



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado de Biotecnología

Modelos de toxicidad inducidos por microsatélites CAG y caracterización de dianas terapéuticas en *C. elegans*

Ana Pilar Gómez Escribano

Tesis Doctoral

Diciembre 2020

Supervisor:

Dr. Rafael P. Vázquez Manrique



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



El Dr. Rafael Vázquez Manrique, investigador principal del grupo de Biomedicina Molecular, Celular y Genómica, perteneciente al Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis doctoral titulado “Modelos de toxicidad inducidos por microsatélites CAG y caracterización de dianas terapéuticas en *C. elegans*” que presenta Ana Pilar Gómez Escribano, licenciada en Biotecnología, para optar al título de Doctora por la Universitat Politècnica de València, ha sido realizado en el grupo de Biomedicina Molecular, Celular y Genómica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe bajo su dirección y, que reúne, las condiciones para ser defendido por su autora.

Para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firma el presente certificado en Valencia, a 8 de diciembre de 2020.

Director Tesis

Fdo: Dr. Rafael P. Vázquez Manrique.

A mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis engloba la participación de muchos compañeros, amigos y familiares que han contribuido para que hoy pueda ver la luz.

Mis primeros agradecimientos van dirigidos a mi mentor, **Rafa**. Gracias por haberme brindado la oportunidad de desarrollarme profesionalmente. Has sido mi apoyo científico y mi consuelo en los días más grises, y sobre todo, siempre has confiado por mí, incluso más que yo misma. Me siento muy afortunada de haber recorrido esta carrera de fondo a tu lado. Gracias por ser, además de mi director, un gran amigo y compañero, que siempre ha mirado por mi futuro.

A **Chema**, por confiar en mí y sobre todo, por hacerme sentir partícipe dentro del grupo BMCG. Gracias por preocuparte por cada uno de nosotros y por hacernos sentir como una familia.

A mi grupo, **BCMG**, que me ha prestado apoyo incondicional para poder alcanzar mi meta. En especial, a mis tres “jefas”, **Regina, Teresa y Elena**, mis consejeras en lo científico y en lo personal. Gracias por estar siempre disponibles para mí, por apaciguarme y calmarme antes situaciones complicadas. Por formar parte del rincón de desahogo durante la Tesis y sobre todo, por preocuparos por mí. A **Gema**, por tus consejos y directrices tan sabias, por tu sosiego y calma para afrontar los problemas de esta etapa. A **Cristina**, por estar lejos pero cerca, siempre pendiente y sobre todo, por seguir haciéndonos sentir parte de tu familia científica. A mi **Lolín**, gracias por haberte conocido, y por confiar en mí. Aquel congreso de Sevilla, fue el inicio de nuestra historia, y mira donde hemos llegado. Gracias por ser mi “zipi” en el laboratorio durante este tiempo, por guiarme y quererme como una amiga.

A **miSeti** y **miLore**, por formar un núcleo estable, gracias al cual hemos superado todas las adversidades de la Tesis. Ese tridente que ha estado disponible para prestar apoyo y grandes consejos, siempre desinteresadamente. Sois mis amigas, y no podría haber tenido mejores compañeras de batalla. Gracias por aguantarme, que entiendo que a veces era muy complicado, sobre todo en los días de “rombo rojo”. Gracias por ser mi empuje cuando estaba

Agradecimientos

desanimada y por pensar por mí, cuando me obcecaba. El final de la Tesis ha sido duro sin vuestra compañía, pero a pesar de la lejanía, siempre estabais ahí, a mi lado. Gracias, Gracias y Gracias.

A todos los profesionales que me han orientado y prestado su ayuda desde que empecé mi andadura, **Nuria, Ibo, Ada, Julián y Anna**.

A mi equipo de flow caribeño, **Carla, Laura, Víctor y Rodri**, con el que empecé todo en el IBV. Gracias por esas noches que rompíamos la monotonía del labo, y que eran combustible para continuar. En especial, a **Carla**, por ser mi imagen científica y por valorarme y quererme tanto. Gracias por tus críticas constructivas, por tu paciencia, por tu tiempo y sobre todo, gracias por ser mi amiga.

A mis Biocuquis, **Paloma, Alba, Laura y Sara**, con las que inicié mi etapa universitaria. Gracias por apoyarme y brindarme la oportunidad de seguir disfrutando de vosotras. Gracias por los viajes, los consejos, las largas charlas, las risas, los lloros, y sobre todo, gracias por luchar por lo que creíamos. En especial a **Paloma**, gracias por ser natural, paciente y comprensiva conmigo, aun cuando era difícil. Gracias por ser mi amiga de siempre, de ahora, y de mañana.

A mi orgullo, **ConBioPreVal**. Gracias por darme la oportunidad de ser pionera, y dejar huella en este bonito proyecto. Gracias por haberme permitido saborear el logro de cumplir un sueño. En especial a **Amaya, Javi, Carmen, Jorge**, gracias por ser tan top! Y tan profesionales!

Y no me olvido de mis hermanas científicas, mis grandes amigas, con las que tantas veces he discutido de ciencia. A **Estela**, gracias por escucharme y apoyarme durante este camino tan turbulento. A pesar de la distancia, te he sentido siempre muy cerca, y siento que nuestra amistad cada vez está más consolidada. A **Steffy**, por ser mi energía y buen rollo. Gracias por sacarme siempre una sonrisa y entenderme cuando pocos lo hacían. Gracias a las dos por ser mi consuelo y mi motor. Gracias, amigas.

En general quería agradecer a todos mis **amigos** que, de un modo u otro, siempre me han ayuda a evadirme de la “vida científica” y a disfrutar de los pequeños detalles.

Gracias a **mi familia**. En especial, todo este esfuerzo se lo quiero enormemente agradecer a **mis padres**. Los que más han confiando en mí desde el primer momento que abrí los ojos. Gracias por haberme brindado todas las facilidades que han permitido que hoy pueda ser lo que soy. Gracias por acompañarme en este camino, y valorar mi trabajo, y sobre todo, aguantarme. A mis **hermanos**, gracias por teneros. A **Alejandro**, por ser tan paciente y considerado conmigo. A **Jesús Ángel**, gracias por ser parte de mí, y haberme querido tanto. Tú eres mi luz. A **mis abuelos**, gracias por sentirnos orgullosos de mí. En especial, a mi segunda madre, **mi abuela Sacramento**, a la que añoro, y se que donde esté, siempre me acompañará. A mi **chacha Marga**, gracias por ser la alegría de la huerta para todos nosotros. A **Javi**, mi compañero de vida, que ha aguantado carros y carretas. Gracias por ser comprensivo, tolerante y darme la oportunidad de evadirme de mis problemas y frustraciones. Gracias por haber aprendido a entenderme y sobre todo, gracias por formar parte de mi vida.

Y para terminar, quiero agradecer todo este trabajo a las personas que son el motor de arranque de todos nuestros logros. Gracias a **Pacientes** y **familiares** por haber contribuído enormemente en esta historia. Gracias en especial a **Mercedes** y **Ana**, por creer en nosotros y estar dispuestas siempre para cualquier necesidad. Gracias por enseñarme la parte dura de la enfermedad y mostrarme lo importante que es nuestro trabajo. Gracias por remar juntos, ya que sin vosotros nada de esto sería posible.

RESUMEN

RESUMEN

El equilibrio de la homeostasis de proteínas es esencial para asegurar la funcionalidad celular. Diferentes procesos celulares controlan el correcto plegamiento de las proteínas y su eliminación, en caso de que así se requiera, para mantener la proteostasis celular. La expresión de proteínas propensas a plegarse mal, y que por ello tienden a colapsar entre ellas, induce la formación de agregados tóxicos. La presencia de estos agregados altera el correcto funcionamiento de estos sistemas de control, lo que conduce a un desequilibrio de la homeostasis de proteínas, y por consiguiente a una afectación patológica. Varias enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington (EH), Parkinson, Alzheimer, Esclerosis Lateral Amiotrófica, entre otras, tienen en común esta marca patológica molecular a pesar de su origen molecular diferencial. Especialmente, la EH pertenece a un grupo de patologías producidas por proteínas que contienen expansiones de poliQs, que hacen que estos péptidos sean propensos a la agregación, y causen los problemas que hemos descrito. Además de la EH, se incluyen varias ataxias espinocerebelosas 1, 2, 3, 6, 7 y 17, la atrofia muscular bulbar y espinal y la atrofia dentatorubro-pálidoluisiana. Estas nueve patologías son promovidas por largas expansiones CAG en regiones codificantes de cada gen causante de la enfermedad. A pesar de que estas enfermedades son genéticas, y se conoce su causa molecular, se cree que la presencia de variantes alélicas en otros genes modificadores puede exacerbar o ralentizar la agregación de proteínas con poliQs. Por tanto, la identificación de estos genes permitirá profundizar en los mecanismos moduladores de la dinámica de agregación de poliQs. Pero, además, cuando estos modificadores son proteínas cuya actividad es modulable por fármacos, nos permite encontrar dianas terapéuticas frente a la toxicidad de poliQs.

Además de las proteínas con poliQs, también es ampliamente conocido que el ARN que las codifica tiene carácter patogénico. Por tanto, es importante considerar esta fuente de toxicidad para desarrollar estrategias más focalizadas y específicas. En este trabajo hemos desarrollado modelos, empleando *Caenorhabditis elegans*, en los que existe estrés inducido por transcritos que contienen CAG expandidos, en células musculares y en dos tipos neuronales diferentes. Estos modelos muestran signos indirectos de que están expresando

transcritos patogénicos, puesto que los tejidos diana revelan una funcionalidad alterada. Usamos uno de estos modelos, que perturba la función de las neuronas GABAérgicas del gusano, para realizar un cribado de 85 compuestos farmacológicos, que nos llevó a identificar cuatro compuestos que reducían los defectos motores en estos animales. Además de poliQs y ARN que contiene expansiones CAG está reconocido, en este tipo de patologías, que se producen péptidos derivados de una traducción no canónica, conocida como traducción RAN (del inglés *Repeat Associated Non-ATG translation*). En relación a esto, hemos profundizado en la identificación y modelización de estos péptidos en *C. elegans* mediante la expresión constitutiva y específica de tejido, de expansiones CAG fusionadas a proteínas fluorescentes para su detección *in vivo*.

Además de generar modelos en *C. elegans*, para estudiar la toxicidad del ARN con expansiones de CAG, hemos empleado modelos desarrollados por otros autores, para caracterizar potenciales dianas terapéuticas, como AMPK. Recientemente, se ha publicado que el enzima AMPK tiene un papel protector frente a la toxicidad por poliQs. Respecto a esto, es especialmente útil que AMPK sea susceptible de ser activado por varios fármacos. Se sabe que esta enzima puede ser activada de forma sinérgica empleando más de un activador a la vez. Sin embargo, algunas sustancias activadoras, como la metformina o el salicilato, son sustancias pleiotrópicas, pudiendo activar dianas no deseadas. Por tanto, en el segundo capítulo de esta tesis hemos caracterizado la activación de AMPK, mediante metformina y salicilato, para reducir el estrés por agregados de poliQs. Con este abordaje conseguimos activar AMPK, empleando cantidades muy pequeñas de ambos fármacos, con lo que podríamos evitar que otras dianas resulten activadas y que produzcan efectos adversos. También diseccionamos el papel de las subunidades de AMPK que resultan esenciales en esta activación. Por último, hemos demostrado que este tratamiento sinérgico podría ser empleado para reducir la toxicidad inducida por otras proteínas tóxicas, como la α -sinucleína implicada en la enfermedad de Parkinson.

Por otro lado, hemos caracterizado en *C. elegans* un nuevo modulador de la agregación de poliQs, obtenido mediante un cribado de genes por mutagénesis química al azar. Se trata de la variante alélica *vlt10*, en el gen *unc-1*, que produce un codón de parada prematuro, y que genera un aumento de agregación de poliQs musculares. UNC-1 modula la sinapsis eléctrica en *C. elegans*, y por tanto

la falta de función de *unc-1* produce disrupción sináptica, que a su vez induce descoordinación motora de los animales. Nuestros resultados sugieren que la mutación *unc-1(vlt10)* perturba la sinapsis eléctrica entre las neuronas sensoriales IL2 y ASJ, induciendo un exceso de señalización hormonal que requiere la función de la sulfotransferasa SSU-1, cuya expresión está confinada a ASJ. Además, hemos confirmado que la señal hormonal requiere la función de las arilsulfatasas SUL-2 y SUL-3, para producir el fenotipo de agregación potenciada. También hemos demostrado que la diana de esta señal es un receptor nuclear llamado NHR-1. En este mismo capítulo, hemos identificado otra ruta de señalización hormonal, mediada por otro receptor nuclear (DAF-12), que tiene un papel protector, o lo que es lo mismo, antagoniza a NHR-1 para modular la agregación de poliQs. Hemos confirmado que estas rutas mantienen una comunicación cruzada, puesto que la supresión de *nhr-1* restaura los defectos de los mutantes *daf-12*.

Se desconoce qué hormona modula la actividad de NHR-1. Sin embargo es posible conocer los genes que regula este receptor nuclear. Para ello hemos analizado el transcriptoma de gusanos que portan mutaciones en *unc-1* y *nhr-1*. La supresión de *nhr-1* sobre un fondo genético mutante *unc-1* restaura la expresión de algunos de estos genes, implicados en el metabolismo de las grasas (entre muchas otras cosas), lo cual sugiere que NHR-1 podría estar reprimiéndolos. Estos resultados han sido confirmados con estudios de lipidómica donde hemos identificado un perfil lipídico que refleja distinta abundancia de especies grasas, en estos mutantes. Hemos observado que la disrupción de *unc-1* induce la acumulación de lípidos en los gusanos, pero a la vez estos animales contienen menos ácidos grasos totales (monoinsaturados, poliinsaturados y saturados). Además, cuando incubamos a los gusanos con poliQs con ácido oleico, que está en torno a un 40% reducido en los mutantes *unc-1*, este lípido induce una reducción de cuerpos de inclusión. Esto sugiere que las grasas juegan un papel fundamental en la modulación de la agregación de poliQs, y quizás señala posibles dianas terapéuticas contra enfermedades causadas por proteínas propensas a la agregación.

En conjunto, nuestros resultados sugieren nuevas estrategias terapéuticas e identifican nuevas dianas, fácilmente modulables mediante fármacos, para paliar el estrés asociado a ARNs que contienen expansiones de repeticiones CAG y a proteínas con propensión a la agregación.

ABSTRACT

ABSTRACT

The balance of protein homeostasis is essential to ensure cellular functionality. Different cellular processes control the correct folding of proteins, and their elimination when required, to maintain cellular proteostasis. The expression of proteins that are prone to misfolding, and therefore tend to collapse between them, induces the formation of toxic aggregates. The presence of these aggregates alters the correct functioning of these control systems, which leads to an imbalance in protein homeostasis and pathological consequences. Several neurodegenerative diseases, such as Huntington disease (HD), Parkinson, Alzheimer, Amyotrophic Lateral Sclerosis, among others, have this molecular pathological mark in common despite its differential molecular origin. HD belongs to a group of pathologies produced by proteins that contain expansions of polyglutamines (polyQs), which make these peptides prone to aggregation, and cause the problems described above. In addition to HD, several spinocerebellar ataxias (1, 2, 3, 6, 7 and 17), bulbar and spinal muscular atrophy and the dentatorubral-pallidoluysian atrophy, are part of this family of diseases. These pathologies are promoted by long CAG expansions in coding regions of genes causing the disease. Although these diseases are genetic, and their molecular cause is known, it is believed that the presence of allelic variants in other modifier genes can exacerbate or slow the aggregation of proteins with polyQs. Therefore, the identification of these genes will allow delving into the modulating mechanisms of the polyQ aggregation dynamics. But also, when these modifiers are proteins whose activity is modulated by drugs, it allows us to find therapeutic targets against the polyQ toxicity.

In addition to proteins with polyQs, it is also widely known that the RNA that encodes them is pathogenic. Therefore, it is important to consider this source of toxicity to develop more targeted and specific strategies. In this work we have developed models, using *Caenorhabditis elegans*, in which stress is produced by transcripts containing expanded CAG, in muscle cells and two different neuronal types. These models showed indirect signs of pathogenic transcript expression since altered functionality was observed in muscular and neuronal tissues. The use of these models, which disturbs the function of the worm's GABAergic neurons, has been used to screen for pharmacological compounds,

which led us to identify four compounds that reduced motor defects in these animals.

In addition to polyQs and RNA that contain CAG expansions, it is well known that this type of pathology produces peptides derived from a non-canonical translation, known as RAN translation (Repeat Associated Non-ATG translation). In this regard, we have delved into the identification and modelling of these peptides in *C. elegans* through the constitutive and tissue-specific expression of CAG expansions fused to fluorescent proteins to investigate them *in vivo*.

In addition to generating models in *C. elegans*, to study RNA toxicity with CAG expansions, we have used models previously generated by other authors to characterize potential therapeutic targets, such as AMPK. Recently, it has been reported that the AMPK enzyme has a protective role against polyQ toxicity. In this regard, it is especially useful that AMPK is susceptible to being activated by various drugs. Also, AMPK can be activated synergistically using more than one activator at the same time. However, some activators, such as metformin or salicylate, are pleiotropic substances and can activate unwanted targets. Therefore, in the second chapter of this thesis, we have characterised the activation of AMPK, using metformin and salicylate, to reduce the stress induced by polyQ aggregates. With this approach, we are able to activate AMPK, using small amounts of both drugs, thereby perhaps preventing possible unwanted targets from being activated. We also dissect the role of some AMPK subunits that are essential in this activation. And finally, we have shown that this synergistic treatment could be used to reduce other sources of toxicity induced by other toxic proteins, such as α -synuclein, which is involved in Parkinson disease.

On the other hand, we have characterised a new modulator of polyQ aggregation, obtained through gene screening, using random chemical mutagenesis. The allelic variant *vlt10*, in the *unc-1* gene, produces a premature stop codon, which generates increased aggregation of muscle polyQs. UNC-1 modulates the electrical synapse in *C. elegans*, and therefore the lack of function of *unc-1* produces synaptic disruption, which in turn induces motor uncoordination of the animals. Our results suggest that the *unc-1(vlt10)* mutation disturbs the electrical synapse between sensory neurons IL2 and ASJ,

inducing an excess of hormonal signalling that requires the function of the sulfotransferase SSU-1, whose expression is confined to ASJ. In addition, we have confirmed that the hormonal signal requires the arylsulfatases SUL-2 and SUL-3 function, to produce the enhanced aggregation phenotype. We have also shown that the target of this signal is the nuclear receptor NHR-1. In the same chapter, we have identified another hormonal signalling pathway, mediated by another nuclear receptor (DAF-12), which has a protective role, or what is the same, antagonizes NRH-1 to modulate polyQ aggregation. Since the deletion of *nhr-1* restores the defects of the *daf-12* mutants, our results confirmed the cross-talk between these pathways

It is unknown which hormone modulates the activity of NHR-1. However, it is possible to uncover which genes this nuclear receptor regulates. To find this out, we have analysed the transcriptome of worms that carry mutations in *unc-1* and *nhr-1*. The suppression of *nhr-1* on a mutant *unc-1* background restores the expression of some of these genes, involved in fat metabolism (among many other things), which suggests that NHR-1 could be repressing them. These results have been confirmed with lipidomic studies, where we have identified a lipid profile that reflects the different abundance of lipid species in these mutants. We have observed that the disruption of *unc-1* induces the accumulation of lipids in worms, but at the same time these animals contain less total fatty acids (monounsaturated, polyunsaturated and saturated). Furthermore, when we incubated the worms expressing polyQs with oleic acid, which is around 40 % reduced in the *unc-1* mutants. Oleic acid treatment induced a reduction of polyQ inclusion bodies. Thus, our results suggest that the metabolism of fats play a key role in modulating polyQs aggregation, highlighting potential therapeutic targets against diseases caused by aggregation-prone proteins.

Together, our results suggest new therapeutic strategies and identify new targets, easily modulated by drugs, to alleviate the stress associated with RNAs containing expansions of CAG repeats and proteins with an aggregation propensity.

RESUM

RESUM

L'equilibri de l'homeòstasi de proteïnes és essencial per a assegurar la funcionalitat cel·lular. Diferents processos cel·lulars controlen el correcte plegament de les proteïnes i la seva eliminació en cas que així es requerisca, per mantenir la proteòstasi cel·lular. L'expressió de proteïnes propenses a plegar-se malament, i que a més a més tendeixen col·lapsar entre elles, indueix la formació d'agregats tòxics. La presència d'aquests agregats altera el correcte funcionament dels sistemes de control, cosa que condueix a un desequilibri de l'homeòstasi de proteïnes, i per consegüent a una afectació patològica. Diverses malalties neurodegeneratives, com la malaltia de Huntington (MH), Parkinson, Alzheimer i l'esclerosi lateral amiotròfica, entre altres, tenen en comú aquesta signatura patològica, malgrat el seu diferent origen molecular. Especialment, la MH pertany a un grup de patologies produïdes per proteïnes que contenen expansions de poliQs, que fan que aquests pèptids siguin propensos a l'agregació, i causen els problemes que hem descrit. A més de la MH, s'inclouen diverses atàxies espinocerebel·loses 1, 2, 3, 6, 7 i 17, l'atròfia muscular bulbar i espinal, i l'atròfia dentatorúbica-pàl·lidaluisiana. Aquestes nou patologies són promogudes per llargues expansions de triplets CAG en regions codificants de cada gen causant de la malaltia. Malgrat que aquestes malalties són genètiques i es coneix la seva causa molecular, es creu que la presència de variants al·lèliques en gens modificadors pot incrementar o alentir l'agregació de proteïnes amb poliQs. Per tant, la identificació de gens modificadors permet aprofundir en els mecanismes moduladors de la dinàmica d'agregació de poliQs. Però a més, quan aquests modificadors són proteïnes i la seva activitat és modulable per fàrmacs, ens permet trobar dianes terapèutiques enfront de la toxicitat de poliQs.

A més de les proteïnes amb poliQs, també és àmpliament conegut que l'ARN que les codifica té caràcter patogènic. Per tant, és important considerar aquesta font de toxicitat per a desenvolupar estratègies més focalitzades i específiques. Per tant, hem desenvolupat models, utilitzant *Caenorhabditis elegans*, en els quals es produeix estrés per transcrits que contenen expansions CAG, en cèl·lules musculars i en dos tipus neuronals diferents. Aquests models mostren signes

indirectes que expressen transcrits patogènics, ja que els teixits diana revelen una funcionalitat alterada. Utilitzant aquests models, que alteren la funció de les neurones GABAèrgiques del cuc, hem realitzat un cribratge de 85 compostos farmacològics, que ens va portar a identificar quatre compostos que reduïen els defectes motors en aquests animals.

A més de poliQs i l'ARN que conté expansions de CAG, està reconegut que aquest tipus de patologies es produeixen pèptids derivats d'una traducció no canònica, coneguda com a traducció RAN (de l'anglès *Repeat Associated Non-ATG translation*). En relació amb això, hem aprofundit en la identificació i modelització d'aquests pèptids en *C. elegans* mitjançant l'expressió constitutiva i específica de teixit, d'expansions CAG fusionades a proteïnes fluorescents per a la seva detecció *in vivo*.

A més de generar models en *C. elegans*, per a estudiar la toxicitat de l'ARN amb expansions de CAG, hem emprat models ja generats per altres autors, per a caracteritzar potencials dianes terapèutiques, com AMPK. Recentment, s'ha publicat que l'enzim AMPK té un paper protector enfront de la toxicitat per poliQs. Respecte a això, és especialment útil que AMPK pugui ser activat per diversos fàrmacs. Se sap que aquest enzim pot ser activat de manera sinèrgica emprant més d'un activador simultàniament. No obstant això, alguns activadors, com la metformina o el salicilat, són substàncies pleiotròpiques que poden activar dianes no desitjades. Per tant, en el segon capítol d'aquesta tesi hem caracteritzat l'activació de AMPK, mitjançant metformina i salicilat, per a reduir l'estrés induït per agregats de poliQs. Amb aquest abordatge aconseguim activar AMPK, emprant quantitats reduïdes dels dos fàrmacs, s'evita l'activació de dianes no desitjades. També hem estudiat el paper de les subunitats de AMPK que resulten essencials per la seva activació. I finalment, hem demostrat que aquest tractament sinèrgic podria ser utilitzat per a reduir altres fonts de toxicitat produïda per proteïnes tòxiques com la α -sinucleína, causant de la malaltia de Parkinson.

D'altra banda, hem caracteritzat un nou modulador de l'agregació de poliQs, obtingut mitjançant un cribratge de gens per mutagènesis química a l'atzar. Es tracta de la variant al·lèlica, *vlt10*, en el gen *unc-1*, que produeix un condó de parada prematur, i que genera un augment d'agregació de poliQs musculars. UNC-1 modula la sinapsi elèctrica en *C. elegans*. La falta de funció d'*unc-1*

produeix disrupció sinàptica, que al seu torn, indueix descoordinació motora en els animals. Els nostres resultats suggereixen que la mutació *unc-1(vlt10)* pertorba la sinapsi elèctrica entre les neurones sensorials IL2 i ASJ, induint un excés de senyalització hormonal que requereix la funció de la sulfotransferasa SSU-1, l'expressió de la qual està confinada a ASJ. A més, hem confirmat que el senyal hormonal requereix la funció de les arilsulfatases SUL-2 i SUL-3, per a produir el fenotip d'agregació potenciada. També hem demostrat que la diana d'aquest senyal és un receptor nuclear anomenat NHR-1. En el mateix capítol, hem identificat una altra ruta de senyalització hormonal, mitjançada per un altre receptor nuclear (DAF-12), que té un paper protector, antagonista a NHR-1 per a modular l'agregació de poliQs. Hem confirmat que aquestes rutes mantenen una comunicació creuada, ja que la supressió de *nhr-1* restaura els defectes dels mutants *daf-12*.

Es desconeix l'hormona que modula l'activitat de NHR-1. No obstant això és possible conèixer els gens que regula NHR-1. Per a això hem analitzat el transcriptoma de cucs portadors de mutacions en *unc-1* i *nhr-1*. La supressió de *nhr-1* sobre un fons mutant *unc-1* restaura l'expressió de gens implicats en el metabolisme dels greixos, suggerint que NHR-1 podria estar reprimint-los. Els resultats han sigut confirmats amb estudis de lipidòmica on hem identificat un perfil lipídic que reflecteix diferent abundància d'espècies lipídiques en aquells mutants. Hem observat que la disrupció de *unc-1* indueix l'acumulació de lípids en els cucs, però simultàniament aquests animals contenen menys àcids grassos totals (monoinsaturats, poliinsaturats i saturats). A més, quan incubem els cucs amb poliQs en àcid oleic, que està entorn d'un 40 % reduït en els mutants *unc-1*, aquest lípid indueix una reducció d'agregats. Això suggereix que els greixos juguen un paper fonamental en la modulació de l'agregació de poliQs, i potser assenyalen possibles dianes terapèutiques contra malalties causades per proteïnes propenses a l'agregació.

En conjunt, els nostres resultats suggereixen noves estratègies terapèutiques i identifiquen noves dianes, fàcilment modulables mitjançant fàrmacs, per a pal·liar l'estrès associat a ARNs que contenen expansions de repeticions CAG i a proteïnes amb propensió a l'agregació.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	vii
RESUMEN.....	xvi
Resumen.....	xviii
Abstract.....	xxi
Resum.....	xxvii
TABLA DE CONTENIDOS.....	xxxv
LISTA DE FIGURAS.....	xxxix
LISTA DE TABLAS.....	xliii
ABREVIATURAS.....	xlvi
INTRODUCCIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.1
1. Enfermedades asociadas a expansiones de microsatélites.....	4
2. Enfermedades asociadas a expansiones de poliQs	7
3. Fuentes de toxicidad en enfermedades causadas por poliQs.....	12
3.1 Toxicidad mediada por ARN con tripletes CAG	14
3.2 Proteotoxicidad asociada a poliQs	17
3.3 Péptidos RAN	19
4. Modelos de toxicidad inducida por poliQs en <i>C. elegans</i>	21
5. Moduladores de la agregación de poliQs en <i>C. elegans</i>	24
5.1. AMPK como diana terapéutica contra la EH	25
5.2. Receptores nucleares.....	28
5.2.1 Señalización endocrina en <i>C. elegans</i>	29
5.2.2 Metabolismo lipídico en <i>C. elegans</i>	30
5.2.3 Receptores nucleares como reguladores del metabolismo lipídico	34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	¡Error! Marcador no definido.
MATERIAL Y MÉTODOS	¡Error! Marcador no definido.
1. Metodología	40
1.1 Cultivo y mantenimiento de <i>C. elegans</i>	40
1.2 Lisado de gusanos para obtener ADN genómico.....	40
1.3 Genotipado de mutantes y transgénicos	41

Tabla de contenidos

1.4	Sincronización de gusanos.....	43
1.5	Diseño <i>in silico</i> de construcciones complejas con tripletes CAG.....	43
1.6	Manipulación de secuencias con tripletes CAG para generar construcciones de interés.....	45
1.7	Sistema Gateway para generar vectores de expresión génica en <i>C. elegans</i>	47
1.8	Generación de cepas transgénicas con inserciones en sitios definidos mediante la tecnología MosSCI.....	54
1.9	Generación de cepas transgénicas con múltiples copias no integradas.....	56
1.10	Generación de mutantes de pérdida de función mediante el sistema CRISPR/Cas9.....	57
1.11	Interferencia por ARN (ARNi) inducido por la dieta mediante la cepa de <i>E. coli</i> HT115.....	64
1.12	Generación de construcciones mediante PCR de fusión.....	66
1.13	Análisis de expresión génica por PCR a tiempo real.....	68
1.14	Cuantificación de poliQs mediante Western Blot.....	69
1.15	Cultivo en medio líquido de <i>C. elegans</i>	70
1.16	Tinciones con colorantes X-34 y Oil Red O.....	71
1.17	Tratamiento con ácido oleico.....	72
1.18	Rastreo de compuestos con alto potencial terapéutico en modelos de toxicidad por ARN.....	72
1.19	Análisis del transcriptoma.....	73
1.20	Ensayo de lipidómica.....	74
1.21	Análisis de la respuesta al tacto en gusanos con neuronas mecanosensoriales estresadas por poliQs.....	75
1.22	Recuento de cuerpos de inclusión de poliQs::YFP en células musculares y en neuronas.....	76
1.23	Recuento de agregados α -sinucleína::YFP en células musculares.....	77
1.24	Recuento de agregados de β -amiloide en células musculares.....	77
1.25	Ensayo de motilidad en medio líquido.....	78
1.26	Análisis estadístico.....	78
1.27	Imágenes por microscopía.....	79
1.28	Cribado de genes al azar por mutagénesis química: Aislamiento de la mutación <i>unc-1(vlt10)</i>	79
2.	Materiales y soluciones.....	81
2.1	Medio de crecimiento de los nematodos (NGM).....	81
2.2	Solución M9 1X.....	81
2.3	Tampón de lisis.....	81
2.4	Solución de sincronización.....	81
2.5	Solución de congelación de <i>C. elegans</i>	82
2.6	LB líquido y sólido.....	82
2.7	Solución PBS-T 1X y tampón de bloqueo.....	82
	RESULTADOS.....	84
	<u>Capítulo I.</u> Desarrollo de modelos de toxicidad por ARN con tripletes CAG para la identificación de péptidos RAN y moléculas con potencial terapéutico en <i>C. elegans</i>	86
I.1	Generación de modelos de toxicidad por ARN en <i>C. elegans</i>	87
I.2	La expresión de múltiples copias del transgén con tripletes CAG en neuronas GABAérgicas altera la capacidad motora de forma sustancial.....	92
I.3	Detección de moléculas potenciales frente a la toxicidad asociada a transcritos CAG en neuronas GABAérgicas.....	94
I.4	Investigación de la presencia de péptidos RAN en modelos de expansiones CAG en <i>C. elegans</i>	98

I.5 La expresión de tripletes CAG sin ATG de inicio empleando un promotor ubicuo produce péptidos	98
I.6 Detección <i>in vivo</i> de acúmulos raros en hipodermis de modelos de traducción RAN	102
Capítulo II: La activación sinérgica de AMPK previene la toxicidad inducida por poliglutaminas en <i>C. elegans</i>	106
II.1 La metformina y el salicilato actúan de manera sinérgica para reducir la toxicidad asociada a poliQs.....	107
II.2 La modulación de la agregación de poliQs ejercida por metformina y salicilato requiere de la función catalítica de AMPK.....	115
II.3 El mecanismo de reducción de la agregación de poliQs, mediado por metformina y salicilato, involucra la función de AMPK β 2.....	118
II.4 La neuroprotección de metformina y salicilato es dependiente de AMPK α 2	121
II.5 La autofagia es necesaria para la función protectora de la metformina y el salicilato para modular la agregación de poliQs.....	123
II.6 El tratamiento con metformina y salicilato reduce la agregación de la α -sinucleína y mejora la función motora de estos animales	126
Capítulo III. Diferentes vías de señalización hormonal modulan de manera opuesta la homeostasis de proteínas a través de cambios en el metabolismo lipídico.....	132
III.1 Identificación de <i>unc-1</i> como un modulador de la agregación de poliQs	132
III.2 La supresión de <i>unc-1/STOML3</i> aumenta la formación de cuerpos de inclusión de poliQs.....	137
III.3 <i>unc-1(vlt10)</i> modifica el fenotipo de agregación de proteínas α -sinucleína y β -amiloide	140
III.4 <i>unc-1</i> es requerido en el sistema nervioso para modular la homeostasis de proteínas en células musculares	142
III.5 La sinapsis eléctrica modula selectivamente el patrón de agregación de poliQs.....	147
III.6 La supresión de la sulfotransferasa SSU-1 rescata el fenotipo de agregación asociado a <i>unc-1(vlt10)</i>	151
III.7 <i>unc-1</i> regula la sinapsis eléctrica entre las neuronas IL2 y ASJ para modular la agregación de poliQs en células musculares.....	153
III.8 La actividad de arilsulfatasas modula la dinámica de agregación de poliQs	156
III.9 El receptor nuclear DAF-12 modula la homeostasis de proteínas	158
III.10 El receptor nuclear NHR-1 modula la homeostasis de proteínas	162
III.11 NHR-1 reduce el estrés asociado a mutaciones en <i>unc-1</i>	166
III.12 NHR-1 y DAF-12 modulan la homeostasis de proteínas de forma opuesta	168
III.13 NHR-1 regula genes del metabolismo lipídico para modular la homeostasis de proteínas	170
III.14 El análisis de lipidómica de los mutantes <i>unc-1</i> muestra que acumulan especies grasas	179
DISCUSIÓN.....	184
Capítulo I. Desarrollo de modelos de toxicidad por ARN con tripletes CAG para la identificación de péptidos RAN y moléculas con potencial terapéutico en <i>C. elegans</i>	186
I.1 Modelización de péptidos RAN en <i>C. elegans</i>	187
I.2 Modelización de toxicidad asociada a transcritos CAG.....	188
Capítulo II: La activación sinérgica de AMPK previene la toxicidad inducida por poliglutaminas en <i>C. elegans</i>	192
II.1 Metformina y salicilato actúan sinérgicamente para reducir el estrés inducido por poliQs.....	192
II.2 La protección celular mediada por la sinergia metformina y salicilato es dependiente de AMPK α 2 y AMPK β 2.....	193

Tabla de contenidos

II.3 La activación de la autofagia es requerida para promover el efecto protector mediante el tratamiento sinérgico	196
II.4 La metformina y el salicilato podrían funcionar contra otras enfermedades neurodegenerativas.....	198
Capítulo III. Diferentes vías de señalización hormonal modulan de manera opuesta la homeostasis de proteínas a través de cambios en el metabolismo lipídico.....	200
III.1 La disrupción de determinadas sinapsis eléctricas modula la homeostasis de proteínas	200
III.2 La disrupción de unc-1 perturba la señalización neurohormonal mediada por SSU-1 y NHR-1 y desequilibra la homeostasis de proteínas	203
III.3 NHR-1 induce una remodelación del metabolismo lipídico para promover un desequilibrio de la homeostasis de proteínas	206
III.4 DAF-12 y NHR-1 modulan la agregación de poliQs mediante señales opuestas	212
III.5 Moduladores de la señalización hormonal como dianas terapéuticas	215
CONCLUSIONES	218
ANEXOS.....	224
REFERENCIAS	254

LISTA DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN.....1

Figura 1.1. Enfermedades asociadas a microsatélites.....6

Figura 1.2. Enfermedades causadas por expansiones de poliQs.....9

Figura 1.3. Relación inversamente proporcional entre el número de tripletes CAG y la aparición de los síntomas motores en pacientes de la EH.....11

Figura 1.4. Fuentes de toxicidad en patologías producidas por expansiones de poliQs.....13

Figura 1.5. Estructura de las subunidades del heterotrímero AMPK.....25

Figura 1.6. La metformina induce la activación indirecta de AMPK.....26

Figura 1.7. Fuentes y rutas de síntesis de ácidos grasos de novo en *C. elegans*32

MATERIAL Y MÉTODOS.....39

Figura 2.1. Construcción pUC57- AP1-114CAG::HA::c-Myc::Flag.....46

Figura 2.2. Vector plasmídico pUC57-AP5-ATG-112CAG:: *TdTomato*.....47

Figura 2.3. Sistema de clonación Gateway multiSite Pro para dos insertos.....48

Figura 2.4. Vector pDONR 221.....49

Figura 2.5. Vector pDEST-pHP2.....51

Figura 2.6. Vector pDEST-pCFJ150-R4-R3.....52

Figura 2.7. Sistema de clonación Gateway multiSite Pro para tres insertos.....53

Figura 2.8. Tecnología MosSCI para *C. elegans*.....55

Figura 2.9. Diseño de CRISPR/Cas9 para introducir mutaciones puntuales.....60

Figura 2.10. Diseño de CRISPR/Cas9 para introducir deleciones.....62

Figura 2.11. Vector pL4440.....65

Figura 2.12. Estrategia para fusionar regiones promotoras a genes de interés para inducir expresión de ADNc o para inducir ARNi.....67

Figura 2.13. Representación de las variantes genéticas en el cromosoma X de la cepa RVM10 de *C. elegans*.....80

RESULTADOS.....84

Capítulo I.....86

Figura 3.1.1. Sistema GABAérgico de *C. elegans*.....88

Figura 3.1.2. Construcción de expansiones CAG no traducidas.....89

Figura 3.1.3. Inserciones MosSCI con expansiones CAG expresadas en varios tejidos.....91

Figura 3.1.4. Los transcritos CAG alteran la capacidad motora en *C. elegans*.....93

Lista de Figuras

Figura 3.1.5. Testado de 85 compuestos potenciales de la quimioteca Pfizer sobre el modelo <i>unc-25p::144CAG</i>	96
Figura 3.1.6. Fármacos con efecto neuroprotector frente a transcritos CAG.....	97
Figura 3.1.7. Expresión de TdTomato mediante un transgén con expansiones CAG sin ATG.....	100
Figura 3.1.8. La expresión de tripletes CAG fusionados a TdTomato en hipodermis generan fluorescencia y agregados de proteínas.....	103
Capítulo II.....	106
Figura 3.2.1. Modelos de toxicidad inducida por la expresión de poliQs.....	109
Figura 3.2.2. La metformina y el salicilato actúan de manera sinérgica mejorando la función mecanosensorial.....	111
Figura 3.2.3. La combinación sinérgica metformina y salicilato reduce la agregación de poliglutaminas en células musculares y mejora la motilidad en animales <i>40Q</i>	114
Figura 3.2.4. El efecto sinérgico de la metformina y el salicilato requiere la función de AMPK α	117
Figura 3.2.5. El efecto sinérgico de la metformina y el salicilato requiere la subunidad reguladora AMPK β 2.....	120
Figura 3.2.6. El tratamiento conjunto con metformina y salicilato restaura la función neuronal a través de AMPK α	122
Figura 3.2.7. La activación de la autofagia es requerida para inducir el efecto sinérgico protector de metformina y salicilato sobre la toxicidad inducida por poliQs.....	125
Figura 3.2.8. El tratamiento con metformina y salicilato modifica el patrón de agregación y la capacidad motora de los animales α -sinucleína::YFP.....	128
Capítulo III.....	135
Figura 3.3.1. <i>vlt10</i> potencia la agregación de poliQs en células musculares.....	134
Figura 3.3.2. Estructura y filogenia de proteínas estomatinas en <i>C. elegans</i>	136
Figura 3.3.3. La supresión de <i>unc-1/STOML3</i> aumenta la formación de cuerpos de inclusión de poliQs en células musculares y en neuronas.....	139
Figura 3.3.4. La supresión de UNC-1/STOML3 modifica el fenotipo de agregación de proteínas α -sinucleína y β -amiloide.....	141
Figura 3.3.5. UNC-1 es requerido en el sistema nervioso para modular la homeostasis de proteínas en células musculares.....	144
Figura 3.3.6. La disrupción de <i>unc-1</i> específicamente en el sistema nervioso aumenta el número de cuerpos de inclusión en animales <i>40Q</i>	146
Figura 3.3.7. La perturbación neuronal de componentes de la sinapsis eléctrica potencia la agregación de poliQs en células musculares.....	150

Figura 3.3.8. La disrupción de <i>ssu-1</i> reduce el número de cuerpos de inclusión en los mutantes <i>unc-1</i>	152
Figura 3.3.9. UNC-1 es requerido en neuronas IL2 para modular la homeostasis de proteínas en células musculares.....	155
Figura 3.3.10. La actividad de las arilsulfatasas, <i>sul-2</i> y <i>sul-3</i> , modula la dinámica de agregación de poliQs.....	157
Figura 3.3.11. La activación del receptor DAF-12 reduce la agregación de poliQs e induce neuroprotección.....	160
Figura 3.3.12. El receptor nuclear NHR-1 modula la homeostasis de proteínas en células musculares.....	163
Figura 3.3.13. El tratamiento con metformina reduce el patrón de agregación y mejora la capacidad motora en animales <i>unc-1(vlt10)</i>	165
Figura 3.3.14. La supresión de NHR-1 reduce el estrés en el retículo endoplasmático inducido por <i>unc-1(vlt10)</i>	167
Figura 3.3.15. NHR-1 es epistático sobre DAF-12.....	169
Figura 3.3.16. Perfil de expresión de genes diferencialmente expresados.....	171
Figura 3.3.17. Análisis funcional de los datos transcriptómicos.....	174
Figura 3.3.18. La pérdida de función de <i>unc-1</i> induce una desregulación transcripcional de genes relacionados con la síntesis lipídica <i>de novo</i> en <i>C. elegans</i>	176
Figura 3.3.19. Los mutantes <i>unc-1</i> acumulan un exceso de lípidos totales.....	178
Figura 3.3.20. El análisis de lipidómica muestra perfiles metabolómicos diferentes entre animales <i>unc-1(vlt10)</i> y silvestres.....	180
Figura 3.3.21. El ácido oleico reduce la agregación de poliQs en presencia de NHR-1 funcional.....	181
DISCUSIÓN.....	184
Figura 4.1. Modelos de activación de AMPK en células musculares mediante el tratamiento farmacológico con metformina y salicilato.....	195
Figura 4.2. Modelo de mecanismo de regulación de la síntesis lipídica por NHR-1 mediante la señalización neurohormonal a través de SSU-1	206
Figura 4.3. Modelo de señalización de los NRs DAF-12 y NHR-1 en la homeostasis de proteínas.....	214

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Cepas de *C. elegans* empleadas en este trabajo.....226

Tabla 2.2. Cebadores empleados para le genotipado de mutantes y transgénicos de *C. elegans*231

Tabla 2.3. Componentes de una reacción de PCR de genotipado.....42

Tabla 2.4. Programa de PCR de genotipado.....42

Tabla 2.5. Vectores plasmídicos pDONR generados en este trabajo.....233

Tabla 2.6. Componentes de una reacción de PCR con ADN Taq polimerasa Phusion.....50

Tabla 2.7. Programa de PCR para ADN Taq polimerasa Phusion.....50

Tabla 2.8. Componentes de una reacción BP.....51

Tabla 2.9. Componentes de una reacción LR.....54

Tabla 2.10. Vectores plasmídicos pDEST para expresión génica en *C. elegans*.....235

Tabla 2.11. Componentes de una mezcla de inyección para generar inserciones por MosSCI.....56

Tabla 2.12. Componentes de una mezcla de inyección estándar.....57

Tabla 2.13. Secuencias de ARN guía para introducir mutaciones puntuales y deleciones mediante el sistema CRISPR/Cas9.....58

Tabla 2.14. Mezcla de inyección para generar mutaciones puntuales por CRISPR/Cas9.....63

Tabla 2.15. Mezcla de inyección para generar deleciones por CRISPR/Cas9.....63

Tabla 2.16. Vectores plasmídicos L4440 para ARNi empleados en este trabajo.....64

Tabla 2.17. Cebadores empleados para la obtención de amplicones (#P), (#CS) y (#CA) mediante las reacciones PCR#1.1 y PCR#1.2.....238

Tabla 2.18. Cebadores empleados para la obtención de construcciones de ADN desnudo obtenidas por PCR de fusión240

Tabla 2.19. Sondas Taqman para PCR cuantitativa empleadas en este trabajo.....68

Tabla 2.20. Componentes para el cultivo de animales en medio líquido en presencia de tratamiento farmacológico, hormonal y químico.....71

Tabla 2.21. Plásmidos empleados en este trabajo.....241

Tabla 2.22. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.....242

Tabla 2.23. Otros cebadores empleados en este trabajo.....242

Tabla 2.24. Colección de 85 compuestos de la libería Pfizer.....243

Tabla 2.25. Reactivos generales empleados en este trabajo.....246

Tabla 2.26. Kits comerciales empleados en este trabajo.....248

Tabla 2.27. Equipos empleados en este trabajo.....248

Tabla 3.3.1. SLPs neuronales e inexas modulan selectivamente la homeostasis de proteínas.....148

ABREVIATURAS

- #CA: cadena antisentido.
 #CS: cadena sentido.
 #P: promotor.
 3'UTR: *untranslated region*; región reguladora 3' no traducida.
 5'UTR: *untranslated region*; región reguladora 5' no traducida.
 A: adenina.
 ADN: Ácido desoxirribonucleico.
 ADNc: ADN complementario.
 ALS/FTD: *amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia*; esclerosis lateral amiotrófica y demencia frontotemporal.
 AMP: Adenosín monofostato.
 AMPK: Proteína quinasa dependiente de AMP.
 AMPK α : subunidad alpha del complejo enzimático AMPK.
 AMPK β : subunidad beta del complejo enzimático AMPK.
 AMPK γ : subunidad gamma del complejo enzimático AMPK.
 Amp^R: gen que codifica la β -lactamasa, que induce resistencia a ampicilina.
 ANOVA: Test estadístico de análisis de la varianza.
 AR: gen que codifica el receptor de andrógeno.
 ARN-Seq: Secuenciación del ARN.
 ARN: Ácido ribonucleico.
 ARNg: ARN guía.
 ARNi: interferencia por ARN.
 ARNm: ARN mensajero.
 ARNr: ARN ribosómico.
 AT1R: receptor de angiotensina II tipo 1.
 ATN1: gen atrofin 1.
 ATP: Adenosín trifosfato.
 ATXN1: gen ataxin 1.
 ATXN2: gen ataxin 2.
 ATXN3: gen ataxin 3.
 ATXN7: gen ataxin 7.
 ATXN8: gen ataxin 8.
 C: citosina.
 C. *elegans*: *Caenorhabditis elegans*.
 CACNA1A: *Calcium Voltage-Gated Channel subunit alpha1 A*. Gen de la subunidad alfa 1 A del canal de voltaje de calcio.
 Cas9: nucleasa Cas9.
 CBM: *Carbohydrate-binding module*. Dominio de unión a carbohidratos.
 ccdB: gen que induce la muerte de bacterias susceptibles.
 CDKs: *Cyclin-dependent kinases*. Quinasas dependientes de ciclinas.
 CGC: Caenorhabditis Genetics Center.
 Cm^R: gen que codifica la cloranfenicol acetil transferasa, que induce resistencia a cloranfenicol.
 CNAG: Centro Nacional de Análisis Genómico.
 COMAV: Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana.
 CRG: Centro de Regulación Genómica.
 CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*. Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas.
 D. *melanogaster*: *Drosophila melanogaster*.
 DBD: *DNA-binding domain*. Dominio de unión a ADN. DM1: *myotonic dystrophy type 1*. Distrofia miotónica tipo 1.
 DM2: *myotonic dystrophy type 2*. Distrofia miotónica tipo 2.
 DMPK: *DM1 protein kinase*. Proteína quinasa de DM1.
 DRPLA: *dentatorubral-pallidoluysian atrophy*. Atrofia dentatorubro-páldidoluisiana.
 E. coli: *Escherichia coli*.
 ECL: sustrato altamente sensible no reactivo para HRP.
 EH: enfermedad de Huntington.
 EMS: *Ethyl methanesulfonate*. Metanosulfonato de etilo.
 EPMI: *progressive myoclonus epilepsy type 1*. Epilepsia mioclónica progresiva tipo 1 o de Unverricht-Lundborg.
 FECD: *Fuchs endothelial corneal dystrophy*. Distrofia corneal endotelial de Fuchs.

Abreviaturas

FMR1: *Fragile X mental retardation 1 gene*. Gen del retraso mental asociado al X frágil 1.

FMRpoliG: péptido enriquecido en poliglicinas dentro del contexto del gen *FMR1*.

FRDA: *Friedreich ataxia*. Ataxia de Friedreich.

FXS: *Fragile X syndrome*. Síndrome asociado al X frágil.

EXTAS: *fragile X – associated tremor/ataxia syndrome*. Síndrome de temblor/ataxia asociado a X frágil.

G: guanina.

GAPDH: *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

HD: *Huntington disease*. Enfermedad de Huntington.

HDL2: *Huntington disease-like 2*. Enfermedad de Huntington-like 2.

HIF1 α : factor inducible por hipoxia 1 α .

HNF4 α : factor nuclear 4 α de hepatocitos.

HRP: Peroxidasa de rábano.

Hsp70: *Heat-shock protein 70* (chaperona molecular).

HTT: gen que codifica la proteína huntingtina en humanos.

Htt: proteína huntingtina en humanos y ratón.

IC: Intervalo de confianza.

iPSCs: *induced Pluripotent stem cells*. Células madre pluripotentes inducidas.

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

Kan^R: gen que codifica la neomicina fototransferasa II, que induce resistencia a kanamicina.

LAB β 2: *Laminina-Associated polypeptide 2beta*. Polipéptido 2 beta asociado a laminina.

LB: *Luria Bertani*.

LBD: *Ligand-binding domain*. Dominio de unión a ligando.

LD: *Lipid droplet*. Depósitos lipídicos.

MBL-1: Proteína *Muscleblind* de *C. elegans*.

MBNL1: *Muscleblind-like 1*.

mHtt: huntingtina mutante.

MosSCI: *Mos-1 Single Copy Insertion*. Inserciones de copia única mediadas por la movilización de transposones miniMos.

MUFAs: *Monounsaturated Fatty Acids*. Ácidos grasos monoinsaturados.

NGM: *Nematode Growth Medium*. Medio de crecimiento de nematodos.

NHR: *Nuclear Hormone Receptor*. Receptores nucleares hormonales.

NR: *Nuclear receptor*. Receptor nuclear.

ns: no estadísticamente significativo.

OEA: lípido oleoiletanolamina.

OPMD: *oculopharyngeal muscular dystrophy*. Distrofia muscular oculofaríngea.

OR: *Odds Ratio*. Razón de probabilidades relativa.

PBP: proteína de unión a penicilina.

PBS-T: Tampón fosfato salino suplementado con detergente Tween 20.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

pDEST: vector plasmídico de destino.

PDGFR: *platelet-derived growth factor receptor*. Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

pDONR: vector plasmídico donador.

PKR: proteína quinasa dependiente de ARN.

PoliAs: polialaninas.

PoliCs: policisteínas.

PoliLs: polileucinas.

PoliQs: poliglutaminas.

PoliSs: poliserinas.

Prof: *Professor*.

PUFAs: *Polyunsaturated Fatty Acids*. Ácidos grasos poliinsaturados.

Q: glutamina.

RAR: *Retinoid Acid Receptor*. Receptor de ácido retinoico.

RT-qPCR: retrotranscripción reversa y PCR a tiempo real.

RXR: *Retinoid X Receptor*. Receptor X retinoide.

SBMA: *Spinal-bulbar muscular atrophy*.

Atrofia muscular bulbar y espinal.

SCA1: *spinocerebellar ataxia type 1*. Ataxia espinocerebelosa tipo 1.

SCA10: *spinocerebellar ataxia type 10*. Ataxia espinocerebelosa tipo 10.

SCA12: *spinocerebellar ataxia type 12*. Ataxia espinocerebelosa tipo 12.

SCA17: *spinocerebellar ataxia type 17*. Ataxia espinocerebelosa tipo 17.

SCA2: *spinocerebellar ataxia type 2*. Ataxia espinocerebelosa tipo 2.

SCA3: *spinocerebellar ataxia type 3*. Ataxia espinocerebelosa tipo 3.

SCA31: *spinocerebellar ataxia type 31*. Ataxia espinocerebelosa tipo 31.

SCA36: *spinocerebellar ataxia type 36*. Ataxia espinocerebelosa tipo 36.

SCA6: *spinocerebellar ataxia type 6*. Ataxia espinocerebelosa tipo 6.

SCA7: *spinocerebellar ataxia type 7*. Ataxia espinocerebelosa tipo 7.

SCA8: *spinocerebellar ataxia type 8*. Ataxia espinocerebelosa tipo 8.

SEM: error estándar.

SFAs: *Saturated Fatty Acids*. Ácidos grasos saturados.

siARN: single interference ARN. Cadena simple de ARN silenciadora.

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*. Polimorfismo de nucleótido único.

SOD1: Superóxido dismutasa 1.

ssODN: *single strand oligonucleotide*. Oligonucleótido largo de ADN de cadena simple.

SSR: *Short Tandem Repeats*; secuencias cortas repetitivas en tándem.

SSU-1: *Stomatin Suppressor Uncooordination*. Enzima sulfotransferasa citosólica de *C. elegans*.

STOML3: *Stomatin like protein 3*. Proteína similar a las estomatinas en mamíferos.

STR: *Simple Sequence Repeats*; secuencias repetitivas simples.

SUL: enzima sulfatasa de mamíferos.

SULT: enzima sulfotransferasa de mamíferos.

T: timina.

TBP: gen que codifica la proteína de unión a caja TATA.

Traducción RAN: *Repeat Associated Non-ATG translation*. Traducción asociada a repeticiones independiente del codón de inicio ATG.

UPS: Sistema Ubiquitina-proteasoma.

YFP: *Yellow Fluorescent Protein*. Proteína fluorescente amarilla.

β-CTD: *C-terminal domain*. Dominio C-terminal.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La generación de proteínas, desde que se produce la traducción hasta que sucede un correcto plegamiento, es un proceso finamente regulado por el cual una proteína adquiere su conformación tridimensional funcional. Cualquier alteración de la secuencia, por una mutación puntual o por expansiones de microsatélites, puede tener consecuencias sobre la estructura tridimensional que pueden desencadenar la pérdida funcional de la proteína. En ocasiones, estas alteraciones pueden producir que dominios hidrofóbicos, que deberían estar en el corazón de la proteína, queden expuestos al medio acuoso y que esta molécula sea propensa a agruparse entre sí, mediante interacciones apolares entre estos dominios expuestos. Esto hace que estas proteínas mutantes sean propensas a agregarse, formando fibrillas que más tarde evolucionan a agregados más grandes, hasta producir cuerpos de inclusión. Debido a su naturaleza propensa a agregarse, son moléculas con una ganancia de función tóxica, puesto que no solo pierden su función, sino que pueden arrastrar en su colapso otras proteínas del ambiente celular, y perturbar seriamente la homeostasis de proteínas. Este escenario es relativamente común en varias enfermedades neurodegenerativas causadas por proteínas que se agregan anómalamente, como la α -sinucleína (enfermedad de Parkinson), β -amiloide (enfermedad de Alzheimer) y huntingtina (enfermedad de Huntington, EH), las cuales alteran la homeostasis de proteínas ocasionando una situación patológica (Ross and Poirier, 2004). Este factor común permite incluir estas patologías en el grupo de enfermedades conocidas como proteinopatías. La toxicidad asociada al fenómeno de agregación es más devastadora en el sistema nervioso, afectando selectivamente a neuronas más vulnerables (Fu et al., 2018). A pesar de las grandes diferencias que conciernen a estas patologías neurodegenerativas, es remarcable que todas ellas compartan alteraciones en procesos celulares comunes, como la transcripción, actividad mitocondrial, señalización sináptica y vías de control de calidad de las proteínas (sistema proteasoma y autofagia), entre otras (Arneson et al., 2018).

En este proyecto de tesis hemos profundizado en la identificación de moduladores de la agregación de proteínas con poliglutaminas (poliQs), codificadas por las mutaciones asociadas a expansiones de tripletes CAG. La detección de genes que codifican proteínas reguladoras de agregación de poliQs, es muy útil para descubrir dianas terapéuticas potenciales contra enfermedades causadas por este tipo de proteínas. Más aún, estas estrategias podrían ser relevantes en algunas de las nueve patologías causadas por expansiones de poliQs, entre las que se incluye la enfermedad de Huntington. Esto, además, podría funcionar en otras patologías más prevalentes como Parkinson y Alzheimer, que también presentan agregados de proteínas tóxicas en diferentes tipos neuronales (Capítulos II y III).

A pesar de que la proteotoxicidad ha sido la causa más estudiada de enfermedades asociadas a poliQs, se ha sugerido por varios autores (Bañez-Coronel et al., 2015; Mykowska et al., 2011) que existen otras fuentes de toxicidad, en los genes mutantes causantes de la enfermedad. Por ejemplo, los ARN mensajeros que portan estas expansiones de tripletes que codifican las poliQs son tóxicas *per se* (Mykowska et al., 2011). Además, por la denominada traducción RAN (vea capítulo #3 – Fuentes de toxicidad causadas por poliQs), se producen otros péptidos derivados de pautas de lectura diferentes (Fischer and Krzyzosiak, 2013; Nguyen et al., 2019), que también resultan tóxicos. Por tanto, el escenario molecular en el que se enmarcan estas patologías es extremadamente complejo. Por ese motivo, además de profundizar en los mecanismos que modulan la dinámica de agregación de poliQs, hemos investigado los otros dos potenciales focos de toxicidad. Para ello, hemos creado modelos animales en los que la proteotoxicidad asociada a poliQs no está presente. Con ello podemos profundizar en los mecanismos que inducen la toxicidad mediada por ARN y, además, investigar la presencia de péptidos fuera de pauta en modelos transgénicos de *C. elegans* (Capítulo I).

1. Enfermedades asociadas a expansiones de microsatélites

Los microsatélites son definidos como secuencias cortas repetitivas en tándem (STR; del inglés *Short Tandem Repeats*) o simples (SSR; del inglés *Simple Sequence Repeats*) que, generalmente, se encuentran distribuidas en regiones no codificantes, aunque también pueden estar presentes en exones (Jasinska and Krzyzosiak, 2004). Además, son diferentes entre individuos, lo que ha permitido

el uso extendido de los microsatélites como marcadores moleculares polimórficos desde finales de los años 80 del pasado siglo (Tautz, 1989). Además, una peculiaridad de estas secuencias repetitivas es que son sitios potenciales de mutaciones debido a la inestabilidad intrínseca de las mismas, sobre todo, durante la replicación y reparación del ADN, lo que propicia que puedan aumentar su número de copias hasta alcanzar longitudes patológicas (Mirkin, 2007). Este fenómeno desencadena la aparición de una gran variedad de enfermedades humanas de carácter neurológico y neuromuscular, como la EH, la distrofia miotónica tipo 1 (DM1; del inglés *myotonic dystrophy type 1*) o la ataxia espinocerebelosa tipo 8 (SCA8; del inglés *spinocerebellar ataxia type 8*), entre otros ejemplos (**Figura 1.1**).

La EH está causada por la presencia de una expansión de 36 copias o más del triplete CAG (que codifica glutamina, Q) en el exón 1 del gen *HTT* que codifica la proteína huntingtina (Htt), que le otorga una ganancia de función tóxica a la proteína (G. Vonsattel and DiFiglia, 1998). La presencia anómala de largas repeticiones en tándem no solamente puede localizarse en zona codificante, sino que también es común en zona no codificante, como ocurre en la DM1, aunque en estos casos es más común que la expansión alcance cientos y miles de copias (**Figura 1.1**). Por ejemplo, la expansión del triplete CTG localizado (50 – 3000 copias) en la región reguladora 3'UTR del gen *DMPK* otorga una ganancia tóxica de función al ARN que secuestra proteínas de unión a ARN (como factores de ajuste alternativo; *Muscleblind-like 1*), las cuales pierden su función (Brook et al., 1992). Sin embargo, la presencia de expansiones repetitivas anormalmente largas en regiones no codificantes, en ciertos casos, no está claro que produzcan transcritos con capacidad patogénica. Por ejemplo, esto ha sido recientemente observado en el síndrome de temblor/ataxia asociado al X frágil (FXTAS; del inglés *fragile X-associated tremor/ataxia syndrome*) (Sellier et al., 2017) (**Figura 1.1**).

Introducción

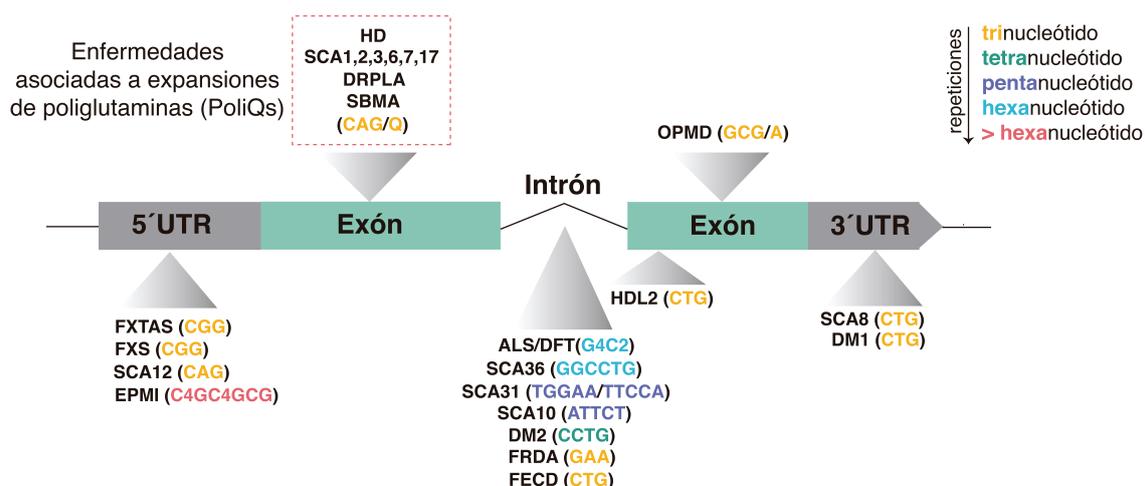


Figura 1.1. Enfermedades asociadas a expansiones de microsatélites. Las expansiones repetitivas son variables en cuanto al número de repeticiones (trinucleótido, tetranucleótido, pentanucleótido, etc.) y su localización genómica (regiones reguladoras, exones, intrones, etc.). Las expansiones más largas suelen localizarse en regiones no codificantes y pueden dificultar la expresión de genes, como en el caso de la ataxia de Friedrich (FRDA; del inglés *Friedreich ataxia*). Las repeticiones en zonas codificantes suelen ser restrictivas a tres nucleótidos, puesto que se ha de mantener la pauta de traducción, y en la mayoría de los casos la proteína adquiere una ganancia de función tóxica (p.e. enfermedad de Huntington; HD en el diagrama, por *Huntington disease* del inglés). El esquema resume la gran mayoría de enfermedades asociadas a mutaciones de expansiones repetitivas en diferentes zonas genómicas: **(1) región reguladora 5'**: síndrome de temblor/ataxia asociado a X frágil (FXTAS; del inglés *fragile X – associated tremor/ataxia syndrome*), síndrome X frágil (FXS; del inglés *fragile X syndrome*), ataxia espinocerebelosa tipo 12 (SCA12; del inglés *spinocerebellar ataxia type 12*) y epilepsia mioclónica progresiva tipo 1 (EPMI; del inglés *progressive myoclonus epilepsy type 1*) o epilepsia mioclónica de Unverricht-Lundborg; **(2) exones**: enfermedad de Huntington (HD), ataxia espinocerebelosa tipo 1, 2, 3, 6, 7 y 17 (SCA1, 2, 3, 6, 7 y 17; del inglés *spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3, 6, 7 and 17*), atrofia dentatorubro-pálidoluisiana (DRPLA; del inglés *dentatorubral-pallidolusian atrophy*), atrofia muscular bulbar y espinal (SBMA; del inglés *spinal-bulbar muscular atrophy*), enfermedad de Huntington-like 2 (HDL2; del inglés *Huntington disease-like 2*) y distrofia muscular oculofaríngea (OPMD; del inglés *oculopharyngeal muscular dystrophy*). La expansión CTG que causa HDL2 está localizada dentro de una región de *splicing* variable del exon2A del gen *JPH3* (gen juntofilina); **(3) intrones**: demencia frontotemporal y esclerosis lateral amiotrófica (ALS/FTD; del inglés *amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia*), ataxia espinocerebelosa tipo 10, 31, 36 (SCA10, 31 y 36; del inglés *spinocerebellar ataxia type 10, 31 and 36*), distrofia Miotónica tipo 2 (DM2; del inglés *myotonic dystrophy type 2*), ataxia de Friedrich (FRDA) y distrofia corneal endotelial de Fuchs (FECD; del inglés *Fuchs endothelial corneal dystrophy*); **región reguladora 3'**: ataxia espinocerebelosa tipo 8 (SCA8; del inglés *spinocerebellar ataxia type 8*) y distrofia Miotónica tipo 1 (DM1; del inglés *myotonic dystrophy type 1*). Información obtenida de www.omim.org.

FXTAS está asociada con la presencia de repeticiones CGG en la región reguladora 5'UTR del gen *FMR1*. En contraste con la DM1, Sellier y colaboradores proponen que la presencia de péptidos traducidos fuera de pauta enriquecidos con poliglicinas (poliG) contribuyen a la patogénesis y descartan que el ARN con tripletes CGG sea patogénico (Sellier et al., 2017). En un primer momento, estos péptidos fuera de pauta fueron relacionados con una

traducción no canónica (sin ATG) y asociada a repeticiones (traducción RAN; del inglés *Repeat-Associated Non-ATG translation*) (revisado por Gao y Richter (Gao and Richter, 2017)) cuya primera evidencia fue observada por la Prof. Laura Ranum en un modelo celular de SCA8 inducido por expansiones del triplete CTG en la región 3'UTR del gen *ATXN8* (Zu et al., 2011). En el capítulo #3 de este apartado, profundizaremos en las diferentes vías de patogenicidad relacionadas con el ARN y la traducción RAN para contextualizar todas las fuentes de toxicidad causadas por expansiones de poliQs.

Hasta el momento, hemos relacionado la expansión de tripletes o trinucleótidos con un determinante causal de diferentes enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, las patologías de expansiones de microsatélites engloban enfermedades asociadas a repeticiones compuestas por un número variable de nucleótidos (desde tres nucleótidos hasta seis, o incluso más) (**Figura 1.1**). Normalmente encontramos secuencias con un número repetitivo variable (entre tres y 12 nucleótidos) en zonas no codificantes o regiones reguladoras, mientras que en exones el número se restringe a tres nucleótidos en la mayoría de casos, para mantener la pauta de lectura (**Figura 1.1**). En cuanto al número de copias repetitivas en tándem, las regiones no codificantes contienen expansiones repetitivas entre 10 y 100 veces más largas que aquellas situadas en pautas de lectura abierta (revisado por Paulson (Paulson, 2018)). Además, observamos que las repeticiones idénticas pueden conllevar enfermedades diferentes, como ocurre con el triplete CTG, que produce la DM1 y la SCA8, o el trinucleótido CAG que produce nueve enfermedades de poliQs distintas. Esto remarca la importancia del contexto genómico donde está localizada la expansión repetitiva, en el desarrollo de la patología (**Figura 1.1**). Concretamente, la presencia del triplete CAG expandido en pautas de lectura abierta, induce el desarrollo de nueve patologías no relacionadas clínicamente pero con un desencadenante molecular común, puesto que son enfermedades asociadas a la agregación de poliQs (**Figura 1.1**).

2. Enfermedades asociadas a expansiones de poliQs

El conjunto de patologías causadas por poliQs engloba a la EH, varias ataxias espinocerebelosas (SCA1, 2, 3, 6, 7 y 17; del inglés *spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3, 6, 7 and 17*), la atrofia muscular bulbar y espinal (SBMA; del inglés *Spinal-bulbar muscular atrophy*) y la atrofia dentatorubro-pálidoluisiana (DRPLA; del

inglés *dentatorubral–pallidoluysian atrophy*) (**Figura 1.2**). La expansión del triplete CAG en diferentes contextos genómicos es la única causa de enfermedades asociadas a poliQs, en las cuales la presencia de un alto número de glutaminas ocasiona la pérdida de conformación natural proteica. Ello afecta a su funcionalidad normal y adquiere una nueva función tóxica que induce un proceso de agregación de la proteína que contiene las poliQs. Uno de los ejemplos más estudiados ha sido la EH, donde la mHtt con un exceso de poliQs es propensa a agregarse convirtiéndose en una especie tóxica, acumulándose tanto en el núcleo como el citoplasma, y perturbando la función de proteínas efectoras y procesos celulares.

Todas las enfermedades asociadas a poliQs afectan a una minoría poblacional, considerándose patologías poco frecuentes (raras o minoritarias), siendo la más prevalente la EH (1-10 cada 100.000 individuos en países occidentales) y la menos prevalente la SCA17, estimándose que hay menos de 100 familias afectadas en todo el mundo (revisado en www.orphanet.net, enero 2020). La transmisión a la descendencia de estas patologías sigue una herencia autosómica dominante, excepto en el caso de la SBMA que está ligada al cromosoma X con herencia dominante (Kennedy et al., 1968).

El rango de tripletes CAG que portan los alelos de población sana y enferma varía entre las distintas patologías (**Figura 1.2**). Por ejemplo, en relación a la SCA6, el alelo patogénico puede portar un número de tripletes CAG entre 21 y 33, rango situado dentro de la normalidad en la EH, cuyo umbral mínimo patogénico se alcanza con 36 tripletes CAG o más (**Figura 1.2**). En este contexto patológico, desde 36 tripletes a 39 se considera un rango difuso (penetrancia incompleta), mientras que con un número de CAG igual o superior a 40 repeticiones, la penetrancia es completa. Existe una correlación común en muchas de estas enfermedades entre la longitud de la zona repetitiva de CAGs y la gravedad, o el inicio más o menos temprano de los síntomas, relacionándose con peores pronósticos cuando las expansiones de tripletes CAG son más largas, como ha sido descrito para SCA2, SCA3 y la EH (Giunti, 1998; Maciel et al., 1995; Trottier et al., 1994). En términos generales, la población no afectada por estas mutaciones suele poseer alelos con un número inferior a 30 tripletes CAG para todas las patologías, a excepción de SCA6 (**Figura 1.2**). En base a la literatura, una vez superado el rango de 45 – 50 tripletes CAG prácticamente se alcanza la penetrancia completa para todas las patologías

causadas por poliQs, a excepción de la SCA3/enfermedad de Joseph-Machado (cuyo rango patológico es 60 tripletes CAG, o más) (Kawaguchi et al., 1994) (Figura 1.2).

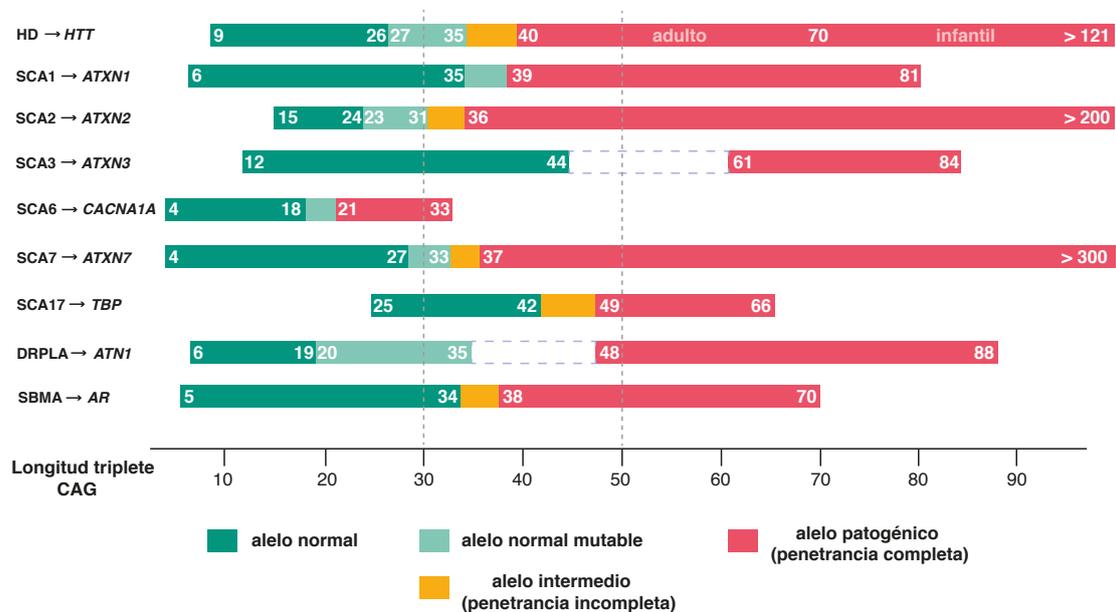


Figura 1.2. Enfermedades causadas por expansiones de poliQs. Se representan los rangos en cuanto al número de tripletes CAG para el alelo normal (verde oscuro), normal con potencial de expansión (verde claro), intermedio o con penetrancia incompleta (naranja) y patológico (rojo) para cada patología asociada. Los rangos contienen el número mínimo y máximo de tripletes que contempla cada grupo de alelos en cada una de las nueve patologías (de izquierda a derecha se indica la enfermedad y el gen responsable): enfermedad de Huntington (HD) – gen de la huntingtina (*HTT*), ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1) – gen ataxin 1 (*ATXN1*), tipo 2 (SCA2) – gen ataxin 2 (*ATXN2*), tipo 3 (SCA3) o enfermedad de Joseph-Machado – gen ataxin 3 (*ATXN3*), tipo 6 (SCA6) – gen *CACNA1A*, tipo 7 (SCA7) – gen ataxin-7 (*ATXN7*), tipo 17 (SCA17) – gen que codifica la proteína de unión a caja TATA (*TBP*), atrofia dentatorubro-pálidoluisiana (DRPLA) – gen atrofina 1 (*ATN1*), atrofia muscular bulbar y espinal (SBMA) – gen que codifica el receptor de andrógeno (*AR*). Un número de tripletes mayor que 30 prácticamente sitúa a todas las patologías dentro del rango normal, o normal con potencial de expandirse al rango mutante, a excepción de la SCA6. El rango difuso de tripletes CAG está marcado con líneas discontinuas verticales entre 30 y 50 tripletes (engloba los rangos para el alelo normal con potencial de expandirse o intermedio), cuyo final viene marcado por el número mínimo de tripletes CAG de un alelo patológico, que es diferente en cada patología. Hay patologías con casos de penetrancia incompleta (HD, SCA2, 7, 17 y SBMA) y otras, como SCA3 y DRPLA donde no se han descrito alelos intermedios. Además, en estas dos últimas patologías no se han descritos casos en un rango de tripletes entre 45 – 60 (SCA3) y 36 – 47 (DRPLA) (señalados con líneas discontinuas horizontales). El número de tripletes que delimitan cada uno de los rangos es aproximado, ya que podemos encontrar una enorme variabilidad que dificulta la estimación precisa de estos rangos. Información obtenida de GeneReviews®.

En la EH, SCA2, SCA7, SCA17 y la SBMA existen casos de penetrancia incompleta, en los que individuos con alelos patogénicos intermedios (dentro de un rango difuso) podrían no desarrollar la enfermedad, pero es altamente probable que la transmitan a la descendencia, o lo que es lo mismo serían algo similar a un “portador asintomático” (**Figura 1.2**). Esto es atribuido a la enorme inestabilidad de las regiones repetitivas, que les otorga cierto dinamismo que provoca que se expandan durante los ciclos de replicación y/o reparación del ADN tanto en células somáticas que no se dividen como en la línea germinal (inestabilidad intergeneracional) (Liu and Leffak, 2012; Mirkin, 2007).

La inestabilidad somática de las expansiones CAG es variable entre tejidos, y especialmente remarcable en algunas regiones del sistema nervioso, lo que compromete en gran medida la función neuronal en estas enfermedades (revisado por Massey and Jones (Massey and Jones, 2018)). Por el contrario, la inestabilidad en la línea germinal queda reflejada en un fenómeno conocido como anticipación génica, característico de estas patologías, por el cual la transmisión de alelos patogénicos de padres a hijos conlleva un aumento en el número de tripletes CAG y por tanto, una aceleración y exacerbación de los síntomas (revisado por Khristich and Mirkin (Khristich and Mirkin, 2020)). Este dinamismo no solamente es característico de rangos patogénicos o intermedios, sino que también puede ocurrir en rangos aparentemente normales (alelo normal con potencial de expandirse) en algunas enfermedades como la SCA2 y la EH, entre otras (Cruz-Mariño et al., 2014; Houge et al., 2013) (**Figura 1.2**). Esto permite la aparición de casos esporádicos en familias sin antecedentes. Por otro lado, se trata de enfermedades monogénicas enormemente influenciadas por factores ambientales, la edad, el envejecimiento y el contexto genómico. En relación a este último y tomando como ejemplo la EH, se ha descrito que hay una correlación inversamente proporcional entre la longitud de la expansión repetitiva CAG y la edad de inicio de los síntomas motores (**Figura 1.3**) (Holmans et al., 2017).

Sin embargo, en los pacientes que tienen alrededor de 40 tripletes puede apreciarse una diferencia de edad de inicio de la enfermedad muy evidente, que fluctúa entre 20 y 80 años (**Figura 1.3**) (Holmans et al., 2017). Esta enorme dispersión sugiere la presencia de genes modificadores que pueden acelerar o ralentizar el inicio de la enfermedad y que conforman nuestro contexto genético, y también una contribución del medio ambiente. Por tanto, podríamos hipotetizar que aquellos pacientes (vea puntos del diagrama; **Figura 1.3**) que

poseen un alelo patogénico de alrededor de 40 tripletes y desarrollan síntomas con una edad posterior a 60 años, estarían protegidos por variantes genéticas contenidas en su genoma. En contraste, aquellos pacientes de la EH que manifiestan síntomas a los 20 años con el mismo número de tripletes estarían sufriendo la presencia de moduladores negativos.

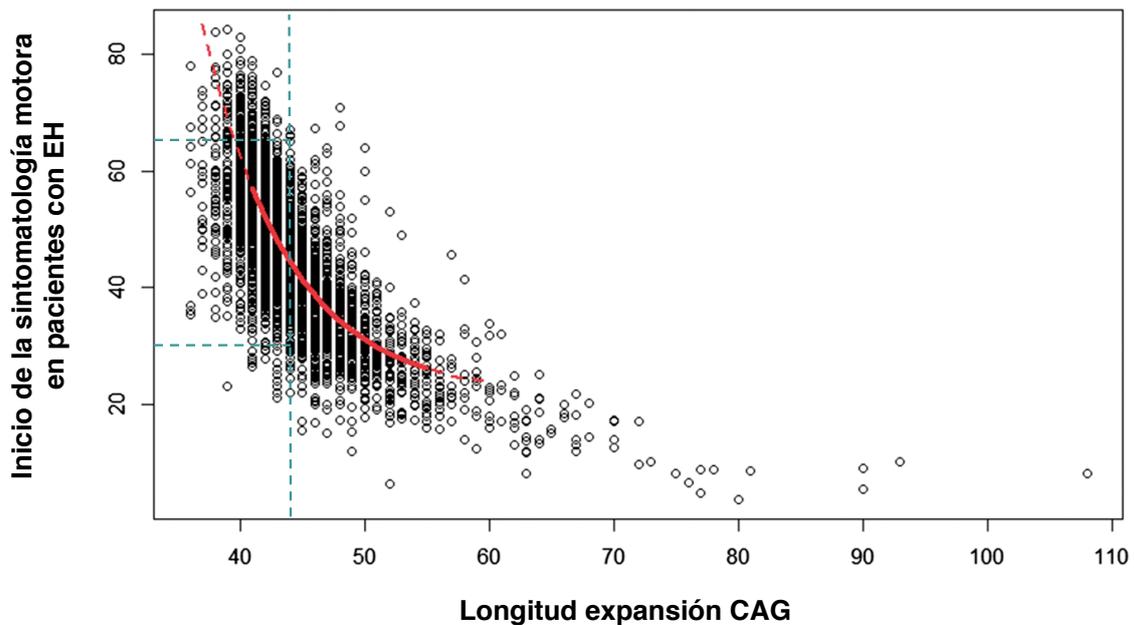


Figura 1.3. Relación inversamente proporcional entre el número de tripletes CAG y la aparición de los síntomas motores en pacientes de la EH. El número de tripletes CAG cercanos al umbral mínimo patológico (36 o más) muestra una enorme variabilidad con respecto al inicio de la sintomatología motora en los pacientes de EH. El rango de datos alrededor de los 40 tripletes (mínimo umbral patogénico con penetrancia completa) muestra la máxima dispersión de la edad de inicio de la enfermedad, y refleja la contribución del contexto genético. Esta representación de los datos refleja la presencia de genes moduladores de la enfermedad que pueden retrasar o acelerar los síntomas en los pacientes de EH. Como ejemplo (línea verde discontinua), pacientes con 44 tripletes pueden desarrollar sintomatología específica con 30 años por lo que presentarían cierta vulnerabilidad, mientras que hay otros que no presentan signos hasta pasados los 60 años, los cuales estarían protegidos por variantes genéticas. Imagen modificada de Holmans *et al.*, (Holmans et al., 2017).

Además de la presencia de genes moduladores, tenemos que insistir en que la dispersión de los datos puede estar fuertemente influenciada por el estilo de vida de los pacientes, y por otras causas medioambientales. Además, se ha descrito recientemente que lo que determina más fielmente el inicio de los síntomas es la expansión de trinucleótidos CAG no interrumpida (Lee et al., 2019). Por ejemplo, en la EH la expansión de tripletes contiene un triplete CAA, que aunque codifica una glutamina, interrumpe la expansión CAG, quedando la secuencia de la siguiente manera: $-CAG_{42}-CAA-CAG$. Respecto a esto, Lee y

colaboradores sugieren que es más correcto, considerar como causantes de la enfermedad exclusivamente los 42 tripletes precedentes al codón CAA, que los 44 que corresponderían a la expansión interrumpida (Lee et al., 2019).

Estas evidencias ponen de manifiesto que el contexto genómico es clave para modular el progreso de la enfermedad. Varios autores han descrito que otros genes, no relacionados directamente con la patogénesis en la EH, pueden modular positiva o negativamente la progresión de la enfermedad. Estos genes modificadores no tienen por qué estar estrictamente relacionados con un desencadenante patogénico, sino que modifican (mejoran o empeoran) fenotipos asociados a mutaciones patogénicas como la expansión de tripletes CAG. Aun así, la pérdida de función de estos genes modificadores, en ciertos casos, puede conllevar también alteraciones en el fenotipo no relacionadas directamente con el fenotipo patogénico sino directamente con la disrupción de este gen.

El aislamiento de modificadores génicos de la enfermedad es importante puesto que, a veces, alguno de ellos codifica proteínas con funciones susceptibles de ser moduladas por fármacos, lo cual supone *de facto* que son potenciales dianas terapéuticas. Además, el conocimiento de estas moléculas podría desvelar nuevos mecanismos moleculares involucrados en la patogénesis.

3. Fuentes de toxicidad en enfermedades causadas por poliQs

Tradicionalmente la patogénesis de enfermedades asociadas a poliQs ha sido relacionada con la presencia de agregados de poliQs tóxicos. Sin embargo, varias evidencias señalan que el ARNm que porta largas repeticiones de trinucleótidos CAG es patogénico y afecta directamente a la funcionalidad de un amplio rango de proteínas que regulan el ajuste alternativo y el transporte del ARNm, entre otros procesos (Fiszer and Krzyzosiak, 2013; Nalavade et al., 2013). Por último, en los últimos años, se ha revelado la existencia de péptidos fuera de pauta no funcionales que tienen un carácter tóxico y que aparentemente contribuyen a la progresión de la enfermedad en algunas patologías asociadas a expansiones de tripletes como la EH, SCA8 y DM1, entre otras (Bañez-Coronel et al., 2015; Zu et al., 2011). Estos péptidos, a diferencia de los agregados de poliQs, son sintetizados mediante una traducción que no responde a un inicio canónico regido por el codón ATG y que se produce por la presencia de zonas repetitivas

expandidas, que contribuyen al inicio de la traducción. A este fenómeno se le ha llamado traducción RAN (del inglés *Repeat Associated Non-ATG translation*) (revisado por Nguyen y colaboradores (Nguyen et al., 2019)).

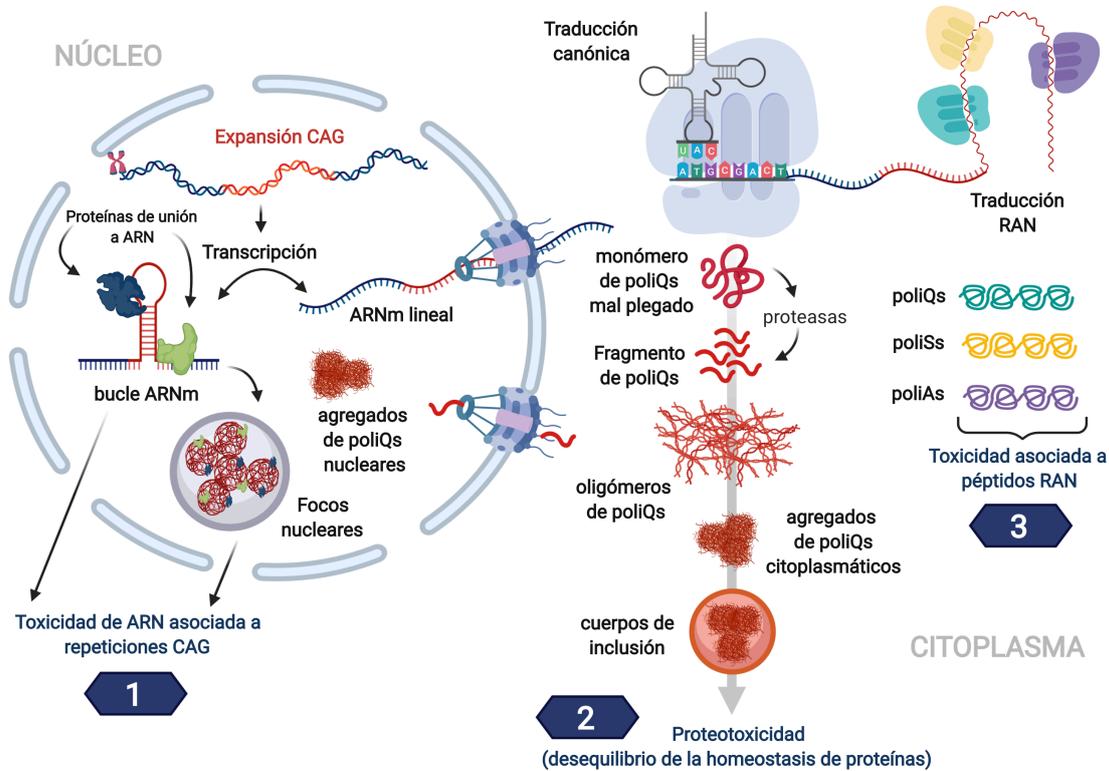


Figura 1.4. Fuentes de toxicidad en patologías producidas por expansiones de poliQs. (1) **Toxicidad asociada al ARN:** Los transcritos sentido y antisentido que contienen repeticiones CAG y CUG forman bucles estables mediante el apareamiento de bases GC. Estos bucles son capaces de secuestrar proteínas de unión a ARN, lo cual inhabilita la función de estas proteínas, y a su vez, impide que parte de los transcritos sean exportados al citoplasma para ser traducidos. Estas estructuras junto con las proteínas que llevan unidas, se acumulan en el núcleo en forma de acúmulos o *foci* nucleares y alteran la transcripción mediante la disfunción de proteínas de ajuste alternativo, de biogénesis del ARNr y activan la maquinaria de silenciamiento génico. (2) **Proteotoxicidad:** Los transcritos que salen del núcleo pueden traducirse convencionalmente por la maquinaria de traducción reglada por el codón de inicio ATG, obteniéndose una proteína que contiene una región extendida de poliQs. El exceso de poliQs ocasiona un mal plegamiento de la proteína que, a su vez, tiende a agregarse sobre sí misma y con otras proteínas no mutantes, que quedan secuestradas en el agregado. Esta proteína mal plegada puede ser diana de proteasas que producen pequeños fragmentos con alta propensión a pegarse y agregarse con otras proteínas, como ha sido descrito en SCA3, SBMA y EH. Los productos de agregación intermedios se conocen como oligómeros y se aglutinan a modo de fibras amiloides. Estos a su vez, se aglutinan más compactadamente formando agregados insolubles, que finalmente, son encapsulados en cuerpos de inclusión. Este proceso de agregación anómalo produce un desequilibrio de la homeostasis de proteínas, perturbando procesos celulares clave para la célula (autofagia, sistema UPS, actividad mitocondrial, transcripción, etc.). (3) **Toxicidad asociada a péptidos derivados de la traducción RAN:** Transcritos sentido (CAG) y antisentido (CUG) pueden ser traducidos eficientemente sin ATG en una totalidad de 6 péptidos diferentes: pauta sentido (+1) CAG (poliQs), (+2) AGC (poliSs), (+3) GCA (poliAs) (reflejadas en la figura) y pauta antisentido (-1) CUG (polileucinas, poliLs), (-2) UGC (policisteínas; poliCs) y (-3) GCU (polialaninas, poliAs) (no reflejadas en la figura). Figura creada mediante la plataforma Biorender.

