY070217). Genomic DNA was digested with *EcoRI*, diluted and ligated to obtain circular molecules. For the PCR, the reverse primer was complementary to the initial ATG codon, while the forward primer contained part of the first exon downstream the ATG. The PCR consistently amplified a 2.7 kb band, which was subsequently cloned and sequenced. The amplified fragment encompassed 1.8 kb of a sequence highly homologous to the *Fabp7* mouse promoter and 0.9 kb containing the first and second *FABP7* exons plus some intronic sequences. The alignment between the human and mouse regions revealed that all the murine regulatory elements were conserved in the human promoter and a similar location for the presumptive Pbx/POU binding site (Fig.2).



Figure 2. Sequence alignment of murine and human FABP7 (BFABP) promoters. Nucleotide identities are boxed in black. Conserved regulatory motifs (the conserved hormone responsive element (HRE), the Pbx/POU binding site and the TATA box) and *PstI* sites, are indicated. The dotted underline indicates the sequence of the probe used for EMSA. The transcription initiation site is marked by an arrow-head.

PKNOX1, a PBX partner, is over-expressed in DS

PBX transcription factors (PBX1, PBX2 and PBX3) are homeobox proteins known to form stable heterodimeric complexes with other homeobox containing proteins, such as HOX and PREP1 (31, 32, 36-40). Depending on the partner, the PBX-containing complexes display differential affinities for binding promoter motifs, even with antagonistic properties. Different genes, such as somastostatin (37), alpha 2(V) collagen

(COL5A2) (41) and urokinase plasminogen activator (31) are known to be regulated by PREP1/PBX heterodimeric complexes. Interestingly, human PREP1, named PKNOX1, is located on chromosome 21q22.3 (30, 33). If PKNOX1 could bind to the promoter through a PBX/PKNOX1 complex to trans-activate *FABP7* expression, the over-expression of this gene in DS brains would be directly associated to the gene-dosage imbalance associated to the 21 chromosome trisomy. To test this hypothesis, we investigated: i) *PKNOX1* over-expression in DS, and ii) the specific binding of PKNOX1 to the *FABP7* promoter. The instability of *PKNOX1* mRNA prevented reliable quantification by densitometric analysis of Northern blots. Therefore, *PKNOX1* expression was quantified by real-time PCR and shown to be over-expressed 1.88-fold in DS fetal brain samples with respect to controls (Fig.3).

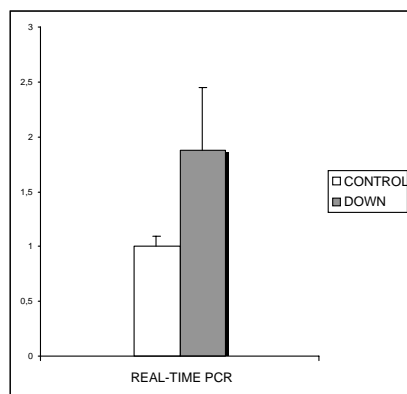


Figure 3. Average *PKNOX1* expression in control and DS fetal brains measured by real-time PCR. All values are given in arbitrary units and normalized using *GAPDH* as an endogenous control. The statistical error is also shown

PKNOX1 binds weakly to the Pbx/POU motif of the FABP7 promoter

PBX and PKNOX1, on their own, bind DNA poorly. In contrast, the stable PBX/PKNOX1 complex, which precedes DNA binding, shows an increased affinity for the target site (31, 32). To test PKNOX1 ability to bind the Pbx/POU site in the human *FABP7* promoter, a 30-bp double-stranded oligonucleotide containing the ATCAATCtg site was used for *in vitro* electrophoretic mobility shift assays (EMSA) with purified recombinant PKNOX1. These assays revealed that, after autoradiographic over-exposure, two faint retarded bands were observed with recombinant PKNOX1 alone (Fig. 4, lane 2). We assumed that one band, the faster, was due to the binding of

PKNOX1 monomer while the slower migrating band could be explained by the formation of PKNOX1 homodimers, favoured under *in vitro* protein excess.

PKNOX1 stably binds to the Pbx/POU motif of the FABP7 promoter in the presence of SH-SY5Y nuclear extracts

In vitro EMSA were performed using nuclear protein extracts from SH-SY5Y human neuroblastoma cells (Fig.4, lane 3). Different DNA-protein complexes were formed, thus indicating the binding of several proteins. Interestingly, a different band migrating pattern was obtained when purified PKNOX1 was added to nuclear SH-SY5Y protein extracts (Fig. 4, lane 4 compared to lane 3): one band clearly disappeared (marked with an asterisk in lane 3), two new ones appeared (arrows in lane 4), and others showed increased signal compared to the nuclear extract alone. All *de novo* bands were specifically competed out by cold Pbx/POU oligonucleotide (5000-fold molar excess) (lane 5), an effect that was not observed when competing with the inespecific GRE oligonucleotide (5000-fold molar excess) (lane 7). Besides, the specificity of the binding was further verified with a Pbx/POU mutated oligonucleotide (lane 6).

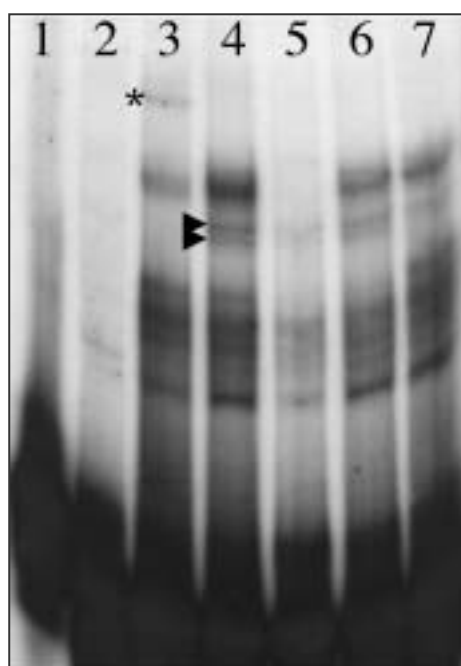


Figure 4. EMSA analyses of SH-SY5Y nuclear extracts supplemented with purified recombinant PKNOX1 protein and a labelled ds oligonucleotide containing the Pbx/POU binding site. Lane 1: probe with no extract; Lane 2: band shift produced when purified recombinant PKNOX1 protein alone was added; Lane 3: band shift produced when the SH-SY5Y nuclear extract was added; Lane 4: band shift produced by the addition of purified PKNOX1 to the SH-SY5Y nuclear extract; Lane 5: binding of SH-SY5Y nuclear extracts supplemented with purified PKNOX1 specifically competed with cold wt-oligonucleotide; Lane 6: specific competition with cold mutated oligonucleotide; Lane 7: inespecific competition with cold GRE1 oligonucleotide. Bands appearing *de novo* after addition of PKNOX1 are indicated by arrows whilst the disappearance of one band is indicated by an asterisk

Taken all together, these results strongly suggested that PKNOX1 showed enhanced binding with the Pbx/POU target in the presence of a partner(s) from the nuclear extracts, needed for the assembling of a functional complex. Whether this partner was already bound to DNA or could only bind DNA after addition of PKNOX1, remains to be established. It has been shown that PKNOX1 could bind to the Pbx/POU target of *FABP7* promoter. Accordingly, it could be assumed that it is involved in the transcriptional regulation of this gene.

PKNOX1 trans-activates FABP7

To analyse the ability of PKNOX1 to regulate *FABP7* transcription, SH-SY5Y cells were transiently co-transfected with a vector constitutively expressing PKNOX1 and a reporter construct bearing the luciferase gene under the *FABP7* promoter. The efficiency of transfection was controlled using a β -galactosidase reporter construct. The ratio of luciferase/ β -gal activities allowed sample comparison and quantification in arbitrary units of transcription transactivation. Our data clearly showed that PKNOX1 did induce luciferase expression (3.7-fold over basal level) and therefore, trans-activated the *FABP7* promoter (Fig. 5). Besides, the induction seemed was not totally dependent on the binding of PKNOX1 to the reported Pbx/POU motif, as deletion of the 9-bp target site caused a clear decrease in the PKNOX1 transactivation effect (2-fold over wild-type basal level) (Fig.5).

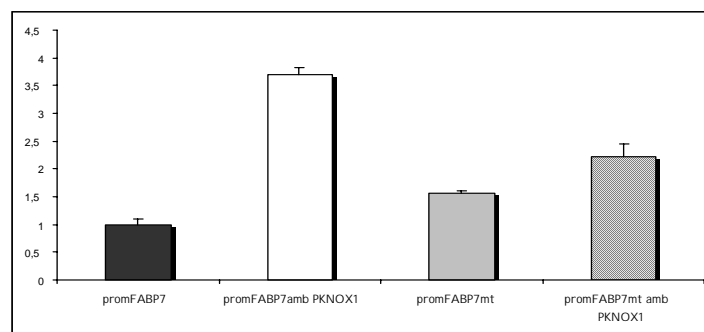


Figure 5. PKNOX1-dependent trans-activation of the *FABP7* promoter on cultured transfected SH-SY5Y cells. Luciferase/ β -gal activity ratios are depicted in arbitrary units with respect to the wild-type promoter without added PKNOX1. The average values and the standard deviation are obtained after 9 replicas for the wild-type promoter with or without co-expression of recombinant PKNOX1 and 4 replicas for the mutant promoter with or without PKNOX1

Discussion

The complexity of DS justifies the very different strategies needed to explore the pathogenesis leading to the reported phenotypic features. In this context, the search for differentially expressed genes could provide essential clues for the understanding the molecular basis of this disease.

Most phenotypic features associated to DS are not present in every patient and the severity of the traits that are present is also very variable. Hence, quantification of differential gene expression on individual patients should be considered cautiously as it may be altered by the genetic background. Moreover, this variability is particularly high in DS patients when compared with disomics (42), so that the number of samples is crucial to validate the data. SSH performed on DS and control brain samples revealed over-expression of *FABP7* (located at 6q22-23), further verified and quantified by densitometric Northern blot analysis and real-time PCR in a total of 22 samples (10 disomic vs 12 DS). Of the two presumptive over-expressed candidates, *FABP7* and ribosomal protein L36, we focussed on the first gene. In fact, variable expression levels of several ribosomal proteins had been also associated to other aneuploidies and several types of cancer (43 and references therein) and thus, could be more related to basal metabolism deviations rather than to specific pathologies.

Several data points to the relevance of *FABP7* over-expression in the most common phenotypic trait, mental retardation, associated to DS. First, *FABP7* has been involved in the development, establishment and maintenance of the nervous system mainly setting the grounds for proper neuronal migration (17, 18). Second, DHA is most probably the ligand of *FABP7* (as deduced from both, its high affinity for DHA and its expression pattern, which correlates with the requirement for exogenous DHA (17, 24)) and deficiencies in DHA cause severe neurological disorders (25, 26). Hence, we aimed at the functional characterization of the *FABP7* promoter to elucidate the molecular basis of the DS-associated over-expression. In particular, among the regulatory elements described on the murine promoter, we considered the Pbx/POU

target site as the best candidate, because PBX factors form heterodimers with PREP1, whose human homologue, PKNOX1, is located on chromosome 21.

EMSA with the recombinant PKNOX1 protein produced a weak band shift after long autoradiographic exposure. This was not unexpected as it had been reported that: i) mouse PREP1 alone showed poor affinity for DNA and ii) high affinity binding could only be with PBX (and possibly other partners) heterodimers. Thus, the most revealing data were obtained when purified PKNOX1 was added to neuroblastoma nuclear protein extracts. Some bands appeared *de novo* while others showed an increased intensity. This new shift pattern could be due to: 1) a super-shift produced by PKNOX1 binding to a former protein-DNA complex; 2) assembly of new protein-DNA complexes by interaction of PKNOX1 with free proteins; 3) dissociation of one of the partners from a bound complex due to interaction with PKNOX1, and 4) formation of a new complex through substitution of a former partner by PKNOX1. Besides, all the new bands were competed specifically by cold ds oligonucleotide but were not affected when using the mutated ds sequence lacking the Pbx/POU binding site. This argues in favor of PKNOX1 specific binding to this site. This interaction has been further confirmed by cell transfection assays, where PKNOX1 over-expression induced transcription activity from the *FABP7* promoter by a 3.7-fold. Moreover, deletion of the 9 bp-Pbx/POU defined target caused an effect on the basal transcription and a clear decrease of the PKNOX1-dependent transactivation (only 2-fold over basal level). This result indicates that although this site is important for PKNOX1 binding and transactivation, there is (are) additional target(s) in this promoter. All our data point to PKNOX1 being a limiting factor in the nuclear extract.

Evidence is being gathered on genes not located on chromosome 21 that show altered expression associated to DS, although their relationship to trisomy 21 remains unknown. Our results from the *in vitro* EMSAs as well as the *in vivo* luciferase assays suggest a direct relationship between PKNOX1, at 21q22.3, and the expression of *FABP7*, at 6q22-23. PKNOX1 has been shown to interact with PBX factors, forming a complex that regulates the expression of different genes. We here show the ability of PKNOX1

to bind to the Pbx/POU binding site present on the *FABP7* promoter and thus, regulate *FABP7* transcription. If PKNOX1 is usually present in limited quantities, three allelic doses may cause a significant effect on the transcriptional levels of target genes. To our knowledge, this is the first report relating chromosome 21 gene-dosage imbalance to altered expression of downstream genes. Although it is known that FABP7 participates in the formation of the central nervous system and it is tempting to postulate that over-expression could lead to neurological disorders, its molecular contribution to the DS pathogenesis remains to be elucidated.

Acknowledgements

We thank the Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona for the use of the 377 ABI PRISM, the ABI PRISM 6700 Automated Nucleic Acid Workstation and the ABI PRISM 7700 sequence detection system. We also thank Olga González-Angulo for technical assistance, N.Garcia-Giralt for helpful comments on EMSA assays, N. Torán, M.D. (Hospital de la Vall de Hebrón) for providing the fetal brain samples and Robin Rycroft for revising the English. M^a F. Sánchez-Font was in receipt of a FPI fellowship from the MEC (Ministerio de Educación y Ciencia). This study was funded by PB96-0220 and PM99-0168 (Ministerio de Ciencia y Tecnología) to R.G.-D.

References

1. Hassold, T. and Jacobs, P. (1984) Trisomy in man. *Annu. Rev. Genet.*, **18**, 69-97.
2. Epstein, C.J. (1995) Epilogue: toward twenty-first century with Down Syndrome -a personal view of how far we have come and how far we can reasonably expect to go. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **393**, 241-246.
3. Epstein, C.J. (1986) The consequences of chromosome imbalance: principles, mechanisms and models. *Cambridge University Press, New York*.
4. Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T.D., Watanabe, H., Yada, T., Parks, H.S., Toyoda, A. and Ishii, K.e.a. (2000) The DNA sequence of Human Chromosome 21. *Nature*, **405**, 311-319.
5. Lisitsyn, N., Lisitsyn, N. and Wigler, M. (1993) Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, **259**, 946-951.
6. Lisitsyn, N.A. (1995) Representational difference analysis: finding the differences between genomes. *TIG*, **11**, 303-307.
7. Hedrick, S.M., Cohen, D.I., Nielsen, E.A. and Davis, M.M. (1984) Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature*, **308**, 149-153.
8. Gurskaya, N.G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P.D., Khaspekov, G.L., Lukyanov, K.A., Vagner, L.L., Ermolaeva, O.D., Lukyanov, S.A. and Sverdlov, E.D. (1996) Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal. Biochem.*, **240**, 90-97.