Esta nueva fuente de toxicidad obliga a reconsiderar el contexto patológico en estas enfermedades para realizar aproximaciones terapéuticas más eficientes y focalizadas. A continuación, detallaremos las alteraciones celulares asociadas a cada fuente de toxicidad (agregados de poliQs, acúmulos nucleares de ARNm, agregados de péptidos fuera de pauta) para tener una visión global del contexto patológico asociado a enfermedades de poliQs.

3.1 Toxicidad mediada por ARN con tripletes CAG

La toxicidad asociada al ARN codificante es definida como la capacidad intrínseca que tienen los transcritos para inducir y/o contribuir en la patogénesis. El ARN con expansiones repetitivas extremadamente largas y ricas en nucleótidos G y C es propenso a formar bucles estables mediante el apareamiento de bases complementarias (**Figura 1.4**). La horquilla de ARN formada atrae proteínas de unión a ARN (factores de ajuste alternativo, transportadores de ARNm, etc.) que finalmente quedan secuestradas en agregados nucleares, o *foci* (**Figura 1.4**). El mecanismo patogénico asociado al ARN está directamente relacionado con la función inhabilitada de proteínas reguladoras que quedan atrapadas en el entramado (Echeverria and Cooper, 2012). La DM1 ha supuesto un modelo idóneo para profundizar en las alteraciones moleculares que están involucradas en esta fuente patogénica (Brook et al., 1992; Taneja et al., 1995; Wheeler and Thornton, 2007). La presencia de expansiones CTG extremadamente largas (entre 50 y 3000 copias en tándem) en la región 3'UTR del gen *DMPK* otorgan una ganancia de toxicidad al ARN (transcritos CUG) en DM1 (Jiang et al., 2004). La retención de proteínas por transcritos CUG consecuentemente induce la acumulación de agregados nucleares (CUG-ARNm-proteína) que impiden un correcto procesamiento del ARNm maduro mediante ajuste alternativo (Jiang et al., 2004). Una de las proteínas atrapadas en el entramado originado por estas estructuras en bucle es un regulador del ajuste alternativo, MBNL1 (del inglés *Muscleblind-like 1*) (Fardaei, 2001; Miller, 2000; Jiang et al., 2004). La pérdida de función de MBNL1 produce defectos en el procesamiento del ARNm que conllevan una desregulación transcripcional y un fallo del remodelamiento del músculo esquelético lo que contribuye en la patogénesis de DM1 (Lin et al., 2006). Estas evidencias reafirmaron el papel patogénico del ARN en DM1, y por tanto, descartaron que la reducción génica del gen *DMPK* debido a la presencia de altas copias del triplete CTG fuese la verdadera causa de la patogénesis.

Este contexto de toxicidad también ha sido observado para transcritos de ARN portadores de expansiones anormalmente largas de tripletes CAG, los cuales pueden formar bucles, aunque menos estables, pero similares a los transcritos CUG (Mykowska et al., 2011). Además, estas moléculas de ARN con tripletes CAG pueden interaccionar también con MBNL1 afectando a su funcionalidad en un contexto patogénico de la EH y SCA3 (Mykowska et al., 2011) (**Figura 1.4**). La primera evidencia que demostró que el ARN, que contiene expansiones de CAG, induce toxicidad fue descrita en estudios sobre la SCA3, empleando *D. melanogaster* como modelo de esta enfermedad (Li et al., 2008). En este modelo se ha observado que expansiones de tripletes CAG, tanto traducidas como no traducidas, promueven la neurodegeneración (Li et al., 2008). Además, observaron que la presencia de tripletes internos CAA, que rompen la estabilidad del bucle que forman las repeticiones CAG, evitan la patogénesis (Li et al., 2008). La toxicidad asociada a tripletes CAG y CUG no traducidos también ha sido demostrada en *C. elegans*. Estos transcritos forman acúmulos nucleares en células musculares, que colocalizan con MBL-1 que es la proteína ortóloga a MBNL1 en *C. elegans* (Wang et al., 2011). Esto induce defectos motores y una menor longevidad de los animales (Wang et al., 2011). A su vez, este patrón de toxicidad fue observado también en un modelo de ratón que expresa 200 CAG en músculo esquelético (Hsu et al., 2011).

La transcripción en dos direcciones de una secuencia concreta, dentro de una región de genes codificantes, es bastante común (Trinklein, 2003). Este hecho viene dado en ocasiones por la existencia de promotores que flanquean esa secuencia y que dirigen la transcripción en ambos sentidos (Trinklein, 2003). De hecho, este fenómeno es muy común en genes que contienen expansiones de tripletes, pero no requiere de secuencias expandidas para producirse, como ocurre con la traducción RAN. Las primeras evidencias fueron descritas en contextos de expansiones de tripletes en zonas no codificantes como DM1, SCA8 y FXS (Cho et al., 2005; Ladd et al., 2007; Moseley et al., 2006). Posteriormente, fueron identificados, en algunas patologías de poliQs como la EH, la SCA2 y la SCA7, transcritos de la hebra antisentido portadores de tripletes CUG (Chung et al., 2011; Li et al., 2016; Sopher et al., 2011). En el caso de la EH, se ha observado que los niveles de expresión de transcritos antisentido son relativamente bajos y no parece que contribuyan en la patogénesis (Chung et al., 2011). En contraste, en modelos celulares de la SCA2, fueron detectados niveles más evidentes de estos

transcritos CUG los cuales se asociaron a la progresión de la patología (Li et al., 2016). Además, en un modelo de ratón de la SCA7, se ha demostrado que se producen transcritos antisentido CUG, que participan en la regulación de la transcripción del gen *ataxin-7* mediante el reclutamiento de modificaciones de histonas que afectan a la región reguladora que promueve la expresión del gen a partir de la secuencia sentido (Sopher et al., 2011). La transcripción antisentido también se ha observado en patologías asociadas a expansiones en zonas codificantes, CTG, como en la enfermedad de Huntington-like 2 produciéndose transcritos antisentido CAG (HDL2) (Wilburn et al., 2011).

Los transcritos que contienen expansiones de CAGs no solamente atraen y sequestran moléculas como MBNL1, sino que también pueden interactuar con otras proteínas como la nucleonina, un componente regulador clave del ARNr (Tsoi et al., 2012; Tsoi and Chan, 2013). Esta interacción aberrante reduce los niveles de ARNr y por tanto, afecta al ensamblaje de la maquinaria ribosomal. Además, el bucle de apareamiento de bases G y C, que abunda en los transcritos CAG y CUG, es una estructura altamente propensa a ser procesada por la maquinaria de silenciamiento que involucra a la ribonucleasa Dicer, generando secuencias cortas CAG y CUG (en torno a 21 nucleótidos), como ha sido descrito en la EH, SCA1 y DM1 (Krol et al., 2007). Además, estas secuencias cortas de ARN actúan como siARNs y silencian otros transcritos que contiene repeticiones complementarias mediante ARNi (Krol et al., 2007).

Estas son algunas evidencias que sostienen que la ganancia de función tóxica del ARN no solamente tiene la capacidad intrínseca de desarrollar *per se* una patología en ausencia de proteína (como ocurre en la DM1 y la SCA8, entre otros ejemplos) sino que además, en un contexto de proteotoxicidad, puede contribuir a la progresión de la enfermedad (un claro ejemplo son las patologías asociadas a poliQs). Además, los mecanismos que producen toxicidad por ARN pueden diferir de aquellos que inducen la agregación de poliQs, por lo que es necesario profundizar en nuevos mecanismos que modulen la toxicidad por ARN y que nos faciliten identificar dianas terapéuticas específicas frente a la toxicidad asociada a transcritos CAG.

3.2 Proteotoxicidad asociada a poliQs

Los transcritos con expansiones CAG pueden exportarse al citoplasma para ser traducidos convencionalmente a proteínas ricas en poliQs (**Figura 1.4**). Estas proteínas inducen la formación de agregados que desequilibran la homeostasis de proteínas siendo una marca distintiva en estas patologías. Curiosamente, es remarcable que la población neuronal afectada por la presencia de agregados en cada patología sea distinta, que quizás se explica porque los genes causales presenten un patrón de expresión diferencial a través de todo el sistema nervioso y tejidos no neuronales (Zoghbi and Orr, 2000). A pesar de la vulnerabilidad neuronal selectiva (revisado por Bogomazova y colaboradores (Bogomazova et al., 2019)), el sello distintivo patogénico en todas estas enfermedades es la presencia de agregados de poliQs, y por tanto, los procesos celulares alterados que contribuyen a la neurodegeneración son comunes, lo que permitiría que cualquier tratamiento que funcione con una de ellas pueda tener utilidad en otras (Stoyas and La Spada, 2018).

Las proteínas con expansiones anormalmente largas de poliQs adquieren una conformación de lámina beta, que afecta a la conformación tridimensional de la proteína exponiendo dominios hidrofóbicos al exterior acuoso, con lo que resulta propensa a la agregación (revisado por Takahashi y colaboradores (Takahashi et al., 2010)) (**Figura 1.4**). Esto le confiere toxicidad, o proteotoxicidad, considerándose hasta el momento dos alternativas: ganancia de una nueva función tóxica o aumento de la función normal hasta niveles tóxicos (Kratte and Finkbeiner, 2010; Orr, 2012). El monómero mal plegado puede ser sustrato de proteasas (en el caso de la SCA3, la SBMA y la EH) (Takahashi et al., 2010) que producen pequeños fragmentos tóxicos (Fragmentos N-terminal solubles) altamente propensos a pegarse y aglutinarse entre sí, lo que marca su elevada toxicidad (**Figura 1.4**). Estas especies solubles son las formas más tóxicas e inician un proceso de agregación que involucra la formación de oligómeros intermediarios, y finalmente entramados de agregados (Stoyas and La Spada, 2018) (**Figura 1.4**). Estos agregados son eventualmente encapsulados en cuerpos de inclusión para aislar las formas solubles tóxicas que interaccionan de forma aberrante con otras proteínas (Kopito, 2000) (**Figura 1.4**). El papel que desempeñan los cuerpos de inclusión en la patogénesis ha sido profundamente debatido, puesto que varias evidencias señalan que son consecuencia de una respuesta protectora de la célula para disminuir las interacciones aberrantes de

especies solubles (monómeros y fragmentos pequeños), mientras que en otros casos, sugieren que contribuyen directamente sobre la progresión de la patogénesis (revisado por Takahashi y colaboradores (Takahashi et al., 2010)). En contraste con esto, el papel tóxico de especies solubles está más consensuado, aceptándose un carácter patogénico que compromete el mantenimiento de la homeostasis de proteínas celular (proteostasis), el metabolismo energético, la función mitocondrial, el transporte axonal, la homeostasis de calcio y la regulación de la transcripción, entre otros procesos celulares alterados (más información revise Lieberman et al., 2019; Stoyas and La Spada, 2018).

El mantenimiento de la homeostasis de proteínas es crucial para garantizar la integridad del proteoma y la supervivencia celular. Por ello, hay varios procesos destinados al control de la calidad proteica (como es la autofagia, el sistema ubiquitina-proteasoma o UPS, etc.) que actúan coordinadamente con los procesos de síntesis proteica (traducción y ensamblaje) para garantizar la degradación eficiente de proteínas defectuosas y asegurar la homeostasis de proteínas celular. Los sistemas de calidad de proteínas involucran la participación de chaperonas moleculares, como Hsp70, que reconocen proteínas mal plegadas mediante los residuos hidrofóbicos expuestos y proceden a corregir su plegamiento. En caso de fracaso, estas chaperonas facilitan la degradación de estas proteínas vía macroautofagia (que de ahora en adelante denominaremos autofagia) o el sistema UPS (revisado por Ciechanover y Kwon (Ciechanover and Kwon, 2017)). La presencia de agregados y especies solubles con tendencia a agregarse colapsan estos sistemas de control debido a interacciones aberrantes con proteínas efectoras (por ejemplo, chaperonas moleculares), impidiendo que estos sistemas puedan responder a la demanda de proteínas mal plegadas (Lieberman et al., 2019). A su vez, los fragmentos tóxicos también pueden ser importados al núcleo para formar agregados proteicos nucleares que interaccionan aberrantemente con factores de transcripción, perturbando la expresión génica (revisado por Stoyas y La Spada (Stoyas and La Spada, 2018)) (**Figura 1.4**). Estas evidencias ponen de manifiesto la gran necesidad de identificar los mecanismos moleculares que controlan la dinámica de agregación de poliQs, puesto que son claves para el mantenimiento de la homeostasis proteica.

3.3 Péptidos RAN

Las primeras evidencias que sugieren la presencia de péptidos fuera de pauta en un contexto de poliQs fueron asociadas a la acumulación de péptidos ricos en polialaninas (poliAs; codificadas por GCA) en la SCA3 (Gaspar, 2000; Toulouse et al., 2005). Posteriormente, fue demostrado que estos péptidos enriquecidos en poliAs coexistían con péptidos que contenían poliSs (poliserinas; codificadas por el triplete AGC) en corteza de ratones transgénicos y pacientes post mortem de la EH (Davies and Rubinsztein, 2006). A pesar de estas evidencias, no fue hasta más adelante, cuando Zu y colaboradores, demostraron tanto la presencia de péptidos que contenían poliQs, poliAs y poliSs, en modelos celulares de la SCA8 y la DM1, así como la existencia de una traducción asociada a expansiones repetitivas e independiente de ATG conocida como traducción RAN (Zu et al., 2011) (**Figura 1.4**). Además, Bañez-Coronel y colaboradores demostraron la presencia de péptidos derivados de la traducción RAN en ratones transgénicos N171-82Q para la EH y muestras de cerebro de pacientes post mortem de la EH (Bañez-Coronel et al., 2015), lo que confirma que los ARNs que portan tripletes CAG pueden codificar otros péptidos adicionales además de la mHtt. En este trabajo observaron también la presencia de péptidos ricos en polileucina (poliLeu) y policisteína (poliC) derivados de transcritos que contenían tripletes CUG, codificados en la hebra de ADN antisentido de *HTT*, evidenciando que los transcritos de la hebra antisentido pueden ser traducidos. Similar a los agregados de poliQs, la acumulación y agregación de estos péptidos es dependiente de la longitud de la expansión, sin embargo se ha observado que se acumulan de manera específica en ciertas áreas del encéfalo (como cerebelo, sustancia blanca del núcleo estriado y corteza frontal) donde la mHtt no es detectada (Bañez-Coronel et al., 2015). La presencia de péptidos RAN ha sido observada en cinco patologías adicionales asociadas a expansiones de repeticiones en regiones no codificantes, como son el FXTAS (Todd et al., 2013a), la ALS/FTD (Ash et al., 2013; Mori et al., 2013; Zu et al., 2013), la DM2 (Zu et al., 2017), la SCA31 (Ishiguro et al., 2017) y la FECD (Soragni et al., 2018).

Para el estudio de la presencia y toxicidad asociada a péptidos RAN han empleado varias aproximaciones en diferentes modelos biológicos. Por un lado, varios autores han abordado la identificación de péptidos RAN mediante la sobreexpresión de secuencias repetitivas sin ATG en líneas celulares de mamífero, y también en animales modelo como *D. melanogaster* y ratón (Bañez-Coronel et al., 2015; Soragni et al., 2018; Stopford et al., 2017; Todd et al., 2013; Zu et al.,

2017, 2011). Sin embargo, en estos casos los autores no pueden saber cuál es la contribución del ARN sobre la toxicidad generada en sus modelos. Por tanto, para confirmar el papel de estos péptidos en la toxicidad inducida, han sido empleadas nuevas estrategias que implican el empleo de secuencias repetitivas que contienen codones alternados que codifican para el mismo aminoácido que están precedidas por un codón ATG y que rompen la estabilidad del bucle a nivel de ARN (Rudich et al., 2017). Estas secuencias posibilitan estudiar exclusivamente la implicación de péptidos RAN en la patogénesis, puesto que no forma bucles que pudieran secuestrar factores de transcripción. Esta estrategia ha sido empleada recientemente en *C. elegans* para el estudio de la toxicidad de péptidos RAN derivados de secuencias G_4C_2/C_4G_2 y CAG/CUG expresados mediante un codón de inicio de traducción ATG, para facilitar su producción (Rudich et al., 2017, 2020). Estas últimas aproximaciones confirman que péptidos RAN inducen toxicidad específicamente y que esta toxicidad es dependiente de la edad (Rudich et al., 2020, 2017). Además, muestran que esta toxicidad puede ser diferencial en función del péptido (Rudich et al., 2020). Sin embargo, estos modelos no confirman que *C. elegans* pueda producir péptidos RAN a partir de ARNs que contienen expansiones de microsatélites, de forma espontánea.

En relación a patologías de poliQs, solamente han sido detectados péptidos RAN, traducidos de varias de las pautas posibles (poliQs, poliAs, poliSs, poliLeus y poliCs), en modelos animales de mamífero y pacientes de la EH (Bañez-Coronel et al., 2015). Esto se suma a las evidencias observadas en la SCA3, aunque no se puede descartar la presencia de ellos, en las otras siete patologías causadas por la expresión de poliQs. Hasta el año 2016, no había suficientes evidencias que indicasen la conservación evolutiva de la traducción RAN entre especies. En ese año, Kramer y colaboradores mostraron simultáneamente la presencia de un único péptido RAN (un dipéptido poliGP; contiene glicina y prolina) en un contexto repetitivo G_4C_2 causante de la patología ALS/FTD en *S. Cerevisiae*, *D. melanogaster* y *C. elegans* (Kramer et al., 2016). Estos resultados podrían evidenciar la presencia de traducción RAN en un contexto de toxicidad asociado a repeticiones del hexanucleótido G_4C_2 . Sin embargo, no podemos obviar que este hexanucleótido produce más de un dipéptido fuera de pauta (Poli-Glicina-Alanina y Poli-Glicina-Arginina) (Ash et al., 2013; Mori et al., 2013; Zu et al., 2013), que no son mostrados en este modelo (Kramer et al., 2016). Este trabajo puede sugerir que existe una conservación evolutiva de la traducción

RAN en *C. elegans*, pero sería interesante reforzar estas evidencias con otros contextos repetitivos que sean patogénicos, como el triplete CAG, que además, podrían ser útiles para profundizar en la identificación de mecanismos que modulen la toxicidad de péptidos enriquecidos en poliAs, poliQs, poliSs, poliLeus y PoliCs.

Por otro lado y más recientemente, Sellier y colaboradores han descartado que el ARN que porta repeticiones CGG contribuya a la patogénesis del FXTAS en un modelo de ratón (Sellier et al., 2017). Estos autores han demostrado que la presencia de péptidos ricos en poliGs son patogénicos, ya que interactúan con la proteína laminina nuclear, LAP2 β , perturbando su función y desorganizando la arquitectura nuclear en neuronas diferenciadas de células iPSCs de FXTAS (Sellier et al., 2017). Sin embargo, han identificado que la traducción de la expansión CGG no es producida mediante un mecanismo de traducción RAN, como habían sugerido otros autores (Todd et al., 2013), sino que es dependiente de un codón de iniciación semejante (ACG) situado “aguas arriba” de las repeticiones CGG, produciendo un péptido rico en poliGs que es patogénico (Sellier et al., 2017). Esta observación ha puesto de manifiesto la posibilidad de que expansiones G₄C₂ puedan, en parte, traducirse a partir de un codón de inicio similar situado previamente a la zona repetitiva (Gao and Richter, 2017). Más recientemente, se ha sugerido que la traducción RAN requiere del escaneado ribosomal dependiente de Cap y es dependiente de la helicasa eIF4A y el factor 2D de iniciación de traducción eucariótico (eIF2D) (Kearse et al., 2016; Kramer et al., 2016; Sonobe et al., 2020). Estas y otras evidencias sostienen que la traducción RAN no es totalmente independiente de reglas canónicas de traducción, sino que comparte ciertas similitudes con la traducción convencional.

4. Modelos de toxicidad inducida por poliQs en *C. elegans*

La dinámica de agregación de poliQs puede ser monitorizada a tiempo real *in vivo*, empleando proteínas fluorescentes, en *C. elegans* (H. R. Brignull et al., 2006; Morley et al., 2002; Parker et al., 2001). Este gusano es extremadamente útil para rastrear posibles genes modificadores mediante cribados químicos con EMS (metanosulfonato de etilo). Su ciclo corto de vida (tres días) y la enorme diversidad de herramientas genéticas que existen para manipularlo, hacen de estos animales un modelo altamente atractivo para la generación de

transgénicos, estudio de interacciones genéticas y ensayos farmacológicos. La identificación de potenciadores y supresores de la agregación de poliQs es una primera aproximación para encontrar vías de señalización y dianas clave en la modulación de la agregación de poliQs.

Con el propósito de estudiar la dinámica de agregación y la disfuncionalidad neuronal en un contexto de estrés inducido por poliQs se han desarrollado una amplia gama de modelos de *C. elegans* (Heather R. Brignull et al., 2006; Morley et al., 2002; Parker et al., 2001; Rudich and Lamitina, 2018; Sanchis et al., 2019). En este proyecto, hemos empleado modelos de *C. elegans* que contienen expansiones puras de tripletes CAG (sin secuencias adicionales pertenecientes a genes causantes de la enfermedad) fusionadas a proteínas fluorescentes. Sabemos que estas expansiones son patológicas en nueve genes distintos (**Figura 1.2**). A su vez, también sabemos que su expresión de forma aislada del resto de secuencia genómica es suficiente para inducir toxicidad, dependiente de la edad, tal y como ocurre en pacientes (Morley et al., 2002). Morley y colaboradores desarrollaron el primer modelo basado en la expresión de una expansión de tripletes CAG, mediante la generación de gusanos que expresaban 29Q, 33Q, 35Q, 40Q, 44Q, 64Q y 82Q, fusionados a la proteína fluorescente amarilla (YFP; del inglés *Yellow Fluorescent Protein*), en células musculares, mediante el promotor del gen *unc-54* (Morley et al., 2002). Estos autores observaron un patrón de agregación dependiente de la longitud de la expansión, y de la edad de los animales. En los animales que expresaban pocas glutaminas la fluorescencia producida por YFP se repartía de forma homogénea en las células musculares del nematodo. Sin embargo, los animales que expresaban 35Q y 40Q producían larvas con fluorescencia homogénea pero con la edad fomentaban la aparición de cuerpos de inclusión, indicativos del inicio de procesos de agregación de poliQs. Por último, en animales jóvenes los péptidos 82Q colapsaban en agregados desde casi el momento de eclosionar a larvas L1. Por tanto, el modelo 40Q emula fenotipos de agregación más tardíos y progresivos, lo que permite evaluar un rango de edad bastante amplio desde estadios larvarios iniciales hasta estadios adultos. Además, en el modelo 40Q, la expresión de poliQs también induce defectos motores, reflejando una relación directa entre agregación y funcionalidad del tejido (Morley et al., 2002). A diferencia de 40Q, el modelo de toxicidad inducido por la expresión de 35Q muestra agregación al comienzo del estadio adulto, quizás porque el número de tripletes está en el límite del umbral no patológico para algunas patologías de poliQs (Morley et al.,

2002) (**Figura 1.2**). Estos modelos, *35Q* y *40Q*, son especialmente útiles para la identificación de genes modificadores de agregación de poliQs (Nollen et al., 2004; van Ham et al., 2010) y para describir los defectos funcionales que producen estos agregados en células musculares. Aunque el tejido mayormente perjudicado en pacientes afectados por proteínas que contienen poliQs es el sistema nervioso, los modelos de agregación de poliQs en células musculares de gusanos proporcionan un contexto de agregación más homogéneo (a partir de ahora *40Q*) y fácilmente evaluable, que la agregación neuronal (entre *35Q* y *40Q*) que muestra un patrón de agregación y comportamental más heterogéneo (H. R. Brignull et al., 2006). Por tanto, la identificación de genes que modulan la agregación de poliQs en células musculares de *C. elegans* ha ayudado a comprender en profundidad la toxicidad de poliQs, que se expresan en neuronas, las cuales es probable que induzcan similares respuestas defensivas en estas células.

A este respecto, Brignull y colaboradores mostraron el comportamiento de diferentes expansiones CAG (0, 19, 35, 40, 67, 86) fusionadas a YFP cuya expresión estaba dirigida a un amplio espectro neuronal, mediante el promotor del gen *F25B3.3* (H. R. Brignull et al., 2006). De igual manera que para la expresión en células del músculo, las expansiones más largas producidas en neuronas forman agregados en edades más tempranas (H. R. Brignull et al., 2006). Sin embargo, observaron que la agregación era dependiente del tipo neuronal, y que esta agregación era más predominante en el cordón nervioso ventral (H. R. Brignull et al., 2006). En contraste con el modelo muscular, los cuerpos de inclusión en neuronas poseen tamaños más pequeños, que dificultan el análisis de la progresión de la agregación. Este modelo permite estudiar simultáneamente agregación y disfunción neuronal, las cuales se correlacionan en los diferentes modelos neuronales (H. R. Brignull et al., 2006).

A diferencia de estos modelos, Parker y colaboradores desarrollaron un modelo transgénico en *C. elegans* en el cual expresaban el primer exón del gen *HTT*, que contiene expansiones mutantes de CAGs (*128Q*) inmersas en los primeros 57 aminoácidos de la proteína Htt fusionados a proteínas fluorescentes, lo cual hace que estos gusanos produzcan una de las especies tóxicas que están presentes en los pacientes de la EH. Esta construcción se expresaba específicamente en neuronas mecanosensoriales mediante el promotor del gen *mec-3* (Parker et al., 2001). Este modelo permite emular disfunciones en neuronas

específicas en un contexto de toxicidad de poliQs, que pueden ser analizadas midiendo el comportamiento de los animales respecto a la mecanosensación (Parker et al., 2001). Dado que estos animales producían un fenotipo tan robusto, posteriormente, Lejeune y colaboradores emplearon el modelo para realizar un rastreo de genes que regulaban la disfunción neuronal asociada a la agregación de poliQs, mediante ARNi (Lejeune et al., 2012). Este modelo también ha contribuido en la identificación y validación de dianas terapéuticas con un papel protector para la funcionalidad neuronal en un contexto de poliQs (Vázquez-Manrique et al., 2016). Vázquez-Manrique y colaboradores demostraron que la activación de AMPK (proteína serina/treonina quinasa activada por AMP) protege frente a la disfuncionalidad neuronal asociada al estrés de poliQs tanto en *C. elegans* como en modelos de mamífero (Vázquez-Manrique et al., 2016).

Recientemente, Sanchis y colaboradores han desarrollado un modelo similar de toxicidad mecanosensorial que contenía 112Q en pauta con la proteína fluorescente Tandem Tomato (a partir de ahora TdTomato) para validar el papel protector de la metformina, un activador indirecto de AMPK, tanto en *C. elegans* como en el ratón modelo de la EH zQ175 (Sanchis et al., 2019). Este modelo, desarrollado en el grupo liderado por el Dr. Vázquez-Manrique, ha sido empleado para evaluar y validar terapias farmacológicas y modificadores génicos en esta tesis doctoral.

5. Moduladores de la agregación de poliQs en *C. elegans*

La agregación y toxicidad inducida por poliQs es un proceso que puede ser regulado por genes que modifican el patrón de agregación y/o la funcionalidad neuronal. Hemos mostrado evidencias que señalan que la presencia de genes modificadores puede retrasar o acelerar la aparición de los síntomas motores en pacientes con la EH (**Figura 1.3**). Esto refleja la gran importancia que tiene identificar cuáles son esos genes y cómo lo hacen.

Los modelos de expresión de poliQs de *C. elegans* han facilitado esta labor, proporcionando información sobre vías de regulación de este tipo de toxicidad que son útiles para comprender en profundidad este contexto patológico (García et al., 2007; Muñoz-Lobato et al., 2014; Silva et al., 2013; van Ham et al., 2010) y sobre todo, para identificar posibles dianas terapéuticas, que finalmente han de ser

validadas en modelos mamíferos, para que tengan relevancia en pacientes de la EH (Sanchis et al., 2019; Vázquez-Manrique et al., 2016).

5.1. AMPK como diana terapéutica contra la EH

AMPK es un complejo enzimático heterotrimérico que regula la homeostasis energética y el metabolismo celular (Barnes et al., 2002). AMPK es una proteína serina/treonina quinasa que está compuesta por una subunidad catalítica AMPK α , y dos subunidades reguladoras AMPK β y AMPK γ (**Figura 1.5**). Todas las subunidades tienen un papel relevante en la regulación de la función de AMPK la cual puede ser activada por un rango de moléculas de distinta índole (AMP, otros metabolitos, proteínas quinasa y diversos fármacos) (revisado por Kim y colaboradores (Kim et al., 2016)). Cuando los niveles de ATP celulares disminuyen, consecuentemente aumenta el AMP circulante que puede unirse específicamente a la subunidad reguladora AMPK γ , que induce la activación del complejo enzimático para fosforilar una amplia gama de dianas (revisado por Kim y colaboradores (Kim et al., 2016)).

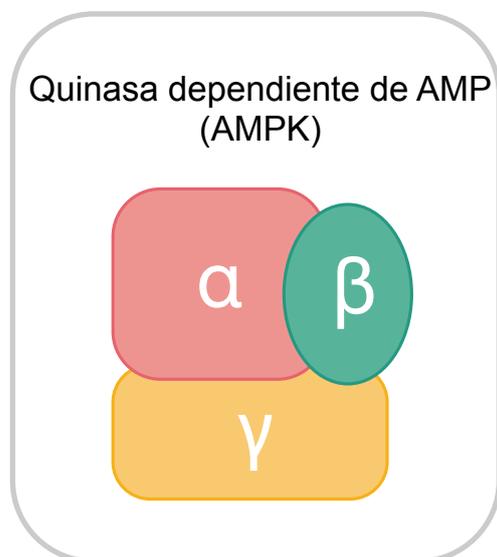


Figura 1.5. Estructura de las subunidades del heterotrímero AMPK. Esta enzima es una quinasa dependiente de AMP (Adenosín monofosfato) formada por una subunidad catalítica (AMPK α) y dos reguladoras (AMPK γ y AMPK β). La subunidad γ posee sitios de unión para el AMP siendo la vía de activación de la enzima más extensamente conocida.

Dentro de los activadores sintéticos, la metformina es uno de los más conocidos por activar de manera indirecta al complejo enzimático AMPK (Kim et al., 2016). Esta sustancia es un fármaco empleado de manera universal para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Rojas and Gomes, 2013). La metformina induce una inhibición moderada del complejo I de la cadena de transporte de electrones

mitocondrial, aumentando los niveles de AMP y por consiguiente, activando a AMPK (Musi et al., 2002). En este sentido, varios autores han demostrado que la metformina reduce la agregación de poliQs muscular y la toxicidad neuronal en *C. elegans* (Sanchis et al., 2019; Vázquez-Manrique et al., 2016), al igual que disminuye defectos comportamentales en modelos de mamífero de la EH (Arnoux et al., 2018; Ma et al., 2007; Sanchis et al., 2019; Vázquez-Manrique et al., 2016) (**Figura 1.6**).

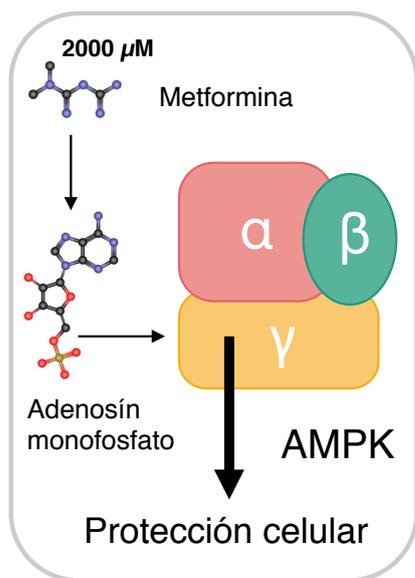


Figura 1.6. La metformina induce la activación indirecta de AMPK. El fármaco anti-diabético metformina produce una inhibición moderada del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial que propicia el aumento de AMP, puesto que cae la producción de ATP, el cual se une alostéricamente a la subunidad reguladora gamma (AMPK γ), activando AMPK. Esta activación ha demostrado ser protectora a una concentración de 2000 µM en un contexto de toxicidad de poliQs neuronal y muscular en *C. elegans*. Adaptada de Gómez-Escribano *et al.*, (Gómez-Escribano et al., 2020).

Hervás y colaboradores analizaron el estado cognitivo de pacientes de la EH de la base de datos mundial Enroll-HD (<https://enroll-hd.org/>). En esta base se han introducido datos de un estudio observacional sobre la EH internacional, que incluye datos del estado físico, psiquiátrico y motor de miles de pacientes, y controles sanos. Además, se incluyen datos de estado educacional, peso, comorbilidad y muchos detalles sobre cualquier fármaco que estén tomando para tratar la EH o cualquier otra dolencia que sufran. Estos autores razonaron que puesto que la diabetes de tipo 2 es muy común en Europa, debería haber una proporción de pacientes de la EH que además fueran diabéticos y que por tanto, tomaran metformina para tratar esta dolencia. Efectivamente los había, y por tanto hicieron un estudio transversal a partir de aproximadamente 8000 pacientes de EH, y controles sanos, que demostró que los pacientes diabéticos con EH tratados con metformina puntuaban mejor en las pruebas cognitivas, que aquellos pacientes de EH no diabéticos (Hervás et al., 2017). Es interesante que exista esta asociación entre tomar metformina, en personas con EH que además sufren diabetes que es una enfermedad que tiene un impacto muy

deletéreo sobre el sistema nervioso, y un mejor estado cognitivo. Por tanto, es lógico hipotetizar que este efecto protector podría ocasionar un mayor beneficio en pacientes con EH, y que no tengan diabetes de tipo 2. Por otro lado, el salicilato, sal o éster del ácido salicílico, puede también modular la activación de AMPK mediante su unión alostérica a la subunidad reguladora AMPK β (Kim et al., 2016).

Sin embargo, la metformina y el salicilato son sustancias pleiotrópicas y por tanto AMPK no es su única diana. En relación a esto, el tratamiento con metformina ha mostrado ser protector, además, en un modelo de ratón para aterosclerosis, promoviendo la activación de AMPK, la reducción de AT1R (receptor de angiotensina II tipo 1) y el incremento de expresión de SOD1 (superóxido dismutasa 1) (Forouzandeh et al., 2014). También ha sido demostrado que la metformina altera el transporte de glucosa y potencia la degradación del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1 α) (Miller et al., 2013; Zhou et al., 2016). Recientemente, Zu y colaboradores han demostrado que la metformina puede inhibir el proceso de traducción RAN a través de la vía PKR (Proteína Quinasa dependiente de ARN) para aliviar la toxicidad de péptidos RAN en un modelo de ratón de la patología ALS/FTD (Zu et al., 2020).

En torno al salicilato y derivados, es ampliamente conocido su poder antiinflamatorio, ya que pueden promover la acetilación e inhibición de ciclooxigenasas, que a su vez reduce la inflamación (revisado por Bhat (Bhat, 2009)). Pero además, puede acetilar quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) e inhibir su actividad para proteger frente al cáncer colorrectal (Dachineni et al., 2017) y suprimir la translocación nuclear de la GAPDH humana para prevenir la muerte celular (Choi et al., 2015). Estas evidencias son algunos ejemplos que ponen de manifiesto el amplio espectro de acción que poseen estos fármacos. Además, es interesante que AMPK sea una diana común que comparten. A su vez, el tratamiento crónico con estas sustancias lleva asociado efectos colaterales relacionados con pérdida de peso y acidosis láctica (metformina) y problemas gastrointestinales (metformina y salicilato). Por tanto, la posibilidad de reducir la dosis de ambos compuestos, aunque sean administrados en combinación, podría disminuir en gran medida efectos secundarios no deseados. Ford y colaboradores han demostrado que la metformina y el salicilato pueden activar de manera sinérgica a AMPK para mejorar la resistencia a insulina (Ford et al., 2015). Además, la combinación de aspirina (ácido salicílico) y metformina

suministradas conjuntamente potencia la apoptosis en modelos *in vitro* de cáncer de mama (Talarico et al., 2016). Otros autores también han sugerido que el tratamiento conjunto de metformina y salicilato es neuroprotector en un contexto de neuroinflamación en líneas celulares hipotalámicas (Ye et al., 2016).

5.2. Receptores nucleares

Los receptores nucleares o NRs (del inglés *Nuclear Receptors*) son sensores metabólicos que pueden responder a ligandos específicos para regular diferentes rutas del metabolismo celular a través de una señalización endocrina (Antebi, 2015; Chawla, 2001). El genoma de *C. elegans* codifica un total de 284 NRs, en contraste a los 48 de humanos y los 18 de *D. melanogaster* (Maglich et al., 2001). DAF-12 es uno de los NR más estudiados en *C. elegans* con importantes funciones en longevidad, desarrollo y metabolismo lipídico (Antebi et al., 2000; Ludewig, 2004; Wang et al., 2015). DAF-12 es activado por su ligando, el ácido dafacrónico, para inhibir la longevidad y promover el desarrollo reproductivo; sin embargo, en ausencia de ligando, DAF-12 puede interactuar con su represor, DIN-1, para promover la longevidad (Gerisch et al., 2007).

En torno a 269 de los NRs de *C. elegans* poseen homología con HNF4 α (Factor nuclear 4 α de hepatocitos), el cual solamente tiene dos variantes en humanos y una en *D. melanogaster* (Robinson-Rechavi et al., 2005). Este NR está implicado en la regulación y el transporte de glucosa y en el remodelado del metabolismo lipídico en mamíferos (Stoffel and Duncan, 1997). En *C. elegans*, NHR-49 es uno de los HNF4 α más conocidos y regula la longevidad, el metabolismo lipídico y la respuesta a nutrientes (Gilst et al., 2005; Van Gilst et al., 2005). A pesar de la enorme abundancia de NRs en *C. elegans*, relativamente pocos receptores han sido caracterizados funcionalmente. Arda y colaboradores han descrito una modularidad funcional de los NRs que ha permitido clasificarlos. Estos autores han reflejado la importancia de que esta familia de receptores esté extendida en *C. elegans*, ya que les facilita a los nematodos adaptarse rápida y eficazmente a cambios ambientales y fisiológicos (Arda et al., 2010).

5.2.1. Señalización endocrina en *C. elegans*

El ácido dafacrónico fue la primera hormona esteroidea descrita en *C. elegans* como ligando de DAF-12 (Motola et al., 2006). Esta hormona es sintetizada a partir de colesterol y mediante enzimas especializadas (DAF-36/oxigenasa Rieske y DAF-9/citocromo P450) y además, presenta cierta similitud con los ácidos biliares producidos en mamíferos (Gerisch, 2007; Russell, 2003; Wollam et al., 2011). DAF-12 tiene funciones opuestas para modular la longevidad en *C. elegans* en función del tipo de alelo (Fisher and Lithgow, 2006). Por otro lado, en animales con las células de la línea germinal intacta, la activación de DAF-12 mediada por ácido dafacrónico inhibe la longevidad, mientras que en animales sin células de la línea germinal, la promueve (Gerisch et al., 2007). Está descrito que ante la ausencia de esta hormona, DAF-12 señala de forma diferente. En este contexto, asociado a condiciones desfavorables (estrés, falta nutricional, falta de hormona, etc.) DAF-12 interacciona con DIN-1, que actúa como correpressor, y reprime genes de crecimiento y promueve la resistencia a estrés lo cual a su vez induce la entrada en estadio *dauer* (Gerisch et al., 2007). Curiosamente, hay evidencias que demuestran que algunos NRs pueden regular indirectamente a otros NRs. Por ejemplo, NHR-8 regula la síntesis de ácido dafacrónico mediante su unión a secuencias promotoras de *daf-36* (Magner et al., 2013). A su vez, DAF-12 es requerido para la función de NHR-80 (regulador de la síntesis lipídica) en animales sin células de la línea germinal para extender la longevidad en *C. elegans* (Goudeau et al., 2011). Estas evidencias no solamente reflejan que hay una íntima regulación entre los NRs sino que además, también pueden funcionar de manera coordinada para regular dianas transcripcionales comunes (Goudeau et al., 2011; Pathare et al., 2012).

La señalización endocrina promovida por hormonas esteroideas que activan receptores nucleares involucra enzimas especializadas en la sulfatación (sulfotransferasas codificadas por genes SULTs en mamíferos) y desulfatación (sulfatasas codificadas por genes SULs en mamíferos) de esteroides (revisado por Mueller y colaboradores (Mueller et al., 2015)). Las hormonas esteroideas pueden ser sulfatadas para adquirir una mayor solubilidad que facilita su difusión a tejidos distales (Gamage et al., 2006). Sin embargo el grupo sulfato imposibilita que la hormona interaccione con su receptor diana, por lo que tras su difusión, el grupo sulfato debe ser eliminado mediante una reacción catalizada por enzimas sulfatasas (revisado por Mueller y colaboradores (Mueller et al., 2015)).

En *C. elegans* solamente hay una única sulfotransferasa, SSU-1 (del inglés *Stomatin Supressor Uncoordination*), cuya expresión está confinada a un par de neuronas sensoriales anfídicas, ASJ (Carroll et al., 2006). En contraste, podemos encontrar tres genes que codifican para las sulfatasas SUL-1, SUL-2 y SUL-3 en *C. elegans* (Sardiello et al., 2005). Carroll y colaboradores han mostrado que la supresión de *ssu-1* modifica fenotipos de descoordinación motora y sensibilidad anestésica en mutantes *unc-1/STOML3* (del inglés; *Stomatin Like Protein 3*) y *unc-24/STOML1* (Carroll et al., 2006). A su vez, la supresión de *ssu-1* también modifica fenotipos dauer asociados a alelos nulos de *unc-24* (Carroll et al., 2006). Recientemente, Burton y colaboradores han descrito una ruta de señalización neurohormonal que relaciona SSU-1 con el receptor de hormonas esteroideas NHR-1 en respuesta al estrés osmótico (Burton et al., 2018). Esta evidencia refleja la existencia de hormonas en *C. elegans* que pueden ser sulfatadas por SSU-1 y que promueven la activación de NRs. Sin embargo, estos autores desconocen la identidad de la hormona involucrada en la señalización mediada por NHR-1. Recientemente, Farina y colaboradores han demostrado que el tratamiento con hormonas esteroideas reduce la toxicidad inducida por poliQs expresadas en neuronas mecanosensoriales en *C. elegans* (Farina et al., 2017). Además, muestran que diversas hormonas esteroideas reducen la mortalidad de células estriatales de ratón modelo de la EH, estresadas por deprivación sérica (Farina et al., 2017).

5.2.2. Metabolismo lipídico en *C. elegans*

Los lípidos tienen importantes funciones involucradas en la permeabilidad selectiva, la fluidificación de membranas, señalización y almacenaje de energía en *C. elegans* (revisado por Watts (Watts, 2009)). Los ácidos grasos son moléculas señalizadoras que pueden interactuar específicamente con un NR, como es el caso del lípido oleoiletanolamida. Este lípido obtenido por la acción de la lipasa lisosomal, LIPL-4, promueve la longevidad mediante la activación de NHR-80, el cual a su vez regula *fat-6*, un gen de síntesis lipídica (Folick et al., 2015). La desaturasa FAT-6 está involucrada en la síntesis de ácido oleico, un lípido señal que induce la activación de factores de transcripción de respuesta a estrés como SKN-1 (Lehrbach and Ruvkun, 2019).

Los lípidos además de funcionar como moléculas señalizadoras, son sustratos para formar moléculas lipídicas de mayor tamaño, como los triglicéridos, que actúan como fuentes de reserva lipídica y que son almacenados en depósitos

lipídicos. Los triglicéridos son una fuente vital de energía durante la embriogénesis, y también durante periodos de baja disponibilidad de comida en larvas y gusanos adultos, y para la supervivencia de las larvas *dauer* (Mak, 2012).

Los ácidos grasos pueden clasificarse en función del número de enlaces dobles y ramificaciones que posean. Los ácidos grasos saturados (SFAs; del inglés *Saturated Fatty Acids*) no contienen enlaces dobles en su cadena, mientras que los monoinsaturados (MUFAs; del inglés *Monounsaturated Fatty Acids*) y poliinsaturados (PUFAs; *Polyunsaturated Fatty acids*), poseen uno o más de un enlace doble, respectivamente (Watts, 2009). El lipidoma de *C. elegans* contiene además unos ácidos grasos metilados de cadena ramificada, que solamente son obtenidos a partir de síntesis *de novo* (Kniazeva et al., 2004). *C. elegans* puede obtener ácidos grasos (SFAs y MUFAs) directamente de la dieta bacteriana con *E. coli* o sintetizarlos *de novo* a partir de acetil-CoA (**Figura 1.7**). La dieta con OP50-1 aporta un 37 % de SFAs, un 11 % de MUFAs y un 49 % de ácidos grasos ricos en ciclopropano que forman parte de la membrana bacteriana, además, esta abundancia difiere de otras cepas bacterianas como HB101, la cual presenta una mayor cantidad de MUFAs (Brooks et al., 2009). Los PUFAs solamente son obtenidos mediante síntesis *de novo* empleando acetil-CoA o SFAs y MUFAs incorporados de la dieta.

Aproximadamente entre el 10-20 % de los ácidos grasos son sintetizados *de novo* en *C. elegans*, con excepción de los que son metilados de cadena ramificada (Watts, 2009; Watts and Ristow, 2017). El acetil-CoA obtenido de la hidrólisis de la glucosa es el sustrato empleado para la síntesis de ácidos grasos *de novo* en *C. elegans* (**Figura 1.7**). La acetil-CoA carboxilada (POD-2/ACC) cataliza la carboxilación del acetil-CoA a malonil-CoA, el cual es a su vez, sustrato de FASN-1/FAS (ácido graso sintasa) para la síntesis de ácido palmítico (C16:0) (Watts and Ristow, 2017) (**Figura 1.7**). Este ácido graso saturado puede ser integrado dentro de triglicéridos o fosfolípidos, o ser modificado por elongasas y desaturasas para la síntesis de diferentes PUFAs (como el ácido linoleico y araquidónico) (**Figura 1.7**) (Watts and Browse, 2002). Previamente a la producción de PUFAs, la elongasa (ELO-2) y desaturasas (FAT-5, FAT-6 y FAT-7) catalizan la producción de ácido esteárico (C18:0; SFAs), ácido palmitoleico (C16:1; MUFAs) y ácido oleico (C18:1; MUFAs), respectivamente (**Figura 1.7**) (Watts and Ristow, 2017).

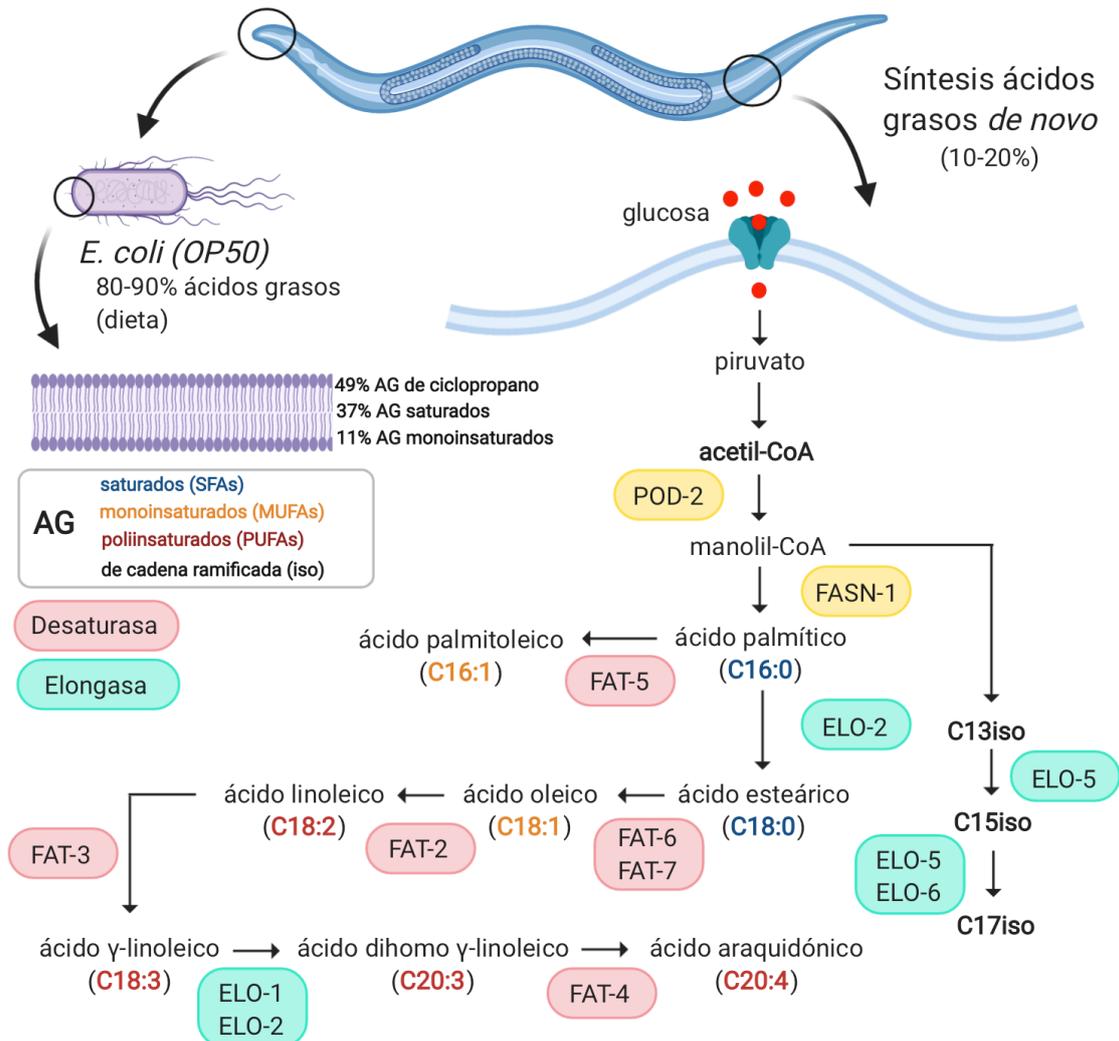


Figura 1.7. Fuentes y rutas de síntesis de ácidos grasos *de novo* en *C. elegans*. Los ácidos grasos pueden ser incorporados a partir de la dieta con *E. coli* o ser sintetizados *de novo* a partir de acetil-CoA. La membrana bacteriana de *E. coli* contiene un 49 % de ácidos grasos bacterianos ricos en ciclopropano, un 37 % de ellos son saturados (SFAs; del inglés *Saturated Fatty Acids*) y un 11 % de estas sustancias están monoinsaturadas (MUFAs; del inglés *Monounsaturated Fatty Acids*). Aproximadamente entre el 10-20 % de los ácidos grasos totales son sintetizados a partir de acetil-CoA obtenido de la glicólisis. Este precursor es sustrato de las enzimas POD-2/ACC (acetil-CoA carboxilasa) y FASN-1/FAS (ácido graso sintasa) que lo transforman a ácido palmítico (C16:0), que es el primer ácido graso saturado de la ruta de biosíntesis lipídica. Este ácido graso puede ser desaturado por FAT-5 (ácido palmítoleico; MUFAs) o elongado por ELO-2 (ácido esteárico; SFAs). Las desaturasas FAT-6 y FAT-7 son las encargadas de la conversión de esteárico a oleico (C18:1), que es un precursor MUFAs que da lugar a un amplio rango de PUFAs (del inglés *Polyunsaturated Fatty Acids*; ácido linoleico, ácido γ -linoleico, ácido dihomo- γ -linoleico y ácido araquidónico). Paralelamente, el manoilil-CoA (obtenido de la carboxilación del acetil-CoA) es empleado para sintetizar ácidos grasos de cadena ramificada monometilados que son prácticamente el 99 % obtenidos *de novo* en *C. elegans*. Esta ruta de síntesis emplea elongasas especializadas, ELO-5 y ELO-6, que producen los ácidos grasos C13iso, C15iso y C17iso. Figura creada mediante la plataforma Biorender.

El manoilil-CoA a su vez puede ser sustrato de elongasas especializadas, ELO-5 y ELO-6, que sintetizan ácidos grasos de cadena ramificada monometilados,

C13iso, C15iso y C17iso, esenciales para el desarrollo de los nematodos (**Figura 1.7**) (Kniazeva et al., 2004). Estos lípidos de cadena ramificada son componentes estructurales de esfingolípidos que tienen importantes funciones en la transducción de señales y reconocimiento celular (Chitwood et al., 1995; Watts, 2009). Los PUFAs son unidos covalentemente a moléculas de glicerol, para producir triglicéridos o lípidos neutros, los cuales son eficientes moléculas de almacenaje de energía debido a su estado altamente reducido (Watts and Ristow, 2017). Los triglicéridos son el mayor componente de las gotas lipídicas, las cuales se acumulan principalmente en el intestino (Mak, 2012), aunque varios estudios sostienen que también pueden acumularse en tejidos no adiposos como el músculo (Herndon et al., 2002; Palikaras et al., 2017; Schmeisser et al., 2019). La desaturasa $\Delta 12$ (FAT-2) cataliza el primer paso de la síntesis de PUFAs mediante la conversión del ácido oleico a ácido linoleico (**Figura 1.7**). La pérdida funcional de *fat-2* conlleva una pérdida completa de PUFAs y como consecuencia una reducción drástica de gotas lipídicas, reflejando la importancia de estos ácidos grasos en la biogénesis de estos sistemas de almacenamiento lipídico (Watts and Browse, 2002; Yi et al., 2013). Ha sido observado que la alimentación enriquecida en PUFAs promueve la longevidad mediante la activación de la autofagia en *C. elegans* (O'Rourke et al., 2013). Esto conlleva un aumento de la lipólisis, liberando señales, que promueven la expresión de genes relacionados con beta-oxidación lipídica mitocondrial (Folick et al., 2015; O'Rourke et al., 2013; Ramachandran et al., 2019). Recientemente, se ha descrito que la lipólisis lipídica puede ocurrir en células musculares, liberando señales lipídicas que activan NHR-80/HNF4 α y AMPK/AAK-2 en neuronas para regular la homeostasis metabólica y promover la longevidad en *C. elegans* (Schmeisser et al., 2019). Los lípidos tienen una importante función de reserva, para promover de una fuente lipídica a las membranas celulares. Varios autores sugieren que los depósitos lipídicos proporcionan una fuente lipídica importante para la formación de las membranas de los autofagosomas (Dupont et al., 2014; Li et al., 2015; Shpilka et al., 2015). En contraste, Velázquez y colaboradores han demostrado que los depósitos lipídicos participan en el mantenimiento de la homeostasis en el retículo endoplásmico, que tiene un impacto directo sobre la regulación de la autofagia en *S. cerevisiae* (Velázquez et al., 2016). Además, estos autores han demostrado que la inhibición de síntesis de ácidos grasos *de novo* y la deficiencia de depósitos lipídicos produce una disfunción del flujo autofágico en levadura (Velázquez et al., 2016). Además, otros autores han sugerido que estos depósitos lipídicos son esenciales para

promover la eliminación de cuerpos de inclusión citosólicos en levadura (Moldavski et al., 2015).

5.2.3. Receptores nucleares como reguladores del metabolismo lipídico

Los NRs son factores de transcripción que interaccionan físicamente con secuencias promotoras específicas para regular la expresión de genes. Son reguladores clave del metabolismo lipídico y altamente atractivos como dianas terapéuticas para la industria farmacéutica (Chawla, 2001). NHR-49/HNF4 α regula diferentes rutas del metabolismo lipídico, activando genes diana, como FAT-7, para regular la desaturación lipídica, y ACS-2 para promover la beta-oxidación lipídica en *C. elegans* (Gilst et al., 2005). NHR-49 puede formar heterodímeros con otros NRs, como son NHR-80 y NHR-66, para regular de manera coordinada y opuesta el metabolismo lipídico en gusanos (Pathare et al., 2012). Concretamente, el heterodímero NHR-49/NHR-80 promueve la activación de la desaturación lipídica, mientras que NHR-49/NHR-66 reprime el metabolismo de esfingolípidos y el remodelado lipídico, evidenciando su papel activador/represor dual dependiendo del NR con el que se coordine (Pathare et al., 2012). El coregulador transcripcional MDT-15 interacciona con NHR-49 para regular el metabolismo lipídico y la activación de genes lipídicos en condiciones de ayuno (Taubert, 2006; Van Gilst et al., 2005). En contraste, NHR-80 puede regular directamente la síntesis del ácido oleico mediante la activación de la desaturasa FAT-6 para promover la longevidad en animales sin células de la línea germinal (Goudeau et al., 2011). Recientemente, han demostrado que la activación de NHR-80 mediante el lípido señal oleoiletanolamida promueve la longevidad en *C. elegans* (Folick et al., 2015). A su vez, NHR-80 actúa en consonancia con DAF-12 para promover la longevidad en animales sin células de la línea germinal (Goudeau et al., 2011). Recientemente, han demostrado que DAF-12 estimula la beta-oxidación lipídica, para movilizar energía desde las reservas lipídicas y promover el desarrollo reproductivo (Wang et al., 2015).

Estos estudios ponen de manifiesto la importancia y el impacto que tiene la señalización mediada por NR sobre el remodelado lipídico y la longevidad en *C. elegans*. En este trabajo hemos relacionado el impacto que tiene la desregulación del metabolismo lipídico sobre la agregación de proteínas con poliQs, denotando la importancia que tienen los lípidos en el mantenimiento del equilibrio de la homeostasis de proteínas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Hasta el momento, la toxicidad asociada al ARN que contiene expansiones CAG no ha sido modelizada en neuronas en *C. elegans*, uno de los principales tipos celulares afectados en patologías asociadas a expansiones de tripletes CAG. Nuestra hipótesis es que la generación de tales modelos podría ser de mucha utilidad para realizar cribados de fármacos contra la toxicidad inducida por ARN tóxico.

Se ha descrito que los transcritos con expansiones de trinucleótidos CAG pueden ser traducidos en diferentes pautas de lectura, mediante la llamada traducción RAN. Nuestra hipótesis es que actualmente no hay suficientes estudios que avalen la conservación evolutiva, entre nematodos y mamíferos, de este proceso, y por tanto su modelización es necesaria.

Recientes evidencias, de varios autores, sugieren que AMPK puede activarse por metformina para inducir un efecto protector. Sabemos que AMPK puede ser activada por otras moléculas, como el salicilato, e incluso de forma sinérgica. Puesto que la metformina y el salicilato son fármacos pleiotrópicos, nuestra hipótesis es que una activación sinérgica de AMPK, mediante estas sustancias, podría requerir dosis muy bajas de ambos fármacos. Esto a su vez induciría una activación específica y dependiente de AMPK que podría resultar protectora, en gusanos estresados por poliQs.

Un cribado de genes al azar en *C. elegans* identificó *unc-1* como un potente modulador de la agregación de poliQs. Nuestra hipótesis es que descubrir el mecanismo por el cual *unc-1* regula la homeostasis de proteínas podría revelar potenciales dianas terapéuticas contra enfermedades causadas por proteínas con tendencia a la agregación.

OBJETIVOS

El objetivo global de esta tesis es el estudio de la toxicidad inducida por moléculas de ARN que contienen expansiones largas de trinucleótidos CAG, y por los péptidos que se derivan de su traducción, empleando *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo. Además, queremos identificar y caracterizar componentes reguladores de la toxicidad asociada a estas moléculas, para desarrollarlas como potenciales dianas terapéuticas contra enfermedades cuya etiología involucre mutaciones por expansiones de tripletes CAG.

Los objetivos desglosados de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

- I. Desarrollar y caracterizar modelos de toxicidad por ARN mediante la expresión de transcritos con expansiones largas de trinucleótidos CAG en diferentes tejidos, para su uso en el cribado de fármacos potencialmente terapéuticos y para estudiar la presencia de péptidos derivados de la traducción RAN.
- II. Cribado de fármacos en gusanos transgénicos que expresan expansiones tóxicas de CAGs en neuronas.
- III. Estudiar la activación sinérgica de AMPK como estrategia terapéutica contra enfermedades causadas por poliQs.
- IV. Estudiar *unc-1* y los componentes de su ruta de señalización como moduladores del fenotipo de agregación de poliQs.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Metodología

Esta sección incluye detalladamente las técnicas y procedimientos experimentales que se han empleado para llevar a cabo los ensayos incluidos en la sección Resultados. Todos los elementos incluidos en tablas están ordenados de acuerdo a su mención en la sección de Resultados.

1.1 Cultivo y mantenimiento de *C. elegans*

La manipulación y el mantenimiento de las cepas incluidas en este trabajo se ha realizado de acuerdo a especificaciones descritas (Brenner, 1974). Se ha empleado el medio de cultivo NGM (del inglés *Nematode Growth Medium*) para el crecimiento y mantenimiento de los nematodos. Una gran parte de las cepas empleadas en este trabajo se han obtenido del *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC; Minneapolis, MN, EEUU) que constituye un repositorio de cepas silvestres de diversas especies de nematodos, pero con especial énfasis en las del género *Caenorhabditis*. Además, también incluye variedad de cepas mutantes y transgénicas de este mismo género, facilitando su accesibilidad a la comunidad científica. En contraste, la cepa CW911: *ssu-1(fc73) V; unc-1(e580) X*, fue cedida amablemente por el Prof. Phillip G. Morgan (Universidad de Washington, Seattle, EEUU). La **Tabla 2.1** (vea **Anexo I**) contiene una descripción detallada de cada una de las cepas empleadas y generadas en esta Tesis. Prácticamente todas las cepas generadas en el laboratorio del Dr. Rafael Vázquez (denotadas como "RVM") han sido cruzadas en sucesivas rondas (> 3) con el genoma silvestre de referencia, Bristol N2, para evitar arrastrar posibles mutaciones no deseadas. Los animales se han mantenido a 20°C para prácticamente la totalidad de experimentos.

1.2 Lisado de gusanos para obtener ADN genómico

Para la extracción cruda de ADN genómico, se coletaron 10 animales en 5-10 µL de tampón de lisis (vea sección Materiales) con un 1% de proteinasa K (#03115879001, Sigma-Aldrich-Merck, St. Louis, MO, USA) para promover la rotura de la cutícula. El programa de lisado empleado incorpora un primer

paso de lisis a 65 °C durante 1 h seguido de una etapa final de inactivación de la proteinasa K a 95 °C durante 15 min. El extracto de ADN crudo es usado en el momento como molde para el genotipado de gusanos, o conservado a -80 °C para usos posteriores.

1.3 Genotipado de mutantes y transgénicos

El genotipado de cada alelo se optimizó mediante la amplificación específica del alelo silvestre y del alelo mutante con cebadores discriminantes (**Anexo I – Tabla 2.2**) empleando diferentes temperaturas de anillamiento (rango [54-56-58-60 °C], a excepción de algunos casos donde empleamos el rango de [52 a 65 °C]). El diseño abordado de cebadores fue distinto en función del tipo de mutación (cambio nucleótido, inserciones de transgenes, deleciones, ediciones por CRISPR, etc.) (**Anexo I – Tabla 2.2**). Para el genotipado de mutaciones puntuales, en general, se diseñaron tres cebadores distintos: cebador directo que contiene en el extremo 3' el nucleótido silvestre (D_silvestre), cebador directo que contiene en el extremo 3' el nucleótido mutante (D_mutante) y un reverso común a ambos unas 300-400 pb aguas debajo de la zona de cambio (R_común). Esta estrategia también la hemos abordado a la inversa (D_común; R_silvestre; R_mutante) en caso de no obtener resultados discriminatorios en la PCR a ninguna de las temperaturas. Para discriminar entre el alelo silvestre y mutante en una única PCR, la dos bases previas al cambio fueron sustituidas en los cebadores para hacer la hibridación más restrictiva. Los cambios fueron realizados con bases del mismo tipo; G \leftrightarrow A(purinas) T \leftrightarrow C(pirimidinas). Para el genotipado de deleciones, realizamos diferentes aproximaciones en función del alelo (**Anexo I – Tabla 2.2**). (#1) diseño de cebadores externos e internos a la zona delecionada para una única PCR; (#2) diseño de cebadores externos e internos a la zona delecionada para PCR anidada; (#3) diseño de cebadores específicos a la secuencia introducida (oligonucleótido molde) tras el corte por CRISPR/Cas9 (vea sección Metodología – CRISPR/Cas9).

Las mutaciones puntuales generadas por CRISPR contienen parte de secuencia exógena con cambios inocuos introducidos mediante la recombinación homóloga entre la región génica y el oligonucleótido molde exógeno (vea sección Metodología – CRISPR/Cas9). Hemos diseñado un cebador reverso específico de esta secuencia para amplificar específicamente el alelo mutante, mientras que el cebador reverso silvestre y el directo común fueron diseñados sobre la

secuencia silvestre sin cambios (**Anexo I – Tabla 2.2**, vea sección Metodología – CRISPR/Cas9). El seguimiento de las inserciones por MosSCI se ha realizado mediante cebadores prediseñados empleando instrucciones establecidas por el Prof. Christian Frøkjær-Jensen (Frøkjær-Jensen et al., 2008; Robert and Bessereau, 2007).

Los componentes y el programa de reacción empleados están reflejados en las **Tablas 2.3 y 2.4**, respectivamente. Tras la obtención del mutante deseado, las mutaciones se validaron por secuenciación *Sanger* (servicio secuenciación-IBMCP-UPV; servicio de secuenciación-iisLaFe; empresa STAB vida, Lisboa, Portugal) mediante cebadores que flanquean el cambio.

Tabla 2.3. Componentes de una reacción de PCR de genotipado.

Componente	V _{final} (μL)	[] _{final}
10X biotools® tampón de reacción suplementado con 2 mM MgCl ₂	2,5	1X
Mezcla de nucleótidos	2,5	0,2 mM
Cebador directo	1	0,4 μM
Cebador reverso	1	0,4 μM
Biotools® ADN Taq polimerasa	0,25	1,25 U/25 μL
ADN molde (lisado gusanos, colonia bacteriana)	X ¹	200-300 ng/25 μL
H ₂ O libre de nucleasas hasta	25	-

¹Para el genotipado de mutaciones en *C. elegans*, empleamos una extracción de ADN cruda mediante un lisado de animales previo. Para la detección de insertos clonados en plásmidos, adicionamos directamente la colonia a testar a la mezcla de PCR.

Tabla 2.4. Programa de PCR de genotipado.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	1/5 ²	1
Desnaturalización	95	0,5	35
Hibridación	52-65 ¹	0,5	
Extensión	72	1/kb ³	
Extensión final	72	5	1
reposo	10	∞	1

¹Gradiente de temperatura para genotipar mutaciones. Para el testado de colonias bacterianas la temperatura estándar empleada fue 58°C. ²PCR genotipado: 1 min; PCR colonia: 5 min, para permitir la rotura completa de la pared bacteriana y la salida del ADN. ³La Taq polimerasa estándar amplifica 1 kb por minuto.

1.4 Sincronización de gusanos

Para la obtención de poblaciones de gusanos sincronizadas, se recogieron hermafroditas con huevos en su interior mediante el lavado de placas Petri, donde se han cultivado los animales, usando la solución M9 1X (vea sección Materiales). Posteriormente, los gusanos fueron trasladados a tubos cónicos de 15 mL. Los tubos fueron centrifugados a 1500 rpm durante 1 min para recuperar el precipitado de animales. El sobrenadante fue retirado con una pipeta serológica de 10 mL y sobre el precipitado se adicionó un volumen de 4 mL de una solución de sincronización diluida (vea sección Materiales) que contiene un 12,5 % de hipoclorito sódico (NaClO). Los animales fueron lisados a temperatura ambiente durante máximo 5 min para evitar efectos tóxicos no deseados de la lejía. Para promover la rotura de la cutícula completa, los tubos fueron agitados brusca y manualmente asegurando la fricción del medio contra la pared del tubo. Seguidamente la muestra lisada fue centrifugada a 1500 rpm durante 1 min para eliminar la lejía residual. Posteriormente, los huevos sedimentados fueron lavados al menos dos veces con M9 1X para diluir la concentración de lejía en las muestras. En el paso final, el sedimento de huevos fue suspendido en 2 mL de M9 1X residual de los lavados e incubado a 20 °C con agitación automática durante toda la noche para propiciar la eclosión de los huevos que darán lugar a poblaciones L1 sincronizadas.

1.5 Diseño *in silico* de construcciones complejas con tripletes CAG

Las construcciones de tripletes CAG en pauta con etiquetas artificiales (HA, c-Myc, Flag) o proteínas fluorescentes (TdTomato) fueron diseñadas *in silico* (vea secuencia #1-3 en **Anexo II**) y sintetizadas por la empresa GenScript (Piscataway, NJ, EEUU). Nuestro diseño combinó aproximaciones descritas por varios autores para el desarrollo de modelos de toxicidad por ARN y traducción RAN a partir de expansiones repetitivas (García et al., 2014; Todd et al., 2013; Zu et al., 2011).

El modelo I descrito como secuencias #1 y #2 (**Anexo II**), contempla el diseño de dos construcciones en presencia y ausencia de tripletes CAG, respectivamente. En base a modelos descritos en la literatura, se solicitó la síntesis de una construcción con un número de tripletes lo suficientemente elevado como para inducir toxicidad, 169CAG, y a su vez, la misma construcción sin tripletes. Esta última fue empleada para introducir un número reducido de repeticiones CAG

para obtener la construcción control. En ambos casos, la secuencia repetitiva contiene en pauta tres secuencias que codifican etiquetas artificiales (HA, c-Myc, Flag) para la detección por Western Blot de cualquier producto traducido en ausencia de ATG (vea secuencias #1 y #2 en **Anexo II**). El modelo II descrito como secuencia #3 (**Anexo II**) incluye nueve tripletes CAG en presencia de ATG y en pauta con la secuencia de una proteína fluorescente, TdTomato. Esta construcción contiene el codón de inicio ATG porque fue sintetizada para otros fines del laboratorio, y tomamos partida de ella para este estudio (vea sección Metodología – Manipulación genética de construcciones).

Como generalidades, la expansión de tripletes CAG está ubicada dentro del exón 1 del gen que codifica la huntingtina humana (*HTT*) para propiciar un contexto genómico más natural (vea secuencias #1-3 en **Anexo II**). Para evitar cualquier punto de traducción canónica desde la región promotora, además de no incluir un codón de inicio ATG previo a los tripletes, incorporamos dos codones de parada (TAATAA) en cada pauta de lectura (vea secuencias #1 y #2 en **Anexo II**). Para darle una doble utilidad a nuestros modelos de toxicidad por ARN, incluimos varios elementos que nos facilitasen la identificación de péptidos traducidos fuera de pauta derivados de la traducción RAN. Basándonos en diseños realizados por la Prof^a. Laura Ranum (University of Florida, Gainesville, FL, EEUU), pionera y experta en el campo de la traducción RAN (Bañez-Coronel et al., 2015; Zu et al., 2011), incorporamos a nuestra secuencia etiquetas artificiales (HA, c-Myc, Flag) por triplicado en cada pauta de lectura sentido (+1, +2, +3) (vea secuencias #1 y #2 en **Anexo II**) para poder aumentar las probabilidades de detección de los péptidos RAN (que contienen poliglutaminas, polialaninas o poliserinas) mediante anticuerpos específicos (vea sección de Resultados; Capítulo I; **Figura 3.1.2**). Seguidamente a estas etiquetas, incorporamos de nuevo dos codones de parada por cada pauta de lectura para detener la posible traducción RAN (vea secuencia #1 y #2 en **Anexo II**). Todas las secuencias #1-3 contienen secuencias attB1 (inicio) y attB2 (final) que flanquean la secuencia de interés para introducirlas en vectores pDONR™221 P1-P2 por recombinación homóloga empleando el sistema Gateway® (vea sección Metodología – Sistema Gateway). Para otorgarle una mayor flexibilidad al diseño I, incorporamos sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción NotI, EcoRI y SacII flanqueantes a la zona repetitiva (vea secuencia #1 y #2 en **Anexo II**) que nos facilitasen la manipulación genética de las construcciones.

El diseño del modelo II, a diferencia del diseño I, contiene sitios adicionales de reconocimiento de corte para las enzimas *AscI* y *PacI* previos a los sitios *attB* (vea secuencia #3 en **Anexo II**). En el lugar de las etiquetas, este diseño contiene la secuencia de la proteína fluorescente *TdTomato* para la detección *in vivo* de una manera más directa de cualquier producto traducido en ausencia de ATG (vea secuencia #3 en **Anexo II**). Para mayor detalle, la secuencia de *TdTomato* contiene la zona codificante (mayúsculas) y regiones intrónicas (minúsculas) para propiciar un mejor ajuste alternativo y por tanto, optimizar la expresión de la proteína (vea secuencia #3 en **Anexo II**). La secuencia de *TdTomato* está en pauta solamente con el codón CAG que codifica para glutamina, por lo que no se podrían detectar por fluorescencia roja los productos derivados de las otras dos pautas de lectura (vea sección Resultados; Capítulo I; **Figura 3.1.7-A**).

1.6 Manipulación de secuencias con tripletes CAG para generar construcciones de interés

Las secuencias fueron sintetizadas e incorporadas en vectores plasmídicos pUC57 por la compañía GenScript (**Anexo I – Tabla 2.21**). Desafortunadamente, solamente se aislaron clones con un número máximo de 114CAG para la secuencia #1 (**Figura 2.1**). Para manipular el inserto *114CAG::HA::c-Myc::Flag(x3)* se empleó una cepa de *E. coli* que tiene una serie de mutaciones en genes de recombinación que le permiten que posea cierta estabilidad y tolerancia a construcciones con regiones repetitivas (#C3040I, *NEB-Stable*, Invitrogen, Waltham, MA, EEUU (**Anexo I – Tabla 2.22**). A diferencia de esta cepa, las cepas de *E. coli* estándar como TOP10 y MATCH1 (**Anexo I – Tabla 2.22**) nos resultaron poco útiles ya que eliminaban cualquier secuencia repetitiva incorporada en el vector pUC57 tras la transformación bacteriana. Curiosamente, como se trata de repeticiones dinámicas, observamos que el número de tripletes CAG variaba en cada ronda de clonación bacteriana. Este hallazgo a la par que complicaba el cribado de clones positivos, también nos facilitó el aislamiento de clones bacterianos con expansiones más largas que las contenidas en el vector inicial, 114CAG (**Figura 2.1**). Este dinamismo pudimos intensificarlo variando la temperatura de incubación de las colonias bacterianas a 37 °C, en lugar de incubarlas a 30 °C que es lo recomendado por el fabricante.

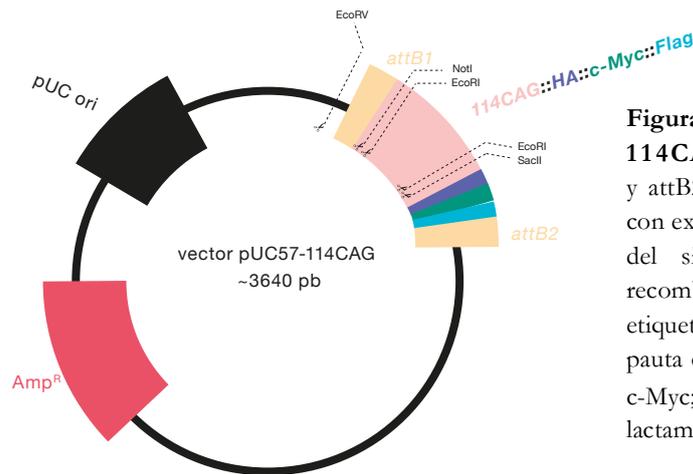


Figura 2.1. Construcción pUC57-AP1-114CAG::HA::c-Myc::Flag. Los sitios attB1 y attB2 flanquean el inserto y son compatibles con extremos de vectores de entrada (*entry vectors*, del sistema Gateway®) y sirven para la recombinación homóloga. Las secuencias de las etiquetas artificiales están por triplicado y en pauta con diferentes codones (CAG-HA; AGC-c-Myc; GCA-Flag). AMP^R: gen que codifica la β-lactamasa, que induce resistencia a ampicilina.

Para la incorporación de tripletes CAG a la secuencia #2 (ausencia de tripletes) empleamos las enzimas de restricción NotI y SacII para linealizar el vector sintetizado pUC57-AP2-HA::c-Myc::Flag(x3) y generar extremos cohesivos compatibles (**Anexo I – Tabla 2.21**). En paralelo, amplificamos un número reducido de tripletes CAG con cebadores que contenían sitios para las mismas enzimas de restricción en los extremos (**Tabla 2.23**). Tras la generación de sitios cohesivos (NotI y SacII) en el amplicón, ligamos este producto al vector digerido empleando la T4 ADN ligasa (#MB00703, Nzytech, Lisboa, Portugal). Después de transformar la ligación en *E. coli*, y tras incubarla a 37 °C durante toda la noche, aislamos clones positivos mediante selección con ampicilina/carbenicilina y cebadores universales (M13F y M13R; **Anexo I – Tabla 2.23**). Finalmente, obtuvimos el vector pUC57-AP3-24CAG::HA::c-Myc::Flag(x3) como control (**Anexo I – Tabla 2.21**).

Para la manipulación del modelo II (vea secuencia #3 en **Anexo II**), abordamos una estrategia similar al caso anterior para incorporar un número de repeticiones mayor y prescindir de las 9CAG incluidas (pUC57-AP4; **Anexo I – Tabla 2.21**). Empleamos las enzimas de restricción NotI y SacII para introducir una expansión mayor de 155 repeticiones de tripletes CAG, procedente del vector pAPG21 (**Anexo I – Tabla 2.5**) en el vector pUC57-AP4-ATG::9CAG::TdTomato (**Anexo I – Tabla 2.21**) digerido previamente con las mismas enzimas. Tras la transformación bacteriana, aislamos un clon positivo que contenía el vector pUC57 con 112CAG (**Figura 2.2**).

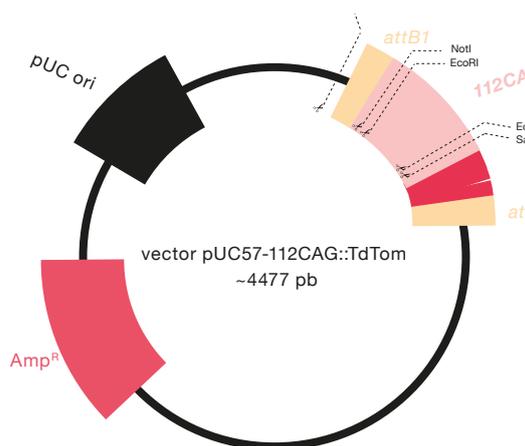


Figura 2.2. Vector plasmídico pUC57-AP5-ATG-112CAG::*TdTomato*. Sitios attB1 y attB2 flanqueantes al inserto compatibles para la recombinación usando el Sistema Gateway®. La zona repetitiva CAG está precedida por el codón de inicio ATG y en pauta con la secuencia de la proteína fluorescente *TdTomato*. Amp^R: gen que codifica la β-lactamasa, que induce resistencia a ampicilina.

El inserto *ATG-112CAG::TdTomato* fue incorporado al vector pDONR™221-P1P2. Posteriormente, eliminamos la región que contenía el ATG mediante las enzimas de restricción AscI y NotI que flanquean el codón ATG (vea secuencia #3 en **Anexo II**) y cebadores con extremos cohesivos (**Anexo I – Tabla 2.23**). Finalmente, obtuvimos un vector sin ATG con 112CAG en pauta con *TdTomato*, pAPG56 (**Anexo I – Tabla 2.5**). Este procedimiento fue idéntico para la obtención de la construcción control pAPG60-9CAG::*TdTomato* (**Anexo I – Tabla 2.5**).

1.7 Sistema Gateway para generar vectores de expresión génica en *C. elegans*

Para generar los vectores plasmídicos que van a dirigir la expresión de transgenes específicamente a tejidos en *C. elegans*, hemos basado nuestra estrategia en el sistema de clonación Gateway® (Invitrogen). Esta tecnología es un método de clonación universal basado en el sistema de recombinación homóloga específico de sitio del bacteriófago lambda. Este sistema permite encapsular varios insertos (por ejemplo, promotor::gen::terminador; promotor::gen::reportero::terminador) de manera modular y direccional (vea versión Multisite Gateway® Pro, Invitrogen). La recombinación homóloga ocurre en base a una secuencias específicas del bacteriófago lambda conocidas como sitios *att* (**Figura 2.3**). Estas secuencias son específicas y homólogas para cada vector plasmídico donador (vector donde se introduce el inserto de interés, pDONR) (**Figura 2.3**). Cada pareja de cebadores empleada para amplificar un amplicón debe incorporar sitios *attB* en sus extremos que serán específicos para sitios *attP* de vectores pDONR (**Figura 2.3, Anexo I – Tabla 2.5**). Los sitios *attB* recombinan con sitios *attP* mediante una reacción catalizada por la clonasa BP

(*attB-attP*) generando sitios *attL* en el vector de entrada (*entry vector*) que contiene el inserto (**Figura 2.3**). Los vectores con insertos diferentes pueden combinarse entre sí para generar diferentes vectores de expresión o vectores de destino (pDEST) mediante recombinación homóloga entre sitios *attL* (*entry vectors*) y *attR* (vectores de destino, pDEST) por medio de una clonasa LR (**Figura 2.3**).

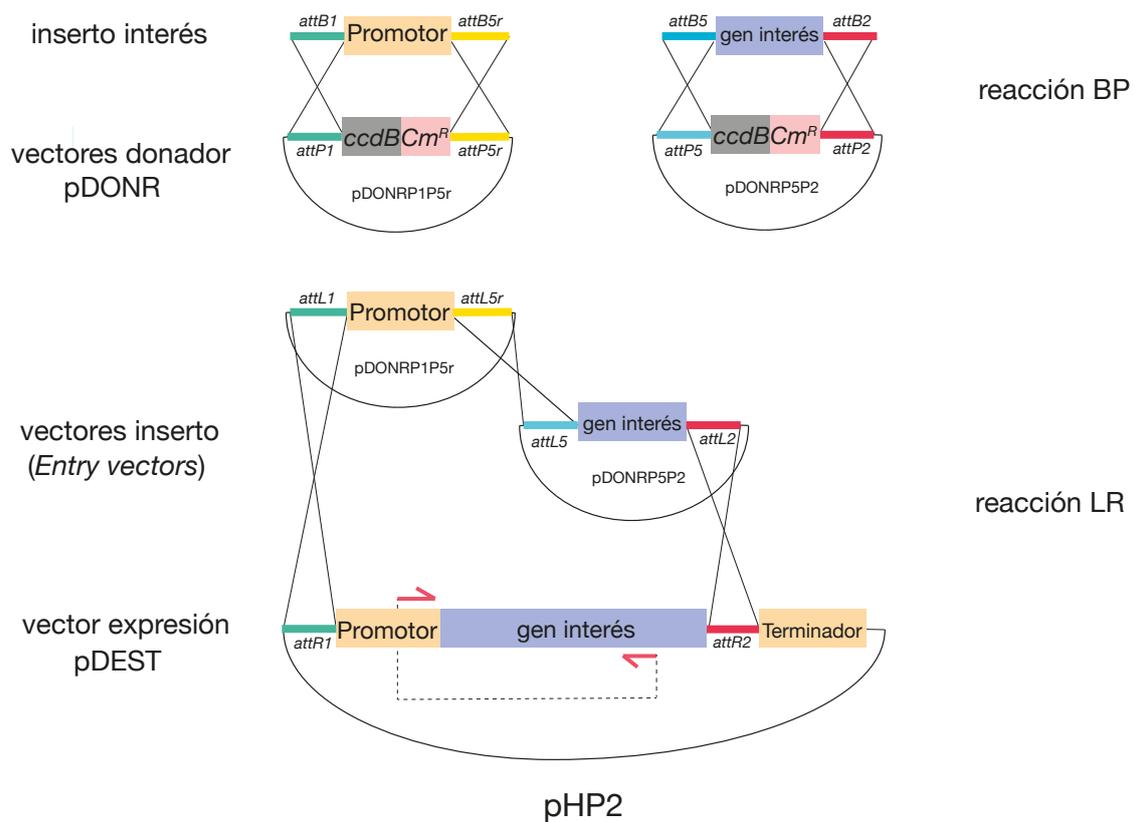


Figura 2.3. Sistema de clonación Gateway multiSite Pro para combinar dos secuencias de interés en el vector de destino pHP2. Los sitios *attB* incorporados en el inserto recombinan con sitios *attP* de los vectores pDONR; P1P5r y P5P2. La reacción BP produce sitios nuevos *attL* en los vectores de entrada que contienen el inserto, los cuales recombinan con sitios *attR* del vector de destino pHP2, mediante una reacción LR. El vector pHP2 contiene adicionalmente una secuencia terminadora de la transcripción del gen *unc-54*.

A partir del vector pDONR™ 221 comercial (**Figura 2.4**) hemos generado vectores que contienen promotores génicos, ADNc de genes de interés, terminadores de la transcripción, expansiones repetitivas de tripletes CAG y reporteros (**Anexo I – Tabla 2.5**).

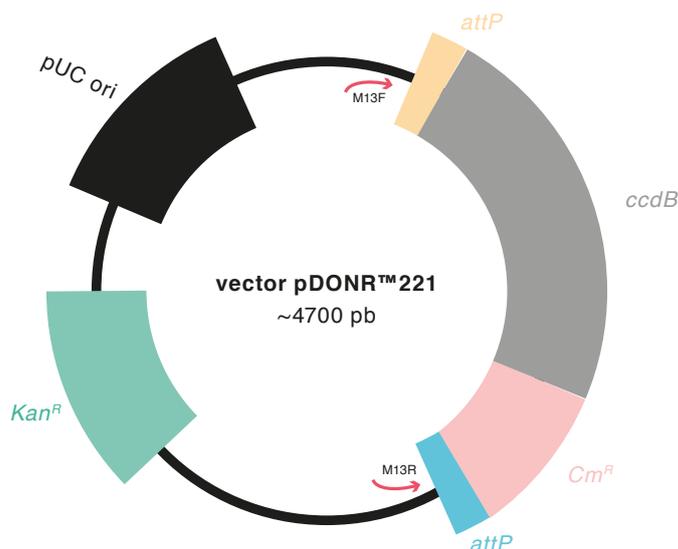


Figura 2.4. Vector pDONR™ 221 comercial. Los sitios *attP* permiten la recombinación homóloga de insertos con sitios *attB*. *Kan^R*: gen que codifica la neomicina fototransferasa II, que induce resistencia a kanamicina. *Cm^R*: gen que codifica la cloranfenicol acetil transferasa, que induce resistencia a cloranfenicol. *ccdB*: gen suicida para la selección de clones positivos.

Como generalidades, los vectores pDONR™ 221 incorporan una secuencia de ADN de 2 kb aproximadamente que se pierde tras la recombinación homóloga con sitios *attB* (**Figura 2.3**). Esta secuencia de ADN codifica para un gen, *ccdB*, que induce la muerte de las bacterias susceptibles (TOP10 y similares no recombinantes) y los clones no positivos no crecen. Por tanto, los pDONR™ 221 comerciales deben ser amplificados y cultivados en cepas bacterianas no sensibles al gen *ccdB*, tales como *E. coli ccdB Survival* (**Anexo I – Tabla 2.22**). Además, como opción alternativa los vectores incluyen dentro de esa misma secuencia un gen de resistencia a cloranfenicol (*Cm^R*) (**Figura 2.4**), permitiendo una doble selección en presencia de este antibiótico. La presencia del gen de resistencia a kanamicina (*Kan^R*) en los pDONR™ 221 permite la selección de los vectores recombinantes. Para poder rastrear estos clones positivos hemos empleado cebadores universales M13F y M13R (**Figura 2.4**).