9. Diatchenko, L., Lau, Y.-F.C., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S.A., Lukyanov, K.A., Gurskaya, N.G., Sverdlov, E.D. and Siebert, P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6025-6030.
10. Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1995) Serial Analysis of Gene Expression. *Science*, **270**, 484-487.
11. McClelland, M., Mathieu-Daude, F. and Welsh, J. (1995) RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends in Genet.* **11**, 242-246.
12. Liversey, F.J. and Hunt, S.P. (1996) Identifying changes in gene expression in the nervous system: mRNA differential-display. *Trends in Neuroscience* **19**, 84-88.
13. de Haan, J., Cristiano, F., Iannello, R.C. and Kola, I. (1995) Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **35**, 1281-1297.
14. de Haan, J., Wolvetang, E.J., Cristiano, F., Iannello, R., Bladier, C., Kelner, M.J. and Kola, I. (1997) Reactive oxygen species and their contribution to pathology in Down syndrome. *Adv Pharmacol.* **38**, 379-402.
15. Oyama, F., Cairns, N.J., Shimada, H., Oyama, R., Titani, K. and Ihara, Y. (1994) Down's Syndrome: up-regulation of beta-amyloid protein precursor and tau mRNAs and their defective coordination. *J. Neurochem.*, **62**, 1062-1066.
16. Kitzmueller, E., Labudova, O., Rink, H., Cairns, N. and Lubec, G. (1999) Altered gene expression in fetal Down Syndrome brain as revealed by the gene hunting technique of subtractive hybridization. *J. Neural Trans. Supp.* **1999**, 99-124.
17. Feng, L., Hatén, M.E. and Heintz, N. (1994) Brain Lipid-Binding Protein (BLBP): A novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* **12**, 895-908.
18. Kurtz, A., Zimmer, A., Schnütgen, F., Brüning, G., Spener, F. and Müller, T. (1994) The expression of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development* **120**, 2637-2649.
19. Shimizu, F., Watanabe, T.K., Shinomiya, H., Nakamura, Y. and Fujiwara, T. (1997) Isolation and expression of a cDNA for human brain fatty acid-binding protein (B-FABP). *Biochim. Biophys. Acta* **1354**, 24-28.
20. Godbout, R., Bisgrove, D.A., Shkolny, D. and Day, R.S. (1998) Correlation of B-FABP and GFAP expression in malignant glioma. *Oncogene* **16**, 1955-1962.
21. Bass, N.M. (1993) Cellular binding proteins for fatty acids and retinoids -similar or specialized functions. *Mol. Cell. Biochem.* **123**, 191-202.
22. Veerkamp, J.H. and Maatman, R.G. (1995) Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: Their structure and genes. *Prog. Lipid Res.* **34**, 17-52.
23. Schnütgen, F., Borchers, T., Müller, T. and Spener, F. (1996) Heterologous expression and characterisation of mouse brain fatty acid binding protein. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **377**, 211-215.
24. Xu, L.X., Sánchez, R., Sali, A. and Heintz, N. (1996) Ligand specificity of Brain Lipid-Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 24711-24719.
25. Innis, S.M. (1991) Essential fatty acids in growth and development. *Prog. Lipid Res.* **30**, 39-103.
26. Martínez, M. (1996) Docosahexaenoic acid therapy in docosahexaenoic acid-deficient patients with disorders of peroxisomal biogenesis. *Lipids* **31**, 145-152.
27. Feng, L. and Heintz, N. (1995) Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. *Development* **121**, 1719-30.
28. Josephson, R., Müller, T., Pickel, J., Okabe, S., Reynolds, K., Turner, P.A., Zimmer, A. and McKay, R.D.G. (1998) POU transcription factors control expression of CNS stem cell-specific genes. *Development* **125**, 3087-3100.
29. Knoepfler, P.S., Calvo, K.R., Chen, H. and Antonarakis, S.E. (1997) Meis1 and Pknox1 bind DNA cooperatively with Pbx1 utilizing an interaction surface disrupted in oncoprotein E2a-Pbx1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14553-14558.
30. Berthelsen, J., Viggiano, L., Schulz, H., Ferretti, E., Consalez, G.G., Rocchi, M. and Blasi, F. (1998a) PKNOX1, a gene encoding PREP1, a new regulator of PBX activity,

- maps on human chromosome 21q22.3 and murine chromosome 17B/C. *Genomics* **47**, 323-324.
31. Berthelsen, J., Zappavigna, V., Mavilio, F. and Blasi, F. (1998b) Prep1, a novel functional partner of Pbx proteins. *EMBO J.* **17**, 1423-1433.
 32. Berthelsen, J., Zappavigna, V., Ferretti, E., Mavilio, F. and Blasi, F. (1998c) The novel homeoprotein Prep1 modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *EMBO J.* **17**, 1434-1445.
 33. Chen, H., Rossier, C., Nakamura, Y., Lynn, A., Chakravarti, A. and Antonarakis, S.E. (1997) Cloning of a novel homeobox-containing gene, PKNOX1, and mapping to human chromosome 21q22.3. *Genomics* **41**, 193-200.
 34. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-169.
 35. Averof, M. (1997) Arthropod evolution: same Hox genes, different body plans. *Current Biol.* **7**, 634-636.
 36. Schreiber, E., Mathias, P., Muller, M.M. and Schaffner, W. (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nuc. Acid Res.* **17**, 6419.
 37. Goudet, G., Delhalle, S., Biemar, F., Martial, J.A. and Peers, B. (1999) Functional and cooperative interactions between the homeodomain PDX1, Pbx, and Prep1 factors on the somatostatin promoter. *J. Biol. Chem.* **274**, 4067-4073.
 38. Ferretti, E., Schulz, H., Talarico, D., Blasi, F. and Berthelsen, J. (1999) The PBX-Regulating Protein PREP1 is present in different PBX-complexed forms in mouse. *Mech. Development* **83**, 53-64.
 39. Ferretti, E., Marshall, H., Popperl, H., Maconochie, M., Krumlauf, R. and Blasi, F. (2000) Segmental expression of Hoxb2 in r4 requires two separate sites that integrate cooperative interactions between Prep1, Pbx and Hox proteins. *Development* **127**, 155-166.
 40. Herzig, S., Füzesi, L. and Knepel, W. (2000) Heterodimeric Pbx-Prep1 homeodomain protein binding to the glucagon gene restricting transcription in a cell type-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **275**, 27989-27999.
 41. Penkov, D., Tanaka, S., Di, R.G., Berthelsen, J., Blasi, F. and Ramirez, F. (2000) Cooperative interactions between PBX, PREP, and HOX proteins modulate the activity of the alpha 2(V) collagen (COL5A2) promoter. *J. Biol. Chem.* **275**, 16681-16689.
 42. Reeves, R.H., Baxter, L.L. and Richtsmeier, J.T. (2001) Too much of a good thing mechanisms of gene action in Down Syndrome. *Trends in Genet.* **17**, 83-87.
 43. Vaarala, M.H., Porvari, K.S., Kyllönen, A.P., Mustone, M.V.J., Lukarinen, O. and Viho, P.T. (1998) Several genes encoding ribosomal proteins are over-expressed in prostate-cancer cell lines: confirmation of L7a and L37 over-expression in prostate-cancer tissue samples. *Int. J. Cancer*, **78**, 27-32.

Footnote

The nucleotide sequence for the human *FABP7* promoter has been deposited in the GenBank database under GenBank Accession Number AY070217.

Abbreviations

DHA: docosahexanoic acid; DS: Down syndrome; EMSA: electrophoretic mobility shift assay; FABP: fatty acid binding protein; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PBX: Pre-B-cell leukemia transcription factor; PKNOX1: Pbx/knotted homeobox 1; PREP1: Pbx regulating protein 1; SSH: suppression subtractive hybridization; SAGE: serial analysis of gene expression

Capítol 4. Efectes genètics derivats de la sobreexpressió de *FABP7* (*BFABP*) en cèl.lules en cultiu

Després de detectar la sobreexpressió del gen *FABP7* en cervells fetals d'individus Down, i demostrar la seva relació amb l'efecte de dosi de *PKNOX1* o *PREP1* situat en el cromosoma 21, ens varem proposar identificar els possibles efectes fenotípics derivats d'aquesta sobreexpressió. Donat que s'ha proposat que *FABP7* reconeix i s'uneix al seu lligand (l'àcid docosahexanoic, DHA) de forma similar a com *CRABP* uneix l'àcid retinoic i que, aquests dos últims tenen un paper important en la transducció i regulació d'altres gens, ens va semblar adient explorar aquesta possibilitat. A més, *FABP7* és una proteïna que intervé en el desenvolupament del SNC i, donada la seva doble localització citoplasma/nucli, podria modular l'expressió de gens implicats en el metabolisme lipídic, i en el creixement i diferenciació cel.lular. Així doncs, ens vam proposar identificar els gens diana regulats per *FABP7*.

En primer lloc, i mitjançant experiments de transfecció cel.lular transitòria, es va confirmar la localització subcel.lular de *FABP7*, tant a nucli com a citoplasma. Posteriorment, es van transfectar cèl.lules en cultiu de neuroblastoma (SH-SY5Y) per aconseguir una sobreexpressió del gen *FABP7*, i emular la situació observada als Down. Aquesta sobreexpressió es va confirmar mitjançant RT-PCR quantitativa a temps real. Les metodologies emprades en l'anàlisi de l'expressió diferencial: *Differential Display PCR* i electroforesi bidimensional de proteïnes (*2-D gel analysis*), així com els resultats obtinguts es detallen a continuació.

MATERIAL I MÈTODES

- Cèl.lules COS-7 (cèl.lules de ronyó de *African green monkey*)
- Cèl.lules de neuroblastoma humanes SH-SY5Y obtingudes de la col·lecció Europea de cèl.lules en cultiu (European Collection of Cell Culture).
- Construccions de DNA:
 - pEGFPC2** (Clontech)
 - pEGFPC2-*FABP7*** on es va clonar el cDNA del gen *FABP7* humà (des de l'ATG fins al STOP) a 3' del gen EGFP i en pauta, per tal de crear una proteïna de fusió
 - pcDNA3** (Invitrogen)
 - pcDNA3-*FABP7*** on es va clonar el cDNA del gen *FABP7* humà des de l'ATG fins al STOP (*EcoRI-XbaI*)

A. TRANSFECCIÓ DE CÈL.LULES

→A.1 LOCALITZACIÓ CEL.LULAR DE FABP7

Les cèl.lules COS-7 van ser cultivades en medi DEMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (GIBCO-BRL), suplementat amb un 10% de serum fetal boví (GIBCO-BRL), 100U/ml penicilina i 1µg/ml d'estreptomicina (GIBCO-BRL), en una estufa a 37°C i 5% de CO₂.

A continuació es van sembrar les cèl.lules en plaques de cultiu de 12 pouets, sobre un vidrets estèrils (un mínim de 3 pouets per construcció) i és va repetir tot el procés (sembrar, transfecció i tinció) al menys tres vegades i de manera independent.

La transfecció es va realitzar fent servir liposomes (Fugene™, Roche) i seguint el següent protocol (volums adaptats pels 3 replicats de cada construcció):

1. S'agafen 100 µl de medi DEMEM sense serum, i es posen en un tub eppendorf.
2. S'afegeixen 7.5 µl de Fugene™ directament sobre el medi i es deixa incubar 5 min a temperatura ambient.
3. Durant aquesta incubació es posa el volum corresponent a 1µg de DNA plasmídic en un tub eppendorf.
4. Després de la incubació es posa el medi amb el Fugene en contacte amb el DNA, gota a gota i sense tocar les parets, es barreja i es deixa incubar 15 min a temperatura ambient.
5. Deprés de la incubació, s'afegeixen 1.5 ml de medi (DEMEM, 10% serum fetal boví, 100U/ml penicilina i 1µg/ml d'estreptomicina).
6. Posteriorment s'afegeix el medi amb el Fugene i el DNA gota a gota (aproximadament 0.5 ml per pouet) sobre els vidrets on estan adherides les cèl.lules.
7. Es barreja suaument movent la placa amb petits moviments circulars i es posa a incubar a 37°C.

Passades 24 h es va procedir al protocol de fixació i tinció següent:

1. Rentat de les cèl.lules amb PBSx1(1 ml/pouet) durant 5 min (2 vegades).
2. Fixació de les cèl.lules amb paraformaldehid al 4% (en PBSx1), 5 min a temperatura ambient
3. Rentat de les cèl.lules amb PBSx1(1 ml/pouet), 5 min (2 vegades).
4. Permeabilització de les cèl.lules amb una solució de tritó X-100 al 0.2% en PBSx1, 5 min a temperatura ambient.
5. Rentat de les cèl.lules amb PBSx1(1 ml/pouet), 5 min (2 vegades).
6. Per a tenyir els filaments d'actina cel.lulars afegir faloidina-TRICT (Sigma) (0.77 µM en PBSx1) a cada pouet (aproximadament 0.5 ml/pouet) i incubar a temperatura ambient durant 15 min.
7. Rentat de les cèl.lules amb PBSx1 (1 ml/pouet), 5 min (2 vegades).
8. Es retiren cuidadosament els vidrets dels pouets i es posen sobre un portaobjectes per tal de procedir a la seva observació al microscopi fluorescent (Leitz Laborlux D).

→A.2 SOBREEXPRESSIÓ DE FABP7

Les cèl.lules SH-SY5Y van ser cultivades en medi DEMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (GIBCO-BRL), suplementat amb un 10% de serum fetal boví (GIBCO-BRL), 100U/ml penicilina i 1µg/ml d'estreptomicina (GIBCO-BRL), a 37°C i 5% de CO₂.

A continuació, es van sembrar 5 plaques de 90 mm de diàmetre (5 x10⁶ cèls/placa).

PLACA 1: Cèl.lules no transfectades, serveixen com a control de la selecció amb neomicina

PLAQUES 2 i 3: Cèl.lules transfectades amb el vector pcDNA3

PLAQUES 4 i 5: Cèl.lules transfectades amb el vector pcDNA3-*FABP7*

La transfecció es va realitzar fent servir liposomes (Fugene™, Roche) i seguint el següent protocol, per cadascuna de les transfeccions:

1. Es posen 200µl de medi DEMEM sense serum en un tub eppendorf.
2. S'afegeixen 6µl de Fugene™ directament sobre el medi i s'incuba 5 min a temperatura ambient.
3. Durant aquesta incubació es posa el volum corresponent a 2µg de DNA plasmídic en un tub eppendorf.
4. Després de la incubació s'afegeix el medi més el Fugene en el tub on està el DNA, gota a gota i sense tocar les parets, es barreja i es deixa incubar 15 min a temperatura ambient.
5. Durant aquesta incubació, pocediu a canviar el medi de les cèl.lules (DEMEM, 10% serum fetal boví, 100U/ml penicilina i 1µg/ml d'estreptomicina).
6. Deprés de la incubació, s'afegeix el medi amb el Fugene i el DNA, gota a gota, sobre la placa on estan adherides les cèl.lules.
7. Es barreja suaument movent la placa amb petits moviments circulars i es posa a incubar a 37°C.

Tres dies després de la transfecció, les cèl.lules van ser tractades amb 100 µg/ml de neomicina (G418) per tal de seleccionar aquelles cèl.lules que han incorporat el vector, que conté el gen de resistència a neomicina. Es van cultivar en medi selectiu fins aconseguir el nombre adient de cèl.lules. Finalment es van recollir les cèl.lules (en PBSx1) i es van mantenir els pellets a –80°C.

B. QUANTIFICACIÓ DE LA SOBREEXPRESSIÓ DE *FABP7* MITJANÇANT PCR QUANTITATIVA A TEMPS REAL

La sobreexpressió de *FABP7* en les cèl.lules de neuroblastoma va ésser confirmada per PCR quantitativa a temps real (veure explicació de la tècnica en el capítol 1 subapartat B.9).

A partir de les cèl.lules recollides (5×10^5) es va extreure el RNA total. A continuació, es va sintetitzar el cDNA mitjançant el robot *ABI PRISM 6700 Automated Nucleic Acid Workstation* (Applied Biosystems). La quantificació de l'amplificació a temps real es va mesurar amb l'*ABI PRISM 7700 sequence detection system* (Applied Biosystems).

Es van utilitzar una parella d'encebadors i una sonda específica pel gen *FABP7* dissenyats amb el programa *PrimerExpress 1.0* (Applied Biosystems), (*FABP7f*: 5'-TGGGCTTTGCCACTAGGC-3'; *FABP7r*: 5'-CCACTTTGTCTCCTTCTTGACTGA-3'; sonda *FABP7*: 5'-TTACCGTTGGTTTGGTCACATTTCCCA -3') i els resultats van ser normalitzats amb *GAPDH* (ref: 4310858 PE Applied Biosystems), com a control endogen.

C. DIFFERENTIAL DISPLAY PCR

Es van fer servir cèl.lules SH-SY5Y transfectades amb pcDNA3-*FABP7*, cèl.lules transfectades amb el vector pcDNA3 (dues rèpliques de cada construcció), i cèl.lules SH-SY5Y sense transfectar (veure descripció de la tècnica al capítol 1 subapartat A). Donat que el vector pcDNA3 s'integra en el genoma i no es manté episomal en aquesta línia cel.lular, s'analitzaren dos replicats de cadascuna de les transfeccions i es van considerar només aquelles bandes que presentessin expressió diferencial en les dues mostres transfectades amb pcDNA3-*FABP7*

respecte a les transfectades amb el vector pcDNA3 i les cèl.lules no transfectades. D'aquesta manera es pretenia eliminar les diferències entre clons degudes al lloc d'integració.

En un intent d'identificar algun gen amb expressió diferencial com a conseqüència de la sobreexpressió de *FABP7* es van analitzar, en total, 10 parelles diferents d'encebadors (P i T) (taula 1).

Taula 1. Encebadors utilitzats en realitzar la tècnica del *DD-PCR* sobre les cèl.lules sobreexpressant *FABP7* (seqüències descrites al capítol 1 a l'apartat A)

Encebador Pi	Encebador Tj
P10	T1
P10	T2
P10	T4
P10	T5
P10	T6
P10	T7
P10	T8
P2	T2
P3	T2
P6	T2

D. ELECTROFORESI BIDIMENSIONAL (2-D) DE PROTEÏNES

L'electroforesi bidimensional de proteïnes es basa en una primera separació de les proteïnes segons el seu punt isoelèctric (IEF), i una segona separació d'acord amb el seu pes molecular. Amb aquesta tècnica es poden identificar proteïnes d'expressió diferencial en les poblacions analitzades.

Les cèl.lules corresponents a les diferents transfeccions i el control sense transfectar van ser recollides i solubilitzades en una solució 7M de Urea, 2M de tiourea, 4% de CHAPS, 1% de DTT en Tris-Cl 20mM pH 8.8, per tal d'obtenir les proteïnes totals. En aquesta solució es va afegir 1µl de Benzonase[®] (Merck) per cada 10 ml de solució de lisis, per tal d'eliminar els àcids nucleics que podrien interferir en la separació de les proteïnes en l'electroforesi 2-D. Es van incubar 10 minuts a temperatura ambient i es van centrifugar a 13000 rpms durant 15 minuts per separar les proteïnes del DNA, lípids i altres restes cel.lulars.

A continuació es van quantificar les proteïnes per el mètode Bradford. Les mostres van ser aliquotades i guardades a -80 °C fins el moment de la seva anàlisi, per evitar la seva degradació. Per a la primera dimensió (isoelectroenfoc: IEF) es van carregar 100 µg de cadascuna de les mostres i es va afegir oli mineral per evitar que les mostres s'assequessin durant l'electroforesi. La rehidratació i càrrega de les mostres es va fer alhora. El gel d'isoelectroenfoc utilitzat va ser *ImmobilineTM Dry strip* pH= 4-7, en tires de 13 cm (Amersham Pharmacia Biotech).

L'aparell emprat per l'IEF va ser *IPGphor* (Amersham Pharmacia Biotech) seguint el programa següent:

4 hores de rehidratació de les tires a 20 °C	}	Rehidratació
5 hores a 20 volts		
7 hores a 70 volts		
1 hora per arribar de 0 a 500 volts, en gradient	}	IEF
1 hora per arribar de 500 a 1000 volts, en gradient		
1 hora per arribar de 1000 a 3500 volts, en gradient		
2 hora per arribar de 3500 a 8000 volts, en gradient		
4 hores a 8000 volts		

Es va limitar l'amperatge a 50 µA per tira.

Abans de córrer la segona dimensió es van equilibrar les tires de IEF, ja corregudes. La solució base d'equilibri conté: 50 mM Tris-Cl pH 8.8, 6M de Urea, 30% de glicerol, 2% SDS i blau de bromofenol. Per equilibrar les tires es va seguir el següent protocol:

1. S'afegeixen 100 mg de DTT per 10 ml de solució d'equilibri.
2. S'introdueix la tira en aquesta solució i s'incuba 10 min a temperatura ambient en agitació.
3. S'afegeixen 450 mg de iodacetamina per 10 ml de solució d'equilibri.
4. S'introdueix la tira en aquesta solució i s'incuba 10 min a temperatura ambient en agitació.

A continuació es va carregar la tira en el gel de poliacrilamida per realitzar la segona dimensió. La segona dimensió es va realitzar en un gel de poliacrilamida (30:0.8) al 12.5%:

Per 100ml :	Acrilamida (30:0.8)	41.6 ml
	Tris 1.5M pH 8.8	25 ml
	SDS 10%	1 ml
	H ₂ O bidestil.lada	31.85 ml
	TEMED	50 µl
	APS 10%	500 µl

Una vegada col·locada la tira entre els dos vidres i en contacte amb el gel de poliacrilamida es va segellar el sistema amb una solució d'agarosa al 0.5% en el tampó d'electroforesi (25 mM Tris base, 192mM de glicina i 0.1% de SDS).

La segona dimensió de proteïnes es va realitzar en un aparell *Hoeffer SE600* (BioRad). Els gels es van córrer, inicialment a 15 mA per gel, fins que la mostra entra correctament en el gel de poliacrilamida, i després a 30 mA durant aproximadament 4 h. Aquestes condicions estan posades a punt d'acord amb les característiques, tant de pes molecular (15 kd) com de punt isoelèctric (5.41), de la proteïna FABP7.

Per a la tinció dels gels es va realitzar el següent protocol:

1. Fixació, 2x 30 min amb una solució 20% de EtOH 99% i 10% d'àcid acètic.
2. Sensibilització, 1x 60 min amb una solució 0.13% Na₂S₂O₃, 4.25% CH₃COONa anhidre, 30% EtOH 99%, 0.125% Gluteraldehid (GDA) 25%.
3. Rentats, 5x 10 min amb H₂O.
4. Tinció amb plata, 1x 30 min amb una solució 0.155% de AgNO₃.
5. Revelador, amb una solució 1.56% de Na₂CO₃anhidre, 0.05% Formaldehid al 37%. Primer s'afegeix una petita quantitat de la solució i es deixa actuar 1-2 min fins que s'enfosqueix, després es decanta i s'afegeix solució nova fins que es detecten les taques a la intensitat desitjada (5-10 min).
6. Aturada de la reacció, 1x 10 min amb una solució 0.9% de EDTA₂Na.
7. Rentats, 3x 10 min amb H₂O per tal d'evitar la formació de precipitats de plata.

L'anàlisi dels resultats es va realitzar amb el programa *PDQuest 2-D Gel Analysis Software 6.1* (BioRad).

RESULTATS

- Els experiments de localització cel.lular van confirmar la localització nuclear i citoplasmàtica de *FABP7* com s'observa a la figura 1.

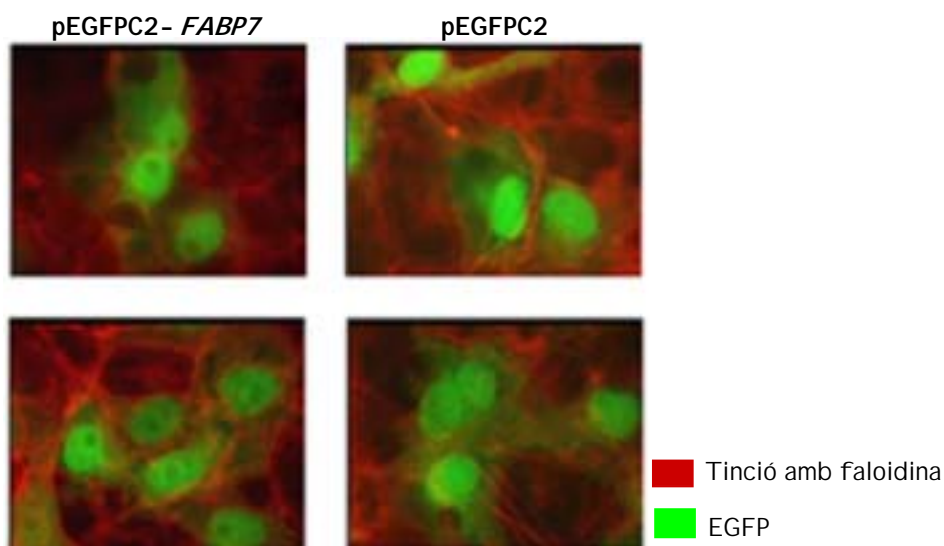


Figura 1. Transfecció transitòria de cèl.lules COS-7 amb pEGFPC2-*FABP7*

- Els resultats de la PCR quantitativa a temps real van confirmar un increment en els nivells d'expressió de *FABP7* de 900 a 1000 vegades en cèl.lules transfectades amb pcDNA3-*FABP7* respecte cèl.lules que només contenen el vector pcDNA3 o cèl.lules sense transfectar (figura 2). La placa de SH-SY5Y es va fer servir com a valor de referència 1. Els valors d'expressió de *FABP7* corresponents a una placa de SH-SY5Y sense transfectar, dues rèpliques transfectades amb el vector pcDNA3 i dues transfectades amb el vector pcDNA3-*FABP7* es varen normalitzar emprant l'amplificació de *GAPDH* com a control intern.

- Mitjançant *Differential Display PCR* es van identificar dues bandes que corresponien a cDNAs sobreexpressats en les cèl.lules transfectades amb *FABP7*. A continuació es varen purificar i reamplificar amb la mateixa parella d'encebadors (T8/P10). Durant el procés de clonació i seqüenciació, es va posar de manifest que es tractava de la mateixa seqüència, probablement conseqüència de dues conformacions diferents en el gel de poliacrilamida degut a una desnaturalització parcial de la mostra. La seqüència obtinguda va confirmar que es tractava d'una proteïna similar a FLJ12838, proteïna aïllada de cèl.lules neuronals en cultiu sotmeses a un tractament amb àcid retinoic durant dues setmanes.

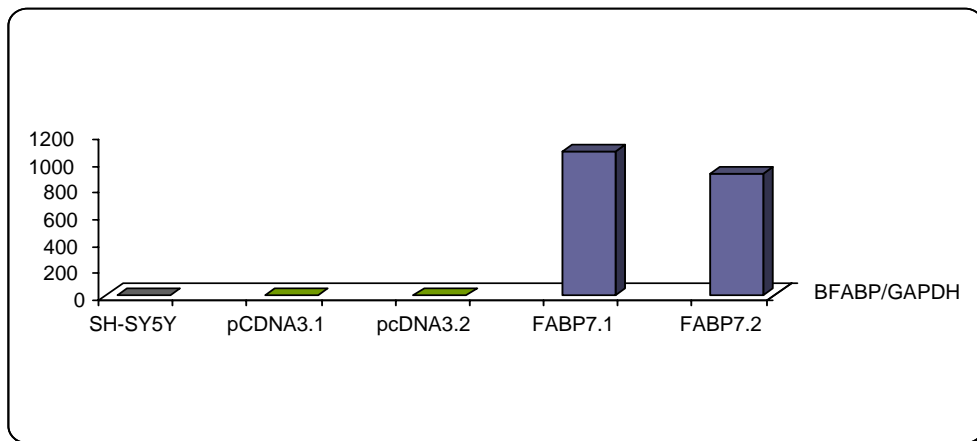


Figura 2. Quantificació de l'expressió de *FABP7* mitjançant la RT-PCR quantitativa a temps real sobre cèl.lules de neuroblastoma transfectades amb pcDNA3 i pcDNA3-*FABP7*

Per confirmar la sobreexpressió de la proteïna similar a FLJ12838 en cèl.lules transfectades amb pcDNA3-*FABP7*, s'ha intentat analitzar la seva expressió mitjançant hibridació *Northern*, on els RNA fixats procedien de cèl.lules transfectades amb pcDNA3-*FABP7* i cèl.lules control. Els primers resultats indiquen que es tracta d'un gen de molt baixa expressió donat que no hem estat capaços de detectar-lo mitjançant aquest tipus d'anàlisi.

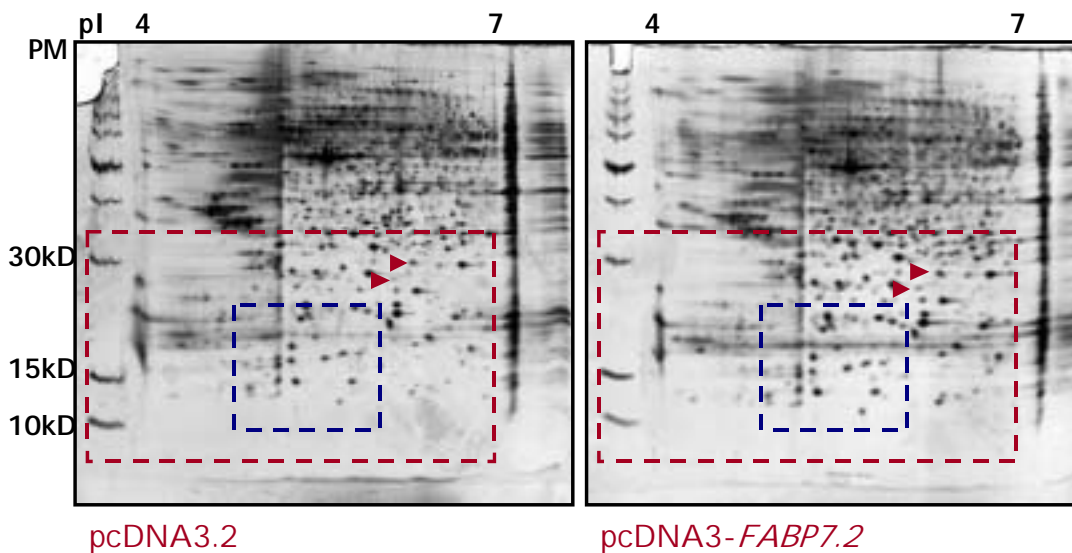


Figura 3. Imatge de gels de proteïnes 2-D representatius dels resultats obtinguts

- L'electroforesi bidimensional de proteïnes va permetre comprovar que, tot i haver demostrat una sobreexpressió de *FABP7* a nivell de mRNA, aquesta sobreexpressió no reflectia un increment proteic. Per detectar possibles diferències d'expressió es va utilitzar el programa *PDQuest 2-D Gel Analysis Software 6.1* (BioRad). En línia

discontinua blava s'indica la zona en què, pel pes molecular (15 kD) i punt isoelèctric (5.4), hauria de migrar la proteïna FABP7 (figura 3).

Tot i que no es va demostrar la sobreexpressió de *FABP7* a nivell de proteïna, i considerant que el problema podria ser una manca de capacitat per detectar la proteïna FABP7, es va analitzar una zona més ampla del gel (indicada en línia discontinua vermella) per tal d'identificar d'altres possibles proteïnes que presentessin una expressió diferencial en cèl.lules transfectades amb pcDNA3-*FABP7* (figures 3 i 4).

L'anàlisi dels gels 2-D amb el programa *PDQuest 2-D Gel Analysis Software 6.1* (BioRad) van detectar dues proteïnes amb diferències d'expressió significatives segons el Test de Mann-Whitney (taula 2, figura 4).

Aquests resultats són preliminars ja que no hem estat capaços de demostrar, a nivell proteic, la sobreexpressió de FABP7. Per tal de verificar la validesa d'aquestes dades es podria incloure un epítoc comercial en la construcció pcDNA3-*FABP7*, per detectar la fusió epítoc-FABP7. Si es poguessin confirmar els resultats anteriors es procediria a seqüenciar parcialment aquestes dues proteïnes expressades diferencialment mitjançant.

Taula 2. Resultats de l'anàlisi d'electroforesi bidimensional. A la taula s'indica en primer lloc, el nombre assignat a cada una de les dues taques diferencials pel programa *PDQuest 2-D Gel Analysis Software 6.1* (BioRad), així com el seu pes molecular i punt isoelèctric

Taca n°	Pes molecular aproximat	Punt isoelèctric aproximat	Diferències d'expressió
1= 6202	23 kd	5.8	x1.5 (sobreexpressió)
2= 7302	25 kd	6.0	x 2 (sobreexpressió)

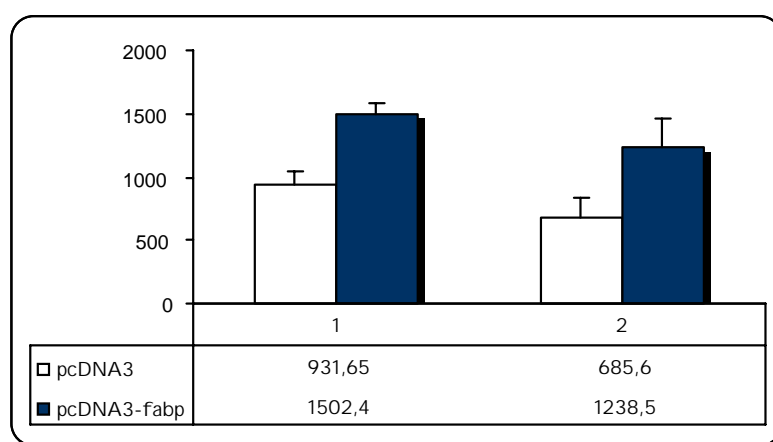


Figura 4. Resultats de l'anàlisi d'electroforesi bidimensional. Es representa el promig dels valors obtinguts per les dues replicues de transfecció realitzades

Discussió

La trisomia del cromosoma 21 humà genera un fenotip molt complex que inclou més de 80 trets fenotípics característics (Epstein, 1991; Revees *et al.* 2001. Els individus amb síndrome de Down (SD) presenten afectacions molt diverses entre les quals, el retard mental i la hipotonia muscular són les més comunes. És, doncs, una malaltia multifactorial molt variable en la seva expressió fenotípica. Per tant, sembla evident que per poder fer front a la complexitat i variabilitat inherents a la SD, és necessària una correcta interacció de moltes disciplines científiques i l'ús d'estratègies metodològiques diferents.

Per aquest motiu, tot i que l'associació entre la trisomia del cromosoma 21 i la síndrome de Down fou establerta fa més de quaranta anys (Lejeune *et al.* 1959; Jacobs *et al.* 1959), encara es coneix molt poc sobre el mecanisme pel qual el desequilibri de dosi de gens del cromosoma 21, conseqüència directa de la trisomia, és capaç d'alterar el desenvolupament i produir els trets fenotípics característics de la SD. En aquest sentit, la informació sobre l'aportació fenotípica de gens concrets del cromosoma 21 al fenotip Down és molt escassa, encara que s'han relacionat diferents gens del cromosoma 21 amb diverses malalties monogèniques (sordeses, FALS, leucèmia mieloproliferativa aguda, etc...).

Recentment, la finalització de la seqüenciació del cromosoma 21 (Hattori *et al.* 2000), ha permès afegir 98 gens predits *in silico* als 127 anteriorment descrits i, per tant, ha proporcionat una primera visió dels 225 possibles gens candidats que contribueixen al fenotip Down. Encara que, en relació a aquest, no s'ha de minimitzar la implicació d'altres gens situats en d'altres cromosomes. Així doncs, els trets fenotípics de la SD poden ser conseqüència directa de la sobreexpressió dels gens del cromosoma 21 o bé, fruit de la interacció d'alguns d'aquests gens amb el conjunt del genoma, transcriptoma o proteoma. Per tant, des d'una perspectiva general, podem considerar que la caracterització i l'estudi funcional dels 225 gens del cromosoma 21 és una aproximació correcta per entendre els mecanismes genètic-moleulars que governen el fenotip SD. Endemés, l'estudi de l'expressió diferencial als individus Down és una aproximació complementària a l'anterior i, ambdues comparteixen un objectiu final comú: entendre la patofisiologia de la SD. De fet, els estudis d'expressió també s'utilitzen actualment per determinar quins gens del cromosoma 21 podrien contribuir al fenotip SD.

El treball realitzat en aquesta tesi doctoral mitjançant l'estudi de l'expressió diferencial en cervells fetals d'individus Down ha permès posar de manifest l'expressió alterada dels gens *FABP7* i *PRDX2*, cap d'ells situat al cromosoma 21. Els resultats obtinguts, així com la seva relació amb la patologia de la SD, es discuteixen a continuació, fent una primera referència a les limitacions de les tècniques emprades en aquest tipus d'aproximacions, així com a la complexitat i la variabilitat inherent a la SD.