Para la amplificación de los insertos de interés empleamos una Taq ADN polimerasa de alta fidelidad y que tiene corrección de lectura (#F-530L, Phusion® High Fidelity, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) (**Tabla 2.6 y 2.7**).

Tabla 2.6. Componentes de una reacción de PCR con ADN Taq polimerasa Phusion®.

Componente	V _{final} (μL)	[] _{final}
5X Phusion® tampón de reacción suplementado con 1,5 mM MgCl ₂	5	1X
Mezcla de nucleótidos	2,5	0,2 mM
Cebador directo	1	0,4 μM
Cebador reverso	1	0,4 μM
Phusion® ADN Taq polimerasa	0,25	0,5 U/25 μL
ADN molde (genómico, ADNc) ¹	X	200-300 ng/ 25 μL
H ₂ O libre de nucleasas hasta	25	

¹Para la amplificación de regiones promotoras fue empleado genómico de N2 como ADN molde. Para la amplificación de regiones génicas fue empleado ADNc de N2 como ADN molde.

Tabla 2.7. Programa de PCR para ADN Taq polimerasa Phusion®.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	98	1 min	1
Desnaturalización	98	0,5 seg	35
Hibridación	58-67 ¹	0,5 seg	
Extensión	72	20 seg/kb ²	
Extensión final	72	5 min	1
reposo	10	∞	1

¹Gradiente de temperatura para amplificar productos específicos. ²La Taq polimerasa Phusion amplifica 1 kb cada 20 seg.

Los productos de PCR purificados fueron incorporados a una reacción BP (Tabla 2.8) para recombinar con el pDONR™ 221 correspondiente durante al menos 1 h a temperatura ambiente. La BP clonasa fue inactivada con 0,5 μL de proteinasa K (incluida en el kit comercial) durante 10 minutos a 65 °C. Seguidamente, el producto de la reacción BP fue empleado (0,7 – 1 μL) para transformar células electrocompetentes *E. coli*.

Tabla 2.8. Componentes de una reacción BP.

Componente	Volumen (μL)
Producto de PCR <i>attB</i> (15-150 ng)	(1-3) ¹
Vector pDONR™ 221 (80-100 ng)	(0,5-1) ²
Clonasa BP ³	1
Tampón TE ⁴ hasta	5

¹La cantidad de producto de PCR fue calculada mediante la siguiente fórmula: $\text{ng}(\text{inserto}) = 25 \text{ fmoles} \times (\text{pb inserto}) \times (660 \text{ fgramos/fmoles}) \times (1 \text{ ng}/10^6 \text{ fgramos})$. ²La cantidad de vector fue calculada mediante la siguiente fórmula: $\text{ng}(\text{inserto}) = 25 \text{ fmoles} \times (\text{pb vector}) \times (660 \text{ fgramos/fmoles}) \times (1 \text{ ng}/10^6 \text{ fgramos})$. ³Vortear y mezclar la clonasa BP antes de adicionarla a la reacción. ⁴Tampón Tris-EDTA pH 8.0.

Los clones recombinantes fueron seleccionados en placas de LB agar (del inglés *Luria Bertani*) suplementadas con kanamicina (50 μg/μL) y validados por PCR usando cebadores universales M13F y M13R (Tabla 2.3 y 2.4). Los vectores pDONR 221 generados fueron combinados con vectores pDEST usando el sistema Gateway (Figura 2.3).

Fueron empleados dos vectores pDEST en función de la aproximación experimental (Anexo I – Tabla 2.21). En el capítulo III de Resultados, los vectores de expresión fueron obtenidos a partir del plásmido pDEST-HP2 (Walker et al., 2009) (Figura 2.5). Este vector fue utilizado para clonar solamente dos insertos distintos, puesto que el vector de expresión pHP2 contiene de base una secuencia terminadora de la transcripción del gen *unc-54* (Figura 2.5). Además, a diferencia de los vectores pDONR™ 221, contiene un gen de resistencia a ampicilina (Figura 2.5) para la selección de los clones recombinantes.

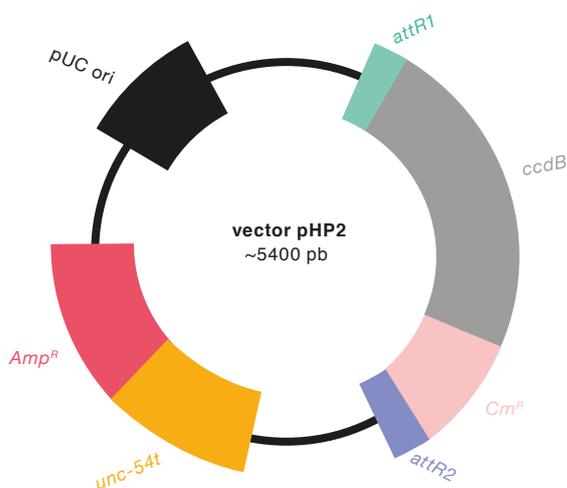


Figura 2.5. Vector pDEST pHP2-R1-R2. El vector de expresión pHP2 permite la recombinación homóloga simultánea de 2 insertos en una misma reacción LR (*attL-attR*). El vector contiene la secuencia terminadora del gen *unc-54*. *Amp^R*: gen que codifica la β-lactamasa, que induce resistencia a ampicilina. *Cm^R*: gen que codifica la cloranfenicol acetil transferasa, que induce resistencia a cloranfenicol. *ccdB*: gen suicida para la selección de clones positivos.

En el capítulo I de Resultados, las construcciones de tripletes CAG fueron diseñadas para su inclusión en el vector de destino pCFJ150 (**Figura 2.6**). Este vector permite combinar al menos tres insertos en un mismo vector (**Figura 2.7**), a diferencia del sistema anterior. El vector pCFJ150 contiene sitios de recombinación específicos y flanqueantes al sitio de localización del transposón (*ttTi5605*; **Figura 2.6**, sitios L y R MosSCI (Frøkjær-Jensen et al., 2008)) que permiten integrar el transgén incorporado en regiones conocidas del genoma de *C. elegans* (vea sección Metodología – sistema MosSCI). Puesto que las cepas donde se introducen los transgenes son deficientes para el gen *unc-119*, el vector contiene la secuencia genómica del gen (**Figura 2.6**), como gen de selección, para rescatar la función de este gen en animales deficientes para *unc-119* y facilitar la selección de líneas transgénicas positivas.

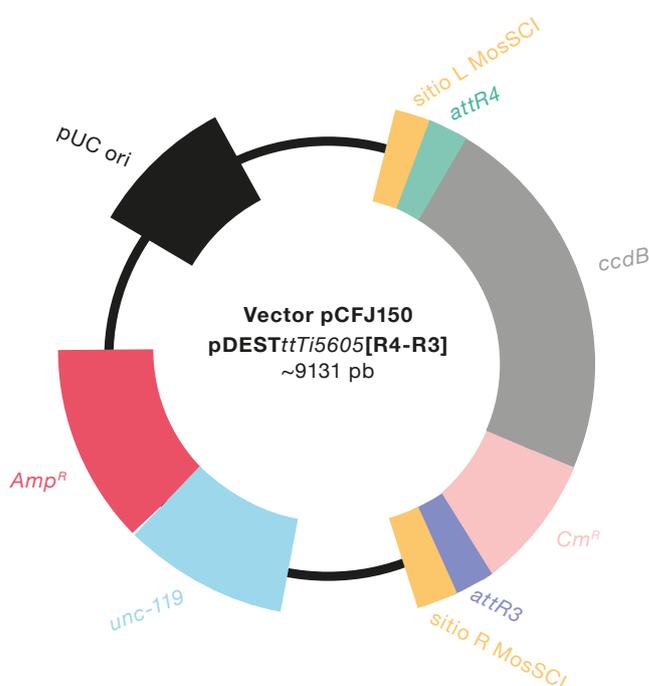


Figura 2.6. Vector pDEST pCFJ150-R4-R3. El vector de expresión pCFJ150 permite la recombinación homóloga simultánea de tres insertos en una misma reacción LR (*attL-attR*). Los sitios de recombinación MosSCI (L y R) permiten integrar el inserto en sitios conocidos del genoma de *C. elegans* mediante la tecnología Mos1-SCI (del inglés *Single Copy Insertion*). *Amp^R*: gen que codifica la β -lactamasa, que induce resistencia a ampicilina. *Cm^R*: gen que codifica la cloranfenicol acetil transferasa, que induce resistencia a cloranfenicol. *ccdB*: gen suicida para selección de clones positivos. Secuencia del gen *unc-119* para la selección de clones positivos.

Los vectores pDONR generados (**Anexo I – Tabla 2.5**) fueron incubados en presencia de la LR clonasa (**Tabla 2.9**) con su correspondiente pDEST (pHP2, pCFJ150) durante al menos 16 h para facilitar la recombinación homóloga entre sitios *attL-attR* (**Figura 2.3** y **2.7**). La LR clonasa fue inactivada con 1 μ L de

Material y Métodos

proteínasa K a 65 °C 10 min y el producto de reacción fue empleado para transformar bacterias *E. coli*. Para la selección de los clones de expresión recombinantes fueron empleados cebadores específicos de cada inserto flanqueante en una PCR analítica (**Figura 2.3, 2.7 y Anexo I – Tabla 2.10**).

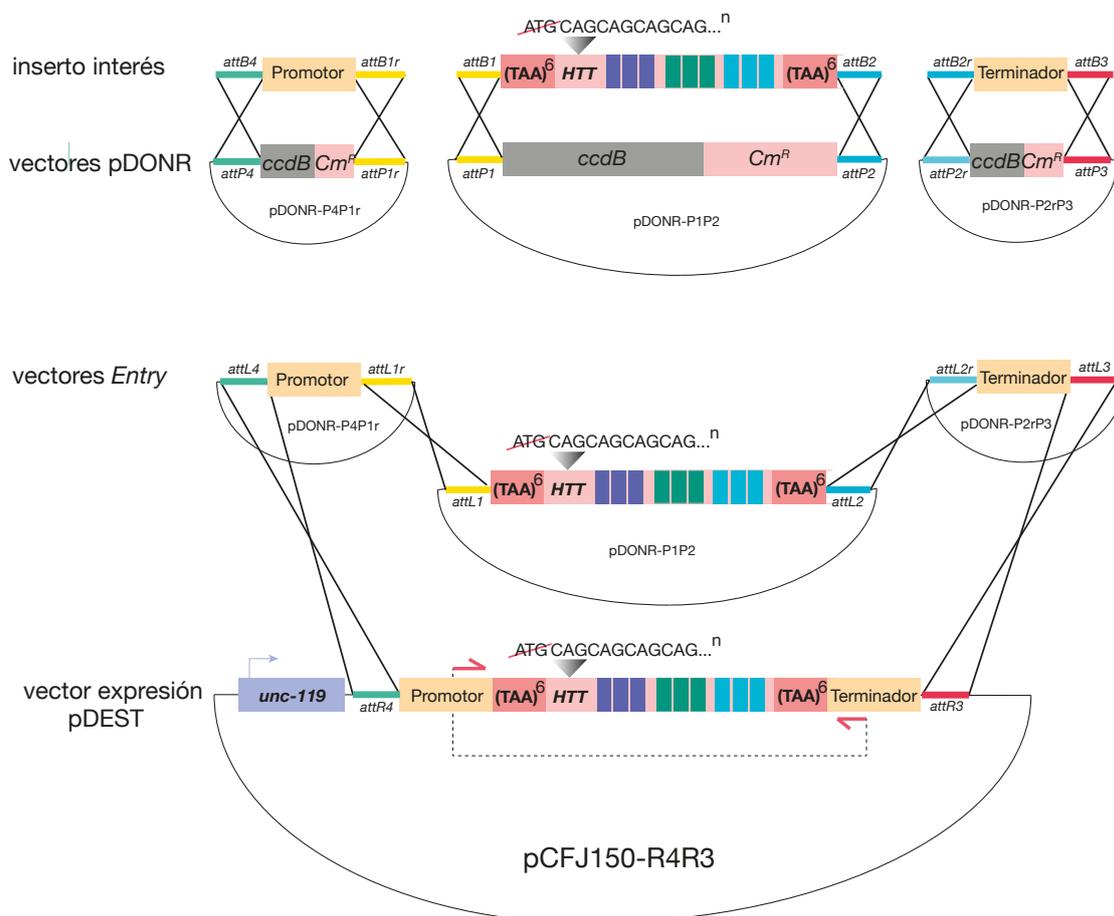


Figura 2.7. Sistema de clonación Gateway multiSite Pro para recombinar tres insertos en el vector integrativo pCFJ150. Los sitios *attB* incorporados en el inserto recombinan con sitios *attP* de los vectores pDONR; P1P5r, P1P2 y P2rP3r. La reacción BP produce sitios *attL* en los vectores con inserto (*Entry vectors*) que recombinan con sitios *attR* del vector de destino (pCFJ150) mediante una reacción LR. Las flechas rojas incluidas en el vector pCFJ150 indican cebadores específicos de la secuencia promotora y terminadora que amplifican el inserto de tripletes CAG etiquetado. HA(x3) (color púrpura); c-Myc(x3) (color verde); Flag(x3) (color azul).

Tabla 2.9. Componentes de una reacción LR.

Componente	Volumen (μL)
Vectores pDONR recombinantes (10 fmoles/vector) ¹	(1-7)
Vector de destino (20 fmoles) ²	(0,5-1)
Clonasa LR ³	2
Tampón TE ⁴ hasta	10

¹La cantidad de vector pDONR recombinante fue calculada mediante la siguiente fórmula: $\text{ng (vector recombinante)} = 10 \text{ fmoles} \times (\text{pb vector recombinante}) \times (660 \text{ fgramos/fmoles}) \times (1 \text{ ng}/10^6 \text{ fgramos})$. Para los cálculos es importante considerar que se pierden ≈ 2000 pb de vector pDONR221 en la reacción BP. ²La cantidad de vector de destino fue calculada mediante la siguiente fórmula: $\text{ng (vector)} = 20 \text{ fmoles} \times (\text{pb vector}) \times (660 \text{ fgramos/fmoles}) \times (1 \text{ ng}/10^6 \text{ fgramos})$. ³Vortear y mezclar la clonasa LR antes de adicionarla a la reacción. ⁴Tampón Tris-EDTA pH 8.0.

Para el análisis de clones con tripletes CAG se optimizaron las condiciones de PCR estándar (**Tabla 2.3** y **2.4**). Se adicionó un 3 % de DMSO (0,75 μL/reacción) a la mezcla de reacción de PCR y se prolongó el tiempo de extensión a 4 min para facilitar la amplificación de regiones repetitivas.

1.8 Generación de cepas transgénicas con inserciones en sitios definidos mediante la tecnología MosSCI

Como hemos comentado previamente, el vector de destino pCFJ150 está adaptado para combinarse con la tecnología MosSCI (inserciones de copia única mediadas por la movilización de transposones miniMos). Los miniMos contienen la región mínima para que el transposón Mos1 de *D. melanogaster* pueda moverse (Frøkjær-Jensen et al., 2008, 2012; Robert and Bessereau, 2007).

Christian Frøkjær-Jensen y colaboradores han generado cepas de *C. elegans* que contienen inserciones universales de Mos1 en la posición *ttTi5605* del genoma del *C. elegans* que permite dirigir y controlar la inserción de transgenes exógenos (**Figura 2.8**). La combinación de esta tecnología y el sistema Gateway permite introducir por recombinación homóloga inserciones complejas en sitios conocidos del genoma para su expresión constitutiva o inducible (Frøkjær-Jensen et al., 2008; Zeiser et al., 2011). Los vectores pAPG23, 38 y 47, que contienen tripletes CAG bajo el control de los promotores *myo-3*, *unc-25* y *rab-3*, respectivamente (**Anexo I – Tabla 2.10**), fueron inyectados sobre la cepa EG8079, la cual contiene una copia del transposón Mos1 en la región genómica *ttTi5605* del cromosoma II y es deficiente para *unc-119* (Frøkjær-Jensen et al., 2008).

La mezcla de inyección contiene varios componentes que intervienen en la recombinación homóloga del inserto y en la selección de cepas transgénicas (Tabla 2.11).

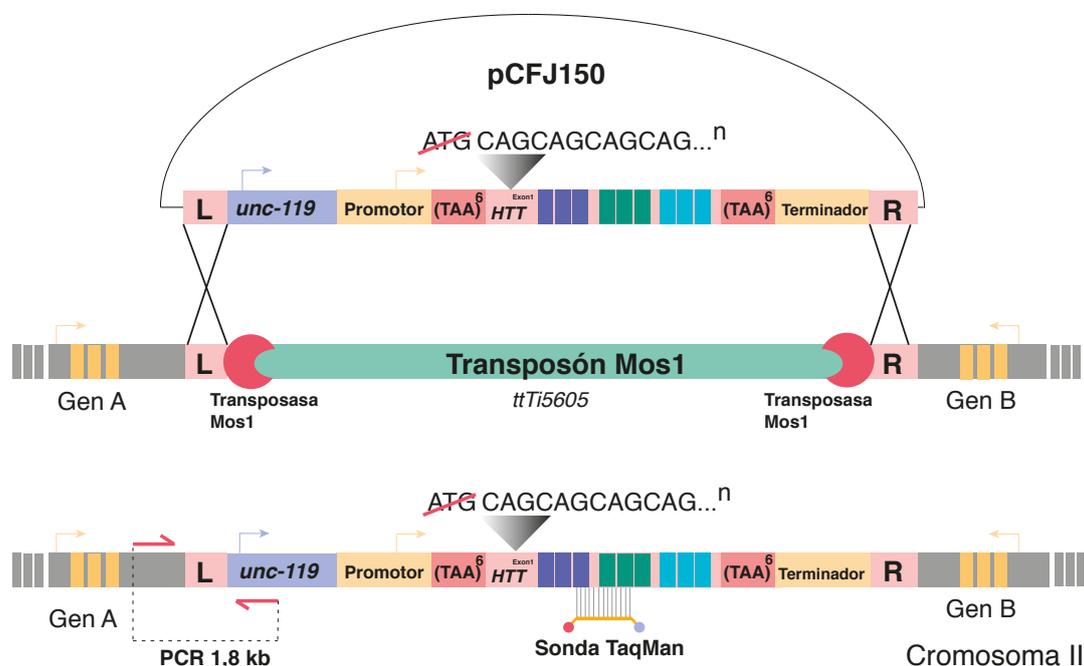


Figura 2.8. Tecnología de inserción de copias únicas de manera dirigida en el genoma de *C. elegans* mediante la movilización de transposones Mos1 (MosSCI). El vector de expresión pCFJ150 contiene sitios de recombinación homóloga (L y R) flanqueantes al sitio de inserción (ocupado por el transposón Mos1). La expresión de la transposasa Mos1 escinde el transposón, permitiendo la entrada de una única copia del inserto de interés. Cebadores específicos (fechas rojas) situados en la región genómica flanqueante y dentro de la secuencia del gen *unc-119*, incorporado tras la recombinación, son empleados para la detección de cepas transgénicas (amplicón 1,8 kb). La sonda Taqman prediseñada, para analizar la expresión del transgén, hibrida específicamente en la región etiquetada con HA y c-Myc.

La transposasa Mos1, expresada en las células de la línea germinal, bajo el control del promotor del gen *eft-3*, escinde el transposón Mos1, generando roturas en el ADN que propician la inserción del transgén diana mediante recombinación homóloga (Figura 2.8). Los integrantes fueron verificados mediante un cebador directo específico de la región flanqueante al sitio de inserción y un cebador inverso específico al gen *unc-119* (que va incorporado en el vector integrativo) (Figura 2.8, Anexo I – Tabla 2.2). El amplicón positivo fue visualizado en un gel de agarosa al 1 % con un tamaño de banda de 1,8 kb.

Tabla 2.11. Componentes de una mezcla de inyección para generar inserciones por MosSCI.

Componente	[] _{final} (ng/μL)	V _{final} (μL)	Finalidad
<i>eft-3p::transposasa</i> <i>Mos1</i>	50	(0,5-1)	Escisión transposón Mos1 en la línea germinal
<i>hsp-16.41p::peel1::</i> <i>tbb-2_i</i>	10	(0,5-1)	Gen letal inducible por choque térmico a 34 °C que produce la muerte de animales transgénicos sin inserción (marcador de selección negativa)
<i>rab-3p::mCherry::</i> <i>unc-54_i</i>	10	(0,5-1)	Marcador de selección negativa en población transgénica sin inserción mediante la expresión de mCherry en sistema nervioso, músculo y faringe, respectivamente
<i>myo-3p::mCherry::</i> <i>unc-54_i</i>	5	(0,5-1)	
<i>myo-2p::mCherry::</i> <i>unc-54_i</i>	2,5	(0,5-1)	
ADN diana	25-50	(1-2)	Expresión constitutiva de transgenes en <i>C. elegans</i>
ADN neutro (pYES) hasta	120	(1-2)	Generación de un “cromosoma satélite” que integra a todos los componentes para su expresión simultánea en <i>C. elegans</i>
Tampón TE pH 8.0 hasta		10	Vehículo

1.9 Generación de cepas transgénicas con múltiples copias no integradas

Las mezclas de ADN para la inyección fueron preparadas mediante los componentes descritos en la **Tabla 2.12**. Los reporteros *myo-2p::GFP* y *myo-2p::mCherry* facilitaron la selección de la población transgénica tras la inyección. El ADN diana fue inyectado mayormente a una concentración de 50 ng/μL para inducir rescate (excepto para casos excepcionales que se redujo la concentración a 5-10 ng/μL), mientras que para interferir genes específicos empleamos concentraciones de igual o menores a 5 ng/μL. Cada mezcla fue inyectada siguiendo instrucciones previamente descritas (Mello and Fire, 1995).

Tabla 2.12. Componentes de una mezcla de inyección estándar.

Componente	[] _{final} (ng/μL)	V _{final} (μL)	Finalidad
<i>myo-2p::mCherry::unc-54</i> o ¹ <i>myo-2p::GFP::unc-54</i>	2,5	(0,5-1)	Marcador de transgénesis mediante la expresión de la proteína fluorescente mCherry o GFP en faringe
ADN diana	2,5-50 ²	(1-2)	Expresión constitutiva de genes y transgenes no integrados bajo promotores específicos en <i>C. elegans</i>
ADN neutro (pYES) hasta	120	(1-2)	Generación de un “array extracromosómico” que incorpora todos los componentes para la expresión en <i>C. elegans</i>
Tampón TE pH 8.0 hasta		10	Vehículo

¹El marcador de transgénesis empleado normalmente ha sido *myo-2p::mCherry*, solamente en ciertos casos, donde no había fondo *40Q::YFP*, se ha empleado *myo-2p::GFP*. ²El rescate con ADNc fue inducido a concentraciones de 50 ng/μL, mientras que el ARNi fue realizado a concentraciones menores (2,5 – 5 ng/μL).

1.10 Generación de mutantes de pérdida de función mediante el sistema CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR/Cas9 fue empleado para generar mutaciones de pérdida de función en genes que se localizan físicamente, en el cromosoma del gusano, cerca del transgén *unc-54p::40Q::YFP* (Tabla 2.13). Nuestro diseño se ha fundamentado en base a la estrategia desarrollada por el grupo del Dr. Julián Cerón (Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge, IDIBELL, Barcelona, España) (Vicencio et al., 2019).

Hemos empleado la edición génica por CRISPR principalmente para emular alelos descritos o propiciar grandes deleciones, que se sitúan físicamente cerca del transgén *unc-54p::40Q::YFP*, como es el caso de *nhr-1* y *daf-12* (Figura 2.9-A) y que por tanto, son difíciles, si no casi imposibles, de introducir mediante cruzamientos entre las cepas de interés. En ambos casos, realizamos predicciones de posibles secuencias de ARN guía (ARNg) que tuviesen secuencias palindrómicas (conocidas como PAM, NGG en el genoma) próximas a la región que se pretendía editar. Estas secuencias son reconocidas por la nucleasa Cas9, la cual introduce cortes 3 pb “aguas bajo” de las mismas (Figura 2.9-B). Para la obtención de predicciones empleamos la herramienta en línea disponible (<http://crispr.cos.uni-heidelberg.de>). Esta herramienta facilita información sobre la eficiencia del ARNg en valores de 0-1 (bajo/medio/alto) y

posibles dianas no específicas de corte en otros genes (del inglés *off-targets*). En nuestro diseño seleccionamos guías cuyo índice de eficacia estuviese próximo a 0,6 o superior y, a ser posible, que fuera específica para una única diana (Tabla 2.13).

Tabla 2.13. Secuencias de ARN guía para introducir mutaciones puntuales y deleciones mediante el sistema CRISPR/Cas9.

Secuencia ADN del ARN guía (ARNg) (5'-3') ¹	Eficiencia ² / otras dianas	Gen	Alelo	Tipo mutación	ADN molde de cadena simple (5'-3') ³
gctaccatagggcaccacgagcgg	0,67/1	<i>dpy-10</i>	<i>cn64</i>	puntual	cacttgaacttcaatcggcaagat gagaatgactggaaccgtaccgc atgctgtgcctatgtagcggagc ttccatggcttcagaccaacagcc tat
acgagcttggattccacgagg	0,76/0	<i>aakb-1</i>	<i>vlt18</i>	delección ≈ 2,1 kb	
agaggctaaatcctgtcgagg	0,76/0				
accggagctctcccacaaatgg	0,62/2	<i>inx-2</i>	<i>vlt22</i>	delección completa	acgtagcgtttgctgctgcacacct cgcgtagtgtcgcggttcgatta cttgcgtggGGAACatactg tactgatcgatcaagatcttctcactg tcttctgctccatcaccagccatattc ataatttcttcaat
gcacaatgagaaccagtattagg	0,70/1				
atattatggatgttaccatgagg	0,66/0	<i>daf-12</i>	<i>vlt19</i>	delección ≈ 500 pb	
ggaatcgttgttcggagagcagg	0,58/1				
acgaagaacaactgctggcggagg	0,60/1		<i>vlt20</i>	delección ≈ 5,1 kb	
ggaatcgttgttcggagagcagg	0,58/1				
caccactccacacgtcttcagg	0,7/0	<i>nhr-1</i>	<i>vlt15</i> <i>vlt16</i>	inserción (cambio de pauta) puntual	ccaacgaagaaaatcaagatgag cagcggatctgacgacgagcaag ccaccactccacacagactcLaag accaggtcagtgggcgaacacat ttacccaattggatgcatcttgaa tttcaacaa

¹Secuencias PAM (NGG) en rojo. ²Eficiencia (0-1). ³El oligonucleótido de ADN molde para mutaciones puntuales, *vlt15* y *vlt16*, incorpora el cambio de nucleótido mutante (T) y cambios inocuos en rojo para facilitar el genotipado de las cepas mutantes mediante el diseño de cebadores (secuencia subrayada) en esa región. Para las deleciones, solamente hemos incluido ADN molde para *inx-2*, marcando en rojo el ADN exógeno, que facilita el genotipado de las cepas mediante cebadores específicos (secuencia subrayada).

Para emular/introducir mutaciones puntuales, como es el caso de *nhr-1(vlt16)*, la secuencia de ARNg conviene que esté próxima al sitio de cambio (C/T), para propiciar el corte lo más cercano posible (Figura 2.9-B). Para estos casos, hemos empleado un oligonucleótido largo de ADN de cadena simple (ssODN) que contiene el cambio mutante (Figura 2.9-B). Además, este ssODN contiene cambios adicionales inocuos, normalmente en la tercera base de cada codón, para no variar la pauta de lectura y evitar que hayan eventos de recombinación homóloga antes del sitio que nos interesa (Figura 2.9-B). Para promover la recombinación homóloga, el ssODN contiene 60 pb de secuencia complementaria al genoma de *C. elegans* que flanquean la zona de cambio, que

propician la inserción del ssODN, tras la rotura del ADN por la enzima Cas9 (**Figura 2.9-B**). Esta estrategia se ha empleado para la obtención de las mutaciones puntuales *vlt15* y *vlt16*, en el gen *nhr-1*. El alelo *vlt16* emula la mutación *n6242* (Burton et al., 2018) que codifica un codón de parada prematuro (TAG) al final del exón 5 del gen *nhr-1*. En contraste, el alelo *vlt15* fue obtenido por un error durante la recombinación homóloga del ssODN en el locus *nhr-1*. *vlt15* contiene una inserción que induce un cambio de pauta de lectura que propicia la aparición de un codón de parada más tardío (TGA) al cambio *vlt16* (**Figura 2.9-C y D**). Ambos alelos se han considerado para su caracterización sobre un contexto de poliQs en esta Tesis.

Para generar deleciones en los genes *aakb-1* y *daf-12*, se emplearon dos secuencias de ARNg complementarias a regiones codificantes, mientras que para *inx-2* los ARNg se diseñaron en regiones flanqueantes a las zonas reguladoras 3' y 5'UTR (**Figura 2.10, Tabla 2.13**). El corte simultáneo con los dos ARNg produjo roturas de más de 5 kb en *daf-12*, la pérdida casi completa de *aakb-1* y la pérdida completa de *inx-2* (**Figura 2.10**). La disrupción del gen *aakb-1* fue inducida mediante ARNg complementarios a regiones codificantes de los exones 1 y 4 (**Figura 2.10-A y Tabla 2.13**). Tras un proceso de recombinación homóloga inesperado, se aisló el alelo *vlt18* que contiene una región parcial del gen *aakb-1*, incluyendo el sitio donador de ajuste alternativo del exón 1 (**Figura 2.10-A**). Tras la deleción, el sitio donador uniría parte del exón 1 y el exón 4 completo, dando lugar a una proteína truncada (**Figura 2.10-A**). La deleción *vlt18* contempla una pérdida parcial del dominio de unión a carbohidratos (CBM; del inglés *Carbohydrate-Binding Module*), el cual es esencial para su unión con salicilato y promover la activación de AMPK (**Figura 2.10-A**). Por otro lado, el alelo *vlt22* produce una pérdida completa del gen *inx-2* (**Figura 2.10-B**). Para generar esta deleción se diseñaron dos ARNg en las regiones anterior y posterior a la ORF del gen *inx-2* y además, a diferencia de los otros casos, se incorporó un ssODN que contiene una región que no codifica (**Tabla 2.13**) para facilitar el rastreo de mutantes *inx-2(vlt22)* (**Figura 2.10-B**).

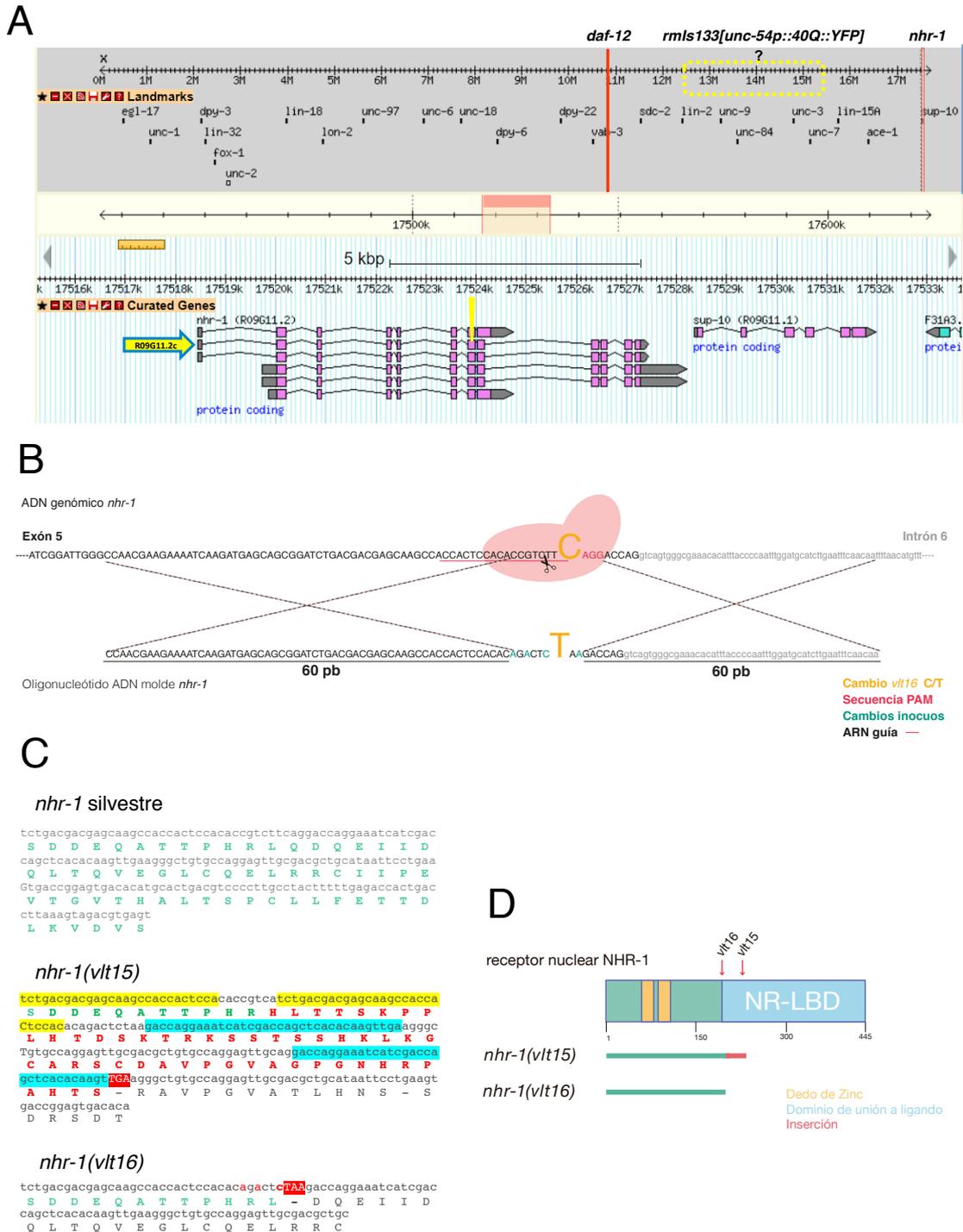


Figura 2.9. Diseño de CRISPR/Cas9 para introducir cambios puntuales en el gen *nhr-1*. (A) El transgén *rmIs133[unc-54p::40Q::YFP]* está próximo a las regiones genómicas donde se localizan los genes *nhr-1* y *daf-12* en el cromosoma X. El locus *nhr-1* codifica seis isoformas de NHR-1. La isoforma R09G11.2c ha sido empleada para la restauración funcional de NHR-1 en células musculares. En color amarillo está marcado el exón que contiene el cambio *vlt16*. (B) Diagrama de diseño y corte específico con Cas9 para introducir el cambio *vlt16* en *nhr-1* que emula el alelo descrito *n6242*. (C) El alelo *vlt15* contiene inserciones en duplicado (sombreado en amarillo y azul) que inducen un cambio de pauta (pauta en rojo) y seguidamente, un codón de parada TGA. El alelo *vlt16* contiene el cambio C/T que introduce un codón de parada TAA previo, al cambio *vlt15*. En rojo se detallan los cambios inocuos que no afectan a la pauta de lectura normal. (D) Diagrama

Material y Métodos

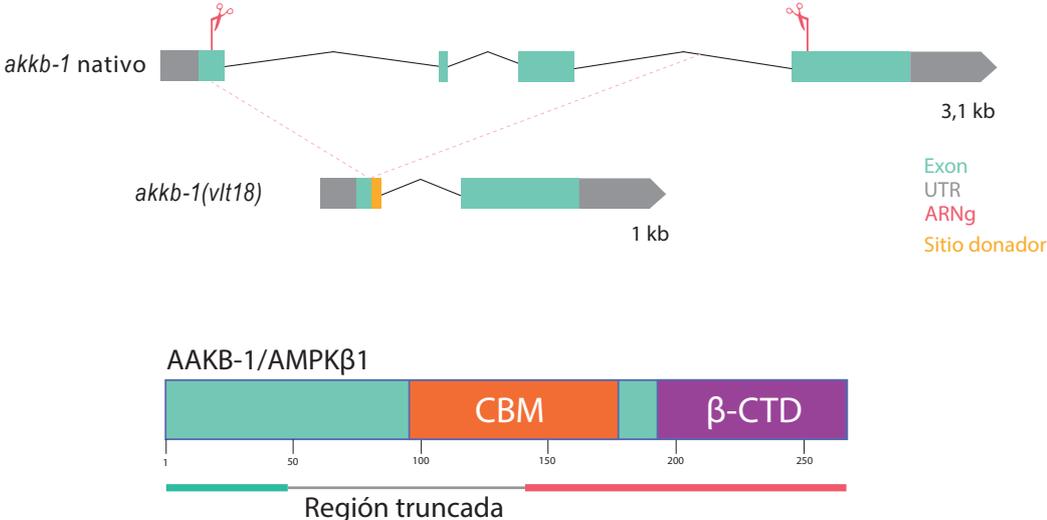
representativo de los dominios del receptor nuclear NHR-1 considerando las implicaciones de los alelos *vlt15* y *vlt16* sobre la estructura de NHR-1. Los alelos *vlt15* y *vlt16* codifican un codón de parada prematuro (TAA y TGA, respectivamente) que impide la traducción completa de la proteína, y la pérdida del dominio de unión a ligando, dando lugar a una proteína truncada potencialmente disfuncional.

Por último, el receptor DAF-12 contiene un dominio de unión a ADN (DBD; del inglés *DNA-Binding Domain*) y un dominio de unión a ligando (LBD; del inglés *Ligand-Binding Domain*) (**Figura 2.10-C**). Como la región genómica de *daf-12* está localizada muy próxima a la inserción que contiene el transgén *unc-54p::40Q::YFP* (**Figura 2.9-A**), hemos introducido diferentes deleciones para producir la pérdida parcial o completa del dominio LBD (**Figura 2.10-C**). Este receptor ha sido ampliamente estudiado y ha permitido la generación de una amplia gama de alelos de pérdida y ganancia de función. Concretamente, el alelo *rh273* interrumpe la unión física del ligando, dando lugar a una ganancia de función de la proteína, mientras que la combinación de alelos, *rh411* y *rh61*, inhabilitan tanto su capacidad de unión al ADN como de unión al ligando, respectivamente, considerándose un mutante nulo (**Figura 2.10-C**).

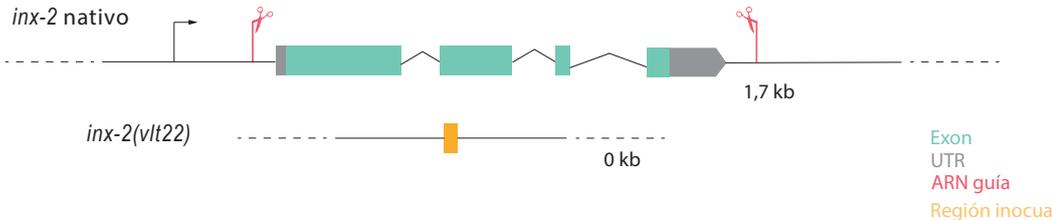
Como una primera aproximación, se generó una deleción pequeña, *vlt19*, que induce una pérdida parcial del dominio LBD y probablemente daría lugar a una proteína truncada (**Figura 2.10-C**). Sin embargo, posteriormente, se generó una deleción, *vlt20*, que implicaba una gran pérdida de gran parte de la proteína DAF-12, junto con el dominio LBD (**Figura 2.10-C**). El alelo *vlt20* no induce la pérdida del dominio DBD, aun así, es poco probable que codifique una proteína funcional.

Los componentes incluidos en la mezcla de inyección para generar mutaciones puntuales (**Tabla 2.14**) y deleciones (**Tabla 2.15**) fueron centrifugados a máxima velocidad durante 10 min. Posteriormente, la mezcla fue incubada a 37 °C durante 15 min para permitir el ensamblaje del sistema y finalmente, congelada a -20 °C para su conservación. La disrupción del gen *dpy-10* fue usado como marcador positivo de la técnica como se ha descrito por otros autores (Prior et al., 2017).

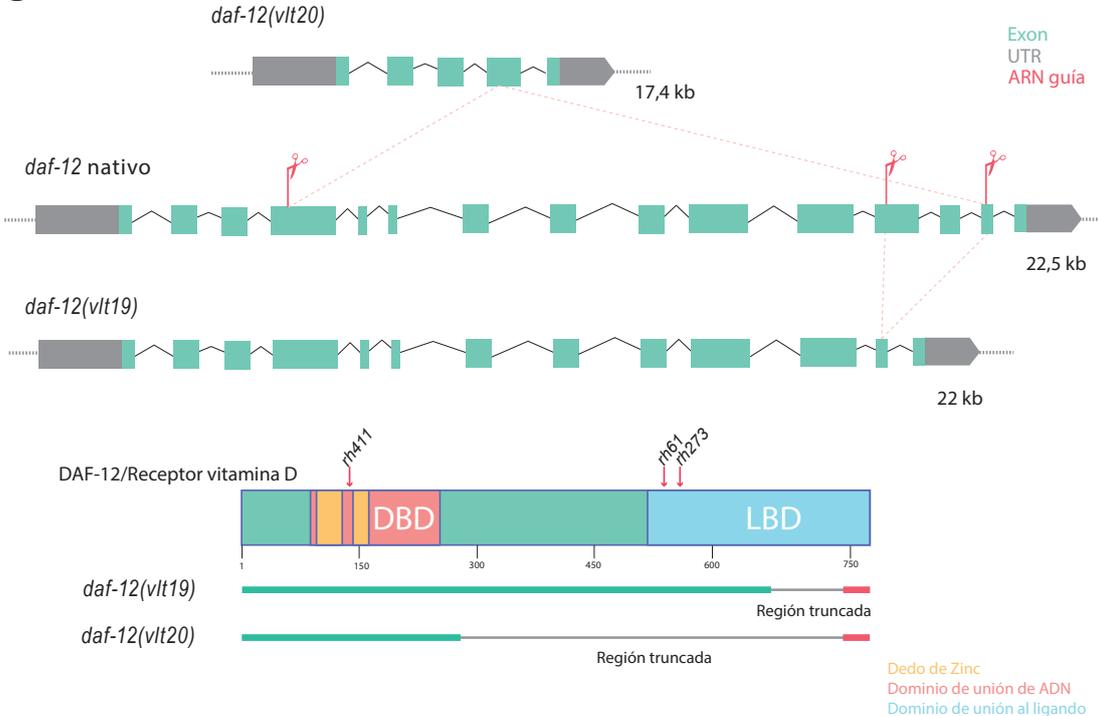
A



B



C



Material y Métodos

Figura 2.10. Diagrama de CRISPR/Cas9 para generar deleciones en *aakb-1*, *inx-2* y *daf-12*. (A) Disrupción del gen *aakb-1* mediante el corte simultáneo con dos secuencias de ARNg complementarias a los exones 1 y 4. La región delecionada, *vlt18*, afecta a gran parte de la región N-terminal de la proteína AAKB-1 y parte del dominio de unión de carbohidratos (CBM; del inglés *Carbohydrate-binding module*), esencial para unir salicilato. El dominio β -CTD (del inglés *C-terminal Domain*) es esencial para el anclaje de las subunidades α y γ de AMPK. (B) Disrupción del gen *inx-2* mediante el corte simultáneo con dos ARNg complementarias a regiones intrónicas adyacentes a las zonas reguladoras 3' y 5'UTR. La deleción *vlt22* induce la pérdida completa del gen *inx-2*. (C) Disrupción del gen *daf-12* mediante la combinación de dos secuencias de ARNg complementarias a los exones 12 y 14 (alelo *vlt19*) y la combinación de guías complementarias para el exón 4 y 14 (alelo *vlt20*). La deleción *vlt19* elimina 500 pb en la región C-terminal de la proteína DAF-12, que afectan principalmente al dominio de unión al ligando (LBD; del inglés *Ligand-binding domain*). *vlt20* induce la pérdida completa de LBD y la región flanqueante entre LBD y el dominio de unión a ADN (DBD; del inglés *DNA binding-domain*).

Tabla 2.14. Mezcla de inyección para generar mutaciones puntuales por CRISPR/Cas9.

Componente ¹	[] _{final}	V _{final} (μ L)	Referencia
Alt-R™ S.p. Cas9 Nucleasa 3NLS	4,5 μ M	1,64	#1081059, IDTDNA
Alt-R™ CRISPR/Cas9 tracrARN	32 μ M	1	#1073190, IDTDNA
ARN guía <i>dpy-10(cn64)</i>	35 μ M	1	IDTDNA, este estudio
Oligonucleótido molde <i>dyp-10</i>	175 ng/ μ L	0,75	IDTDNA, este estudio
ARN guía gen diana	35 μ M	3,5	IDTDNA, este estudio
Oligonucleótido molde gen diana	175 ng/ μ L	1,75	IDTDNA, este estudio
H ₂ O estéril hasta		10	

¹Los ARNg fueron disueltos en 20 μ L de tampón IDTE (Tris-EDTA pH 8.0) libre de nucleasas. El oligonucleótido de ADN molde de cadena simple fue disuelto en tampón IDTE para obtener una concentración de 1 μ g/ μ L de acuerdo a su peso molecular.

Tabla 2.15. Mezcla de inyección para generar deleciones por CRISPR/Cas9.

Componente ¹	[] _{final}	V _{final} (μ L)	Referencia
Alt-R™ S.p. Cas9 Nucleasa 3NLS	4,5 μ M	1,64	#1081059, IDTDNA
Alt-R™ CRISPR/Cas9 tracrARN	32 μ M	1	#1073190, IDTDNA
ARN guía <i>dpy-10(cn64)</i>	35 μ M	1	IDTDNA, este estudio
Oligonucleótido molde <i>dyp-10</i>	175 ng/ μ L	0,75	IDTDNA, este estudio
ARN guía 1 gen diana	17,5 μ M	1,75	IDTDNA, este estudio
ARN guía 2 gen diana	17,5 μ M	1,75	IDTDNA, este estudio
Oligonucleótido molde gen diana ²	175 ng/ μ L	1,75	IDTDNA, este estudio
H ₂ O hasta		10	

¹Los ARNg fueron disueltos en 20 μ L de tampón IDTE (Tris-EDTA pH 8.0) libre de nucleasas. Los oligonucleótidos de ADN molde de cadena simple fueron disueltos en tampón IDTE para obtener una concentración de 1 μ g/ μ L de acuerdo a su peso molecular. ²Fue añadido solamente para generar la deleción *inx-2(vlt22)*, en los otros casos el volumen fue sustituido con H₂O.

1.11 Interferencia por ARN (ARNi) inducido por la dieta mediante la cepa de *E. coli* HT115

Los animales fueron alimentados con la cepa de *E. coli* HT115 que contiene una ARN polimerasa T7 inducible por IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) y es deficiente para la enzima RNasa III (Timmons et al., 2001). La cepa HT115 fue transformada con el plásmido pL4440 que contiene dos secuencias promotoras para la ARN polimerasa T7 flanqueantes a la zona de inserción (**Figura 2.11**). La ARN polimerasa, una vez se induce mediante IPTG, sintetiza una doble cadena de ARN específica del gen que se pretende interferir. El amplicón fue amplificado con una Taq ADN polimerasa de alta fidelidad (Phusion® High Fidelity, Thermofisher Scientific) y cebadores específicos diseñados entre exones comunes a todas las isoformas para propiciar el silenciamiento de todas ellas (**Tabla 2.16**).

Tabla 2.16. Vectores plasmídicos L4440 para ARNi empleados en este trabajo.

Vector ARNi	Gen	Secuencia cebadores (5'–3')	Amplicón (pb)
pJB2	<i>aakb-2</i>	D: ggcaacaatcagctctggagg R: taccatcgggatccgcgtctgc	340
pJB1	<i>lgg-1</i>	D: gaatcaaatgaagtgggcttac R: tcctcttttcgacctctctcc	428
pJB3	<i>atg-18</i>	D: cactgacatatgaaggcg R: aagagatgaacagatccagtg	514
pJB4	<i>bec-1</i>	D: tgtcttccacattgggtgatg R: agcattgcacgagtcctcg	1269
pAPG11	<i>sul-1</i>	D: tcagctctggaaatgctactac R: tcttttgacttcaagtagtgc	399
pAPG12	<i>sul-2</i>	D: gctcacctagcagagctggattc R: gtctctcgtgtgatcttgtgcc	103
pAPG13	<i>sul-3</i>	D: ttacatacaciaaacctccggc R: tgaagtaaccgtttgggtcc	454
pAPG52	<i>elo-2</i>	D: tcatgactggatcatcatgcc R: gcgcaaccaggaacagaatcag	331
pAPG53	<i>fat-6</i>	D: cgtaagcatccacaagttaagg R: ggtaattgaggaatcgtatggc	445

Los amplicones fueron clonados en el vector pL4440 empleando la enzima de restricción EcoRV (#FD0303, Thermofisher Scientific) que, tras su corte, genera extremos romos (**Figura 2.11**). Los clones positivos fueron seleccionados mediante PCR colonia (**Tabla 2.3** y **2.4**) empleando el cebador universal T7 (**Anexo I – Tabla 2.23**). Los clones positivos seleccionados fueron validados por secuenciación *Sanger* (servicio secuenciación-IBMCP-UPV; servicio de secuenciación-iisLaFe; empresa STAB vida, Lisboa, Portugal).

Material y Métodos

Para la obtención de los cultivos bacterianos, los vectores generados y el vector vacío (control negativo) incluidos en HT115 fueron cultivados en LB suplementado con carbenicilina 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente, los cultivos de bacteria crecidos fueron inducidos con IPTG (#I5502; Sigma-Aldrich-Merck) durante 2 h a 37 °C para promover la síntesis de la doble cadena de ARN.

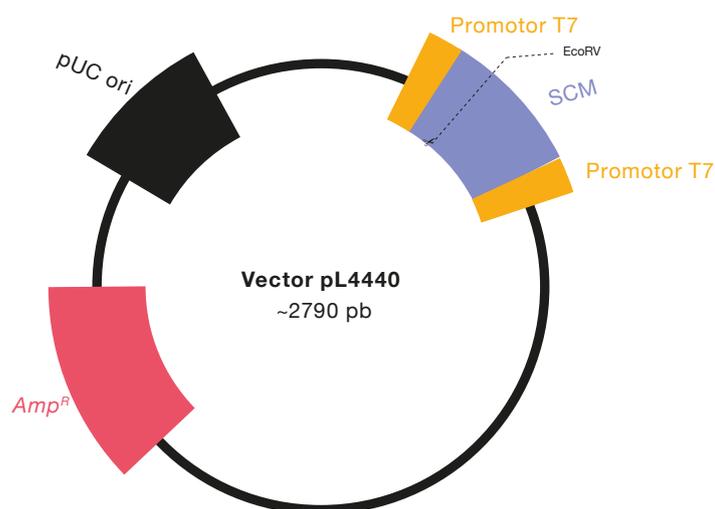


Figura 2.11. Vector pL4440 para inducir silenciamiento génico en *C. elegans* mediante la cepa de *E. coli* HT115. El sitio de corte EcoRV genera extremos romos para incorporar insertos flanqueados por dos secuencias promotoras T7. Estas secuencias son reconocidas por la ARN polimerasa bacteriana T7 inducible por IPTG para generar la síntesis de la doble cadena de ARN. *Amp^R*: gen de resistencia a ampicilina. SCM: Sitio de Clonación Múltiple.

El compuesto IPTG es fotosensible por lo que se recomienda trabajar en condiciones de oscuridad siempre que sea posible. Los cultivos inducidos fueron centrifugados a 4000 rpm durante 5 min para concentrar el extracto bacteriano. Finalmente, el depósito bacteriano fue disuelto en 2 mL de medio LB residual, de los cuales 200 μL fueron sembrados por cada placa. Tras unos 30 min de secado en cabina de flujo laminar, los animales sincronizados fueron incorporados en las placas de ARNi y cultivados a 20 °C y en oscuridad hasta alcanzar el estadio deseado. Para poder realizar una buena interpretación de los resultados es conveniente tener en cuenta que la dieta con HT115 modifica *per se* el patrón de agregación de poliQs basal (Muñoz-Lobato et al., 2014).

1.12 Generación de construcciones mediante PCR de fusión

Para crear construcciones mediante PCR de fusión, basamos nuestra aproximación en una estrategia descrita por el Dr. Hobert (Hobert, 2002). Para ello, se generaron reporteros génicos para estudiar su perfil de expresión en *C. elegans*, pero también nos fue de gran utilidad para obtener construcciones con las que inducir ARNi y restaurar la expresión de genes de manera específica de tejido. Las construcciones fusionadas de ADN desnudo fueron obtenidas mediante la fusión de dos productos de PCR cuya parte final e inicial eran solapantes. Los cebadores fueron diseñados en base a la aproximación realizada (reportero, rescate o silenciamiento génico) (**Anexo I – Tabla 2.17 y 2.18**). Como ejemplo ilustrativo mostramos el diseño estándar para inducir ARNi, donde hemos sintetizado dos productos de fusión que serán expresados simultáneamente en tejidos específicamente para promover la síntesis de la doble cadena de ARN (**Figura 2.12**). En primer lugar, fue amplificada la región promotora (#P) mediante los cebadores A y B (**Figura 2.12 – PCR#1.1 y Anexo I – Tabla 2.17**). En paralelo, fueron amplificadas secuencias específicas de la cadena sentido (#CS) y antisentido (#CA) del gen de interés mediante los cebadores C1 + D1 y C2 + D2, respectivamente (**Figura 2.12 – PCR#1.2 y Anexo I – Tabla 2.17**). En nuestro diseño, hemos incorporado la zona solapante de la región promotora (#P) en el cebador directo del gen diana de ambas cadenas (C1 y C2) (**Figura 2.12 – PCR#1.2**). En un segundo paso, el amplicón (#P) fue combinado con los amplicones (#CS) y (#CA) en dos reacciones independientes, PCR#2.1 y PCR#2.2, con cebadores específicos para ambos productos (A*+D1* y A*+D2*) para la obtención de los productos de fusión #P::CS y #P::CA, respectivamente (**Figura 2.12 y Anexo I – Tabla 2.18**).

Esta estrategia nos ha facilitado generar líneas transgénicas en las que se produce silenciamiento constitutivo y específico de tejido. Además, facilita realizar estudios de silenciamiento génico en sistema nervioso, puesto que este es refractario a la inducción de ARNi mediante la alimentación con HT115. Para los ensayos de expresión de ADNc, fueron generados productos de fusión combinando la región promotora (#P) con el ADNc del gen de interés en presencia de un terminador de la transcripción, normalmente del gen *unc-54* (**Anexo I; Tabla 2.18**). Para el abordaje de *daf-36*, amplificamos la región genómica (reguladora y génica) en dos partes debido al gran tamaño de la

región genómica, obteniendo dos amplicones que fueron empleados como molde para una PCR anidada.

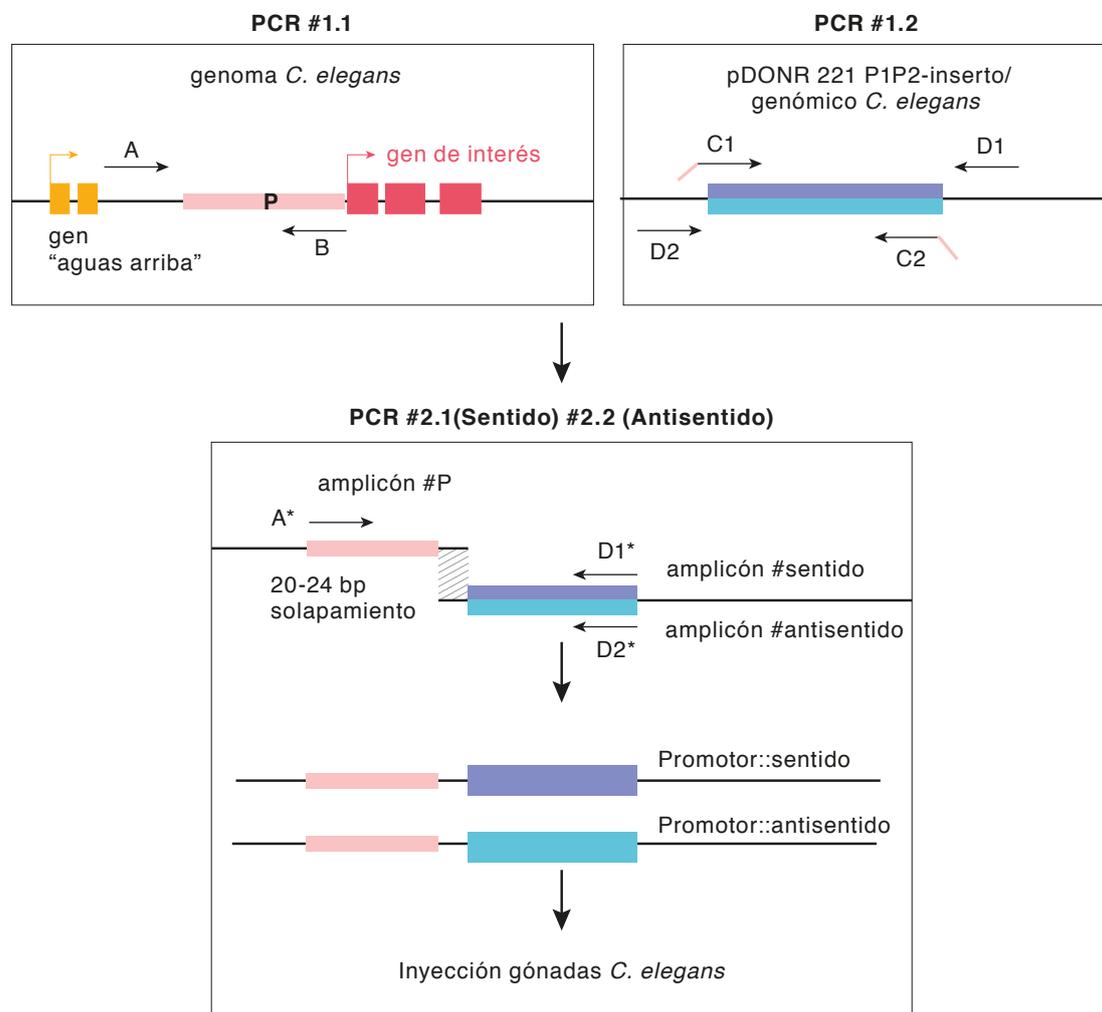


Figura 2.12. Estrategia para fusionar regiones promotoras a genes de interés para inducir expresión de ADNc o ARNi. **PCR #1.1.** Amplificación de la región promotora de interés. **PCR #1.2.** Amplificación de fragmentos de la cadena sentido (C1 + D1) y/o antisentido (C2 + D2) del gen interés mediante cebadores que incorporan una región solapante en el extremo (C1 y C2) al promotor deseado. **PCR #2.1/2.2.** PCR-fusión empleando amplicones obtenidos en las reacciones #1.1 y #1.2. La región solapante permite la fusión de los dos amplicones mediante la región solapante empleando una PCR anidada. Para los ensayos de silenciamiento fueron inyectados los dos amplicones de fusión simultáneamente para producir ambas hebras de ARN, que se hibridarán en el tejido de interés para generar la doble cadena de ARN que inducirá el ARNi. Para estudios de expresión fue inyectado solamente el amplicón fusionado al ADNc de la cadena sentido del gen de interés. Modificado de la Tesis Doctoral de la Dra. Carla Lloret.

1.13 Análisis de expresión génica por PCR a tiempo real

La expresión relativa de genes diana fue medida mediante RT-qPCR empleando sondas tipo Taqman™ específicas para cada gen (Tabla 2.19).

Tabla 2.19. Sondas Taqman para PCR cuantitativa usadas en este estudio

Secuencia sonda Taqman (5' – 3') ¹	Gen	Referencia
	<i>pmp-3</i>	#Ce02485188_m1, Thermofisher
/56-FAM/ataaccttc/ZEN/gggcatggcac tct/3IABkFQ/	<i>gfp</i>	Este estudio, IDTDNA
/56-FAM/tgggtcgaa/ZEN/catcagcgt gag/3IABkFQ	<i>dve-1</i>	Este estudio, IDTDNA
/56-FAM/tcgagtga/ZEN/tctcacgcttag ttgacg/3IABkFQ	<i>atfs-1</i>	Este estudio, IDTDNA
/56-FAM/agcatcttg/ZEN/gagagctgtgc gaa/3IABkFQ	<i>hsp-60</i>	Este estudio, IDTDNA
/56-FAM/caaagcgag/ZEN/aaatcgtgtg ctccg/3IABkFQ	<i>pek-1</i>	Este estudio, IDTDNA
/56-FAM/tgccaatc/ZEN/acgccgaacta tct/3IABkFQ	<i>rtcb-1</i>	Este estudio, IDTDNA
/56-FAM/cgagtattg/ZEN/ttccggagagg ctgt/3IABkFQ	<i>ire-1</i>	Este estudio, IDTDNA
/56-FAM/ttgctcgcc/ZEN/acggaagagtc at/3IABkFQ	<i>atf-6</i>	Este estudio, IDTDNA
/56-FAM/ttccgataa/ZEN/gagcctggcat caaaga/3IABkFQ	<i>hsp-3</i>	Este estudio, IDTDNA
/56-FAM/tgaacggct/ZEN/gcaccaaag gcta/3IABkFQ	<i>hsp-70</i>	Este estudio, IDTDNA
/56-FAM/tgaaggaaa/ZEN/actccaaattg aggctcca/3IABkFQ	<i>hsp-16.41</i>	Este estudio, IDTDNA
/56-FAM/cgacaaact/ZEN/gcgtctcgtaat actgctc/3IABkFQ	<i>pod-2</i>	Este estudio, IDTDNA
/56-FAM/acataacag/ZEN/tgtggacggc aagg/3IABkFQ	<i>elo-2</i>	Este estudio, IDTDNA
/56-FAM/agtacacc/ZEN/tattccatgtct ctgagc/3IABkFQ	<i>elo-5</i>	Este estudio, IDTDNA
/56-FAM/acgacgacg/ZEN/acaagatac ccatcga/3IABkFQ/	Tripletes CAG ²	Este estudio, IDTDNA

¹Secuencia detallada para las sondas customizadas.

La reacción de PCR a tiempo real fue realizada mediante el termociclador ViiA7 (Applied Biosystems, Waltham, MA, EEUU). Para analizar la expresión de genes incluidos dentro de un cromosoma satélite hemos seleccionado manualmente animales que expresan el transgén a través del reportero *myo-2p::mCherry* mediante un microscopio de disección con fluorescencia M165FC (Leica, Wetzlar, Alemania). Para evaluar la expresión génica endógena, se sincronizó la población y se recogieron los animales para su lavado, empleando el tampón M9 1X. Todas las muestras fueron congeladas en tampón de lisis (kit de extracción ARN; #R6834-01, OMEGA Bio-Tek, Norcross, GA, EEUU)

suplementado con un 1 % β -mercaptoetanol para inducir la rotura de la cutícula de los nematodos. Tras este paso, las muestras fueron lisadas mecánicamente empleando jeringas de insulina. Se han seguido las instrucciones del fabricante para la obtención del ARN total (#R6834-01, OMEGA Bio-Tek). Para eliminar el ADN genómico, las muestras fueron tratadas con DNAsa I (#79254, Qiagen, Hilden, Alemania). En torno a 200–500 ng de ARN fue retrotranscrito a ADNc siguiendo las instrucciones del fabricante (#RR037A, PrimeScript™ RT reagent, Takara Bio, Kusatsu, Japón). Para la PCR a tiempo real fue usado el master mix 2XPrimeTime® Gene Expression (#RR390, Takara Bio) y el programa de PCR estándar: [50 °C/10 min] x 1 ciclo; [95 °C/15 seg] x 1 ciclo; [60 °C/1 min] x 40 ciclos. Para normalizar los niveles de expresión génica, se empleó el control endógeno *pmp-3* (Tabla 2.19). En los casos donde se ha solicitado un diseño customizado de las sondas a través de la plataforma de IDTDNA, se han considerado todas las isoformas posibles para el diseño de la sonda y se ha restringido que la sonda y los cebadores estén localizados en exones distintos.

1.14 Cuantificación de poliQs mediante Western Blot

Para la cuantificación de expresión de proteínas con poliQs, se lavaron animales jóvenes adultos tratados y no tratados con tampón M9 1X, antes de lisar las muestras con un tampón de extracción de proteínas (RIPA 1X, #R0278, Invitrogen) al que se le adicionó un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete, #11697498001, Roche, Basilea, Suiza). Las muestras fueron congeladas a -80 °C para promover la rotura de la cutícula. Tras ello, las muestras descongeladas fueron lisadas mediante fricciones mecánicas con sucesivas aspiraciones empleando una jeringa de insulina. Se adicionó un volumen de tampón de carga 4X con SDS (dodecilsulfato sódico) y β -mercaptoetanol en función del volumen del extracto proteico total. Seguidamente, las muestras fueron hervidas a 100 °C durante 10 min para promover su desnaturalización. El extracto de proteína total fue separado en un gel al 8 % de acrilamida tratado con SDS para promover condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y, seguidamente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante un sistema de transferencia semi-seco (Trans-Blot Turbo system, Biorad, Hercules, CA, EEUU). El bloqueo fue realizado con leche al 5 % disuelta en tampón TBS-T (vea sección Materiales) de acuerdo a las especificaciones de los siguientes anticuerpos primarios: anti-poliQ (ratón, 1:1000, #P1874, Sigma-

Aldrich-Merck), anti-actina (ratón, 1:500, #MA5-11869, Invitrogen). Los anticuerpos primarios fueron incubados durante toda la noche a 4 °C con agitación moderada. Se realizaron varios lavados cortos con TBS-T para retirar el exceso de anticuerpo antes de incubar la membrana con el anticuerpo secundario anti-ratón (1:1000, #SC-2005, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EEUU) conjugado a HRP (Peroxidasa de rábano) durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, la detección de proteínas fue realizada mediante el compuesto ECL (sustrato HRP) (#RPN2106, GE healthcare, Chicago, IL, EEUU) y el sistema de revelado Amersham Imager 600 (GE healthcare).

1.15 Cultivo en medio líquido de *C. elegans*

Los animales sincronizados en estadio L1 fueron cultivados en tubos cónicos de 50 mL en presencia del tratamiento específico y componentes estándar de cultivo de *C. elegans* hasta alcanzar el estadio deseado (**Tabla 2.20**). Todos los animales fueron cultivados a 20 °C y en agitación para permitir la aireación del cultivo. Al finalizar el tratamiento, los animales fueron recuperados en placas NGM para evaluar el fenotipo (respuesta mecanosensorial, patrón de agregación de poliQs y defectos locomoción) o lavados para realizar análisis bioquímicos (análisis de expresión génica, cuantificación de niveles de proteínas y estudios de lipidómica).

Como tratamiento farmacológico fueron empleadas diferentes sustancias como la metformina, el salicilato y la cloroquina (Sigma-Aldrich-Merck) las cuales fueron disueltas en agua estéril hasta la concentración de trabajo deseada. Diferentes dosis de metformina [100; 150; 200; 300; 500; 2000 μ M] y salicilato [5, 10, 15, 25, 50, 100 μ M] por separado y en combinación, han sido empleadas para el cultivo de animales con fondo genético *mec-3p::112Q::TdTomato*, *unc-54p::40Q::YFP* y *unc-54p:: α -sinucleína::YFP*. El tratamiento con cloroquina solamente ha sido testado en la cepa *unc-54p::40Q::YFP* a una concentración final de 10 mM, 24 horas antes de finalizar el experimento. Como tratamiento hormonal y químico, fue empleado el ácido dafacrónico- Δ^4 (AD- Δ^4 , Cayman chemical, Michigan, MI, EEUU) disuelto en etanol (Gerisch et al., 2007) y el compuesto dafadine A soluble en DMSO (Sigma-Aldrich-Merck) (Luciani et al., 2011). El AD- Δ^4 fue testado a una concentración final de 1 μ M (Gerisch et al., 2007) mientras que el dafadine A fue evaluado a tres concentraciones finales

distintas (1, 5, 12,5 μM) que habían sido previamente evaluadas en *C. elegans* (Luciani et al., 2011).

Tabla 2.20. Componentes para el cultivo de animales en presencia de tratamiento farmacológico, hormonal y químico.

Componente	[] _{final}	V _{final}
OP50-1	DO ₆₀₀ = 0,5	2 mL
Estreptomicina	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 μL
Nistatina	12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 μL
Colesterol	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 μL
Tratamiento ¹ /vehículo ²		[1-50] μL
1000 animales L1	X ³ animales/ μL	X ³ μL
Solución M9 1X hasta		5 mL

¹Tratamiento: metformina [100; 150; 200; 300; 500; 2000 μM]; salicilato [5, 10, 15, 25, 50, 100 μM]; cloroquina 10 mM; ácido dafacrónico- Δ^4 (AD- Δ^4) 1 μM ; dafadine A [1, 5, 12,5 μM]. ²Disolvente donde el tratamiento es soluble: agua (metformina, salicilato, cloroquina), etanol (AD- Δ^4) y DMSO (dafadine A). ³El número de animales fue calculado mediante el recuento total de animales en 10 μL de población sincronizada L1, para obtener el volumen necesario para incorporar 1000 animales por cultivo.

1.16 Tinciones con colorantes X-34 y Oil Red O

El colorante X-34 (#SML1954, Sigma-Aldrich-Merck) tiñe específicamente depósitos amiloides como se ha descrito (Link et al., 2001). Los animales sincronizados fueron cultivados en placas NGM a 20 °C hasta el estadio de adulto de un día. Estos animales fueron incubados durante 2 h dentro de una gota de 20 μL que contenía: colorante X-34 1 mM y solución TRIS 10 mM a pH 7,5. Los animales fueron lavados con tampón fosfato salino 1X y transferidos a placas NGM frescas y sembradas con FIN-1. Las placas con animales teñidos fueron incubadas a 20 °C durante toda la noche para ser evaluados en el estadio adulto de dos días, previamente anestesiados con acida sódica (0,05 M).

El colorante Oil Red O (#O0625, Sigma-Aldrich-Merck) tiñe específicamente triglicéridos y lipoproteínas, permitiendo obtener valores relativos de abundancia lipídica en *C. elegans* (Escorcía et al., 2018). La tinción de *C. elegans* con Oil Red O muestra un patrón de gotas lipídicas rojas a lo largo del cuerpo, principalmente localizadas en el intestino y fácilmente cuantificables mediante el software *Image J* (Imanikia et al., 2019). Para la tinción de animales con Oil Red O se han seguido instrucciones previamente descritas (Escorcía et al., 2018). La solución Oil Red O fue preparada a partir de 500 mg de polvo disuelto en 100

mL de isopropanol al 100 %. La solución fue diluida (3:2) en agua para reducir el isopropanol al 60 % y fue mantenida en agitación continua toda la noche. Esta solución fue filtrada empleando filtros estériles de 0,2 μm antes de teñir a los animales. Previamente a la tinción, los animales jóvenes adultos sincronizados fueron lavados con 1 mL tampón fosfato salino 1X que contenía 0,1 % detergente Tween-20 0,1 % (PBS-T; vea sección Materiales). Posteriormente, las muestras fueron fijadas con 600 μL de isopropanol al 40 % durante 3 min a temperatura ambiente y en una rueda giratoria. Las muestras fijadas fueron teñidas durante 2 h con 600 μL de tinción Oil Red O diluida y filtrada a temperatura ambiente y en rueda giratoria. Finalmente, los animales fueron lavados con PBS-T durante dos rondas de 30 min. Tras la centrifugación para eliminar el tampón del 2º lavado, los animales fueron suspendidos en parte del tampón residual remanente para su posterior montaje y visualización con un microscopio de disección digital (dmd108, Leica). Las muestras fueron conservadas a 4 °C durante al menos 3-4 días.

1.17 Tratamiento con ácido oleico

El ácido oleico (#O1008, Sigma-Aldrich-Merck) fue añadido al medio NGM fundido a una concentración final de 2 mM para generar placas NGM en las cuales puede observarse gotas lipídicas accesibles para los nematodos (Imanikia et al., 2019). Las placas NGM con ácido oleico fueron conservadas en oscuridad para preservar las propiedades del ácido oleico y sembradas con bacteria OP50-1 previamente a su uso. Los animales sincronizados L1 fueron incorporados en las placas suplementadas con ácido oleico hasta alcanzar el estadio L4 para ser analizados.

1.18 Rastreo de compuestos con alto potencial terapéutico en modelos de toxicidad por ARN

Un total de 85 compuestos de la quimioteca de Pfizer (#L2400-01; Nueva York, NY, EEUU) (**Anexo I – Tabla 2.24**) fueron testados en su totalidad en el modelo *unc-25p::144CAG*. Los compuestos conservados a una concentración de 10 mM fueron diluidos en agua (1:10) hasta concentraciones de 1 mM (concentración trabajo) para reducir la toxicidad del vehículo (DMSO) y, seguidamente, fueron conservados a -80 °C para preservar su estabilidad. Finalmente, los compuestos fueron testados a una concentración final de 10 μM . Los animales sincronizados L1 fueron cultivados en presencia de los compuestos en placas de 96 multi-

pocillo en un volumen final de 100 μ L. Previamente, fue preparada una mezcla con todos los componentes de cultivo (**Tabla 2.20**) a excepción del compuesto o el control a testar, el cual fue adicionado individualmente. Se adicionaron 100 animales por pocillo junto con los componentes estándar. Finalmente, fue adicionado 1 μ L/compuesto o DMSO (0,1 %) por pocillo. Los animales fueron incubados en atmósfera húmeda a 20 °C y en agitación hasta alcanzar el estadio de joven adulto. Tras alcanzar ese estadio, los animales fueron depositados en placas NGM para seleccionar la población transgénica mediante el reportero *myo-2p::mCherry* y evaluar su capacidad de motilidad manualmente.

1.19 Análisis del transcriptoma

Los animales *40Q::YFP*, *40Q::YFP; unc-1(vlt10)*, *40Q::YFP; nhr-1(vlt16)* y *40Q::YFP; unc-1(vlt10); nhr-1(vlt16)* fueron sincronizados y cultivados en placa NGM desde el estadio L1 hasta alcanzar el estadio joven adulto. Se realizaron seis réplicas biológicas por cada cepa en las mismas condiciones de cultivo. Los animales fueron recogidos en tubos independientes y lavados al menos tres veces con tampón M9 1X. El precipitado de animales fue disuelto en tampón de lisis de ARN (NZY total RNA isolation kit, #MB13402, Nzytech) con 0,1 % β -mercaptoetanol y congelado a -80 °C. Previamente a la extracción de ARN (NZY total RNA isolation kit), las muestras descongeladas fueron lisadas mecánicamente con 200 mg de bolas de cristal (Glass beads, acid-washed, #G4649, Sigma-Aldrich-Merck) mediante un equipo agitador Fastprep (Thermofisher Scientific, modelo FP120) durante 30 seg. Tras la rotura de las muestras, fue recuperado el sobrenadante mediante una centrifugación de las muestras a máxima velocidad durante 1 min. Este sobrenadante fue procesado mediante el kit de extracción de ARN (#MB13402, Nzytech) el cual incorpora un tratamiento con DNAsa. El ARN purificado fue cuantificado y enviado para su secuenciación por la empresa Novogene (Cambridge, UK).

El análisis de los datos de transcriptómica fue en base a los valores normalizados (RPKM) proporcionados por la compañía Novogene. En el proceso de normalización se ha tenido en cuenta el número de lecturas totales alineadas en cada caso, así como el tamaño del gen. Para la representación de los datos se han seleccionado los genes diferencialmente expresados en base a su p-valor < 0,05 e incremento relativo (*fold change*) igual o superior a 2 en la mayoría de los casos. Para el perfil de expresión de los genes diferencialmente

expresados reflejados en todas las cepas se ha desarrollado un *heatmap* con la herramienta DESeq2 (Love et al., 2014). El diagrama de Venn muestra numéricamente la cantidad de genes desregulados por comparaciones de genotipos (por ejemplo, simple mutante *unc-1* vs silvestre y/o doble mutante *unc-1; nhr-1* vs simple mutante *unc-1*). El análisis funcional de los datos que nos permite identificar tejidos, procesos y fenotipos alterados se ha realizado con la herramienta que relaciona los términos GO de la WormBase (www.wormbase.org) (Angeles-Albores et al., 2018, 2016). Por último, el análisis de enriquecimiento de las vías de señalización alteradas se ha obtenido mediante la herramienta KEGG (www.genome.jp/kegg/).

1.20 Ensayo de lipidómica

Los animales de la cepa silvestre y simple mutante *unc-1(vlt10)* fueron sincronizados y cultivados en medio líquido (**Tabla 2.20**) desde el estadio L1 hasta alcanzar el estadio joven adulto. Se realizaron al menos seis réplicas por cada cepa y por cada ensayo (en total tres experimentos independientes y 21 réplicas biológicas/cepa). Los animales cultivados a 20 °C fueron recogidos y lavados al menos tres veces con tampón M9 1X. El precipitado de animales fue disuelto en tampón de lisis de proteína RIPA 1X (#R0278, Invitrogen). Las muestras fueron congeladas a -80 °C previamente a la extracción de proteínas. Para el lisado mecánico de las muestras empleamos jeringas de insulina y realizamos sucesivas aspiraciones. El extracto total de proteínas fue cuantificado mediante el kit comercial (#23225; Pierce™ BCA Protein Assay kit, Thermofisher) y empleado para normalizar los datos de lipidómica de las muestras analizadas. Seguidamente, los extractos de animales fueron procesados por personal de la Unidad Analítica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe para su análisis metabolómico. Brevemente, fueron adicionados 300 µL de isopropanol frío a 100 µL a cada extracto y éstos fueron conservados a -20°C durante 30 min para precipitar las proteínas residuales. Los sobrenadantes recuperados fueron mezclados con 10 µL de una solución que contiene patrones internos (IS, 20 µM). Paralelamente, prepararon una muestra de control de calidad (QC) mezclando 10 µL de cada muestra. Finalmente, las muestras fueron inyectadas aleatoriamente en el sistema cromatográfico para evitar la variabilidad dentro de la secuencia analítica, así como, para mejorar la calidad y la reproducibilidad del estudio. Las muestras fueron analizadas mediante un equipo de cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de

masas de alta resolución acoplado a un detector Orbitrap UPLC-QExactive Plus con fuente de electrospray (ESI) siguiendo los procedimientos optimizados en la Unidad Analítica (método interno no publicado). Los controles fueron analizados además, en modo *All Ions* (AIF) para proceder al procesamiento e identificación de los lípidos mediante la librería LipidMS (Alcoriza-Balaguer et al., 2019). El procesamiento de datos de las muestras y el control de calidad adquirido en modo Full MS Scan se llevaron a cabo utilizando un script interno incluido en el software R (v.3.6.1) con los paquetes XCMS y CAMERA para la detección, filtrado, alineación e integración de los picos cromatográficos y finalmente, para la anotación de los mismos empleando el paquete LipidMS.

1.21 Análisis de la respuesta al tacto en gusanos con neuronas mecanosensoriales estresadas por poliQs

La agregación de proteínas con poliQs en neuronas mecanosensoriales (*112Q::TdTomato*) induce una disfunción neuronal relacionada con la capacidad de respuesta mecanosensorial en los animales (Sanchis et al., 2019). *C. elegans* posee seis neuronas con receptores de respuesta al tacto, conocidas como ALML, ALMR, AVM, PLML, PLMR, PVM (www.wormbook.org). Estas neuronas responden al roce sutil, y la funcionalidad de estas neuronas se puede cuantificar empleando un pelo de pestaña montado en una punta de pipeta. La presencia de agregados de poliQs en este tipo neuronal altera su funcionalidad de respuesta mecanosensorial como ya se ha descrito (Parker et al., 2001). Por cada animal cultivado a 20 °C, se evaluó diez veces su respuesta. Si el animal se aleja es que responde bien, pero si se queda impassible es que la neurona no ha sentido la pestaña tras rozar su parte posterior sutilmente, siendo un indicador de disfuncionalidad neuronal. Para cada experimento independiente al menos 20 animales fueron testados. Cada análisis fue validado al menos tres veces en experimentos independientes. Los datos totales obtenidos fueron normalizados en % de número de veces de respuesta (por ejemplo, si responden dos veces, corresponde a un 20 % de respuesta mecanosensorial) con respecto al 100 % (total de diez veces). El fenotipado de los animales fue realizado mediante un microscopio de disección MS5 (Leica).

1.22 Recuento de cuerpos de inclusión de poliQs::YFP en células musculares y en neuronas

El transgén *unc-54p::40Q::YFP* induce la formación de cuerpos de inclusión en células musculares con un aumento progresivo dependiente de la edad (Morley et al., 2002). La expresión de YFP en pauta con las poliQs permite la visualización a tiempo real, mediante fluorescencia, del patrón de agregación desde estadios larvarios tempranos (L2) hasta individuos adultos. Los recuentos de cuerpos de inclusión fueron obtenidos en diferentes estadios (L2, L4, joven adulto) dependiendo del abordaje experimental. Los animales fueron analizados sobre población heterogénea cultivada a 20 °C, y tras el recuento del animal seleccionado, éste fue descartado, para evitar duplicaciones de los datos. Esta dinámica fue repetida durante tres experimentos independientes, en los cuales fueron contabilizados al menos diez animales por genotipo/estadio/experimento. Al menos 30 animales fueron analizados en el estudio global por genotipo/estadio (en total 90 animales por genotipo). El fenotipado de los animales fue realizado mediante un microscopio de disección acoplado con fluorescencia M165FC (Leica).

Para el recuento de agregados de poliQ neuronales fue empleado un modelo de *C. elegans* que contiene una inserción que induce la expresión de 40 glutaminas en pauta con YFP, específicamente en sistema nervioso mediante el promotor del gen *F25B3.3* (H. R. Brignull et al., 2006). Puesto que el patrón de agregación de poliQs en todo el sistema nervioso fue muy complejo de analizar en su totalidad debido a su heterogeneidad, optamos por seleccionar la zona del cordón nervioso ventral que es predominantemente donde más densidad de cuerpos de inclusión quedan empaquetados (H. R. Brignull et al., 2006). Además, en esta área los cuerpos de inclusión aparecen como entidades aisladas fácilmente evaluables. Para ello, fue seleccionada la zona de la vulva como referencia, y se realizaron los recuentos de los agregados neuronales presentes a lo largo del cordón nervioso ventral. Finalmente, se representa el número de agregados poliQs/animal/zona acotada. Los animales jóvenes adultos fueron montados en una superficie de agarosa 2X y anestesiados con acida sódica (0,05 M) para visualizar los agregados de poliQs mediante el microscopio vertical de fluorescencia DM2500 (Leica). El análisis de número de agregados fue realizado en tres experimentos independientes y al menos 20 animales por cepa fueron testados en cada caso, con un total de 60 animales por cepa.

1.23 Recuento de agregados α -sinucleína::YFP en células musculares

El transgén que codifica la α -sinucleína::YFP induce la agregación tardía de la proteína α -sinucleína expresada en pauta con la proteína fluorescente YFP, específicamente en células musculares mediante el promotor del gen *unc-54* (van Ham et al., 2008). A diferencia de los cuerpos de inclusión de poliQs, visibles mediante microscopios de disección con fluorescencia, los agregados α -sinucleína::YFP solamente son visibles mediante microscopios de alta resolución y, además, presentan una aparición más tardía y mayor abundancia. Puesto que es inviable realizar un conteo completo de todo el tejido muscular del animal en estas condiciones, hemos seleccionado la zona situada entre los dos bulbos faríngeos para evaluar el patrón de agregación de α -sinucleína en los animales basándonos en estudios descritos (Muñoz-Lobato et al., 2014) y empleando el microscopio de fluorescencia DM2500 (Leica). Los animales adultos de dos días fueron montados en placas con agarosa, anestesiados con acida sódica (0,05 M) y evaluados *in vivo*. Las imágenes representativas fueron obtenidas en mayor resolución mediante un microscopio confocal SP5 (Leica). El análisis de número de agregados fue realizado en tres experimentos independientes y al menos 20 animales por cepa fueron testados en cada caso, con un total de 60 animales por cepa.

1.24 Recuento de agregados de β -amiloide en células musculares

La cepa CL2006 contiene una inserción que dirige la expresión del péptido humano β -amiloide específicamente a células musculares mediante el promotor del gen *unc-54* (Link, 1995). Para visualizar los depósitos de β -amiloide se han teñido los animales con el colorante X-34 (#SML1954, Sigma-Aldrich-Merck) que tiene afinidad por estos depósitos. Los animales adultos de dos días teñidos fueron depositados en superficies de agarosa 2X y anestesiados con acida sódica (0,05 M) para poder ser analizados mediante un microscopio de fluorescencia DM2500 (Leica). El recuento de depósitos de β -amiloide se ha realizado considerando la zona situada entre los dos bulbos faríngeos como en el modelo anterior y siguiendo recomendaciones descritas (Muñoz-Lobato et al., 2014). Se han realizado tres experimentos de recuentos independientes y al menos 20 animales por cepa se han evaluado en cada caso, con un total de 60 animales por cepa.

1.25 Ensayo de motilidad en medio líquido

Los ensayos comportamentales destinados a evaluar la capacidad motora de los animales pueden ser empleados como un indicador de salud y/o bienestar del nematodo *C. elegans* (Bansal et al., 2015). Este tipo de análisis se ha realizado en animales tratados con fármacos para investigar si el fármaco además de reducir la agregación de proteínas con propensión a agregarse (poliQs, α -sinucleína, etc.), induce una recuperación funcional de las células musculares. A su vez, también se ha empleado para evaluar la disfuncionalidad neuronal en modelos de expresión de transcritos CAG tóxicos. Para ello, los animales cultivados hasta estadio de joven adulto fueron recolectados en placas de 24 pocillos que contienen M9 1X. Cada animal fue depositado independiente en un pocillo y previamente, fueron aclimatados durante 30 seg, antes de iniciar el recuento manual del número de desplazamientos o *thrashes* (en inglés la técnica se denomina *thrashing assay*) completos durante los 30 seg contiguos (Hart, 2006). Un *thrash* se considera cuando ambos miembros, cabeza y cola, tienden a tocarse hacia uno y otro lado del cuerpo mientras el animal nada. Si solo mueve la cola o la cabeza, no se considera un *thrash* completo y no se contabiliza. El número total de *thrashes* durante 30 seg fue extrapolado a un 1 min. Al menos fueron analizados diez animales por cada ensayo independiente para cada condición a una temperatura de 20 °C. Cada experimento fue repetido al menos tres veces. Aquellos animales que fueron dañados durante la manipulación fueron descartados en el estudio.

1.26 Análisis estadístico

En el capítulo I y III, el análisis estadístico fue realizado mediante un test de análisis de la varianza (ANOVA) combinado con un test *Tukey* para realizar comparaciones múltiples de diferentes cepas y/o condiciones. En los casos donde las comparaciones son entre dos condiciones exclusivamente, fue realizado un t-test de *Mann Whitney* para obtener la significancia estadística de los datos. En los gráficos mostramos la media y el error estándar (media \pm SEM) visualizado como una barra y el p-valor estadísticamente significativo denotado con asteriscos (*: p valor < 0,05; **: p-valor < 0,01; ***: p-valor < 0,001). La abreviatura “ns” indica no estadísticamente significativo.

En el capítulo II, el análisis de estadístico fue realizado mediante el software R (versión 3.5.1) en colaboración con el Dr. David Hervás (servicio de bioestadística

del Instituto de Investigación sanitaria La Fe), Victoria Fornés (Tau Analytics, Parc Científic Universitat de València, Paterna, España) y el Dr. Carlos Mora (Institute of biotechnology, University of Helsinki, Finlandia). Para estudiar el efecto sinérgico de la metformina y el salicilato en la respuesta al tacto del modelo *112Q::TdTomato* fue realizada una regresión logística binomial de los datos (representados en % de veces de respuesta tras diez intentos). Para estudiar el efecto sinérgico de los fármacos y su efecto por separado sobre la dinámica de agregación de la cepa *40Q::YFP*, fue implementando un modelo de regresión binomial negativa en base a la naturaleza discreta de la variable. Los valores de *thrashing* fueron analizados empleando modelos de regresión lineal dada la naturaleza cuantitativa de la variable. En base a la naturaleza de las variables, fueron reflejados los valores de *Odds Ratio* (OR) o razón de probabilidades relativa (comparativa de éxito (*Odds*) entre dos tratamientos; éxito fármaco A/éxito fármaco B) y el efecto estimado (diferencias entre las medias de los tratamientos A y B). Concretamente el valor OR es reflejado para los fenotipos de respuesta mecanosensorial y agregación, mientras que el valor estimado acompaña los datos de motilidad. En todos los casos, estos valores fueron acompañados de valores referidos al intervalo de confianza (IC) al 95 % y al p-valor para indicar la significancia de los datos.