1. Aproximació a l'expressió gènica diferencial mitjançant: *SSH* i *DD-PCR*

L'estudi de l'expressió diferencial és una eina molt útil a l'hora de dilucidar les bases moleculars de malalties multifactorials, com és el cas de la SD. Les tècniques més freqüentment utilitzades a nivell de transcrit són la hibridació substractiva, el *differential display-PCR* i, més recentment, les hibridacions sobre *micro-* o *macroarrays* de cDNAs. Aquestes tècniques són molt potents però tenen limitacions. Una de les principals, degut a l'elevada freqüència de falsos positius, és sens dubte la necessitat de confirmar els resultats mitjançant d'altres tècniques, com ara la hibridació *Northern* o la RT-PCR quantitativa.

La tècnica del *differential display-PCR* es basa en una PCR convencional. L'ús d'encebadors arbitraris genera un nombre elevat de falsos positius degut a anellaments incomplets, que generen amplificacions artefactuals i, per tant, poblacions de cDNAs d'intensitat diferent. Això pot induir a errors quan es comparen mostres diferents. La quantitat de mostra és un altre problema afegit, ja que es poden produir diferents nivells de saturació de la PCR, depenent de la mostra. Finalment, el fons genètic de les mostres és la principal causa de falsos positius. Per aquesta raó, s'ha d'analitzar un nombre mínim de mostres de cada població i considerar vàlides només aquelles diferències que es mantenen en tots els individus d'una població respecte als de l'altra. La tècnica del DD-PCR ha esdevingut molt eficaç quan es tracta d'estudiar l'efecte de compostos químics, com ara, drogues, inhibidors... o de diverses situacions estressants sobre cultius cel·lulars, ja que, en aquests casos s'han minimitzat les diferències de fons genètic.

La hibridació substractiva supressora es basa en dues rondes successives d'hibridació entre cDNAs de dues poblacions amb l'objectiu d'enriquir la mostra en trànscripats expressats diferencialment i, finalment, amplificar-los selectivament. En aquest tipus d'assaig es poden generar falsos positius com a conseqüència de: **1)** una primera ronda d'hibridació incompleta, per la qual, una molècula present en les dues poblacions en quantitat equivalent, no s'hauria hibridat en la primera volta i per tant, podria ésser amplificada al final del procés; **2)** una amplificació exponencial de molècules que tenen el mateix adaptador a ambdós costats degut a que no es formaria l'estructura esperada de "nansa" (figura 3, cap.1); **3)** una amplificació aritmètica de molècules amb un únic adaptador lligat, que en cap cas correspondria a una expressió diferencial (figura 3, cap.1).

L'experiència obtinguda al llarg d'aquest treball ens permet corroborar l'elevada freqüència de falsos positius. Tot i això, els assajos SSH ens han permès caracteritzar dos gens d'expressió diferencial en cervell fetal d'individus Down. Finalment, cal remarcar que una qualitat important de les dues metodologies descrites és que permeten identificar gens "patogènics" sense disposar de cap tipus d'informació prèvia.

2. Complexitat i variabilitat del fenotip Down

El principal problema per a l'anàlisi de l'expressió gènica diferencial és la variabilitat, tant a nivell de penetració, com a nivell d'expressivitat, associada al fenotip Down (revisat a Reeves *et al* 2001). Dels més de 80 trets fenotípics, només el retard mental i la hipotonia muscular es presenten en el 100% dels afectes. Endemés, la severitat d'aquests trets és també molt variable. Actualment es considera la SD més com una condició genètica de predisposició a determinats trets fenotípics, que com a un factor causal. Això complica tant l'anàlisi de l'expressió diferencial com l'establiment de correlacions genotip-fenotip.

La variabilitat associada a la SD pot explicar-se en base a les diferents combinacions al·lèliques dels gens del cromosoma 21, ja que les relacions de dominància i recessivitat dels tres al·lèls presents es modifiquen, incrementant així la variabilitat associada als disòmics. Així mateix, s'ha de resaltar la importància de les diferències de fons genètic entre els individus, on la trisomia dels gens del cromosoma 21 pot

provocar una font de variació fenotípica addicional. D'altra banda, la població Down en la que s'haurien de confirmar els resultats obtinguts és també molt heterogènia, la qual cosa implica que les diferències d'expressió inicials disminueixin o, inclús perdin, la significació estadística.

Finalment, hem de considerar la pròpia naturalesa de la població control que, encara que prové d'avortaments per motius no genètics i els fetus no presenten cap aneuploidia, sovint s'associen a malformacions congènites. Malgrat aquestes poden ésser degudes a mutacions monogèniques, en la major part dels casos es desconeix la causa.

Del conjunt d'observacions anteriors es desprèn que el nombre de mostres necessàries per validar els assajos SSH o DD-PCR és crucial. En aquest sentit, l'obtenció de mostres de cervell fetal humà ha estat un factor limitant. No sempre ha estat possible disposar del nombre i tipus de mostres adequades (estadi del desenvolupament, sexe). En aquest treball, s'ha emprat 3 mostres de pacients SD i 3 controls per realitzar els experiments de SSH. Per confirmar els resultats obtinguts s'ha ampliat el nombre de mostres per tal d'intentar assolir significació estadística, ja que les diferències observades entre disòmic i trisòmic són més aviat petites.

3. *PRDX2*

3.1. Subexpressió de *PRDX2* en cervells fetals SD

La subexpressió de *PRDX2* detectada mitjançant SSH va ésser posteriorment confirmada per anàlisis *Northern* i per RT-PCR quantitativa temps real. Malgrat els nivells d'expressió obtinguts en cervells SD eren clarament inferiors als dels controls (0.7 i 0.73 respectivament) només els resultats de la PCR quantitativa varen donar significació pel *Test de Mann-Whitney*, $P \leq 0.05$. Aquesta diferència podria explicar-se pel nombre de mostres analitzades en cada cas. En el *Northern* es van analitzar 5 mostres d'afectes SD i 5 controls (10 en total), mentre que en la PCR quantitativa a temps real es van analitzar 6 controls i 7 individus SD (13 en total). El test utilitzat per demostrar la significativitat esdevé molt restrictiu quan decreix el nombre de mostres utilitzades.

En analitzar els resultats obtinguts el més destacable és l'elevat grau de variabilitat interindividual, que presenta nivells comparables tant en els afectes Down com en els controls (figura 1).

Com a conclusió, podem parlar dels resultats obtinguts com una tendència a la subexpressió de *PRDX2* més que d'un fet que es presenti en el 100% dels individus Down. Tendències semblants han estat descrites per molts dels trets fenotípics SD per exemple, un 40-50% dels individus SD presenten anomalies cardíques congènites, només en un 4-7% dels casos el fenotip SD s'associa a una estenosi duodenal, etc...(Korenberg *et al.* 1992; Korenberg *et al.* 1994; Korenberg,1995). Aquestes dades semblen indicar que també a nivell molecular, les diferències que es detectin entre SD i controls s'han d'interpretar més en clau de tendència que de factors determinants d'efectes fenotípics singulars.

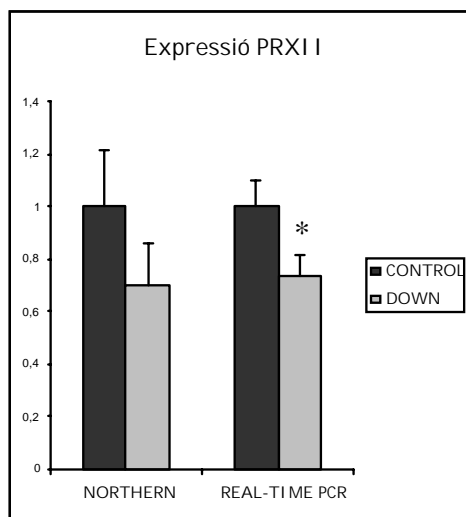


Figura 1. Subexpressió de *PRDX2* en cervells fetals SD expressada en unitats arbitràries segons la *ratio* de l'expressió *PRDX2*/*GAPDH*

3.2. *PRDX2*, un enzim antioxidant amb funció protectora enfront l'estrés oxidatiu

PRDX2 localitzat a 13q12 (Pahl *et al.* 1995) i amb una clara tendència a la subexpressió en els afectes Down, podria tenir un interès fenotípic donada la seva funció com a antioxidant. La presència de més de 100 membres de la família de les peroxiredoxines descrits al llarg del regne animal, des de bacteris a mamífers, reforçaria la seva importància a nivell funcional. Com ja s'ha esmentat, *PRDX2*

catalitza l'eliminació del peròxid d'hidrogen (H_2O_2) produint aigua (H_2O). Aquest enzim transfereix els electrons reductors cedits per la tioredoxina (TRX) i es genera un cicle de formació-disrupció d'un dímer de PRDX2 (Chae *et al.* 1994a; Chae *et al.* 1994c). La forma monomèrica és la que elimina el H_2O_2 i, com a conseqüència de la reacció entre l' H_2O_2 i el grup sulfidril de la cisteïna (Cys_{51} , l'equivalent a la Cys_{47} de llevats) es forma un dímer PRDX2-PRDX2. Aquest dímer es posteriorment reduït per la TRX que regenera la forma monomèrica, finalitzant així el cicle. L'eliminació d' H_2O_2 per part de PRDX2 s'ha associat a la protecció de les macromolècules enfront l'estrés oxidatiu (Lim *et al.* 1994; Netto *et al.* 1996; Kim *et al.* 1997).

Recentment s'ha demostrat que *Tsalp*, un homòleg de PRDX2 a llevats, pot induir, en presència d' H_2O_2 , l'expressió de la tioredoxina (TRX) i de la tioredoxina reductasa (TRR), ambdós elements clau pel correcte funcionament i regulació del sistema de detoxificació de radicals lliures (Ross *et al.* 2001).

L'estrés oxidatiu apareix sovint associat a malalties neurodegeneratives, com ara l'Alzheimer, el Parkinson, l'esclerosi amiotròfica lateral (ALS) i també a la SD (Ianello *et al.* 1999; Neve *et al.* 2000; Smith *et al.* 2000; Matés, 2000; Forsberg *et al.* 2001). La subexpressió de PRDX2 en cervells fetals SD demostrada en aquest treball podria provocar un increment dels nivells intracel.lulars d' H_2O_2 , conseqüència d'un defecte en els processos d'eliminació, causant estrés oxidatiu i mort cel.lular. D'aquesta manera, el fet que els individus Down presentin una subexpressió de PRDX2 podria explicar, al menys parcialment, els fenòmens d'estrés oxidatiu associats a aquesta síndrome i què, fins el moment, han estat principalment atribuïts a l'efecte de dosi del gen superòxid dismutasa (SOD1), localitzat a 21q22.1. De fet, s'ha descrit que els ratolins que sobreexpressen SOD1 desenvolupen una malaltia neuronal motora, similar a l'esclerosi lateral amiotròfica familiar (FALS), quan són exposats a alts nivells de peròxid d'hidrogen (Kola & Hertzog, 1997). Això recolzaria la importància de la subexpressió de PRDX2, com a modulador dels nivells d' H_2O_2 , en el desenvolupament de determinats trets fenotípics SD.

Per tal d'avaluar l'efecte fenotípic de la subexpressió de PRDX2 en pacients SD s'han realitzat assajos de transfecció sobre línies cel.lulars en cultiu, en concret SH-SY5Y, amb un cDNA antisentit de PRDX2. De manera paral.lela i com a control, es va sobreexpressar SOD1 en aquesta mateixa línia cel.lular. Les dades obtingudes en aquests experiments de transfecció demostren, en condicions de cultiu estàndards, un

lleuger descens de la viabilitat cel.lular (quantificació del iodur de propidi i assaig de reducció de MTT). L'efecte sobre la viabilitat cel.lular en els clons que subexpressen *PRDX2* i en els que sobreexpressen *SOD1* és molt similar. Per tant, segons els nostres resultats, hi hauria una contribució equivalent per part dels dos gens al fenotip SD podria explicar l'increment descrit de la mort neuronal per defectes en el mecanisme de detoxificació dels radicals lliures (Busciglio & Yanker, 1995). Així mateix, hem analitzat la vulnerabilitat d'ambdues línies cel.lulars a diferents agents neurotòxics oxidatius (etoposide, timerosal i peròxid d'hidrogen) i hem observat una reducció de la viabilitat cel.lular en els clons que subexpressen *PRDX2* en presència de timerosal i peròxid d'hidrogen, però no d'etoposide. D'altra banda, la sobreexpressió de *SOD1* estaria associada a un descens de la viabilitat en presència de peròxid d'hidrogen, però l'efecte del timerosal no seria tan clar. L'etoposide tampoc produiria cap efecte diferencial.

Les anàlisis d'apoptosi mitjançant assajos tunel, quantificació d'activitat caspasa-3 i immunodetecció d'aquesta proteïna i de la fodrina, un dels primers substrats de la caspasa-3, corroboren les dades anteriors i demostren, en condicions de cultiu estàndards, un lleuger increment d'apoptosi, tant per subexpressió de *PRDX2* com per sobreexpressió de *SOD1*. Aquests fenòmens de menor inducció (o "protecció") d'apoptosi en presència d' H_2O_2 (100 μ M durant 3 hores) observats en els clons de cèl.lules on es subexpressa *PRDX2* o es sobreexpressa *SOD1* indicarien que, la disminució de viabilitat observada mitjançant els experiments d'assaig de reducció de MTT i captació de iodur de propidi, en aquestes mateixes condicions, ha d'ésser deguda a processos de necrosi, o com a mínim, processos alternatius als de mort cel.lular programada o apoptosi via caspasa-3. Aquests resultats de "protecció" d'apoptosi induïda per H_2O_2 en cèl.lules que sobreexpressen *SOD1* coincideixen, i reforcen, dades anteriors (Lee et al. 2001). D'altra banda, la reducció de viabilitat cel.lular produïda pel timerosal en els clons que subexpressen *PRDX2*, d'acord amb els resultats de la immunodetecció directa de caspasa-3, podria ésser, al menys parcialment, conseqüència d'un tipus d'apoptosi mediada via caspasa-3.

Recentment, s'ha descrit que el tractament amb oligonucleòtids antisentit de *PRDX2* incrementa la mort cel.lular en resposta a radiacions (Park et al. 2000). Així mateix, sembla existir una relació entre la sobreexpressió de *PRDX2* i la resistència a la teràpia antitumoral per radiacions. Aquesta major resistència a la mort cel.lular

s'explicaria per inhibició parcial de la citòlisi oxidativa induïda per radiacions. Aquestes dades, concorden totalment amb les nostres en el sentit que reforcen la funció "protectora" de *PRDX2* front l'estrés oxidatiu i permeten establir una relació clara entre la subexpressió de *PRDX2* i l'increment de la vulnerabilitat a aquests agents, d'acord amb la seva implicació en alguns dels trets fenotípics de la síndrome de Down.

En relació a experiments prèviament realitzats en cultius cel·lulars hi ha dues dades interessants: primer, la sobreexpressió de *PRDX2* sembla conferir sistemàticament una protecció a l'apoptosi en presència de diferents estímuls estressants (etoposide, ceramida, H_2O_2 , creixement en absència de serum) (Zhang *et al.* 1997; Kim *et al.* 1997) i segon, *PRDX2* inhibeix l'acumulació d' H_2O_2 i, per tant, inhibeix la cascada apoptòtica en un estadi primerenc (Kim *et al.* 1997). Aquests fets reforçarien la hipòtesi apuntada anteriorment, la subexpressió de *PRDX2* trobada en cervells fetals SD induiria un increment en els fenòmens apoptòtics mitjançant l'increment dels ROS intracel·lulars, fet ja descrit al teixit neuronal dels pacients. En conseqüència, els compostos antioxidants, que s'ha demostrat inhibeixen aquests processos apoptòtics, podrien ésser considerats com a possibles agents terapèutics pel retard mental i l'aparició prematura de la malaltia d'Alzheimer associats a SD (Busciglio & Yankner, 1995).

Finalment, en cervells fetals de pacients Down s'ha descrit la subexpressió de la tioredoxina (*TRX*), per altra part també associada a l'increment dels fenòmens apoptòtics neuronals de la SD (Kitzmueller *et al.* 1999). A més, s'ha observat que, ratolins transgènics que sobreexpressen *TRX1* també sobreexpressen *PRDX1* (Berggren *et al.* 2001). Aquestes dues afirmacions ens permetrien associar el decrement de *TRX* en els cervells fetals SD amb la subexpressió de *PRDX2* demostrada en el nostre treball, produint el conseqüent increment d'apoptosi neuronal.

3.3. Relació trisomia cromosoma 21/sobreexpressió de *SOD1*/ subexpressió de *PRDX2*

Una possible hipòtesi de la subexpressió de *PRDX2* en la SD relacionaria la sobreexpressió de *SOD1*, conseqüència directa de la trisomia del cromosoma 21, amb la subexpressió de *PRDX2*.

Kim i col.laboradors (1989) van demostrar que elevades concentracions d'O₂ eren capaces de induir la síntesi de TSA (*thiol specific antioxidant*), l'homòleg de *PRDX2* a llevats. D'altra banda, la sobreexpressió de *SOD1* detectada a la SD, amb la seva activitat dismutasa actua disminuint la presència d'O₂ i incrementant la d'H₂O₂. Per tant, ens vam plantejar la possibilitat d'una regulació de l'expressió de *PRDX2* per catabolisme i que fos la disminució d'O₂ la responsable de la subexpressió de *PRDX2*.

En aquest sentit, es troben informacions contradictòries. Kim i col.laboradors (1997) descriuen la inducció de *PRDX2* o *NKEFB* en presència d'H₂O₂. D'aquesta manera, l'increment d'H₂O₂ intracel·lular generat per la sobreexpressió de *SOD1* causaria, en tot cas, una inducció de *PRDX2* i no la subexpressió esperada. També Mitsumoto i col.laboradors (2001), mitjançant la tècnica de l'electroforesi bidimensional (*2-D gel analysis*), demostren la inducció de diverses peroxiredoxines en presència d'H₂O₂. En contraposició, Netto i col.laboradors (1996) descriuen la inhibició de TSA a llevats a elevades concentracions d'H₂O₂ (70 µM). Per tant, i com a conclusió, podríem estar considerant una regulació molt fina de *PRDX2* en base als nivells cel·lulars tant d'O₂ com d'H₂O₂, o probablement, de la seva proporció relativa.