1.27 Imágenes por microscopía

Las imágenes de fluorescencia fueron adquiridas empleando un microscopio confocal SP5 (Leica) y un microscopio vertical DM2500 (Leica). Las imágenes para analizar las tinciones histológicas (Oil Red O) fueron tomadas con un microscopio de disección digital DMD108 (Leica). En todos los casos, los animales fueron montados en superficies de agar al 2X de agarosa que contenían una gota de acida sódica (0,05 M) para anestesiarlos. La manipulación y selección de nematodos fue realizada mediante el uso de microscopios de disección y a veces con fluorescencia acoplada (MS5 y M165FC, Leica).

1.28 Cribado de genes al azar por mutagénesis química: Aislamiento de la mutación *unc-1(vlt10)*

Los animales L4, que contienen el transgén *unc-54p::40Q::YFP*, fueron sometidos a mutagénesis química al azar usando metanosulfonato de etilo a 47 mM (#M0880, Sigma-Aldrich-Merck). Los animales fueron incubados durante 4 h a

20 °C con este compuesto. Tras varios lavados con M9 1X, fueron dispensados en placas NGM sembradas con bacteria OP50-1 para permitir la puesta de huevos (generación F1). Los animales F1 fueron descartados una vez alcanzaron el estadio adulto para poder estudiar la generación F2. Sobre esta población, seleccionamos animales descoordinados que tuviesen un patrón anormal de agregación de poliQs. Una vez aislamos los animales con el fenotipo deseado, cruzamos la cepa al menos cinco veces con el fondo genético de referencia o silvestre (N2, Bristol) antes de secuenciar su genoma masivamente para identificar el cambio alélico responsable.

Las lecturas facilitadas por el servicio de secuenciación del Centro Nacional de análisis genómico (CNAG) del CRG (Centro de Regulación Genómica, Barcelona, España) fueron mapeadas frente al genoma de referencia de *C. elegans* WS245 usando el algoritmo “mem” implementado por el software BWA (Li, 2013, 2011). El análisis de los datos de secuenciación fue realizado por el Dr. Joaquín Cañizares y el Dr. José Blanca del COMAV (Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España). Las variantes tipo SNPs fueron filtradas teniendo en cuenta si estaban presentes en más de un alelo en todas las familias, o si el alelo de referencia no estaba representado en alguna familia, o si había más de tres alelos mutantes cuando las familias fueron consideradas. Para los SNPs que pasaron todos los filtros, fue calculado un índice de selección que consistía en la diferencia entre la frecuencia del alelo más frecuente en la población de retrocruce obtenida y la frecuencia del mismo alelo en la población parental (**Figura 2.13**). De esta manera, SNPs con las mayores diferencias entre ambas poblaciones tendrían el mayor índice de selección.

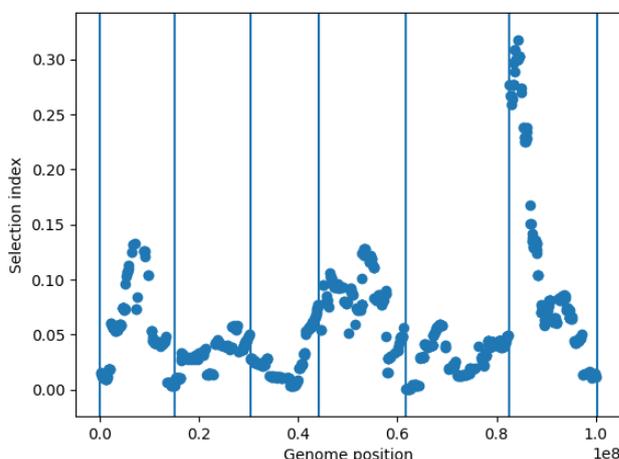


Figura 2.13. Representación de las variantes génicas a lo largo del cromosoma X. La mutación *vlt10* está localizada en el brazo izquierdo del cromosoma, puesto que hay un pico de estas variantes que segrega junto con el fenotipo de interés.

2. Materiales y soluciones

Esta sección incluye una descripción detallada de soluciones, reactivos y material biológico empleado en este trabajo.

2.1 Medio de crecimiento de los nematodos (NGM)

El medio NGM agar contiene NaCl (3 g/L), agar (20 g/L, Takara), peptona (2,5 g/L, Takara), solución CaCl₂ 1 M (1 mL/L), solución MgSO₄ 1 M (1 mL/L), solución KPO₄ 1 M, pH 6.0 (25 mL/L), colesterol 5 mg/L en etanol absoluto (1 mL/L, Sigma-Aldrich), nistatina 12,5 mg/L en etanol absoluto (1 mL/L, PanReac AppliChem) y agua ultrapura miliQ (Merck Millipore). La nistatina fue adicionada para prevenir la contaminación fúngica. El medio NGM y las soluciones tamponadas fueron autoclavados para su esterilización. El medio NGM líquido y estéril fue atemperado a 60 °C antes de adicionar los siguientes componentes: CaCl₂ 1 M, MgSO₄ 1 M, KPO₄ 1 M, colesterol y nistatina.

2.2 Solución M9 1X

La solución M9 1X fue empleada para recoger y lavar a los animales cultivados en placas NGM y como disolvente para el cultivo líquido de nematodos. M9 1X fue preparado a partir de M9 10X: Na₂HPO₄ × 12H₂O (146 g/L), KH₂PO₄ (30 g/L), NaCl (5 g/L) y solución MgSO₄ 1 M (1 mL/L) adicionado tras la esterilización.

2.3 Tampón de lisis

Esta solución permite la rotura y disgregación de los nematodos tras ser incubados a 65 °C durante 1 hora. El tampón de lisis contiene tampón de PCR 1X (1:10 tampón de PCR 10X, Biotools), Tween-20 (0,45 % (v/v), (#BP337-500, Fisher Scientific, Hampton, Nuevo Hampshire, NH, EEUU), proteinasa K 20 mg/mL (Roche, 5/100 µL tampón lisis). El tampón sin proteinasa K fue alícuotado y conservado a -20 °C. La proteinasa K fue adicionada a la solución de lisis en el momento de uso.

2.4 Solución de sincronización

La solución de sincronización (del inglés *bleaching solution*) contiene 1 mL de hipoclorito sódico de uso rutinario (NaClO), 2,5 mL de solución NaOH 1 M

estéril y 0,5 mL H₂O destilada. Esta solución fue diluida 1:2 con M9 1X previamente a su uso.

2.5 Solución de congelación de *C. elegans*

Las cepas generadas en este trabajo han sido congeladas para su conservación a largo plazo. La solución de congelación contiene los siguientes componentes: NaCl 5 M (20 mL/L, nzytech), solución KPO₄ 1 M (50 mL/L), glicerol 100 % (300 mL/L, thermofisher Scientific) y agua destilada hasta completar un volumen de 1L. Esta solución fue autoclavada previamente a la adición de MgSO₄ 1M (300 mL/L). La población fue enriquecida en animales de estadio L1 y descontaminada antes de proceder a la congelación de los gusanos.

2.6 LB líquido y sólido

El medio LB líquido contiene los siguientes componentes: Triptona (10 g/L, BD), extracto de levadura (5 g/L, Fisher Scientific), NaCl (10 g/L, Nzytech) y agua destilada hasta 1 L. Para la obtención de LB sólido, se ha adicionado agar (20 g/L, Takara) a la mezcla de componentes anterior. Previamente a su uso, las soluciones fueron esterilizadas.

2.7 Solución TBS-T 1X y tampón de bloqueo

El tampón TBS-T se ha empleado para realizar los sucesivos lavados de las membranas de proteínas tras la incubación del bloqueo y los anticuerpos correspondientes. La solución TBS-T 1X se ha preparado a partir de TBS-T 10X: Tris (12,11 g/L, Promega), NaCl (87,66 g/L, nzytech) y Tween 20 (5 mL/L, Fisher Scientific). Previamente a la adición del detergente, se ha ajustado el pH a 7,4. El tampón TBS-T se ha empleado como disolvente para la obtención de la solución de bloqueo que contiene un 5 % de leche en polvo.

RESULTADOS

RESULTADOS

Capítulo I. Desarrollo de modelos de toxicidad por ARN con tripletes CAG para la identificación de péptidos RAN y moléculas con potencial terapéutico en *C. elegans*.

Las mutaciones que contienen largas expansiones CAG, en regiones codificantes de los genes, confieren una ganancia de función tóxica a través de dos tipos de moléculas: ARN y proteína. Esto ocasiona alteraciones moleculares distintas. Este tipo de mutaciones está presente en nueve patologías diferentes englobadas bajo el término de enfermedades de poliQs. En los últimos años, la traducción RAN (vea más adelante) ha introducido complejidad al contexto patológico asociado a estas patologías. Es remarcable la importancia que tiene identificar dianas terapéuticas que reduzcan específicamente cada uno de los focos de toxicidad que contribuyen independientemente a la progresión de la patología. La toxicidad asociada a ARN ha sido ampliamente estudiada en un contexto sin ganancia de función proteica, como es el caso de la Distrofia miotónica tipo 1 (Houseley et al., 2005; Mankodi, 2000).

En los posteriores capítulos describiremos varias dianas terapéuticas y mecanismos moduladores de la toxicidad asociada a la agregación de proteínas. Es posible que las dianas terapéuticas que alivian la toxicidad producida por agregados de poliQs, no tengan efecto sobre la toxicidad asociada al ARN, y viceversa. A pesar de que se intuye, desde hace tiempo, que el ARN con expansiones de microsatélites puede tener un papel relevante en la degeneración de las neuronas, no se sabe con el detalle adecuado. Mucho menos se ha profundizado en la generación de fármacos contra estas moléculas potencialmente tóxicas. Por tanto, nos propusimos desarrollar modelos específicos de toxicidad de ARN que contiene expansiones de trinucleótidos CAG, para investigar dos procesos potencialmente patológicos: (#1) Identificar moléculas que alivien la toxicidad de ARN específicamente (#2), investigar la

presencia de péptidos RAN en modelos de expansiones CAG en *C. elegans*. En este proyecto ha contribuido José Bono en la parte experimental destinada al testado de la quimioteca para reducir la toxicidad por ARN que contiene expansiones CAG. Durante la realización de los trabajos de este capítulo han sido llevados a término dos trabajos fin de grado (Paula Rojas-UPV y Diego Leiva-UPV para la caracterización modelos de ARN y péptidos RAN) y dos trabajos fin de máster (María Magallón-UV y Álvaro Ballesteros-UV; profundización en la traducción RAN) co-supervisados con mi director de tesis, Rafael Vázquez.

I.1 Generación de modelos de toxicidad por ARN en *C. elegans*

Para generar modelos en los que realizar cribados farmacológicos, creímos conveniente que los animales mostrasen toxicidad celular sustancial, para tener fenotipos medibles, pero que produjesen animales viables. Para ello era esencial escoger un tejido interesante donde expresar el ARN mensajero que porta las expansiones de tripletes CAG, puesto que hay células más o menos susceptibles de proporcionar un fenotipo medible y visible. En este sentido, se han generado muy pocos modelos de toxicidad inducida por ARN en *C. elegans*. Por un lado, García y colaboradores desarrollaron un modelo para la modelización de tripletes no traducidos CUG en células musculares de *C. elegans* (García et al., 2014). Estos animales mostraban defectos musculares y acumulaciones nucleares que resultaban tóxicas (García et al., 2014). Por otro lado, otros autores generaron modelos mediante la expresión de tripletes CAG en células musculares, las cuales parecen mimetizar los efectos de repeticiones CUG (Mykowska et al., 2011; Wang et al., 2011). Sin embargo, no existen modelos de toxicidad por ARN que contengan tripletes CAG en neuronas, al menos, que tengamos constancia.

Por tanto, decidimos escoger algún tipo neuronal cuya alteración de función produjese un defecto muy obvio, pero que no resultase un impedimento vital para los gusanos. El hecho de que sea un modelo neuronal lo hace más útil para buscar sustancias neuroprotectoras, que son al fin y al cabo, el tipo de medicamentos que necesitan los enfermos de la EH. Un tipo neuronal muy interesante, en este sentido, son las neuronas GABAérgicas del gusano (**Figura 3.1.1**). Estas neuronas tienen una función excitadora de las células musculares,

que cuando es defectuosa induce descoordinación motora en los animales (Schuske et al., 2004), lo cual es muy sencillo de cuantificar.

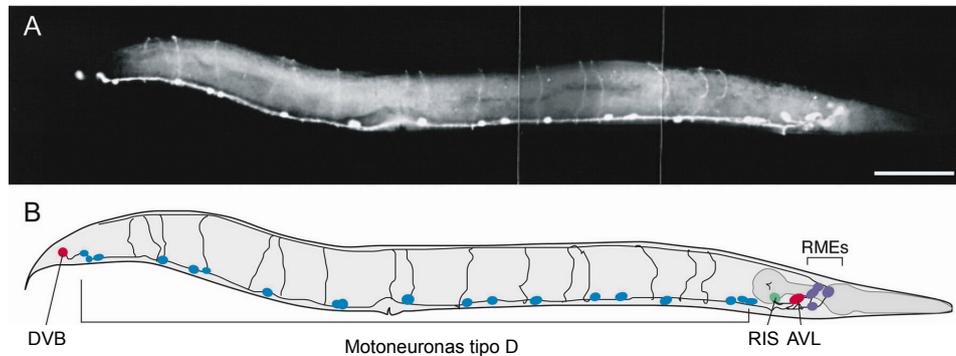


Figura 3.1.1. Sistema GABAérgico de *C. elegans*. (A) Imagen de fluorescencia de un animal adulto teñido con un antiGABA. Solamente 26 neuronas están teñidas para GABA. Barra escala: 100 μ m. (B) Diagrama representativo que muestra las posiciones de las 26 neuronas GABAérgicas mediante colores; violeta: neuronas RMEs que inervan los músculos de la cabeza; rojo: neuronas AVL y DVB que inervan los músculos entéricos; verde: interneurona RIS; azul: motoneuronas que inervan en el músculo. www.wormbook.org.

Para la expresión de repeticiones CAG en neuronas GABAérgicas, decidimos emplear el promotor del gen *unc-25*, el cual se expresa específicamente en estas neuronas. Además del promotor y los tripletes CAG, introdujimos una serie de elementos en el vector de expresión (vea sección Metodología – diseño *in silico*; **Anexo II**) que serían de interés para que resultara doblemente útil. Brevemente, la secuencia, incluida en el vector de expresión, contiene el primer exón de la *HTT*, y en lugar del sitio de inicio de la traducción, contiene tres codones de parada en las tres pautas de lectura (+1, +2, +3), justo antes de la expansión de tripletes CAG, para evitar cualquier traducción del ARN, desde sitios crípticos de inicio situados aguas arriba (**Figura 3.1.2**).

Por otro lado, contiene secuencias que codifican para dominios peptídicos de reconocimiento por anticuerpos estándar (HA, c-Myc y Flag) en el extremo 3' del exón 1 de *HTT*, que están cada una en una de las tres posibles pautas de lectura de la cadena sentido (**Figura 3.1.2**). Estos péptidos nos servirán para detectar si ha habido traducción RAN del transgén y para explorar la presencia de péptidos RAN en los gusanos (**Figura 3.1.2**). Al final de esta secuencia de ADN, hemos incorporado un terminador típico de *C. elegans* correspondiente al gen *unc-54* (Walker et al., 2009) (**Figura 3.1.2**). Por último, esta secuencia de ADN está flanqueada por unas secuencias específicas que permiten la recombinación

homóloga de este inserto empleando el sistema Gateway (vea Metodología – sistema Gateway). A su vez, este sistema contiene vectores de expresión con regiones homólogas al genoma del gusano para poder insertar el transgén en un sitio de referencia mediante la tecnología MosSCI (vea Metodología – Tecnología MosSCI, (Frøkjær-Jensen et al., 2012)).

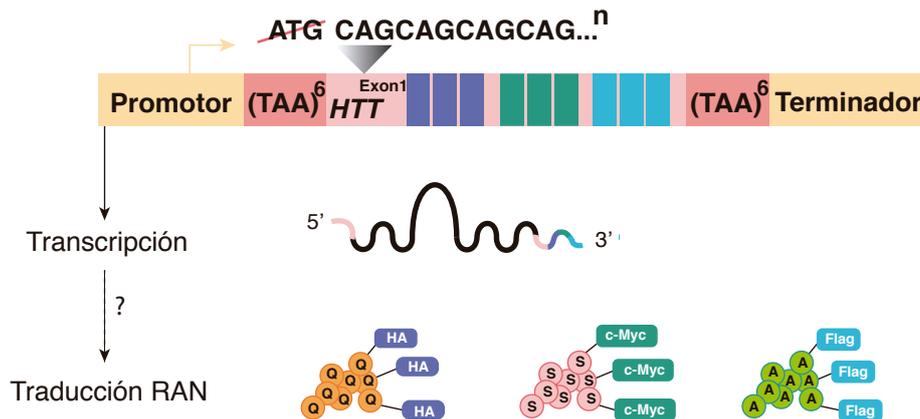


Figura 3.1.2. Construcción de transgenes para estudiar la toxicidad inducida por moléculas de ARN con expansiones de trinucleótidos CAG. Cabe destacar en el diseño de la construcción los siguientes componentes (izq-dcha): **(#1)** región promotora que dirige la expresión a un tejido específico, **(#2)** dos codones de parada de traducción (TAA) por cada pauta de lectura para evitar cualquier traducción previa a los tripletes CAG a partir de posibles ATGs en la secuencia promotora, **(#3)** eliminación de codón inicio ATG previo a los tripletes, **(#4)** secuencia del exón 1 del gen *HTT* para propiciar un contexto genómico natural, **(#5)** número variable de tripletes CAG dentro del exón 1 del gen *HTT*, **(#6)** secuencia específica para la expresión de etiquetas artificiales (HA, c-Myc, Flag) por triplicado que permite el etiquetado de péptidos derivados de las tres pautas de lectura sentido (+1, +2, +3) para identificar posibles péptidos RAN traducidos (poliglutaminas (Q), poliserinas (S) y polialaninas (A)), **(#7)** dos codones de parada de traducción (TAA) por cada pauta de lectura para detener la posible traducción no canónica o traducción RAN, **(#8)** la secuencia del terminador de la transcripción del gen *unc-54*. La transcripción del transgén produce un transcrito de ARN con una zona repetitiva del trinucleótido CAG (línea en color negro) que propicia el apareamiento de bases, dando lugar a la formación de un bucle. En el hipotético caso de que los transcritos sean traducidos de manera independiente a ATG, se generarían tres péptidos que contendrían poliglutaminas, poliserinas y polialaninas, etiquetados con HA, c-Myc y Flag, respectivamente.

Puesto que este tipo de construcciones se generan por módulos (vea Metodología – sistema Gateway) nos resultaba relativamente fácil generar construcciones para expresar esta secuencia de ARN potencialmente tóxica en otros tejidos. Por tanto, creamos varias construcciones con esta estructura para su expresión en neuronas GABAérgicas, y en paralelo, también para dirigir la expresión a

células musculares, sistema nervioso, neuronas mecanosensoriales y quimiosensoriales. Sin embargo, solamente integramos los transgenes que dirigían la expresión de expansiones CAG en células musculares, sistema nervioso y neuronas GABAérgicas (**Figura 3.1.3-A**). Una vez integrados en el genoma del gusano, mediante MosSCI, evaluamos la expresión de cada transgén mediante RT-qPCR. El promotor de expresión en tejidos musculares, *myo-3p*, reflejó una mayor expresión del transgén que promotores neuronales, como *rab-3p* y *unc-25p* (**Figura 3.1.3-B**). Curiosamente, la expresión en las 26 neuronas GABAérgicas fue similar a los niveles observados en prácticamente todo el sistema nervioso (**Figura 3.1.3-B**). Estos resultados confirman que los transgenes se expresan de manera diferencial y dependiente del tejido.

Para caracterizar fenotípicamente nuestros modelos, decidimos analizar la capacidad motora de los animales mediante el recuento del número de *thrashes* que experimentan los animales para mantenerse a flote (vea Metodología – ensayo de motilidad). El análisis de motilidad reflejó que jóvenes adultos silvestres mostraban un número medio de *thrashes* en torno a 200 veces por minuto, mientras que los animales transgénicos que contenían expansiones CAG mostraron defectos de motilidad sutiles dentro del rango 140-180 (*thrashes*/min) (**Figura 3.1.3-C**). Los jóvenes adultos silvestres, resultantes del retrocruzamiento de las cepas transgénicas (que usábamos como controles adicionales), no mostraron cambios en el fenotipo motor comparado con la cepa silvestre Bristol N2 (**Figura 3.1.3-C**). Esto sugiere que los defectos observados en los animales transgénicos estaban asociados específicamente al transgén que contienen y no a posibles mutaciones aleatorias no deseadas del fondo genético de la cepa madre que usamos para hacer la cepa transgénica, EG8079. Estos resultados también sugieren que una única copia del transgén repetitivo produce defectos relativamente sutiles, y que esto era más evidente en los animales en los que el transgén se expresaba en células musculares. A pesar de ello, los fenotipos observados fueron más moderados de lo que esperábamos y poco útiles para realizar el rastreo de compuestos, por lo que decidimos construir cepas similares que incorporasen muchas más copias de cada transgén.

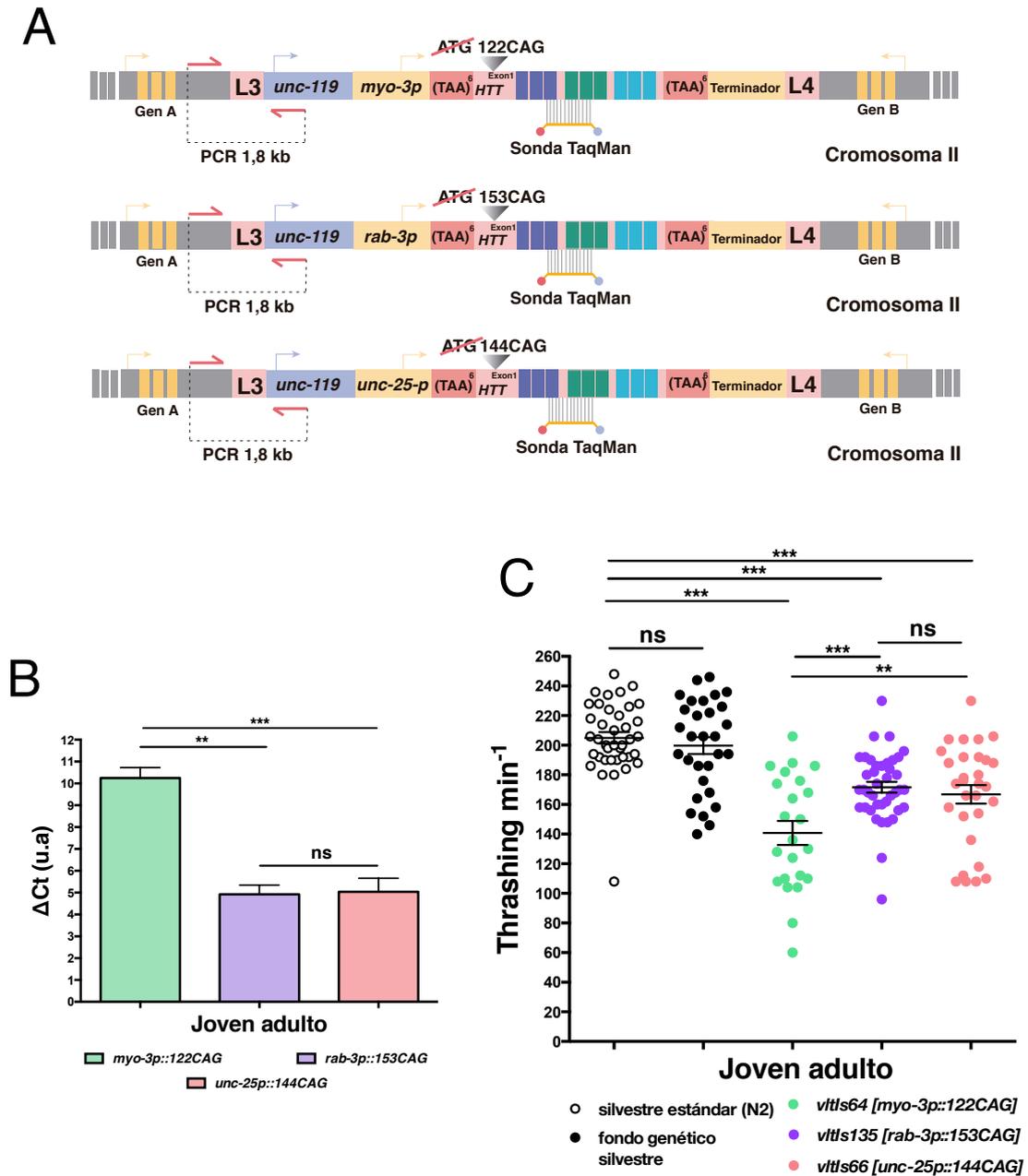


Figura 3.1.3. Inserciones generadas por MosSCI que contienen expansiones de tripletes CAG expresadas en diversos tejidos. (A) Diagrama de las inserciones generadas por MosSCI en el cromosoma II de la cepa EG8079: *oxTi179[ttTi5605 + NeoR (+) + unc-18 (+)] II; unc-119 (ed3) III*. Cada transgén contiene un número de tripletes distinto (122CAG, 153CAG, 144CAG) que serán expresados específicamente en células musculares, tejido nervioso y neuronas GABAérgicas bajo el control de los promotores de los genes *myo-3*, *rab-3* y *unc-25*, respectivamente. Las inserciones contienen una copia del gen *unc-119* que sirve para rescatar el fenotipo de parálisis asociado a la mutación *unc-119(ed3)*. Las regiones L3 y L4 que flanquean el transgén insertado propician la recombinación homóloga con el inserto incluido en el vector pDEST-pCFJ150. Las fechas en rojo denotan los cebadores empleados para amplificar 1,8 kb de ADN y seleccionar los animales transgénicos. La sonda tipo Taqman, complementaria a la región etiquetada por HA y c-Myc, permite analizar la expresión de los transgenes integrados por RT-qPCR. Las inserciones están ubicadas en zonas del genoma que no alteran la expresión de genes adyacentes (Gen A y B). (B) Todos los transgenes insertados se expresan correctamente de acuerdo al promotor que dirige su expresión. (C) El fenotipo comportamental de los

animales fue evaluado mediante la medida del número de *thrashes* por minuto (de *Thrashing assay*) que experimenta un animal en medio líquido. Los animales jóvenes adultos silvestres N2 mostraron una respuesta mayor a 200 *thrashes*/min, mientras que la expresión de ARN con tripletes reduce esta respuesta un 15 % en los modelos neuronales y un 30 % en el modelo de expresión en células musculares. Todas las cepas transgénicas fueron cruzadas al menos ocho veces con el genoma de referencia N2 (silvestre), para eliminar posibles mutaciones presentes en el genoma de EG8079, o que pudieran haber sido causadas al movilizar el transposón durante la inserción del transgén. Además, aislamos animales silvestres, derivados de estos cruces, que tienen el mismo fondo genético que los animales transgénicos. Estos se han empleado como controles silvestres adicionales. No obtuvimos diferencias entre la cepa silvestre N2 y los controles con el fondo genético de los cruces, confirmando que no hay mutaciones aleatorias indeseadas que puedan modificar el fenotipo de los animales. Los datos representan la media \pm SEM. (N = 3; gráfico B); (N > 20; gráfico C). N_{EXPERIMENTAL} = 3. ***: p-valor < 0,001; **: p-valor < 0,01; ns: estadísticamente no significativo. Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

I.2 La expresión de múltiples copias del transgén con tripletes CAG en neuronas GABAérgicas altera la capacidad motora de forma sustancial

La expresión de transgenes de tripletes CAG de copia única fue insuficiente para inducir fenotipos severos de movilidad, dificultando el uso de esos modelos para el rastreo de librerías de compuestos con potencial terapéutico. Por tanto, para intensificar el efecto tóxico de transcritos CAG, generamos líneas transgénicas con arrays extracromosómicos (del inglés, *extrachromosomal array*) sobre un fondo genético silvestre. Estos arrays son cromosomas satélites que contienen múltiples copias (decenas o centenares) del ADN que se inyecta para generar el transgénico y se heredan de forma no Mendeliana. Pueden transmitirse entre un 10 % y un 90 % a la descendencia, y en ocasiones, producen mosaicismo en los individuos al no segregarse durante la mitosis.

Seleccionamos el modelo GABAérgico que frente a los otros dos modelos, resulta más innovador, puesto que no se han desarrollado modelos previamente para estudiar la toxicidad por ARN en neuronas. El sistema nervioso de *C. elegans* solamente posee 26 neuronas GABAérgicas, con la peculiaridad de que cualquier perturbación de las mismas se traduce a fenotipos comportamentales muy específicos y nos permite focalizar la atención a un número de neuronas muy reducido. Hemos desarrollado líneas transgénicas extracromosómicas que incorporan los transgenes *vtEx[unc-25p::144CAG::unc-54t]*, que sería nuestra cepa para rastrear, y *vtEx[unc-25p::22CAG::unc-54t]* que es un control negativo con un número de tripletes CAGs no patológico. Fueron aisladas cuatro líneas estables para el modelo

patológico GABAérgico (144CAG) y dos líneas transgénicas control (22CAG). Hemos evaluado la capacidad motora de todas las líneas aisladas mediante el recuento del número medio de *thrashes*/min. Como control adicional hemos analizado la respuesta motora de una cepa silvestre sin transgén (Bristol N2) la cual mostró un número promedio *thrashes*/min superior a 200 (**Figura 3.1.4-A**) en concordancia con resultados anteriores. La presencia de 22CAG indujo una toxicidad sutil, puesto que los animales mostraron una ligera disminución de su capacidad locomotora (**Figura 3.1.4-A**).

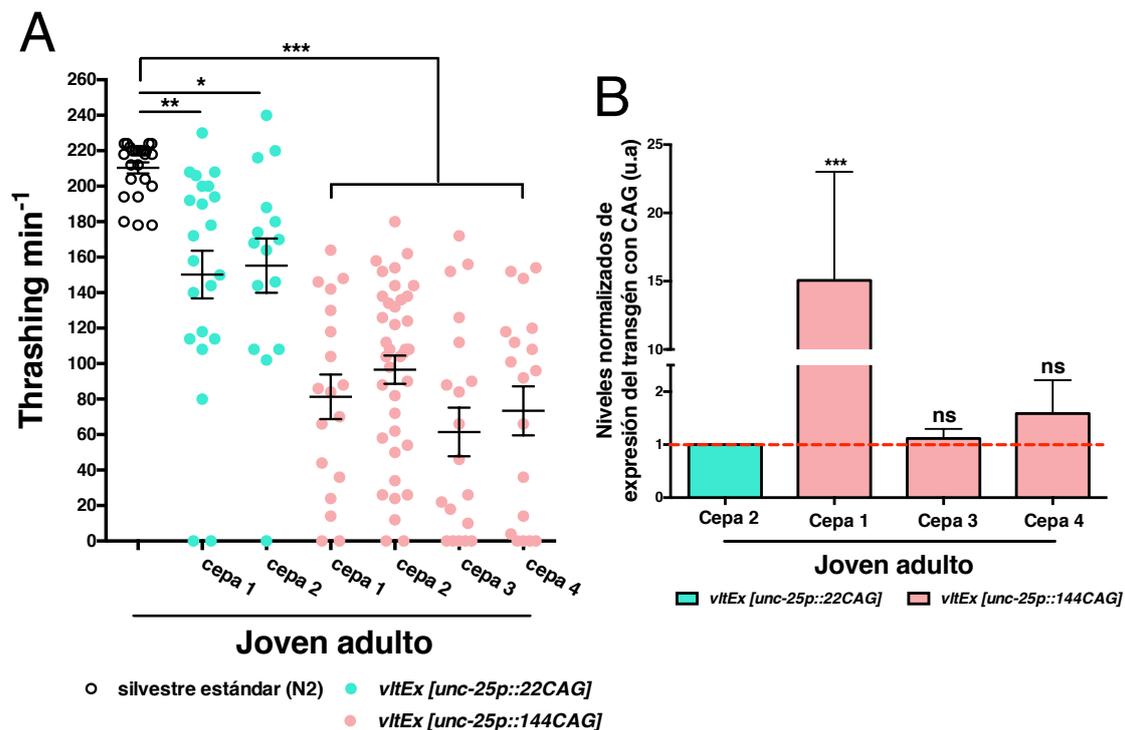


Figura 3.1.4. La presencia de transcritos con tripletes CAG en neuronas GABAérgicas altera sustancialmente la capacidad motora de *C. elegans*. **(A)** La expresión de múltiples copias del transgén *unc-25p::144CAG* muestra alteraciones sustanciales en la capacidad motora debido a la perturbación funcional de las neuronas GABAérgicas. La expresión de expansiones cortas de repeticiones, 22CAG, en neuronas GABAérgicas produce defectos sutiles en la motilidad de animales jóvenes adultos transgénicos con respecto a la cepa silvestre, N2. **(B)** La expresión de los transgenes de copia múltiple fue diferencial entre las líneas transgénicas con 144CAG caracterizadas. Solamente las líneas transgénicas #3 y #4 muestran niveles de expresión similares a la cepa control #2. La línea transgénica #1 fue descartada del estudio por presentar niveles de expresión extremadamente diferentes al control #2. Se muestran los valores de p-valor referidos al control #2. Los datos representan la media \pm SEM. (N > 20; gráfico A); (N = 3; gráfico B). N_{EXPERIMENTAL} = 3. ***: p-valor < 0,001; **: p-valor < 0,01; *: p-valor < 0,05; ns: estadísticamente no significativo. Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

A pesar de ello, las líneas transgénicas que portaban un mayor número de tripletes mostraron fenotipos más severos y significativos, con respecto tanto a al control silvestre como al control transgénico con 22CAG (**Figura 3.1.4-A**). Estos resultados sugieren que el aumento de expresión del transgén 144CAG mediante el aumento del número de copias es más eficiente para producir fenotipos más evidentes, en contraste con las observaciones previas. A pesar de que el control 22CAG induzca una ligera toxicidad, es remarcable que esta sea menor que la observada con 144CAG.

Considerando estos resultados, hemos seleccionado la cepa control #2, y las cepas patológicas #1, #3 y #4 como posibles candidatas para el rastreo de moléculas. Una de las desventajas de estos modelos es que no podemos controlar el número de copias del transgén en cada línea generada independiente. Por tanto, es conveniente analizar la expresión del transgén en cada línea para seleccionar líneas extracromosómicas que sean comparables. Es importante que la diferencia en el fenotipo venga determinada por la longitud de la expansión mutante y no por el número de copias del transgén. Para ello, evaluamos los niveles de expresión mediante RT-qPCR y detectamos valores de expresión distintos en las diferentes líneas. Las cepas transgénicas #3 y #4 mostraron niveles de expresión del transgén similares a la cepa control #2, mientras que la cepa transgénica #1 mostró niveles de expresión muy superiores a la cepa control (**Figura 3.1.4-B**). Estos resultados demuestran que el aumento del número de copias de expansiones largas de 144CAG en neuronas GABAérgicas induce defectos motores específicos de transcritos CAG tóxicos fácilmente evaluables *in vivo*.

I.3 Detección de moléculas potenciales frente a la toxicidad asociada a transcritos CAG en neuronas GABAérgicas

En base a los resultados de caracterización, seleccionamos la cepa transgénica #3 (*vltEx276[unc-25p::144CAG]*) para realizar el testado de compuestos de la quimioteca, ya que muestra un fenotipo algo más marcado que el de la cepa #4 (**Figura 3.1.4-A**). Para el rastreo, empleamos la quimioteca sintetizada por la empresa Pfizer (Nueva York, NY, EEUU) que contiene 85 sustancias terapéuticas empleadas para diversas patologías humanas (**Anexo I; Tabla 2.24**).

Capítulo I

Los animales sincronizados en estadio L1 con fondo genético *vltEx276[unc-25p::144CAG; myo-2p::mCherry]* fueron cultivados en presencia de los compuestos (10 μ M) hasta alcanzar el estadio joven adulto. Tras ello, evaluamos la capacidad de motilidad en medio líquido de al menos 10 animales por tratamiento, incluyendo DMSO 0,1 % como tratamiento control en cada ronda de análisis. Previamente al fenotipado, los animales transgénicos tratados fueron seleccionados mediante el reportero *myo-2p::mCherry* usando un microscopio de disección con fluorescencia. Para confirmar el efecto protector de los candidatos seleccionados, hemos realizado al menos tres rondas de rastreo adicionales. Así, hemos desechado falsos positivos y finalmente, solo hemos considerado los compuestos que resultaban positivos en todas las rondas de análisis.

En la ronda I, hemos evaluado la totalidad de la quimioteca, 85 compuestos, de los cuales seleccionamos 17 candidatos que mostraron un efecto protector sobre la capacidad de motilidad (marcados en rojo), a diferencia de un compuesto (#1835) que resultó ser tóxico para los animales (señalados en azul) (**Figura 3.1.5**). Durante el rastreo, pudimos observar que los valores de *thrashing* de la cepa transgénica estaban por encima de lo observado previamente (**Figura 3.1.4-A y 3.1.5**). Es notable resaltar que los animales cultivados en medio líquido desde que nacen pueden adquirir ventajas para aclimatarse al medio donde viven (Çelen et al., 2018), explicando este hecho. El fenotipo de motilidad mostrado anteriormente fue evaluado en una población cultivada en medio sólido (**Figura 3.1.4-A**), mostrando valores inferiores a 80 *thrashes*/min, a diferencia del observado en cultivo líquido, en torno a 140-150 *thrashes*/min (**Figura 3.1.5**).

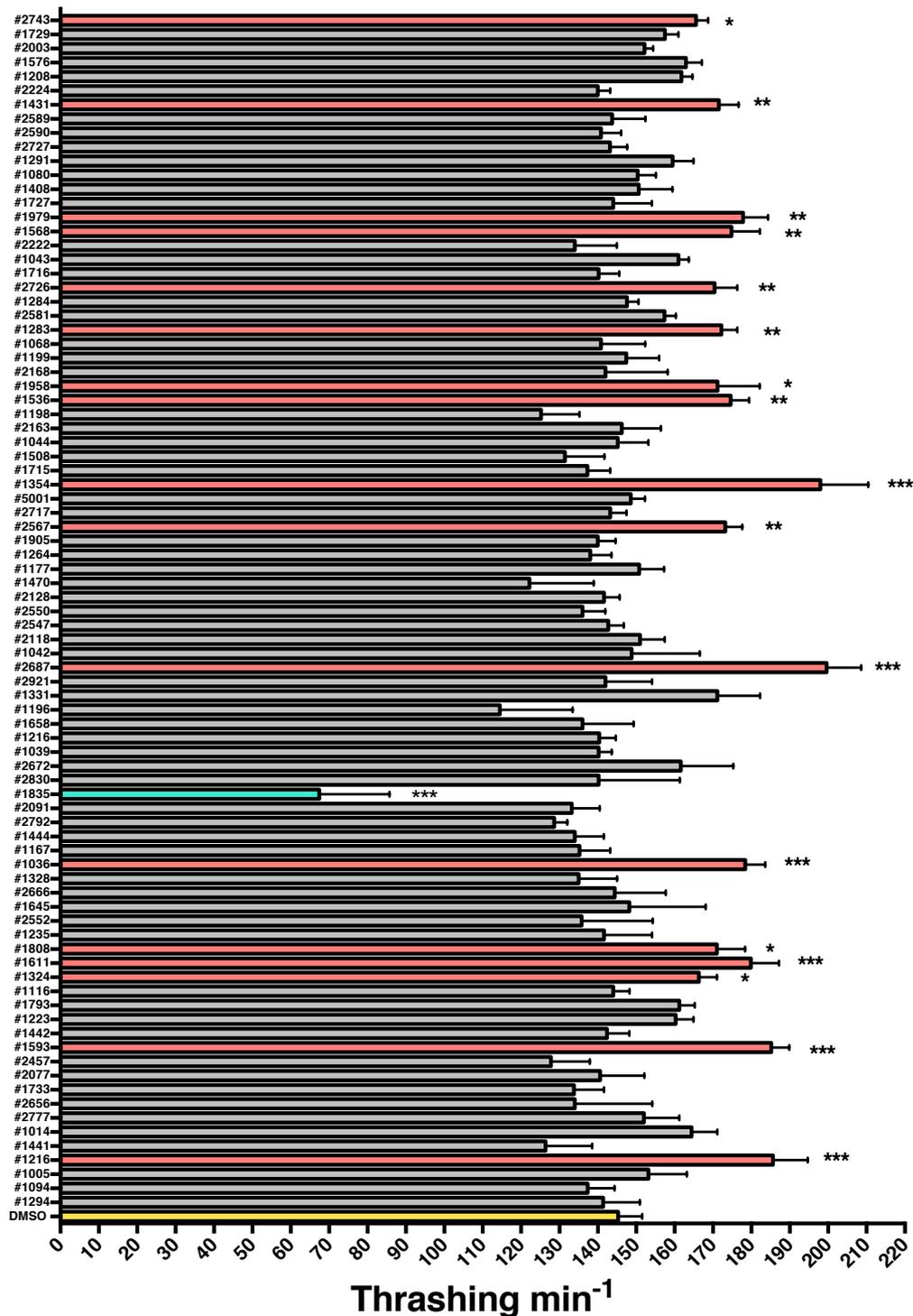


Figura 3.1.5. Testado de 85 compuestos potenciales de la quimioteca de Pfizer sobre el modelo *unc-25p::144CAG*. Identificación de 17 moléculas (resaltadas en color rojo) que mejoran el fenotipo motor asociado a transcritos que contienen tripletes CAG expresados en neuronas GABAérgicas, con respecto al control con DMSO 0,1 % (resaltado en amarillo). También se ha identificado una sustancia (en color azul) que reduce la capacidad motora de los animales tratados con respecto al control. Este experimento corresponde a la ronda #I de testado con al menos tres réplicas experimentales por tratamiento. Los datos representan la media \pm SEM (N = 10). ***: p-valor < 0,001; **: p-valor < 0,01; *: p-valor < 0,05. Los valores de p-valor son referidos al control con DMSO. Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

De los 17 compuestos, fueron seleccionados 13 candidatos con la estadística más robusta (***: p-valor < 0,001; **: p-valor < 0,01) para validarlos en sucesivas rondas independientes. Después de tres rondas de testado adicionales, fueron detectados cuatro compuestos potencialmente neuroprotectores (Figura 3.1.6).

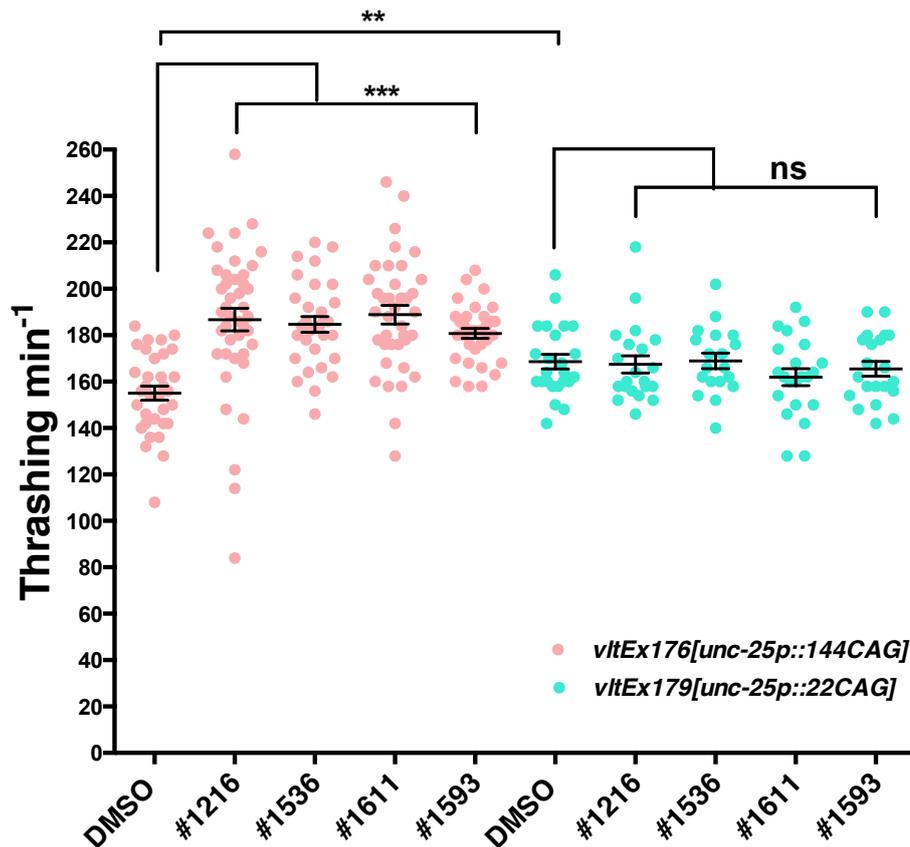


Figura 3.1.6. Fármacos con un efecto neuroprotector reproducible frente a la toxicidad inducida por transcritos CAG. El tratamiento con los fármacos #1216, #1536, #1611 y #1593 promueve una mejora de la función neuronal, medido de forma indirecta mediante el fenotipo motor en animales transgénicos *unc-25p::144CAG*. En contraste, la incubación de animales transgénicos *unc-25p::22CAG* con estos mismos compuestos no produce ningún efecto sobre el fenotipo motor. Estos datos corresponden a los recuentos totales de una $N_{\text{EXPERIMENTAL}} = 4$ para el análisis de *unc-25p::144CAG* y una $N_{\text{EXPERIMENTAL}} = 3$ para el análisis de *unc-25p::22CAG*. Los datos representan la media \pm SEM. ($N > 30$; *unc-25p::144CAG*), ($N > 20$; *unc-25p::22CAG*). ***: p-valor < 0,001; **: p-valor < 0,01; ns: estadísticamente no significativo. Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

El compuesto #1216 corresponde a PFI-1, un inhibidor selectivo para proteínas BET que contienen bromo dominios (BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT) y que ha sido empleado como una estrategia frente al cáncer (Picaud et al., 2013). Otro inhibidor, CP673451 (#1536), induce un efecto neuroprotector frente a

transcritos CAG expandidos. CP673451 es un inhibidor de PDGFR (factor de crecimiento derivado de plaquetas) el cual presenta un papel esencial en angiogénesis y regula múltiples linajes que producen esteroides (Andrae et al., 2008; Schmahl et al., 2008). Adicionalmente, hemos identificado una sustancia con potencial antibiótico frente a infecciones por pseudomonas (Cefobid; #1611) y un inhibidor (Apixaban; #1593) del factor de coagulación X (Factor Xa) empleado para el tratamiento y prevención de trombosis (Bhanwra and Ahluwalia, 2014).

Estos resultados preliminares desvelan nuevas potenciales vías de señalización y proteínas dianas que podrían tener una función importante en la modulación de la toxicidad asociada a transcritos CAG expandidos en *C. elegans*.

I.4 Investigación de la presencia de péptidos RAN en modelos de expansiones CAG en *C. elegans*

Con respecto a los animales que generamos mediante MosSCI, decidimos averiguar si aquel fenotipo motor sutil se debía a la expresión de ARN tóxico y/o a péptidos RAN. Para ello, decidimos identificar péptidos que se produjesen fuera de pauta mediante la detección indirecta de las etiquetas artificiales (HA, c-Myc y Flag) expresadas en cada pauta de lectura (**Figura 3.1.2, 3.1.3-A**). Hemos reflejado que nuestros modelos carecen de un ATG de inicio previo a la zona repetitiva para bloquear la traducción vía canónica (**Figura 3.1.2**). Desafortunadamente, tras una profunda puesta a punto y muchos intentos fallidos, no pudimos detectar péptidos derivados de la traducción RAN mediante anticuerpos específicos anti-HA, anti-c-Myc y anti-Flag. Esta falta de detección, no implicaba la no existencia de péptidos endógenos y pensamos que podría ser fruto de un problema técnico en el método de detección. Por ello decidimos generar nuevos modelos para investigar la presencia de péptidos RAN en *C. elegans*.

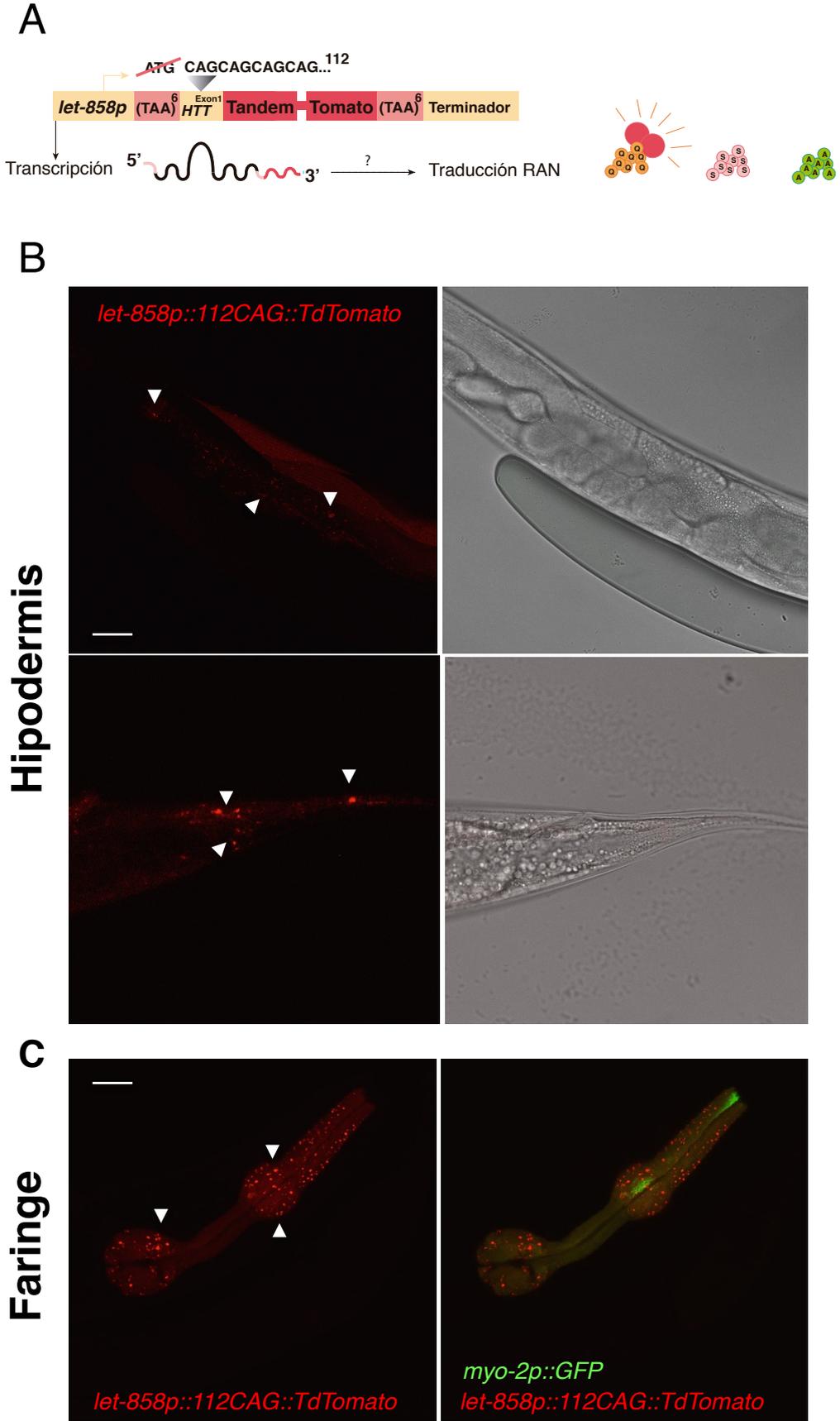
I.5 La expresión de tripletes CAG sin ATG de inicio empleando un promotor ubicuo produce péptidos

Para paliar las posibles limitaciones técnicas de expresión y detección del transgén, desarrollamos nuevos modelos de estudio que incorporasen la

expansión CAG en pauta con una proteína fluorescente para detectar *in vivo* la presencia o la ausencia de péptidos RAN en *C. elegans* (**Figura 3.1.7-A**).

Nuestro diseño estaba basado en un estudio previo donde inducen toxicidad por tripletes CGG etiquetados con GFP en *D. melanogaster* (Todd et al., 2013). La construcción es similar a nuestra aproximación anterior, con la única diferencia de que en el lugar de las etiquetas artificiales, hemos incluido la secuencia de la proteína pseudomonomérica fluorescente TdTomato en pauta con el triplete repetitivo CAG (**Figura 3.1.7-A**, vea secuencia #3 en **Anexo II**). TdTomato es una proteína pseudomonomérica formada por dos copias del gen que codifica la proteína DsRed (con tendencia a agregarse en polímeros). Puesto que la secuencia de *TdTomato* contiene dos copias de *DsRed*, cuando se traducen se encuentran unidas covalentemente, y se repliegan sobre sí mismas en forma de monómero (Shaner et al., 2004). Esto hace que TdTomato sea mucho más brillante que otras proteínas monoméricas como EGFP, lo que aumenta la sensibilidad y probabilidad de detección de estos péptidos, en caso de que estuviesen expresados a niveles muy bajos. Como la secuencia de *TdTomato* está en pauta con el codón CAG, solamente podríamos identificar *in vivo* péptidos enriquecidos en poliQs fusionados a TdTomato, mientras que los otros péptidos no podríamos visualizarlos por fluorescencia (**Figura 3.1.7-A**).

Para la generación de los transgénicos, decidimos usar un promotor ubicuo, *let-858p*, que nos permite evaluar la expresión en todo el organismo. Esto podría ser de utilidad, si los tejidos en los que ya hemos intentado detectar traducción RAN fuesen refractarios a este fenómeno. Generamos la construcción pAPG57 que contiene 112CAG en pauta con *TdTomato* para su expresión ubicua mediante el promotor *let-858p* y lo inyectamos sobre el fondo genético silvestre Bristol N2 para generar la cepa con genotipo *vltEx140[let-858p::112CAG::TdTomato::let-858t; myo-2p::GFP]* que contiene múltiples copias del transgén no integradas. Sorprendentemente, pudimos observar expresión de TdTomato en los animales inyectados, y además esta expresión no era completamente difusa en algunos tejidos, pudiendo observar un patrón punteado similar a los modelos de agregación por poliQs. Este patrón de acúmulos fue detectado en tejidos específicos, como hipodermis y faringe (**Figura 3.1.7-B-C**), e incluso, en intestino (datos no mostrados).



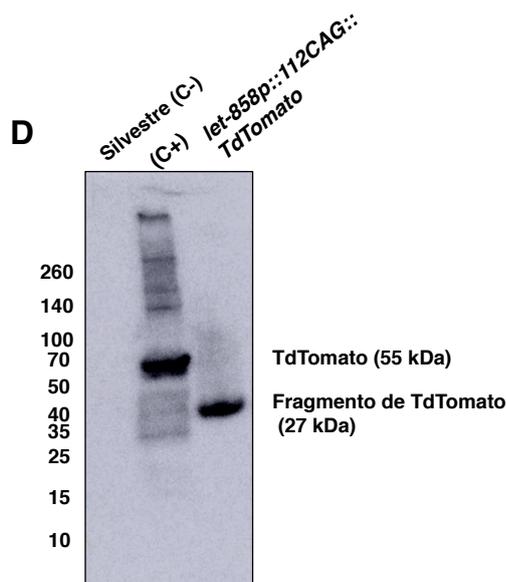


Figura 3.1.7. Expresión de la proteína fluorescente TdTomato desde un transgén que codifica una expansión de CAGs pero que no contiene un ATG de inicio de la traducción. (A) Diagrama que describe los diferentes módulos del transgén empleado para detectar traducción RAN en *C. elegans*. La construcción tiene los siguientes componentes (izq-dcha): (#1) región promotora del gen *let-858* que dirige la expresión ubicua del transgén, (#2) dos codones de parada de traducción por cada pauta de lectura para evitar cualquier traducción desde una región aguas arriba de los tripletes CAG, (#3) ausencia del codón de inicio del exón 1 del gen *HTT*, (#4) secuencia de ADN procedente del exón 1 del gen *HTT*, flanqueante a la región repetitiva, para propiciar un contexto genómico natural, (#5) 112 tripletes CAG inmersas en el exón 1 del gen *HTT*, (#6) secuencia que codifica la proteína fluorescente TdTomato en pauta con la secuencia repetitiva del triplete CAG, (#7) dos codones de parada de traducción por cada pauta de lectura para detener la posible traducción no canónica o RAN, (#8) secuencia terminadora de la transcripción del gen *let-858*. La transcripción del transgén produce un transcrito de ARN con una zona repetitiva del trinucleótido CAG que forma un bucle por el apareamiento de bases GC. Los transcritos, al carecer de ATG, solamente pueden traducirse mediante la traducción RAN, sintetizándose posibles péptidos raros (poliQs-TdTomato, poliSs y poliAs). En el supuesto de observar fluorescencia, sería indicativo de traducción. (B-C) Imágenes representativas de gusanos que expresan el transgén de expresión ubicua de 112CAG en pauta con *TdTomato* bajo el control del promotor del gen *let-858*. La expresión del transgén se localiza en tejidos concretos, como faringe y epidermis, en forma de patrón difuso y punteado. (D) El análisis por Western Blot de muestras de proteína total de animales transgénicos mostró un patrón inesperado, ya que TdTomato es una proteína pseudomonomérica de 55 kDa, y en su defecto, obtuvimos una banda inferior de aproximadamente 40 kDa. Como control positivo utilizamos TdTomato producido en *E. coli* y un extracto proteico de nematodos silvestres como control negativo. Barra escala: 20 μ m.

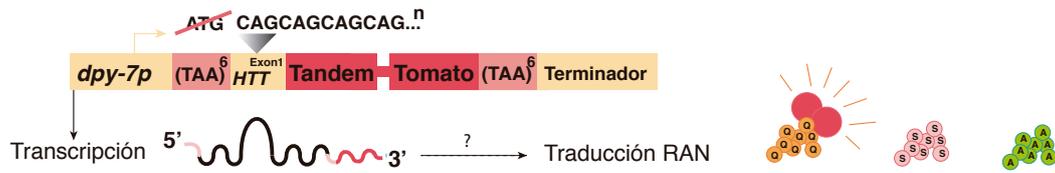
Estos resultados sugieren que la posible presencia de estos péptidos raros podría estar confinada a tejidos específicos. El patrón punteado podría relacionarse con una traducción previa a los tripletes, sin embargo, no podemos afirmar que los agregados observados sean tripletes CAG traducidos.

Para confirmar estos resultados, decidimos analizar estas proteínas mediante la detección específica de la proteína TdTomato con el anticuerpo anti-RFP (del inglés *Red Fluorescent Protein*) por Western Blot. En el ensayo incluimos como control positivo un extracto bacteriano procedente de una cepa de *E. coli* que contiene un plásmido que codifica y expresa TdTomato. El análisis bioquímico de las muestras mostró un patrón de bandas diferente entre el control positivo bacteriano y la cepa transgénica *112CAG::TdTomato* (**Figura 3.1.7-D**). En el extracto bacteriano observamos una banda correspondiente a la proteína completa en torno a 55 kDa, mientras que en el extracto de animales transgénicos detectamos una banda a la mitad del tamaño (≈ 40 kDa) (**Figura 3.1.7-D**). Estos resultados sugieren que hay expresión de la proteína fluorescente TdTomato aunque el experimento de Western Blot resulta un tanto sorprendente.

I.6 Detección *in vivo* de acúmulos raros en hipodermis de modelos de traducción RAN

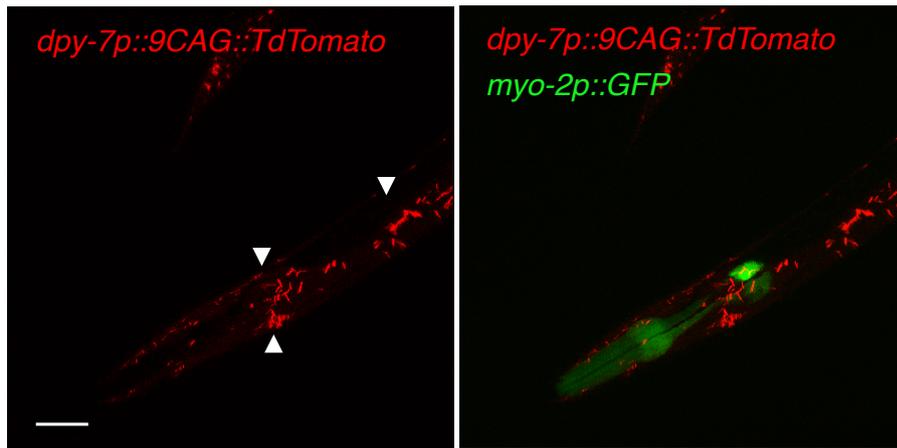
La expresión ubicua del transgén *112CAG::TdTomato* resultó ser relativamente tóxica, e incluso observamos una selección natural de animales con poca expresión del transgén (datos no mostrados). Un hecho interesante que observamos es que la expresión de TdTomato estaba confinada a tejidos en los que no habíamos investigado anteriormente la traducción RAN (tejido hipodérmico, faringe, intestino etc.), lo que sugiere que es posible que la traducción RAN ocurra de forma excepcional en estos tejidos. Para profundizar en la detección y caracterización de estos péptidos, generamos nuevas construcciones para expresar de manera específica de tejido el transgén *112CAG::TdTomato* en hipodermis mediante el promotor del gen *dyp-7* (**Figura 3.1.8-A**). En paralelo, fue clonado el transgén *dpy-7p::9CAG::TdTomato* para emplearlo como control. Ambas construcciones fueron inyectadas en animales silvestres N2 para generar líneas transgénicas extracromosómicas estables. Al igual que con el modelo ubicuo, lo primero que observamos fue fluorescencia roja en los animales transgénicos lo que indicaba que nuestra construcción *dyp-7p::112CAG::TdTomato::unc-54t* se estaba traduciendo. Sin embargo, observamos traducción del transgén tanto para repeticiones patológicas (*112CAG::TdTomato*) como no patológicas (*9CAG::TdTomato*) (**Figura 3.1.8-B**). Además, detectamos agregados de la proteína fluorescente TdTomato en ambas cepas (**Figura 3.1.8-B**).

A

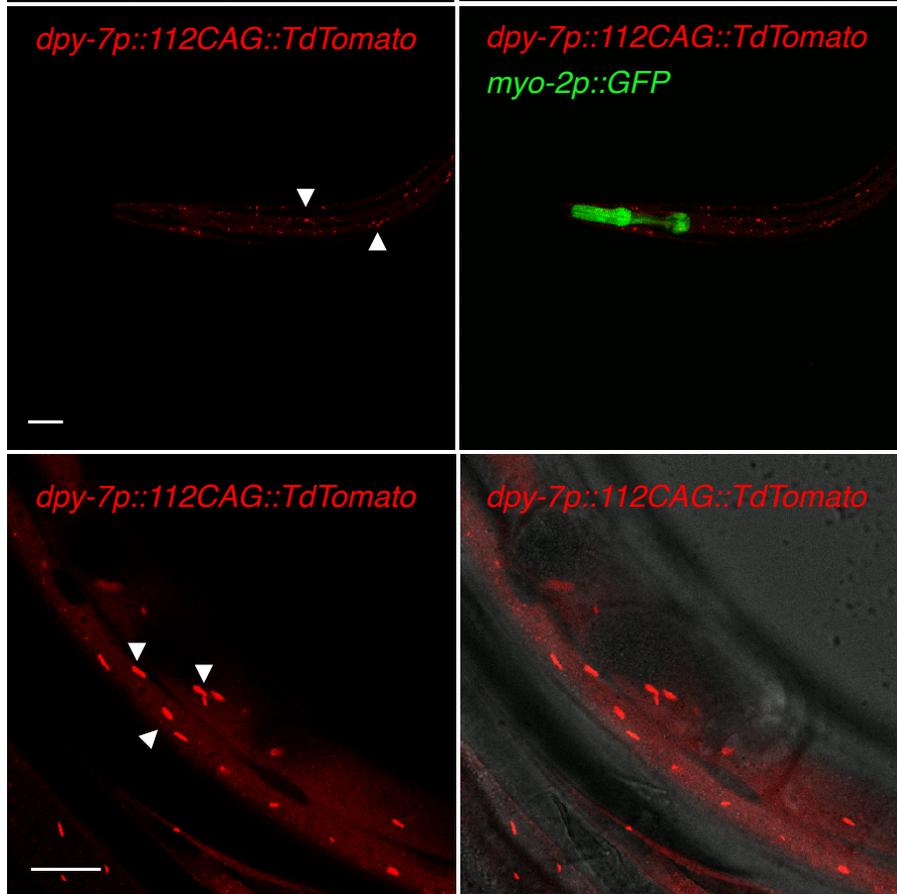


B

9 CAG



112 CAG



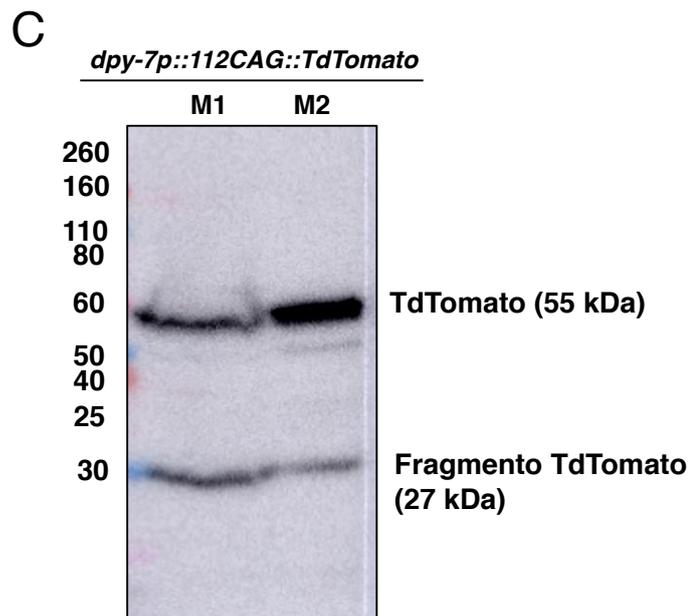


Figura 3.1.8. La expresión de tripletes CAG fusionados a la proteína fluorescente TdTomato en hipodermis genera fluorescencia y agregados de proteínas. (A) Diagrama de la construcción que dirige la expresión de tripletes CAG (9 y 112) específicamente al tejido epidérmico (B) Imágenes representativas del modelo de expresión en hipodermis de 9CAG y 112CAG en pauta con *TdTomato* bajo el control del promotor del gen *dpy-7*. Tanto la expresión de 9 como 112 tripletes CAG induce un patrón de agregación similar en animales jóvenes adultos. (C) El análisis bioquímico de dos muestras independientes de proteína total de animales transgénicos con 112CAG (M1 y M2) muestra la presencia de dos bandas, una referida a la proteína TdTomato completa (55 kDa) y otra a la forma fragmentada (27 kDa), en ambos extractos. Barra escala: 20 μ m.

La apariencia de estos depósitos no se asemejaba a la forma previamente observada para los cuerpos de inclusión de poliQs, siendo estos nuevos depósitos de menor tamaño y más alargados. Estos resultados sugieren que el transgén se traduce independientemente del número de tripletes. Para tratar de entender estos resultados, analizamos estas cepas mediante un Western Blot empleando un anticuerpo anti-RFP. Este mostró la presencia de dos bandas de diferente tamaño molecular, como habíamos observado previamente, que podrían corresponder a la proteína completa (55 kDa) y a fragmentos de TdTomato (**Figura 3.1.8-C**). Estos resultados sugieren que quizás se está produciendo una proteólisis de TdTomato.

Finalmente, nuestros modelos de toxicidad que contienen expansiones CAG no traducidas nos han servido por un lado para identificar 4 moléculas con un

Capítulo I

potencial terapéutico sobre la toxicidad asociada a transcritos CAG. La expresión de estas expansiones en pauta con TdTomato ha permitido, además, que podamos detectar expresión a partir de transgenes que carecen de ATG de inicio. Sin embargo, nuestros resultados no son concluyentes, y por tanto, no podemos afirmar ni descartar la presencia de péptidos RAN en *C. elegans* con este modelo.

Capítulo II: La activación sinérgica de AMPK previene la toxicidad inducida por poliglutaminas en *C. elegans*.

La homeostasis de proteínas es un proceso vital para la supervivencia de los organismos, por ello hay varios procesos destinados a su regulación (revisado por Labbadia y Morimoto (Labbadia and Morimoto, 2013)). Estos procesos están compuestos por moléculas señalizadoras, reguladoras y con funciones de eliminación de proteínas defectuosas, que a veces actúan como moduladores de la proteostasis, cuya actividad, a veces, puede ser modulable mediante fármacos. La identificación de moduladores de la agregación de poliQs nos aproxima a la identificación de nuevos mecanismos que involucren posibles dianas terapéuticas frente a la toxicidad asociada a poliQs. Vázquez-Manrique y colaboradores mostraron que el heterotrímero AMPK modula la agregación de poliQs y que, cuando se activa, mejora la funcionalidad neuronal en modelos de la EH (Vazquez-Manrique et al., 2016). AMPK es un activador directo de la autofagia, uno de los procesos más importantes implicados en la proteostasis.

Han sido descritas varias moléculas que actúan como activadores directos o indirectos de AMPK (vea más abajo para una descripción detallada). Recientemente ha sido publicado que el tratamiento con metformina, un activador indirecto de AMPK, disminuye el patrón de agregación de poliQs en células musculares y mejora la función mecanosensorial en modelos de *C. elegans* (Sanchis et al., 2019). Además, la metformina reduce los agregados de mHtt en cerebro de ratones modelo para EH (Sanchis et al., 2019; Vazquez-Manrique et al., 2016) e induce mejoras a nivel comportamental en el modelo de ratón zQ175 (Sanchis et al., 2019). Otro activador de AMPK, el salicilato, se une alostéricamente a AMPK β , una de las subunidades reguladoras del complejo enzimático AMPK (Hawley et al., 2012). Una desventaja del uso crónico de estos fármacos es que estas moléculas son pleiotrópicas, pudiendo activar diferentes dianas, lo que podría provocar efectos secundarios indeseados. En relación a esto, recientemente se ha demostrado una interacción sinérgica de metformina y salicilato sobre la activación de AMPK que mejora la susceptibilidad a insulina (Ford et al., 2015). Por tanto, nosotros hipotetizamos que esta sinergia sobre AMPK también podría disminuir la toxicidad inducida por poliQs. A su vez, con este tratamiento sinérgico podríamos reducir las dosis de ambas sustancias, obteniendo el mismo resultado sobre la toxicidad de las poliQs. Respecto a

esto, en este capítulo describimos la investigación y demostración de esta hipótesis, en relación al tratamiento sinérgico con metformina y salicilato para reducir el estrés asociado a la toxicidad por agregación de poliQs y la proteína α -sinucleína. También describimos que la activación sinérgica es dependiente de AMPK en modelos de toxicidad de poliQs. Este proyecto ha sido desarrollado en colaboración con M^a Dolores Sequedo y José Bono, ambos son miembros del grupo liderado por el Dr. Rafael Vázquez. El Dr. David Hervás (Unidad de bioestadística del instituto de investigación sanitaria La Fe, Valencia), Victoria Fornés (TauAnalytics company, Valencia) y el Dr. Carlos Mora (Institute of biotechnology, University of Helsinki, Finlandia) han contribuido en la parte analítica de los datos.

II.1 La metformina y el salicilato actúan de manera sinérgica para reducir la toxicidad asociada a poliQs

AMPK es un regulador maestro de la homeostasis energética celular y está formada por una subunidad catalítica (AMPK α) y dos subunidades reguladoras (AMPK γ y AMPK β). AMPK puede ser activada mediante la unión de AMP a la subunidad reguladora AMPK γ , que induce la fosforilación de un residuo de treonina de la subunidad catalítica de AMPK (AMPK α), activando la función catalítica del complejo enzimático.

La metformina es un fármaco sintético, derivado de un producto natural de la planta *Galega officinalis*, cuya estructura química está formada por dos moléculas de guanidina (Rena et al., 2017). La metformina mejora la glucemia mediante la activación de AMPK en el hígado. Ello ha supuesto que este tratamiento sea altamente atractivo para combatir la diabetes tipo 2 (Gottlieb and Auld, 1962). Sin embargo, algunos mecanismos de acción de la metformina no involucran a AMPK, sino a otras moléculas como ATR1, SOD1, HIF1 α , PKR, entre otros ejemplos (Forouzandeh et al., 2014; Zhou et al., 2016; Zu et al., 2020). En relación a los diferentes mecanismos de acción sobre AMPK, uno de los más conocidos es su capacidad de inhibir moderadamente el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, previniendo la producción de ATP mitocondrial e incrementando la ratio AMP/ATP citoplasmática, que a su vez, promueve la activación del complejo AMPK (Owen et al., 2000; Rena et al., 2017). El salicilato es un derivado del ácido salicílico (aspirina) empleado comúnmente por sus propiedades analgésicas, anti-piréticas y anti-coagulantes. A diferencia de la metformina, el salicilato es un activador directo de AMPK puesto que se

une alostéricamente a la subunidad reguladora AMPK β (Hawley et al., 2012). Sin embargo, su mecanismo de acción también es capaz de modular otras dianas como ciclooxigenasas, CDKs, GAPDH, entre algunos ejemplos (Bhat, 2009; Choi et al., 2015; Dachineni et al., 2017). Desafortunadamente, el uso crónico de estas sustancias puede producir efectos no deseados, como la pérdida de peso ligada a la metformina (The Diabetes Prevention Program Research Group, 2012) o la hemorragia gastrointestinal asociada a la aspirina (Huang et al., 2011).

Puesto que ambas sustancias pueden activar AMPK de manera sinérgica en mamíferos (Ford et al., 2015), decidimos investigar si esta interacción podría reducir el estrés asociado a agregados de poliQs en *C. elegans*. Para ello, hemos empleado cepas de *C. elegans* como modelos de toxicidad inducidos por poliQs en neuronas y células musculares. En concreto una cepa que contiene un transgén que induce la expresión de 112 glutaminas en pauta con la proteína pseudomonómica fluorescente TdTomato (*112Q::TdTomato*) (Sanchis et al., 2019). Esta construcción se expresa mediante el promotor del gen *mec-3* exclusivamente en las neuronas receptoras sensoriales, o “*touch receptor neurons*” en inglés: ALML, ALMR, AVM, PLML, PLMR, PVM (**Figura 3.2.1-A**; (Sanchis et al., 2019)). Estas neuronas tienen la función de sentir un roce ligero, en contraste con otras neuronas sensoriales que sienten contactos más consistentes. La capacidad mecanosensorial, o mecanosensación, puede ser evaluada y cuantificada mediante ensayos de respuesta al tacto (Parker et al., 2005, 2001; Sanchis et al., 2019; Vázquez-Manrique et al., 2016) (vea Metodología – ensayos de respuesta al tacto). En condiciones normales, un animal silvestre responde un 70 % de las veces al tacto ligero con una pestaña. Sin embargo, los animales que presentan poliQs en esas neuronas presentan un fenotipo neuronal reflejado en su capacidad de respuesta mecanosensorial defectuosa, y tan solo responden alrededor de un 25 % de las veces tras ser rozados (Parker et al., 2005, 2001; Sanchis et al., 2019; Vázquez-Manrique et al., 2016).

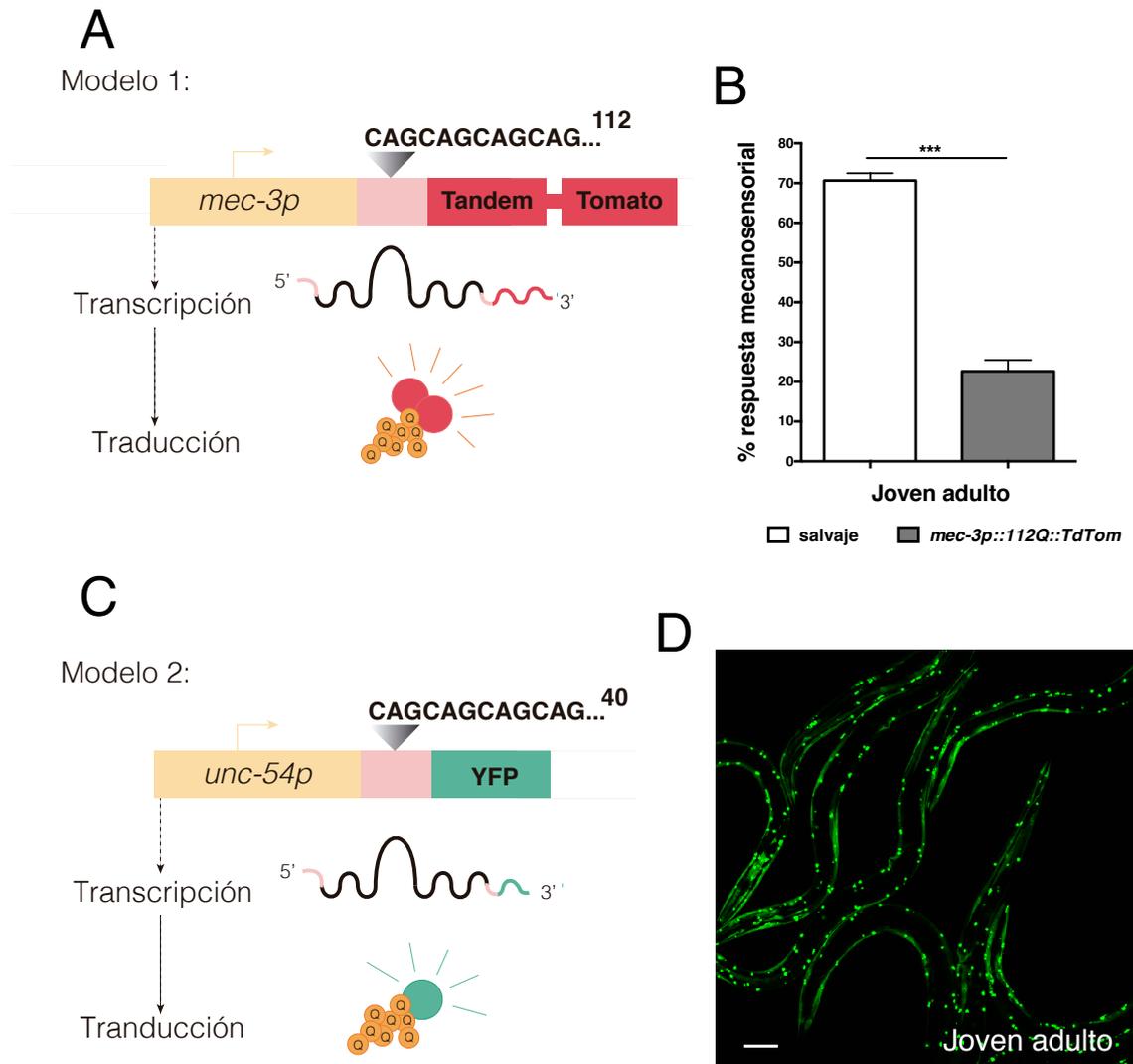


Figura 3.2.1. Modelos de toxicidad inducida por la expresión de poliQs. (A) El modelo 1 contiene un transgén de 112 glutaminas (*112Q*) en pauta con la proteína pseudomonómica fluorescente TdTomato expresado en neuronas mecano sensoriales (ALML, ALMR, AVM, PLML, PLMR, PVM) mediante el promotor del gen *mec-3*. Este modelo nos facilita el análisis de la función neuronal mediante un ensayo de mecano sensación en los nematodos. (B) Animales transgénicos portadores del array extracromosómico *112Q::TdTomato* muestran defectos en la capacidad de respuesta mecano sensorial, reduciéndola en un 25 % comparado con animales silvestres sin transgén (70 %). (C) El modelo 2 contiene un transgén de 40 glutaminas (*40Q*) en pauta con la proteína fluorescente amarilla YFP expresado en células musculares mediante el promotor del gen *unc-54*. Este modelo nos permite estudiar la dinámica de agregación *in vivo*. (D) La expresión del transgén *40Q* induce la formación de cuerpos de inclusión en prácticamente todas las células musculares del animal de manera progresiva y dependiente de la edad de los individuos. Los animales muestran un fenotipo de agregación temprano que es visible en estadio larvario L2, y puede ser evaluado al menos hasta estadio de joven adulto, ya que estadios posteriores presentan un colapso excesivo de cuerpos de inclusión. Se muestra una imagen representativa del patrón de agregación de animales *40Q* en estadio joven adulto. En los recuentos *in vivo* se han contabilizado los acúmulos puntuados marcados con YFP en músculo. Los datos representan la media \pm SEM. (N = 15) por genotipo. N_{EXPERIMENTAL} = 3. ***: p-valor < 0,001. Test estadístico t-test con prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Barra escala: 50 μ m.

Este transgén no está insertado en el genoma del gusano, sino que está formando un array extracromosómico (vea Resultados – Capítulo I, página 92). En primer lugar, analizamos el efecto de la expresión del transgén *mec-3p::112Q::TdTomato* (a partir de ahora *112Q*) respecto a la respuesta mecanosensorial perturbada por las poliQs. En nuestras manos se produjo una reducción de la respuesta mecanosensorial, en torno a un 25 %, en jóvenes adultos, comparado con los controles silvestres (OR = 6,71, IC95% [5,19; 8,73], $p < 0,001$) (**Figura 3.2.1-B, 3.2.2-A**), lo cual está en consonancia con publicaciones anteriores (Sanchis et al., 2019).

Este fenotipo de disfunción neuronal fue empleado para evaluar el efecto de diferentes tratamientos farmacológicos, independientes o combinados, con metformina y salicilato. En concordancia con resultados previos del grupo, el tratamiento con metformina 2000 μM produjo una mejora de la función neuronal (OR = 2,59; IC95% [2,33; 2,88], p -valor $< 0,001$) en jóvenes adultos *112Q* (**Figura 3.2.2-A**) y el efecto fue comparable al tratamiento con salicilato 50 μM (OR = 2,18; IC95% [1,83; 2,60], p -valor $< 0,001$) (**Figura 3.2.2-A**). Tras la confirmación de que el salicilato tiene un papel protector al igual que la metformina en un contexto de toxicidad neuronal por poliQs, testamos diferentes concentraciones (5 – 100 μM para salicilato y 100 – 2000 μM para metformina) en combinaciones de ambos fármacos sobre el modelo de toxicidad neuronal (*112Q*) para estudiar la interacción sinérgica. Se obtuvieron una gran cantidad de datos en base al % de respuesta mecanosensorial que nos permitieron identificar la concentración requerida para promover el efecto sinérgico. Finalmente, observamos una interacción sinérgica con una concentración mínima de ambos fármacos (metformina 150 μM y salicilato 5 μM) que significativamente mejoraba la respuesta mecanosensorial en jóvenes adultos *112Q* (Efecto estimado = 0,55; IC95% [1,20; 2,53], p -valor = 0,004) comparado con animales no tratados (**Figura 3.2.2-B**).

Este resultado fue confirmado empleando un tratamiento independiente y combinado de metformina 150 μM y salicilato 5 μM , para el cual observamos que ambas sustancias eran inefectivas por separado (OR = 1,16; IC95% [0,91; 1,48], p -valor = 0,214), (OR = 0,92; IC95% [0,76; 1,11], p -valor = 0,374) (**Figura 3.2.2-A**). Como cabría esperar, la combinación de ambas sustancias (metformina 150 μM y salicilato 5 μM), mostró un rescate de la función neuronal hasta niveles similares al tratamiento único con metformina 2000 μM (OR = 1,39;

Capítulo II

IC95% [1,10; 1,77], p-valor = 0,007) o salicilato 50 μ M (OR = 1,17; IC95% [0,89; 1,55], p-valor = 0,266) (Figura 3.2.2-A).

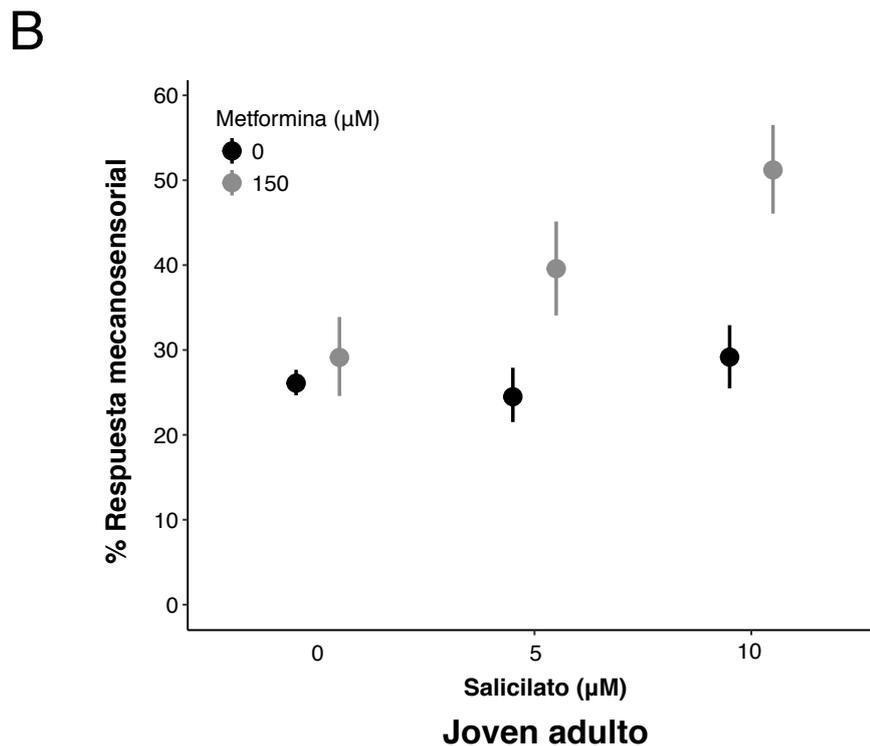
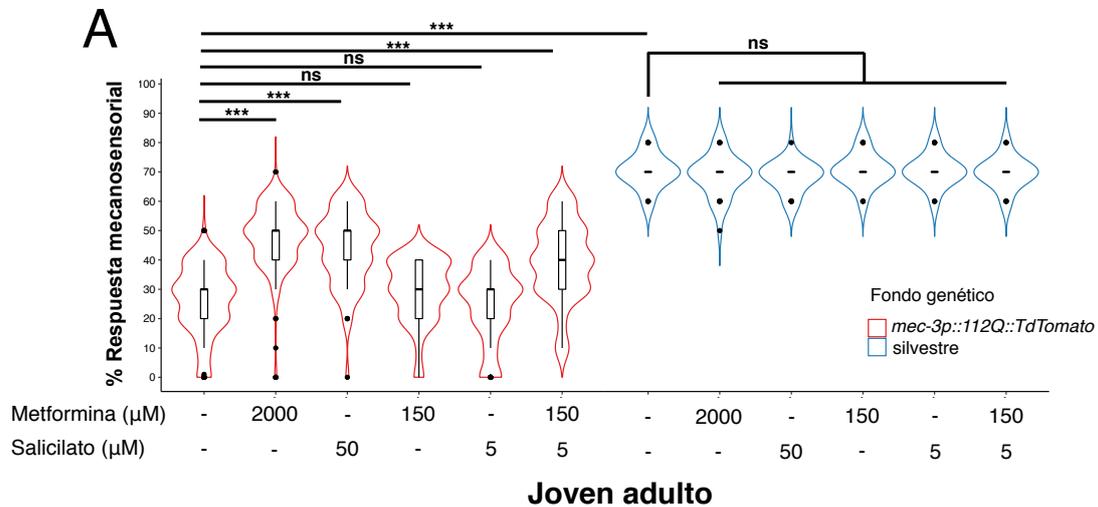


Figura 3.2.2. La metformina y el salicilato actúan de manera sinérgica mejorando la función mecanosensorial. (A) El tratamiento con metformina 2000 μ M y salicilato 50 μ M por separado rescata la función neuronal en animales jóvenes adultos. Bajas dosis de metformina y salicilato en combinación (150 μ M/5 μ M) mejoran la función neuronal de manera sinérgica, mientras que tratamientos independientes no tienen ningún efecto sobre el fenotipo neuronal. Los animales silvestres muestran una respuesta mecanosensorial en torno al 70 %, que es significativamente superior que la referida por animales

transgénicos no tratados. Los diferentes tratamientos, tanto individuales como en combinación, no modifican la función mecanosensorial de animales silvestres N2. **(B)** El estudio de interacciones de algunas combinaciones de tratamientos muestra que la mezcla combinada con 150 μ M metformina y 5 μ M salicilato es la dosis mínima para rescatar la función mecanosensorial de manera sinérgica y significativa. El análisis estadístico muestra el ratio OR (del inglés *Odds Ratio*; razón de probabilidades relativa), el coeficiente de intervalo de confianza mínimo y máximo al 95 % (IC95%) y el p-valor para indicar la significancia de los datos. Los datos representan la media de respuesta mecanosensorial y la dispersión de los datos. (N > 30) por genotipo y/o condición. N_{EXPERIMENTAL} = 3. ***: p-valor < 0,001; ns: estadísticamente no significativo. Recuentos de respuesta mecanosensorial realizados por Loli Sequedo y José Bono. Adaptada de Gómez-Escribano *et al.*, (Gómez-Escribano *et al.*, 2020).