En relació a les dades anteriors, els nostres resultats mesurant el nivell de transcrit de *PRDX2* als clons de cèl·lules que sobreexpressen *SOD1* semblarien indicar una relació entre la sobreexpressió de *SOD1* i la subexpressió de *PRDX2*. Cal remarcar que per consolidar aquesta hipòtesi caldria realitzar experiments confirmatius.

3.4. L'expressió d'altres *PRDXs* associada a processos patològics

Altres processos degeneratius en humans han estat relacionats amb canvis en l'expressió de les *PRDXs*: la sobreexpressió de *PRDX5* (x 3) en tendó degeneratiu humà s'ha associat a l'increment de ROS que té lloc en aquests processos (Wang *et al.* 2001) i la sobreexpressió de *PRDX1*, *PRDX2* i *PRDX3* en alguns tipus de càncer de mama humà, sobre les que s'hipotetitza una contribució important en el desenvolupament i creixement del tumor (Noh *et al.* 2001). En conjunt, aquests resultats permeten postular la importància de la família *PRDX* en processos cel·lulars en els que intervé l'estrés oxidatiu. Per tant, es podria assumir que una desregulació continuada d'aquests gens condueixi, o es presenti associada, a patologies greus.

4. *FABP7* (o *BFABP*)

4.1. La sobreexpressió de *FABP7* (*BFABP*) en cervells fetals SD

Els assajos SSH varen permetre caracteritzar un altre gen d'expressió diferencial. La sobreexpressió de *FABP7* en cervells fetals SD va ésser confirmada posteriorment mitjançant hibridacions sobre *Northern* i RT-PCR quantitativa a temps real, obtenint-se uns increments d'expressió de 1.45 i 1.63 vegades, respectivament.

En total es varen analitzar 10 mostres en la prova *Northern* (5 afectes i 5 controls) i 16 mostres en la PCR quantitativa a temps real (9 afectes i 7 controls). Tanmateix, de manera semblant al cas del gen *PRDX2*, només les dades de la PCR quantitativa varen donar significació en el *Test de Mann-Whitney*, $P \leq 0.05$. Així doncs, més que destacar una relació directa entre la sobreexpressió de *FABP7* i el fenotip SD, hauríem d'interpretar aquesta tendència a la sobreexpressió com un factor de predisposició en l'ampli context patològic.

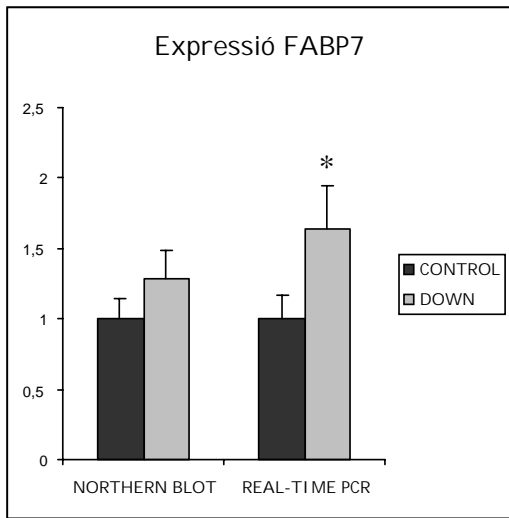


Figura 2. Sobreexpressió de *FABP7* en cervells fetals SD. Unitats arbitràries: ratio de l'expressió *FABP7*/*GAPDH*

4.2. Relació *PKNOX1(PREP1)/FABP7*

Per tal d'aprofundir en les causes de la sobreexpressió de *FABP7* varem abordar l'estudi de la seva regió promotora. Es disposava de l'estructura de la regió homòloga de ratolí i, en canvi, aquesta regió no es coneixia en humans perquè encara no s'havia seqüenciat. Per PCR inversa varem aïllar 1.8 kb de la regió promotora i es va confirmar l'existència de diversos dominis d'unió a proteïnes, prèviament descrits a

ratolí (Josephson *et al.* 1998). D'entre aquests elements reguladors, és de destacar la diana Pbx/POU (9-pb), lloc d'unió dels factors PBXs. Les proteïnes PBXs poden formar heterodímers amb la proteïna PKNOX1 o PREP1, codificada a 21q22.3 i subjecte, per tant, a l'efecte de dosi associat a la trisomia SD (Chen *et al.* 1997; Berthelsen *et al.* 1998a; Berthelsen *et al.* 1998b, Goudet *et al.* 1999, Ferreti *et al.* 1999, Ferreti *et al.* 2000, Herzig *et al.* 2000).

Els experiments d'EMSA utilitzant un oligonucleòtid marcat (30 pb) que contenia la diana Pbx/POU varen demostrar una unió feble de la proteïna recombinant purificada PKNOX1 a aquest domini. El caràcter feble d'aquest enllaç podria explicar-se per què PKNOX1 (PREP1) hauria de formar heterodímers amb factors PBX per tal d'incrementar la seva afinitat pel DNA, interacció que ja ha estat postulada amb anterioritat (Berthelsen *et al.* 1998b, c). Nous experiments EMSA utilitzant extractes nuclears proteics de cèl.lules SH-SY5Y o, extractes nuclears suplementats amb PKNOX1 recombinant, varen demostrar l'aparició de noves interaccions així com un increment en la intensitat de certes bandes ja existents, quan s'afegia a la reacció la proteïna PKNOX1 purificada. Totes aquestes bandes van ser desplaçades en presència d'un excés d'oligonucleòtids de la mateixa regió sense marcar (x500, x5000) i, en canvi, es mantien en presència d'un excés d'oligonucleòtid mutat de la mateixa regió, deficient pels 9-pb del lloc d'unió Pbx/POU (x5000). En conjunt, aquests resultats demostraren clarament l'especificitat d'aquestes unions.

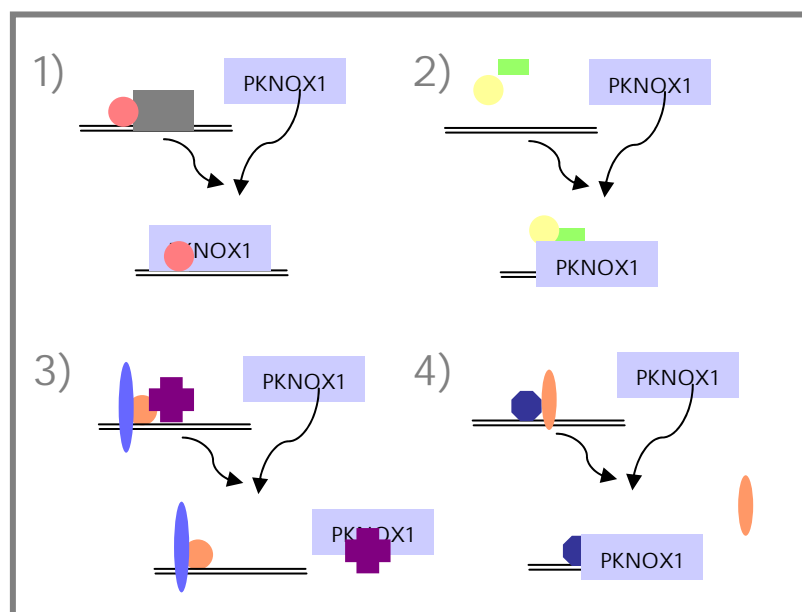


Figura 3. Possibles interaccions proteiques promogudes per PKNOX1

Aquest canvi en el patró de bandes observat en afegir PKNOX1 recombinant s'explicaria (figura 3): 1) si aquesta proteïna s'afegís a un complex inicial DNA-proteïna, formant així un nou complex i generant un super-desplaçament (*super-shift*); 2) per la formació de nous complexos DNA-proteïna en els que intervindrien altres proteïnes lliures; 3) per la dissociació d'un factor d'un complex ja existent mitjançant la unió directa de PKNOX1 a aquesta proteïna i, 4) per la formació de nous complexos substituïnt per desplaçament un factor enganxat a un complex ja existent.

Es van fer nous assajos per tal de determinar si hi havia una relació entre la sobreexpressió de PKNOX1 i la de *FABP7*. Primer es va confirmar per RT-PCR quantitativa a temps real la sobreexpressió de PKNOX1 (x 1.88) en cervells fetals SD. Després, es va quantificar l'activitat luciferasa en extractes de cèl.lules de neuroblastoma que sobreexpressaven *PKNOX1* constitutivament. En aquests experiments (figura 4) es demostra de forma consistent i repetitiva que la sobreexpressió de *PKNOX1* produeix un increment (x 3.7 vegades) de la transcripció del gen *reporter* luciferasa, dirigida pel promotor de *FABP7* (1.2 kb del extrem proximal). Segons aquestes dades, PKNOX1 semblaria ésser el factor limitant de la unió, i no PBX (el seu possible *parthern*), ja que la sobreexpressió del primer és suficient per induir la sobreexpressió del *reporter* sense necessitat d'alterar l'expressió de PBX o cap altre factor. D'altra banda, la deleció dels 9-pb corresponents al lloc d'unió Pbx/POU de la regió promotora de *FABP7* condueix a una disminució, sense anul.lar totalment, la capacitat de PKNOX1 de transactivar la luciferasa (valors d'activació de 2 vegades sobre el nivell basal, sense sobreexpressió de PKNOX1). Aquests resultats semblarien indicar la presència d'una segona diana d'unió per a PKNOX1, fet que no altera la relació existent demostrada entre la trisomia del cromosoma 21, la sobreexpressió de *PKNOX1* i la conseqüent sobreexpressió de *FABP7*. Finalment, és important assenyalar que la deleció de la diana d'unió per Pbx/POU incrementa la transcripció basal del gen de la luciferasa en comparació amb la mateixa seqüència sense deleccionar aquestes 9-pb, tot i que aquest increment és inferior a l'observat per transactivació de PKNOX1 (figura 4). Aquests resultats podrien indicar que l'eliminació d'aquesta diana crea una nova situació en el promotor de *FABP7*, on es podrien fer accessibles noves dianes per altres factors reguladors, que causarien un increment en la taxa de transcripció basal.

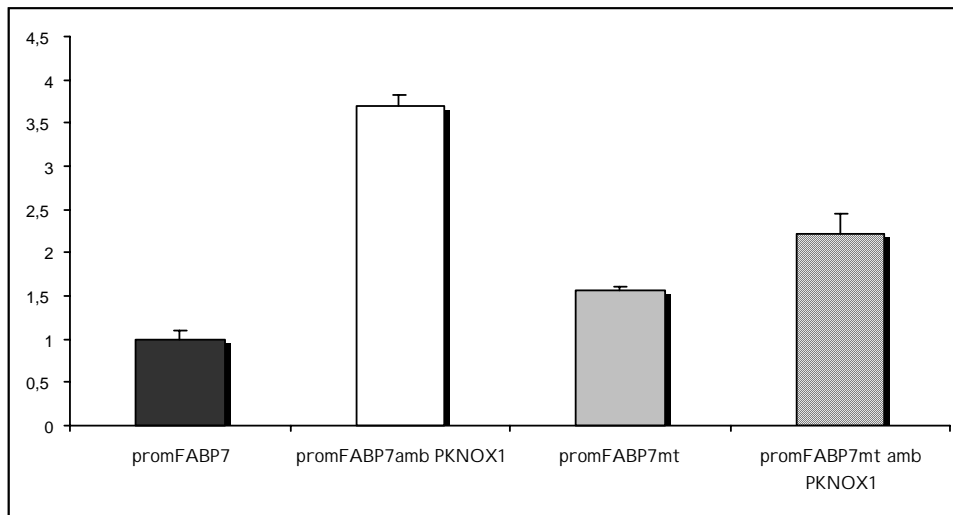


Figura 4. Resultats de l'assaig luciferasa recollits al capítol 3

De manera general, aquests experiments no fan més que confirmar, de forma complementària, els resultats obtinguts mitjançant una tècnica tant complexa com és la SSH.

La capacitat de *PKNOX1* de transactivar *FABP7* és la primera demostració de la relació (no hem trobat cap d'altra a la literatura) entre l'efecte de dosi d'un gen situat al cromosoma 21 (*PKNOX1*) i la sobreexpressió d'un altre gen no situat en aquest mateix cromosoma (*FABP7*). Un gran repte per entendre les bases moleculars de la SD és identificar la relació entre la multitud de gens amb expressió diferencial en els pacients (veure capítol introductorí subapartat 5.3) i la trisomia del cromosoma 21. Molt probablement, en molts casos, la relació no serà directa.

4.3. *FABP7* és important en el transport dels àcids grassos

La hidrofobicitat dels àcids grassos complica molt el seu transport i justifica l'existència de mecanismes específics de transport, fent ús de les proteïnes citoplasmàtiques d'unió d'àcids grassos (FABPcs).

Els àcids grassos de cadena llarga (LCFAs) tene un paper molt important en l'homeostasi cel.lular. Es creu que són font d'energia metabòlica, contribueixen a l'estructura de les membranes, i participen en la senyalització cel.lular. A més de la interacció directa o indirecta amb les membranes, transportadors, canals iònics, enzims, receptors hormonals etc..., cada cop s'accepta més el seu paper com a

reguladors de l'expressió gènica. Aquesta multiplicitat de funcions atribuïda als àcids grassos suggereix mecanismes de regulació molt fins pel correcte manteniment de la integritat cel.lular.

4.4. *FABP7* és important pel desenvolupament del SNC

S'ha assenyalat la importància de *FABP7* en la formació del sistema radial de fibres gials, així com en la diferenciació i proliferació neuronal (Feng *et al.* 1994; Kurtz *et al.* 1994). Alteracions en l'expressió d'aquest gen en estadis tan primerencs del desenvolupament podria explicar part de les anomalies observades en cervells SD. Una conseqüència de la incorrecta migració de les neurones cap a les capes corticals durant el desenvolupament del SNC podria ésser el menor volum i el nombre reduït de connexions sinàptiques descrit en els afectes Down.

Així mateix, s'ha descrit que l'homòleg de *FABP7* a aus, *RFABP* (de retina), manté molt elevada la seva expressió en els individus adults, a diferència de l'expressió de *FABP7* a mamífers, que queda restringida a un petit grup de cèl.lules. Aquestes diferències d'expressió s'han relacionat amb el fet de que les aus presenten una elevada neurogènesi, inclús en les etapes adultes, a diferència dels mamífers (Bisgrove *et al.* 1999).

Els nivells de DHA són molt importants per la permeabilitat, així com per la integritat de les membranes cel.lulars. El fet que el lligand *in vivo* de *FABP7* sigui l'àcid docosohexanoic (DHA; C22:6n-3) (Xu *et al.* 1996), principal àcid gras de cadena llarga del reservori de fosfolípids del cervell, i que les deficiències en DHA causin alteracions en l'aprenentatge i deficiències visuals (Innis *et al.* 1994) fa encara més interessant l'expressió diferencial de *FABP7* trobada als individus Down. Podríem hipotetitzar que l'increment de *FABP7* segrestaria més DHA i, per tant, hi hauria menys DHA lliure. En els Down s'ha detectat un increment en els nivells de DHA (Pastor *et al.* 1998), que podria estar relacionat amb una major captació d'aquest àcid gras, però en cap cas s'ha determinat la quantitat de DHA realment funcional.

D'altra banda, *FABP7* entre d'altres *FABPcs*, és capaç d'inhibir la síntesi de proteïnes d'una manera depenent de dosi. *FABP7* modula la diferenciació i proliferació cel.lular interaccionant amb els sistemes de traducció de proteïnes (Zimmerman & Veerkamp, 1998). En aquest sentit, petits canvis en els nivells intracel.lulars de *FABP7*, també podrien tenir efectes fenotípics severes en la formació i manteniment del SNC.

En aquest context, cal remarcar l'interès de continuar analitzant la possible activitat transactivadora de FABP7, de manera anàloga a la de CRABP amb l'àcid retinoic, en cèl.lules que sobreexpressin FABP7. Els nostres resultats preliminars reforcen aquest interès.

4.5. Alteracions en l'expressió d'altres *FABPcs* associades a patologies

S'han descrit nivells alterats de la proteïna d'unió d'àcids grassos de l'epidermis (EFABP o FABP5) en un gran nombre de situacions patològiques, entre elles: psoriasis, carcinomes, taques a la pell, etc...(Hertzel & Bernlohr, 2000). De forma similar, s'ha detectat una sobreexpressió de FABP5 en el sistema nerviós central com a resposta a tractaments agressius (Hertzel & Bernlohr, 2000).

Aquesta alteració de l'expressió d'un dels membres de la família de les FABPcs relacionat amb diversos processos patològics que, a més, s'expressa també a cervell com és el cas de FABP7, indica la importància de la correcta regulació de l'expressió dels membres de la família de les FABPcs.

5. Conclusions generals

De manera general, podem considerar que l'aproximació experimental realitzada en aquesta tesi doctoral ha permès descriure dos nous gens, presumiblement implicats en el fenotip Down, i que no estan localitzats en el cromosoma 21.

PRDX2 és un enzim antioxidant subexpressat en els afectes Down que podria explicar part dels trets fenotípics relacionats amb l'estrés oxidatiu, apoptosi neuronal i l'aparició prematura de la malaltia d'Alzheimer.

FABP7, el segon gen, podria influir sobre les anomalies morfològiques descrites en els cervells SD i estar implicat en el retard mental. D'altra banda, es descriu per primera vegada una associació entre un gen del cromosoma 21 (*PKNOX1*) i l'expressió diferencial d'un gen situat en un altre cromosoma (*FABP7*).