Este resultado es indicativo de que ambos compuestos actúan de manera sinérgica, reduciendo la toxicidad neuronal en animales 112Q. Este hallazgo es interesante puesto que permite administrar ambas sustancias a dosis diez veces por debajo de su dosis independiente efectiva, pudiendo reducir posibles efectos colaterales de los fármacos. Además, hemos confirmado que estos tratamientos no tienen efecto sobre la funcionalidad neuronal en un fondo genético silvestre (**Figura 3.2.2-A**).

Para profundizar en los mecanismos de neuroprotección asociados al tratamiento combinado con metformina y salicilato, hemos evaluado el efecto sinérgico sobre la dinámica de agregación de poliQs en células musculares. Hipotetizamos que podría ser probable que algunas rutas de eliminación de proteínas mal plegadas, como la autofagia, estuvieran involucradas en el efecto neuroprotector que hemos observado. Por tanto, nos propusimos estudiarlas, empleado la cepa de *C. elegans*, AM141, que contiene un transgén que induce la expresión de 40 tripletes CAG en pauta con la proteína fluorescente YFP en células musculares bajo el control del promotor del gen *unc-54* (a partir de ahora 40Q) (**Figura 3.2.1-C**; (Morley *et al.*, 2002)). Los animales 40Q presentan un patrón de agregación muscular temprano que es progresivo y dependiente de la edad. El transgén induce la formación de cuerpos de inclusión (acúmulos esféricos de agregados) que son visibles y factibles de contar *in vivo* mediante un microscopio de disección con fluorescencia (**Figura 3.2.1-D**). El tratamiento de los animales 40Q con metformina 2000 μ M redujo drásticamente el número de cuerpos de inclusión en jóvenes adultos comparado con animales no tratados (OR = 0,80; IC95% [0,69; 0,90], p-valor < 0,001) (**Figura 3.2.3-A**), como habían demostrado previamente otros autores (Sanchis *et al.*, 2019). En nuestro estudio, sin embargo, esta reducción también fue observada por primera vez en animales tratados con salicilato 50 μ M (OR = 0,81; IC95% [0,70; 0,91], p-valor = 0,001) (**Figura 3.2.3-A**). A su vez, la combinación sinérgica de ambas sustancias

redujo significativamente el número de cuerpos de inclusión en jóvenes adultos, comparado con animales no tratados (OR = 0,80; IC95% [0,71; 0,92], $p = 0,001$) (**Figura 3.2.3-A,B**), en contraste con el efecto observado en animales tratados con ambas sustancias por separado (OR = 0,97; IC95% [0,85; 1,09], p -valor = 0,574), (OR = 0,98; IC95% [0,86; 1,11], p -valor = 0,749; respectivamente) (**Figura 3.2.3-A**). Además, hemos verificado que los diferentes tratamientos reducen el patrón de agregación sin alterar la expresión del promotor *unc-54*, el cual dirige la expresión del transgén *40Q* (**Figura 3.2.3-C,D**). Este resultado es relevante ya que varias sustancias o intervenciones genéticas, como experimentos de ARNi (Muñoz-Lobato et al., 2014), pueden influir en la expresión del promotor de miosina/*unc-54* artefactualmente. Por ejemplo, si este promotor es ligeramente reprimido, y produce por tanto menos poliQs, esto hace que la concentración de estas proteínas no alcance el umbral suficiente para colapsar en agregados, y finalmente en la formación de cuerpos de inclusión.

Estos experimentos demuestran que estas sustancias reducen la agregación de poliQs, pero no nos dan información sobre si esto repercute en una mejora funcional de las células musculares. Para confirmar que el papel protector de la sinergia metformina y salicilato mejora la funcionalidad de los tejidos estresados por poliQs de estos animales, hemos empleado ensayos de motilidad mediante el recuento del número de *thrashes* por minuto en medio líquido (Hart, 2006). Se ha demostrado que hay una correlación entre la capacidad motora y la esperanza de vida y estado fisiológico en *C. elegans* (Bansal et al., 2015). Además algunos modelos de *C. elegans* que contienen proteínas que expresan poliQs en células musculares muestran valores reducidos de motilidad en medio líquido (Guerrero-Gómez et al., 2019; Lee et al., 2017; Morley et al., 2002). Como esperábamos, el tratamiento con metformina 2000 μ M, salicilato 50 μ M y la combinación sinérgica de ambos, incrementó la capacidad motora de jóvenes adultos *40Q* con respecto a los animales no tratados (Efecto estimado = 17,66; IC95% [8,72; 26,60], $p < 0,001$; Efecto estimado = 23,70; IC95% [14,13; 33,27], $p < 0,001$; Efecto estimado = 22,20; IC95% [12,63; 31,77], $p < 0,001$; respectivamente) (**Figura 3.2.3-E**). Los animales silvestres no transgénicos, tratados con estas dosis y combinaciones de las mismas, no mostraron una mejora de la capacidad de motilidad con respecto a animales silvestres no tratados (**Figura 3.2.3-E**). Esto está en concordancia con los ensayos de respuesta mecanosensorial en los que estas sustancias no alteran el comportamiento ni la forma física de los animales no transgénicos (**Figura 3.2.2-A**).

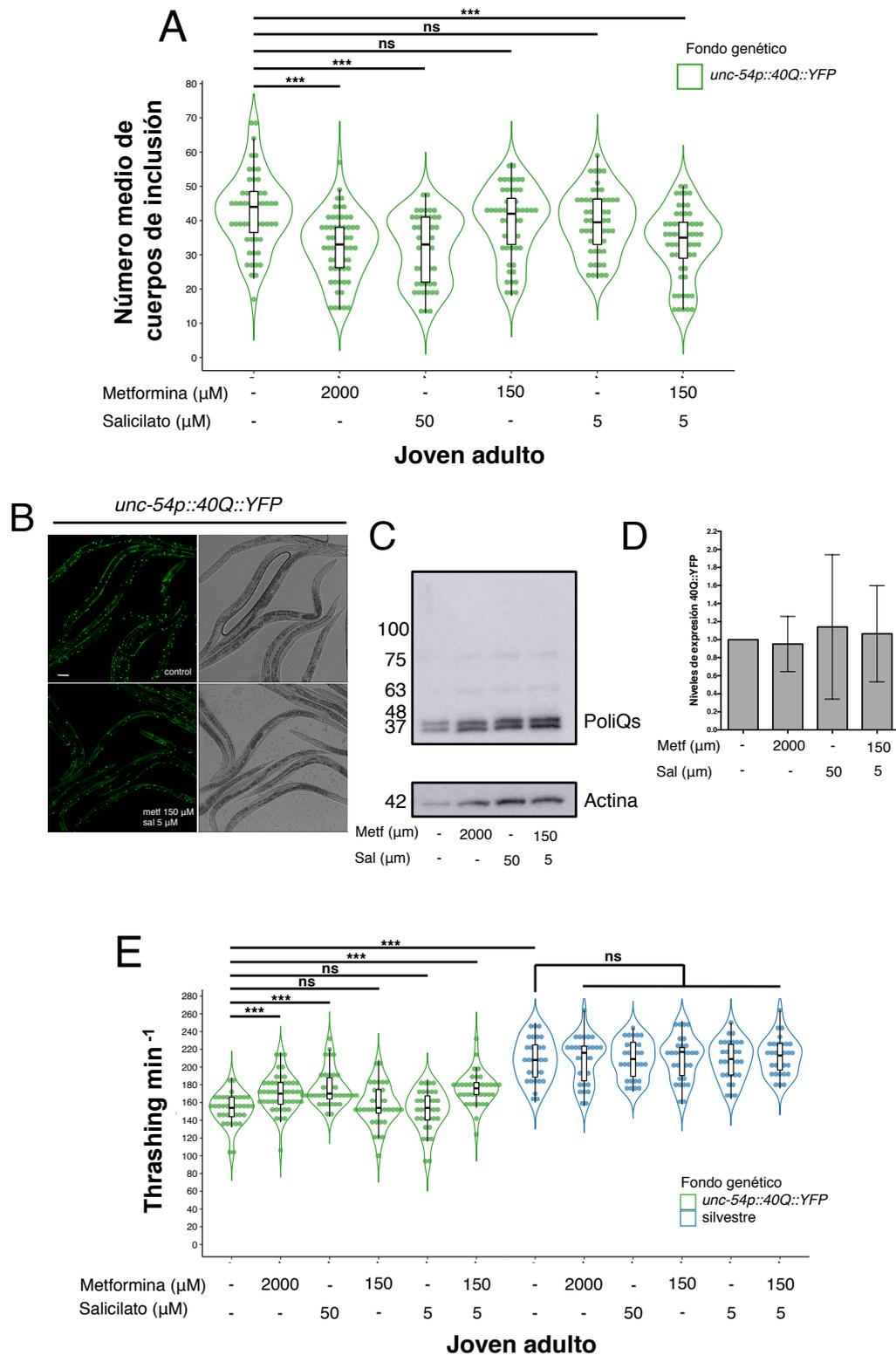


Figura 3.2.3. La combinación sinérgica metformina y salicilato reduce la agregación de poliQs en células musculares y mejora la motilidad en animales 40Q. (A) El tratamiento individual de metformina 2000 μM y salicilato 50 μM reduce el número medio de cuerpos de inclusión a niveles equiparables a los observados para del tratamiento sinérgico combinado (metformina 150 μM y salicilato 5 μM). (B) Imágenes representativas de animales jóvenes adultos no tratados (H_2O , vehículo; control) y tratados con

metformina 150 μ M y salicilato 5 μ M obtenidas con microscopía confocal. **(C)** Análisis por Western Blot de extractos de proteína total en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) obtenidos de animales jóvenes adultos 40Q no tratados y tratados con metformina 2000 μ M, salicilato 50 μ M, y la combinación sinérgica. Los niveles de expresión de poliQ::YFP se han detectado empleando un anticuerpo específico anti-poliQ (ratón, 1:1000) y un secundario anti-ratón (1:10000) conjugado a HRP. Para normalizar los niveles de expresión se ha usado actina. **(D)** Niveles de expresión de poliQs::YFP normalizados con actina y referenciado a la cepa control no tratada obtenidos mediante el software Image J. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras tratadas y no tratadas. **(E)** El tratamiento con metformina 2000 μ M, salicilato 50 μ M y la combinación sinérgica de metformina y salicilato mejora estadísticamente la capacidad de motilidad de los animales 40Q con respecto a los controles 40Q no tratados. Los diferentes tratamientos tanto individuales como combinados no modifican la capacidad motora de animales silvestres. Este último experimento se realizó en colaboración con José Bono. El análisis estadístico muestra la ratio OR (del inglés *Odds Ratio*; razón de probabilidades relativa) o el valor de efecto estimado (dada la naturaleza de la variable), el coeficiente de intervalo de confianza mínimo y máximo al 95 % (IC95%) y el p-valor para indicar la significancia de los datos. Los datos representan la media de cuerpos de inclusión y la dispersión de los datos. (N = 30; gráfico A); (N > 30; gráfico E) por condición y/o genotipo. N_{EXPERIMENTAL} = 3. ***: p-valor < 0,001; ns: estadísticamente no significativo. Barra escala: 50 μ m. Adaptada de Gómez-Escribano *et al.*, (Gómez-Escribano et al., 2020).

Estos resultados en conjunto confirman el papel protector de la sinergia de metformina y salicilato frente a la toxicidad de poliQs, que producen una mejora de la funcionalidad neuronal y que, además, reduce la agregación de poliQs en células musculares.

II.2 La modulación de la agregación de poliQs ejercida por la metformina y el salicilato requiere de la función catalítica de AMPK

La metformina y el salicilato, además de activar AMPK, activan otras dianas relacionadas con cáncer, estrés oxidativo e inflamación, entre otras (Bhat, 2009; Forouzandeh et al., 2014; Schulten, 2018). Por tanto, decidimos hacer experimentos para profundizar sobre el potencial mecanismo de acción de estas sustancias. Para ello decidimos estudiar si la reducción de cuerpos de inclusión observada tras el tratamiento sinérgico era dependiente de la activación del complejo enzimático AMPK. La subunidad catalítica de esta enzima, AMPK α , tiene funciones relacionadas con longevidad en *C. elegans* (*aak-2*/AMPK α 2) (Apfeld, 2004). El alelo *ok524* del gen *aak-2*, que produce la pérdida de función de la subunidad α de la enzima, empeora la respuesta mecanosensorial en un contexto de toxicidad por 128Q en *C. elegans* (Vazquez-Manrique et al., 2016). Para estudiar la implicación de AMPK α 2 en la dinámica de agregación y poder

identificar el mecanismo de acción de la sinergia hemos introducido la mutación *aak-2(ok524)* sobre un fondo genético *40Q*.

Como esperábamos, los jóvenes adultos *40Q* defectivos para la subunidad catalítica de AMPK mostraron un mayor número de cuerpos de inclusión que los animales silvestres *40Q* (OR = 1,26; IC95%[1,19; 1,33], p-valor < 0,001) (**Figura 3.2.4-A**), en concordancia con estudios anteriores (Sanchis et al., 2019). Además, el efecto protector asociado al tratamiento con metformina 150 μ M y salicilato 5 μ M fue suprimido en mutantes *aak-2(ok524)* (**Figura 3.2.4-A**) (OR = 0,98; IC95%[0,93; 1,04], p-valor = 0,541), lo cual demuestra que este efecto protector requiere necesariamente la función enzimática de AMPK.

En relación al estado funcional de los tejidos afectados por las poliQs de los animales, los mutantes *aak-2*, que expresan *40Q* en células musculares, mostraron un menor número de *thrashes*/min, en comparación con los controles jóvenes adultos *40Q* (Efecto estimado = -43,93; IC95%[-48,13; -39,74], p < 0,001) (**Figura 3.2.4-B**). En concordancia con resultados anteriores, la pérdida funcional de AAK-2 supuso un bloqueo total del efecto sinérgico de los fármacos sobre el fenotipo motor, no mostrándose diferencias significativas entre animales mutantes tratados y no tratados (Efecto estimado = -3,80; IC95%[-8,03; 0,43], p = 0,077) (**Figura 3.2.4-B**). Estos datos demuestran que el tratamiento farmacológico dual requiere la actividad catalítica de AMPK, para reducir la agregación de poliQs en células musculares y promover una mejora funcional en las células musculares.

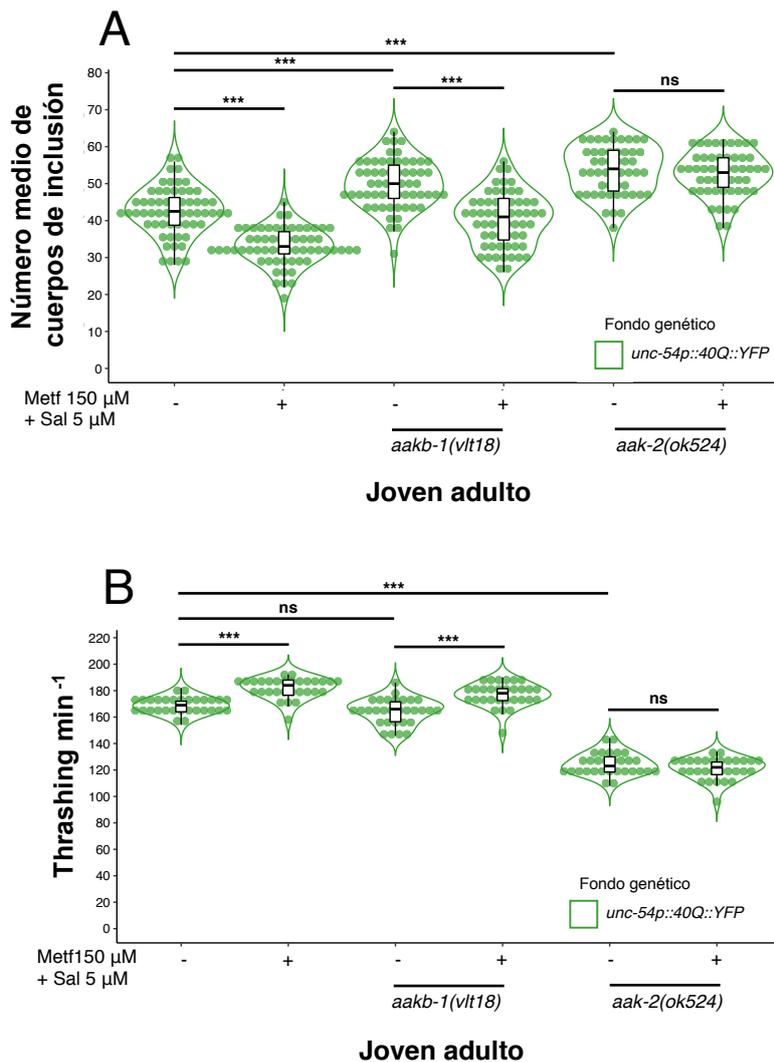


Figura 3.2.4. El efecto sinérgico de la metformina y el salicilato requiere la función de AMPK α . (A) Número medio de cuerpos de inclusión en jóvenes adultos *40Q* en presencia o ausencia de alelos mutantes para la subunidad catalítica α , *aak-2(ok524)*, y la subunidad reguladora β 1, *aakb-1(vlt18)*, de AMPK, tratados con metformina 150 μ M y salicilato 5 μ M o vehículo (H₂O). EL efecto sinérgico protector observado en animales *40Q* tratados con los fármacos se pierde en los mutantes *40Q; aak-2(ok524)*, mientras que se mantiene en los mutantes *40Q; aakb-1(vlt18)*. (B) El efecto protector de la sinergia se ve reflejado en una mejora de la capacidad motora de los animales tratados con respecto a los animales no tratados. La pérdida funcional de la subunidad catalítica α suprime por completo el beneficio que otorga el tratamiento sinérgico, mientras que la disrupción de AAKB-1/AMPK β 1 no bloquea el efecto protector farmacológico. El análisis estadístico muestra el ratio OR (del inglés *Odds Ratio*; razón de probabilidades relativa) o el valor de efecto estimado (dada la naturaleza de la variable), el coeficiente de intervalo de confianza mínimo y máximo al 95 % (IC95%) y el p-valor para indicar la significancia de los datos. Los datos representan la media de cuerpos de inclusión o número de *thrashes* en el ensayo de *thrashing*, y la dispersión de los valores por cada genotipo y condición. (N > 50; gráfico A); (N = 30; gráfico B). N_{EXPERIMENTAL} = 3. ***: p-valor < 0,001; ns: estadísticamente no significativo. La generación de los alelos mutantes y los recuentos de los cuerpos de inclusión y *thrashes*/min fueron realizados por José Bono. Adaptada de Gómez-Escribano *et al.*, (Gómez-Escribano et al., 2020).

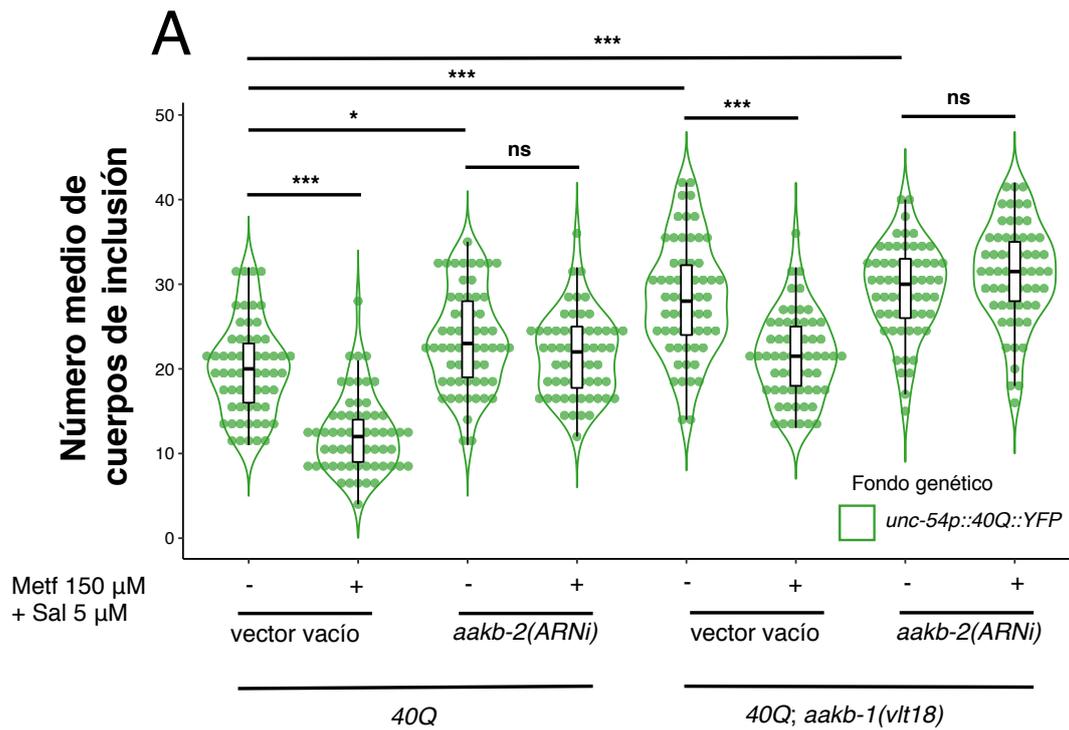
II.3 El mecanismo de reducción de la agregación de poliQs, mediado por metformina y salicilato, involucra la función de AMPK β 2

El salicilato se une alostéricamente a la subunidad reguladora AMPK β (Hawley et al., 2012) y con ello se activa la función catalítica de AMPK. Por tanto, decidimos averiguar si el mecanismo de acción de la activación sinérgica de la metformina y el salicilato sobre AMPK involucraba a esta subunidad. El genoma de *C. elegans* contiene dos genes, *aakb-1* y *aakb-2*, que codifican para las dos subunidades de AMPK β (β 1 y β 2) respectivamente. Por tanto, nos propusimos estudiar el papel de ambas subunidades sobre la actividad protectora de AMPK por separado y en conjunto. Con respecto a *aakb-1*, el repositorio de cepas CGC no tiene disponible alelos mutantes para este gen, por lo que generamos un alelo de pérdida de función, *vlt18*, empleando el sistema CRISPR/Cas9 (vea sección Metodología – sistema CRISPR/Cas9, **Figura 2.10-A**). Fueron diseñadas dos ARNg complementarias a los exones primero y último del gen *aakb-1* para obtener una delección completa del gen (**Figura 2.10-A**). Sin embargo, no pudimos aislar un mutante que tuviese una delección completa del gen, en su defecto, aislamos un alelo, *vlt18*, que contenían parcialmente el exón 1 y el exón 4 completo (**Figura 2.10-A**). Esta delección incluye el sitio donador de ajuste del exón 1, no afectando posiblemente a este fenómeno (**Figura 2.10-A**). En el hipotético caso de que toda la secuencia estuviese en pauta después de producirse la escisión por ajuste alternativo, obtendríamos una proteína truncada (**Figura 2.10-A**). Este péptido perdería gran parte de la región N-terminal, incluyendo la mitad del dominio de unión a carbohidratos (CBD) (**Figura 2.10-A**), el cual es esencial para la unión de salicilato y la consecutiva activación de AMPK (Kim et al., 2016).

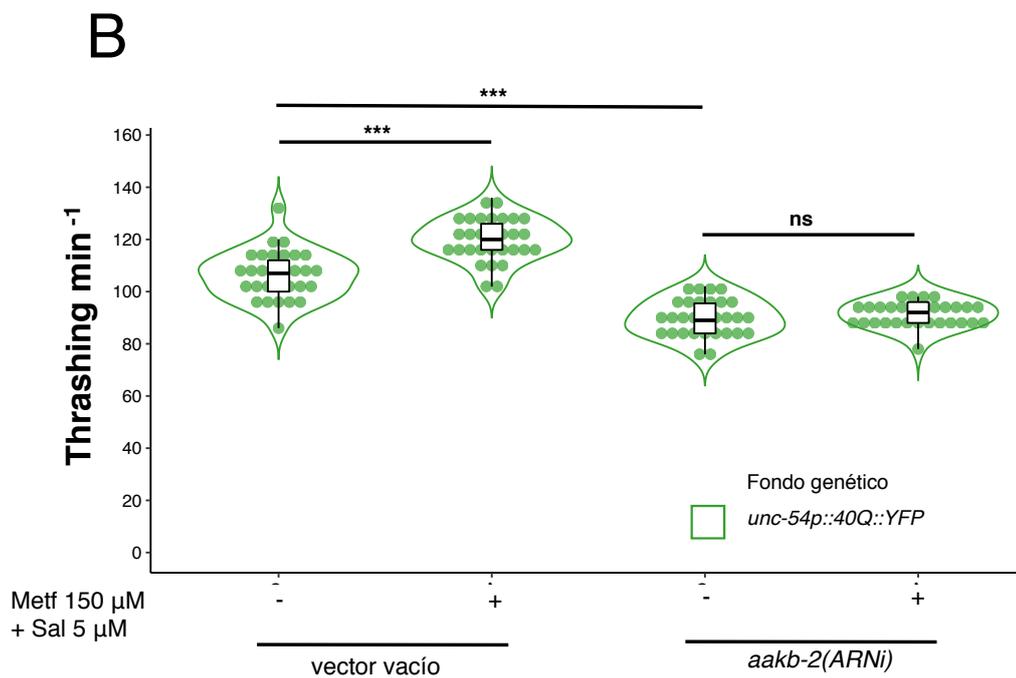
El análisis de animales *aakb-1(vlt18)* jóvenes adultos mostró un incremento significativo en el número medio de cuerpos de inclusión (OR = 1,17; IC95%[1,11; 1,24], p-valor < 0,001) (**Figura 3.2.4-A**). Sin embargo, el efecto de la pérdida de función de *aak-2(ok524)* resultó ser más fuerte que la mutación *aakb-1(vlt18)* en un contexto de agregación de poliQs (OR = 1,07; IC95%[1,02; 1,13] p-valor = 0,008) (**Figura 3.2.4-A**). A pesar del impacto tan evidente que tienen estas subunidades en la dinámica de la agregación de poliQs, el tratamiento de estos mutantes con metformina 150 μ M y salicilato 5 μ M mostró diferencias notables (**Figura 3.2.4-A**). A diferencia de lo observado en los animales deficientes para la subunidad catalítica AMPK α 2, los mutantes *aakb-1(vlt18)*

respondieron perfectamente al tratamiento sinérgico en comparación con mutantes *aakb-1(vlt18)* no tratados (OR = 0,81; IC95%[0,76; 0,85], p-valor < 0,001) (**Figura 3.2.4-A**). Este patrón fue observado, a su vez, en la capacidad motora de los mutantes *aakb-1(vlt18)*, tanto tratados como no tratados (**Figura 3.2.4-B**). En este experimento, se aprecia un rescate del fenotipo motor en animales mutantes tratados con la combinación de metformina y salicilato (Efecto estimado = 12,13; IC95%[7,31; 16,95], p < 0,001), los cuales muestran un defecto motor sutil cuando no son tratados, comparado con animales silvestres no tratados (Efecto estimado = -4,13; IC95%[-8,33; 0,06], p = 0,053) (**Figura 3.2.4-B**). Estos resultados descartan la participación de la subunidad AMPK β 1 sobre el efecto protector promovido por el tratamiento sinérgico con metformina y salicilato.

Considerando que *aakb-1* no está involucrado en la activación sinérgica de AMPK decidimos investigar si AMPK β 2 podría estar implicada en esta activación. Para ello, en un primer momento obtuvimos un mutante disponible en el CGC, *aakb-2(rr88)*, que resultó ser estéril (datos no mostrados) y fue imposible testarlo en un fondo genético 40Q. Por tanto, decidimos llevar a cabo un ensayo de silenciamiento por ARNi para reducir la expresión de *aakb-2* en cepas de gusano con un fondo genético 40Q y mutante 40Q; *aakb-1(vlt18)* (**Figura 3.2.5-A**). El silenciamiento de *aakb-2* en larvas L4 40Q aumentó ligeramente el número medio de cuerpos de inclusión, comparado con los animales 40Q controles (OR = 1,7; IC95%[1,07; 1,29], p-valor = 0,001), aunque muy por debajo del nivel de los mutantes *aakb-1(vlt18)* (OR = 1,21; IC95%[1,11; 1,32], p-valor < 0,001) (**Figura 3.2.5-A**). Estos resultados sugieren que ambas isoformas, AAKB-1 y AAKB-2, modulan la agregación de poliQs en *C. elegans*. Sin embargo, en contraste con *aakb-1(vlt18)*, el silenciamiento génico de *aakb-2* bloqueó completamente el efecto protector del tratamiento sinérgico asociado a una reducción de la agregación de poliQs (OR = 0,92; IC95%[0,84; 1,01], p-valor = 0,07), resaltando la importancia de su función sobre el mecanismo de acción farmacológico (**Figura 3.2.5-A**). Los animales con ambas subunidades silenciadas, *aakb-1(vlt18); aakb-2(ARNi)* mostraron el patrón de agregación más exacerbado y una supresión completa del efecto sinérgico de los fármacos (OR = 1,06; IC95%[0,99; 1,14], p-valor = 0,10) (**Figura 3.2.5-A**).



L4



L4

Figura 3.2.5. El efecto sinérgico de la metformina y el salicilato requiere la subunidad reguladora AMPK β 2. (A) La pérdida funcional de las subunidades reguladoras β 1 y β 2 incrementa el número medio de cuerpos de inclusión con respecto a los animales *40Q* silvestres. El tratamiento sinérgico reduce el número medio de cuerpos de inclusión en animales silvestres *40Q* y mutantes *aakb-1* por igual, mientras que los mutantes *aakb-2(ARNi)* y los animales con ambas subunidades afectadas no responden al tratamiento. (B) La reducción de la expresión de *aakb-2* induce un empeoramiento de la capacidad de motilidad en los animales *40Q*. Los animales silenciados para *aakb-2* no responden al efecto protector asociado a la sinergia de la metformina y el salicilato, observado en los controles *40Q*. El análisis estadístico muestra el ratio OR (del inglés *Odds Ratio*; razón de probabilidades relativa) o el valor efecto estimado (dada la naturaleza de la variable), el coeficiente de intervalo de confianza mínimo y máximo al 95 % (IC95%) y el p-valor para indicar la significancia de los datos. Los datos representan la media y la dispersión de los valores por cada genotipo y/o condición. (N > 50; gráfico A); (N = 30; gráfico B). N_{EXPERIMENTAL} = 3. ***: p-valor < 0,001; *: p-valor < 0,05; ns: estadísticamente no significativo. Los recuentos fueron realizados por José Bono. Adaptada de Gómez-Escribano *et al.*, (Gómez-Escribano et al., 2020).

En relación a estos resultados, estábamos interesados en conocer si el cambio en la dinámica de agregación de poliQs se correspondía con una mejora de la funcionalidad de las células musculares de los animales mutantes *aakb-2(ARNi)*. En los ensayos de motilidad observamos que los animales mutantes *aakb-2(ARNi)* no tratados mostraron niveles de motilidad inferiores a los animales silvestres *40Q* (Efecto estimado = -16,53, IC95%[-20,88; -12,18], p-valor < 0,001) (**Figura 3.2.5-B**). El tratamiento sinérgico con metformina 150 μ M y salicilato 5 μ M produjo un aumento de la capacidad de motilidad de los animales silvestres (Efecto estimado = 13,73, IC95%[9,16; 18,31], p-valor < 0,001), mientras que los animales mutantes *aakb-2(ARNi)* tratados y no tratados no mostraron diferencias (Efecto estimado = 1,73, IC95%[-1,45; 4,91], p-valor = 0,28) (**Figura 3.2.5-B**). Estos resultados en conjunto sugieren que solamente *aakb-2* es requerido para responder al tratamiento sinérgico, aunque ambas subunidades (AAKB-1 y AAKB-2) poseen un papel modulador sobre la homeostasis de proteínas con poliQs en *C. elegans*.

II.4 La neuroprotección de metformina y salicilato es dependiente de AMPK α 2

El tratamiento con la combinación de metformina y salicilato además de reducir la agregación de poliQs (**Figura 3.2.3**) también mejora la función neuronal en un contexto de toxicidad de poliQs (**Figura 3.2.2**). Varios autores han mostrado que la activación de AMPK es neuroprotectora en modelos de toxicidad de poliQs en *C. elegans* (Sanchis et al., 2019; Vazquez-Manrique et al., 2016). En concordancia

con estos resultados, observamos que los jóvenes adultos *112Q* mostraban una menor respuesta mecanosensorial en presencia del alelo mutante para $AMPK\alpha 2$, *aak-2(ok524)*, (OR = 0,39; IC95%[0,27; 0,56], p-valor < 0,001) (**Figura 3.2.6**). Adicionalmente, la supresión funcional de AAKB-1/ $AMPK\beta 1$ mostró una reducción drástica de la capacidad de respuesta al tacto en animales cuyas neuronas mecanosensoriales estaban estresadas por poliQs (OR = 0,36; IC95%[0,25; 0,52], p < 0,001) (**Figura 3.2.6**), lo cual sugiere que $AMPK\beta 1$ posee un papel neuroprotector en esas neuronas, al igual que $AMPK\alpha 2$.

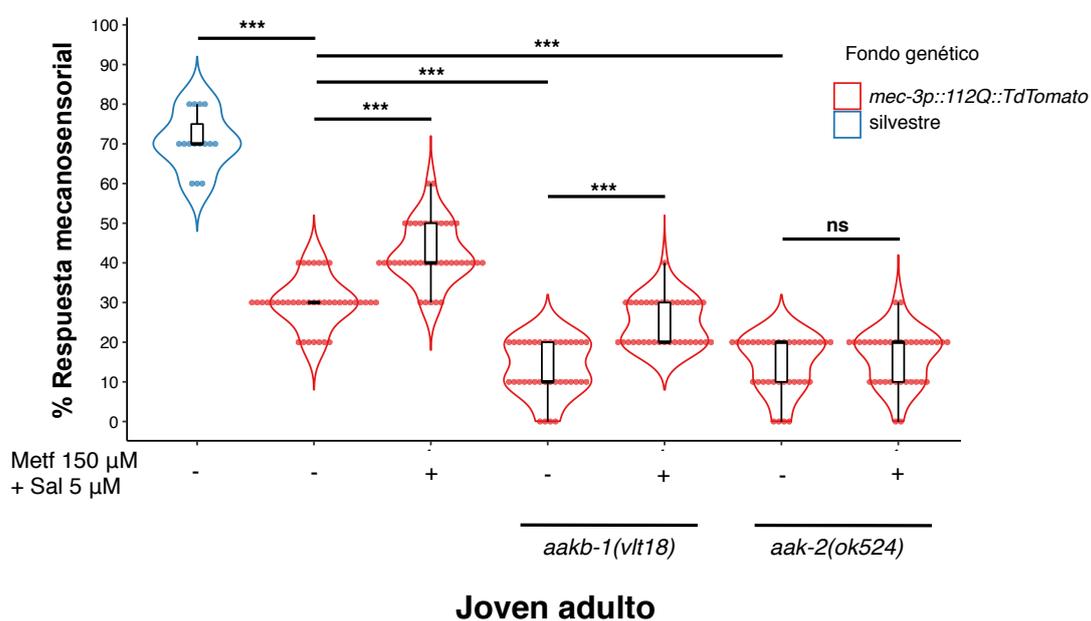


Figura 3.2.6. El tratamiento conjunto con metformina y salicilato restaura la función neuronal a través de $AMPK\alpha$. La gráfica muestra el porcentaje de respuesta mecanosensorial en animales jóvenes adultos *112Q::TdTomato* en presencia de mutaciones *aak-2(ok524)* y *aakb-1(vlt18)* con o sin tratamiento con ambas sustancias (metformina 150 µM y salicilato 5 µM). Los animales transgénicos *112Q* deficientes para *aak-2(ok524)* o *aakb-1(vlt18)* muestran una menor respuesta mecanosensorial que los animales *112Q* silvestres. Los animales tratados controles y mutantes *aakb-1* responden por igual al tratamiento sinérgico, observándose un aumento del % de respuesta mecanosensorial. La disrupción de AAK-2/ $AMPK\alpha$ suprime completamente el efecto neuroprotector de la sinergia, indicando la esencialidad de esta subunidad en el mecanismo de acción de los fármacos en las neuronas. Los recuentos han sido realizados por José Bono. El análisis estadístico muestra el ratio OR (del inglés *Odds Ratio*; razón de probabilidades relativa), el coeficiente de intervalo de confianza mínimo y máximo al 95 % (IC95%) y el p-valor para indicar la significancia de los datos. Los datos representan la media y la dispersión de los valores por cada cepa y condición. (N = 30). N_{EXPERIMENTAL} = 3. ***: p-valor < 0,001; ns: estadísticamente no significativo. Adaptada de Gómez-Escribano *et al.*, (Gómez-Escribano et al., 2020).

Como habíamos demostrado previamente, los animales jóvenes adultos *112Q* sometidos al tratamiento sinérgico mostraron una capacidad de respuesta mecanosensorial mayor que los animales no tratados (OR = 1,73; IC95%[1,29; 2,33], p-valor < 0,001) (**Figura 3.2.6**). En relación al mecanismo de acción del tratamiento sinérgico, los animales jóvenes adultos *112Q; aakb-1(vlt18)* respondieron perfectamente al tratamiento dual (OR = 2,17; IC95%[1,48; 3,21], p-valor < 0,001) (**Figura 3.2.6**), en contraste con la respuesta nula mostrada por los animales deficientes para *aak-2(ok524)* (OR = 1,14; IC95%[0,76; 1,71], p-valor = 0,53) (**Figura 3.2.6**). Estos resultados sugieren que ambas subunidades (AMPK α 2 y AMPK β 1) modulan la función neuronal en un contexto de poliQs, sin embargo, el mecanismo de acción farmacológico en neuronas solamente involucra a la subunidad catalítica α 2 de AMPK, y estos resultados descartan la implicación de la subunidad β 1.

II.5 La autofagia es necesaria para la función protectora de la metformina y el salicilato para modular la agregación de poliQs

Hemos demostrado que el tratamiento dual con metformina y salicilato reduce de manera sinérgica la agregación de poliQs y mejora la función neuronal a través de AMPK. Esta enzima es un activador directo de la autofagia (Kim et al., 2011), por lo que decidimos averiguar si este proceso participa en la reducción de la toxicidad de poliQs tras el tratamiento farmacológico. Para ello, hemos perturbado el flujo autofágico mediante dos abordajes: (#1) inhibición del flujo autofágico químicamente mediante cloroquina para bloquear la fusión autofagosoma – lisosoma y su actividad (Mauthe et al., 2018) y (#2) alterar el flujo autofágico mediante la reducción de la expresión de genes relacionados con la formación y maduración de los autofagosomas (*lgg-1/LC3*, *atg-18/ATG-18* y *bec-1/ATG-6*) empleando ARNi (Kabeya, 2000; Melendez, 2003).

En estos experimentos, el tratamiento con metformina y salicilato redujo la agregación de poliQs en animales *40Q* (OR = 0,67; IC95%[0,58; 0,78], p-valor < 0,001) (**Figura 3.2.7-A**), mientras que la presencia de cloroquina en el medio de cultivo bloqueó completamente la reducción del número de cuerpos de inclusión en larvas L4 tratadas con las tres sustancias (metformina, salicilato y cloroquina) (OR = 1,10; IC95%[0,95; 1,27], p-valor = 0,177) (**Figura 3.2.7-A**). Esto sugiere que el flujo de lisosomas es necesario para la protección mediada por metformina y salicilato, y por tanto, que la autofagia juega un papel en la

reducción de los agregados de poliQs. Adicionalmente, observamos que los grupos tratados con cloroquina (con o sin metformina y salicilato) no mostraron diferencias significativas en el número de cuerpos de inclusión (OR = 1,02; IC95%[0,89; 1,17], p-valor = 0,739) (**Figura 3.2.7-A**). Desde un punto de vista funcional, observamos que las larvas L4 tratadas con metformina, salicilato y cloroquina no mostraron un rescate motor, comparado con animales tratados únicamente con cloroquina (Efecto estimado = 0,67; IC95%[-7,88; 9,21], p-valor = 0,874) y larvas L4 no tratadas control (Efecto estimado = -1,47; IC95%[-11,17; 8,24], p-valor = 0,763) (**Figura 3.2.7-B**). Estos resultados confirman observaciones previas del grupo, que sugerían que la inhibición del flujo autofágico en animales estresados por poliQs suprime el beneficio asociado al tratamiento con metformina 2000 μ M (Sanchis et al., 2019).

Datos de otros autores sugieren que la inactivación de la autofagia mediante el silenciamiento de genes esenciales para la maduración de los autofagosomas, como *atg-18* y *bec-1*, modifica el patrón de agregación en animales 40Q (Jia et al., 2007). Además, hay datos que muestran que la aspirina induce la activación de la autofagia a través de *lgg-1* en *C. elegans* (Pietrocola et al., 2018). Por tanto, evaluamos el patrón de agregación en animales tratados con metformina 150 μ M y salicilato 5 μ M en los que habíamos reducido la expresión de, los genes *atg-18*, *bec-1* y *lgg-1* por ARNi independientemente. El análisis de cuerpos de inclusión mostró que una disminución de la expresión de estos genes (*atg-18*, *bec-1* y *lgg-1*), por separado, incrementa el patrón de agregación de poliQs de manera significativa comparado con animales controles 40Q (OR = 1,26; IC95%[1,13; 1,41], p < 0,001; OR = 1,25; IC95%[1,12; 1,39], p < 0,001; OR = 1,28; IC95%[1,15; 1,43], p < 0,001; respectivamente) (**Figura 3.2.7-C**). Además, observamos que aquellos animales tratados con la combinación sinérgica de metformina y salicilato, y que presentaban algunos de los genes silenciados (*atg-18*, *bec-1* o *lgg-1*), no respondían al efecto protector del tratamiento farmacológico comparado con los animales controles 40Q (OR = 0,99; IC95%[0,89; 1,09], p = 0,792; OR = 1,05; IC95%[0,94; 1,16], p = 0,389; OR = 1,02; IC95%[0,92; 1,12], p = 0,775; respectivamente) (**Figura 3.2.7-C**).

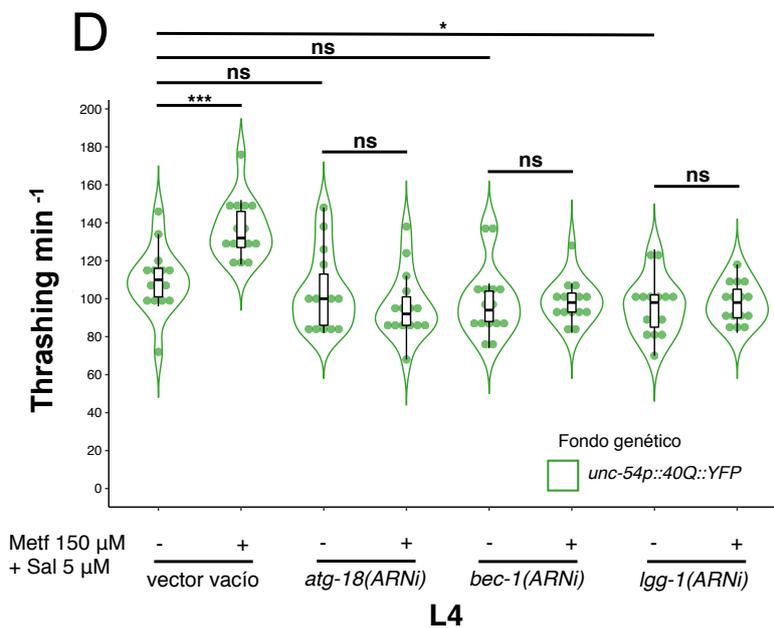
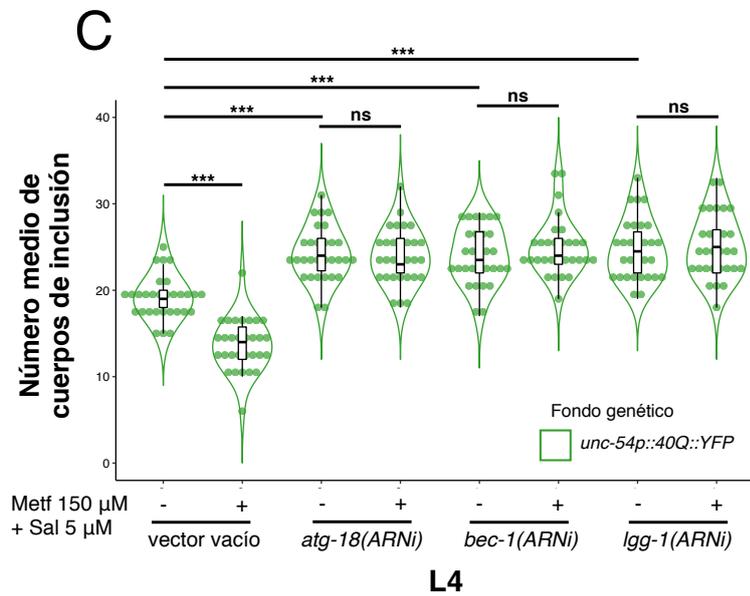
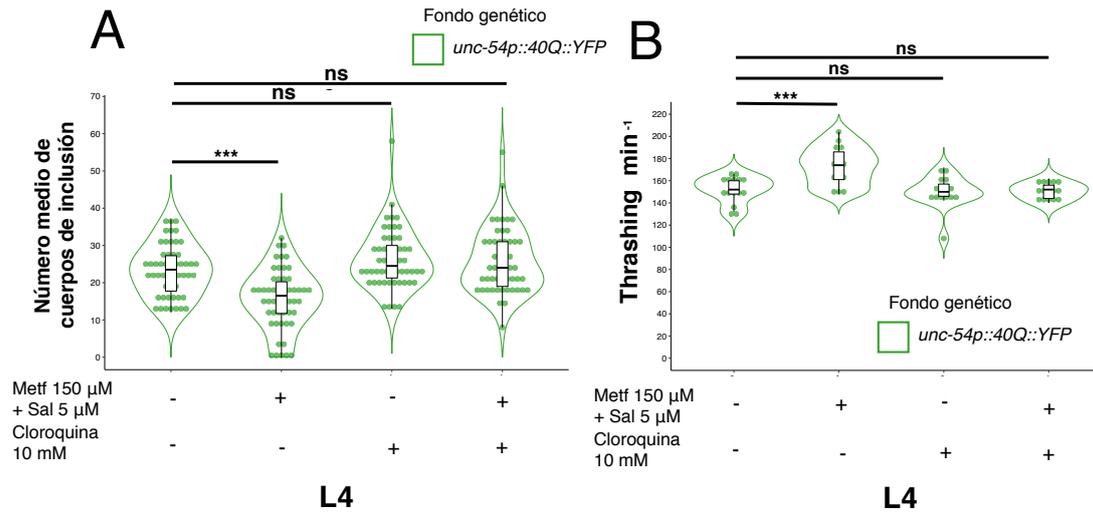


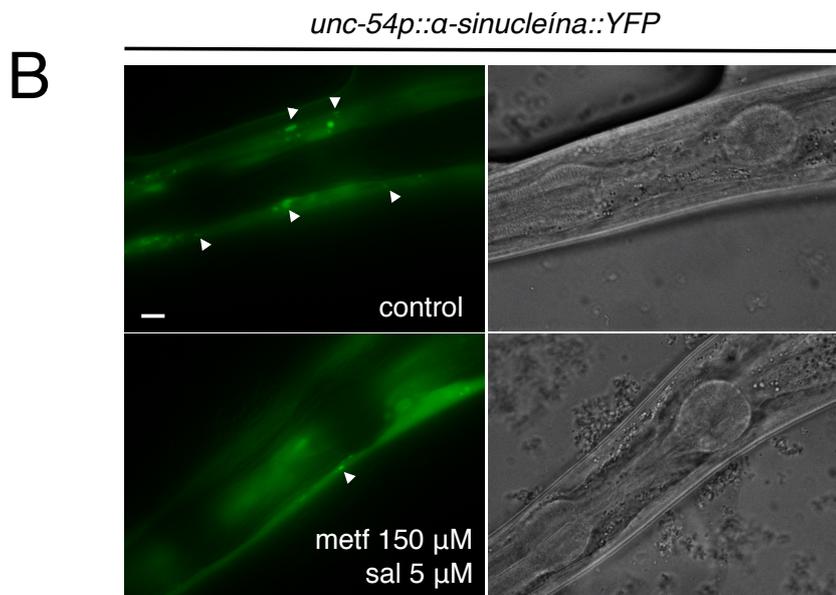
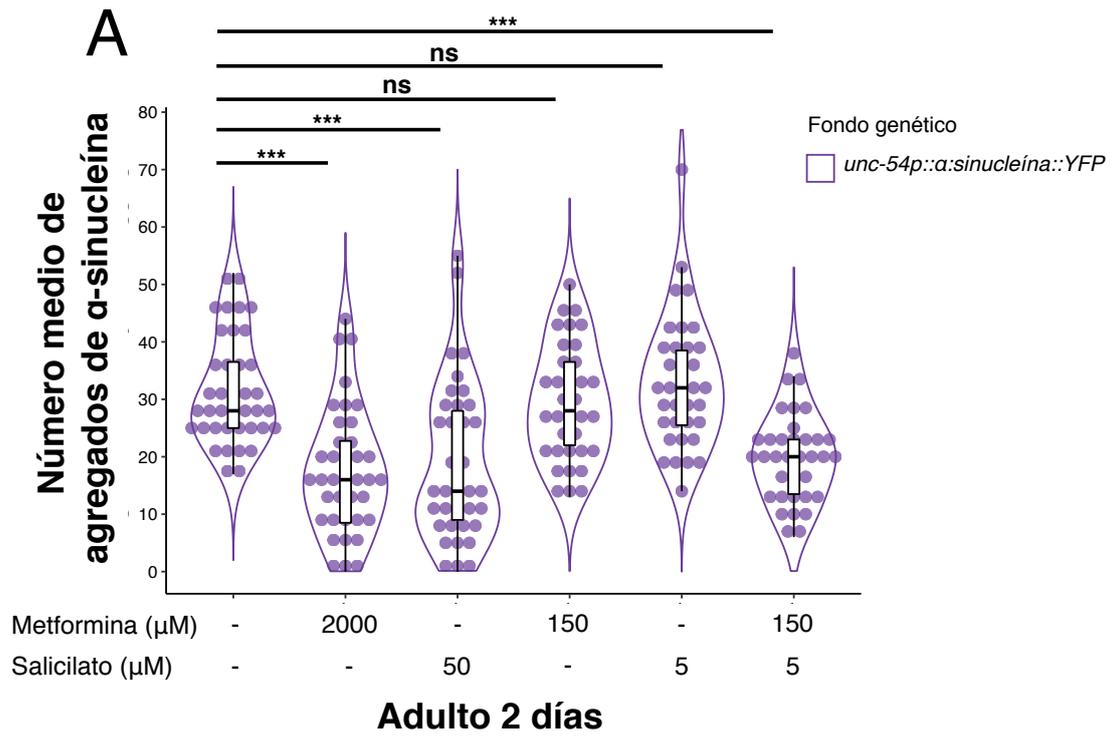
Figura 3.2.7. La activación de la autofagia es requerida para inducir el efecto sinérgico protector de metformina y salicilato sobre la toxicidad inducida por poliQs. (A) El bloqueo del flujo autofágico mediante cloroquina 10 mM suprime el rescate del fenotipo de agregación asociado al tratamiento sinérgico con metformina 150 μ M y salicilato 5 μ M, en las larvas L4 40Q. (B) El rescate del fenotipo motor de los animales L4 40Q es bloqueado mediante el tratamiento con cloroquina 10 mM. (C) El silenciamiento de genes que participan en el flujo autofágico (*atg-18*, *bec-1* y *lgg-1*) induce un aumento del número de cuerpos de inclusión en los animales L4 40Q. Los animales L4 40Q tratados con metformina y salicilato que poseen una menor expresión de *atg-18*/ATG-18, *bec-1*/ATG-6 y *lgg-1*/LC3 no responden al tratamiento sinérgico, mostrando un número de cuerpos de inclusión similar a los animales no tratados cuyo gen ha sido silenciado. (D) El silenciamiento génico de *atg-18*, *bec-1* y *lgg-1* suprime el efecto protector de la combinación sinérgica en los animales L4 40Q sobre el fenotipo motor. La supresión de *lgg-1* reduce significativamente la capacidad motora de los animales 40Q, a diferencia del silenciamiento de *atg-18* y *bec-1* que no agravan el fenotipo motor. Los recuentos de silenciamiento génico fueron realizados en colaboración con José Bono. El análisis estadístico muestra el ratio OR (del inglés *Odds Ratio*; razón de probabilidades relativa) o el valor de efecto estimado (dada la naturaleza de la variable), el coeficiente de intervalo de confianza mínimo y máximo al 95 % (IC95%) y el p-valor para indicar la significancia de los datos. Los datos representan la media y la dispersión de los valores por cada cepa y condición. (N = 50; gráfico A); (N = 15; gráfico B); (N = 30; gráfico C); (N = 15; gráfico D). $N_{EXPERIMENTAL} = 3$. ***: p-valor < 0,001; *: p-valor < 0,05; ns: estadísticamente no significativo. Adaptada de Gómez-Escribano *et al.*, (Gómez-Escribano *et al.*, 2020).

Los estudios funcionales de estos animales mediante ensayos de motilidad mostraron de igual manera que aquellos animales que poseían una expresión reducida de alguno de los genes *atg-18*, *bec-1* o *lgg-1*, no respondían al tratamiento sinérgico comparado con los controles L4 40Q (Efecto estimado = -7,73; IC95%[-21,90; 6,44], p = 0,273; Efecto estimado = 0,40; IC95%[-10,93; 11,73], p = 0,943; Efecto estimado = 2,13, IC95%[-7,50, 11,76], p = 0,653; respectivamente) (**Figura 3.2.7-D**). Estos resultados sugieren que la función de la autofagia es requerida para que el beneficio protector de la sinergia, mediante el tratamiento con metformina y salicilato, sea efectivo. Sin embargo, desconocemos si AMPK es responsable de la activación de la autofagia, y tampoco podemos descartar que ambas vías de señalización actúen paralelamente.

II.6 El tratamiento con metformina y salicilato reduce la agregación de la α -sinucleína y mejora la función motora de estos animales

En muchas enfermedades neurodegenerativas tales como la EH, Parkinson o Alzheimer, es común la presencia de agregados tóxicos que perturban la homeostasis proteica celular. Concretamente, en la enfermedad de Parkinson, la proteína α -sinucleína es propensa a agregarse, al igual que la mHtt, iniciando un proceso de toxicidad similar. Como hemos observado, los activadores de

AMPK, tales como la metformina y el salicilato, reducen el patrón de agregación y la toxicidad de agregados de poliQs. Puesto que el contexto patológico molecular es similar, hipotetizamos que quizás sería probable que estos activadores pudieran reducir la toxicidad inducida por otras fuentes de agregación como la proteína α -sinucleína. El repositorio de cepas de *C. elegans* (CGC) contiene un modelo de *C. elegans* bien establecido para estudiar y emular síntomas y fenotipos característicos de la toxicidad inducida por la proteína α -sinucleína. Estos animales expresan la proteína α -sinucleína en pauta con la proteína fluorescente YFP en células musculares bajo el promotor del gen *unc-54* (van Ham et al., 2008). Los animales transgénicos α -sinucleína::YFP muestran un patrón de agregación tardío (iniciado aproximadamente tras el estadio de joven adulto), a diferencia de la cepa 40Q (detectable en los estadios larvarios L2-L4). La presencia de YFP permite que el patrón de agregación pueda visualizarse bajo un microscopio vertical equipado con fluorescencia. En base a la literatura y sabiendo que la presencia de agregados es más evidente en estadios adultos, evaluamos animales adultos de dos días tras el tratamiento farmacológico. Por tanto, iniciamos el tratamiento en jóvenes adultos α -sinucleína::YFP, los cuales no muestran agregados, con metformina 2000 μ M, salicilato 50 μ M y la mezcla que induce sinergia sobre AMPK (metformina 150 μ M y salicilato 5 μ M) para obtener resultados comparables. Posteriormente, evaluamos el número de agregados de α -sinucleína entre los dos bulbos faríngeos de animales adultos de dos días de edad. En todos los casos, los animales tratados con metformina 2000 μ M, salicilato 50 μ M y la sinergia, mostraron una reducción del número de agregados de α -sinucleína comparado con los animales no tratados (OR = 0,55; IC95%[0,45; 0,69], p-valor < 0,001; OR = 0,61; IC95%[0,49; 0,75], p-valor < 0,001; OR = 0,63; IC95%[0,50; 0,78], p-valor < 0,001; respectivamente) (**Figura 3.2.8-A, B**).



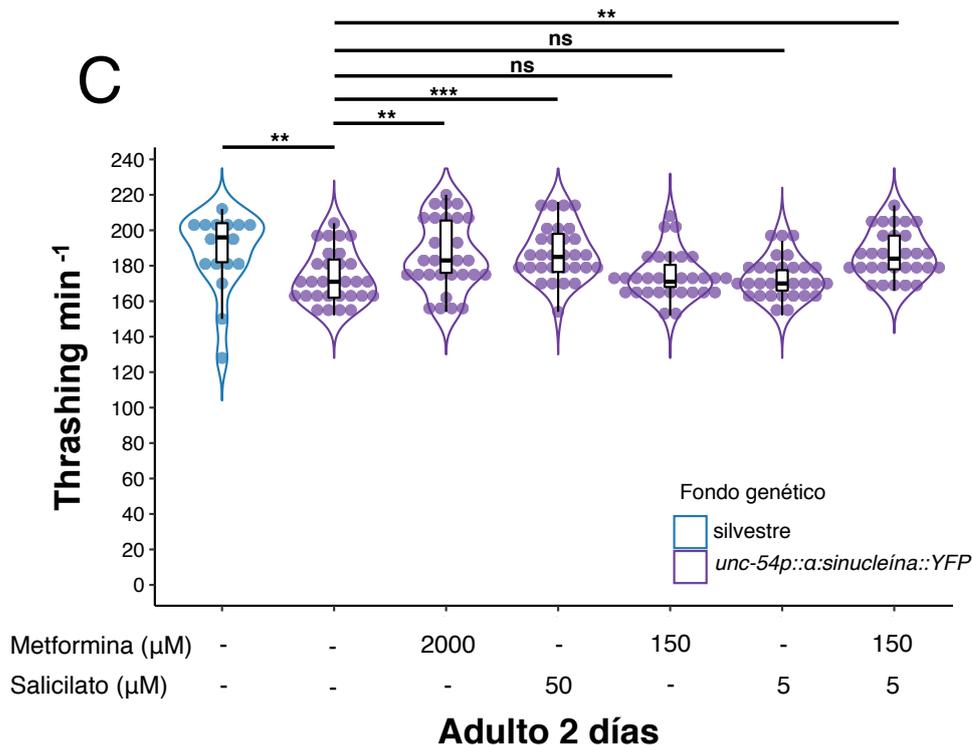


Figura 3.2.8. El tratamiento con metformina y salicilato modifica el patrón de agregación y la capacidad motora de los animales que expresan α -*sinucleína::YFP*. (A) Los animales adultos de dos días tratados con metformina 2000 μ M, salicilato 50 μ M y la combinación sinérgica de metformina y salicilato (150 μ M/5 μ M) muestran una reducción significativa del número medio de agregados de proteína α -*sinucleína* células musculares del área situada entre los dos bulbos faríngeos. (B) Imágenes de fluorescencia representativas de animales α -*sinucleína::YFP* no tratados (H_2O ; vehículo) y tratados con metformina y salicilato (150 μ M/5 μ M). Las flechas señalan los agregados de α -*sinucleína* en células musculares localizadas entre los dos bulbos faríngeos. (C) El tratamiento con 2000 μ M, salicilato 50 μ M y la combinación sinérgica mejora la motilidad de los animales α -*sinucleína::YFP* adultos de dos días, con respecto a animales no tratados o tratados con dosis bajas independientes de metformina (150 μ M) y salicilato (5 μ M). El análisis estadístico muestra el ratio OR (del inglés *Odds Ratio*; razón de probabilidades relativa) o el valor de estimación (dada la naturaleza de la variable), el coeficiente de intervalo de confianza mínimo y máximo al 95 % (IC95%) y el p-valor para indicar la significancia de los datos. Los datos representan la media y la dispersión de los valores por cada cepa y condición. (N > 30; gráfico A); (N = 30; gráfico C). N_{EXPERIMENTAL} = 3. ***: p-valor < 0,001; **: p-valor < 0,01; ns: estadísticamente no significativo. Barra escala: 10 μ m. Adaptada de Gómez-Escribano *et al.*, (Gómez-Escribano *et al.*, 2020).

En paralelo, evaluamos el efecto del tratamiento sobre la funcionalidad muscular de animales transgénicos α -*sinucleína::YFP* mediante ensayos de motilidad, evaluando el número de *thrashes*/min. En este caso, los animales adultos de dos días tratados con metformina 2000 μ M y salicilato 50 μ M, de manera independiente, mostraron un rescate del fenotipo motor en

comparación con los animales no tratados (Efecto estimado = 12,60; IC95%[4,74; 20,47], p-valor = 0,002; Efecto estimado = 13,47; IC95%[5,60; 21,33], p-valor = 0,001; respectivamente) (**Figura 3.2.8-C**). En contraste, dosis inferiores de ambos fármacos por separado (metformina 150 μ M y salicilato 5 μ M) no modificaron la capacidad motora de animales adultos de dos días tratados (Efecto estimado = 0,733, IC95%[-7,13; 8,60], p-valor = 0,854; Estimación = -0,93; IC95%[-8,80; 6,93], p-valor = 0,815; respectivamente), mientras que la combinación de ambos fármacos a esas dosis aumentó significativamente la capacidad motora de los animales comparado con animales no tratados (Efecto estimado = 12,60; IC95%[4,74; 20,47], p-valor = 0,002) (**Figura 3.2.8-C**). Estos resultados sugieren que el tratamiento sinérgico con metformina y salicilato, además de reducir la toxicidad por poliQs, puede combatir el estrés inducido por la agregación de la proteína α -sinucleína en células musculares, mejorando a su vez su funcionalidad.

Capítulo III. Diferentes vías de señalización hormonal modulan de manera opuesta la homeostasis de proteínas a través de cambios en el metabolismo lipídico

La integridad del proteoma es vital para la supervivencia de los organismos. El desequilibrio de la homeostasis de proteínas, inducido por proteínas mal plegadas y con tendencia a agregarse, desencadena enfermedades devastadoras. Por tanto, es crucial investigar sobre los mecanismos que pueden modular la homeostasis de proteínas, mediante el estudio de genes reguladores, que, si son susceptibles de ser activados o inhibidos por fármacos, podrían resultar potenciales dianas terapéuticas.

En este trabajo hemos identificado y caracterizado *unc-1(vlt10)* como un potente modulador del patrón de agregación de proteínas con poliQs. Hemos demostrado que la falta de función del gen *unc-1*, alelo *vlt10*, induce la producción de un exceso de señalización neurohormonal desde las neuronas ASJ, que involucra a la sulfotransferasa citosólica SSU-1. A su vez, hemos demostrado que esta señal hormonal activa un receptor nuclear, NHR-1, que regula la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico, entre otras dianas. Además, hemos descubierto que otra vía de señalización hormonal, que relaciona al receptor nuclear DAF-12, controla la dinámica de agregación de poliQs de manera opuesta a NHR-1. Finalmente, hemos identificado varios genes del metabolismo lipídico y algunos lípidos que se encuentran alterados mediante ensayos de transcriptómica y de lipidómica, respectivamente. En el marco de este proyecto, han sido desarrollados, y supervisados por la candidata a doctora, dos trabajos de final de grado (Qiuyi Chen-UPV e Irene Real-UV).

III.1 Identificación de *unc-1* como un modulador de la agregación de poliQs

García y colaboradores mostraron que la señalización mediada por la sinapsis química modula la homeostasis de proteínas en células musculares (García et al., 2007). Sin embargo, conocemos relativamente poco sobre los procesos celulares

implicados en esta regulación. Para profundizar en el conocimiento de estas vías de control sobre la homeostasis de proteínas, realizamos un cribado de genes al azar que nos permitiese encontrar modificadores de la agregación de poliQs. Para ello empleamos metanosulfonato de etilo (EMS; vea Metodología – Rastreo EMS), que induce lesiones en el ADN de forma aleatoria, produciendo mutantes que podrían alterar fenotipos de interés. Uno de los fines de este cribado de genes era identificar moléculas moduladoras de la señalización sináptica, que a su vez, regulasen la agregación de poliQs (**Figura 3.3.1-A**).

Para realizar estos experimentos empleamos la cepa de *C. elegans* que contiene el transgén *unc-54p::40Q::YFP* (Morley et al., 2002). Los animales 40Q presentan un aumento progresivo de agregados que es más evidente en rangos de edad tempranos e intermedios (estadios larvarios L2, L3 y L4) hasta jóvenes adultos, por lo que los ensayos comparativos fueron realizados teniendo en cuenta diferentes edades de los animales (p.e. estadio intermedio o L4; **Figura 3.3.1-B**) para los experimentos incorporados en este estudio. El aumento de magnificación (20X) de una zona seleccionada en los animales L4 40Q permite observar en detalle la forma y distribución de los cuerpos de inclusión, los cuales se agrupan como acúmulos independientes dispersos por el tejido muscular (**Figura 3.3.1-C**). Para los recuentos, hemos considerado cada punto como un acúmulo independiente. En el cribado descrito arriba, aislamos una cepa de animales descoordinados que, además, mostraban un aumento sensible de agregados de poliQs (**Figura 3.3.1-D**), la cual llamamos RVM10. Después de varios cruces entre la cepa mutante y el fondo genético silvestre (N2, Bristol), observamos que la mutación responsable del fenotipo, *vlt10*, se transmitía mediante una herencia recesiva. El alelo *vlt10* aumenta notablemente la agregación de poliQs en larvas L4 (**Figura 3.3.1-B, D, E**) comparado con animales silvestres y, además, conlleva un fenotipo de descoordinación motora que podría estar causado por una alteración de la señalización sináptica.

Para el aislamiento del cambio codificado por *vlt10*, analizamos el genoma completo de la cepa RVM10 (vea Metodología – Aislamiento *vlt10*) mediante secuenciación masiva (Centro Nacional de Análisis Genómico, Barcelona, España). Además de *vlt10*, el EMS produce muchas otras lesiones al azar que se pierden tras los sucesivos cruzamientos, excepto la mutación de interés, que se mantiene porque va ligada al fenotipo de interés y al igual que cualquier otra mutación que esté cercana físicamente a *vlt10*.

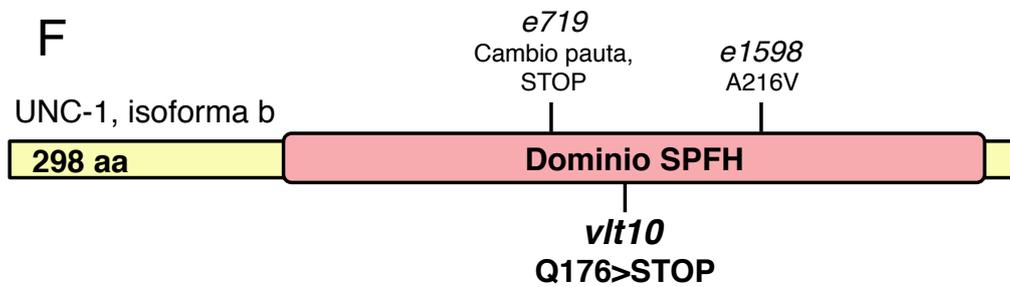
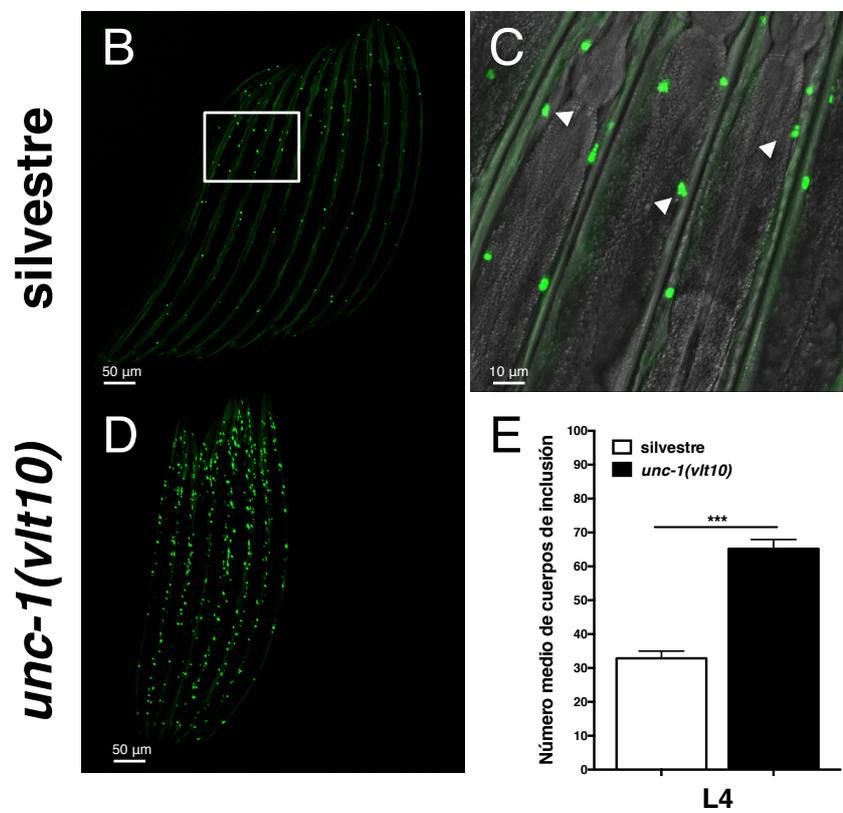
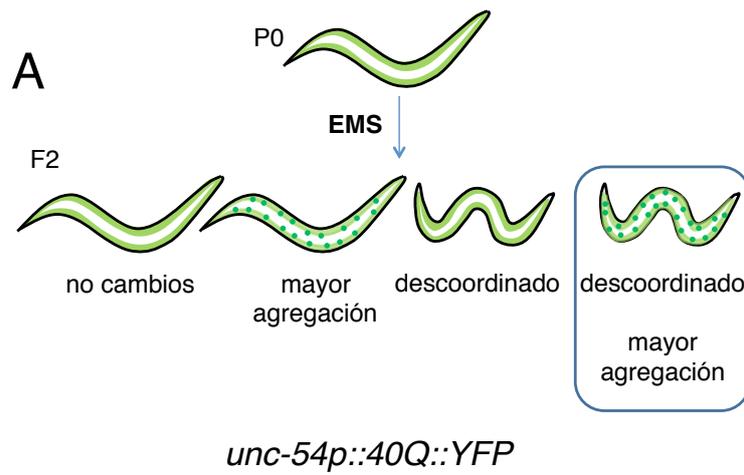


Figura 3.3.1. *vlt10* codifica un codón de parada prematuro en el gen *unc-1* que potencia la agregación de poliQs en células musculares. (A) El tratamiento con el compuesto químico metanosulfonato de etilo (EMS) genera mutaciones espontáneas en animales *40Q*. Tras dos generaciones, aislamos mutantes descoordinados (que podrían tener alteraciones en la señalización sináptica) y cuyo patrón de agregación de poliQs es diferente a los controles no tratados. (B) Imagen representativa de animales *40Q* en estadio L4 obtenida mediante microscopía confocal. (C) El recuadro blanco de la figura B acota la zona que ha sido aumentada (20X) en la imagen para visualizar la forma y el patrón de los cuerpos de inclusión (señalados con puntas de flecha) asociados al transgén que expresa *40Q::YFP* en células musculares. (D) Imagen representativa, tomada con microscopía confocal, de animales *40Q* en estadio L4 que contienen la mutación *vlt10*, responsable del aumento del fenotipo de agregación de poliQs. (E) Los animales que tienen el alelo *vlt10* en homocigosis sufren un aumento sensible de cuerpos de inclusión con respecto a los controles *40Q*. (F) La secuenciación masiva de la cepa RVM10 mostró que el cambio alélico, *vlt10*, está en homocigosis en la región codificante del gen *unc-1* y codifica un codón de parada prematuro (Q176 > STOP), dando lugar a una posible proteína truncada. El dominio SPFH, presente en UNC-1, le facilita el anclaje a la membrana celular. Los datos representados muestran la media \pm SEM. (N = 30) por genotipo. N_{EXPERIMENTAL} = 3. ***: p-valor < 0,001. Test estadístico t-test con prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Secuenciamos los genomas de todas las cepas mutantes (tanto RVM10 como otras aisladas en el cribado) antes y después del cruce con los animales silvestres. También secuenciamos la cepa original AM141, como control no tratado con EMS. Tras ello, procedimos a comparar los genomas de todas estas cepas (este proceso fue realizado en el COMAV-UPV, Valencia, España). Este análisis nos mostró una región genómica con una alta densidad de mutaciones en forma de pico alrededor del brazo izquierdo del cromosoma X (vea Metodología – Aislamiento *vlt10*, **Figura 2.13**). Nuestra suposición es que el alelo, causante del fenotipo de agregación aumentada de poliQs, estaba en esa región junto con otros cambios de ADN que están fuertemente ligados a *vlt10*. El análisis en detalle de la región genómica mostró que la región codificante del gen *unc-1* contenía una mutación puntual sin sentido en homocigosis que codificaba un codón de parada prematuro en el lugar de una glutamina (Q176), que posiblemente daría lugar a un mutante nulo (**Figura 3.3.1-F**). *unc-1* codifica UNC-1, que es una proteína perteneciente a la familia de las proteínas parecidas a las estomatinas de mamíferos (SLP; del inglés *Stomatin-like protein*) (Lapatsina et al., 2012; Rajaram et al., 1998). Análisis de filogenia preliminares, realizados por nosotros y que coinciden con los realizados por biólogos moleculares de Wormbase, sitúan a UNC-1 próxima evolutivamente a hSTOML3 (**Figura 3.3.2**).

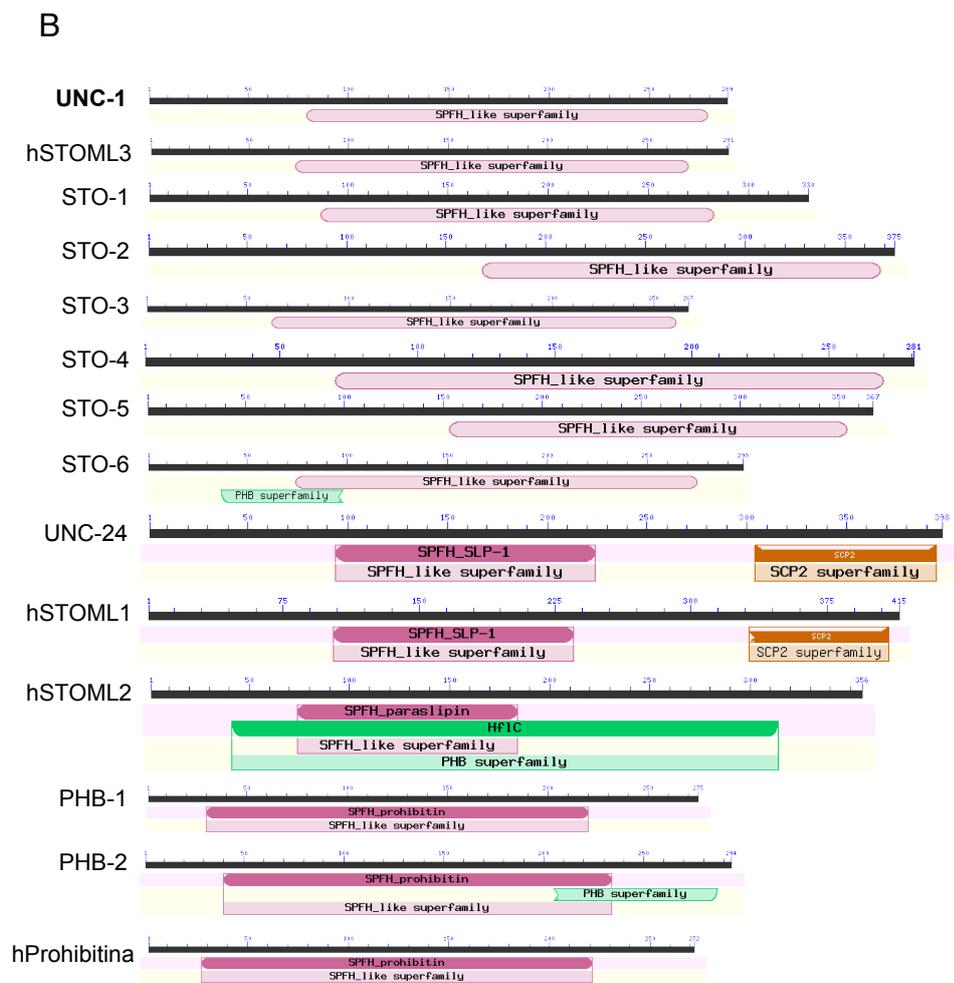
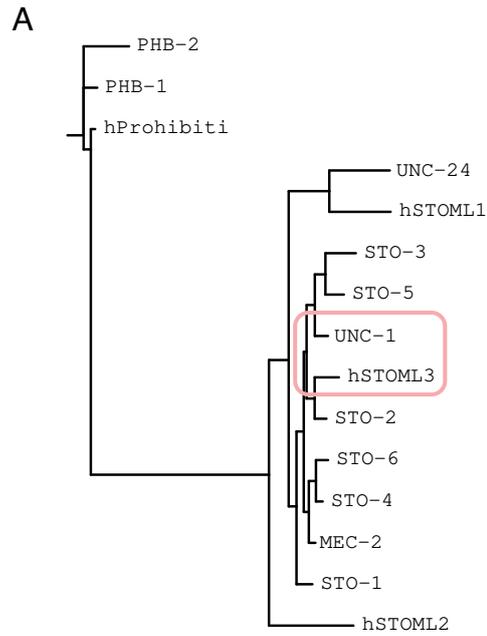


Figura 3.3.2. Estructura y filogenia de proteínas estomatinas en *C. elegans* y humanos. (A) El análisis filogenético sitúa a ambas proteínas, UNC-1 y hSTOML3, muy próximas. En contraste, otras SLPs, como UNC-24, está evolutivamente más cercana a hSTOML1, mientras que MEC-2 es más parecida a hSTOML2. Las herramientas Clustal Omega (Sievers et al., 2011), MUSCLE (Edgar, 2004) y IQ-TREE (Chernomor et al., 2016; Li, 2011; Nguyen et al., 2015) fueron empleadas para producir el alineamiento múltiple de las proteínas y el árbol filogenético. Empleamos tanto prohibitinas de *C. elegans* (PHB-1 y PHB-2) como la proteína humana hProhibitina como grupos externos. (B) La estructura de las proteínas fue desarrollada empleando las fuentes de información del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi). UNC-1 presenta un grado de similitud de secuencia, estructura y longitud similar con la proteína estomatina humana hSTOML3.

En *C. elegans*, la función de UNC-1 ha sido relacionada con la regulación de la sinapsis eléctrica a través de las uniones tipo GAP (uniones en hendidura que conectan células para facilitar la comunicación entre las mismas) (Hall, 2017). Además, UNC-1 también parece regular la sensibilidad a anestésicos (Chen et al., 2007; Rajaram et al., 1998). Se han descrito multitud de alelos mutantes para este gen que reproducen el fenotipo de descoordinación motora observado en los animales portadores de *vlt10* en homocigosis (Chen et al., 2007), reforzando la posibilidad de que *unc-1(vlt10)* codifique una proteína truncada.

III.2 La supresión de *unc-1/STOML3* aumenta la formación de cuerpos de inclusión de poliQs

Para investigar si *unc-1(vlt10)* era responsable del aumento del fenotipo de agregación de la cepa RVM10, introdujimos algunos alelos mutantes descritos (*e719* y *e1598*) para *unc-1* en animales con el fondo genético *40Q*. El análisis del número de cuerpos de inclusión mostró que los alelos *e719* (pérdida de función total, recesivo) y *e1598* (dominante), mimetizaban el fenotipo de agregación de animales *vlt10* desde el estadio larvario L2 hasta alcanzar el estadio de joven adulto (**Figura 3.3.3-A**). Sin embargo, el alelo *vlt10* produjo un fenotipo de agregación ligeramente más débil, comparado con los alelos *e719* y *e1598*, sugiriendo que el alelo *vlt10* podría ser hipomorfo. Tampoco podemos descartar que otras mutaciones desconocidas pudieran ir ligadas al alelo *vlt10*, mitigando su fenotipo. Dado el evidente papel modulador de *unc-1(vlt10)* sobre un fondo de agregación patológico *40Q*, evaluamos su pérdida de función sobre un fondo de agregación con un número de poliQs por debajo del umbral patológico para la EH (i.e. 36 tripletes CAG). Para ello empleamos la cepa AM140, que contiene un transgén que induce la expresión de 35Q en células musculares (Morley et al., 2002). Los animales 35Q presentan un patrón de

agregación más tardía que los animales 40Q y solamente es evidente la presencia de cuerpos de inclusión en animales que han alcanzado la edad adulta (Morley et al., 2002). Por tanto, sentíamos curiosidad por conocer si *unc-1(vlt10)* podría adelantar la aparición de cuerpos de inclusión en la cepa 35Q en estadios larvarios. Como esperábamos, el análisis de animales 35Q; *unc-1(vlt10)* mostró que el alelo *vlt10* aceleraba el fenotipo de agregación de animales 35Q desde el estadio L2 hasta jóvenes adultos (**Figura 3.3.3-B**). Hay que hacer notar, que en ninguno de estos estadios se observan agregados en presencia exclusivamente del transgén 35Q::YFP (**Figura 3.3.3-B**). Esto ocurre de igual modo en los alelos *e719* y *e1598* (**Figura 3.3.3-B**). Estos datos muestran robustamente que *unc-1* modula la agregación de poliQs, incluso en un fondo de agregación tardía, incrementando y adelantando en el ciclo vital de los gusanos la formación de cuerpos de inclusión. En este caso, observamos que *vlt10* potencia igual o más la formación de cuerpos de inclusión que los otros alelos descritos. Esto podría deberse a que el fondo genético de los gusanos 35Q y 40Q arrastrasen diferentes mutaciones que modulen el efecto de *vlt10*, de las cuales no nos hemos librado, a pesar de haber retrocruzado las cepas.

La desestabilización de la homeostasis de proteínas asociada a una agregación desmesurada de poliQs, también ha sido ampliamente estudiada en el sistema nervioso, y se ha descrito que afecta a la funcionalidad neuronal (Brignull et al., 2006; Parker et al., 2001). Brignull y colaboradores han profundizado sobre este proceso y, para ello, desarrollaron un modelo de *C. elegans* que codifica 40 glutaminas en pauta con YFP bajo el control del promotor del gen *F25B3.3*, que se expresa en un amplio espectro neuronal. Estos animales contienen agregados de poliQs neuronales, visibles mediante un microscopio de fluorescencia, que perturban la función neuronal (Brignull et al., 2006). Puesto que UNC-1 es un componente de la sinapsis eléctrica, evaluamos si *unc-1(vlt10)* podría modular la agregación de poliQs en el sistema nervioso al igual que habíamos observado en células musculares. Para ello, introdujimos *unc-1(vlt10)*, aislada de RVM10, dentro de un fondo genético *F25B3.3-p::40Q::YFP*. Como esperábamos, *unc-1(vlt10)* incrementó significativamente la formación de agregados neuronales en el cordón nervioso ventral de jóvenes adultos significativamente (**Figura 3.3.3-C,D**). Estos resultados demuestran que *unc-1(vlt10)* potencia la agregación de poliQs tanto en neuronas como en células musculares.

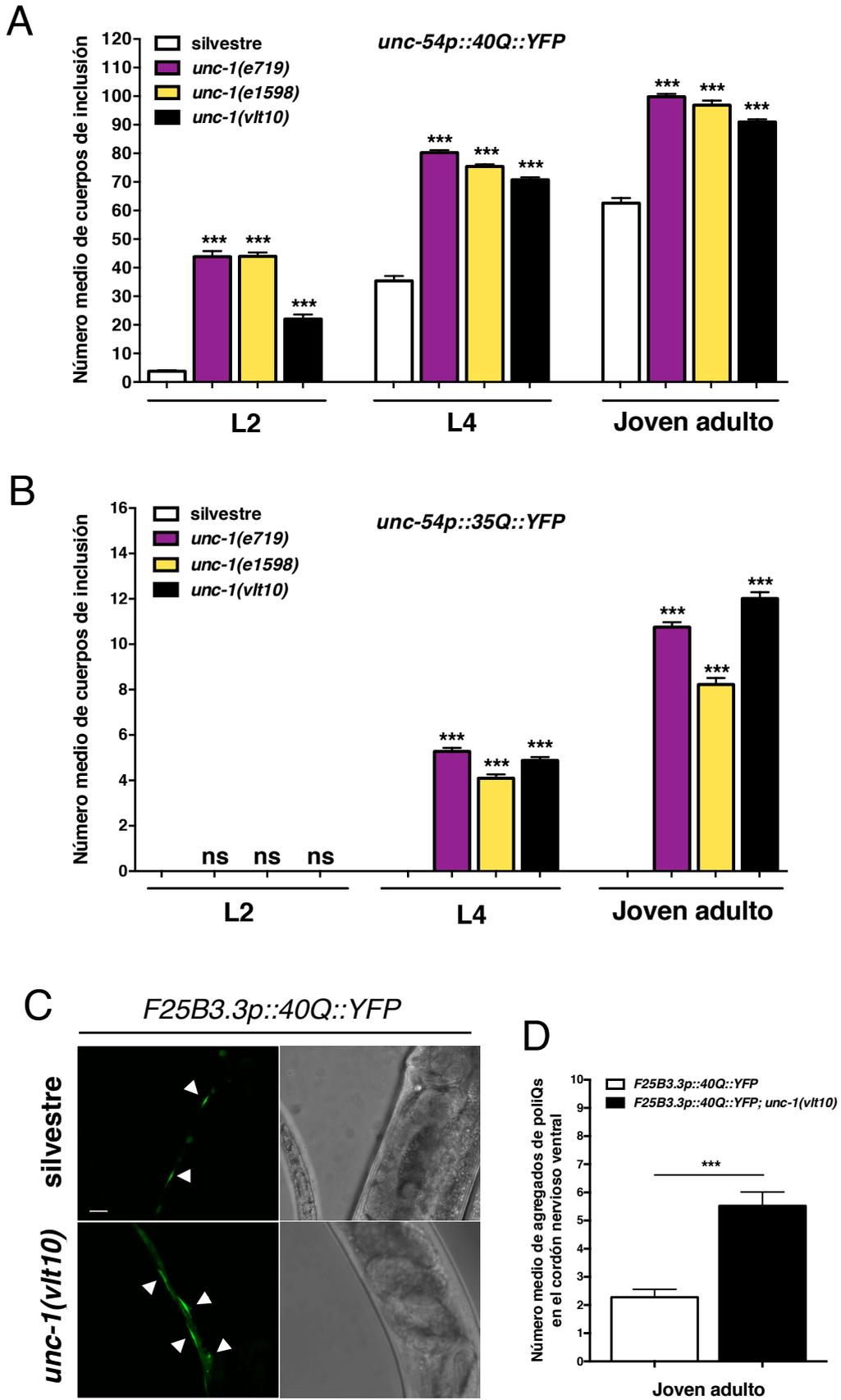


Figura 3.3.3. La supresión de *unc-1/STOML3* aumenta la formación de cuerpos de inclusión de poliQs en células musculares y en neuronas. (A) *vlt10* emula el fenotipo de agregación muscular de mutaciones de pérdida y ganancia de función descritas en *unc-1*, *e719* y *e1598*, respectivamente, en varios estadios, L2, L4 y joven adulto en un fondo genético *40Q*. El efecto débil de *vlt10*, en comparación con los otros alelos, podría indicar que se trata de un alelo hipomorfo. (B) *vlt10* acelera la aparición de cuerpos de inclusión de poliQs en animales *35Q*, al igual que otros los alelos descritos de *unc-1*, *e719* y *e1598*. (C) Imágenes representativas tomadas con microscopía de fluorescencia que muestran agregados neuronales de poliQs (marcados con puntas de flechas blancas) en el cordón nervioso ventral de animales controles *F25B3.3p::40Q::YFP* y *F25B3.3p::40Q::YFP*; *unc-1(vlt10)* en estadio de joven adulto. (D) *vlt10* aumenta el número de agregados neuronales de poliQs significativamente en jóvenes adultos que contienen el transgén *F25B3.3p::40Q::YFP*. Los datos representados muestran la media \pm SEM. (N = 30; gráfico A y B), (N = 60; gráfico D) por genotipo. N_{EXPERIMENTAL} = 3. *** : p-valor < 0,001; ns: estadísticamente no significativo. Los valores de significación son referidos a la cepa control *40Q* (gráfico A) y a la cepa *35Q* (gráfico B) de cada estadio. Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey. Barra escala: 10 μ m.