Establir la relació entre genotip (trisomia del cromosoma 21)/fenotip (expressió gènica diferencial) en la SD és, sens dubte, crucial per entendre les bases moleculars d'aquesta síndrome. En el cas de *FABP7* i *PKNOX1* (*PREP1*) la relació sembla directa, però és evident que es donen altres situacions molt més complexes. Podríem

hipotetitzar regulacions indirectes: per exemple, l'efecte de dosi d'un gen del cromosoma 21 induiria l'expressió d'un gen del cromosoma 15 i aquest, finalment, provocaria la subexpressió d'un tercer gen del cromosoma 13 (com per exemple podria ser el cas de *PRDX2*). També podem hipotetitzar regulacions gèniques per catabolít, i així serien els nivells d' H_2O_2 o d' O_2 els responsables de la subexpressió de *PRDX2*, essent fruit d'un complex entramat bioquímic.

En aquest sentit, aquest tipus de treball és una aproximació altament complicada però alhora molt gratificant.

6. Perspectives de treball futur

Una estratègia que podria aportar llum sobre la implicació d'ambdós gens en el fenotip Down seria la construcció de ratolins transgènics que subexpressessin *PRDX2* o sobreexpressessin *FABP7* i l'anàlisi del seu fenotip.

En el cas de *PRDX2*, s'hauria de confirmar la relació *SOD1/PRDX2*. D'altra banda, la creació de línies cel·lulars estables que alhora subexpressessin *PRDX2* i sobreexpressessin *SOD1* permetria dissecionar la contribució, en termes d'estrés oxidatiu, d'aquests dos gens al fenotip Down. Segons els resultats obtinguts en els cultius cel·lulars es plantejaria la construcció d'un ratolí transgènic que reproduís aquesta situació, i així, determinar si és necessària la desregulació d'ambdós gens per provocar la neurodegeneració motora descrita en el transgènic que sobreexpressa *SOD1* quan és exposat a nivells elevats de peròxid d'hidrogen.

En el cas de *FABP7* i tenint en compte la seva relació amb *PKNOX1*, seria interessant confirmar si d'altres gens regulats per *PKNOX1* com són, la somatostatina (Goudet *et al.* 1999), el gen de la colàgena COL52A (Penkov *et al.* 2000) , uroquinasa (Berthelsen *et al.* 1998b) i d'altres, s'expressen diferencialment en els individus Down. Alternativament, es podrien generar cèl·lules de neuroblastoma sobreexpressant *PKNOX1* i tractar d'identificar, mitjançant l'estudi de l'expressió diferencial amb tècniques com la SSH i el *DD-PCR*, d'altres gens expressats diferencialment. Posteriorment, seria interessant confirmar si aquests gens també presenten alteracions en l'expressió en cervells Down.

Conclusions

1. A partir dels resultats obtinguts amb les diverses metodologies emprades per analitzar l'expressió diferencial en SD, queda palès que, a nivell molecular, la trisomia del cromosoma 21 és una condició genètica de predisposició (o tendència) més que un clar agent causatiu.
2. S'ha detectat en cervells fetals Down una clara tendència a la subexpressió del gen *PRDX2* (x 0.7-anàlisi *Northern blot*, x 0.73- RT-PCR quantitativa a temps real).
3. En condicions de cultiu estàndards, tant la subexpressió de *PRDX2* (x 0.6-x 0.9) com la sobreexpressió de *SOD1* (x 3-x 5), provoquen un descens en la viabilitat i un increment en la mort cel.lular programada per apoptosi via caspasa-3.
4. En presència d'agents oxidatius citotòxics (H_2O_2 i timerosal), tant la subexpressió de *PRDX2* com la sobreexpressió de *SOD1* causen un descens en la viabilitat cel.lular. Aquest increment de la mort cel.lular es deu, al menys parcialmet: a) a apoptosi via caspasa-3, en presència de timerosal; b) a processos alternatius a l'apoptosi via caspasa-3, en presència de H_2O_2 .
5. L'alteració de l'expressió de *PRDX2* provoca uns efectes sobre la viabilitat cel.lular de magnitud similar a la sobreexpressió de *SOD1*, gen situat al cromosoma 21 que es considera responsable de determinats trets fenotípics de la SD.
6. S'ha detectat en cervells fetals Down una clara tendència a la sobreexpressió del gen *FABP7* o *BFABP* (x 1.3-anàlisi *Northern blot*, x 1.63- RT-PCR quantitativa a temps real).
7. La regió promotora del gen *FABP7* humà conté una diana d'unió a factors Pbx/POU. Aquesta diana també és reconeguda, mitjançant la unió d'heterodímers, per PKNOX1. PKNOX1 és capaç de transactivar *in vivo* la transcripció a partir del promotor de *FABP7*.
8. S'ha confirmat la sobreexpressió *in vivo* de *PKNOX1* o *PREP1* en cervells fetals Down (x1.88 vegades). La sobreexpressió del gen *FABP7* detectada s'ha relacionat directament amb l'efecte de dosi del gen *PKNOX1* (*Pbx/Knotted homeobox 1*), que mapa a 21q22.3.

Bibliografia

A

- Ahlbom, B. E., Goetz, P., Korenberg, J. R., Pettersson, U., Seemanova, E., Wadelius, C., Zech, L., and Anneren, G. (1996). Molecular analysis of chromosome 21 in a patient with a phenotype of Down syndrome and apparently normal karyotype. *Am J Med Genet* **63**, 566-72.
- Annerén, K. G., Korenberg, J. K., and Epstein, C. J. (1987). Phosphofructokinase activity in fibroblasts aneuploid for chromosome 21. *Hum Genet* **76**, 63-65.
- Antonarakis, S. E. (1991). Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. Down Syndrome Collaborative Group. *N Engl J Med* **324**, 872-6.
- Antonarakis, S. E. (1998). 10 years of Genomics, chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics* **51**, 1-16.
- Antonarakis, S. E. (2001). Chromosome 21: from sequence to applications. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 241-246.
- Antonarakis, S. E., Avramopoulos, D., Blouin, J. L., Talbot, C. J., and Schinzel, A. A. (1993). Mitotic errors in somatic cells cause trisomy 21 in about 4.5% of cases and are not associated with advanced maternal age [see comments]. *Nat Genet* **3**, 146-50.
- Antonarakis, S. E., Petersen, M. B., McInnis, M. G., Adelsberger, P. A., Schinzel, A. A., Binkert, F., Pangalos, C., Raoul, O., Slaugenhaupt, S. A., Hafez, M., and *et al.* (1992). The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* **50**, 544-50.
- Averof, M. (1997) Arthropod evolution: same Hox genes, different body plans. *Curr Biol* **7**, 634-636.

B

- Bambrick, L. L., and Krueger, B. K. (1999). Neuronal apoptosis in mouse trisomy 16: mediation by caspases. *J Neurochem* **72**, 1769-1772.
- Baxter, L. L., Moran, T. H., Richtsmeier, J. T., Troncoso, J., and Reeves, R. H. (2000). Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse. *Hum Mol Genet* **9**, 195-202.
- Bass, N.M. (1993) Cellular binding proteins for fatty acids and retinoids -similar or specialized functions. *Mol. Cell. Biochem.* **123**, 191-202.
- Berggren, M. I., Husbeck, B., Samulitis, B., Baker, A. F., Gallegos, A., and Powis, G. (2001). Thioredoxin Peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in Thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin. *Arch Biochem Biophys* **392**, 103-109.
- Bernlohr, D. A., Simpson, M. A., Hertzell, A. V., and Banaszak, L. J. (1997). Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu Rev Nutr* **17**, 277-303.
- Berthelsen, J., Viggiano, L., Schulz, H., Ferretti, E., Consalez, G. G., Rocchi, M., and Blasi, F. (1998a). PKNOX1, a gene encoding PREP1, a new regulator of

- PBX activity, maps on human chromosome 21q22.3 and murine chromosome 17B/C. *Genomics* **47**, 323-324.
- Berthelsen, J., Zappavigna, V., Ferretti, E., Mavilio, F., and Blasi, F. (1998c). The novel homeoprotein Prep1 modulates Pbx-Hox protein cooperativity. *EMBO J* **17**, 1434-1445.
- Berthelsen, J., Zappavigna, V., Mavilio, F., and Blasi, F. (1998b). Prep1, a novel functional partner of Pbx proteins. *EMBO J* **17**, 1423-1433.
- Bisgrove, D. A., and Godbout, R. (1999). Differential expression of AP-2 alpha and AP-2 beta in the developing chick retina: Repression of R-FABP promoter activity by AP-2. *Develop Dynam* **214**, 195-206.
- Bisgrove, D. A., Monckton, E. A., Packer, M., and Godbout, R. (2000). Regulation of brain fatty acid-binding protein expression by differential phosphorylation of nuclear factor I in malignant glioma cell lines. *J Biol Chem* **275**, 30668-30676.
- Busciglio, J., and Yankner, B. A. (1995). Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons in vitro. *Nature* **378**, 776-9.

C

- Cairns, N. J. (1999). Neuropathology. *J Neural Transm Suppl* **57**, 61-74.
- Ceballos-Picot, I., Nicole, A., Briand, P., Grimber, G., Delacourte, A., Defossez, A., Javoy-Agid, F., Lafon, M., Blouin, J. L., and Sinet, P. M. (1991). Neuronal-specific expression of human copper-zinc superoxide dismutase gene in transgenic mice: animal model of gene dosage effects in Down's syndrome. *Brain Res* **552**, 198-214.
- Chae, H. Z., Chung, S. J., and Rhee, S. G. (1994c). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* **269**, 27670-27678.
- Chae, H. Z., Kim, H. J., Kang, S. W., and Rhee, S. G. (1999). Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diab Res Clin Pract* **45**, 101-112.
- Chae, H. Z., Kim, L.-H., Kim, K., and Rhee, S. G. (1993). Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **268**, 16815-16821.
- Chae, H. Z., Robison, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G., and Rhee, S. G. (1994a). Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: Alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 7017-7021.
- Chae, H. Z., Uhm, T. B., and Rhee, S. G. (1994b). Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 7022-7026.
- Charst, R., Scott, H. S., Papasavvas, M. P., Rossier, C., Antonarakis, E. S., Barras, C., Davisson, M. T., Schimdt, C., Estivill, X., Dierssen, M., Pritchard, M., and Antonarakis, S. E. (2000). The mouse brain transcriptome by SAGE: differences in gene expression between P30 brains of the partial trisomy 16 mouse model of Down syndrome (Ts65Dn) and normals. *Genome Res* **10**, 2006-2021.
- Chen, H., and Antonarakis, S. E. (1997). Localization of a human homologue of the *Drosophila mnb* and rat *Dyrk* genes to chromosome 21q22.2. *Hum Genet* **99**, 262-5.

- Chen, H., Rossier, C., Nakamura, Y., Lynn, A., Chakravarti, A., and Antonarakis, S. E. (1997a). Cloning of a novel homeobox-containing gene, PKNOX1, and mapping to human chromosome 21q22.3. *Genomics* **41**, 193-200.
- Chen, J.-W., Dodia, C., Feinstein, S. I., Jain, M. K., and Fisher, A. B. (2000). 1-Cys Peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities. *J Biol Chem* **275**, 28421-28427.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-169.
- Chumakov, I., Rigault, P., Guillou, S., Ougen, P., Billaut, A., Guasconi, G., Gervy, P., LeGall, I., Soularue, P., Grinas, L., and et, a. l. (1992). Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 21q [see comments]. *Nature* **359**, 380-7.
- Clarke, C. M., Edwards, J. H., and Smallpiece, V. (1961). 21 trisomy/normal mosaicism in an intelligent child with mongoloid characteristics. *Lancet*, 1028-1030.
- Coe, N. R., and Bernlohr, D. A. (1998). Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1391**, 287-306.
- Cole, S. E., Wiltshire, T., Rue, E. E., Morrow, D., Hieter, P., Brahe, C., Fisher, E. M., and Katsanis, N. (1999). High-resolution comparative physical mapping of mouse Chromosome 10 in the region of homology with human Chromosome 21. *Mamm Genome* **10**, 229-234.
- Cox, D., Smith, S. A., Epstein, L. B., and Epstein, C. J. (1984). Mouse trisomy 16 as an animal model of human trisomy 21 (Down Syndrome): Production of viable Trisomy 16 ÷ Diploid Mouse chimeras. *Dev Biol* **101**, 416-424.

D

- Das, K. C., Pahl, P. M. B., Guo, Z.-L., and White, C. W. (2001). Induction of peroxiredoxin gene expression by oxygen in lungs of newborn primates. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**, 226-232.
- Davisson, M. T., Schmidt, C., and Akeson, E. C. (1990). Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog Clin Biol Res* **360**, 263-280.
- de Haan, J., Cristiano, F., Iannello, R., Bladier, C., Kelner, M. J., and Kola, I. (1996). Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum Mol Genet* **5**, 283-92.
- de Haan, J., Cristiano, F., Iannello, R. C., and Kola, I. (1995). Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. *Biochem Mol Biol Int* **35**, 1281-97.
- de Haan, J., Newman, J. D., and Kola, I. (1992). Cu/Zn superoxide dismutase mRNA and enzyme activity, and susceptibility to lipid peroxidation, increases with aging in murine brains. *Brain Res Mol Brain Res* **13**, 179-87.
- de la Monte, S. M. (1999). Molecular abnormalities of the brain in Down syndrome: relevance to Alzheimer's neurodegeneration. *J Neural Transm Suppl* **57**, 1-20.
- Delabar, J. M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettou, Z., Blouin, J. L., Prieur, M., Noel, B., and Sinet, P. M. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Genet* **1**, 114-124.

- Diatchenko, L., Lau, Y.-F. C., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S. A., Lukyanov, K. A., Gurskaya, N. G., Sverdlov, E. D., and Siebert, P. D. (1996). Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6025-6030.
- Dunham, I., and al., e. (1999). The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* **402**, 489-495.
- Dutta-Roy, A. K. (2000). Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty acid-binding/transport proteins. *Cel Mol Life Sci* **57**, 1360-1372.

E

- Epstein, C. J. (1986). The consequences of chromosome imbalance: principles, mechanisms and models. *Cambridge University Press, New York*.
- Epstein, C. J. (1990). The consequences of chromosome imbalance. *Am J Med Gen suppl* **7**, 31-37.
- Epstein, C. J. (1995). Epilogue: toward twenty-first century with Down Syndrome -a personal view of how far we have come and how far we can reasonably expect to go. *Prog Clin Biol Res* **393**, 241-246.
- Epstein, C. J., Avraham, K. B., Lovett, M., Smith, S., Elroy-Stein, O., Rotman, G., and Groner, Y. (1987). Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity: animal model of dosage effects in Down syndrome. *Proc Nat Acad Sci* **84**, 8044-8048.
- Epstein, C. J., Korenberg, J. R., Anneren, G., Antonarakis, S. E., Ayme, S., Courchesne, E., Epstein, L. B., Fowler, A., Groner, Y., Huret, J. L., and *et al.* (1991). Protocols to establish genotype-phenotype correlations in Down syndrome. *Am J Hum Genet* **49**, 207-35.

F

- Fang-Kircher, S., Labudova, O., Kitzmueller, E., Rink, H., Cairns, N., and Lubec, G. (1999). Increased steady state mRNA levels of DNA-repair genes XRCC1, ERCC2 and ERCC3 in brain of patients with Down syndrome. *Life Sci* **64**, 1689-1699.
- Feng, L., Hatén, M. E., and Heintz, N. (1994). Brain Lipid-Binding Protein (BLBP): A novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* **12**, 895-908.
- Feng, L., and Heintz, N. (1995). Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. *Development* **121**, 1719-1730.
- Ferretti, E., Marshall, H., Popperl, H., Maconochie, M., Krumlauf, R., and Blasi, F. (2000). Segmental expression of Hoxb2 in r4 requires two separate sites that integrate cooperative interactions between Prep1, Pbx and Hox proteins. *Development* **127**, 155-166.
- Ferretti, E., Schulz, H., Talarico, D., Blasi, F., and Berthelsen, J. (1999). The PBX-Regulating Protein PREP1 is present in different PBX-complexed forms in mouse. *Mech Dev* **83**, 53-64.
- Finkel, T. (1998). Oxyen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 248-253.

- Forsberg, L., de Faire, U., and Morgenstern, R. (2001). Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch Biochem Biophys* **389**, 84-93.
- Fuentes, J. J., Genescà, L., Kingsbury, T. J., Cunningham, K. W., Pérez-Riba, M., Estivill, X., and de la Luna, S. (2000). DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Hum Mol Genet* **9**, 1681-1690.
- Fuentes, J. J., Pritchard, M. A., and Estivill, X. (1997). Genomic organization, alternative splicing, and expression patterns of the DSCR1 (Down syndrome candidate region 1) gene. *Genomics* **44**, 358-61.
- Fuentes, J. J., Pritchard, M. A., Planas, A. M., Bosch, A., Ferrer, I., and Estivill, X. (1995). A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Hum Mol Genet* **4**, 1935-44.

G

- Gardiner, K., and Davisson, M. (2001). The sequence of human chromosome 21 and implications into Down syndrome research. *Genome Biol* **1**, 1-9.
- Gardiner, K., Horisberger, M., Kraus, J., Tantravahi, U., Korenberg, J., Rao, V., Reddy, S., and Patterson, D. (1990). Analysis of human chromosome 21: correlation of physical and cytogenetic maps; gene and CpG island distributions. *EMBO J* **9**, 25-34.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, R., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M., and Hardy, J. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704-706.
- Godbout, R., Bisgrove, D. A., Shkolny, D., and Day, R. S. (1998). Correlation of B-FABP and GFAP expression in malignant glioma. *Oncogene* **16**, 1955-1962.
- Goudet, G., Delhalle, S., Biemar, F., Martial, J. A., and Peers, B. (1999). Functional and cooperative interactions between the homeodomain PDX1, Pbx, and Prep1 factors on the somatostatin promoter. *J Biol Chem* **274**, 4067-4073.
- Greber-Platzer, S., Balcz, B., Cairns, N., and Lubec, G. (1999c). c-fos expression in brains of patients with Down syndrome. *J. Neural. Transm. Suppl.* **57**, 75-86.
- Greber-Platzer, S., Shatzmann-Turhani, D., Cairns, N., Balcz, B., and Lubec, G. (1999b). Expression of the transcription factor ETS2 in brain of patients with Down syndrome- evidence against the overexpression-gene dosage hypothesis. *J Neural Transm Suppl* **57**, 269-281.
- Greber-Platzer, S., Shatzmann-Turhani, D., Wollenek, G., and Lubec, G. (1999a). Evidence against the current hypothesis of "gene dosage effects" of trisomy 21: ets-2, encoded on chromosome 21, is not overexpressed in hearts of patients with Down syndrome. *Biochem Biophys Res Comm* **254**, 395-399.
- Groner, Y., Elsroy-Stein, O., Avraham, K. B., Schickler, M., Knobler, H., Minc-Golomb, D., Bar-Peled, O., Yarom, R., and Rotshenker, S. (1994). Cell damage by excess Cu/znSOD and Down's syndrome. *Biomed Pharmacother* **48**, 231-240.
- Guimera, J., Casas, C., Estivill, X., and Pritchard, M. (1999). Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics* **57**, 407-418.

- Guimera, J., Casas, C., Pucharcos, C., Solans, A., Domenech, A., Planas, A. M., Ashley, J., Lovett, M., Estivill, X., and Pritchard, M. A. (1996). A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum Mol Genet* **5**, 1305-10.
- Guimera, J., Pritchard, M., Nadal, M., and Estivill, X. (1997). Minibrain (MNBH) is a single copy gene mapping to human chromosome 21q22.2. *Cytogenet Cell Genet* **77**, 182-4.
- Gulesserian, T., Engidawork, E., Cairns, N., and Lubec, G. (2000). Increased levels of serotonin transporter in frontal cortex of patients with Down Syndrome. *Neurosci Lett* **296**, 53-57.
- Gurskaya, N. G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P. D., Khaspekov, G. L., Lukyanov, K. A., Vagner, L. L., Ermolaeva, O. D., Lukyanov, S. A., and Sverdlov, E. D. (1996). Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* **240**, 90-97.

H

- Hallam, D. M., Travelstead, A. L., Brewer, G. J., and Mauron, L. E. (2000). Evidence for an interferon-related inflammatory reaction in the trisomy 16 mouse brain leading to caspase-1-mediated neuronal apoptosis. *J Neuroimmunol* **110**, 66-75.
- Haridas, V., Ni, J., meager, A., Su, J., Yu, G.-L., Zhai, Y., Kyaw, H., Akama, K. T., Hu, J., Van Eldik, L. J., and Aggarwal, B. B. (1998). TRANK, a novel cytokine that activates NF- κ B and c-Jun N-Terminal Kinase. *J Immunol* **161**, 1-6.
- Hassold, T., and Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: The genesis of human aneuploidy. *Nature Genet* **2**, 280-290.
- Hassold, T., and Jacobs, P. (1984). Trisomy in man. *Annu. Rev. Genet.* **18**, 69-97.
- Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T. D., Watanabe, H., Yada, T., Parks, H. S., Toyoda, A., and Ishii, K. *et al.* (2000). The DNA sequence of Human Chromosome 21. *Nature* **405**, 311-319.
- Haydar, T. K., Nowakowski, R. S., Yarowski, R. J., and Krueger, B. K. (2000). Role of founder cell deficit and delayed neuronogenesis in microencephaly of the trisomy 16 mouse. *J Neurosci* **20**, 4156-64.
- Hedrick, S. M., Cohen, D. I., Nielsen, E. A., and Davis, M. M. (1984). Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* **308**, 149-153.
- Hermon, M., Cairns, N., Egly, J. M., Fery, A., Labudova, O., and Lubec, G. (1998). Expression of DNA excision-repair-cross-complementing proteins p80 and p89 in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **251**, 45-48.
- Hernandez, D., Mee, P. J., Martin, J. E., Tybulewicz, L. J., and Fisher, E. M. C. (1999). Transchromosomal mouse embryonic stem cell lines and chimeric mice that contain freely segregating segments of human chromosome 21. *Hum Mol Genet* **8**, 923-933.
- Hertzel, A. V., and Bernlohr, D. A. (2000). The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *TEM* **11**, 175-180.

Herzig, S., Füzesi, L., and Knepel, W. (2000). Heterodimeric Pbx-Prep1 homeodomain protein binding to the glucagon gene restricting transcription in a cell type-dependent manner. *J Biol Chem* **275**, 27989-27999.

Hook, E. B., Cross, P. K., and Schreinemachers, D. M. (1983). Chromosomal abnormality rates in amniocentesis and in live-born infants. *JAMA* **249**, 2034-2038.

I

Iannello, R. C., Crack, P. J., de Haan, J. B., and Kola, I. (1999). Oxidative stress and neuronal dysfunction in Down Syndrome. *J Neural Transm Suppl* **57**, 257-268.

Innis, S. M. (1991). Essential fatty acids in growth and development. *Prog. Lipid Res.* **30**, 39-103.

Irving, N. G., Cabin, D. E., Swanson, D. A., and Reeves, R. H. (1994). Gene order is conserved within the human chromosome 21 linkage group on mouse chromosome 10. *Genomics* **21**, 144-149.

Ishii, T., Kawane, T., Taketani, S., and Bannai, S. (1995). Inhibition of the thiol-specific antioxidant activity of rat liver MSP23 protein by hemin. *Biochem Biophys Res Comm* **216**, 970-975.

J

Jacobs, P. A., Baikle, A. G., Court-Brown, W. M., and Strong, J. A. (1959). The somatic chromosomes in mongolism. *Lancet i*, 710-711.

Jäschke, A., Mi, H., and Tropschug, M. (1998). Human T cell cyclophilin 18 binds to thiol-specific antioxidant protein Aop1 and stimulates its activity. *J Mol Biol* **277**, 763-769.

Jin, D.-Y., Chae, H. Z., Rhee, S. G., and Jeang, K.-T. (1997). Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kB activation. *J Biol Chem* **272**, 30952-30961.

Jones, C. T., Swingler, R. J., and Brock, D. J. (1994). Identification of a novel SOD1 mutation in an apparently sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient and the detection of Ile113Thr in three others. *Hum Mol Genet* **3**, 649-50.

Josephson, R., Müller, T., Pickel, J., Okabe, S., Reynolds, K., Turner, P. A., Zimmer, A., and McKay, R. D. G. (1998). POU transcription factors control expression of CNS stem cell-specific genes. *Development* **125**, 3087-3100.

K

Kang, S. W., Baines, I. C., and Rhee, S. G. (1998b). Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J Biol Chem* **273**, 6303-6311.

Kang, S. W., Chae, H. Z., Seo, M. S., Kim, K., Baines, I. C., and Rhee, S. G. (1998a). Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* **273**, 6297-6302.

- Kim, A. T., Sarafian, T. A., and Shau, H. (1997). Characterization of antioxidant properties of Natural Killer-Enhancing Factor-B and induction of its expression by hydrogen peroxide. *Toxicol Appl Pharmacol* **147**, 135-142.
- Kim, H., Lee, T.-H., Park, E. S., Suh, J. M., Park, S. J., Chung, H. K., Kwon, O.-Y., Kim, Y. K., Ro, H. K., and Shong, M. (2000). Role of peroxidoxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-induced apoptosis in thyroid cells. *J Biol Chem* **275**, 18266-18270.
- Kishimoto, T. K., O'Conner, K., and Springer, T. A. (1989). Leukocyte adhesion deficiency. Aberrant splicing of a conserved integrin sequence causes a moderate deficiency phenotype. *J Biol Chem* **264**, 3588-3595.
- Kitzmueller, E., Labudova, O., Rink, H., Cairns, N., and Lubec, G. (1999). Altered gene expression in fetal Down syndrome brain as revealed by the gene hunting technique of subtractive hybridization. *J Neural Transm Suppl* **57**, 99-124.
- Kola, I. (1997). Simple minded mice from 'in vivo' libraries [news; comment]. *Nat Genet* **16**, 8-9.
- Kola, I., and Hertzog, P. J. (1997). Animal models in the study of the biological function of genes on human chromosome 21 and their role in the pathophysiology of Down syndrome. *Hum Mol Genet* **6**, 1713-27.
- Kola, I., and Hertzog, P. J. (1998). Down syndrome and mouse models. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 316-21.
- Korenberg, J. P. (1995). Mental Modeling. *Nature Genetics* **11**, 109-111.
- Korenberg, J. R., Bradley, C., and Disteché, C. M. (1992). Down syndrome: molecular mapping of the congenital heart disease and duodenal stenosis. *Am J Hum Genet* **50**, 294-302.
- Korenberg, J. R., Chen, X. N., Schipper, R., Sun, Z., Gonsky, R., Gerwehr, S., Carpenter, N., Daumer, C., Dignan, P., Disteché, C., and et, a. l. (1994). Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4997-5001.
- Korenberg, J. R., Kawashima, H., Pulst, S. M., Ikeuchi, T., Ogasawara, N., Yamamoto, K., Schonberg, S. A., West, R., Allen, L., Magenis, E., and et, a. l. (1990). Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am J Hum Genet* **47**, 236-46.
- Korenberg, J. R., Pulst, S. M., Neve, R. L., and West, R. (1989). The Alzheimer amyloid precursor protein maps to human chromosome 21 bands q21.105-q21.05. *Genomics* **5**, 124-7.
- Kowaltowski, A., Netto, L. E. S., and Vercesi, A. E. (1998). The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* **273**, 12766-12769.
- Knoepfler, P.S., Calvo, K.R., Chen, H. and Antonarakis, S.E. (1997) Meis1 and Pknox1 bind DNA cooperatively with Pbx1 utilizing an interaction surface disrupted in oncoprotein E2a-Pbx1. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 14553-14558.
- Krapfenbauer, K., Chul Yoo, B., Cairns, N., and Lubec, G. (1999). Differential Display reveals deteriorated mRNA levels of NADH3 (complex I) in cerebellum of patients with Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* **57**, 211-220.
- Krapfenbauer, K., Yoo, B. C., Kim, S. H., Cairns, N., and Lubec, G. (2001). Differential display reveals downregulation of the phospholipid transfer protein (PLTP) at mRNA level in brains of patients with Down syndrome. *Life Sci* **68**, 2169-2179.
- Kurtz, A., Zimmer, A., Schnütgen, F., Brüning, G., Spener, F., and Müller, T. (1994). The expression of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development* **120**, 2637-2649.

L

- Labudova, O., Cairns, N., Kitzmuller, E., and Lubec, G. (1999d). Impaired brain glucose metabolism in patients with Down Syndrome. *J Neural Transm Suppl* **57**, 247-256.
- Labudova, O., Cairns, N., Koeck, T., Kitzmueller, E., Rink, H., and Lubec, G. (1999c). Thyroid stimulating hormone - receptor overexpression in brain of patients with Down Syndrome and Alzheimer's disease. *Life Sci* **64**, 1037-1044.
- Labudova, O., FangKircher, S., Cairns, N., Moenkemann, H., Yeghiazaryan, K., and Lubec, G. (1998b). Brain vasopressin levels in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Brain Res* **806**, 55-59.
- Labudova, O., Kitzmueller, E., Rink, H., Cairns, N., and Lubec, G. (1999a). Gene expression in fetal Down Syndrome brain as revealed by subtractive hybridization. *J Neural Transm Suppl* **57**, 125-136.
- Labudova, O., Kitzmueller, E., Rink, H., Cairns, N., and Lubec, G. (1999b). Increased phosphoglycerate kinase in the brains of patients with Down's syndrome but not with Alzheimer's disease. *Clinical Sci* **96**, 279-285.
- Labudova, O., Krapfenbauer, K., Moenkemann, H., Rink, H., Kitzmuller, E., Cairns, N., and Lubec, G. (1998a). Decreased transcription factor junD in brains of patients with Down syndrome. *Neurosci Lett* **252**, 159-62.
- Lamb, B. T., Sangram, S. S., Lawler, A. M., Slunt, H. H., Kitt, C. A., Kearns, W. G., Pearson, P. L., Price, D. L., and Gearhart, J. D. (1993). Introduction and expression of the 400 kilobase precursor amyloid protein gene in transgenic mice. *Nat Genet* **5**, 22-30.
- Lee, M., Hyun, D.-H., Jenner, P., and Halliwell, B. (2001a). Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative damage and antioxidant defences: relevance to Down's syndrome and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **76**, 957-965.
- Lee, S. M., and Park, J.-W. (1998). Thermosensitive phenotype of yeast mutant lacking thioredoxin peroxidase. *Arch Biochem Biophys* **359**, 99-106.
- Lee, S. P., Hwang, Y. S., Kim, Y. J., Kwon, K.-S., Kim, H. J., Kim, K., and Chae, H. Z. (2001b). Cyclophilin A binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *J Biol Chem* **276**, 29826-29832.
- Lee, T.-H., Yu, S.-L., Kim, S.-U., Kim, Y.-M., Choi, I., Kang, S. W., Rhee, S. G., and Yu, D.-Y. (1999). Characterization of the murine gene encoding 1-Cys peroxiredoxin and identification of highly homologous genes. *Gene* **234**, 337-344.
- Lejeune, J., Gautier, M., and Turpin, R. (1959). Etude des chromosome somatique des neuf enfants mongoliens. *CR Acad Sci Paris* **248**, 1721-1722.
- Lieman-Hurwitz, J., Dafni, N., Lavie, V., and Groner, Y. (1982). Human cytoplasmic superoxide dismutase cDNA clone: a probe for studying the molecular biology of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 2808-2811.
- Lim, M. J., Chae, H. Z., Rhee, S. G., Yu, D.-Y., Lee, K.-K., and Yeom, Y. I. (1998). The type II peroxiredoxin gene family of the mouse: molecular structure, expression and evolution. *Gene* **216**, 197-205.
- Lim, Y.-S., Cha, M.-K., Yun, C.-H., Kim, H.-K., Kim, K., and Kim, I.-H. (1994). Purification and characterization of thiol-specific antioxidant protein from human red blood cell: A new type of antioxidant protein. *Biochem Biophys Res Comm* **199**, 199-206.

- Lim, Y. S., Cha, M. K., Kim, H. K., Uhm, T. B., Park, J. W., Kim, K., and Kim, I. H. (1993). Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role *in vivo*. *Biochem Biophys Res Comm* **192**, 273-280.
- Lisitsyn, N., Lisitsyn, N., and Wigler, M. (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science* **259**, 946-951.
- Lisitsyn, N. A. (1995). Representational difference analysis: finding the differences between genomes. *TIG* **11**, 303-307.
- Liversey, F. J., and Hunt, S. P. (1996). Identifying changes in gene expression in the nervous system: mRNA differential-display. *Trends in Neurosci* **19**, 84-88.
- Lubec, G., Labudova, O., Cairns, N., Berndt, P., Langen, H., and Fountoulakis, M. (1999a). Reduced aldehyde dehydrogenase levels in the brain of patients with Down Syndrome. *J Neural Transm Suppl* **57**, 21-40.
- Lubec, G., Labudova, O., Cairns, N., and Fountoulakis, M. (1999c). Increased glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase levels in the brain of patients with Down's syndrome. *Neurosci Lett* **260**, 141-145.
- Lubec, G., Nonaka, M., Krapfenbauer, K., Gratzer, M., Cairns, N., and Fountoulakis, M. (1999b). Expression of the dihydropyrimidinase related protein 2 (DRP-2) in Down Syndrome and Alzheimer's Disease brain is down regulated at the mRNA and dysregulated at the protein level. *J Neural Transm Suppl* **57**, 161-178.

M

- Martínez, M. (1996). Docosahexaenoic acid therapy in docosahexaenoic acid-deficient patients with disorders of peroxisomal biogenesis. *Lipids* **31**, 145-152.
- Matés, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicol* **153**, 83-104.
- Matsumoto, A., Okado, A., Fujii, T., Fujii, J., Egashira, M., Niikawa, N., and Taniguchi, N. (1999). Cloning of the peroxiredoxin gene family in rats and characterization of the fourth member. *FEBS Lett* **443**, 246-250.
- Mauron, L. E., Heffernan, T. N., and Hallam, D. M. (2000). Partial IFN- α /beta and IFN- γ receptor knockout trisomy 16 mouse fetuses show improved growth and cultured neuron viability. *J Interferon Cytokine Res* **20**, 197-203.
- McClelland, M., Mathieu-Daude, F., and Welsh, J. (1995). RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *TIG* **11**, 242-246.
- Mitsumoto, A., Takanezawa, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nakagawa, Y. (2001). Variants of peroxiredoxins expression in response to hydroperoxide stress. *Free Rad Biol Med* **30**, 625-635.
- Mizuguchi, M., and Hayakawa, T. (2001). Characteristics of adenovirus-related tetracycline-controllable expression system. *Biochim Biophys Acta* **1568**, 21-29.
- Murell, J., Farlow, M., Ghetti, B., and Benson, M. D. (1991). A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's Disease. *Science* **254**, 97-99.

N

- Nagy, Z. (1999). Mechanisms of neuronal death in Down's syndrome. *J Neural Transm Suppl* **57**, 233-247.