III.3 *unc-1(vlt10)* modifica el fenotipo de agregación de proteínas α -sinucleína y β -amiloide

El mal plegamiento proteico y, por consiguiente, la acumulación de agregados que conduce a una pérdida de la homeostasis de proteínas, es un fenómeno común en otras enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer. Hemos demostrado que *unc-1* tiene un papel modulador en la homeostasis de proteínas con poliQs (donde se enmarcan la EH junto con otras ocho patologías con orígenes diferentes), por tanto, nos propusimos estudiar si *unc-1(vlt10)* también podría modificar fenotipos de proteínas con tendencia a la agregación como la α -sinucleína y el péptido β -amiloide, desencadenantes de algunas formas de las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, respectivamente. El estudio de estas patologías ha propiciado el desarrollo de varios modelos en *C. elegans* para profundizar en los mecanismos que controlan su dinámica de agregación. Concretamente, hemos empleado la cepa NL5901 que contiene el transgén *unc-54p:: α -sinucleína::YFP* (van Ham et al., 2008) y la cepa CL2006 que contiene un transgén que induce la expresión muscular de 42 aminoácidos del péptido β -amiloide derivados de la proteína precursora amiloide humana (a partir de ahora denotado como β -amiloide) (Link, 1995).

El patrón de agregación de la proteína α -sinucleína fue observado mediante la detección de YFP, mientras que los depósitos de β -amiloide fueron previamente teñidos con el colorante fluorescente X-34 que tiene afinidad por fibras amiloides (vea Metodología – Tinción colorante X-34).

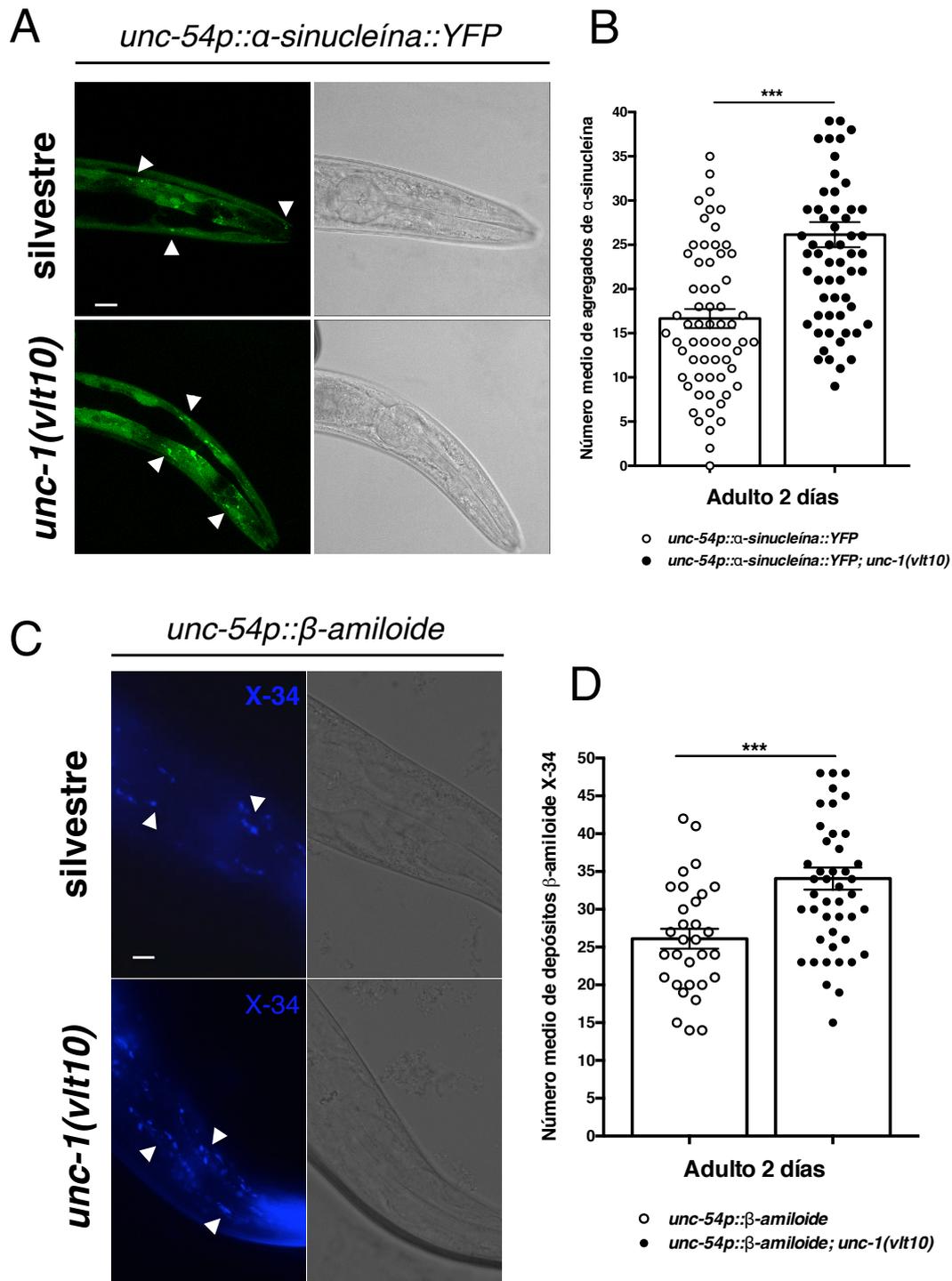


Figura 3.3.4. La supresión de UNC-1/STOML3 modifica el fenotipo de agregación de proteínas α -sinucleína y β -amiloide. (A) Imágenes representativas tomadas con microscopía confocal que muestran la zona de la musculatura situada entre los dos bulbos faríngeos, entre los cuales se han realizado los recuentos de agregados de α -sinucleína. Se observan acúmulos de agregados (puntas de flechas blancas) que contrastan con el patrón difuso de proteínas no agregadas. (B) *vlt10* potencia la formación de agregados de α -sinucleína comparado con animales silvestres en estadio de adulto de dos días. Los recuentos fueron obtenidos considerando el área situada entre los dos bulbos faríngeos en animales adultos de dos días de edad. (C) Imágenes representativas tomadas con microscopía de fluorescencia que incluyen la zona situada entre los dos bulbos faríngeos, entre los cuales se han realizado los recuentos. Los animales fueron previamente

teñidos con el colorante fluorescente X-34 para destacar los depósitos amiloides. (D) *vlt10* aumenta el número de depósitos β -amiloide en músculo notablemente comparado con animales silvestres adultos de dos días. Los datos representados muestran la media \pm SEM. (N > 60; gráfico B) y (N > 40; gráfico D) por genotipo. ***: p-valor < 0,001. Test estadístico t-test con prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Barra escala: 10 μ m.

El patrón de agregación fue analizado *in vivo* mediante un microscopio de fluorescencia. Ambas cepas presentan un patrón de agregación tardío dependiente de la edad, por lo que tuvimos que evaluar adultos de dos días de edad para analizar el patrón de agregación. Como esperábamos, la falta de función de *unc-1* mostró un aumento significativo del número medio de agregados de α -sinucleína en células musculares situadas cerca de la faringe (zona situada entre los dos bulbos faríngeos) en adultos de dos días (Figura 3.3.4-A, B). Del mismo modo, los animales β -amiloide; *unc-1(vlt10)* mostraron un número medio de depósitos β -amiloide notablemente mayor que los adultos de dos días que solamente contenían el transgén (Figura 3.3.4-C, D). Estos resultados sostienen que *unc-1* puede modular el patrón de agregación de proteínas de diferente tipo como α -sinucleína y β -amiloide en células musculares, de igual manera que ocurre con los gusanos que expresan proteínas que portan poliQs.

III.4 *unc-1* es requerido en el sistema nervioso para modular la homeostasis de proteínas en células musculares

La expresión de UNC-1 está confinada, al menos, al sistema nervioso y células musculares (Chen et al., 2007; Rajaram et al., 1998; Sedensky et al., 2001). Hemos confirmado que *unc-1* modula la homeostasis de proteínas en ambos tejidos con diferentes modelos, pero desconocemos dónde reside su función. Para investigar si UNC-1 modula la agregación muscular de poliQs autónomamente en el mismo tejido donde se expresa, restauramos la función del gen mediante el ADNc expresado bajo el promotor del gen *myo-3* (*myo-3p*), el cual dirige la expresión específicamente en células musculares (Miller et al., 1983). El análisis del patrón de agregación mostró que la construcción *myo-3p::unc-1(ADNc)*, inyectada a 25 μ g/ μ L, no era suficiente para rescatar el patrón de agregación en estadios larvarios (L2, L4), aunque produjo una pequeña reducción de cuerpos de inclusión en animales jóvenes adultos (datos no mostrados). Por tanto, decidimos intentarlo a una concentración más elevada, 50 μ g/ μ L, para descartar un problema de expresión baja de *unc-1*. En este caso, los animales rescatados

mostraron una clara reducción del número de cuerpos de inclusión (**Figura 3.3.5-A**). Sin embargo, percibimos una bajada sensible de la fluorescencia (datos no mostrados), lo que sugería que las poliQs se estaban expresando menos que en los animales sin ese transgén de rescate. Esto nos hizo hipotetizar que quizás la presencia de un alto número de copias del promotor *myo-3* podría estar secuestrando factores de transcripción específicos de células musculares, y quizás compartidos con el promotor del gen *unc-54*, que es el que dirige la expresión del transgén *40Q*. Para investigar esto, inyectamos exclusivamente el promotor, *myo-3p*, en animales *40Q*, y efectivamente, observamos una reducción de cuerpos de inclusión (datos no mostrados). Por consiguiente, evaluamos por RT-qPCR los niveles de expresión del transgén *40Q* y efectivamente, la expresión de *YFP* estaba reducida en animales transgénicos inyectados con las construcciones *myo-3p::unc-1(ADNc)* y también en animales que solo contenían un transgén portando *myo-3p* (**Figura 3.3.5-B**). Esto sugiere que la reducción de agregación de poliQs observada mediante la reintroducción del ADNc de *unc-1* en células musculares no es debido a un rescate de su función. Estos resultados sugieren que *unc-1* podría modular la agregación muscular de poliQs de forma no autónoma. Aunque debido al artefacto producido por los promotores musculares presentes en los transgenes, no podemos demostrar si introducir *unc-1* en músculo podría rescatar el fenotipo mutante.

El otro tejido donde se ha descrito que se expresa *unc-1* es el tejido nervioso (Chen et al., 2007). Por tanto, decidimos reintroducir el ADNc de *unc-1* mediante un promotor neuronal de amplio espectro, *rab-3p*, en animales *40Q; unc-1(vlt10)*. En este caso, la expresión de *unc-1(ADNc)* en el sistema nervioso restauró completamente el fenotipo de agregación en todos los estadios evaluados al nivel observado en animales silvestres *40Q* (**Figura 3.3.5-C**). En contraste con el experimento anterior, el rescate de *unc-1* en el sistema nervioso no modificó los niveles de expresión del transgén *40Q* (**Figura 3.3.5-C**). Para confirmar estos resultados, interferimos la función de *unc-1* mediante silenciamiento génico específicamente en el sistema nervioso sobre animales *40Q*.

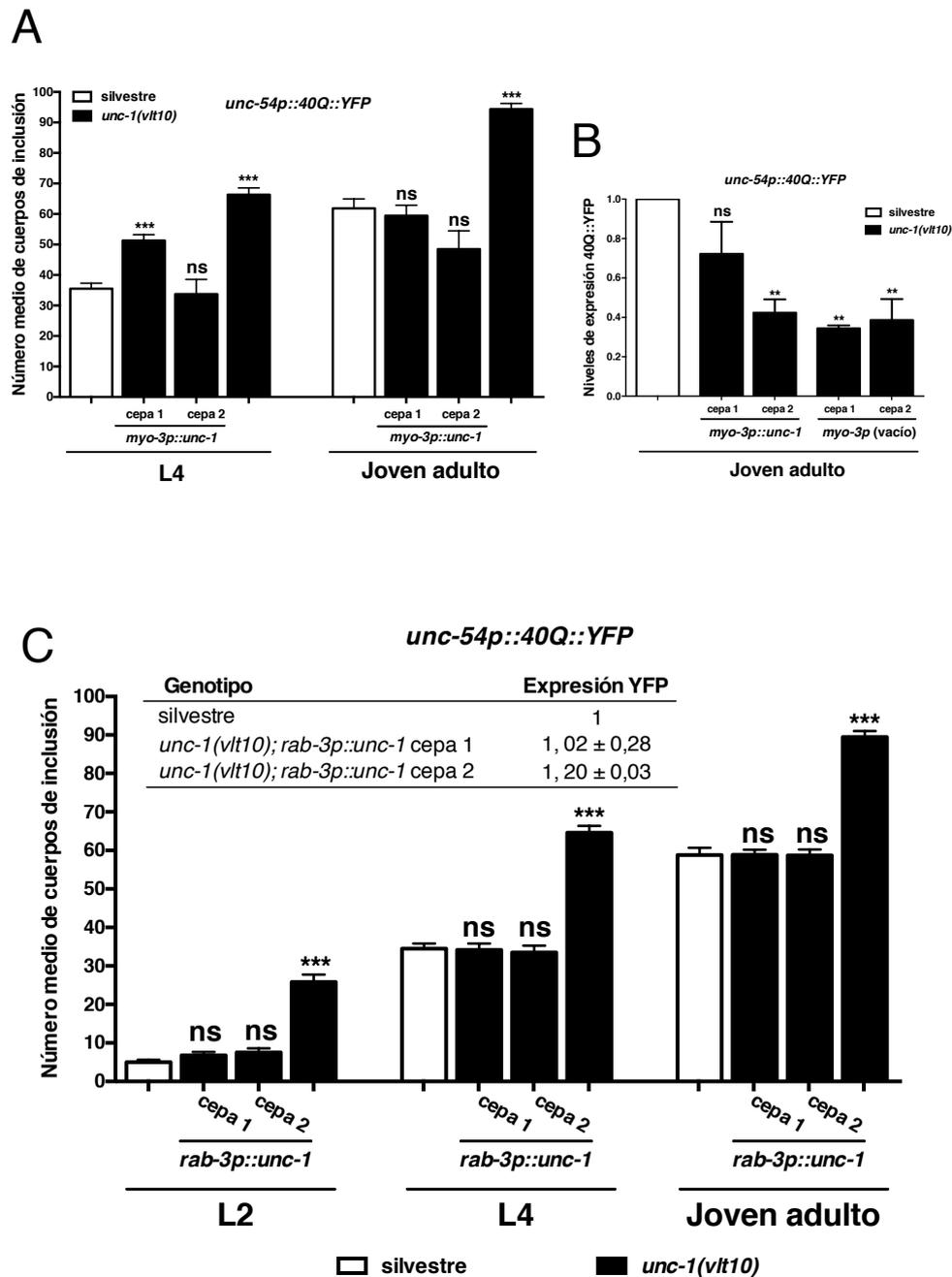


Figura 3.3.5. UNC-1 es requerido en el sistema nervioso para modular la homeostasis de proteínas en células musculares. (A) El rescate de *unc-1* en células musculares reduce el número de cuerpos de inclusión de manera diferencial en animales L4 y jóvenes adultos. (B) Los niveles de expresión relativa del transgén *unc-54p::40Q::YFP* están reducidos sustancialmente en las líneas transgénica de animales jóvenes adultos que expresan el transgén *myo-3p::unc-1(ADNc)* y en aquellas donde solamente hemos introducido el promotor *myo-3*, indicando que el rescate observado es debido a una menor expresión de la inserción *40Q::YFP*. Los niveles de YFP están normalizados con el control endógeno *pmp-3* y relativizados a la cepa control *40Q*. (C) El rescate de *unc-1* bajo el promotor pan-neuronal de amplio espectro, *rab-3p*, restaura completamente el fenotipo de agregación de los mutantes *unc-1(vlt10)* hasta los niveles del control *40Q*, en todos los estadios evaluados (L2, L4 y joven adulto). El rescate específico de tejido de *unc-1* mediante la construcción *rab-3p::unc-1* no afecta a los niveles de expresión del transgén *40Q::YFP* (datos numéricos mostrados en tabla insertada en el gráfico). Los datos representan la media ± SEM. (N = 30; gráfico A y C)

por genotipo y/o condición. ($N_{\text{EXPERIMENTAL}} = 3$). **: p-valor < 0,01; ***: p-valor < 0,001; ns: estadísticamente no significativo. Los valores de significación son referidos a la cepa control *40Q* de cada estadio. Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

Para activar la maquinaria de ARN interferente (ARNi) sintetizamos dos productos de PCR independientes que tenían en común la secuencia del promotor *rab-3* (1,7 kb), la cual fue fusionada (#1) a un fragmento de la cadena sentido (*rab-3p::unc-1_sentido*) y (#2) a un fragmento antisentido (*rab-3p::unc-1_antisentido*) del gen mediante una PCR de fusión (vea Metodología – Fusión por PCR, **Figura 2.12**). En paralelo, sintetizamos productos de PCR específicos del gen que codifica la resistencia a ampicilina en bacterias (AMP^r , incluida de manera estándar en los vectores plasmídicos) para emplearla como control negativo del ensayo. El silenciamiento de *unc-1* en sistema nervioso mostró un aumento del número de cuerpos de inclusión en varios estadios comparado con las cepas transgénicas control interferidas con *rab-3p::AMP^r(ARNi)*, las cuales muestran niveles similares a los animales *40Q* que no expresan el ARNi (**Figura 3.3.6-A**). Estos resultados reforzaron la implicación de *unc-1* como modulador de la agregación de poliQ muscular mediante una señalización desde el sistema nervioso. Recientemente ha sido descrito un alelo dominante negativo para *unc-1*, *n494* (Jang et al., 2017). Para obtener datos sobre la función de *unc-1* en el sistema nervioso, de forma alternativa, decidimos introducir este alelo en animales *40Q* bajo el control de *rab-3p*. En paralelo, investigamos si la sobreexpresión de *unc-1* tenía algún efecto sobre la dinámica de agregación de poliQs. Por un lado, la perturbación de la función de *unc-1* por el alelo *n494* en el sistema nervioso, mostró un aumento del número de cuerpos de inclusión con respecto a los animales silvestres *40Q* y *40Q; rab-3p* controles y, por el contrario, más parecido a animales *40Q; unc-1(vlt10)* (**Figura 3.3.6-B**). Por otro lado, la sobreexpresión de *unc-1* en sistema nervioso no produjo ningún cambio en la dinámica de agregación (**Figura 3.3.6-B**). Todos estos resultados en conjunto sugieren que la función moduladora que posee UNC-1, sobre la agregación de poliQs, reside en el sistema nervioso. A su vez, esto confirma que *unc-1* regula la homeostasis de proteínas poliQs en células musculares a través de una señalización celular no autónoma. Además, estos datos refuerzan la hipótesis que sostiene que *unc-1(vlt10)* es la mutación responsable del aumento del patrón de agregación de poliQs de los animales *40Q; unc-1(vlt10)*.

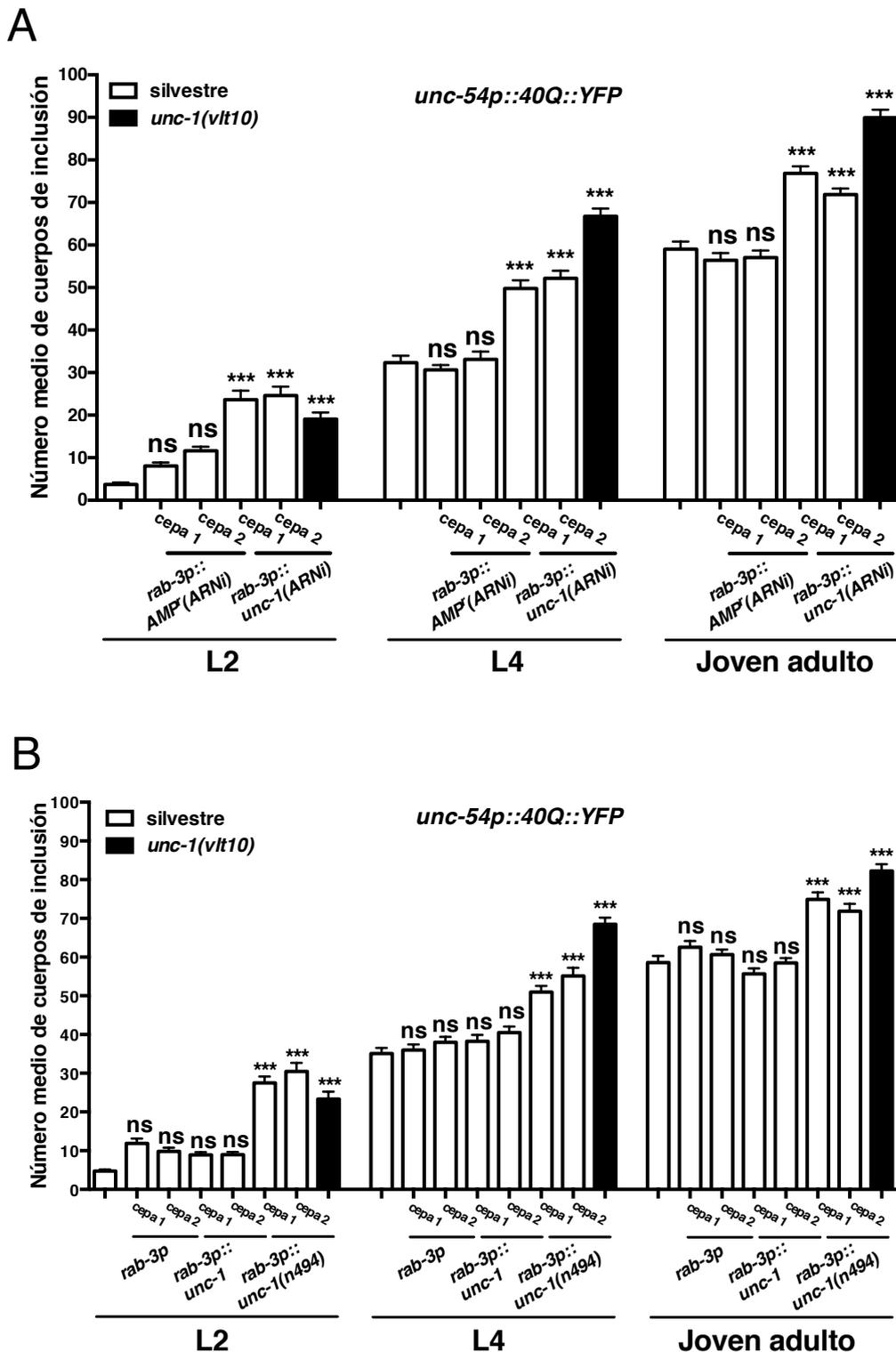


Figura 3.3.6. La disrupción de *unc-1* específicamente en el sistema nervioso aumenta el número de cuerpos de inclusión en animales *40Q*. (A) El silenciamiento génico de *unc-1* bajo el promotor pan-neuronal del gen *rab-3* incrementa el número medio de cuerpos de inclusión de poliQs en células musculares de animales L2, L4 y jóvenes adultos comparado con animales no interferidos *40Q* y animales interferidos con *rab-3p::AMP*. (B) La sobreexpresión de *unc-1* en sistema nervioso dirigida por *rab-3p* no tiene efectos sobre el patrón de agregación de poliQs, al igual que la expresión única de *rab-3p*. La expresión del alelo dominante negativo *n494* en sistema nervioso perturba la funcionalidad del alelo silvestre, ocasionando una

reducción funcional de UNC-1 e incrementando el patrón de agregación de poliQs en los estadios L2, L4 y joven adulto comparado con los controles (*40Q* y *40Q; rub-3p*). Los datos representan la media \pm SEM. (N = 30) por genotipo y/o condición. (N_{EXPERIMENTAL} = 3). ***: p-valor < 0,001; ns: estadísticamente no significativo. Los valores de significación son referidos a la cepa control *40Q* de cada estadio. Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

III.5 La sinapsis eléctrica modula selectivamente el patrón de agregación de poliQs

Hemos demostrado que *unc-1/STOML3* modula la agregación de poliQs en células musculares mediante una señalización neuronal. En *C. elegans* hay descritos dos genes que codifican proteínas SLP neuronales, *unc-24* y *mec-2*, además de *unc-1*, expresadas en todo el sistema nervioso (además de otros tejidos) y neuronas mecanosensoriales, respectivamente (Carroll et al., 2006). Para investigar si el papel modulador de *unc-1* sobre la dinámica de agregación puede ser extrapolado a otras SLP neuronales, analizamos la pérdida de función de *unc-24(e138)* y *mec-2(e75)* sobre un fondo genético *40Q*. El análisis de estos mutantes mostró que solamente *unc-24(e138)* aumenta la formación de cuerpos de inclusión de manera similar a los mutantes *unc-1(vlt10)*, mientras que los mutantes *mec-2(e75)* no mostraron cambios en el fenotipo (**Tabla 3.3.1**).

Como hemos comentado previamente, los animales *unc-1(vlt10)* muestran un fenotipo de descoordinación motora, posiblemente debido a un mal funcionamiento de la sinapsis eléctrica (Chen et al., 2007). Chen y colaboradores postularon que UNC-1 podría formar parte de las uniones tipo GAP junto con inexas, tales como UNC-9, para controlar la locomoción en *C. elegans*. Las inexas son proteínas transmembrana que forman parte de las uniones tipo GAP y facilitan la sinapsis eléctrica entre neuronas y células musculares (Güiza et al., 2018). Por tanto, decidimos investigar el papel de la sinapsis eléctrica en el control de la proteostasis en *C. elegans*. Para ello, introdujimos alelos de pérdida de función de genes que codifican inexas que se expresan prácticamente en todo el sistema nervioso y otros tejidos (*inx-7* y *unc-9*), y otras cuyo patrón de expresión se restringe a neuronas específicas (*inx-2*, *inx-6*, *unc-7*) (revisado por Altun y colaboradores (Altun et al., 2009)). Todos los mutantes fueron obtenidos del repositorio CGC, a excepción del mutante *inx-2(vlt22)*, que fue generado mediante la tecnología CRISPR/Cas9 (vea sección Metodología – sistema CRISPR/Cas9, **Figura 2.10-B**). El análisis de los alelos mutantes en un fondo

genético 40Q mostró que no todas las inexinas modificaban el patrón de agregación de igual forma que los mutantes *unc-1(vlt10)* (Tabla 3.3.1).

Tabla 3.3.1. SLPs neuronales e inexinas modulan selectivamente la homeostasis de proteínas.

Genotipo	CI (%) ¹	P-valor ²	Proteína	Función ³	Expresión ³
<i>unc-1(vlt10)</i>	171,7 ± 3,1	***	SLP	Locomoción Sensibilidad a anestésicos volátiles	SN ⁴ Músculo
<i>unc-24(e138)</i>	149,1 ± 3,8	***	SLP	Locomoción Sensibilidad a anestésicos volátiles	SN
<i>mec-2(e75)</i>	114,5 ± 5,2	ns	SLP	Mecanosensación	Neuronas mecanosensoriales
<i>unc-7(e5)</i>	178,7 ± 4,7	***	Inexina	Locomoción Sensibilidad a anestésicos volátiles Sensibilidad a ivermectina	Neuronas ⁴ Células gliales Mesodermo
<i>unc-9(ec27)</i>	185,4 ± 2,7	***	Inexina	Locomoción Sensibilidad a anestésicos volátiles Sensibilidad a Ivermectina Acoplamiento eléctrico de las células musculares	NS Músculos entéricos SR ⁴ Hipodermis Células gliales Embriones
<i>inx-2(vlt22)</i>	175,4 ± 4,3	***	Inexina	Papel en estadio inicial de proliferación celular	SN- neurona AVK Faringe Intestino Embriones
<i>inx-7(ok2319)</i>	98,7 ± 3,8	ns	Inexina	Desconocido	SN Faringe SR Mesodermo Embriones
<i>inx-6(rr5)</i>	98,8 ± 4,1	ns	Inexina	Contracciones musculares sincronizadas en la faringe	Faringe Mesodermo Embriones Neuronas

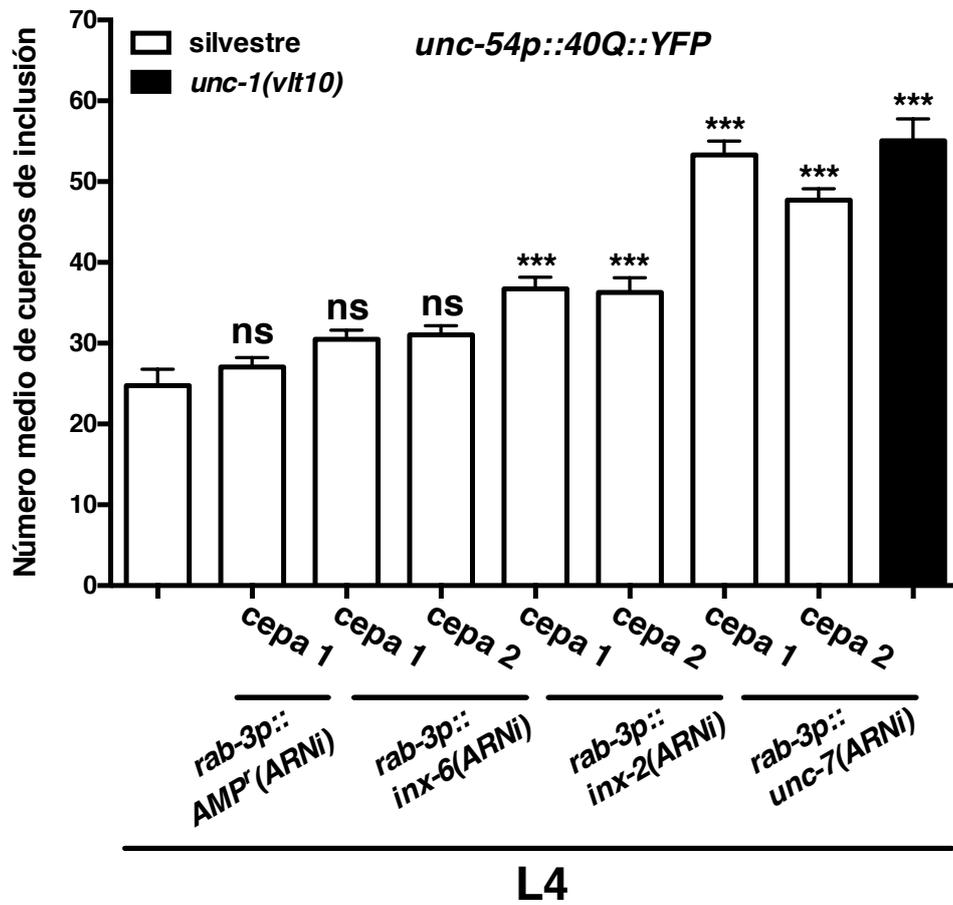
¹Media de cuerpos de inclusión normalizada con la media de la cepa 40Q::YFP (100%) ± Error Estándar de la media. ²Test estadístico t-test con prueba no paramétrica de Mann-Whitney; ***: p-valor < 0,001 referido al fondo silvestre 40Q::YFP; ns: estadísticamente no significativo. ³Datos de función y expresión de acuerdo a la revisión de (Altun et al., 2009). ⁴SN: Sistema nervioso completo; neuronas: algunas neuronas concretas; SR: sistema reproductivo.

Concretamente, los mutantes *unc-7(e5)*, *unc-9(ec27)* e *inx-2(vlt22)* mostraron un aumento de los cuerpos de inclusión similar al de los mutantes *unc-1(vlt10)*, mientras que los mutantes *inx-7(ok2329)* e *inx-6(rr5)* no modificaron el patrón de agregación de poliQs (Tabla 3.3.1). Estos resultados confirman que la función de algunos componentes de la sinapsis eléctrica, tales como SLP neuronales e inexinas, son necesarios para controlar la agregación de proteínas con poliQs, y que, por extensión, algunas sinapsis eléctricas tienen un papel esencial en el

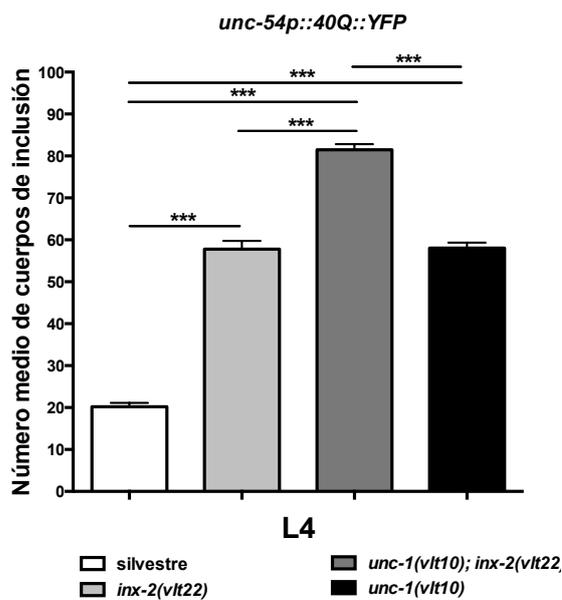
mantenimiento de la homeostasis de proteínas. Prácticamente todas las inexinas evaluadas intervienen en la sinapsis neuronal y/o neuromuscular (Altun et al., 2009), y por tanto, se expresan tanto en neuronas como en células musculares. Esto hacía difícil averiguar en qué células es necesaria su función para evitar un aumento de agregados de poliQs. Puesto que ya sabemos que la función reguladora de UNC-1 es esencialmente neuronal, hipotetizamos que quizás la sinapsis eléctrica, en la que participa UNC-1, es necesaria en algún tipo neuronal exclusivamente. Para averiguar esto, decidimos interferir la función de las inexinas *unc-7* e *inx-2* de forma específica en el sistema nervioso, puesto que estos genes presentan un patrón de expresión neuronal más restringido que *unc-9* (Tabla 3.3.1). Hemos seleccionado *inx-6* como control negativo del estudio, ya que su ausencia no incrementa la agregación de poliQs. En concordancia con los resultados anteriores, el silenciamiento génico de *unc-7(ARNi)* e *inx-2(ARNi)* en el sistema nervioso aumentó la formación de cuerpos de inclusión, a diferencia de *inx-6(ARNi)* que no produjo cambios significativos (Fig. 3.3.7-A). Estos resultados sugieren que parte de la función moduladora de las inexinas *inx-2* y *unc-7* reside en el sistema nervioso y que perturbar la sinapsis eléctrica neuronal a través de estas inexinas, tiene un impacto sobre la dinámica de agregación de poliQs en células musculares. Puesto que *unc-1*, *unc-7* e *inx-2* modulan la agregación de poliQs desde el sistema nervioso, decidimos investigar la interacción genética entre UNC-1 y las inexinas, INX-2 y UNC-7.

Por un lado, los animales *40Q; unc-1(vlt10); inx-2(vlt22)* mostraron un aumento de número de cuerpos de inclusión significativamente superior al simple mutante *unc-1* (Figura 3.3.7-B) que correspondía a un efecto aditivo de ambos alelos. Este patrón genético sugiere que *unc-1* e *inx-2* operan en rutas paralelas para modular la homeostasis de proteínas. Por el contrario, los animales *40Q; unc-1(vlt10); unc-7(e5)* mostraron niveles de agregación similares al simple mutante *unc-1* (Figura 3.3.7-C), lo cual sugiere que ambos genes podrían actuar juntos para regular la agregación de poliQs.

A



B



C

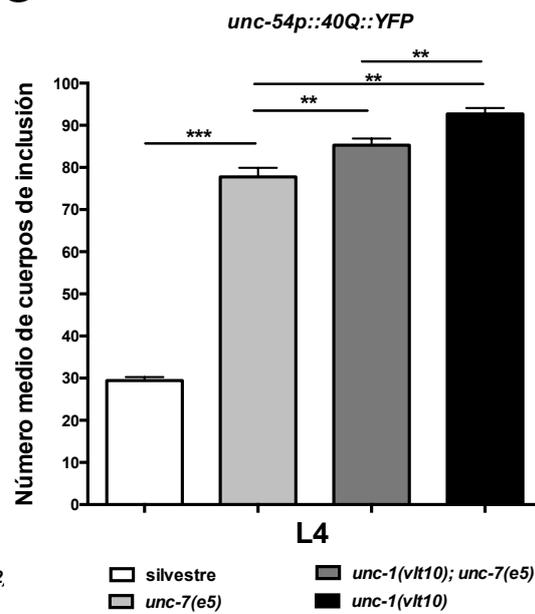


Figura 3.3.7. La perturbación neuronal de componentes de la sinapsis eléctrica potencia la agregación de poliQs en células musculares. (A) El silenciamiento génico, específicamente en sistema nervioso, de las inexinas *inx-2* y *unc-7* aumenta la formación de cuerpos de inclusión de poliQs, en contraste con el silenciamiento de *inx-6*. (B) La supresión de *inx-2* y *unc-1* aumenta el número medio de cuerpos de inclusión por encima de los controles *40Q*. El doble mutante *unc-1(vlt10); inx-2(vlt22)* presenta una mayor agregación que los simples mutantes, lo que sugiere que ambas mutaciones tienen un efecto aditivo, indicativo de que ambos genes operan en rutas paralelas. (C) La disrupción de *unc-7* y *unc-1* aumentan el patrón de agregación de poliQs, mientras que el doble mutante para ambos presenta valores intermedios de agregación de poliQs, lo cual sugiere que *unc-7(e5)* y *unc-1(vlt10)* podrían estar ejerciendo su función en el mismo proceso. Los datos representan la media \pm SEM. (N = 30) por genotipo y/o condición. (N_{EXPERIMENTAL} = 3). ***: p-valor < 0,001; **: p-valor < 0,01; ns: estadísticamente no significativo. Los valores de significación son referidos a la cepa control *40Q; rab-3p::AMP'(ARNi)* (gráfico A). Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

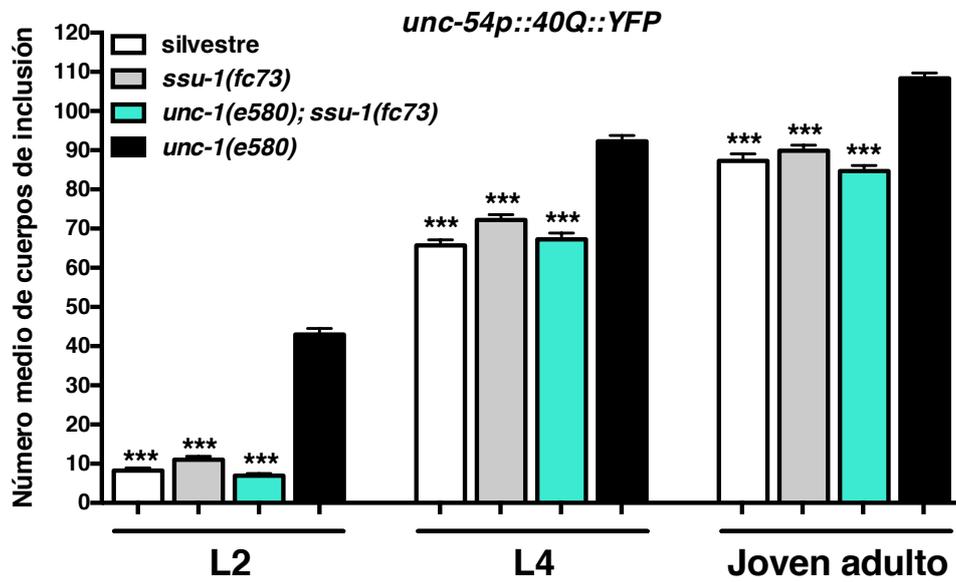
III.6 La supresión de la sulfotransferasa SSU-1 rescata el fenotipo de agregación asociado a *unc-1(vlt10)*

Las alcohol sulfotransferasas son enzimas capaces de adicionar grupos sulfato a una gran variedad de moléculas, como péptidos, hormonas esteroideas (señalización distal) y xenobióticos (detoxificación), entre otros (revisado por Gamage y colaboradores (Gamage et al., 2006)). Respecto a esto, Carroll y colaboradores mostraron que mutaciones en *ssu-1*, un gen que codifica la única alcohol sulfotransferasa citosólica de *C. elegans*, rescataban parcialmente el fenotipo de descoordinación motora de mutantes *unc-1* (Carroll et al., 2006). Además, la supresión de este gen rescataba completamente la función de UNC-1 en relación a la sensibilidad anestésica en *C. elegans* (Carroll et al., 2006). La expresión de SSU-1 en *C. elegans* está restringida a un par de neuronas sensoriales, ASJL y ASJR, las cuales están involucradas en detección de varias sustancias químicas, incluyendo la comida (Carroll et al., 2006). Además, las neuronas ASJ son capaces de liberar hormonas (insulinas y otras), y a través de ellas, inducir la entrada de las larvas L1 en un estadio larvario de resistencia llamado *dauer* (Hu, 2007), cuando las condiciones ambientales no son favorables para la reproducción (Carroll et al., 2006; Hattori et al., 2006; Schackwitz et al., 1996).

Puesto que la pérdida de función de *ssu-1* rescata varios fenotipos mutantes de *unc-1*, hipotetizamos que quizás podría existir una interacción entre ambos genes, en relación a la dinámica de agregación de proteínas con poliQs. Para investigar esto, decidimos verificar la interacción genética entre *unc-1* y *ssu-1* empleando los mutantes disponibles *ssu-1(fc73)* y *unc-1(e580)* (Carroll et al., 2006), en un contexto genético *40Q*. Para ello, introdujimos el transgén *40Q* dentro del

fondo genético de la cepa CW911 que contenía los alelos de pérdida de función, *unc-1(e580)* y *ssu-1(fc73)*.

A



B

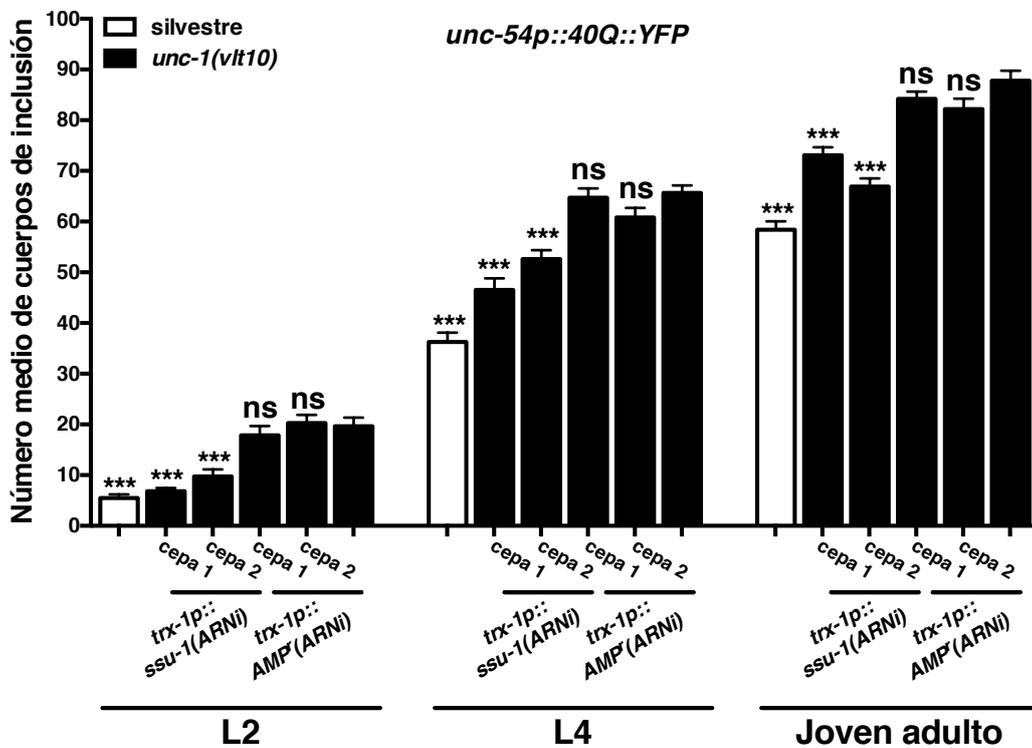


Figura 3.3.8. La disrupción de *ssu-1* reduce el número de cuerpos de inclusión en los mutantes *unc-1*. (A) La supresión total de *ssu-1* (*fc73*) no modifica el patrón de agregación de animales silvestres *40Q*, pero por el contrario, modifica el fenotipo de agregación del simple mutante nulo *unc-1*(*e580*) con fondo genético *40Q*. (B) ARNi contra *ssu-1* en neuronas ASJ reduce significativamente la agregación de poliQs en los mutantes *unc-1*(*vlt10*), en los estadios L2, L4 y joven adulto. Los datos representan la media \pm SEM. (N = 30; gráfico A y B) por genotipo y/o condición. (N_{EXPERIMENTAL} = 3). ***: p-valor < 0,001; ns: estadísticamente no significativo. Los valores de significación son referidos a la cepa mutante *40Q*; *unc-1*(*e580*) (gráfico A) y *40Q*; *unc-1*(*vlt10*) (gráfico B). Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

El análisis de agregación mostró que el simple mutante *ssu-1*(*fc73*) poseía un patrón de agregación similar a los animales *40Q* silvestres (**Figura 3.3.8-A**), mientras que el doble mutante *unc-1*(*e580*); *ssu-1*(*fc73*) mostró un rescate total del fenotipo de agregación, alterado por la mutación *unc-1*(*vlt10*), hasta los niveles de animales *40Q* silvestres (**Figura 3.3.8-A**). Estos resultados sugieren que mutaciones en *ssu-1* suprimen la agregación de poliQs asociada a mutaciones en *unc-1*, y que por tanto, la actividad de *ssu-1* en ASJ es requerida para potenciar la agregación en mutantes *unc-1*. Para confirmar estos resultados, silenciamos la expresión de *ssu-1* específicamente en neuronas ASJ en animales *40Q*; *unc-1*(*vlt10*). González-Barrios y colaboradores describieron la región mínima del promotor del gen *trx-1*, cuya expresión es exclusiva en neuronas ASJ (Gonzalez-Barrios et al., 2015). Por tanto, sintetizamos productos de ADN, mediante PCR de fusión, con la mínima región promotora de *trx-1* fusionada a fragmentos sentido y antisentido del gen *ssu-1* (vea Metodología – PCR Fusión, **Figura 2.12**). Los animales *40Q*; *unc-1*(*vlt10*) fueron inyectados con los productos de fusión *trx-1p::ssu-1*(sentido) y *trx-1p::ssu-1*(antisentido) para inducir la formación de la doble cadena de ARN contra *ssu-1* en neuronas ASJ. Como habíamos hipotetizado, los recuentos de cuerpos de inclusión de las cepas transgénicas resultantes mostraron una clara reducción del número de cuerpos de inclusión con respecto a los animales *40Q*; *unc-1*(*vlt10*) inyectados con la construcción control *trx-1p::AMP^r* (**Figura 3.3.8-B**).

III.7 *unc-1* regula la sinapsis eléctrica entre las neuronas IL2 y ASJ para modular la agregación de poliQs en células musculares

Los resultados anteriores reflejan que existe una clara interacción genética entre *unc-1* y *ssu-1* en un contexto de agregación de poliQs. Estos resultados sugieren que la disfunción de *unc-1* tiene un impacto sobre la funcionalidad neuronal de

ASJ y, por consiguiente, sobre *ssu-1*. Siguiendo con este razonamiento, pensamos que quizás una alteración de la función de ASJ podría estar induciendo un exceso de señal sulfatada, puesto que requiere la actividad de *ssu-1*, que a su vez sería la responsable de desregular la homeostasis de proteínas. Por tanto, decidimos profundizar en esta hipótesis para poder explicar la relación entre ambos genes. Puesto que UNC-1 interviene en la sinapsis eléctrica y modula la agregación de poliQs en células musculares desde el sistema nervioso, investigamos si la falta de función de *unc-1* podría perturbar la sinapsis eléctrica entre ASJ y otras neuronas presinápticas. Recientemente, Cook y colaboradores han publicado una descripción muy detallada del conectoma de *C. elegans* donde muestran todas las conexiones nerviosas, procedentes de sinapsis eléctricas o químicas, en ambos sexos del nematodo (Cook et al., 2019). En relación a la sinapsis eléctrica, muestran que ASJ actúa como neurona postsináptica de las neuronas presinápticas IL2L y PVQR (Cook et al., 2019). Para investigar si *unc-1* participa en la señalización sináptica en estos tipos neuronales, decidimos silenciar su expresión de forma específica en neuronas ASJ, IL2L y PVQR empleando ARNi. A diferencia de ASJ, no hay descritos promotores específicos de neuronas IL2L y PVQR. Sin embargo, Chelur y Chalfie describieron una forma ingeniosa de inducir la expresión de toxinas botulínicas de forma específica en neuronas, mediante complementación de proteínas, empleando promotores que solapan su expresión en un único tipo neuronal (Chelur and Chalfie, 2007). En este trabajo describen, entre otras, combinaciones de promotores que producen expresión específica en neuronas IL2 (IL2L, IL2R, IL2DL, IL2DR, IL2VL, IL2VR) y otra en neuronas PVQ (PVQL, PVQR). Concretamente, la combinación de los promotores de los genes *oig-1* y *osm-3* solapan sus patrones de expresión únicamente en neuronas IL2 (**Figura 3.3.9-A**), mientras que la combinación de *glr-1p* y *gpa-9p* permite la expresión específica en neuronas PVQ (Chelur and Chalfie, 2007). Teniendo esto en cuenta, sintetizamos construcciones por PCR de fusión, combinando cada promotor con un fragmento, sentido o antisentido, de la siguiente manera: *oig-1p::unc-1(sentido)* y *osm-3p::unc-1(antisentido)*; *glr-1p::unc-1(sentido)* y *gpa-9p::unc-1(antisentido)*. De esta forma la doble cadena de ARNs se formaría únicamente en la neurona donde solapan ambos promotores, y el resto de neuronas donde se expresa solamente una hebra (sentido o antisentido) no se verían afectadas, en principio, por el ARNi (**Figura 3.3.9-A**). Para silenciar *unc-1* en neuronas ASJ empleamos la región promotora mínima de *trx-1p* (vea sección Metodología – Fusión por PCR, **Figura 2.12**).

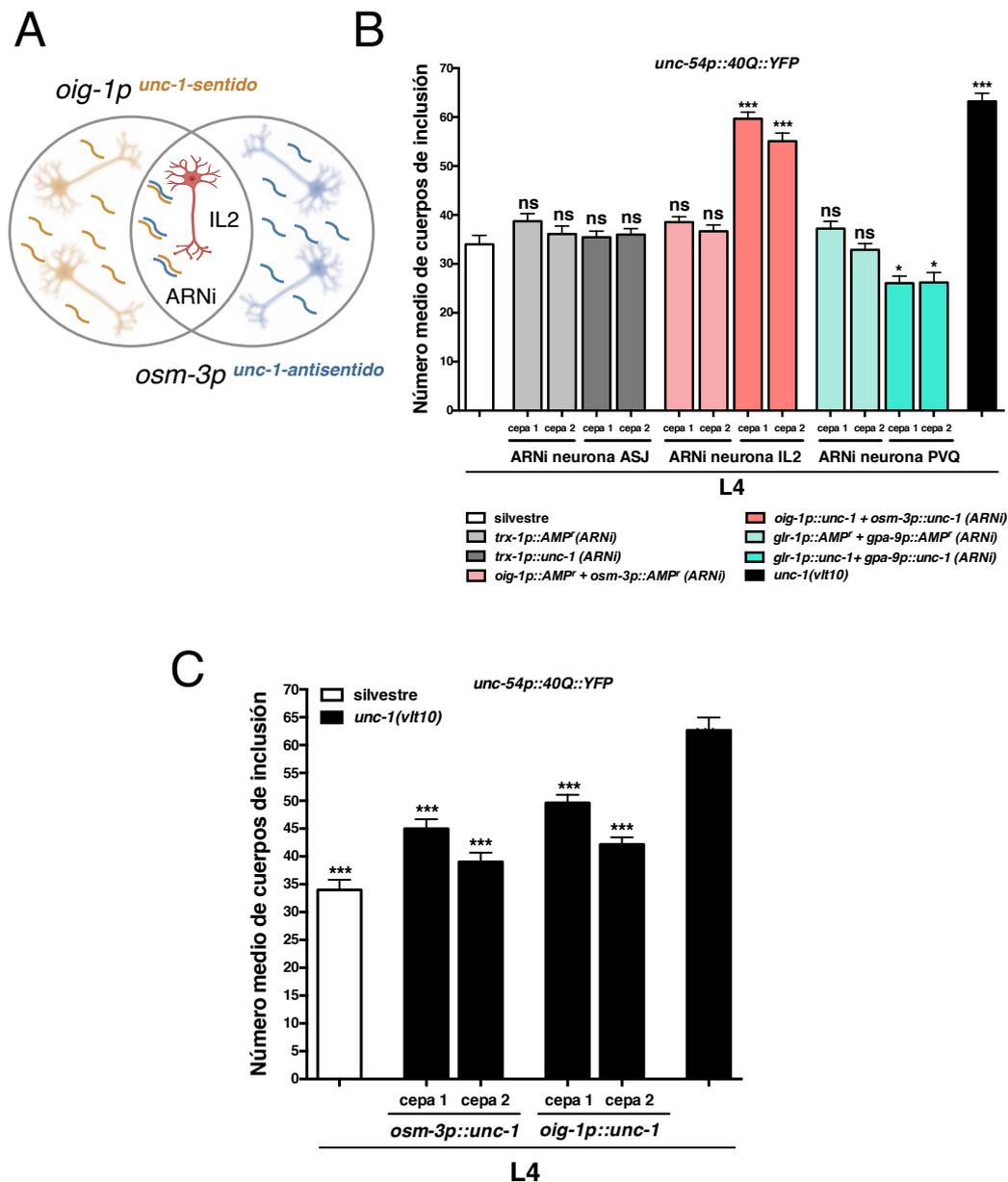


Figura 3.3.9. UNC-1 es requerido en neuronas IL2 para modular la homeostasis de proteínas en células musculares. (A) Diagrama representativo de la estrategia de ARNi específica de neuronas IL2. Ambos genes, *oig-1* y *osm-3p*, se expresan específicamente en IL2, por lo que la expresión simultánea de dos fragmentos de *unc-1* referidos a la cadena sentido y antisentido bajo el control de los promotores de estos genes, *oig-1p* y *osm-3p*, permite silenciar específicamente *unc-1* en IL2, no afectando a otras neuronas. (B) ASJ actúa como neurona postsináptica de neuronas IL2L y PVQR. El silenciamiento específico de *unc-1* en ASJ mediante *trx-1p* no produce cambios en el patrón de agregación de poliQs. En contraste, se observan cambios diferenciales en el fenotipo de agregación de poliQs cuando se silencia este gen en los tipos neuronales IL2 y PVQ. (C) La restauración del ADNc del gen *unc-1* en mutantes *unc-1(vlt10)* bajo el control de los promotores *osm-3p* y *oig-1p*, ambos específicos de neuronas IL2, rescata significativamente el fenotipo de agregación de poliQs del simple mutante *unc-1(vlt10)*. Los datos representan la media \pm SEM. (N = 30; gráfico B y C) por genotipo y/o condición. (N_{EXPERIMENTAL} = 3). ***: p-valor < 0,001; *: p-valor < 0,05; ns: estadísticamente no significativo. Los valores de significación son referidos a la cepa control 40Q (gráfico B) y la cepa mutante 40Q; *unc-1(vlt10)* (gráfico C). Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

El silenciamiento de *unc-1* en neuronas ASJ, no indujo cambios en el patrón de agregación de poliQs de animales L4 40Q en comparación con animales controles 40Q; *trx-1p::AMP^r(ARNi)* (**Figura 3.3.9-B**). En contraste, la disrupción de *unc-1* en neuronas IL2, aumentó significativamente la agregación de poliQs, a niveles comparables al del simple mutante *unc-1(vlt10)* (**Figura 3.3.9-B**). Sorprendentemente, el silenciamiento específico en PVQ, mostró una reducción del número de cuerpos de inclusión (**Figura 3.3.9-B**). Los datos mostrados sugieren que la función de *unc-1* no es necesaria en ASJ, pero es crucial en las neuronas presinápticas IL2. Para confirmar estos datos, restauramos específicamente la función de *unc-1* en animales 40Q; *unc-1(vlt10)*. Para ello, introdujimos el ADNc de *unc-1* bajo el control de los promotores *oig-1p* y *osm-3p*, independientemente. Como esperábamos, animales transgénicos inyectados para ambas construcciones mostraron un rescate significativo parcial del número de cuerpos de inclusión con respecto a mutantes *unc-1(vlt10)* (**Figura 3.3.9-C**).

Estos datos sugieren que *unc-1* modula la agregación de poliQs en células musculares, al menos, desde las neuronas IL2, y que una perturbación de la sinapsis eléctrica en estas neuronas podría tener un impacto sobre la funcionalidad de neuronas postsinápticas como ASJ.

III.8 La actividad de arilsulfatasas modula la dinámica de agregación de poliQs

En base a nuestros resultados, sabemos que la disrupción funcional de *unc-1* podría alterar la sinapsis eléctrica entre las neuronas IL2 y ASJ, desencadenando la producción de una señalización hormonal mediada por SSU-1. La sulfotransferasa SSU-1 cataliza la incorporación de un grupo sulfato a moléculas señalizadoras para otorgarles una mayor solubilidad en medio acuoso y permitir su difusión hacia tejidos distales, tales como el músculo (Gamage et al., 2006). Independientemente de la naturaleza de esta molécula señalizadora, imaginamos que debería desulfatarse antes de unirse a su receptor. Esta reacción química la llevan a cabo las sulfatasas (revisado por Mueller y colaboradores (Mueller et al., 2015)). El genoma de *C. elegans* contiene solamente tres sulfatasas que son codificadas por los genes *sul-1*, *sul-2* y *sul-3* (Sardiello et al., 2005). *sul-1* codifica una proteína con alta similitud a una 6-O-endosulfatasa de mamíferos (www.wormbase.org; **Figura 3.3.10-A**), mientras que

Capítulo III

sul-2 y *sul-3* codifican enzimas muy cercanas evolutivamente a la familia de las arilsulfatasas (www.wormbase.org; **Figura 3.3.10-A**). Por tanto, si las sulfatasas son necesarias para que un posible exceso de esta señal actúe como un potenciador de la agregación de poliQs, nos preguntábamos si eliminar la función de alguna de estas enzimas podría fenocopiar la ausencia de *ssu-1* en un fondo genético mutante *unc-1(vlt10)*. Esto ocurría puesto que, si la hormona mantiene el grupo sulfato, es incapaz de unirse a su receptor.

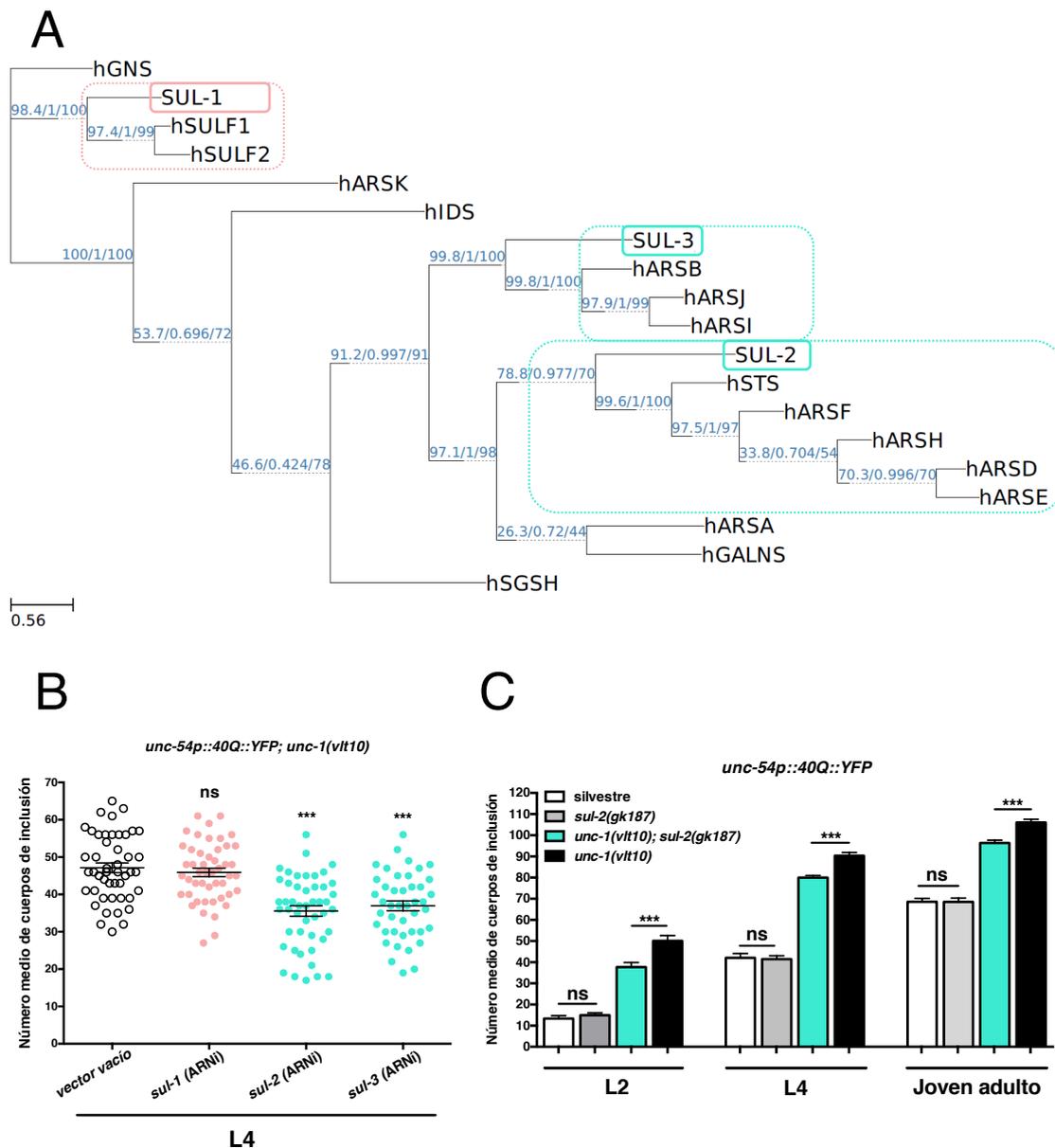


Figura 3.3.10. La actividad de las arilsulfatasas, *sul-2* y *sul-3*, modula la dinámica de agregación de poliQs. (A) Se muestra el diagrama muestra el árbol filogenético, obtenido por nosotros empleando los herramientas MUSCLE (Edgar, 2004) y IQ-TREE versión 1.6.8 (Chernomor et al., 2016; Li, 2011; Nguyen et

al., 2015), de todas las sulfatasas de *C. elegans*, *sul-1*, *sul-2* y *sul-3* y su localización en las ramas junto a las sulfatasas más parecidas del genoma humano. En el árbol filogenético se muestran los valores de *bootstrap* referidos a los valores de confianza que se obtienen para denotar la veracidad de un nodo (cuanto más próximo a 100 más real es un nodo que conecta dos proteínas). Estos análisis muestran que SUL-2 y SUL-3 son arilsulfatasas, donde SUL-2 está más próxima a hSTS (sulfatasa humana), mientras que SUL-1 es una endosulfatasa próxima a hSULF1 y hSULF2. **(B)** Gráfica que representa los niveles de agregación de poliQs después del silenciamiento ubicuo de las diferentes sulfatasas de *C. elegans* en el simple mutante *unc-1(vlt10)*. El ARNi inducido con HT115 de *sul-2* y *sul-3*, pero no *sul-1*, reduce el patrón de agregación de poliQs de animales *40Q; unc-1(vlt10)* comparado con animales incubados con el vector pL4440 vacío. **(C)** La disrupción de *sul-2* mediante el alelo de pérdida de función, *gk187*, en animales *unc-1(vlt10)*, reduce parcialmente el número medio de cuerpos de inclusión en los estadios L2, L4 y joven adulto, mientras que el simple mutante *40Q; sul-2(gk187)* no muestra cambios en el fenotipo en ningún estadio. Los datos representan la media \pm SEM. (N > 40; gráfico B) (N = 30; gráfico C) por genotipo y/o condición. (N_{EXPERIMENTAL} = 3). ***: p-valor < 0,001; ns: estadísticamente no significativo. Los valores de significación son referidos a la cepa mutante *40Q; unc-1(vlt10)*; ARNi-pL4440 (gráfico B). Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

Por tanto, para identificar cuál de estas sulfatasas estaba implicada en el proceso de señalización hormonal, silenciamos mediante ARNi la función de todas ellas en animales *40Q; unc-1(vlt10)*. El análisis de estos datos muestra que únicamente la reducción de la expresión de las arilsulfatasas, *sul-2* y *sul-3*, produce una disminución de agregación respecto a los animales *40Q; unc-1(vlt10)* (**Figura 3.3.10-B**). Para confirmar estos datos, realizamos un estudio de interacción genética entre el único mutante disponible en el repositorio CGC, *sul-2(gk187)*, y *unc-1(vlt10)*. Tal como esperábamos, la supresión funcional de *sul-2* modificó el fenotipo de agregación de mutantes *unc-1(vlt10)* significativamente (**Figura 3.3.10-C**). Sin embargo, esta reducción fue parcial, muy probablemente debida a una compensación funcional asociada a *sul-3*. Todos estos resultados, indican que las arilsulfatasas, *sul-2* y *sul-3*, pero no *sul-1*, catalizan la pérdida de sulfato del exceso hormonal asociado a *unc-1(vlt10)*, y por tanto, participan en la modulación de la agregación de poliQs en este contexto de toxicidad.

III.9 El receptor nuclear DAF-12 modula la homeostasis de proteínas

A pesar de que no hay evidencias, que sepamos, de que los ácidos dafacrónicos podrían ser sustrato y/o producto de sulfotransferasas y sulfatasas, decidimos investigar si la señal hormonal producida desde ASJ por *ssu-1*, responsable del fenotipo de agregación *unc-1(vlt10)*, podrían ser los ácidos dafacrónicos. Estas hormonas esteroideas actúan como ligandos del receptor nuclear de hormonas

esteroideas DAF-12 (Antebi et al., 2000; Gerisch et al., 2007). El receptor DAF-12 promueve una señalización hormonal con efectos opuestos en longevidad dependiendo del contexto genético y metabólico de los animales (Fisher and Lithgow, 2006; Gerisch et al., 2007). Como la inserción del transgén que induce la expresión de 40Q está muy cerca de la región genómica del cromosoma X donde se localiza *daf-12* (vea Metodología – CRISPR/Cas9, **Figura 2.9-A**), es extremadamente complicado introducir el alelo mutante de *daf-12* en ese fondo genético. Por tanto, en un primer momento, generamos una delección pequeña, *vlt19*, cerca del extremo 3' del gen *daf-12* que afectaba al dominio de unión al ligando (LBD) situado en la zona C-terminal de la proteína (vea Metodología – CRISPR/Cas9, **Figura 2.10-C**). Curiosamente, observamos que la interacción genética entre mutantes *daf-12* y *unc-1* produjo letalidad, impidiendo analizar el fenotipo del doble mutante. Contrariamente a lo que creíamos, los animales 40Q; *daf-12(vlt19)* mostraron un patrón de agregación incrementado con respecto a los animales silvestres 40Q, en los estadios L2, L4 y joven adulto (**Figura 3.3.11-A**). Esto sugiere que la señalización mediada por DAF-12 es protectora en un contexto de agregación por poliQs en células musculares.

DAF-12 regula la expresión de diferentes genes dependiendo de la presencia o ausencia de su ligando, los ácidos dafacrónicos. Por tanto, los experimentos de arriba solo nos sugieren que este factor de transcripción modula la agregación de poliQs, pero no nos informa sobre si la señal hormonal estaba implicada. Para investigar si la señalización mediada por ácido dafacrónico estaba implicada, bloqueamos la síntesis de esta hormona inhibiendo algunos de los genes clave de la ruta de biosíntesis, *daf-36* y *daf-9* (Dumas et al., 2013). La oxigenasa Rieske DAF-36/*Neverland* (*Nvd*) interviene en el primer paso de la ruta de biosíntesis de los ácidos dafacrónicos para metabolizar el colesterol a 7-dehidrocolesterol (Yoshiyama-Yanagawa et al., 2011). Para analizar la pérdida de función de *daf-36*, introdujimos un alelo mutante de pérdida de función, *k114*, en animales 40Q. Inesperadamente, observamos que la supresión de *daf-36* produjo una alta letalidad en un fondo genético 40Q que dificultaba su análisis (datos no mostrados). Por tanto, decidimos rescatar la función de *daf-36*, mediante la introducción de una construcción que contenía el locus *daf-36* completo (región genómica reguladora y codificante) sobre los animales 40Q; *daf-36(k114)* que pudimos rescatar. Como hemos explicado en otras secciones de este trabajo (vea Resultados – Capítulo I, página 92), la formación de transgénicos se produce a través de arrays de ADN, que se heredan de forma no mendeliana, y

por tanto las cepas que los contienen producen una considerable cantidad de animales sin la construcción de rescate (de ahora en adelante *daf-36p::daf-36*).

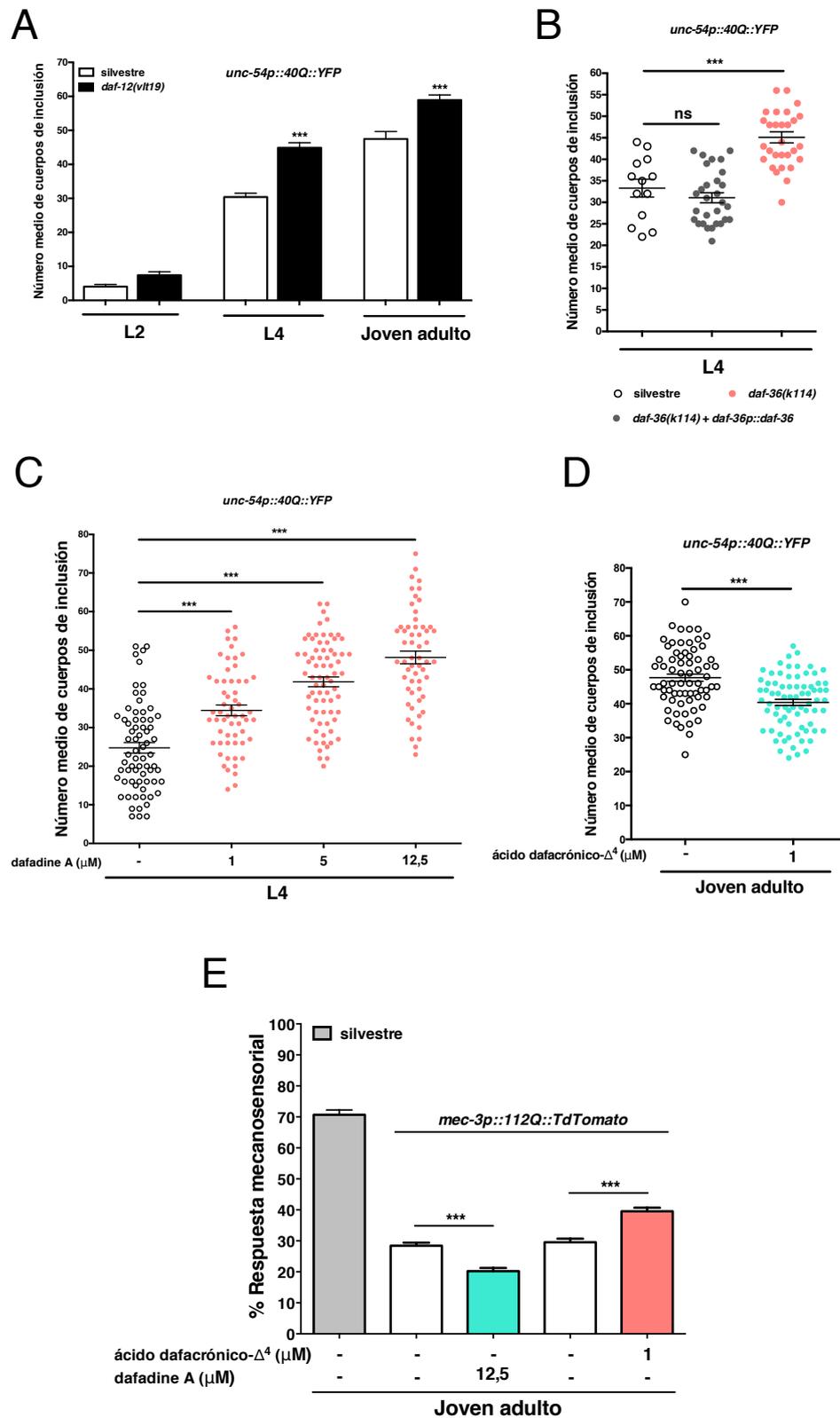


Figura 3.3.11. La activación del receptor de hormonas esteroideas DAF-12 reduce la agregación de poliQs e induce neuroprotección. (A) Los animales *daf-12(vlt19)* muestran un patrón de agregación de

poliQs superior a los animales silvestres *40Q*. El cambio alélico *vlt19* contiene una delección de aproximadamente 500 pb que ocasiona la pérdida parcial del dominio de unión al ligando (ácidos dafacrónicos) (vea figura 2.10-C). **(B)** La supresión de *daf-36*, implicado en la biosíntesis de ácidos dafacrónicos, incrementa la formación de cuerpos de inclusión en animales L4 *40Q*. **(C)** El bloqueo de *daf-9*, mediante el compuesto químico dafadine A, muestra un aumento progresivo del número medio de cuerpos de inclusión en animales L4 *40Q* dependiente de la dosis. **(D)** El tratamiento de animales *40Q* con ácido dafacrónico- Δ^4 reduce significativamente el número medio de cuerpos de inclusión en animales jóvenes adultos. **(E)** La supresión de *daf-9* con dafadine A reduce la respuesta mecanosensorial en animales *112Q::TdTomato* con respecto a animales tratados con el vehículo (DMSO). Los animales *112Q::TdTomato* tratados con ácido dafacrónico- Δ^4 muestran niveles de respuesta mecanosensorial superiores a los animales tratados con el vehículo (etanol). Los datos representan la media \pm SEM. (N = 30, gráfico A y B); (N > 55; gráfico C); (N > 65; gráfico D); (N > 40; gráfico E) por genotipo y/o condición. N_{EXPERIMENTAL} = 3. ***: p-valor < 0,001; ns: estadísticamente no significativo. Los valores de significación son referidos a la cepa control *40Q* de cada estadio (gráfico A). Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey (gráfico A, B, C y E). Test estadístico t-test con prueba no paramétrica de Mann-Whitney (gráfico D).

Estos animales permitieron evaluar el efecto asociado a la pérdida funcional de *daf-36* sobre la dinámica de agregación. Con respecto a este ensayo, y como era esperable, los animales *40Q; daf-36(k114)* mostraron un aumento de cuerpos de inclusión significativo respecto a ambos controles, *40Q* y *40Q; daf-36(k114) + daf-36p::daf-36* (**Figura 3.3.11-B**).

Por otro lado, DAF-9/Citocromo P450 es la última enzima que interviene en la ruta de biosíntesis de los ácidos dafacrónicos del tipo Δ^4 y Δ^7 (Jia et al., 2002). Para investigar la pérdida de función de *daf-9*, tratamos a los animales con un compuesto químico, dafadine A, que inhibe la actividad enzimática de DAF-9 y que por tanto, fenocopia alelos de pérdida de función para este gen (Luciani et al., 2011). En base a la literatura, evaluamos el efecto de diferentes concentraciones de dafadine A (1, 5 y 12,5 μ M) en animales *40Q*. Los animales *40Q* jóvenes adultos tratados mostraron un aumento de cuerpos de inclusión dependiente de la dosis de dafadine A (**Figura 3.3.11-C**). Estos resultados en su conjunto sugieren que el bloqueo de la ruta de biosíntesis de los ácidos dafacrónicos y, por consiguiente, la disrupción de la señalización mediada por esta hormona, incrementa la agregación de poliQs en células musculares. Para confirmar estos datos, investigamos el efecto de adicionar exógenamente uno de los ácidos dafacrónicos, Δ^4 , y evaluar el fenotipo de animales *40Q*. En concordancia con nuestros resultados, el tratamiento de animales con el ácido dafacrónico- Δ^4 1 μ M redujo la agregación de poliQs, evidenciando su efecto protector (**Figura 3.3.11-D**). En base a estos resultados evaluamos el efecto del tratamiento con dafadine A 12,5 μ M y ácido dafacrónico- Δ^4 1 μ M sobre el modelo de toxicidad

de poliQs neuronal, *112Q::TdTomato*. Como esperábamos, el tratamiento con dafadine A disminuyó la respuesta mecanosensorial, a diferencia del tratamiento con ácido dafacrónico- Δ^4 que indujo una mejora en la funcionalidad neuronal (**Figura 3.3.11-E**). Estos datos sugieren que la señalización mediada por ácido dafacrónico no solamente modula la dinámica de agregación de poliQs en células musculares, sino que además, es neuroprotectora como ya habían sugerido otros autores para otros neuroesteroides (Farina et al., 2017).

III.10 El receptor nuclear NHR-1 modula la homeostasis de proteínas

Nuestros resultados sugieren que la señalización mediada por el receptor nuclear DAF-12 es necesaria para mantener la homeostasis de proteínas. Sin embargo, la hormona que se produce en las neuronas ASJ, desconocida hasta el momento, aumenta la agregación de proteínas a través de algún efector que no puede ser DAF-12. Recientemente, Burton y colaboradores han mostrado que la sulfotransferasa SSU-1 interviene en la señalización neurohormonal a través del receptor nuclear NHR-1 para regular el estrés osmótico que antagoniza la vía de señalización mediada por insulina (Burton et al., 2018). Por tanto, decidimos evaluar la interacción genética entre *unc-1* y *nhr-1* en un contexto *40Q*. Al igual que *daf-12*, *nhr-1* está situado muy cerca del transgén *40Q* (vea sección Metodología **Figura 2.9-A**). Por tanto, decidimos emplear el sistema de edición génica CRISPR/Cas9, para editar el gen *nhr-1* y producir un alelo idéntico al descrito por Burton y colaboradores, *n6242*, en animales *40Q*; *unc-1(vlt10)* (vea sección Metodología – Sistema CRISPR/Cas9, **Figura 2.9-B**). Debido al proceso de edición, la lesión resultante, *vlt16*, no es exactamente igual al alelo descrito por estos autores, aunque codifica una proteína con el mismo cambio de aminoácido. Adicionalmente, aislamos y caracterizamos un nuevo alelo de *nhr-1*, *vlt15*, obtenido mediante un fenómeno de recombinación homóloga anómala (vea sección Metodología – Sistema CRISPR/Cas9, **Figura 2.9-C y D**). El alelo *vlt16* emula el cambio *n6242*, mientras que el alelo *vlt15* codifica un codón prematuro de parada aguas abajo del cambio *n6242*, que produce una proteína con pérdida funcional potencialmente (vea sección Metodología – Sistema CRISPR/Cas9, **Figura 2.9-C y D**). Ambos alelos, *vlt15* y *vlt16*, rescataron el efecto tóxico de *vlt10*, observándose una reducción significativa en el número de cuerpos de inclusión en los dobles mutantes (**Figura 3.3.12-A**).

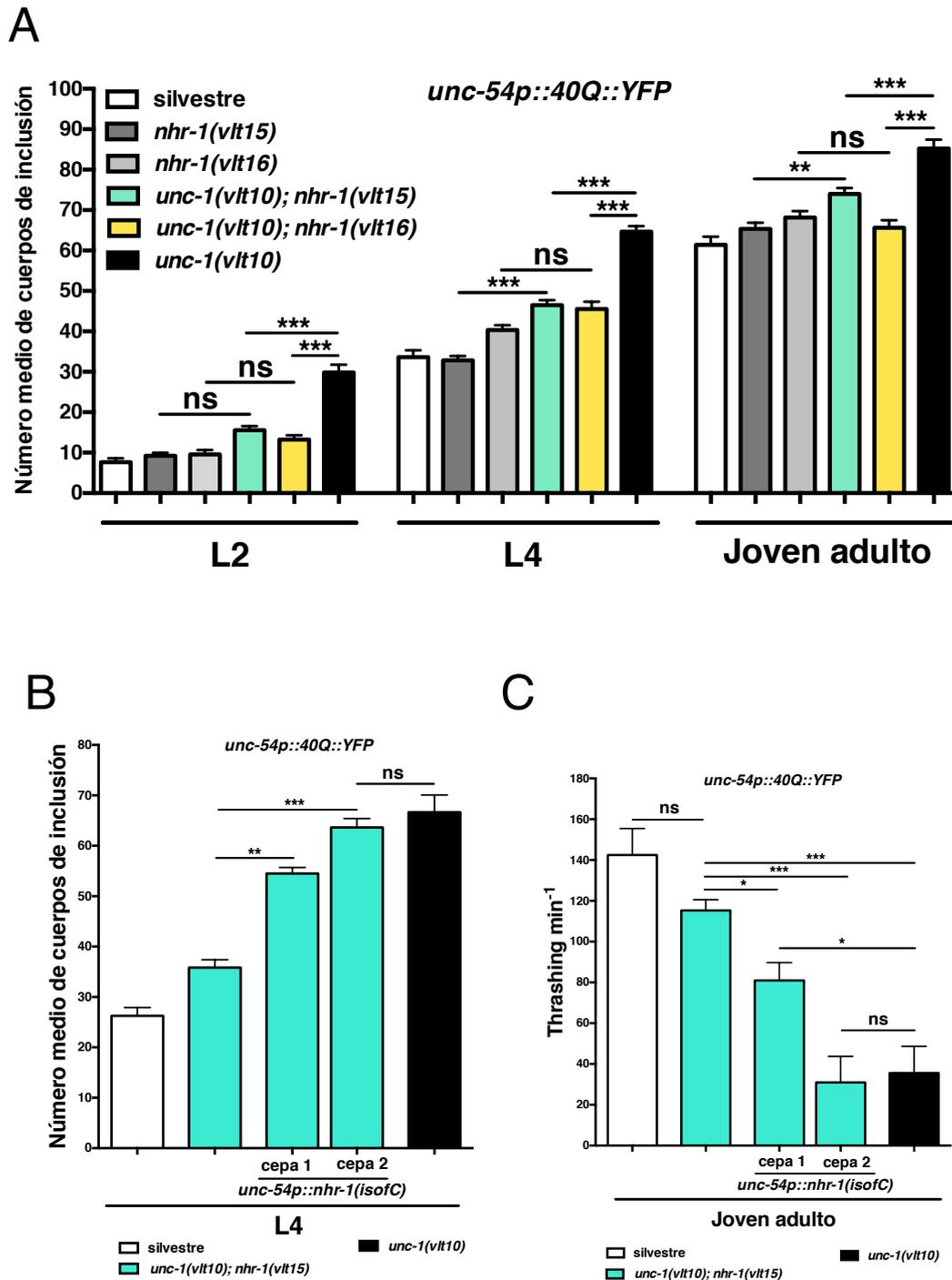


Figura 3.3.12. El receptor nuclear NHR-1 modula la homeostasis de proteínas en células musculares. (A) La pérdida de función de *nhr-1* promovida por *vlt15* y *vlt16* reduce drásticamente la agregación de poliQs en animales *unc-1(vlt10)*. La disrupción de *nhr-1* en un fondo genético *40Q* no muestra cambios significativos en el patrón de agregación de poliQs. *vlt15* fenocopia al alelo *vlt16*, lo cual sugiere que ambos alelos inducen una pérdida de función de NHR-1. (B) La expresión de la isoforma C de *nhr-1* mediante la restauración con el ADNc en células musculares incrementa la agregación de poliQs en el doble mutante *unc-1(vlt10); nhr-1(vlt15)*, indicando que *nhr-1* modula la agregación de poliQ de manera autónoma en este tejido. (C) *unc-1(vlt10)* induce una descoordinación motora reflejada en la capacidad de motilidad de los animales evaluada mediante el número de *thrases*/min. La presencia de *nhr-1(vlt15)* en un fondo genético mutante *unc-1(vlt10)*, rescata el

fenotipo de movilidad de animales jóvenes adultos significativamente. La restauración de la isoforma C de *nhr-1* en el músculo agrava el defecto motor y lo aproxima al observado para el simple mutante *unc-1(vlt10)*. Los datos representan la media \pm SEM. (N = 30, gráfico A y B); (N > 20; gráfico C) por genotipo y/o condición. N_{EXPERIMENTAL} = 3. ***: p-valor < 0,001; **: p-valor < 0,01; *: p-valor < 0,05; ns: estadísticamente no significativo. Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

Estos datos confirman que *nhr-1* modula la dinámica de agregación muscular en los mutantes *unc-1* y su supresión restaura el fenotipo de agregación prácticamente a los niveles basales de animales 40Q silvestres. Los resultados sugieren que NHR-1 podría ser un efector de la señal producida por SSU-1 en neuronas ASJ. Para averiguar si NHR-1 modula la agregación de poliQs en células musculares, restauramos la función de *nhr-1* mediante un vector que dirige la expresión de una de las isoformas, R09G11.2c, bajo el control del promotor del gen *unc-54* (Burton et al., 2018). Los animales 40Q; *unc-1(vlt10)*; *nhr-1(vlt15)* rescatados mostraron un aumento sustancial de cuerpos de inclusión que parcialmente restauraban el fenotipo de agregación observado en el simple mutante *unc-1* (**Figura 3.3.12-B**). Estos datos sugieren que NHR-1 es requerido, al menos, en células musculares para modular la homeostasis de proteínas de poliQs.

Carroll y colaboradores mostraron que la disrupción de la señalización hormonal por *ssu-1* rescataba el fenotipo de descoordinación motora asociado a mutaciones en *unc-1* (Carroll et al., 2006). De acuerdo con estos datos, cuando bloqueamos *nhr-1*, en animales 40Q; *unc-1(vlt10)* también observamos un rescate motor con respecto al simple mutante 40Q; *unc-1(vlt10)* (**Figura 3.3.12-C**). En contraposición, la restauración de *nhr-1* en células musculares, mostró una disminución de la capacidad motora con respecto al doble mutante *unc-1(vlt10)*; *nhr-1(vlt15)* (**Figura 3.3.12-C**). Como hemos comentado, UNC-1 parece regular la producción de una señal hormonal que impacta sobre la homeostasis de proteínas. Sin embargo, también es responsable de la regulación de la sinapsis eléctrica que controla el movimiento. Para confirmar que el rescate motor observado está asociado a una modulación de la dinámica de agregación y no a una mejora de la actividad sináptica en el mutante *unc-1*, decidimos investigar si la reducción de cuerpos de inclusión va ligada a una mayor motilidad de los animales 40Q y 40Q; *unc-1(vlt10)*. En el capítulo anterior hemos mostrado que el tratamiento con activadores de AMPK no solamente reduce la agregación de poliQs, sino que además, mejora la funcionalidad de las células musculares de los animales. Por tanto, para este abordaje hemos tratado a los

animales *40Q* y *40Q*; *unc-1(vlt10)* con metformina 2000 μM y hemos evaluado simultáneamente el patrón de agregación y la capacidad de motilidad de los animales tratados. Como esperábamos, el tratamiento con metformina 2000 μM mostró una reducción de cuerpos de inclusión en animales silvestres y en mutantes *unc-1(vlt10)* (**Figura 3.3.13-A**), siendo incluso más significativa para los mutantes *unc-1(vlt10)*.

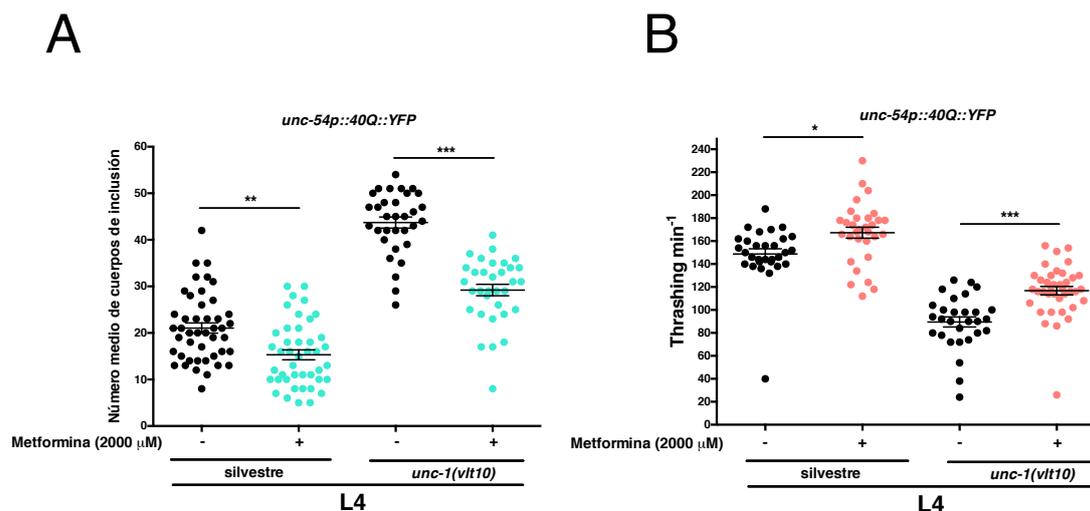


Figura 3.3.13. El tratamiento con metformina reduce el patrón de agregación y mejora la capacidad motora en animales *unc-1(vlt10)*. (A) El tratamiento con metformina 2000 μM reduce la formación de cuerpos de inclusión de poliQs en animales L4 silvestres y mutantes *unc-1(vlt10)*. (B) El análisis de motilidad de animales L4 (*40Q* y *40Q*; *unc-1(vlt10)*) tratados con metformina 2000 μM muestra un aumento de la capacidad motora de los animales tratados con respecto a los animales no tratados. El análisis de recuentos de cuerpos de inclusión de poliQs y *thrashes*/min se ha realizado considerando el mismo individuo para la medida de ambos fenotipos. Los datos representan la media \pm SEM. ($N > 30$; gráfico A y B) por genotipo y/o condición. ($N_{\text{EXPERIMENTAL}} = 3$). ***: p-valor $< 0,001$; **: p-valor $< 0,01$; *: p-valor $< 0,05$. Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

De manera interesante, animales mutantes tratados no solamente mostraron un patrón de agregación reducido, sino que además su capacidad motora era mejor que en aquellos no tratados (**Figura 3.3.13-B**). Estos datos refuerzan los resultados anteriores, con los que podemos asociar que la mejora de la capacidad motora del doble mutante *unc-1(vlt10)*; *nhr-1(vlt15)* no es debida a una mejora de actividad neuronal de los animales sino que está asociada directamente a una reducción de la agregación de poliQs y por tanto, a una mejor actividad funcional de las células musculares. Estos datos en conjunto

refuerzan el papel modulador de *nhr-1* sobre la dinámica de agregación de poliQs.

III.11 NHR-1 reduce el estrés asociado a mutaciones en *unc-1*

El desbalance de la proteostasis en animales *unc-1(vlt10)* es posible que esté alterando la actividad de rutas de respuesta de proteínas mal plegadas (del inglés UPR; *unfolded protein response*). Para confirmarlo, introdujimos la mutación *vlt10* en una cepa que expresa un reportero de estrés en el retículo endoplasmático, *hsp-4::GFP* (Calfon et al., 2002; Taylor and Dillin, 2013), y analizamos los niveles de expresión del marcador de estrés. En presencia de estrés en el retículo endoplasmático, se induce la expresión de la chaperona HSP-4/ hsp70 BiP, que activa la vía de señalización dependiente de IRE-1 (Calfon et al., 2002). Para evaluar si *unc-1(vlt10)* potencia el estrés en el retículo endoplasmático, indujimos un estrés exógeno en los animales mediante una dosis baja de tunicamicina (1 $\mu\text{g/mL}$) y cuantificamos los niveles de estrés mediante la medición de niveles de fluorescencia del reportero en animales silvestres y mutantes *unc-1(vlt10)*. En presencia de estrés inducido con tunicamicina, observamos que *unc-1(vlt10)* potenció la expresión del reportero *hsp-4::GFP* (**Figura 3.3.14-A, B**). Estos resultados sugieren que mutaciones en *unc-1* llevan asociado un estrés en el retículo endoplasmático, y posiblemente también en otras partes. Considerando estos resultados, nos propusimos evaluar la expresión de algunos genes que participan en las vías de activación/regulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático (UPR^{RE}), mitocondria (UPR^{mt}) y citosol (HSR, del inglés *heat shock response*) en animales *unc-1(vlt10)* y *nhr-1(vlt15)* en un contexto de poliQs. La expresión de genes de UPR^{mt} (*atfs-1*), UPR^{RE} (*rtcb-1*, *ire-1*, *atf-6*, *hsp-3*) y HSR (*hsp-70*, *hsp-16.41*) estaba aumentada en mutantes *unc-1(vlt10)* con respecto a animales silvestres 40Q (**Figura 3.3.14-C**). Estos resultados confirman que la desregulación de la homeostasis de proteínas en animales *unc-1(vlt10)* aumenta la expresión de genes de respuesta a estrés relacionados con proteínas mal plegadas, no solamente en el retículo endoplasmático sino también a nivel mitocondrial y citosólico.

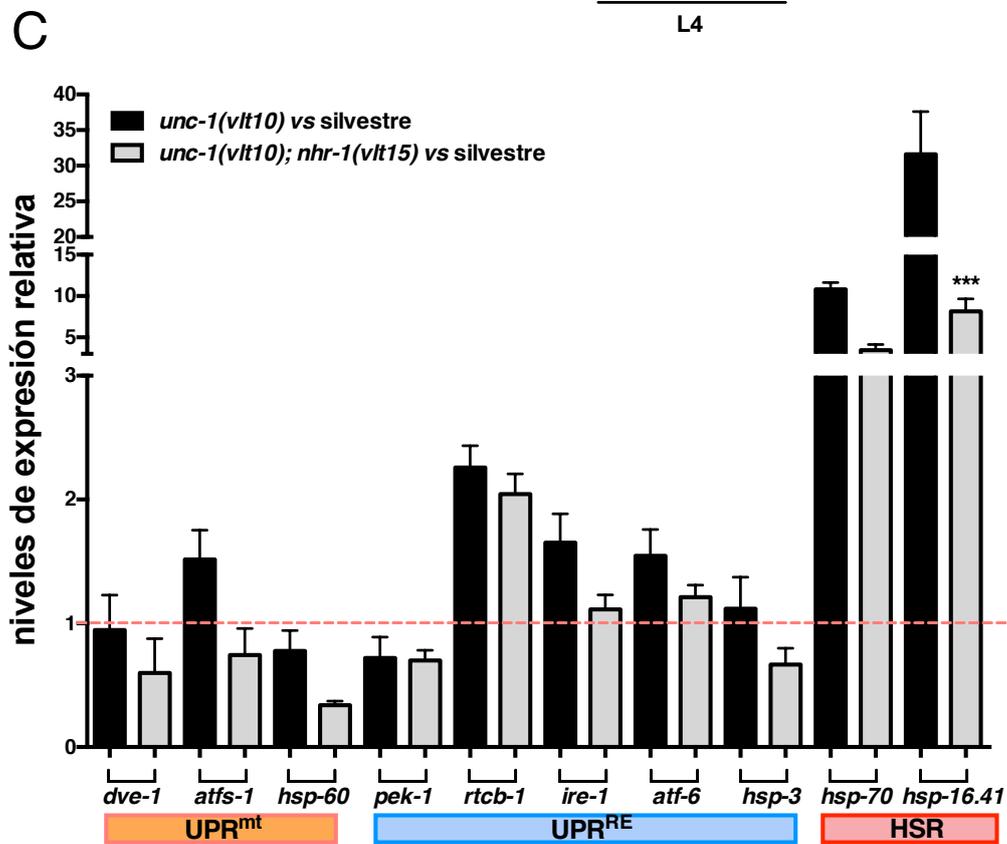
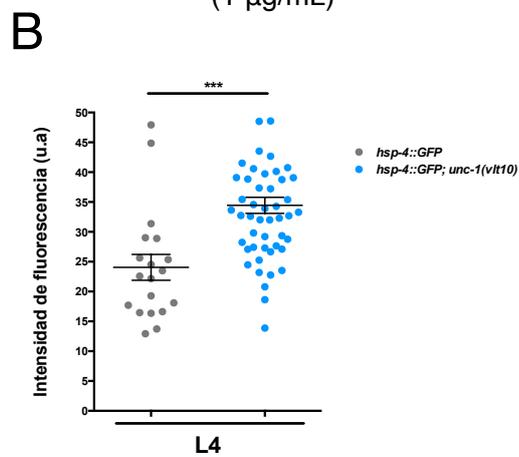
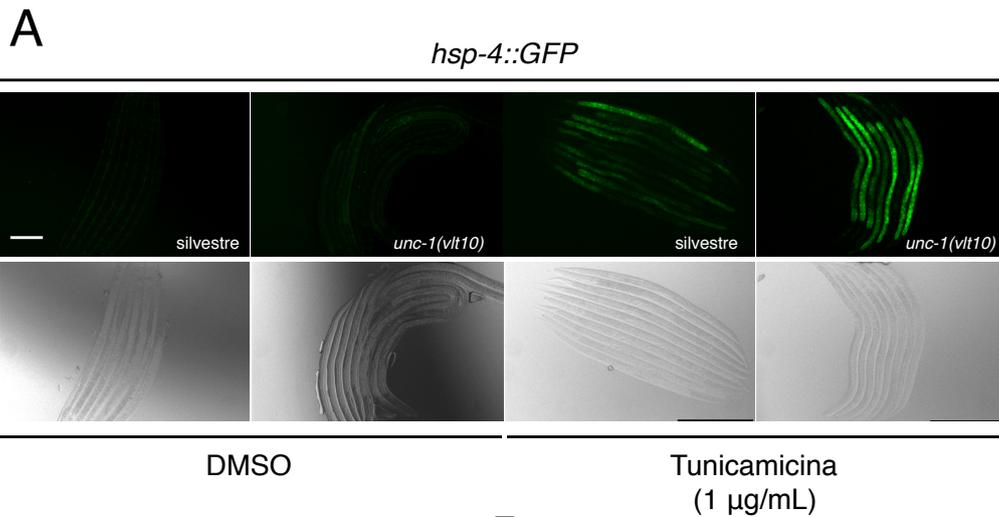


Figura 3.3.14. La supresión de NHR-1 reduce el estrés en el retículo endoplasmático inducido por *unc-1(vlt10)*. (A) Imágenes representativas de animales silvestres N2 y mutantes *unc-1* que expresan el reportero *hsp-4::GFP* en condiciones basales e inducidas de estrés en el retículo endoplasmático mediante tunicamicina (1 μ g/mL). Los animales no tratados con tunicamicina muestran expresión débil del reportero *hsp-4::GFP* con diferencias sutiles (no cuantificadas). El simple mutante *unc-1(vlt10)* tratado con tunicamicina induce una mayor expresión del reportero que animales silvestres N2 tratados. (B) *vlt10* induce un estrés en el retículo endoplasmático reflejado en un aumento significativo de los niveles de expresión del reportero *hsp-4::GFP*. (C) *unc-1(vlt10)* potencia la expresión de algunos genes de estrés de respuesta a proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático (UPR^{RE}), mitocondria (UPR^{mt}) y citosol (HSR) con respecto a animales silvestres *40Q*. La supresión de *nhr-1* en un fondo genético mutante *unc-1(vlt10)* reduce la expresión de genes de estrés que participan en las vías de respuesta UPR y HSR. Los datos han sido normalizados con un control endógeno, *pmp-3*, y relativizados con la cepa silvestre *40Q* en ambos casos. Los datos representan la media \pm SEM. (N > 20; gráfico B). (N_{EXPERIMENTAL} = 3). ***: p-valor < 0,001. Test estadístico t-test con prueba no paramétrica de Mann-Whitney (gráfico B). Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey (gráfico C). Barra escala: 100 μ m.

Considerando que la disrupción de *nhr-1* reduce la formación de agregados de poliQs en los mutantes *unc-1*, pensamos que indirectamente podría reducir, a su vez, el estrés asociado a proteínas mal plegadas. Para confirmarlo, analizamos los niveles de expresión de los mismos genes de respuesta a estrés en el doble mutante *unc-1(vlt10); nhr-1(vlt15)* y normalizamos los datos con respecto a los controles *40Q*. Como suponíamos, la pérdida de función de *nhr-1* redujo los niveles de expresión de genes UPR^{mt} (*atfs-1*), UPR^{RE} (*ire-1*, *atf-6*, *hsp-3*) y HSR (*hsp-70*, *hsp-16.41*) en el doble mutante, los cuales estaban alterados en el simple mutante *unc-1(vlt10)* (Figura 3.3.14-C). Estos resultados sostienen que la pérdida de función de *nhr-1* modula la dinámica de agregación y además, reduce el estrés asociado a proteínas mal plegadas en los mutantes *unc-1(vlt10)*.

III.12 NHR-1 y DAF-12 modulan la homeostasis de proteínas de forma opuesta

Nuestros resultados señalan que diferentes rutas de señalización por hormonas esteroideas mediadas por DAF-12 y NHR-1 modulan de forma opuesta la agregación de poliQs. Por un lado, la activación del receptor nuclear DAF-12 mediante ácidos dafacrónicos promueve el mantenimiento de la homeostasis de proteínas con poliQs, mientras que NHR-1, en un contexto de exceso de señal hormonal, induce un desequilibrio de la homeostasis de proteínas. Sin embargo, no sabemos si NHR-1 y DAF-12 modulan la homeostasis de proteínas paralelamente o convergen dentro de una misma ruta de señalización. Por tanto, generamos el doble mutante para ambos genes, *nhr-1* y *daf-12*, y en

combinación con *unc-1(vlt10)* para estudiar su efecto sobre un contexto de toxicidad por poliQs muscular.

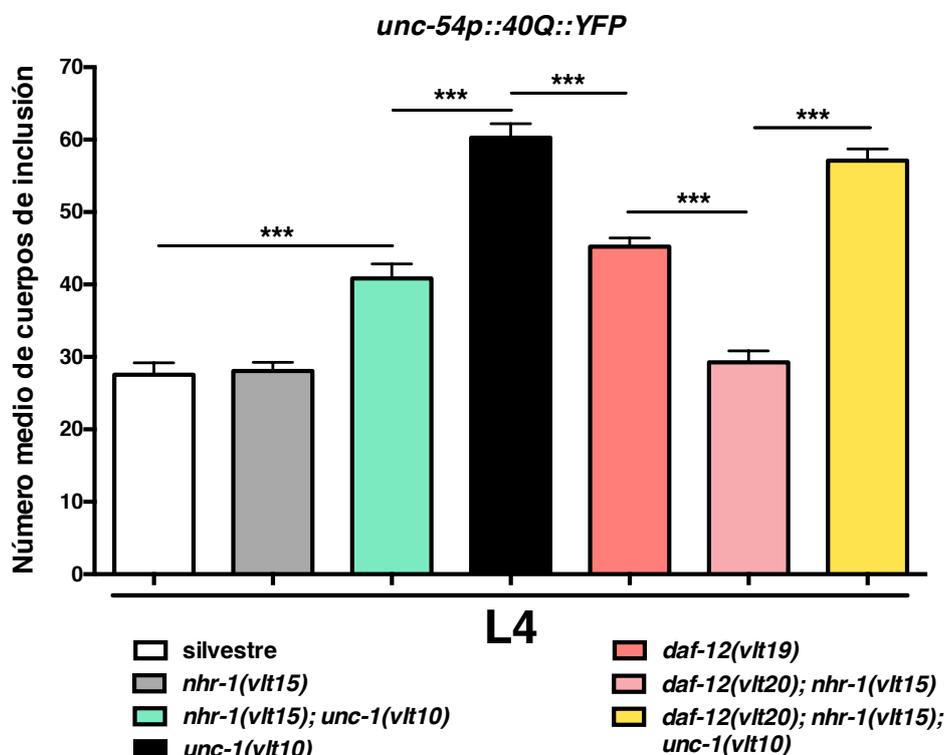


Figura 3.3.15. NHR-1 es epistático sobre DAF-12. La supresión de *daf-12* incrementa los niveles de cuerpos de inclusión por debajo del simple mutante *unc-1(vlt10)*. La supresión de *nhr-1* en condiciones basales (sin exceso hormonal) no modifica el patrón de agregación de poliQs, en contraste a la disminución que se observa en presencia de un exceso de señal hormonal asociado a *unc-1(vlt10)*. El efecto tóxico, asociado a la disrupción de *daf-12*, es mitigado mediante *nhr-1(vlt15)* hasta alcanzar los niveles del animales silvestres *40Q*. La interacción sintético letal entre mutaciones en *daf-12* y *unc-1* en un contexto de poliQs es suprimida por el bloqueo de NHR-1. Los datos representan la media \pm SEM. (N = 30) por genotipo. (N_{EXPERIMENTAL} = 3). ***: p-valor < 0,001. Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

Puesto que *nhr-1* y *daf-12* se sitúan cerca del transgén *40Q*, en el cromosoma X (vea sección Metodología – CRISPR/Cas9, **Figura 2.9-A**), para tener ambos alelos en la misma cepa generamos un nuevo alelo de *daf-12*, *vlt20*, usando CRISPR/Cas9, sobre el doble mutante *unc-1(vlt10); nhr-1(vlt15)* y también sobre el simple mutante *nhr-1(vlt15)* (vea sección Metodología – CRISPR/Cas9, **Figura 2.10-C**). El alelo *vlt20* contiene una deleción mayor que *vlt19* que ocasiona la pérdida completa del dominio de unión al ligando (LBD) y la región intermedia entre este dominio y el dominio de unión a ADN (DBD) que putativamente inhabilita

la función de la proteína DAF-12 (vea sección Metodología – CRISPR/Cas9, **Figura 2.10-C**). En concordancia con nuestros resultados, el análisis de animales *40Q; unc-1(vlt10); nhr-1(vlt15)* confirmó que *nhr-1* es epistático sobre *unc-1* (**Figura 3.3.15**). Para comprobar si *nhr-1(vlt15)* también enmascara el efecto tóxico de la pérdida de función de *daf-12*, evaluamos el doble mutante *nhr-1(vlt15); daf-12(vlt20)*. Curiosamente, el experimento de interacción genética mostró una reducción del patrón de agregación de poliQs en el doble mutante con respecto al simple mutante *daf-12(vlt19)* hasta prácticamente los niveles basales de animales silvestres *40Q* (**Figura 3.3.15**). Como ya explicamos anteriormente, la interacción genética entre *daf-12* y *unc-1* fue sintético letal (vea Resultados – Capítulo III, página 159). Sorprendentemente, los gusanos triple mutante *unc-1; daf-12; nhr-1* resultaron viables, confirmando que *nhr-1* es epistático sobre *daf-12* y *unc-1* (**Figura 3.3.15**). Estos resultados sugieren que mutaciones en *nhr-1* pueden mitigar el efecto perjudicial asociado a mutaciones en *unc-1* y *daf-12* independientemente y en combinación (**Figura 3.3.15**).

III.13 NHR-1 regula genes del metabolismo lipídico para modular la homeostasis de proteínas

Para comprender cómo UNC-1 y NHR-1 regulan antagonicamente la homeostasis de proteínas, realizamos un análisis transcriptómico (ARN-Seq) empleando ARN total extraído de simples mutantes, *40Q; unc-1(vlt10)* y *40Q; nhr-1(vlt16)*, el doble mutante para ambos genes y el control *40Q*. Estas muestras fueron secuenciadas y analizadas por la compañía Novogene (Cambridge, Reino Unido). Para el análisis se han seleccionado los genes que tienen un p-valor ajustado inferior a 0,05 y un incremento relativo (*fold change*) igual o mayor a 2. Para reflejar el perfil de expresión de los genes diferencialmente expresados en cada uno de los genotipos, hemos desarrollado un *Heatmap* reflejando el perfil transcriptómico por cada réplica biológica incluida en el estudio (**Figura 3.3.16-A**). Este diagrama permite observar descriptivamente que muchos de los genes que están menos expresados (azul) en el mutante *unc-1*, están rescatados (amarillo) en el doble mutante *unc-1; nhr-1* (**Figura 3.3.16-A**).

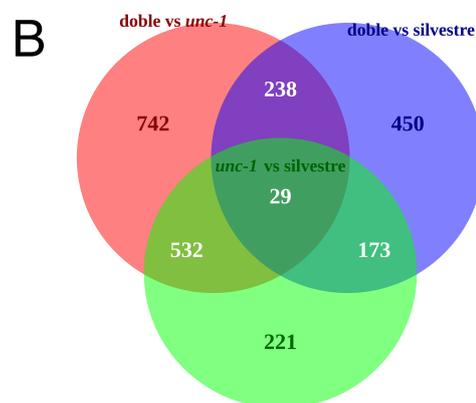
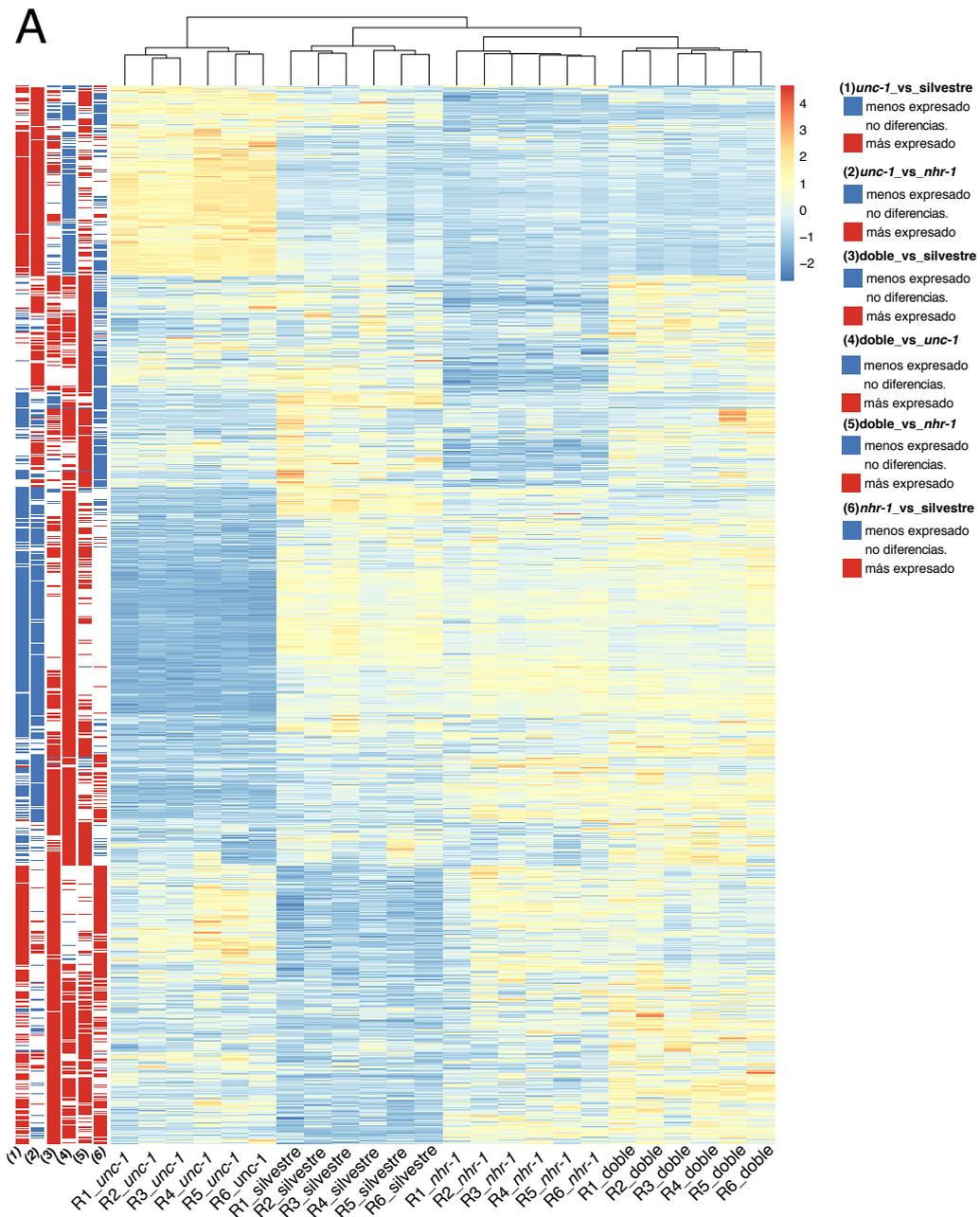


Figura 3.3.16. Perfil de expresión de genes diferencialmente expresados en *unc-1(vlt10)*. (A) Niveles normalizados de genes diferencialmente expresados que han sido seleccionados por su p-valor $< 0,05$ y *fold change* igual o superior a 2. En el *Heatmap* se muestran los genes que poseen una expresión diferencial reducida (azul) y aumentada (naranja-rojo) en cada réplica biológica (R1, R2, R3, R4, R5, R6) referida a cada cepa (*unc-1(vlt10)*, silvestre, *nhr-1(vlt16)*, *unc-1(vlt10); nhr-1(vlt16)*) incluidas en el estudio transcriptómico. En el *Heatmap* se representa el número de lecturas (*read counts*) normalizadas con la herramienta DESeq2 (Love et al., 2014). A la izquierda del *Heatmap* se han incluido las distintas comparaciones entre cada conjunto de réplicas para un mismo genotipo (por ejemplo; (#1) el perfil de niveles de expresión de genes diferencialmente expresados en *unc-1(vlt10)* vs silvestre). En este caso se observan en azul los genes menos expresados, en blanco los que presentan expresión invariable y en rojo los que están más expresados. (B) Diagrama de Venn que muestra el número de genes que están diferencialmente expresados en *unc-1(vlt10)* con respecto al genotipo silvestre, y en el doble mutante *unc-1(vlt10); nhr-1(vlt16)* vs *unc-1(vlt10)* y vs salvaje. Se observan 523 genes que están diferencialmente expresados en todas las comparativas a excepción del doble mutante *nhr-1; unc-1* vs silvestre, indicativo de que se trata de los genes rescatados por el alelo *vlt16*. En contraste, hay 173 genes diferencialmente expresados que son específicos de la mutación *unc-1(vlt10)* y cuya expresión no está alterada por *nhr-1*.

En ese mismo diagrama, puede apreciarse en un extremo la comparativa entre las diferentes cepas en color rojo (genes más expresados) y azul (genes menos expresados) (**Figura 3.3.16-A**). Estas comparaciones ilustran que muchos de los genes que están más expresados (rojo) en el mutante *unc-1* con respecto a la cepa silvestre (columna #1), están menos expresados (azul) en el doble mutante *unc-1; nhr-1* (columna#4), y viceversa (**Figura 3.3.16-A**). Estos resultados reflejan que la supresión de *nhr-1* restaura la desregulación de la expresión génica asociada a mutaciones en *unc-1*, en muchos casos, hasta equiparar los niveles a los observados para el genotipo silvestre.

En el diagrama de Venn pueden observarse el número de genes que están diferencialmente expresados en los diferentes mutantes (**Figura 3.3.16-B**). Los genes que son comunes a dos comparativas o más, nos permiten conocer si están implicados o no en el rescate observado en el doble mutante. Por ejemplo, podemos observar que 532 genes están diferencialmente expresados entre el doble mutante *unc-1; nhr-1* y *unc-1* y, a su vez, entre el simple mutante *unc-1* y el genotipo silvestre (**Figura 3.3.16-B**; solapamiento de círculos verde y rojo), que por otro lado, no están diferencialmente expresados entre el doble mutante y la cepa silvestre (**Figura 3.3.16-B**; círculo morado). Por tanto, estos genes que muestran una expresión similar en el doble mutante y en los animales silvestres son los genes que serían los “rescatados” por la mutación en *nhr-1*. Por otro lado, solamente hay 173 genes diferencialmente expresados en las comparativas *unc-1* vs silvestre y *unc-1; nhr-1* vs silvestre, cuya expresión no es variable entre el doble mutante y el simple mutante *unc-1* (**Figura 3.3.16-B**; solapamiento de

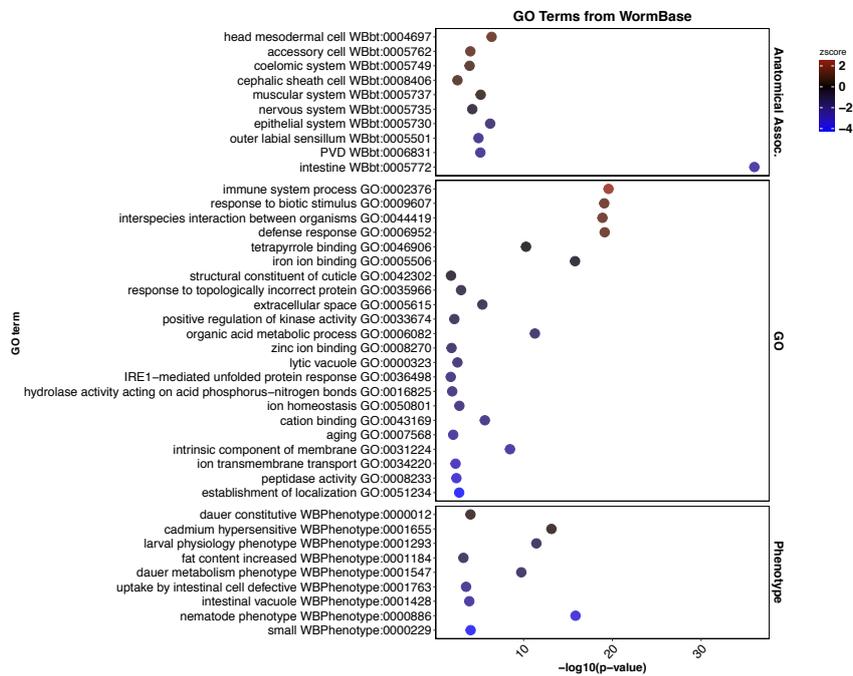
círculos verde y morado). Estos últimos datos indican que estos 173 genes son genes no rescatados y que por tanto, son específicos de *unc-1*.

Para identificar en qué procesos celulares están involucrados los genes diferencialmente expresados, hemos representado los términos GO (del inglés *Gene Ontology*) mediante una herramienta de la Wormbase (www.wormbase.org) (Angeles-Albores et al., 2018, 2016). Esta herramienta utiliza tres ontologías distintas en base a la asociación anatómica, procesos celulares y fenotipo de los animales (Angeles-Albores et al., 2018, 2016). Este análisis ha permitido identificar genes diferencialmente expresados en el simple mutante *unc-1* que están relacionados con intestino, metabolismo de lípidos, respuesta UPR, respuesta inmune, entre otros (**Figura 3.3.17-A**). La supresión de *nhr-1* en un fondo genético mutante *unc-1* rescata genes expresados en intestino, los cuales podrían estar relacionados con el metabolismo lipídico (**Figura 3.3.17-B**).

También hemos realizado un análisis de enriquecimiento de rutas de señalización (del inglés *pathway enrichment analysis*) mediante la herramienta KEGG (www.genome.jp/kegg/), para identificar procesos celulares y rutas metabólicas cuyos genes podrían estar alterados. Estos resultados mostraron que efectivamente, algunas rutas metabólicas estaban predominantemente alteradas. Entre otras, sobresalen rutas del metabolismo y la degradación ácidos grasos (**Figura 3.3.18-A, Anexo III**). Hemos representado los niveles de expresión de los genes diferencialmente expresados involucrados en los procesos KEGG relacionados con biosíntesis de ácidos grasos y degradación lipídica mediante *heatmaps* (**Figura 3.3.18-A y Anexo III**). Se observa claramente que los genes relacionados con la biosíntesis lipídica *de novo*, están, por lo general, menos expresados en el simple mutante *unc-1(vlt10)* que en el resto de cepas (silvestre, *nhr-1(vlt16)* y *unc-1(vlt10); nhr-1(vlt16)*) (**Figura 3.3.18-A**). La supresión de *nhr-1* en un fondo genético mutante *unc-1*, restauró los niveles de expresión de muchos de los genes relacionados con biosíntesis de ácidos grasos, como es el caso de *pod-2*, *fasn-1*, *fat-5*, *fat-6*, *fat-7*, *elo-1*, *elo-2*, *elo-5* y *elo-6*, entre otros (**Figura 3.3.18-A**). Los genes relacionados con la degradación de ácidos grasos o catabolismo lipídico presentan un perfil de expresión similar al que hemos observado, sugiriendo que tanto la síntesis como la degradación parece estar alterada en los mutantes *unc-1* (**Anexo III**).

A

unc-1 vs silvestre



B

unc-1;nhr-1 vs *unc-1*

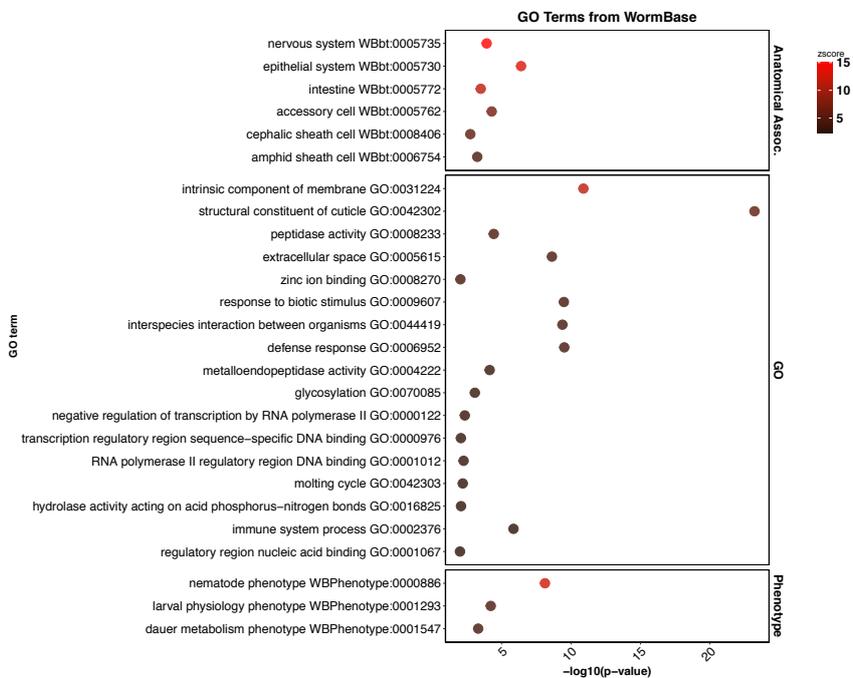


Figura 3.3.17. Análisis funcional de términos enriquecidos para asociación anatómica, proceso celular y fenotipo en *unc-1(vlt10)* y *unc-1(vlt10); nhr-1(vlt16)*. (A) La comparativa muestra los diferentes términos GO que están alterados en el simple mutante *unc-1* con respecto al fondo genético *40Q* en las diferentes Ontologías. El diagrama contiene una escala de color (z-score) que corresponde a los niveles de expresión (azul: menos expresados; rojo: más expresados) denotado como puntos que reflejan cada término GO seleccionado (por ejemplo, genes relacionados con intestino, UPR^{RE} y lípidos están menos expresados en *unc-1*, mientras que aquellos relacionados con respuesta inmune están más expresados con respecto a animales *40Q*). (B) La comparativa muestra los diferentes términos GO que están restaurados en el doble mutante *unc-1(vlt10); nhr-1(vlt16)* con respecto al simple mutante *unc-1(vlt10)* en las diferentes Ontologías. El perfil de expresión observado en ocasiones es opuesto a la comparativa de “A”. Se muestran que varios genes relacionados con los términos intestino, UPR^{RE} y metabolismo lipídico cuya expresión es más elevada en el doble mutante que en el simple mutante *unc-1(vlt10)*. Los colores denotan un z-score que indica en qué dirección tienden a estar expresados los genes de cada término. Se calcula como $(n^{\circ} \text{ genes expresados a la alza} - n^{\circ} \text{ genes expresados a la baja}) / n^{\circ} \text{ genes diferencialmente expresados}$ (negativo - azul: menos expresado; positivo - rojo: más expresado). El eje de abscisas refleja la significancia de los datos; es decir, cuando más hacia la derecha está situado un punto, menor es el p-valor. Los datos han sido seleccionados ajustando un p-valor $< 0,05$ y un *fold change* mayor a 1 para cada comparación mediante la herramienta incluida en la base de datos WormBase (www.wormbase.org) (Angeles-Albores et al., 2018, 2016).

La acetil- CoA carboxilasa, ACC/POD-2, codifica para una enzima crucial en la vía de síntesis de ácidos grasos, cuya expresión estaba reducida en los mutantes *unc-1*, al igual que algunas desaturasas, *fat-5*, *fat-6* y *fat-7*, y elongasas, *elo-1*, *elo-2*, que intervienen en la ruta de síntesis del ácido oleico (**Figura 3.3.18-A**). Este lípido ha mostrado tener un papel protector en longevidad y funcionalidad neuronal en un contexto de poliQs (Goudeau et al., 2011; Imanikia et al., 2019). Por otro lado, también hemos detectado niveles de expresión reducidos referentes a otras elongasas, *elo-5* y *elo-6*, especializadas en la síntesis de ácidos grasos de cadena ramificada monometilados, C15iso y C17iso (Kniazeva et al., 2004). Para la validación de los resultados de transcriptómica, analizamos los niveles de expresión de algunos de los genes, como *pod-2*, *elo-2* y *elo-5* mediante RT-qPCR para evaluar la desregulación en diferentes puntos de la ruta de biosíntesis. La validación de estos genes mediante RT-qPCR mostró que los niveles de expresión de *pod-2*, *elo-2* y *elo-5* estaban reducidos en los mutantes *unc-1(vlt10)* con respecto a las demás cepas (**Figura 3.3.18-B**). En contraste, la supresión de *nhr-1* en un fondo genético mutante para *unc-1(vlt10)*, restauró la expresión de todos ellos (**Figura 3.3.18-B**). En paralelo, para validar funcionalmente los datos de transcriptómica referidos a algunos genes de la ruta de síntesis de ácidos grasos, redujimos la expresión de *fat-6* y *elo-2* mediante ARNi en fondos genéticos mutantes *unc-1* y *nhr-1*, en un contexto de poliQs y, seguidamente, contabilizamos el número de cuerpos de inclusión de poliQs.

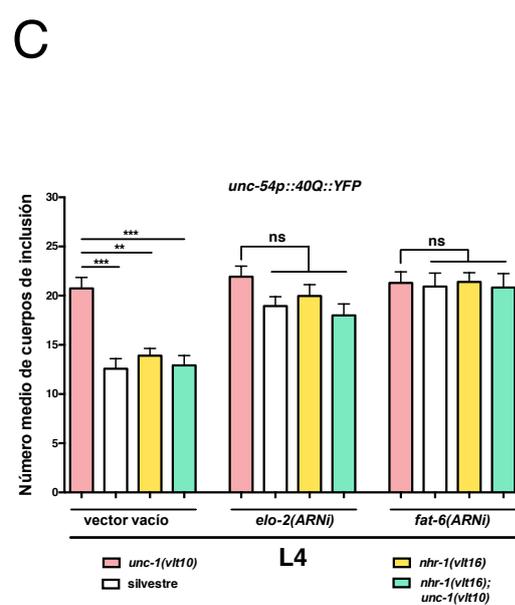
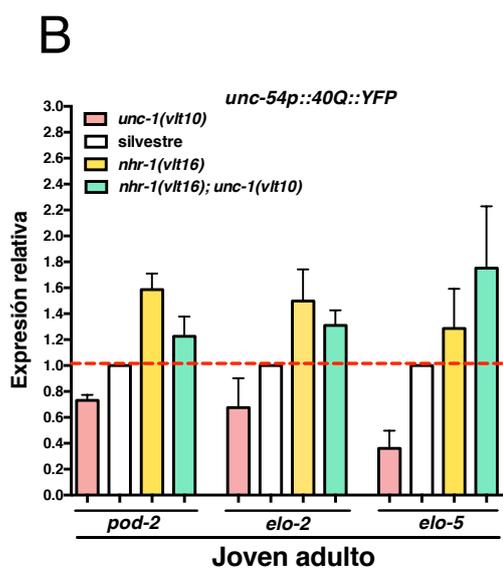
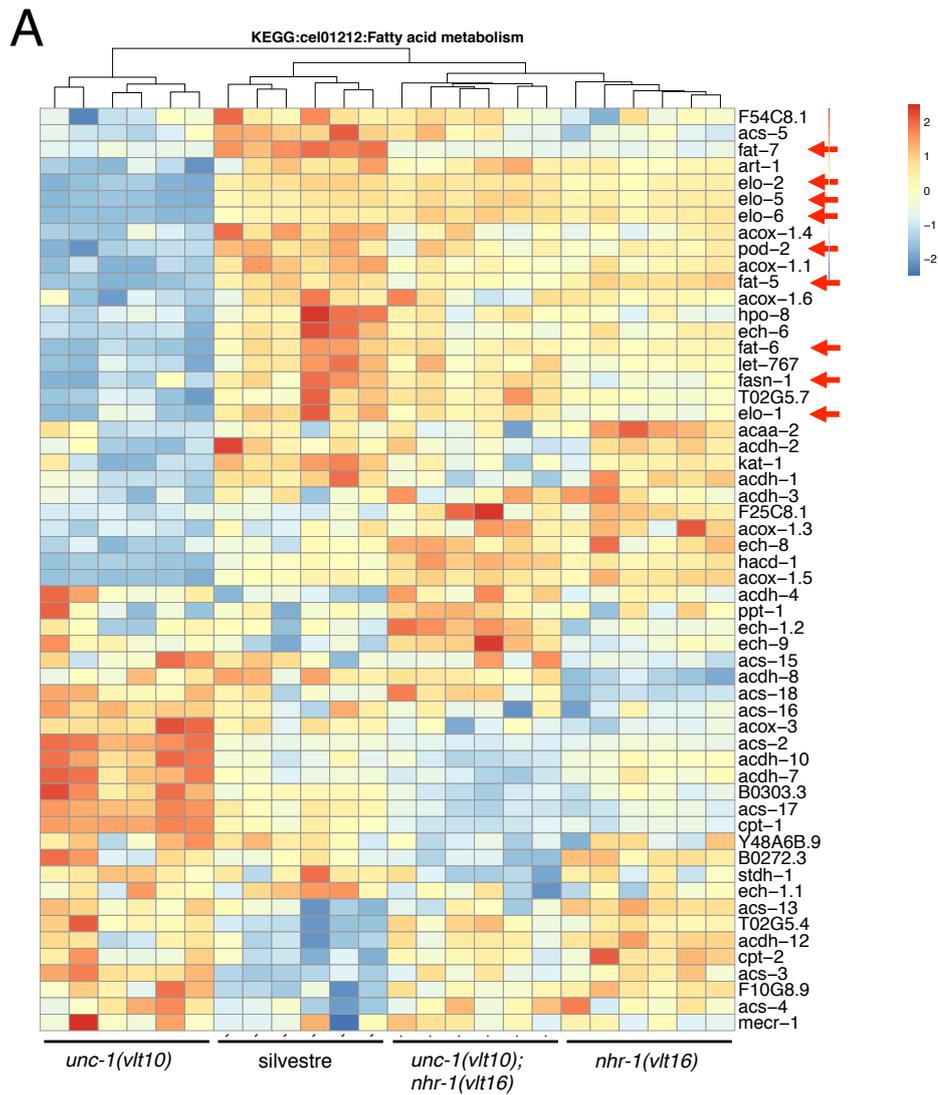


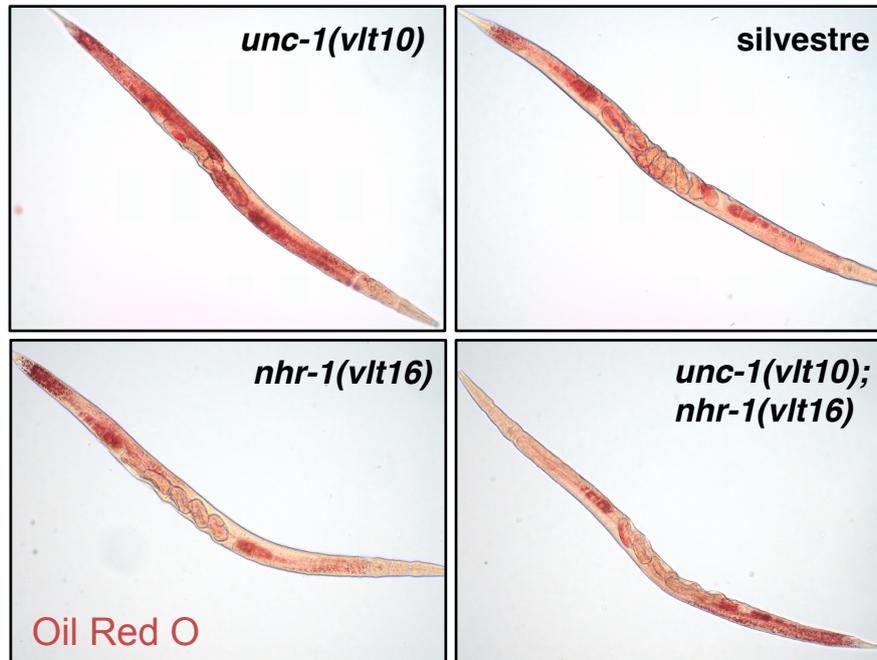
Figura 3.3.18. La pérdida de función de *unc-1* induce una desregulación transcripcional de genes relacionados con la síntesis lipídica *de novo* en *C. elegans*. (A) Perfil de expresión génica relacionado con el metabolismo de ácidos grasos (KEGG: "Fatty Acid Metabolism") en *40Q*, el simple mutante *unc-1(vlt10)*, simple mutante *nhr-1(vlt16)* y doble mutante *unc-1(vlt10); nhr-1(vlt16)*. Los genes resaltados en azul muestran niveles de expresión baja mientras que en rojo se muestran los genes con expresión alta en cada réplica biológica incluida en el análisis y por genotipo. Los genes que aparecen en el *Heatmap* se han seleccionado de acuerdo a un p-valor < 0,05 y un *fold change* igual o mayor a 2. A la dcha del *Heatmap*, se resaltan (flechas rojas) algunos genes relacionados con síntesis lipídica que muestran una expresión reducida en el simple mutante *unc-1* con respecto a los demás genotipos (B) Se muestran los niveles de expresión relativa de *pod-2/ACC*, *elo-2/elongasa 2* y *elo-5/elongasa 5* obtenidos mediante RT-qPCR en animales jóvenes adultos silvestres, *unc-1(vlt10)*, *nhr-1(vlt16)* y *unc-1(vlt10); nhr-1(vlt16)* con fondo genético *40Q*. Los valores de expresión se han normalizado usando el control endógeno, *pmp-3*, y referenciado los datos a la cepa silvestre *40Q*. (C) Número medio de cuerpos de inclusión en larvas L4 silvestres, *unc-1(vlt10)*, *nhr-1(vlt16)* y *unc-1(vlt10); nhr-1(vlt16)* con fondo genético *40Q*, tras el silenciamiento por ARNi ubicuo de los genes *elo-2/ACC* y *fat-6/desaturasa Δ9*. El plásmido L4440 vacío, incluido en la cepa HT115, se ha empleado como control negativo del ensayo de silenciamiento. Los datos representan la media ± SEM. (N = 6 muestras biológicas independientes por genotipo; diagrama A); (N = 30; gráfico C) por genotipo y/o condición. N_{EXPERIMENTAL} = 3. ***: p-valor < 0,001; **: p-valor < 0,01; ns: no estadísticamente significativo. Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

El silenciamiento de *elo-2* y *fat-6* aumentó el número medio de cuerpos de inclusión en todas las cepas, a excepción del simple mutante *unc-1(vlt10)*, sugiriendo que la expresión de estos genes ya estaba previamente reducida debido a la presencia de la mutación *vlt10* (Figura 3.3.18-C). Estos resultados confirman que la disrupción de *unc-1* induce una reducción de la expresión de los genes *pod-2*, *elo-2*, *fat-6* y *elo-5*, la cual es restaurada tras la disrupción de *nhr-1*. Por otro lado, hemos demostrado que *fat-6* y *elo-2* pueden modificar el patrón de agregación de poliQs, sugiriendo que estos genes modulan directamente la homeostasis de poliQs (Figura 3.3.18-C).

Para profundizar en los resultados que señalan una desregulación lipídica asociada a la disrupción de *unc-1*, analizamos el contenido lipídico en las cuatro cepas incluidas en el estudio de transcriptómica mediante un colorante que tiñe específicamente lípidos (Oil Red O) y que permite realizar un análisis semi-cuantitativo de la abundancia lipídica. En concordancia con los resultados de transcriptómica, los niveles de tinción lipídica fueron notablemente diferentes en animales jóvenes adultos *unc-1(vlt10)* con respecto a las demás cepas (silvestre, *nhr-1(vlt16)*, *unc-1(vlt10); nhr-1(vlt16)*) (Figura 3.3.19-A). Los animales *unc-1(vlt10)* mostraron aproximadamente el doble de tinción lipídica que animales silvestres *40Q* (Figura 3.3.19-A, B). Adicionalmente, los animales portadores de una mutación en *nhr-1* (simple y doble mutante), no mostraron

diferencias significativas con respecto al fondo genético silvestre (Figura 3.3.19-A, B), lo cual sugiere que NHR-1 restaura la abundancia lipídica en el doble mutante *unc-1; nhr-1*.

A



B

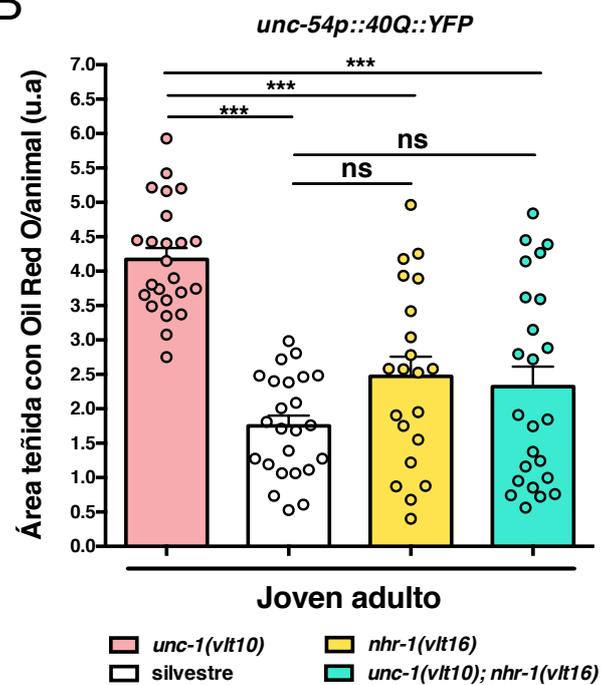


Figura 3.3.19. Los mutantes *unc-1* acumulan un exceso de lípidos totales. (A) Imágenes representativas de animales jóvenes adultos teñidos con Oil Red O que reflejan la diferente abundancia lipídica dependiendo del genotipo. (B) Datos semicuantitativos de los niveles de tinción de Oil Red O que muestran diferencias significativas en contenido lipídico entre animales *unc-1(vlt10)* y animales silvestres, ambos con fondo genético *40Q*. La supresión de *nbr-1* restaura el contenido lipídico basal de los mutantes *unc-1* hasta niveles del control *40Q* y el simple mutante *nbr-1(vlt16)*. Los datos representan la media \pm SEM. (N > 20) por genotipo. N_{EXPERIMENTAL} = 3. ***: p-valor < 0,001; ns: estadísticamente no significativo. Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

III.14 El análisis de lipidómica de los mutantes *unc-1* muestra que acumulan especies grasas

Para estudiar el contenido lipídico de los animales *unc-1*, empleamos técnicas metabolómicas que nos permitiesen compararlo con el de los animales silvestres, empleando animales jóvenes adultos. El perfil lipídico reflejó una mayor abundancia lipídica total en los mutantes *unc-1* respecto a los controles (**Figura 3.3.20-A**), lo cual está en concordancia con los datos semi-cuantitativos reflejados por la tinción Oil Red O (**Figura 3.3.19**). Sin embargo, no todos los lípidos están en exceso en los mutantes *unc-1*. Previamente hemos demostrado que los genes que regulan la síntesis de ácidos grasos mono y poli-insaturados (MUFAs y PUFAs, respectivamente), entre los que se encuentra el ácido oleico y linoleico, presentaban una expresión reducida en jóvenes adultos *unc-1(vlt10)*. Respecto a esto, hemos identificado niveles inferiores en el contenido total de estos ácidos grasos (donde se incluyen MUFAs, PUFAs y ácidos grasos saturados-SFAs) en los mutantes *unc-1* con respecto a animales silvestres (**Figura 3.3.20-A**).

Los MUFAs proceden de un ácido graso saturado (ácido palmítico; C16:0), que puede ser incorporado en la dieta por los gusanos, a partir de *E. coli*, o ser obtenido por nueva síntesis (Watts, 2009). La síntesis de ácidos grasos *de novo* en *C. elegans* emplea acetil-CoA como sustrato inicial que es metabolizado por la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa (FA) a ácido palmítico (C16:0) (Watts, 2009). Este ácido graso saturado es metabolizado por una serie de desaturasas (FAT-5, FAT-6, FAT-7) y elongasas (ELO-1, ELO-2) para sintetizar MUFAs (como el ácido oleico y el palmitoleico) y PUFAs (como el ácido linoleico, dihomo- γ -linoleico y araquidónico) (Watts and Browse, 2000).

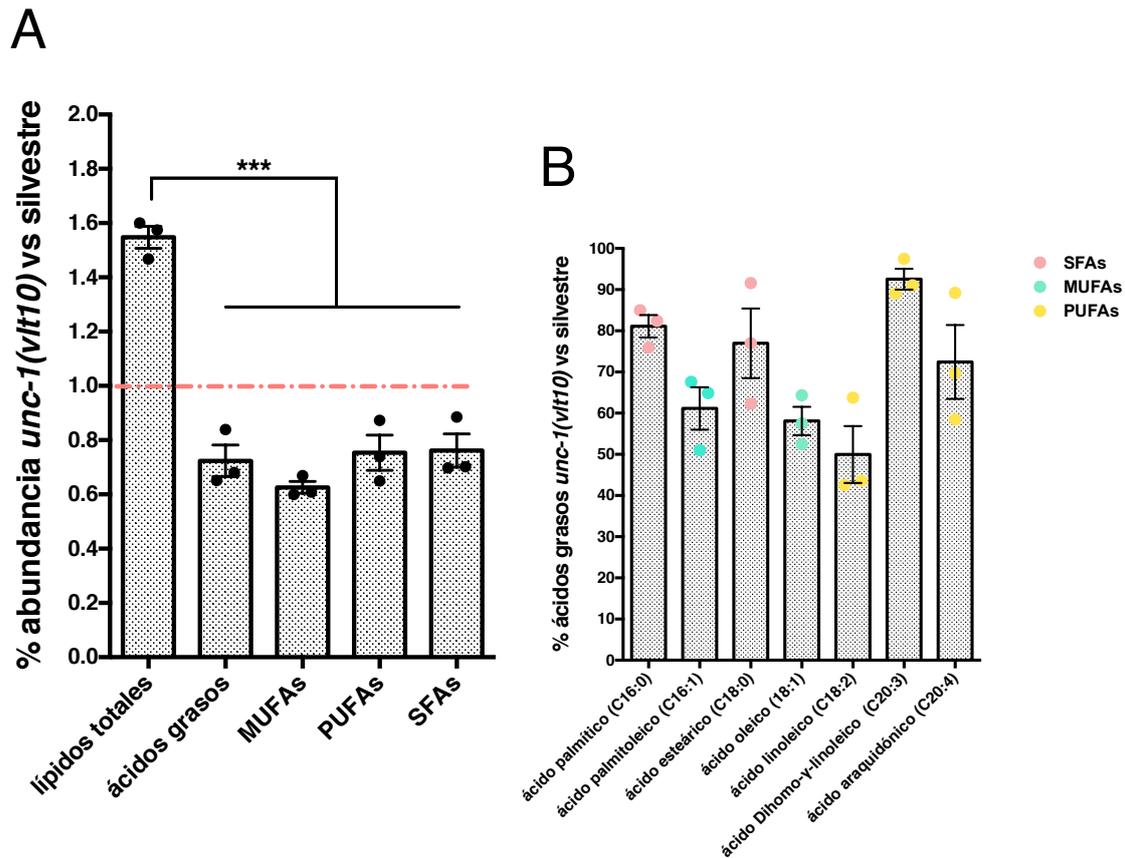


Figura 3.3.20 El análisis de lipidómica muestra perfiles metabólicos diferentes entre animales *unc-1* y silvestres. **(A)** El contenido total de lípidos está incrementado en animales jóvenes adultos *unc-1(vlt10)* con respecto a animales silvestres N2. En contraste, el contenido total de ácidos grasos totales (MUFAs, PUFAs y SFAs) está disminuido en los mutantes *unc-1*. El estudio individualizado de MUFAs, PUFAs y SFAs sostiene de la misma forma, una reducción de su contenido en los mutantes *unc-1*. **(B)** La abundancia de varios ácidos grasos dentro del grupo MUFAs, PUFAs o SFAs está drásticamente reducida en los mutantes *unc-1*, especialmente el % de ácido palmítoleico, oleico y linoleico. Los datos representan la media de los 3 ratios de experimentos independientes \pm SEM. ($N_{\text{MUESTRAL}} > 20$). $N_{\text{EXPERIMENTAL}} = 3$. ***: p -valor $< 0,001$. Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

El ácido palmítico y esteárico, ambos ácidos grasos precursores de MUFAs y PUFAs, estaban reducidos al 80% en los mutantes *unc-1* con respecto a los animales silvestres (**Figura 3.3.20-B**). Esta menor abundancia fue más drástica para MUFAs y PUFAs, como el ácido oleico, palmítoleico y linoleico (**Figura 3.3.20-B**). Otros PUFAs sintetizados a partir del ácido linoleico, como el dihomog- γ -linoleico y el ácido araquidónico, mostraron una reducción de los niveles lipídicos más moderada (**Figura 3.3.20-B**). Estos resultados en conjunto confirman que la disrupción de *unc-1* conlleva una desregulación de las vías de síntesis lipídica *de novo* afectando a los niveles totales de MUFAs, PUFAs y SFAs, que a su vez, produjo un perfil diferencial de abundancia en los distintos

ácidos grasos. De manera interesante, los resultados de lipidómica muestran que el ácido oleico está reducido un 40 % en los mutantes *unc-1* con respecto a animales silvestres (**Figura 3.3.20-B**). Partiendo de estos resultados, decidimos investigar el papel del ácido oleico en un contexto de poliQs en presencia de mutaciones para *unc-1* y *nhr-1*. El tratamiento con ácido oleico 2 mM de animales silvestres 40Q redujo el patrón de agregación de poliQs significativamente con respecto a animales no tratados (**Figura 3.3.21**), confirmando por primera vez el papel protector de este lípido en un contexto de toxicidad de poliQs en células musculares. Además, el tratamiento con ácido oleico 2 mM de animales *unc-1(vlt10)* mostró una reducción drástica del número de cuerpos de inclusión comparado con los animales *unc-1(vlt10)* no tratados, incluso con un incremento mayor, que el que observado en los animales silvestres tratados y no tratados (**Figura 3.3.21**).

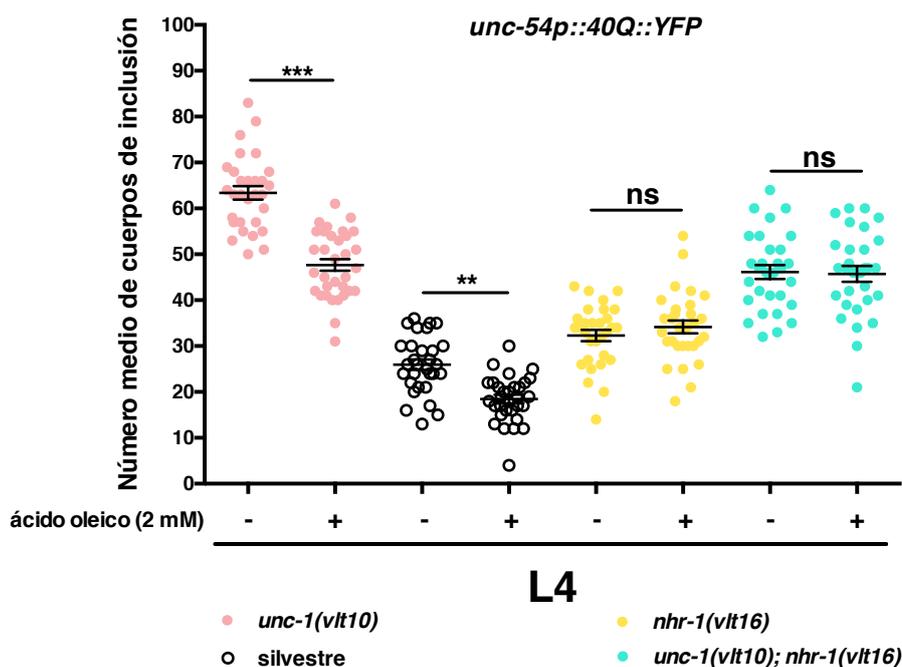


Figura 3.3.21. El ácido oleico reduce la agregación de poliQs en presencia de NHR-1 funcional. El tratamiento con ácido oleico 2 mM reduce el patrón de agregación en animales L4 silvestres y mutantes *unc-1(vlt10)*, mientras que no tiene efecto sobre animales mutantes *nhr-1(vlt16)*. Los datos representan la media \pm SEM. (N = 30) por genotipo y/o condición. N_{EXPERIMENTAL} = 3. Test estadístico ANOVA con prueba comparativa múltiple tipo Tukey.

Por el contrario, el tratamiento con ácido oleico 2 mM fue inocuo en un fondo genético mutante *nhr-1(vlt16)*, incluso en presencia de *unc-1(vlt10)* (**Figura 3.3.21**). Estos resultados sugieren, por un lado, que el ácido oleico tiene un papel protector en un contexto de toxicidad de poliQs muscular, y por otro lado, que el ácido oleico es incapaz de modular la agregación de poliQs cuando se inactiva *nhr-1*, lo cual sugiere que NRH-1 podría ser necesario para que el ácido oleico ejerza su papel protector.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Capítulo I. Desarrollo de modelos de toxicidad por ARN con tripletes CAG para la identificación de péptidos RAN y moléculas con potencial terapéutico en *C. elegans*.

Recientes evidencias señalan que la traducción RAN, producida por expansiones de tripletes, es un proceso que está conservado entre animales invertebrados, como *D. melanogaster*, y vertebrados (ratón y humanos) (Bañez-Coronel et al., 2015; Kramer et al., 2016; Todd et al., 2013; Zu et al., 2011). A pesar de que este tipo de traducción es independiente de la presencia del codón de iniciación ATG, se ha demostrado recientemente que requiere de otros factores de reclutamiento del complejo de iniciación de la traducción (Cap, eIF4D, eIF2D, etc.) (Kearse et al., 2016; Sellier et al., 2017; Sonobe et al., 2020). En contraste con esto, nunca ha sido observada la presencia péptidos RAN derivados de expansiones CAG en *C. elegans*. Sin embargo, sí se ha estudiado la potencial toxicidad de este tipo de proteínas, empleando animales transgénicos, cuyo transgén tiene un codón de iniciación de la traducción ATG, previo a la zona repetitiva CAG/CUG (Rudich et al., 2020). De ese modo, han podido estudiar la implicación directa de estos péptidos en la progresión de la patogénesis en *C. elegans*. Por supuesto que estos resultados no confirman la presencia de péptidos RAN producidos espontáneamente en los gusanos. El único trabajo que sugiere la presencia de un único dipéptido (poli-glicina – prolina) derivado de traducción RAN en *C. elegans* fue producido por una cepa de gusanos transgénicos, que expresaban una expansión repetitiva del hexanucleótido G₄C₂ (Kramer et al., 2016). A pesar de ello, en estos animales no parece que se produzcan péptidos derivados de otras pautas de lectura, que sí aparecen en otros animales superiores como *D. melanogaster* o ratones, y en humanos, lo cual es extraño (Ash et al., 2013; Mori et al., 2013; Tao et al., 2015; Zu et al., 2013).

I.1 Modelización de péptidos RAN en *C. elegans*

Puesto que no es evidente que los péptidos RAN existan en *C. elegans*, de la forma en la que han sido descritos en otros animales, hemos desarrollado nuevos modelos transgénicos de expresión de expansiones CAG. Hemos empleado estos animales para estudiar la presencia de estos péptidos en *C. elegans*, pero también para poder modelizar la toxicidad asociada al ARN que contiene las expansiones de tripletes. En un primer momento, basamos nuestra estrategia en la detección indirecta de péptidos RAN con etiquetas artificiales tal y como ha sido publicado (Bañez-Coronel et al., 2015; Zu et al., 2011), pero no fuimos capaces de detectar este tipo de péptidos.

Por tanto, realizamos una nueva aproximación con la que detectar los péptidos *in vivo* mediante el uso de proteínas fluorescentes como TdTomato, que están en pauta con los microsatélites, de forma que, si se produce traducción RAN desde la pauta canónica del primer exón de la huntingtina, veríamos fluorescencia roja en estos gusanos. Estos animales transgénicos los diseñamos basándonos, de nuevo, en modelos animales descritos por otros autores (Todd et al., 2013). Los animales que portaban el transgén *let-858p::112CAG::TdTomato* produjeron un patrón de expresión diferencial en diferentes tejidos, mostrándose acúmulos distribuidos principalmente en tejido hipodérmico, intestino y faringe (**Figura 3.1.7**), a pesar de que el promotor del gen *let-858* se expresa ubicuamente (Jedrusik and Schulze, 2001). Esto sugería que estábamos presenciando un fenómeno de traducción RAN. Sin embargo, los animales producían descendencia enferma, y era obvio que la expresión por tejidos correspondía a animales mosaico, que no expresaban el transgén en todos los tejidos, y que obviamente inducía mucha toxicidad. Por tanto, decidimos generar una construcción que se expresase específicamente en tejido hipodérmico, que parecía que era el tejido donde se expresaba el transgén de los animales que sobrevivían, para confirmar que se estaba produciendo traducción RAN. Para ello generamos dos tipos de transgenes: (#1) con un número reducido de repeticiones CAG (9CAG), y (#2) con un número patológico de tripletes (112CAG). En estos últimos observamos de nuevo una fuerte fluorescencia roja, que además, parecía acumularse en cuerpos de inclusión, lo cual sugería que podría estar produciéndose péptidos RAN, con poliQs. Sin embargo, observamos un patrón similar en el control (9CAG) (**Figura 3.1.8**). No hemos tenido tiempo de hacer experimentos que nos permitan comprobar si los

cuerpos de inclusión observados en los animales 112CAG son fruto de un artefacto, y por tanto no son péptidos RAN. Por el contrario, se ha documentado que los animales que expresan pocas poliQs, 19Q, en neuronas mecanosensoriales en *C. elegans*, producen agregados similares a los producidos por proteínas que contienen 128Q (Parker et al., 2001). No sabemos, aún, si un número tan reducido como 9Q podría estar produciendo estos agregados, y si es posible que nuestro control negativo esté, de hecho, produciendo péptidos RAN.

Un análisis por Western Blot revelando las proteínas de estos animales transgénicos, empleando un anticuerpo anti-DsRed, mostró un patrón de bandeo de TdTomato extraño, como si hubiese sufrido proteólisis (**Figura 3.1.7-D y 3.1.8-C**). Puesto que no tenemos más datos sobre estos animales, no podemos saber si la posible proteólisis de TdTomato, en dos mitades, está ocurriendo en la hipodermis de estos animales, y si esto está favoreciendo una agregación no específica, ya que se ha descrito que DsRed tiende a la autoagregación. A pesar de ello, no podemos descartar que en el conglomerado de agregados puedan coexistir péptidos poliQ-TdTomato con estos agregados no específicos. Estas evidencias no sostienen la presencia de péptidos endógenos RAN a partir de tripletes CAG pero tampoco nos permiten descartarla.

Por tanto, necesitamos profundizar más en la optimización de modelos transgénicos basándonos en otros marcadores fluorescentes estrictamente monoméricas, como NeonGreen, que permitan aumentar la sensibilidad de detección de niveles basales de péptidos RAN. Estos modelos pueden ser extremadamente útiles para identificar dianas terapéuticas que específicamente combatan la toxicidad asociada a péptidos RAN. En este sentido, se ha sugerido recientemente que la metformina reduce la toxicidad asociada a péptidos RAN derivados de expansiones G₄C₂, bloqueando su traducción, por la activación de la quinasa dependiente de ARN (PKR) (Zu et al., 2020).

I.2 Modelización de toxicidad asociada a transcritos CAG

Para la modelización de la toxicidad asociada a transcritos CAG, hemos creado un modelo transgénico de expresión específica de ARN potencialmente tóxico, en neuronas GABAérgicas de *C. elegans*. Se ha descrito que la disfunción de

neuronas GABAérgicas se traduce en defectos motores de los gusanos, puesto que estas neuronas participan en la modulación excitatoria de las células musculares implicadas en la locomoción (Schuske et al., 2004). En consonancia con esto, hemos observado que nuestros animales, que expresan los transcritos que contienen expansiones anormalmente largas de CAG, sufren defectos motores. Hemos observado que estos defectos son sutiles cuando resulta de la expresión de dos copias del transgén *unc-25p::144CAG*. Sin embargo, cuando se expresa desde un array extracromosómico, que contiene múltiples copias, los defectos motores son más severos (**Figura 3.1.3-C y 3.1.4-A**). Por tanto, hemos seleccionado el modelo transgénico con fenotipo motor severo para facilitar el rastreo de compuestos farmacológicos, a pesar de las dificultades técnicas de manipulación de estos animales, ya que el transgén no está integrado en un cromosoma, y por tanto se hereda en solo una parte de la población. En estos animales, hemos observado que los niveles de deterioro motor no son comparables a los animales control que portan el transgén *unc-25p::22CAG* (**Figura 3.1.4**). Esto confirma que los defectos motores observados en los animales son inducidos específicamente por transcritos que portan tripletes expandidos CAG.

Hemos identificado 4 compuestos, de una librería de 85 fármacos, que potencialmente mejoran la funcionalidad neuronal y por tanto, reducen los defectos motores asociados a transcritos CAG (**Figura 3.1.6**). A pesar de que desconocemos el mecanismo de acción de estos fármacos, en estos animales transgénicos, podemos especular sobre su acción fijándonos en las rutas de señalización que activan en sistemas mamíferos. Por ejemplo, uno de los fármacos que parece rescatar la movilidad en nuestros transgénicos, es el inhibidor PFI-1. En base a la bibliografía, algunas de las dianas de este fármaco tienen homología con proteínas presentes en *C. elegans*, como es el caso de la familia de proteínas BET-1/BET (Fisher et al., 2013). Las proteínas BET tienen dos bromo dominios que contienen residuos de lisina acetilados que les facilitan la unión a histonas y, que por tanto, participan en el reordenamiento de la cromatina y en la regulación de la expresión génica (Dey et al., 2003; Florence and Faller, 2001). En nuestro caso, PFI-1 podría estar bloqueando a alguna de las proteínas BET en *C. elegans* y, esto a su vez, podría modular la expresión de genes, pero se necesita más trabajo para investigar esto.

Otra sustancia que ha mejorado la motilidad de los animales estresados por ARN tóxicos en las neuronas GABAérgicas, es CP-673451. Este compuesto es un inhibidor del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR, del inglés *platelet-derived growth factor receptor*) (Xi et al., 2014). Aunque este receptor no se encuentra conservado en *C. elegans*, sí existen el factor de crecimiento que lo activa, que está codificado por el gen *pvf-1* (Tarsitano et al., 2006). Sin embargo, es difícil de explicar si este compuesto puede tener alguna relación, considerando la ruta de señalización en la que participa PVF-1, ya que CP-673451 es un inhibidor específico de PDGFR. Por otro lado, es también probable que esta sustancia esté activando o inhibiendo otras dianas presentes en el gusano, por interacciones no descritas en la literatura. El tercer compuesto que funcionó en el cribado es Apixaban, que es un inhibidor del factor de coagulación Xa. Como ocurría con el anterior compuesto, no existe un homólogo funcional para este factor en *C. elegans*, que nosotros sepamos, y es posible que esta sustancia esté modulando una diana de la que no tenemos, aún, conocimiento. Por último, el compuesto antibiótico cefoperazona también resultó positivo en cuatro experimentos independientes. La cefoperazona, es una cefalosporina que interfiere con la síntesis de la pared celular bacteriana al unirse a las proteínas de unión a penicilina (PBP), evitando así la reticulación de nacientes peptidoglicano. Es muy improbable que el mecanismo de rescate en los gusanos tenga nada que ver con este tipo de moléculas, por razones obvias. Sin embargo, es posible que tenga acción sobre dianas que no conocemos aún, como en los dos casos anteriores. Pero hay otra hipótesis alternativa, que quizás es más probable. Puesto que esta sustancia es un antibiótico, podría darse el caso de que esté alterando la viabilidad de la cepa de bacterias OP50-1, que sirve de fuente de alimento para *C. elegans*. Recientes estudios sugieren que *E. coli* puede colonizar el intestino y reducir la viabilidad de *C. elegans* (Podshivalova et al., 2017). Por tanto, si intervenimos en este proceso deletéreo, quizás estemos generando una situación favorable en la que los gusanos están más sanos. Además, si el antibiótico está reduciendo la disponibilidad de alimento es posible que estemos induciendo restricción calórica en nuestros gusanos, lo cual hace que se activen genes de supervivencia, a través de la inhibición de la ruta de la insulina, que hagan que se reduzca la toxicidad del ARN (Iser and Wolkow, 2007; Lee et al., 2006; Santos et al., 2016).

Capítulo I

En conjunto todos los resultados que hemos obtenido del rastreo químico son preliminares. Por tanto es necesario realizar numerosas pruebas experimentales, para describir un mecanismo que explique el efecto beneficioso que ejercen sobre los gusanos con neuronas GABAérgicas estresadas por expansiones de CAGs.

Capítulo II: La activación sinérgica de AMPK previene la toxicidad inducida por poliglutaminas en *C. elegans*.

En este estudio hemos demostrado que la combinación de metformina y salicilato puede activar de manera sinérgica el complejo enzimático AMPK para reducir la agregación de poliQs y la disfunción neuronal en diferentes modelos de *C. elegans*. Además, hemos confirmado que este tratamiento puede paliar el estrés inducido por otras fuentes de agregación como la proteína α -sinucleína. Además de AMPK, hemos confirmado que la autofagia juega un papel esencial en la protección celular frente al estrés por poliQs.

II.1 Metformina y salicilato actúan sinérgicamente para reducir el estrés inducido por poliQs

Nuestro estudio muestra por primera vez el papel protector celular del tratamiento dual, mediante metformina y salicilato, en un contexto de toxicidad inducida por poliQs en neuronas y células musculares, en *C. elegans*. Sin embargo, la primera evidencia que sugería que ambas sustancias activan de manera sinérgica AMPK ha sido mostrada en un contexto de resistencia a insulina y obesidad en mamíferos (Ford et al., 2015). En este trabajo han demostrado que AMPK puede ser activada por la metformina y el salicilato de manera sinérgica, en el hígado, para reducir la lipogénesis y mejorar la sensibilidad a insulina, en ratones tratados con una dieta rica en grasas y también en hepatocitos humanos (Ford et al., 2015). Además, posteriormente, otros autores han demostrado que el co-tratamiento con estas sustancias activa AMPK y reduce la expresión de algunos marcadores de neuroinflamación inducidos por TNF α y palmitato en una línea neuronal inmortalizada de células del hipotálamo (Ye et al., 2016). Este último trabajo evidencia por primera vez el papel neuroprotector de estos fármacos en un contexto de inflamación. Por último, diferentes autores han demostrado un papel anti-cancerígeno asociado al tratamiento sinérgico con estas sustancias. En torno a esto, han sugerido que la metformina y el salicilato activan de manera sinérgica AMPK para reducir la proliferación de células tumorales de próstata y pulmón *ex vivo* a través de la reducción de la lipogénesis (O'Brien et al., 2015). Por otro lado, han propuesto que el tratamiento con metformina y en este caso, aspirina, activa AMPK e

induce apoptosis de manera sinérgica en modelos *in vitro* de cáncer de mama (Talarico et al., 2016). Además de la sinergia entre metformina y salicilato, hemos demostrado por primera vez que el tratamiento individualizado con salicilato 50 μM reduce el estrés de poliQs en neuronas y células musculares en *C. elegans* (**Figura 3.2.2 y 3.2.3**), del mismo modo que había sido mostrado para el tratamiento con metformina 2000 μM (Sanchis et al., 2019).

Ambas sustancias, metformina y salicilato, tienen un marcado carácter pleiotrópico, que hace que modulen la actividad de multitud de dianas farmacológicas (Huang et al., 2011; The Diabetes Prevention Program Research Group, 2012). Esto implica que su uso de forma crónica, para tratar una enfermedad determinada, conlleva el peligro de producir efectos secundarios al activar una de estas dianas no deseadas. Por tanto, si se pudiese reducir su dosis, se podría paliar efectos secundarios no deseados. En este trabajo hemos demostrado que reducir la dosis de cualquiera de estas dos sustancias, hasta diez veces por debajo de la dosis efectiva, no tiene efecto alguno en gusanos nematodos *C. elegans* (**Figura 3.2.2 y 3.2.3**). Sin embargo, cuando ambos fármacos se administran simultáneamente, a estas dosis tan bajas, se obtiene un efecto protector frente al estrés de poliQs en neuronas y células musculares (**Figura 3.2.2 y 3.2.3**). Varios autores han propuesto diferentes mecanismos de acción de la metformina cuando se administra individualmente en contextos de toxicidad por expansiones repetitivas para reducir el estrés inducido por poliQs y por péptidos RAN, que involucran a mTOR, AMPK y PKR (Arnoux et al., 2018; Sanchis et al., 2019; Zu et al., 2020). Estos trabajos evidencian el amplio espectro de acción de esta molécula en contextos similares. Por tanto, es probable que sean varias las dianas que se activan simultáneamente dentro de un contexto patológico único. Con nuestro abordaje, ese escenario es relativamente menos probable, ya que la plétora de dianas que activan cada uno no son plenamente coincidentes.

II.2 La protección celular mediada por la sinergia metformina y salicilato es dependiente de AMPK α 2 y AMPK β 2

AMPK es una diana común para los fármacos metformina y salicilato, los cuales inducen la activación del complejo por diferentes mecanismos (Hawley et al., 2012; Owen et al., 2000). Ello es extremadamente útil para proponer un mecanismo que explique la protección celular sinérgica de estas sustancias.

Nuestros experimentos muestran que la subunidad AAK-2/AMPK α 2 es esencial para la protección celular mediada por el tratamiento sinérgico, en un contexto de toxicidad inducida por poliQs, que se expresan en neuronas y en células musculares (**Figura 3.2.4 y 3.2.6**). Otros autores, sugirieron que la neuroprotección frente a poliQs, inducida por metformina, requiere AAK-2/AMPK α 2 (Sanchis et al., 2019; Vazquez-Manrique et al., 2016). A su vez, otros autores demostraron que la activación de AAK-2/AMPK α 2, mediante metformina, extiende la longevidad en *C. elegans* (Onken and Driscoll, 2010). Más recientemente, Chen y colaboradores han diseccionado un mecanismo de acción coordinada donde la metformina activa AMPK e inhibe mTORC1, a través de la vía lisosomal, y con ello promueve la longevidad en *C. elegans* (Chen et al., 2017). AMPK también regula el metabolismo oxidativo mediante el incremento de la glucólisis y reducción de las reservas lipídicas (Moreno-Arriola et al., 2016). En este trabajo, sugieren que la subunidad AAK-2 es crucial para promover el metabolismo oxidativo, a través del tratamiento con metformina, en *C. elegans* (Moreno-Arriola et al., 2016). Sin embargo, trabajos recientes sugieren que el tratamiento con metformina puede resultar tóxico, reduciendo la supervivencia celular y acortando la esperanza de vida en nematodos envejecidos (Espada et al., 2019). En este contexto, han demostrado que la toxicidad inducida por la metformina está asociada con una disfunción mitocondrial que es independiente de la función de AMPK (Espada et al., 2019).

En este trabajo, hemos demostrado que otras subunidades del complejo AMPK (β 1 y β 2) tienen un papel modulador sobre la dinámica de agregación de poliQs y la función neuronal en *C. elegans*, empleando la genética tal y como se había hecho con AAK-2/AMPK α 2 con anterioridad (Sanchis et al., 2019; Vazquez-Manrique et al., 2016). Nuestros resultados muestran que la supresión de las distintas subunidades reguladoras, β 1 y β 2, codificadas por los genes *aakb-1* y *aakb-2* respectivamente, del complejo AMPK son esenciales para mantener la homeostasis de proteínas con poliQs en *C. elegans* (**Figura 3.2.4, 3.2.5 y 3.2.6**). Está establecido que el salicilato promueve la activación del complejo AMPK mediante su unión directa a la subunidad AMPK β (Hawley et al., 2012). Para diseccionar el mecanismo de acción del salicilato en la activación sinérgica de AMPK, evaluamos el tratamiento sinérgico con metformina y salicilato sobre mutantes *aakb-1* y *aakb-2*, en diferentes contextos de toxicidad por poliQs. Nuestros experimentos sugieren que solamente la subunidad AMPK β 2 es

requerida para el efecto protector promovido por el tratamiento sinérgico sobre la agregación de poliQs en células musculares en *C. elegans* (Figura 3.2.5). Además, hemos confirmado que AMPK α 2 interviene en el mecanismo neuroprotector mediado por metformina y salicilato, sin embargo, nuestros resultados descartan la función de AMPK β 1 en este contexto de toxicidad (Figura 3.2.6).

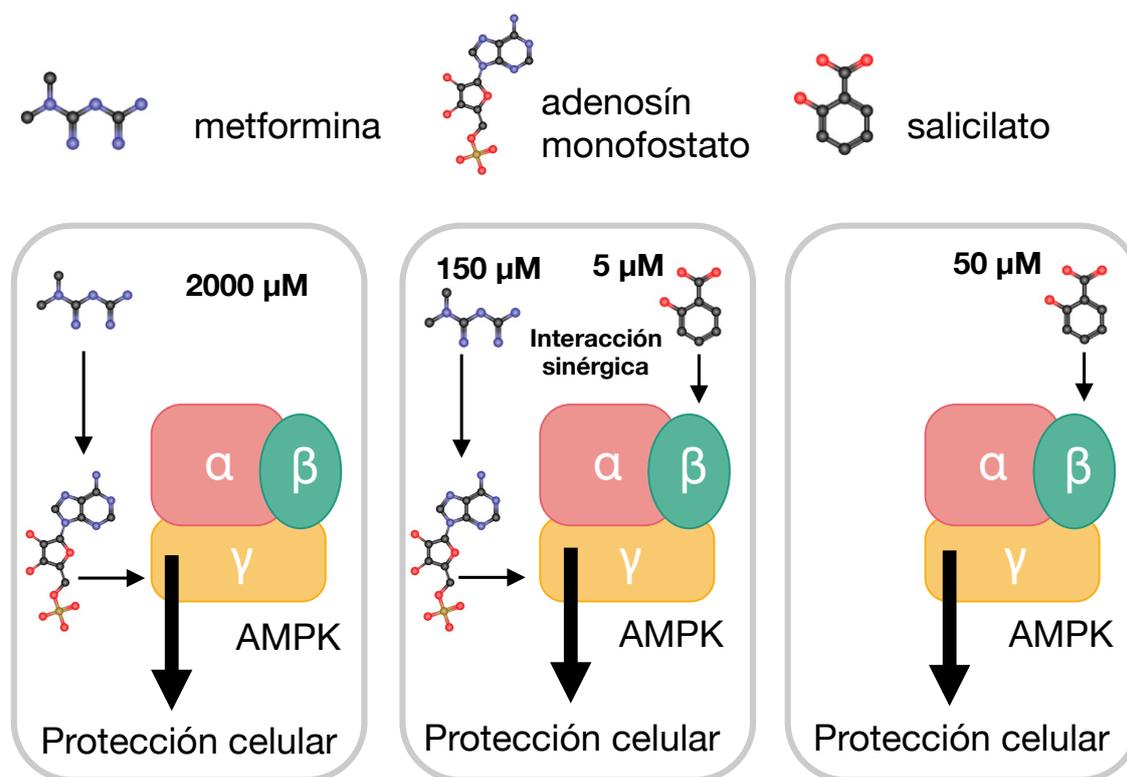


Figura 4.1. Modelos de activación de AMPK en células musculares mediante el tratamiento farmacológico con metformina y salicilato de manera independiente y en combinación. La metformina aumenta la concentración de AMP (adenosín monofosfato), el cual se une a la subunidad reguladora AMPK γ que induce la activación catalítica del complejo enzimático AMPK. El salicilato interacciona con la subunidad reguladora AMPK β que directamente activa la actividad catalítica de AMPK. Dosis bajas de metformina y salicilato promueven la activación de AMPK de manera sinérgica lo que promueve una protección celular.

En mamíferos, y quizás también en *C. elegans*, ambas subunidades poseen un patrón de expresión diferencial, ya que AMPK β 2 se expresa principalmente en tejido cardíaco y músculo esquelético, mientras que AMPK β 1 se expresa en hígado y otros tejidos no musculares (Sanz et al., 2013). Por tanto, el mecanismo de acción farmacológico puede involucrar diferentes subunidades en función

del tejido donde sea necesaria su acción, para que se muestre el fenotipo. Otros autores han profundizado en el papel protector del salicilato y sus derivados para extender la esperanza de vida en *C. elegans* a través de AMPK y DAF-16/FOXO, activando la autofagia y vías de control mitocondrial de respuesta a proteínas mal plegadas (Shamalnasab et al., 2018). Sin embargo, en estos trabajos no se investiga la implicación de las distintas subunidades reguladoras $\beta 1$ y $\beta 2$ en el mecanismo de acción del salicilato y derivados, que hemos descrito en este trabajo. En conjunto nuestros resultados señalan que el mecanismo de acción del tratamiento sinérgico con metformina y salicilato requiere de la funcionalidad de las subunidades AMPK $\alpha 2$ y AMPK $\beta 2$ para modular la agregación de poliQs e inducir una mejora funcional en *C. elegans* (Figura 4.1).

II.3 La activación de la autofagia es requerida para promover el efecto protector mediante el tratamiento sinérgico

Es ampliamente conocido que el complejo AMPK activa la autofagia mediante la inhibición de mTOR (Kim et al., 2011). De hecho, ya se ha demostrado que la activación de la autofagia, inducida por la activación de AMPK mediante metformina, es capaz de reducir la toxicidad por poliQs en gusanos *C. elegans* (Sanchis et al., 2019). Varias líneas de investigación han señalado que los agregados de mHtt inducen una desregulación de la autofagia, que contribuye a la patogénesis de la EH. Concretamente, las primeras evidencias que sostienen firmemente este hecho lo atribuyen a una acumulación de vacuolas autofágicas en diferentes modelos de ratón de la EH y células no neuronales de muestras de pacientes con EH (Martinez-Vicente et al., 2010). Otro grupos, a su vez, mostraron que algunos marcadores de autofagia (p62 y LC3-II) estaban alterados en el núcleo estriado de ratones transgénicos modelo de la EH, mientras que otros autores sugerían que los agregados de mHtt secuestraban mTOR, inhibiendo su actividad e induciendo la activación de la autofagia (Lee et al., 2012; Ravikumar et al., 2004). A pesar de ello, la disrupción del flujo autofágico no era la causa de esta desregulación, como ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas (revisado por Wong y Cuervo (Wong and Cuervo, 2010)). El grupo de investigación de la Prof. Cuervo demostró que la mHtt interaccionaba de forma aberrante con p62, dando lugar a un fallo en el reconocimiento del cargo que ocasionaba la formación de autofagosomas vacíos y por tanto, una autofagia menos eficiente en diferentes modelos de ratón de la EH y también en células de pacientes de esta enfermedad (Martinez-Vicente et al.,

2010). Además, un trabajo más reciente relaciona directamente una de las funciones de la Htt por actuar como anclaje o proteína de andamiaje requerida para la macroautofagia selectiva (agrefagia, lipofagia y mitofagia) (Rui et al., 2015).