- Netto, L. E. S., Chae, H. Z., Kang, S.-W., Rhee, S. G., and Stadtman, E. R. (1996). Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. *J Biol Chem* **271**, 15315-15321.
- Neve, R. L., McPhie, D. L., and Chen, Y. (2000). Alzheimer's disease: a dysruption of the amyloid precursor protein. *Brain Res* **886**, 54-66.
- Niebuhr, E. (1974). Down's syndrome: the possibility of a pathogenic segment on chromosome N°21. *Humangenetik* **21**, 99-101.
- Noh, D. Y., Ahn, S. J., Lee, R. A., Kim, S. W., Park, I. A., and Chae, H. Z. (2001). Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. *Anticancer Res* **21**, 2085-2090.

O

- Oberley, T. D., Verwiebe, E., Zhong, W., Kang, S. W., and Rhee, S. G. (2001). Localization of the thioredoxin system in normal rat kidney. *Free Rad Biol Med* **30**, 412-424.
- Oppermann, M., Cols, N., Nyman, T., Helin, J., Saarinen, J., Byman, I., Toran, N., Alaiya, A. A., Bergman, T., Kalkkinen, N., Gonzalez, D. R., and Jornvall, H. (2000). Identification of foetal brain proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry - Comparison of samples from individuals with or without chromosome 21 trisomy. *Eur J Biochem* **267**, 4713-4719.
- Oyama, F., Cairns, N. J., Shimada, H., Oyama, R., Titani, K., and Ihara, Y. (1994). Down's Syndrome: up-regulation of beta-amyloid protein precursor and tau mRNAs and their defective coordination. *J Neurochem* **62**, 1062-1066.

P

- Pahl, P., Berger, R., Hart, I., Chae, H. Z., Rhee, S. G., and Patterson, D. (1995). Localization of TDPX1, a human homologue of the yeast thioredoxin-dependent peroxide reductase gene (TPX), to chromosome 13q12. *Genomics* **26**, 602-606.
- Park, S.-H., Chung, Y. M., Lee, Y.-S., Kim, H. J., Kim, J. S., Chae, H. Z., and Yoo, Y. D. (2000). Antisense of human peroxiredoxin II enhances radiation-induced cell death. *Clin Cancer Res* **6**, 4915-4920.
- Parkes, T. L., Elia, A. J., Dickinson, D., Hilliker, A. J., Phillips, J. P., and Boulianne, G. L. (1998). Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nat Genet* **19**, 171-174.
- Peled-Kamar, M., Degani, H., Bendel, P., Margalit, R., and Groner, Y. (1998). Altered brain glucose metabolism in transgenic-PFKL mice with elevated L-phosphofuctokinase: in vivo NMR studies. *Brain Res* **810**, 138-145.
- Peled-Kamar, M., Lotem, J., Okon, E., Sachs, L., and Groner, Y. (1995). Thymic abnormalities and enhanced apoptosis of thymocytes and bone marrow cells in transgenic mice overexpressing Cu/Zn-superoxide dismutase: implications for Down Syndrome. *EMBO J* **14**, 4985-4993.
- Penkov, D., Tanaka, S., Di, R.G., Berthelsen, J., Blasi, F. and Ramirez, F. (2000) Cooperative interactions between PBX, PREP, and HOX proteins modulate the activity of the alpha 2(V) collagen (COL5A2) promoter. *J Biol Chem* **275**, 16681-16689.

- Pletcher, M. T., Wiltshire, T., Cabin, D. E., Villanueva, M., and Reeves, R. H. (2001). Use of comparative physical and sequence mapping to annotate mouse chromosome 16 and human chromosome 21. *Genomics* **74**, 45-54.
- Polani, P. E., Briggs, J. H., Ford, C. E., Clark, C. M., and Berg, J. M. (1960). A mongol child with 46 chromosomes. *Lancet* *i*, 721-724.
- Pritchard, M. A., and Kola, I. (1999). The "gene dosage effect" hypothesis versus "amplified developmental instability" hypothesis in Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* **57**, 293-303.

R

- Reeves, R. H. (2000). Recounting a genetic story. *Nature* **405**, 283-284.
- Reeves, R. H., Baxter, L. L., and Richtsmeier, J. T. (2001). Too much of a good thing mechanisms of gene action in Down Syndrome. *Trends in Genet* **17**, 83-87.
- Reeves, R. H., Irving, N. G., Moran, T. H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S. S., Schmidt, C., Bronson, R. T., and Davisson, M. T. (1995). A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behavioral deficits. *Nature Genet* **11**, 177-184.
- Ross, S. J., Findlay, V. J., Malakasi, P., and Morgan, B. A. (2001). Thioredoxin peroxidase is required for the transcriptional response to oxidative stress in budding yeast. *Mol Biol Cell* **11**, 2631-2642.
- Russo, C., Saido, T. C., DeBusk, L. M., Tabaton, M., Gambetti, P., and Teller, J. K. (1997). Heterogeneity of water-soluble amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. *FEBS Lett* **409**, 411-6.

S

- Sago, H., Carlson, E. J., Smith, D. J., Kilbridge, J., Rubin, E. M., Mobley, W. C., Huang, T. T., and Epstein, C. J. (1998). Ts1Cje, a partial trisomy mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 6256-6261.
- Sago, H., Carlson, E. J., Smith, D. J., Rubin, E. M., Crnic, L. S., Huang, T. T., and Epstein, C.J. (2000). Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatric Res* **48**, 606-613.
- Saito, Y., Oka, A., Mizuguchi, M., Motonaga, K., Mori, Y., Becker, L. E., Arima, K., Miyauchi, J., and Takashima, S. (2000). The developmental and aging changes of Down's syndrome cell adhesion molecule expression in normal Down's syndrome brains. *Acta Neuropathol* **100**, 654-664.
- Sani, E., Hatzistavrou, T., Hertzog, P., Kola, I., and Wolvetang, E. J. (2001). Ets-2 is induced by oxidative stress and sensitizes cells to H₂O₂-induced apoptosis: Implications for Down's syndrome. *Biochem Biophys Res Comm* **287**, 1003-1008.
- Sarafian, T. A., Verity, M. A., Vinters, H. V., Shih, C. C.-Y., Shi, L., Ji, X. D., Dong, L., and Shau, H. (1999). Differential expression of peroxiredoxin subtypes in human brain cell types. *J Neurosci Res* **56**, 206-212.
- Sarafian, T. A., Rajper, N., Grigorian, B., Kim, A., and Shau, H. (1997). Cellular antioxidant properties of human natural killer enhancing factor B. *Free Rad Res* **26**, 281-289.

- Sasagawa, I., Matsuki, S., Suzuki, Y., Iuchi, Y., Tohya, K., Kimura, M., Nakada, T., and Fujii, J. (2001). Possible involvement of the membrane-bound form of peroxiredoxin 4 in acrosome formation during spermiogenesis of rats. *Eur J Biochem* **268**, 3053-3061.
- Sawa, A. (1999). Neuronal cell death in Down's syndrome. *J. Neural Transm Suppl* **57**, 87-98.
- Schaap, F. G., Binas, B., Danneberg, H., van der Vusse, G. J., and Glatz, J. F. C. (1999). Impaired long-chain fatty acid utilization by cardiac myocytes isolated from mice lacking the heart-type fatty acid-binding protein. *Cir Res* **85**, 329-337.
- Schatzmann-Turhani, D., Labudova, O., Yeghiazaryan, K., Rink, H., Hauser, E., Cairns, N., and Lubec, G. (1999). Overexpression of DNase I in brain of patients with Down Syndrome. *J Neural Transm Suppl* **57**, 353-362.
- Schnütgen, F., Bö rchers, T., Müller, T. and Spener, F. (1996) Heterologous expression and characterisation of mouse brain fatty acid binding protein. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **377**, 211-215.
- Seidl, R., Labudova, O., Krapfenbauer, K., Henriksson, W. E., Craft, J., Turani-Schatzmann, D., Achsel, T., Bidmon, B., Pruijn, G. J. M., Cairns, N., and Lubec, G. (2001). Deficient brain snRNP70K in patients with Down syndrome. *Electrophoresis* **22**, 43-48.
- Seo, M. S., Kang, S. W., Kim, K., Baines, I. C., and Lee, T. H. (2000). Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem* **275**, 20346-20354.
- Shapiro, B. L. (1983). Down syndrome--a disruption of homeostasis. *Am J Med Genet* **14**, 241-69.
- Shapiro, B. L. (1994). The environmental basis of Down syndrome phenotype. *Dev Med Child Neurol* **36**, 84-90.
- Shapiro, B. L. (1999). The Down syndrome critical region. *J Neural Transm Suppl* **57**, 41-60.
- Shau, H., Huang, A. C. J., Faris, M., Nazarian, R., Vellis, J. D., and Chen, W. (1998). Thioredoxin Peroxidase (Natural Killer Enhancing Factor) regulation of activator protein-1 function in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* **249**, 683-686.
- Shimizu, F., Watanabe, T. K., Shinomiya, H., Nakamura, Y., and Fujiwara, T. (1997). Isolation and expression of a cDNA for human brain fatty acid-binding protein (B-FABP). *Biochim Biophys Acta* **1354**, 24-28.
- Shinohara, T., Tomizuka, K., Miyabara, S., Takehara, S., Kazuki, Y., Inoue, J., Katoh, M., Nakane, H., Iino, A., Ohguma, A., Ikegami, S., Inokuchi, K., Ishida, I., Reeves, R. H., and Oshimura, M. (2001). Mice containing a human chromosome 21 model behavioral impairment and cardiac anomalies of Down's syndrome. *Hum Mol Genet* **10**, 1163-1175.
- Schreiber, E., Mathias, P., Muller, M.M. and Schaffner, W. (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nuc Acid Res* **17**, 6419.
- Simzar, S., Ellyin, R., Shau, H., and Sarafian, T. A. (2000). Contrasting antioxidant and cytotoxic effects of peroxiredoxin I and II in PC12 and NIH3T3 cells. *Neurochem Res* **25**, 1613-1621.
- Smith, D. J., and Rubin, E. M. (1997). Functional screening and complex traits: human 21q22.2 sequences affecting learning in mice. *Hum Mol Genet* **6**, 1729-33.
- Smith, D. J., Stevens, M. E., Sudanagunta, S. P., Bronson, R. T., Makhinson, M., Watabe, A. M., O'Dell, T. J., Fung, J., Weier, H. U., Cheng, J. F., and Rubin, E. M. (1997). Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2

- in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome [see comments]. *Nature Genet* **16**, 28-36.
- Smith, M. A., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Raina, A. K., and Perry, G. (2000). Oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **1502**, 139-44.
- Stewart, J. M. (2000). The cytoplasmic fatty-acid-binding proteins: thirty years and counting. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1345-59.
- Sumarsono, S. H., Wilson, T. J., Tymms, M. J., Venter, D. J., Corrick, C. M., Kola, R., Lahoud, M. H., Papas, T. S., Seth, A., and Kola, I. (1996). Down's syndrome-like skeletal abnormalities in *Ets2* transgenic mice. *Nature* **379**, 534-537.

T

- Tassone, F., Lucas, R., Slavov, D., Kavsan, V., Crnic, L., and Gardiner, K. (1999). Gene expression relevant to Down syndrome: problems and approaches. *J Neural Transm Suppl* **57**, 179-195.
- Turens, J. F. (2001). Increased superoxide dismutase and Down's syndrome. *Med Hypotheses* **56**, 617-619.

V

- Valero, R., Marfany, G., Gil-Benso, R., Ibañez, M. A., López-Pajares, I., Prieto, F., Rullán, G., Sarret, E., and González-Duarte, R. (1999). Molecular characterization of partial chromosome 21 aneuploidies by fluorescent PCR. *J Med Genet* **36**, 694-699.
- Vaarala, M.H., Porvari, K.S., Kyllönen, A.P., Mustone, M.V.J., Lukarinen, O. and Viho, P.T. (1998) Several genes encoding ribosomal proteins are over-expressed in prostate-cancer cell lines: confirmation of L7a and L37 over-expression in prostate-cancer tissue samples. *Int J Cancer* **78**, 27-32.
- Veerkamp, J. H., van Moerkerk, H. T. B., and Zimmerman, A. W. (2000). Effect of fatty acid-binding protein on intermembrane fatty acid transport. Studies on different and mutant proteins. *Eur J Biochem* **267**, 5959-5966.
- Veerkamp, J. H., and Maatman, R. G. (1995). Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: Their structure and genes. *Prog Lipid Res* **34**, 17-52.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1995). Serial Analysis of Gene Expression. *Science* **270**, 484-487.

W

- Waller III, B. R., McQuinn, T., Phelps, A. L., Markwald, R. R., Lo, C. W., Thompson, R. P., and Wessels, A. (2000). Conotruncal anomalies in the trisomy 16 mouse: an immunohistochemical analysis with emphasis on the involvement of the neural crest. *Anatomical Record* **260**, 279-293.
- Warren, A. C., Slaugenhaupt, S. A., Lewis, J. G., Chakravarti, A., and Antonarakis, S. E. (1989). A genetic linkage map of 17 markers on human chromosome 21. *Genomics* **4**, 579-591.
- Watabe, S., Hiroi, T., Yamamoto, Y., Fujioka, Y., Hasegawa, H., Yago, N., and Takahashi, S. Y. (1997). SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. *Eur J Biochem* **249**, 52-60.

- Whitaker-Azmitia, P. M., Wingate, M., Borella, A., Gerlai, R., Roden, J., and Azmitia, E. C. (1997). Transgenic mice overexpressing the neurotrophic factor S-100 β show neuronal cytoskeletal and behavioral signs of altered aging processes: implications for Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Brain Res* **776**, 51-60.
- Willcox, E. R., Burton, Q. L., Naz, S., Riazuddin, S., Smith, T. N., Ploplis, B., Belyantseva, I., Ben-Yosef, T., Liburd, N., Morell, R. J., Kachar, B., Wu, D. K., Griffith, A. J., and Friedman, T. B. (2001). Mutations in the gene encoding thigh junction Claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* **104**, 165-172.

X

- Xu, L. X., Sánchez, R., Sali, A., and Heintz, N. (1996). Ligand specificity of Brain Lipid-Binding Protein. *J Biol Chem* **271**, 24711-24719.

Y

- Yeghiazaryan, K., Turhani, S. D., Labudova, O., Schuller, E., Olson, E. N., Cairns, N., and Lubec, G. (1999). Downregulation of the transcription factor scleraxis in brain of patients with Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* **57**, 305-314.
- Yim, M. B., Chae, H. Z., Rhee, S. G., Chock, P. B., and Stadtman, E. R. (1994). On the protective mechanism of the thiol-specific antioxidant enzyme against the oxidative damage of biomacromolecules. *J Biol Chem* **269**, 1621-1626.
- Yoo, B. C., Fountoulakis, M., Cairns, N., and Lubec, G. (2001a). Changes of voltage-dependent anion-selective channel proteins VDAC1 and VDAC2 brain levels in patients with Alzheimer's disease and Down Syndrome. *Electrophoresis* **22**, 172-179.
- Yoo, B. C., Vlkolinsky, R., E., E., Cairns, N., Fountoulakis, M., and Lubec, G. (2001b). Differential expression of molecular chaperones in brain of patients with Down syndrome. *Electrophoresis* **22**, 1233-1241.

Z

- Zhang, P., Liu, B., Kang, S. W., Seo, M. S., Rhee, S. G., and Obeid, L. M. (1997). Thioredoxin Peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J Biol Chem* **272**, 30615-30618.
- Zimmerman, A. W., and Veerkamp, J. H. (1998). Members of the fatty acid-binding protein family inhibit cell-free protein synthesis. *FEBS Lett* **437**, 183-186.

Abreviatures

cDNA: àcid desoxiribonucleic còpia
 CMV: citomegalovirus
 Ct: cicle llindar de fluorescència
 DD-PCR: *Differential display PCR*
 DHA: àcid docosahexanoic
 DNA: àcid desoxiribonucleic
 DRGE: *dorsal root ganglion and notocord element*
 DS: *Down syndrome*
 DSCR: *Down syndrome critical region*
 DSCS: *dorsal spinal cord silencer*
 EGFP: *enhanced green fluorescent protein*
 EMSA: *electrophoretic mobility shift assay*
 FABP7: *fatty acid binding protein 7*
 FABPs: *cytoplasmic fatty acid binding proteins*
 FALS: *familial amyotrophic lateral sclerosis*
 FISH: *fluorescent in situ hybridization*
 GAPDH: *gliceraldehide 3-phosphosphate dehydrogenase*
 HRE: *hormone responsive element*
 Kb: kilobase
 Mb: megabase
 kD: kilodalton
 MTT: *2-(4.5-dimethylthiazo-1-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
 ORF: *open reading frame, pauta de lectura oberta*
 PBX: *Pre-B-cell leukemia transcription factor*
 PCR: *polymerase chain reaction*
 PKNOX1: *Pbx/knotted homeobox 1*
 POU: factor de transcripció tipus Pit-1/Oct-1/Unc-1
 PRDX2: *peroxiredoxin 2, peroxiredoxina 2*
 PRDXs: *peroxiredoxins, peroxiredoxines*
 PREP1: *Pbx regulating protein 1*
 RGE: *radial glial specific element*
 RNA: àcid ribonucleic
 ROS: *reactive oxygen species*
 RT-PCR: *reverse transcription polymerase chain reaction*
 rtTA: *reverse tetracycline transactivator*
 SAGE: *Serial analysis of gene expression*
 SD: Síndrome de Down
 SNC: sistema nerviós central
 SOD1: *superoxide dismutase 1*
 SSH: *suppression subtractive hybridization, hibridació substractiva supressora*
 TPX: *thioredoxin peroxidase*
 TRX: *thioredoxin, tioredoxina*
 TRE: *tetracycline responsive element*
 YAC: *yeast artificial chromosome*