Estas son algunas evidencias que demuestran que la autofagia, además de ser esencial para eliminar especies tóxicas de proteínas con poliQs, muestra una desregulación que está directamente relacionada con la patogénesis en la EH. En relación a esto, se ha profundizado en terapias dirigidas a la activación de la autofagia. Por ejemplo, Sanchis y colaboradores han observado una desregulación de marcadores de autofagia como p62, que se acumula en situaciones de autofagia reducida, en el modelo de ratón zQ175 (Sanchis et al., 2019). Estos autores han demostrado que el tratamiento con metformina reduce los niveles de p62, lo cual sugiere que se activa la autofagia, promoviendo una recuperación de las funciones motoras y psiquiátricas en el modelo de la EH zQ175 (Sanchis et al., 2019). Nuestros resultados sugieren el tratamiento sinérgico con metformina y salicilato requiere que la autofagia esté intacta, para producir el efecto protector en gusanos estresados por poliQs (**Figura 3.2.7**). Sin embargo, no tenemos datos que demuestren que AMPK sea la responsable de la activación del flujo autofágico. Por tanto, no podemos descartar que ambas vías puedan estar actuando paralelamente. Está ampliamente establecido que AMPK y componentes de la vía autofagia están fuertemente conservados entre nematodos y mamíferos. De hecho, la activación de AMPK en mamíferos se sabe que resulta protectora en diferentes modelos de ratón de la EH (Sanchis et al., 2019; Vazquez-Manrique et al., 2016). A su vez, promover la activación de la autofagia es protectora en modelos mamíferos de la EH (Sanchis et al., 2019). Además, el tratamiento con metformina, mediante la activación de AMPK, ha mostrado ser protector en otros contextos patológicos. En relación a esto, se ha sugerido que la metformina induce una protección dependiente de AMPK, la cual suprime el procesamiento proteolítico de SREBP-1c, la traslocación al núcleo de este factor de transcripción, y por consiguiente, la inducción de la expresión de dianas lipogénicas en ratones con resistencia a insulina (Li et al., 2011). En otro estudio, identifican que la mutación de sitios de fosforilación (Ser79 y Ser212) localizados en la acetil-CoA carboxilada (diana de AMPK), bloquea la tolerancia a la insulina asociada al tratamiento con metformina en ratones diabéticos (Fullerton et al., 2013). El salicilato también ha demostrado actuar vía AMPK en mamíferos para promover la protección celular. En un

estudio se ha mostrado que el salicilato regula la homeostasis del colesterol en cultivos primarios de macrófagos vía AMPK β 1 (Fullerton et al., 2015), en concordancia con lo expuesto por Ford y colaboradores en un contexto de resistencia a insulina (Ford et al., 2015). Además, la interacción sinérgica entre ambos ha sido demostrada en diferentes modelos de la enfermedad, en mamíferos, por varios autores (Ford et al., 2015; O'Brien et al., 2015; Talarico et al., 2016; Ye et al., 2016).

Todos estos trabajos ponen de manifiesto la posibilidad de que el tratamiento sinérgico con metformina y salicilato pueda ser protector en modelos murinos para la EH, e incluso poder trasladarlo a la clínica. Recientes trabajos desarrollados en nuestro grupo han validado el papel protector de la metformina en modelos de *C. elegans* y murinos para la EH, y estudios observacionales en pacientes, los cuales son la base para futuros ensayos clínicos en humanos (Hervás et al., 2017; Sanchis et al., 2019).

II.4 La metformina y el salicilato podrían funcionar contra otras enfermedades neurodegenerativas

Varias enfermedades neurodegenerativas, con diferente etiología, comparten muchas características. Por ejemplo, las enfermedades causadas por poliQs (donde se enmarca la EH), la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, entre otras, muestran agregados de proteínas en las neuronas más afectadas por la enfermedad (Ross and Poirier, 2004). Otras, como la enfermedad de Lafora, también muestran agregados pero mayoritariamente compuestos de poliglucosanos (Nitschke et al., 2018). En Parkinson y Alzheimer, la activación de AMPK ha sido investigada como una potencial estrategia terapéutica (Curry et al., 2018; Wang et al., 2019). A su vez, esta estrategia farmacológica, basada en la activación de AMPK mediante metformina, ha mostrado ser eficiente en un modelo de ratón para la enfermedad de Lafora (Berthier et al., 2016). En relación a Parkinson y Alzheimer, se ha evaluado el efecto de la metformina sobre diferentes modelos animales de estas patologías, y se ha observado, que en función del contexto patológico, la diana activada y el efecto puede ser distinto. Por ejemplo, el tratamiento con metformina reduce la neurodegeneración y la agregación de α -sinucleína en modelos de ratón de manera dependiente de AMPK (Lu et al., 2016). Sin embargo, en otro estudio, observaron que la pérdida de AMPK no afectaba al efecto neuroprotector de la metformina en ratones

deficientes de esta enzima (Bayliss et al., 2016). Estas evidencias refuerzan la necesidad de identificar dianas más específicas que activen AMPK. A su vez, varios estudios demuestran que la metformina puede desencadenar efectos opuestos sobre el proceso degenerativo en Alzheimer. Por ejemplo, el tratamiento con metformina incrementa la biogénesis del péptido A β de manera independiente a AMPK (Chen et al., 2009). En otro estudio más reciente, muestran que la metformina puede agravar el proceso neurodegenerativo en ratones modelo deficientes para ApoE (Apolipoproteína E) (Kuhla et al., 2019). En este estudio, demuestran que la metformina, en lugar de activar AMPK, promueve la lipogénesis en el cerebro que causa un deterioro cognitivo en los animales (Kuhla et al., 2019). Por tanto, estas evidencias ilustran la necesidad de identificar moléculas que modulen de una manera más específica la actividad de AMPK, evitando la activación de otras dianas.

En nuestro trabajo, hemos demostrado que el tratamiento sinérgico con metformina y salicilato puede activar específicamente AMPK, probablemente más restrictivamente que otros fármacos, administrados de forma independiente, como la metformina o el salicilato, a mayor concentración. Esta sinergia podría promover efectos protectores dependientes de AMPK en diferentes contextos patológicos de agregación. Por tanto, hemos profundizado en el uso del tratamiento sinérgico en modelos de *C. elegans* que expresan la proteína α -sinucleína la cual tiende a agregarse en función de la edad. Nuestros resultados muestran que este tratamiento reduce la agregación de α -sinucleína y promueve una mejora fisiológica de los animales tratados (**Figura 3.2.8**).

Estos resultados refuerzan la posibilidad de que este tratamiento combinado pueda ser empleado para el tratamiento de diferentes modelos de mamífero de enfermedades neurodegenerativas que tienen características en común. A pesar de la conservación filogenética de AMPK desde nematodos hasta mamíferos, poco se sabe sobre el papel de cada una de sus isoformas y subunidades de acuerdo al perfil de expresión, remarcando la necesidad de estudios que profundicen sobre ello.

Capítulo III. Diferentes vías de señalización hormonal modulan de manera opuesta la homeostasis de proteínas a través de cambios en el metabolismo lipídico

En este estudio hemos demostrado que la disrupción de un componente de la sinapsis eléctrica, UNC-1/STOML3, modula la agregación de poliQs induciendo un exceso de señalización neurohormonal mediada por la sulfotransferasa citosólica SSU-1. Esta señalización hormonal es desencadenada específicamente en las neuronas ASJ para liberar señales a tejidos distales que activan receptores nucleares de hormonas, como NHR-1, promoviendo la regulación de genes diana. Análisis transcriptómicos han mostrado que NHR-1 está regulando genes del metabolismo lipídico para modular la homeostasis de proteínas con poliQs. A su vez, hemos identificado que otro NR, DAF-12, es protector frente a la agregación de poliQs, lo que contrasta con NHR-1, cuya función parece ser la opuesta.

III.1 La disrupción de determinadas sinapsis eléctricas modula la homeostasis de proteínas

La señalización sináptica garantiza la comunicación celular mediante la liberación de neurotransmisores (sinapsis química) y el intercambio de iones por canales tipo GAP (sinapsis eléctrica). Se ha sugerido que la sinapsis química modula la agregación de poliQs en células musculares (Garcia et al., 2007). Sin embargo, hasta el momento, se desconocía el papel de la sinapsis eléctrica en este contexto. Por tanto, nos propusimos profundizar en ello mediante la identificación de genes que modulan la sinapsis eléctrica y la agregación de poliQs. Identificamos un componente de la sinapsis eléctrica, UNC-1/STOML3 (Chen et al., 2007; Rajaram et al., 1998), cuya disrupción potencia la agregación de poliQs, además de llevar asociado una alteración motora en *C. elegans* (**Figura 3.3.1 y 3.3.3**). Además, UNC-1 también modula la agregación de la proteína α -sinucleína y la proteína β -amiloide (**Figura 3.3.4**), reflejando la importancia de que enfermedades que comparten características fenotípicas pueden converger en mecanismos moduladores y dianas comunes.

La mutación *unc-1(vlt10)* aumenta la formación de cuerpos de inclusión de poliQs tanto en neuronas como en células musculares. Sin embargo, hemos demostrado que la función moduladora de UNC-1 está localizada en el sistema nervioso para regular la homeostasis de proteínas en células musculares (**Figura 3.3.5 y 3.3.6**) y, probablemente en neuronas, mediante una señalización no autónoma. Hemos identificado que este papel modulador no es universal para todas las SLPs neuronales codificadas por el genoma de *C. elegans*. Solamente UNC-24/STOML1 reproduce fenotipos motores similares a mutaciones en *unc-1* (Carroll et al., 2006), al igual que potencia el fenotipo de agregación de poliQs (**Tabla 3.3.1**).

En mamíferos hay cinco genes que codifican estomatinas (estomatina, *Stoml1*, *Stoml2*, *Stoml3*, podocin) mientras que en *C. elegans* hay diez genes de SLPs (tres neuronales: *unc-1*, *unc-24* y *mec-2* y siete no neuronales: *stl-1*, *sto-1*, *sto-2*, *sto-3*, *sto-4*, *sto-5*, *sto-6*) (Hobert, 2013; Lapatsina et al., 2012, www.wormbook.org). Las estomatinas de mamíferos son proteínas integrales de membrana que se asocian a regiones enriquecidas en colesterol (*lipid rafts*) que pertenecen a la familia de proteínas con dominios SPFH (presente en estomatinas, prohibitinas, flotilinas y HflC/K) (Lapatsina et al., 2012). Recientemente, se ha demostrado que las estomatinas se pueden unir directamente a colesterol mediante un sitio de unión localizado en la región C-terminal (Rungaldier et al., 2017). Nuestro estudio filogenético muestra que UNC-1 y UNC-24 estructuralmente están próximos evolutivamente a hSTOML3 y hSTOML1, respectivamente, mientras que hSTOML2 está más cercano a MEC-2 y proteínas prohibitinas de *C. elegans* (PHB-1 y PHB-2) y a la proteína humana (hProhibitina) (**Figura 3.3.2**). Las prohibitinas son proteínas que se anclan a la membrana mitocondrial y modulan la actividad mitocondrial, al igual que STOML2. Ha sido descrito que el complejo mitocondrial prohibitina promueve la longevidad a través del metabolismo energético y lipídico en *C. elegans* (Artal-Sanz and Tavernarakis, 2009). Por otro lado, STOML2 ha demostrado tener un papel neuroprotector para un contexto patológico de la enfermedad de Parkinson debido a su interacción con parkina en la mitocondria (Zanon et al., 2017). En cuanto a STOML3, se ha demostrado que la deficiencia de este gen produce una pérdida sustancial de mecanosensibilidad en ratones, que es agravada en animales con mutaciones en *asic-2* y *asic-3*, proteínas que codifican canales de iones (Moshourab et al., 2013). Además, recientes investigaciones sugieren que STOML3 modula la

sensibilidad de canales de iones en la membrana de neuronas sensoriales mediante la captación de colesterol (Qi et al., 2015).

Por otro lado, el genoma de *C. elegans* contiene 25 genes que codifican inexinas, las cuales pueden actuar en cooperación con SLPs (Altun et al., 2009). Hemos observado que mutaciones en las inexinas *unc-7* y *unc-9*, reproducen fenotipos similares a mutantes *unc-1* y *unc-24* (**Tabla 3.3.1**), reforzando la idea de que las SLPs pueden actuar de forma cooperativa con inexinas, para modular la sinapsis eléctrica neuronal, neuromuscular y muscular, a través de uniones en hendidura tipo GAP (del inglés *gap junction*) (Hall, 2017). En relación a esto, se ha descrito que UNC-1 y UNC-9 pueden funcionar juntos para regular el acoplamiento eléctrico en células musculares (Chen et al., 2007). Nuestros resultados muestran que la pérdida de función de *unc-9* potencia la formación de cuerpos de inclusión en animales que expresan 40Q en células musculares (**Tabla 3.3.1**), e induce una descoordinación motora de manera similar a la que muestran los mutantes *unc-1(vlt10)* como ya había sido descrito (Chen et al., 2007). Además, este aumento de agregación lo hemos observado también en mutantes *unc-7(e5)* (**Tabla 3.3.1**). Recientemente, Walker y Schafer han relacionado la función de UNC-7 con un papel funcional en mecanosensación en *C. elegans* (Walker and Schafer, 2020). Otras inexinas que no contemplan fenotipos de descoordinación motora como *inx-2*, *inx-6* e *inx-7* muestran patrones diferenciales, donde exclusivamente *inx-2* potencia el fenotipo de agregación (**Tabla 3.3.1**). Hemos confirmado que las inexinas UNC-7 e INX-2 regulan la agregación de poliQs en células musculares desde el sistema nervioso al igual que UNC-1, siendo la disrupción de *unc-7* más severa que la pérdida funcional de *inx-2* (**Figura 3.3.7-A**). Finalmente, hemos demostrado que *unc-1* y *unc-7* pueden operar en el mismo proceso para modular la homeostasis de proteínas en células musculares, posiblemente desde el sistema nervioso, mientras que *inx-2* parece actuar paralelamente (**Figura 3.3.7-B y C**).

Las inexinas están conservadas evolutivamente entre especies, pudiendo encontrar en mamíferos proteínas homólogas conocidas como panexinas, las cuales se piensa que funcionan exclusivamente como canales y no como uniones GAP (Beyer and Berthoud, 2018). En humanos solamente hay tres genes que codifican panexinas (*PANX1*, *PANX2*, *PANX3*) (revisado por Beyer y Berthoud (Beyer and Berthoud, 2018)), los cuales están implicados en enfermedades cardiovasculares, inflamación, cáncer y neuropatías (Begandt et al., 2017; Crespo

Yanguas et al., 2017; Penuela et al., 2014). Mutaciones en *PANX1* han sido relacionadas con pérdida auditiva, fallo ovárico prematuro y defectos esqueléticos en humanos (Shao et al., 2016). Recientemente, en el trabajo liderado por el Prof. Schafer, se ha demostrado que el gen panexina 1 (*Panx1*) de ratón puede rescatar la función mecanosensorial de la inexina *unc-7* en mutantes de *C. elegans*, sugiriendo que las funciones de mecanotransducción neuronal entre inexinas/panexinas están conservadas entre nematodos y mamíferos (Walker and Schafer, 2020). Los genes de panexinas *PANX1* y *PANX2*, se expresan en el sistema nervioso central, a diferencia de *PANX3* (Ahmadian et al., 2019). Además, se ha mostrado que los canales Panx-1 pueden contribuir a la formación de radicales libres de oxígeno en líneas humanas de keratinocitos (Onami et al., 2014), la cual es una importante vía de toxicidad en la EH, Parkinson y Alzheimer. Por tanto, varias estrategias terapéuticas investigadas están destinadas al uso de inhibidores de estos canales para bloquearlos (revisado por Ahmadian y colaboradores (Ahmadian et al., 2019)). En conjunto nuestros resultados demuestran que la perturbación de la sinapsis eléctrica induce un desequilibrio de la homeostasis de proteínas en *C. elegans*. A su vez, hemos demostrado que *unc-1* podría estar actuando de forma cooperativa con la inexina *unc-7* para promover esta regulación

III.2 La disrupción de *unc-1* perturba la señalización neurohormonal mediada por SSU-1 y NHR-1 y desequilibra la homeostasis de proteínas

La sulfotransferasa citosólica SSU-1, expresada exclusivamente en las neuronas ASJ, desencadena la liberación de señales hormonales sulfatadas hacia tejidos distales para activar receptores nucleares. En alusión a su nombre, SSU-1 suprime fenotipos motores asociados a SLPs, como *unc-1* y *unc-24* (Carroll et al., 2006). Estos resultados nos motivaron a evaluar su papel sobre el fenotipo de agregación tóxica asociado a mutaciones en *unc-1*. Curiosamente, observamos que *ssu-1(fc73)* suprime robustamente el efecto potenciador de la agregación debido a mutaciones *e580* y *vlt10* en *unc-1* (**Figura 3.3.8**). Puesto que SSU-1 está implicado en el procesamiento de señales hormonales en *C. elegans* (Burton et al., 2018) al igual que algunas sulfotransferasas citosólicas de mamíferos (SULT1A1, SULT1E1, SULT2A1, SULT2B1a y SULT2B1b) (Gamage et al., 2006; Mueller et al., 2015; Rižner, 2016), nuestros resultados sugieren que la disrupción de la sinapsis eléctrica asociada a *unc-1(vlt10)* conlleva un exceso de señal hormonal mediado

por esta enzima (**Figura 4.2**). En humanos, se ha descrito una correlación entre el número de copias de los genes de dos sulfotransferasas *SULT1A3* y *SULT1A4*, y la edad de inicio de la enfermedad de Alzheimer y, quizás, de Parkinson (Butcher et al., 2018). Estas enzimas participan en la síntesis de dopamina (Sidharthan et al., 2013) lo que podría explicar su relación con la enfermedad neurodegenerativa. Salvando las distancias evolutivas entre gusanos y humanos, y las diferencias bioquímicas entre SSU-1 y los productos de *SULT1A3* y *SULT1A4*, nuestros resultados contrastan con los referidos arriba, puesto que en nuestro caso la inhibición de SSU-1 resulta beneficiosa (**Figura 3.3.8**).

Recientemente se ha descrito que las neuronas IL2L y PVQR presentan sinapsis eléctricas con ASJ, las neuronas donde se expresa SSU-1 (Cook et al., 2019). UNC-1 funciona en el sistema nervioso para promover una señalización hacia el resto de tejidos del organismo (al menos sobre células musculares). Nuestros datos de silenciamiento de *unc-1*, específico sobre ASJ, IL2 y PVQ muestran que UNC-1 es requerido en neuronas IL2 para modular la agregación de poliQs en células musculares (**Figura 3.3.9-B**). Además, el rescate específico de neurona confirma que UNC-1 funciona en neuronas IL2 para modular la agregación de poliQs (**Figura 3.3.9-C**). La clase de neuronas IL2 incluye seis neuronas sensoriales, que proyectan cilios al exterior, alrededor de la boca del gusano. No se sabe con exactitud si estas neuronas son polimodales (Hilliard et al., 2005), pero se sabe que sufren fuertes remodelaciones durante la formación de la larva *dauer* (Bargmann and Horvitz, 1991; Schackwitz et al., 1996). De hecho, la salida del estadio *dauer* es inhibida por las neuronas sensoriales IL2, mientras que ASJ y AWC promueven la entrada del gusano en este estadio (Bargmann and Horvitz, 1991; Ouellet et al., 2008), mediante la emisión de señales hormonales de tipo insulínico, como DAF-28 (Li, 2003). Por tanto, UNC-1 funciona en neuronas que modulan la función de ASJ para regular su función. Cuando la sinapsis eléctrica entre IL2L y ASJ está perturbada por la falta de función de *unc-1*, esto tiene un impacto sobre la funcionalidad de ASJ y, por consiguiente, sobre las hormonas que procesa SSU-1 (**Figura 4.2**).

Durante la señalización hormonal, la pérdida de sulfato es esencial para que el ligando pueda interactuar con su receptor. El genoma de *C. elegans* codifica tres sulfatasas (Sardiello et al., 2005) pero solamente la pérdida funcional de las arilsulfatasas, *sul-2* y *sul-3*, reduce el patrón de agregación en mutantes *unc-1*

(Figura 3.3.10). De manera interesante, SUL-2 y SUL-3 son evolutivamente más cercanas a las sulfatasas humanas de esteroides (hSTS) que SUL-1 (heparan endosulfatasa en *C. elegans*), siendo SUL-2 la más cercana. Estos resultados respaldan la hipótesis de que la disrupción de *unc-1* puede alterar la señalización a través de hormonas esteroideas sulfatadas, que requieren la función de SSU-1, SUL-2 y SUL-3 (Figura 4.2). En este sentido es interesante resaltar que, al igual que la actividad de las sulfotransferasas, la modulación de la función de las sulfatasas, mediante fármacos, puede ser una estrategia potencial para reducir el estrés de poliQs. En este sentido, otros autores están investigando el efecto del inhibidor de sulfatasas humanas, STX64, para aliviar el estrés ocasionado por los depósitos amiloides y mejorar la funcionalidad cognitiva en un modelo de ratón para la enfermedad de Alzheimer (Pérez-Jiménez et al., 2019). Además, otros autores han publicado que otro inhibidor, DU-14, tiene un efecto protector sobre la memoria espacial y la plasticidad sináptica, en un modelo de rata de toxicidad inducida por la proteína β -amiloide (Yue et al., 2016). Esta estrategia también ha sido investigada para abordar nuevas terapias anticancerígenas focalizadas en la inhibición de sulfatasas de estrógenos (N. Morozkina and G. Shavva, 2020).

Recientemente, se ha descrito que la señalización neurohormonal mediada por SSU-1 antagoniza la señalización de la ruta de la insulina, para regular el estrés osmótico a través de NHR-1 en *C. elegans* (Burton et al., 2018). Tras demostrar que *ssu-1(fc73)* suprime completamente el fenotipo de agregación asociado a mutaciones en *unc-1*, decidimos investigar el papel de *nhr-1* en este contexto de toxicidad. Nuestros resultados muestran que el bloqueo funcional de *nhr-1* reduce el patrón de agregación asociado a mutantes *unc-1(vlt10)* (Figura 3.3.12-A), al igual que hemos observado cuando suprimimos la actividad de *ssu-1*, *sul-2* y *sul-3* en un fondo genético *unc-1(vlt10)*. Hemos confirmado que NHR-1 modula la dinámica de agregación de poliQs, al menos, en las células del músculo (Figura 3.3.12-B y C), sugiriendo que la señal producida en ASJ por SSU-1 difunde hasta las células musculares y otros tejidos distales para modular la homeostasis de proteínas (Figura 4.2).

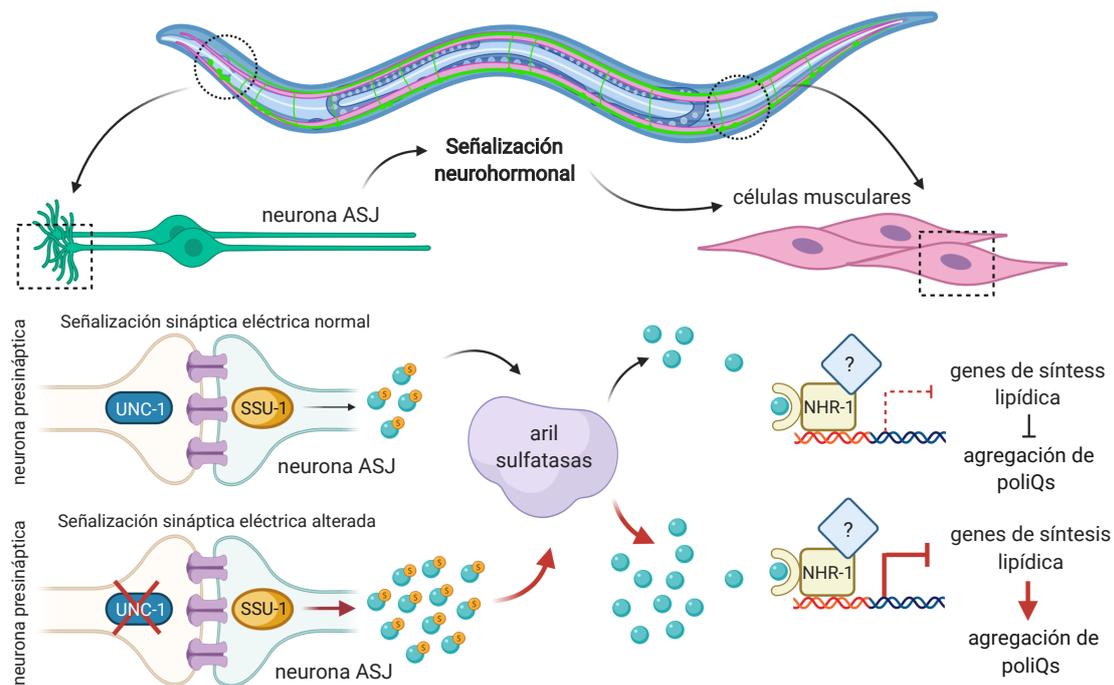


Figura 4.2. Modelo del mecanismo de regulación de la síntesis lipídica por NHR-1 mediante la señalización neurohormonal a través de SSU-1. La funcionalidad o la falta de UNC-1 da lugar a dos escenarios distintos: **(#1)** En condiciones basales, los animales *40Q* poseen una sinapsis eléctrica normal que induce la síntesis limitada de una hormona sulfatada desconocida por SSU-1 en ASJ, que tras la pérdida del sulfato por arilsulfatasas, activa al receptor NHR-1, lo cual tiene un impacto sobre sus dianas transcripcionales. **(#2)** La alteración de la sinapsis eléctrica entre IL2 y ASJ, por la disrupción de UNC-1/STOML3, induce un exceso hormonal que hace que NHR-1 esté sobreactivado, de forma que tiene un mayor efecto sobre los genes que regula. Las arilsulfatasas, SUL-2 y SUL-3, catalizan la pérdida de sulfato de esta hormona para facilitar su interacción con NHR-1. Adicionalmente, NHR-1 podría estar actuando solo o en cooperación con otros NRs, para reprimir genes de síntesis de lípidos que tienen un impacto sobre la homeostasis de proteínas con poliQs en las células musculares. Figura creada mediante la plataforma Biorender.

III.3 NHR-1 induce una remodelación del metabolismo lipídico para promover un desequilibrio de la homeostasis de proteínas

En este trabajo hemos demostrado que la supresión funcional de NHR-1 restaura la homeostasis de proteínas en un contexto de toxicidad asociado a mutaciones en *unc-1*. Hemos profundizado a nivel transcriptómico en la identificación de genes que podrían estar regulados por NHR-1. Los análisis transcriptómicos muestran que la reducción de la agregación de poliQs asociada a la supresión de *nhr-1* en un fondo genético mutante *unc-1* va ligada a una adaptación del metabolismo lipídico (Figura 3.3.16, 3.3.17 y 3.3.18). Esta

desregulación está reflejada en una reducción de la expresión de genes que participan en la vía de síntesis de ácidos grasos *de novo*. Hemos validado los niveles de expresión de algunos de ellos, *pod-2*, *elo-2*, y *elo-5*, mediante RT-qPCR y hemos confirmado que la expresión de estos genes estaba reducida en los mutantes *unc-1* con respecto al doble mutante *unc-1; nhr-1* (**Figura 3.3.18-B**). Además, hemos confirmado que el silenciamiento génico mediante ARNi de *elo-2* y *fat-6* no tiene ningún efecto sobre el simple mutante *unc-1*, pero sí sobre animales silvestres *40Q*, el simple mutante *nhr-1* y el doble mutante *unc-1; nhr-1* (**Figura 3.3.18-C**). Estos resultados sugieren por un lado, que la expresión de estos genes está reducida en los mutantes, y por tanto, no vemos efecto y por otro lado, que ambos genes son moduladores de la agregación de poliQs.

El papel modulador de la homeostasis lipídica ha sido previamente observado en otros NRs, como son NHR-49/HNF4 α y NHR-80/HNF4 α en *C. elegans*. A diferencia de NHR-1, estos receptores presentan homología con receptores nucleares de mamífero HNF4 α , y poseen funciones similares a PPAR α , los cuales tienen un papel modulador sobre el metabolismo lipídico y el transporte de glucosa en mamíferos (Hashimoto et al., 2000; Stoffel and Duncan, 1997). Ambos receptores, HNF4 α y PPAR α , pueden interaccionar en el hígado para regular conjuntamente la beta-oxidación lipídica mitocondrial y peroxisomal, el metabolismo del colesterol y ácidos biliares, el metabolismo de las lipoproteínas y consecuentemente, la prevención de la esteatosis hepática (revisado por Chamouton y Latruffe (Chamouton and Latruffe, 2012)). Por tanto, la falta de expresión de ambos receptores, HNF4 α y PPAR α , induce una acumulación lipídica en el hígado, que puede llevar a una hipoglucemia en ratones deficientes para estos receptores (Djouadi et al., 1998; Hayhurst et al., 2001). Además, mutaciones en HNF4 α han sido asociadas con una forma de diabetes hereditaria conocida como MODY1 (del inglés *mature-onset diabetes of the young 1*) (Yamagata et al., 1996). Otros autores identificaron que mutaciones puntuales en el gen *PPAR* α están asociadas a un desequilibrio del contenido de plasma total, apolipoproteína B-LDL y colesterol LDL, lo que producía una dislipidemia en los pacientes afectados (Vohl et al., 2000). Además de la isoforma PPAR α , hay otras dos isoformas, PPAR γ y PPAR β/δ , con funciones protectoras para enfermedades neurodegenerativas (revisado por Moutinho y colaboradores (Moutinho et al., 2019)). Los receptores PPAR pueden ser activados por varios ligandos lipídicos de tipo PUFAs (Wahli and Michalik, 2012). El uso de agonistas lipídicos promueve la activación de estas isoformas en diferentes contextos

patológicos, para reducir el transporte de colesterol, la resistencia a insulina, y promover la protección celular (hiperlipidemia; PPAR α , diabetes tipo II; PPAR γ y síndrome metabólico; PPAR β/δ) (Barish, 2006; Duffy and Rader, 2005; Lehrke and Lazar, 2005). La activación específica de PPAR γ y PPAR β/δ ha sido también testada en modelos de mamífero de la EH. Se ha observado que la activación de PPAR γ revierte los defectos motores y la pérdida de peso, y a su vez, reduce los agregados de mHtt en el ratón R6/2, modelo de la EH (Chiang et al., 2010). Por otro lado, se ha descrito que la activación de PPAR β/δ en diferentes modelos de la EH (BAC-HD97 y N171-82Q) es neuroprotectora y extiende la supervivencia de los animales (Dickey et al., 2016). Estas son algunas evidencias que demuestran que los NRs implicados en el metabolismo lipídico en mamíferos pueden ser potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la EH.

Estas evidencias muestran que una desregulación del metabolismo lipídico en mamíferos puede conllevar una acumulación excesiva de lípidos, predominantemente en el hígado. En nuestro caso, hemos detectado que los mutantes *unc-1* acumulan lípidos, predominantemente en el intestino (**Figura 3.3.19**), a pesar de tener reducida la expresión de algunos genes que codifican enzimas de síntesis lipídica. Ha sido descrito por otros autores que una mayor abundancia lipídica en los gusanos, acompañada de una activación de vías de lipogénesis y catabolismo lipídico, es requerida para promover la longevidad en animales, cuyas células de la línea germinal han sido extirpadas (revisado por Lemieux y Ashrafi (Lemieux and Ashrafi, 2016)). Sin embargo, no está claro si la activación de genes que promueven la longevidad depende de lípidos que actúan como ligandos de NRs o de señales de estrés en respuesta a lípidos que no pueden ser empaquetados dentro de depósitos o reservas lipídicas (Lemieux and Ashrafi, 2016). En torno a esto, se ha sugerido que lo que podría explicar en ciertos casos el efecto lipídico es la calidad, más que la cantidad, lo cual es relevante considerando nuestros resultados. Nuestros datos reflejan que a pesar de que los mutantes *unc-1* acumulen más lípidos, estos *per se*, no están igualmente representados en las distintas clases lipídicas. En su defecto, hemos observado que la totalidad de ácidos grasos está reducida significativamente en los mutantes *unc-1* con respecto a animales silvestres (Bristol, N2), lo que sugiere que mutaciones en *unc-1* inducen una desregulación de la síntesis de ácidos grasos (**Figura 3.3.20**). Estos resultados pueden sugerir algo de controversia, dado que está demostrado que modelos animales de la EH, como

zQ175, y pacientes muestran graves pérdidas de peso que van asociadas a la toxicidad desencadenada por la mHtt (Djousse et al., 2002; Peng et al., 2016). En relación a esto, han observado que la mHtt compromete la función del páncreas, desencadenando una desregulación metabólica y el desarrollo de diabetes en pacientes y modelos de ratón de la EH (Andreassen, 2002; Hurlbert et al., 1999). Además, en pacientes de la EH, esta pérdida de peso ha sido atribuida también a un estado hipermetabólico que conlleva un gasto de energía elevado (revisado por Cai y colaboradores (Cai et al., 2012)).

Nuestros resultados muestran una reducción de todas las especies de ácidos grasos (**Figura 3.3.20-A**), entre los que se incluyen el lípido neuroprotector ácido oleico (**Figura 3.3.20-B**) (Imanikia et al., 2019). *fat-6*, cuya expresión está regulada por NHR-80, es una de las desaturasas, junto con *fat-7*, que actúa sobre el ácido esteárico para sintetizar ácido oleico. Recientemente, se ha demostrado que NHR-49 regula la expresión de *fat-7* junto a un co-regulador, MDT-15, en condiciones de bajas temperaturas (D. Lee et al., 2019). Los mutantes *mdt-15* muestran una reducción de la ratio ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados, debido a la menor expresión de *fat-7* (vea sección Introducción para detalles – **Figura 1.7**). Esta reducción de la ratio induce una disminución de la longevidad en estos animales y promueve la proteotoxicidad bajo condiciones de estrés inducido por bajas temperaturas (D. Lee et al., 2019). El complejo MDT-15/NHR-49 además de regular el metabolismo lipídico y la proteostasis, es requerido para regular genes de respuesta a estrés oxidativo (Goh et al., 2018). Concretamente, nuestros resultados muestran algo similar. La disrupción de *unc-1* promueve una actividad aumentada del receptor NHR-1 que reprime la expresión de *fat-6* (**Figura 3.3.18**). La reducción de *fat-6* promueve una reducción del ratio ácido oleico/ácido esteárico y ácido palmítoleico/ácido palmítico en los mutantes *unc-1*, lo que podría estar directamente relacionado con el aumento de agregación que observamos en estos animales (**Figura 3.3.20-B**) (vea sección Introducción para detalles – **Figura 1.7**). El ácido oleico es de los MUFAs más conocidos por su potencial papel protector para promover la longevidad y mejorar la proteostasis neuronal en *C. elegans* (Goudeau et al., 2011; Imanikia et al., 2019). Este lípido posee propiedades antioxidantes y neuroprotectoras en modelos de mamífero de isquemia cerebral (Song et al., 2019). Además, ha sido usado en ensayos clínicos para tratar a pacientes de la EH como terapia antioxidante (revisado por Bono-Yagüe y colaboradores (Bono-Yagüe et al., 2020)), aunque los resultados parece que no apoyan su uso como

tratamiento. Probablemente, la estrategia del ensayo basada en la suplementación de ácido oleico a los pacientes no sea la más eficiente. Quizás un abordaje más efectivo podría basarse en fármacos que modulen enzimas de síntesis de estos lípidos (desaturasas y elongasas, entre otras), que aumenten la producción endógena de lípidos con capacidad protectora.

Hemos demostrado que el ácido oleico estaba disminuido en un 40 % en el simple mutante *unc-1*, en ausencia de poliQs, con respecto a los controles silvestres (**Figura 3.3.20-B**). Para responder a la pregunta de si la reducción de ácido oleico, que es una sustancia pro-longevidad y neuroprotectora, era responsable del aumento de agregación de poliQs, evaluamos si la suplementación con ácido oleico inducía una reducción de la agregación de poliQs, lo que acabó confirmándose (**Figura 3.3.21**). Estos resultados sugerían que este lípido podría tener un papel en la modulación de la agregación de poliQs en células musculares. Además, el silenciamiento génico de *fat-6*, enzima clave en la síntesis de oleico, aumentaba la agregación de poliQs (**Figura 3.3.18-C**), lo cual apoyaba la hipótesis de que el ácido oleico desempeñaba un papel esencial en la protección celular en este contexto. Curiosamente, el tratamiento con ácido oleico fue doblemente más eficiente en un mutantes *unc-1*, probablemente debido al menor contenido endógeno de ácido oleico y a que la desregulación de la homeostasis de proteínas es más marcada (**Figura 3.3.21**). Estos resultados confirman que la reducción de la concentración de ácido oleico induce un aumento de la proteotoxicidad. En contraste, hemos observado que el tratamiento con ácido oleico en un mutantes *nhr-1* no modifica el patrón de agregación de poliQs (**Figura 3.3.21**), lo que podría sugerir que NHR-1 es necesario para el papel protector de este lípido en un contexto de toxicidad basal. A este respecto, se sabe que el ácido oleico actúa como señal lipídica para promediar la activación de SKN-1/Nrf, un conocido factor pro-longevidad, pero solo en gusanos a los que se les ha extirpado las células de la línea germinal (Lemieux and Ashrafi, 2016; Steinbaugh et al., 2015). SKN-1, además de promover la longevidad, induce resistencia al estrés (Blackwell et al., 2015; Miranda-Vizueté and Veal, 2017) y regula genes del metabolismo lipídico para paliar el exceso de grasas asociado a la falta de células de la línea germinal (Steinbaugh et al., 2015). Recientemente, ha sido descrito que SKN-1 puede ser activado como una respuesta UPR citosólica que a su vez, activa el proteasoma para reducir la acumulación de proteínas propensas a agregarse, como el péptido beta-amiloide (Lehrbach and Ruvkun, 2019). SKN-1 es homólogo a la familia de factores

de transcripción Nrf (*Nrf1*, *Nrf2*, *Nrf3*) de mamíferos (Blackwell et al., 2015). Los factores de transcripción, NRF-1 y NRF-2, pueden ser activados por PGC-1 α , para regular la expresión de genes de biogénesis mitocondrial y promover la longevidad (Gureev et al., 2019; Ploumi et al., 2017). PGC-1 α es un regulador clave del metabolismo energético y actúa como un sensor antioxidante (Liang and Ward, 2006; St-Pierre et al., 2006), además puede ser activado indirectamente por ácido oleico para modular los niveles de oxidación lipídica (Lim et al., 2013). En este trabajo, describen que el ácido oleico incrementa los niveles intracelulares de AMP cíclico, activando PKA (proteína quinasa A), la cual induce la fosforilación de SIRT1 para incrementar su actividad desacetilasa (Lim et al., 2013). SIRT1 activada promueve la desacetilación de PGC-1 α y por tanto, incrementa la expresión de genes de oxidación lipídica (Lim et al., 2013).

La reducción de MUFAs incide en la abundancia de PUFAs como el ácido linoleico (**Figura 3.3.20-B**), puesto que son precursores de su síntesis. El ácido linoleico es un lípido esencial con propiedades neuroprotectoras (revisado por Blondeau y colaboradores (Blondeau et al., 2015)). Aunque algunos autores han desafiado el efecto protector del ácido linoleico en el cerebro, y más investigación sería necesaria para concluir sobre ello (Taha, 2020). Los PUFAs son los conocidos como ácidos grasos esenciales ω -3 y ω -6. Recientemente se ha sugerido que algunos de ellos, como el ácido araquidónico y el dihomo- γ -linoleico, extienden la longevidad mediante la inducción de la autofagia en *C. elegans* y células de mamífero (O'Rourke et al., 2013). Los PUFAs son sustrato para la síntesis de triglicéridos (lípidos de reserva), y por tanto, su reducción podría tener un impacto perjudicial sobre los sistemas de almacenamiento de energía en forma de depósitos de grasa, también llamados *lipid droplets*. Estos sistemas de almacenamiento de lípidos están involucrados en la biogénesis de vesículas autofágicas (autofagosomas) y vesículas sinápticas en terminales presinápticos (Davletov and Montecucco, 2010; Dupont et al., 2014; Shpilka et al., 2015; Velázquez et al., 2016). Se ha descrito que algunas desaturasas como *fat-6* y *fat-7*, regulan el tamaño de los *lipid droplets* (Shi et al., 2013). Nuestros resultados indicaban que la disrupción de *unc-1*, produce una reducción de estas desaturasas que implica una reducción de la producción de MUFAs, y consecuentemente de PUFAs. Estos resultados, junto con las evidencias previas, sugieren que esta reducción pueda estar afectando a la biogénesis de los *lipid droplets*. Puesto que estos depósitos de grasa abastecen de lípidos a las membranas autofágicas, es obvio pensar que participen en la degradación de proteínas mediante la activación de

autofagia y el proteasoma, como se ha demostrado en líneas celulares de hepatocitos humanos (Ohsaki et al., 2006). Recientemente, se ha descrito que su función es esencial para la eliminación de cuerpos de inclusión citosólicos, con tendencia a agregarse, en levadura, sugiriendo que pueden tener una función relevante para el mantenimiento de la homeostasis de proteínas en este organismo (Moldavski et al., 2015). Por otro lado, se ha confirmado que el suplemento con PUFAs de un modelo de ratón para la EH es protector frente a los defectos motores promovidos por la mHtt (Clifford et al., 2002). Tomando en consideración estos trabajos, podemos postular que la disminución de MUFAs y PUFAs en los mutantes *unc-1* podría producir, a su vez, una afectación de los sistemas de reserva y por tanto, una menor eficiencia de las vías destinadas a la degradación de agregados de poliQs, aunque se necesita más investigación para confirmar esto.

Nuestros resultados están respaldados por varios trabajos que sugieren que los lípidos pueden tener un papel protector para el mantenimiento de la homeostasis proteica. Además, muchas enfermedades neurodegenerativas, como la EH, Parkinson y Alzheimer, tienen en común una desregulación del metabolismo lipídico que contribuye a la patogénesis (revisado por Shamim y colaboradores (Shamim et al., 2018)). Diferentes estrategias terapéuticas en ensayos clínicos están destinadas al tratamiento con lípidos MUFAs y PUFAs para paliar el proceso neurodegenerativo en pacientes con la EH, Parkinson y Alzheimer (revisado por Shamim y colaboradores (Shamim et al., 2018)), sin embargo una estrategia potencialmente atractiva sería modular la producción endógena de estos lípidos, más que suplementarlos exógenamente.

III.4 DAF-12 y NHR-1 modulan la agregación de poliQs mediante señales opuestas

Se ha descrito que un mismo NR puede regular la misma ruta de señalización de forma opuesta, esto es inhibiendo o induciendo la activación de la transcripción de genes implicados en esta ruta (Fisher and Lithgow, 2006; Gerisch et al., 2007; Pathare et al., 2012). Por ejemplo, un NR que puede hacer esto dependiendo de si está unido, o no, a un ligando (p.e. DAF-12 unido a ácido dafacrónico o DAF-12 sin ligando y unido a la proteína correpresora DIN-1) (Fisher and Lithgow, 2006; Gerisch et al., 2007). Otra forma de producir estas señales opuestas es mediante dimerización de NHR diferentes, como ocurre con NHR-

49, que puede unirse a NHR-80, para activar genes de desaturación, o a NHR-66, para reprimir genes que participan en la remodelación lipídica y procesamiento de esfingolípidos (Pathare et al., 2012). A su vez, hay evidencias que sostienen funciones opuestas de diferentes NRs sobre la regulación del metabolismo lipídico. Por ejemplo, NHR-80 es un conocido activador de la síntesis lipídica mediante la activación de la transcripción de *fat-6*, sin embargo NHR-64 regula opuestamente la síntesis lipídica y a su vez, promueve la oxidación lipídica (Goudeau et al., 2011; Liang et al., 2010). Esta función dual en respuesta a la presencia o ausencia de ligando, también ha sido observada en mamíferos en algunos receptores como el RXR (receptor X retinoide) y el RAR (receptor de ácido retinoico) (Huang et al., 2014). Además, estos receptores pueden dimerizar para modular la expresión de genes diana (Huang et al., 2014). A su vez, RXR puede formar heterodímeros funcionales con otros receptores como PPAR para regular el metabolismo lipídico (Michalik et al., 2006). Esto es relevante porque nuestros resultados muestran que dos receptores nucleares distintos, DAF-12 y NHR-1, modulan de manera opuesta la homeostasis de proteínas (**Figura 4.3**).

Hemos confirmado que la activación de DAF-12 mediante ácido dafacrónico es protectora frente a la toxicidad de poliQs (**Figura 3.3.11**). En contraste, hemos identificado una señalización neurohormonal que involucra a NHR-1, el cual requiere una hormona de carácter desconocido, para reprimir la transcripción de genes, que a su vez regulan la agregación de poliQs (**Figura 3.3.12**). Hemos demostrado la existencia de una interacción genética entre *daf-12* y *nhr-1*, en la cual la supresión de *nhr-1* restaura los niveles de agregación en mutantes *daf-12*. Además, permite que estén presentes en la misma cepa de gusanos mutaciones de pérdida de función de *unc-1* y de *daf-12*, que como hemos explicado previamente, induce letalidad cuando se expresan junto con las poliQs en células musculares. Nuestros datos no indican si ambos receptores están actuando en la misma vía de señalización o por el contrario, actúan paralelamente, para modular la homeostasis de proteínas (**Figura 3.3.15 y 4.3**).

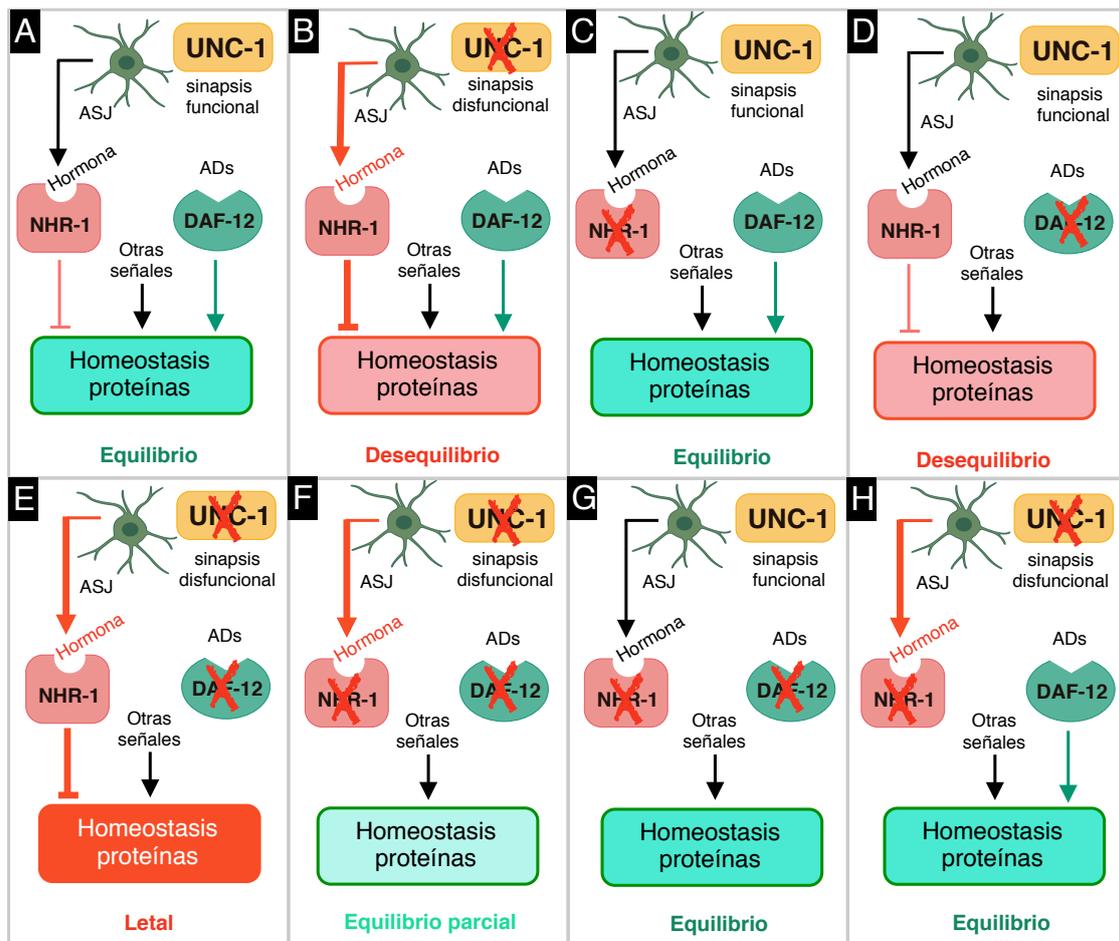


Figura 4.3. Modelo de señalización de los NRs DAF-12 y NHR-1 en la homeostasis de proteínas. (A) La activación de NHR-1 y DAF-12 dependiente de ligando (hormona desconocida y ácido dafacrónico: ADs) junto con otras señales, mantiene el equilibrio de la homeostasis de proteínas. (B) La disrupción sináptica asociada a la falta de función de UNC-1 induce un exceso de señalización hormonal que sobre-activa a NHR-1, produciendo un desbalance y favoreciendo la formación de agregados de poliQs. (C) La supresión de NHR-1 no modifica la homeostasis de proteínas debido a la compensación funcional de otros factores, como por ejemplo DAF-12. (D) La falta de función de DAF-12 promueve un desequilibrio de la homeostasis de proteínas. (E) La disrupción de UNC-1 y DAF-12 promueve un desequilibrio extremadamente nocivo que induce letalidad. (F) El triple mutante *unc-1, daf-12, nhr-1* es viable y muestra un equilibrio parcial de proteostasis. (G) La supresión de NHR-1 es epistática sobre el fenotipo de agregación tóxica asociado a la disrupción de DAF-12, promoviendo el equilibrio de la homeostasis. (H) El bloqueo funcional de NHR-1 restaura el equilibrio de la proteostasis en presencia de una alteración de la sinapsis eléctrica asociada a mutaciones en *unc-1* que consecuentemente conlleva un exceso hormonal.

Hemos demostrado que NHR-1 modula la agregación de poliQs mediante la represión de genes de síntesis lipídica, como FAT-6, entre otros, y consecuentemente, el contenido de ácido oleico, y que quizás este mismo lípido podría requerir a NHR-1 para ejercer su función protectora. Por otra parte, el papel regulador de genes del metabolismo lipídico asociado a DAF-12 ha sido descrito en varios trabajos, relacionando su función con la activación de genes

relacionados con la oxidación lipídica para la obtención de energía (Farias-Pereira and Park, 2019; Ludewig, 2004; Wang et al., 2015). Además, DAF-12 es requerido por NHR-80 para promover la longevidad en animales en los que se ha extirpado las células de la línea germinal (Goudeau et al., 2011). NHR-80 regula la síntesis de ácido oleico, mediante la activación de *fat-6*, el cual es reprimido por NHR-1. El ácido oleico puede actuar como un lípido señal que induce la activación indirecta de SKN-1 (Steinbaugh et al., 2015). Como ya hemos comentado anteriormente, SKN-1 se activa ante situaciones de estrés, para promover la expresión de genes relacionados con la protección celular y el mantenimiento de la homeostasis (Blackwell et al., 2015; Lehrbach and Ruvkun, 2019). Recientemente, se ha demostrado que la vitamina D induce la activación de genes de respuesta como *skn-1*, *ire-1* y *xbp-1* para promover la homeostasis de proteínas y la longevidad en *C. elegans* (Mark et al., 2016). Además, en este trabajo demuestran que la vitamina D no requiere de la funcionalidad de DAF-12 para extender la longevidad, descartando la conservación filogenética que ha sido establecida en el pasado entre este receptor y el receptor de vitamina D de mamíferos (Mark et al., 2016). Estas evidencias confirman el papel modulador lipídico de DAF-12, sin embargo, no hemos analizado el perfil lipídico y transcriptómico en mutantes *daf-12* para un contexto de toxicidad por poliQs. Esta aproximación podría aportarnos más información sobre si NHR-1 y DAF-12 podrían estar regulando dianas transcripcionales lipídicas comunes que impactan sobre la homeostasis de proteínas.

III.5 Moduladores de la señalización hormonal como dianas terapéuticas

Nuestros resultados han desglosado diferentes componentes que participan en la señalización hormonal para modular la homeostasis de proteínas en *C. elegans*. Muchos de estos componentes poseen homología funcional con mamíferos, como es el caso de las sulfotransferasas citosólicas, sulfatasas y enzimas de síntesis lipídica. Ello inspiró a algunos autores a usar inhibidores de sulfotransferasas y sulfatasas en modelos animales para modular la actividad de estas enzimas, como potenciales estrategias terapéuticas frente al cáncer y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Chapman et al., 2002; N. Morozkina and G. Shavva, 2020; Pérez-Jiménez et al., 2019; Yue et al., 2016). Este abordaje terapéutico también sería especialmente interesante para modular la producción endógena de lípidos neuroprotectores mediante la regulación de

enzimas de síntesis que son clave (acetil-CoA carboxilada/POD-2, Delta9 deasaturasa/FAT-6, elongasas, etc.). A su vez, los NRs también pueden ser modulables mediante sus ligandos (activadores y represores). Hemos observado que la activación de DAF-12 por ácido dafacrónico induce la reducción de la agregación de poliQs y la mejora de la función neuronal. En mamíferos, por ejemplo, el tratamiento con el agonista vitamina D que activa al receptor de vitamina D induce efectos neuroprotectores en pacientes con Alzheimer (Banerjee et al., 2015). Muchas enfermedades neurodegenerativas, como la EH, Parkinson y Alzheimer, conllevan alteraciones metabólicas severas que se traducen en graves pérdidas de peso en los pacientes (Djousse et al., 2002; Gillette-Guyonnet et al., 2000; Kashihara, 2006). Por tanto, algunas estrategias terapéuticas están enfocadas a la regulación de vías metabólicas mediante receptores nucleares, como PPAR, para mejorar la patogénesis en modelos de ratón; sin embargo, la traslación a la clínica no ha mostrado ser lo suficientemente eficiente hasta el momento (Moutinho et al., 2019).

Estas evidencias en conjunto sostienen la posibilidad de que varios de los componentes que han sido descritos en esta tesis, con un potencial papel modulador en la agregación de poliQs en *C. elegans*, podrían ser dianas terapéuticas muy atractivas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas a un desequilibrio de la homeostasis de proteínas, como Parkinson y Alzheimer, y lo más importante, podrían ser confirmadas en modelos mamíferos para estas patologías, lo que sentaría las bases preclínicas para futuros ensayos clínicos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los resultados descritos en esta Tesis nos llevan a concluir lo siguiente:

- 1 La expresión de moléculas de ARN, que contienen expansiones tóxicas de trinucleótidos CAG, disrumpe la funcionalidad de las neuronas GABAérgicas, lo cual a su vez altera de la capacidad motora de los animales.
- 2 El cribado de fármacos empleando gusanos que expresan expansiones de trinucleótidos CAG en neuronas GABAérgicas, nos ha permitido la identificación de cuatro compuestos que reducen la toxicidad asociada a transcritos de ARN con microsatélites.
- 3 El tratamiento sinérgico empleando metformina y salicilato reduce la agregación de poliglutaminas en células musculares, y promueve una recuperación funcional en neuronas y células musculares.
- 4 La metformina y el salicilato activan de manera sinérgica a AMPK, que a su vez reduce la agregación de poliQs en células musculares, y esto es dependiente de AMPK α 2 y AMPK β 2. A su vez, hemos identificado que el efecto neuroprotector de la sinergia es dependiente, al menos, de AMPK α 2.
- 5 El tratamiento sinérgico de metformina y salicilato activa el flujo autofágico, lo cual es esencial para reducir la agregación de poliglutaminas y recuperar la funcionalidad muscular.
- 6 El tratamiento individual y combinado con metformina y salicilato reduce la agregación de α -sinucleína en células musculares, y mejora la capacidad motora de los gusanos.

Conclusiones

- 7 La disrupción de *unc-1/STOML3* potencia la agregación de poliglutaminas a través de una señalización no autónoma desde el sistema nervioso hacia las células musculares, y quizás, hacia otros tejidos.
- 8 La falta de función de *unc-1* aumenta la agregación de las proteínas α -sinucleína y β -amiloide, causantes de otras enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer respectivamente.
- 9 Algunos componentes de la sinapsis eléctrica, como son algunas estomatinas e inexinas, son esenciales para mantener la homeostasis de proteínas en modelos de toxicidad inducida por poliQs, en *C. elegans*.
- 10 La disrupción de UNC-1 perturba la sinapsis eléctrica entre neuronas IL2 y ASJ, induciendo un exceso de señalización hormonal cuya actividad depende de las enzimas sulfotransferasa SSU-1 y sulfatasas, SUL-2 y SUL-3.
- 11 La hormona que produce la disrupción de *unc-1* requiere la función del receptor nuclear NHR-1, para incrementar la agregación de poliQs. Este fenotipo, mediado por NHR-1, parece requerir la modulación de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de las grasas.
- 12 El perfil lipídico obtenido por metabolómica muestra que la abundancia lipídica total está incrementada en los mutantes *unc-1(vlt10)*. En contraste, la cantidad de ácidos grasos totales (MUFAs, PUFAs, SFAs) está reducida. Uno de los MUFAs más interesantes por su papel protector en este contexto es el ácido oleico, cuya abundancia está reducida un 40 % en los mutantes.
- 13 Incubar gusanos con ácido oleico reduce la agregación de poliQs en los mutantes *unc-1*. En contraste, la supresión de *nhr-1* bloquea el efecto protector del ácido oleico en un contexto de toxicidad por poliQs.

- 14 El receptor nuclear DAF-12 tiene un papel protector en la homeostasis de proteínas con poliQs, al contrario que NHR-1. Puesto que *nhp-1* es epistático sobre *daf-12*, pudiendo modular la homeostasis de poliQs, se puede concluir que ambas rutas de señalización tienen una comunicación cruzada.

ANEXOS

ANEXO I

Tabla 2.1. Cepas de *C. elegans* empleadas en este trabajo.

Cepa ¹	Genotipo	Referencia
Bristol N2	<i>Caenorhabditis elegans</i> fondo silvestre	(Brenner, 1974)
EG8079	<i>oxTi179[ttTi5605 + NeoR (+) + unc-18 (+)] II; unc-119 (ed3) III</i>	(Robert and Bessereau, 2007)
RVM64	<i>vltIs64[myo-3p::122CAG::HA/c-Myc/Flag::unc-54t II; unc-119 II]</i>	Este estudio
RVM135	<i>vltIs135[unc-25p::153CAG::HA/c-Myc/Flag::unc-54t II; unc-119 II]</i>	Este estudio
RVM66	<i>vltIs66[unc-25p::144CAG::HA/c-Myc/Flag::unc-54t II; unc-119 II]</i>	Este estudio
RVM273	<i>vltEx273[unc-25p::144CAG::HA/c-Myc/Flag::unc-54t II; unc-119 II cepa 1]</i>	Este estudio
RVM275	<i>vltEx275[unc-25p::144CAG::HA/c-Myc/Flag::unc-54t II; unc-119 II cepa 2]</i>	Este estudio
RVM276	<i>vltEx276[unc-25p::144CAG::HA/c-Myc/Flag::unc-54t II; unc-119 II cepa 3]</i>	Este estudio
RVM277	<i>vltEx277[unc-25p::144CAG::HA/c-Myc/Flag::unc-54t II; unc-119 II cepa 4]</i>	Este estudio
RVM279	<i>vltEx279[unc-25p::22CAG::HA/c-Myc/Flag::unc-54t II; unc-119 II cepa 1]</i>	Este estudio
RVM280	<i>vltEx280[unc-25p::22CAG::HA/c-Myc/Flag::unc-54t II; unc-119 II cepa 2]</i>	Este estudio
RVM140	<i>vltEx140[let-858p::non-ATG-112CAG::TdTomato::let-858t; myo-2p::GFP]</i>	Este estudio
RVM350	<i>vltEx350[dyp-7p::non-ATG-9CAG::TdTomato::unc-54t; myo-2p::GFP]</i>	Este estudio
RVM351	<i>vltEx350[dyp-7p::non-ATG-112CAG::TdTomato::unc-54t; myo-2p::GFP]</i>	Este estudio
EG8079	<i>oxTi179[ttTi5605 + NeoR (+) + unc-18 (+)] II; unc-119 (ed3) III</i>	(Robert and Bessereau, 2007)
RVM64	<i>vltIs64[myo-3p::122CAG::HA/c-Myc/Flag::unc-54t II; unc-119 II]</i>	Este estudio
RVM135	<i>vltIs135[unc-25p::153CAG::HA/c-Myc/Flag::unc-54t II; unc-119 II]</i>	Este estudio
RVM66	<i>vltIs66[unc-25p::144CAG::HA/c-Myc/Flag::unc-54t II; unc-119 II]</i>	Este estudio
RVM273	<i>vltEx273[unc-25p::144CAG::HA/c-Myc/Flag::unc-54t II; unc-119 II cepa 1]</i>	Este estudio
RVM131	<i>vltEx131[mec-3p::112Q::TdTomato; myo-2p::GFP]</i>	(Sanchis et al., 2019)
AM141	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X</i>	(Morley et al., 2002)
NL5901	<i>pkIs2386[unc-54p::α-sinucleína::YFP + unc-119(+)] IV</i>	(van Ham et al., 2008)

Anexo I

RVM137	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; aak-2(ok524) X</i>	(Sanchis et al., 2019)
RVM132	<i>vltEx131[mec-3p::112Q::TdTomato; myo-2p::GFP]; aak-2(ok524) X</i>	(Sanchis et al., 2019)
RVM301	<i>aakb-1(vlt18) X</i>	Bono J ² ; este estudio
RVM305	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; aakb-1(vlt18) X</i>	Bono J ² ; este estudio
RVM304	<i>vltEx131[mec-3p::112Q::TdTomato; myo-2p::GFP]; aakb-1(vlt18) X</i>	Bono J ² ; este estudio
RVM10	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X</i>	Este estudio
CB719	<i>unc-1(e719) X</i>	(Park and Horvitz, 1986)
CB1598	<i>unc-1(e1598) X</i>	(Park and Horvitz, 1986)
RVM23	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(e719) X</i>	Este estudio
RVM20	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(e1598) X</i>	Este estudio
AM140	<i>rmIs132[unc-54p::35Q::YFP] X</i>	(Morley et al., 2002)
RVM21	<i>rmIs132[unc-54p::35Q::YFP]; unc-1(e1598) X</i>	Este estudio
RVM24	<i>rmIs132[unc-54p::35Q::YFP] X; unc-1(e719) X</i>	Este estudio
RVM26	<i>rmIs132[unc-54p::35Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X</i>	Este estudio
AM101	<i>rmIs110[F25B3.3-p::40Q::YFP]</i>	(Brignull et al., 2006)
RVM27	<i>rmIs110[F25B3.3-p::40Q::YFP]; unc-1(vlt10) X</i>	Este estudio
CL2006	<i>dvIs2[pCL12(unc-54/péptido humano Abeta 1-42 minigen)+pRF4]</i>	(Link, 1995)
RVM317	<i>pkIs2386[unc-54p::α-synucleína::YFP + unc-119(+)] IV; unc-1(vlt10) X</i>	Este estudio
RVM328	<i>dvIs2[pCL12(unc-54/ péptido humano Abeta 1-42 minigen)+pRF4], unc-1(vlt10) X</i>	Este estudio
RVM47	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; vltEx47[myo-3p::unc-1(o/e); myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM155	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; vltEx155[myo-3p::unc-1(o/e); myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM158	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; vltEx158[myo-3p(o/e)]; myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM159	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; vltEx159[myo-3p(o/e)]; myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM44	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; vltEx44[rab-3p::unc-1(o/e)]; myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM48	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; vltEx48[rab-3p::unc-1(o/e)]; myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM42	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx42[rab-3p::AMP^r(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM43	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx43[rab-3p::AMP^r(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio

RVM71	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx71[rab-3p::unc-1(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM72	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx72[rab-3p::unc-1(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM205	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx205[rab-3p(o/e)]; myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM206	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx206[rab-3p(o/e)]; myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM201	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx201[rab-3p::unc-1(o/e)]; myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM221	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx221[rab-3p::unc-1(o/e)]; myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM227	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx227[rab-3p::unc-1(n494)(o/e)]; myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM230	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx230[rab-3p::unc-1(n494)(o/e)]; myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
CB75	<i>mec-2(e75) X</i>	(Chalfie and Sulston, 1981)
CB138	<i>unc-24(e138) IV</i>	(Brenner, 1974)
RVM208	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; mec-2(e75) X</i>	Este estudio
RVM192	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-24(e138) IV</i>	Este estudio
CB5	<i>unc-7(e5) X</i>	(Brenner, 1974)
FH85	<i>unc-9(ec27) X</i>	(Sedensky and Meneely, 1987)
MR127	<i>inx-6(rr5) IV</i>	(Li et al., 2003)
RB1792	<i>inx-7(ok2319) IV</i>	(The C. elegans Deletion Mutant Consortium, 2012)
RVM209	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-7(e5) X</i>	Este estudio
RVM175	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-9(ec27) X</i>	Este estudio
RVM196	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; inx-2(ok376) X</i>	Este estudio
RVM197	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; inx-6(rr5) IV</i>	Este estudio
RVM218	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; inx-7(ok2319) IV</i>	Este estudio
RVM340	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx340[rab-3p::inx-6(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM341	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx341[rab-3p::inx-6(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM333	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx333[rab-3p::inx-2(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM342	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx342[rab-3p::inx-2(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM335	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx335[rab-3p::unc-7(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM337	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx337[rab-3p::unc-7(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio

Anexo I

RVM346	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-7(e5) X</i>	Este estudio
RVM347	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; unc-7(e5) X</i>	Este estudio
RVM349	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; inx-2(vlt22) X</i>	Este estudio
RVM348	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; inx-2(vlt22) X</i>	Este estudio
RVM188	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1 (vlt10) X; vltEx188[trx-1p::AMP^r(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM189	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1 (vlt10) X; vltEx188[trx-1p::AMP^r(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM176	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; vltEx176[trx-1p::ssu-1(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM232	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; vltEx176[trx-1p::ssu-1(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
CW911	<i>ssu-1(fc73) V; unc-1(e580) X; rol-6(su1006)</i>	(Carroll et al., 2006)
RVM142	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; ssu-1(fc73) V</i>	Este estudio
RVM143	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(e580) X</i>	Este estudio
RVM144	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; ssu-1(fc73) V; unc-1(e580) X</i>	Este estudio
VC382	<i>sul-2(gk187) V</i>	(The C. elegans Deletion Mutant Consortium, 2012)
RVM360	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx360[trx-1p::AMP^r(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM361	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx361[trx-1p::AMP^r(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM364	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx364[trx-1p::unc-1(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM365	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx365[trx-1p::unc-1(ARNi)]; myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM368	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx368[oig-1p::AMP^r(ARNi); osm3p::AMP^r(ARNi); myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM369	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx369[oig-1p::AMP^r(ARNi); osm-3p::AMP^r(ARNi); myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM355	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx355[oig-1p::unc-1(ARNi); osm-3p::unc-1(ARNi); myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM356	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx356[oig-1p::unc-1(ARNi); osm-3p::unc-1(ARNi); myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM362	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx362[glr-1p::AMP^r(ARNi); gpa-9p::AMP^r(ARNi); myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM363	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx363[glr-1p::AMP^r(ARNi); gpa-9p::AMP^r(ARNi); myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM366	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx366[glr-1p::unc-1(ARNi); gpa-9p::unc-1(ARNi); myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM367	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; vltEx367[glr-1p::unc-1(ARNi); gpa-9p::unc-1(ARNi); myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio

RVM386	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; vltEx386[oig-1p::unc-1(o/e); myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM387	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; vltEx387[oig-1p::unc-1(o/e); myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM384	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; vltEx384[osm-3p::unc-1(o/e); myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM385	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; vltEx385[osm-3p::unc-1(o/e); myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM224	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; sul-2(gk187) V</i>	Este estudio
RVM225	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; sul-2(gk187) V; unc-1(vlt10) X</i>	Este estudio
RVM320	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; daf-12(vlt19) X</i>	Este estudio
AA292	<i>daf-36(k114) V</i>	(Rottiers et al., 2006)
RVM390	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; daf-36(k114) V; vltEx390 [daf-36p::daf-36; myo-2p::mCherry]</i>	Este estudio
RVM288	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; nhr-1(vlt15) X</i>	Este estudio
RVM289	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; nhr-1(vlt15) X</i>	Este estudio
RVM293	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; nhr-1(vlt16) X</i>	Este estudio
RVM294	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; nhr-1(vlt16) X</i>	Este estudio
RVM290	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; nhr-1(vlt16) X; vltEx290[unc-54p::nhr-1(o/e); myo-2p::mCherry cepa 1]</i>	Este estudio
RVM291	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; nhr-1(vlt16) X; vltEx291[unc-54p::nhr-1(o/e); myo-2p::mCherry cepa 2]</i>	Este estudio
RVM241	<i>unc-1(vlt10) X</i>	Este estudio
SJ4005	<i>zcls4[hsp-4::GFP] V</i>	(Calfon et al., 2002)
RVM373	<i>zcls4[hsp-4::GFP] V; unc-1(vlt10) X</i>	Este estudio
RVM327	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; nhr-1(vlt15) X; daf-12(vlt20) X</i>	Este estudio
RVM323	<i>rmIs133[unc-54p::40Q::YFP] X; unc-1(vlt10) X; nhr-1(vlt15) X; daf-12(vlt20) X</i>	Este estudio

¹Las cepas están listadas en orden de apariencia en la sección resultados. ²Bono J pertenece al grupo del Dr. Rafael Vázquez y ha contribuido en la generación de algunas cepas incluidas en este trabajo. Los colores denotan las cepas que han sido empleadas y desarrolladas en los diferentes capítulos: amarillo – Capítulo I; azul – Capítulo II; rojo – Capítulo III.

Tabla 2.2. Cebadores empleados para el genotipado de mutantes y transgénicos de *C. elegans*.

Gen (alelo)	Secuencia cebador (5' – 3')	(T _h /t _{ex} ³)	Producto PCR (pb)	Tipo Mutación
<i>aak-2</i> (<i>ok524</i>)	RVM1(D_externo): atgtcgtctccaggaggaga	58°C/ 1min	1+2: 1225 (silvestre); 817 (mutante) 3+2: 450 (silvestre)	delección (#1)
	RVM2(R_externo): catttatcaccggcagtg			
	RVM3(D_interno): atgggtgtctcctgatcatg			
<i>aakb-1</i> (<i>vlt18</i>)	RVM815(D_externo): acctagaactgccgtatagatgc	56°C/50s	815+816: 542 (mutante) 815+817: 783 (silvestre)	delección (#1)
	RVM816(R_externo): gaaatgaggcactctaaccac			
	RVM817(R_interno): taggggaacgtgtcagatgctc			
<i>unc-1</i> (<i>vlt10</i>)	RVM383(D_silvestre): cagaacgtgaagcattgctc	54°C/20s	266	puntual
	RVM384(D_mutante): cagaacgtgaagcattgctc			
	RVM385(R_común): acccgttcgtcagatttctg			
<i>mec-2</i> (<i>e75</i>)	APG735(D_silvestre): caaagattccgtgacagtta	58°C/30s	230	puntual
	APG736(D_mutante): caaagattccgtgacagtta			
	RVM705(R_común): aatagcttctctgtccgacaa			
<i>unc-24</i> (<i>e138</i>)	APG739(D_silvestre): tttacgctgggaagagctc	54°C/30s	202	puntual
	APG740(D_mutante): tttacgctgggaagagctc			
	APG741(R): cgagtccacgagaccagatc			
<i>unc-7</i> (<i>e5</i>)	APG717(D_silvestre): gcaccattggtaataagccaatcc	62°C/20s	222	puntual
	APG718(D_mutante): gcaccattggtaataagccaatcc			
	APG719(R_común): ctgaaattcagtagcttcttctg			
→	→	→	→	→

<i>unc-9</i> (<i>ec27</i>)	RVM621(D_silvestre): aattaaacccatttcaggaca	52°C/30s	378	puntual
	RVM622(D_mutante): aattaaacccatttcaggaca			
	RVM623(R_común): tggttttcaagagaattatgatgag			
<i>inx-6</i> (<i>rr5</i>)	APG710(D_silvestre): gctcttaatttaggagatatct	54°C/20s	253	puntual
	APG711(D_mutante): gctcttaatttaggagatatct			
	APG712(R_común): gtttcaagttccagataaagtag			
<i>inx-7</i> (<i>ok2319</i>)	APG724(D_externo): acgtctgaaggttctgctt (PCR_1)	55°C/ 3min	-	delección (#2)
	APG723(R_externo): agctagtcattgggagagaaa (PCR_1)	58°C/ 3min 30s		
	APG725(D_interno): caagtgcgtctcatcatc (PCR_2)			
	APG726(R_interno): ggctgtctcggaaattttg (PCR_2)			
<i>inx-2</i> (<i>vlt122</i>)	RVM986(D_externo): ccgagataatacggctcagatgagc	58°C/ 1min	986+987: 2567 (silvestre); 632 (mutante) 986+940: 900 (mutante)	delección (#3)
	RVM987(R_externo): tcaactctatcagtaaccgcc			
	APG940(R_mutante): ggcaaacgactcacaagcttgag			
<i>ssu-1</i> (<i>fc73</i>)	RVM386(D_silvestre): gtagtgggattctggaaa	61°C/45s	314	puntual
	RVM408(D_mutante): gtagtgggattctggaaa			
	RVM388(R_común): cactcaacggttttctgtgac			
<i>unc-1</i> (<i>e580</i>)	RVM398(D_silvestre): gatgaaggaactgaacattgga	61°C/45s	245	puntual
	RVM299(D_mutante): gatgaaggaactgaacattgga			
	RVM385(R_común): acccgttcgtcagatttctg			
<i>sul-2</i> (<i>gk187</i>)	IRA465(D_externo): caacgagaagatgcacagtg	56°C/ 1min	465+466: 348 (silvestre) 465+467: 1000 (silvestre); 600 (mutante)	delección (#1)
	IRA466(R_interno): cactgtgcaacttctcgttg			
	IRA467(R_externo): caaactgtgttgagtgacttg			
→	→	→	→	→

<i>daf-12</i> (<i>vlt19</i>)	RVM751(D_externo): catcgatttctgcactttaag	55°C/ 1min	751+750: 1395 (silvestre); 987 (mutante) 751+477: 890 (silvestre)	delección (#1)
	APG750(R_externo): gaggtagaggaatattatacg			
	RVM477(R_interno): ttgattacctgttgagaagactc			
<i>daf-12</i> (<i>vlt20</i>)	RVM751(D_interno): catcgatttctgcactttaag	55°C/ 1min	751+750: 1395 (silvestre) 900+750: 1354 (mutante)	delección (#1)
	APG750(R_externo): gaggtagaggaatattatacg			
	RVM900(D_externo): atgagcacaccagatgatc			
<i>nhr-1</i> (<i>vlt15</i>)	APG854(D_silvestre): gccaccactccacacgctctt ¹	58°C/35s	500	puntual
	APG844(D_mutante): ccaccactccacacgctccc ²			
	APG856(R_común): gaatgtcgttcatcgacgccgg			
<i>nhr-1</i> (<i>vlt16</i>)	APG854(D_silvestre): gccaccactccacacgctctt ¹	58°C/35s	500	puntual
	APG855(D_mutante): gccaccactccacacagactc ²			
	APG856(R_común): gaatgtcgttcatcgacgccgg			
<i>ttTi5605</i>	oCF1493(D): tgcctggaaggacttgattt	58°C/40s	1493+1494: 281 (silvestre) 1529+1494: 554 (inserción)	Inserción MosSCI
	oCF1494(R): ttgccacgtcttcttgagtg			
	oCF1529(D): tatcgtaaactcggcgcgagc			
<i>vltIs64</i> <i>vltIs66</i> <i>vltIs135</i>	APG446(D_externo): tctggctctgcttctctgt APG447(R_externo): caattcatcccggttctgt	58°C/ 2min	1800	Inserción CAGs

¹D: cebador directo; R: cebador reverso; externo: fuera de la zona delecionada; interno: dentro de zona delecionada; silvestre: hibrida con el alelo silvestre (resaltado en verde); mutante: hibrida con el alelo mutante (resaltado en violeta). ²T_h: Temperatura de hibridación de los cebadores optimizada. ³t_{ext}: tiempo de extensión del amplicón en función del tamaño (pb) y la polimerasa empleada (Taq polimerasa estándar: 1kb/min).

Tabla 2.5. Vectores plasmídicos pDONR 221 generados en este trabajo.

Vector plasmídico pDONR 221	inserto	Cebadores (5'– 3')/Enzimas restricción para la obtención del inserto de interés ¹	sitios <i>attB</i>	ADN molde	Vector pDONR 221 destino
pAPG1	<i>rab-3p</i>	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcta tcttcagatgggagcagtg	B1	Genómico N2	P1P5r
		ggggacaactttgtatacaaagttgtcatct gaaaatagggtactgtgat	B5r		
pAPG2	<i>unc-1</i>	ggggacaactttgtatacaaagttgaaatg tcaaacaaggaaagaac	B5	cDNA N2	P5P2
		ggggaccactttgtacaagaaagctgggta aaggaaaatgatattggtc	B2		
pAPG5 ²	<i>unc-1</i> (n494) ²	cttgatgaagaactgaacat		pAPG2	P5P2
		atgttcagttcttcatcaag			
pAPG7	<i>myo-3p</i>	ggggacaactttgtatagaaaagttggcag gtcggctataataagttcttg	B4	Genómico N2	P4P1r
		ggggactgctttttgtacaaactggatcta gtggtcgtgggttgat	B1r		
pAPG8	<i>rab-3p</i>	ggggacaactttgtatagaaaagttgatcttc agatgggagcagtg	B4	Genómico N2	P4P1r
		ggggactgctttttgtacaaactgcatctga aaatagggtactgtgat	B1r		
pAPG9	<i>unc-25p</i>	ggggacaactttgtatagaaaagttgaaat aagaataattgtataatt	B4	Genómico N2	P4P1r
		ggggactgctttttgtacaaactgaaactga gcttttcctattcc	B1r		
pAPG10	<i>mec-3p</i>	ggggacaactttgtatagaaaagttgcgcg agaagttagagcattcattg	B4	Genómico N2	P4P1r
		ggggactgctttttgtacaaactggcgga aattgtggctactcactg	B1r		
pAPG11	<i>osm-10p</i>	ggggacaactttgtatagaaaagttgagct tgacaccgactggcac	B4	Genómico N2	P4P1r
		ggggactgctttttgtacaaactgcaggag agaggtcttctgaaattta	B1r		
pAPG12	<i>unc-54t</i>	ggggacagcttcttgtacaaagttggcgccc gtgcctctgacttcta	B2r	Genómico N2	P2rP3
		ggggacaactttgtataataaagttgaaaca gttatgtttggtatattggg	B3		
pAPG13	60CAG	EcoRV	B1	pUC57- 114CAG	P1P2
			B2		
pAPG14	67CAG	EcoRV	B1	pUC57- 114CAG	P1P2
			B2		
pAPG15	114CAG	EcoRV	B1	pUC57- 114CAG	P1P2
			B2		
pAPG16	50CAG	EcoRV	B1	pUC57- 114CAG	P1P2
			B2		
pAPG17	120CAG	EcoRV	B1	pUC57- 114CAG	P1P2
			B2		
→	→	→	→	→	→

pAPG18	71CAG	EcoRV	B1 B2	pUC57- 114CAG	P1P2
pAPG19	26CAG	EcoRV	B1 B2	pUC57- 114CAG	P1P2
pAPG20	43CAG	EcoRV	B1 B2	pUC57- 114CAG	P1P2
pAPG21	155- 159CAG	EcoRV	B1 B2	pUC57- 114CAG	P1P2
pAPG22	125CAG	EcoRV	B1 B2	pUC57- 114CAG	P1P2
pAPG49	22CAG	EcoRV	B1 B2	pUC57- 24CAG	P1P2
pAPG50	24CAG	EcoRV	B1 B2	pUC57- 24CAG	P1P2
pAPG54	<i>let-858p</i>	ggggacaactttgtatagaaaagttgaagct tctggagattgctccagcag ggggactgctttttgtacaaactgctagcg gtaccaccggtatcttac	B4 B1r	Genómico N2	P4P1r
pAPG55	<i>let-858t</i>	ggggacagctttctgtacaaagtggcgggt tctagaggatcctatcg ggggacaactttgtataataaagttgaatcc agttcgatgtaaccactcg	B2r B3	Genómico N2	P2rP3
pAPG56	112CAG :: <i>TdTom</i>	NotI + SacII EcoRV AscI + SacII	B1 B2	pUC57- ATG::9C AG:: <i>TdTo</i> <i>m</i>	P1P2
pAPG60	9CAG:: <i>TdTom</i>	EcoRV AscI + SacII	B1 B2	pUC57- ATG::9C AG:: <i>TdTo</i> <i>m</i>	P1P2
pAPG61	<i>dpy-7p</i>	ggggacaactttgtatagaaaagttgggca gcagcggtaacggagaca ggggactgctttttgtacaaactgcatttat ctggaacaaaatgta	B4 B1r	Genómico N2	P4P1r

¹Los cebadores empleados para amplificar regiones promotoras y génicas contienen en su extremo la secuencia attB específica marcada en negrita. Para *unc-1* se ha resaltado el codón inicio/parada de traducción, contenidos en los cebadores director y reverso, respectivamente. Las enzimas empleadas o combinación de ellas han sido usadas con diferentes finalidades: EcoRV (apertura de vector pDONR 221); NotI + SacII (incorporación de secuencia de tripletes CAG); AscI + SacII (eliminación de codón inicio ATG del pDONR 221). ²Los cebadores amplifican la región flanqueante al cambio alélico n494. (*) En verde están marcados los vectores pDONR 221-P1P2 con tripletes CAG etiquetados que han sido seleccionados para su combinación con vectores pDEST-pCFJ150, mientras que en rojo están señalados los vectores pDONR 221-P1P2 empleados para la expresión de péptidos RAN etiquetados con *Tandem Tomato*.

Tabla 2.10. Vectores pDEST para expresión génica en *C. elegans*.

Vectores pDEST	Recombinación de vectores pDONR221	inserto	Cebadores PCR analítica (5' – 3')	Vector pDEST de destino
pAPG3	pDONRP1P5r- <i>myo-3p</i> (Dr. Denisse Walker) pAPG2_ <i>unc-1</i>	<i>myo-3p::unc-1</i>	D: atcaaaccacgaccactagatc R: gcaaagttgagcaatggcttcacg	pDEST pHP2
pAPG4	pAPG1_ <i>rab-3p</i> pAPG2_ <i>unc-1</i>	<i>rab-3p::unc-1</i>	D: cgagttgtagtccactaactcaa R: gcaaagttgagcaatggcttcacg	pDEST pHP2
pAPG6	pAPG1_ <i>rab-3p</i> pAPG5_ <i>unc-1(n494)</i>	<i>rab-3p::unc-1(n494)</i>	D: cgagttgtagtccactaactcaa R: gcaaagttgagcaatggcttcacg	pDEST pHP2
pAPG23	pAPG7_ <i>myo-3p</i> pAPG17_ 120CAG pAPG12_ <i>unc-54t</i>	<i>myo-3p::122CAG::unc-54t</i>	D: atcaaaccacgaccactagatc R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
pAPG24	pAPG7_ <i>myo-3p</i> pAPG17_ 120CAG pAPG12_ <i>unc-54t</i>	<i>myo-3p::120CAG::unc-54t</i>	D: atcaaaccacgaccactagatc R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
pAPG25	pAPG7_ <i>myo-3p</i> pAPG17_ 120CAG pAPG12_ <i>unc-54t</i>	<i>myo-3p::126CAG::unc-54t</i>	D: atcaaaccacgaccactagatc R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
pAPG26	pAPG7_ <i>myo-3p</i> pAPG17_ 120CAG pAPG12_ <i>unc-54t</i>	<i>myo-3p::118CAG::unc-54t</i>	D: atcaaaccacgaccactagatc R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
pAPG27	pAPG7_ <i>myo-3p</i> pAPG21_ >155CAG pAPG12_ <i>unc-54t</i>	<i>myo-3p::158CAG::unc-54t</i>	D: atcaaaccacgaccactagatc R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
pAPG28	pAPG7_ <i>myo-3p</i> pAPG21_ >155CAG pAPG12_ <i>unc-54t</i>	<i>myo-3p::107CAG::unc-54t</i>	D: atcaaaccacgaccactagatc R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
pAPG29	pAPG7_ <i>myo-3p</i> pAPG21_ >155CAG pAPG12_ <i>unc-54t</i>	<i>myo-3p::149CAG::unc-54t</i>	D: atcaaaccacgaccactagatc R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
pAPG30	pAPG7_ <i>myo-3p</i> pAPG21_ >155CAG pAPG12_ <i>unc-54t</i>	<i>myo-3p::176CAG::unc-54t</i>	D: atcaaaccacgaccactagatc R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
pAPG31	pAPG7_ <i>myo-3p</i> pAPG21_ >155CAG pAPG12_ <i>unc-54t</i>	<i>myo-3p::91CAG::unc-54t</i>	D: atcaaaccacgaccactagatc R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
pAPG32	pAPG7_ <i>myo-3p</i> pAPG21_ >155CAG pAPG12_ <i>unc-54t</i>	<i>myo-3p::136CAG::unc-54t</i>	D: atcaaaccacgaccactagatc R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
pAPG33	pAPG10_ <i>mec-3p</i> pAPG17_ 120CAG pAPG12_ <i>unc-54t</i>	<i>mec-3p::138CAG::unc-54t</i>	D: ggctcttgacgggtgatttg R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
pAPG34	pAPG10_ <i>mec-3p</i> pAPG17_ 120CAG pAPG12_ <i>unc-54t</i>	<i>mec-3p::115CAG::unc-54t</i>	D: ggctcttgacgggtgatttg R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
→	→	→	→	→

pAPG35	pAPG10_mec-3p	mec-3p::	D: ggctcttgacgggtgatttg R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG17_120CAG	120CAG::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
pAPG36	pAPG10_mec-3p	mec-3p::	D: ggctcttgacgggtgatttg R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG17_120CAG	128CAG::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
pAPG37	pAPG10_mec-3p	mec-3p::	D: ggctcttgacgggtgatttg R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG21_>155CAG	153CAG::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
pAPG38	pAPG9_unc-25p	unc-25p::	D:cggaatagggaaaagctcagttcac R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG21_>155CAG	144CAG::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
pAPG39	pAPG9_unc-25p	unc-25p::	D: cggaatagggaaaagctcagttcac R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG21_>155CAG	>162CAG::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
pAPG40	pAPG9_unc-25p	unc-25p::	D: cggaatagggaaaagctcagttcac R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG21_>155CAG	68CAG::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
pAPG41	pAPG9_unc-25p	unc-25p::	D: cggaatagggaaaagctcagttcac R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG21_>155CAG	165CAG::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
pAPG42	pAPG11_osm-10p	osm-10p::	D: cgtgttctcaaaaggtgagatttc R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG21_>155CAG	101CAG::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
pAPG43	pAPG11_osm-10p	osm-10p::	D: cgtgttctcaaaaggtgagatttc R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG21_>155CAG	64CAG::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
pAPG44	pAPG11_osm-10p	osm-10p::	D: cgtgttctcaaaaggtgagatttc R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG21_>155CAG	148CAG::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
pAPG45	pAPG11_osm-10p	osm-10p::	D: cgtgttctcaaaaggtgagatttc R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG21_>155CAG	71CAG::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
pAPG46	pAPG8_rab-3p	rab-3p::	D: cgagttgtagtccactaactcaa R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG21_>155CAG	141CAG::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
pAPG47	pAPG8_rab-3p	rab-3p::	D: cgagttgtagtccactaactcaa R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG21_>155CAG	153CAG::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
pAPG48	pAPG8_rab-3p	rab-3p::	D: cgagttgtagtccactaactcaa R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG21_>155CAG	146CAG::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
pAPG51	pAPG9_unc-25p	unc-25p::	D: cggaatagggaaaagctcagttcac R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG49_22CAG	22CAG::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
→	→	→	→	→

Anexo I

pAPG57	pAPG54_let-858p	let-858p::	D: cggaggcgacaacggtattttcg R: cggtagcaatcagactcactatagg	pDEST pCFJ150
	pAPG56_112CAG:: <i>TdTom</i>	112CAG:: <i>TdTom</i> ::		
	pAPG55_let-858t	letf-858t		
pAPG58	pAPG54_let-858p	let-858p::	D: cggaggcgacaacggtattttcg R: cggtagcaatcagactcactatagg	pDEST pCFJ150
	pAPG56_112CAG:: <i>TdTom</i>	108CAG:: <i>TdTom</i> ::		
	pAPG55_let-858t	letf-858t		
pAPG59	pAPG54_let-858p	let-858p::	D: cggaggcgacaacggtattttcg R: cggtagcaatcagactcactatagg	pDEST pCFJ150
	pAPG56_112CAG:: <i>TdTom</i>	60CAG:: <i>TdTom</i> ::		
	pAPG55_let-858t	letf-858t		
pAPG62	pAPG61_dyp-7p	dpy-7p::	D: caagattcattctgaatgaaca R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG56_112CAG:: <i>TdTom</i>	112CAG:: <i>TdTom</i> ::		
	pAPG12_unc-54t	unc-54t		
pAPG63	pAPG61_dyp-7p	dpy-7p::	D: caagattcattctgaatgaaca R: tagaagtcagaggcacgggcg	pDEST pCFJ150
	pAPG60_9CAG:: <i>TdTom</i>	9CAG:: <i>TdTom</i> ::		
	APG12_unc-54t	unc-54t		

(*) En azul están marcados los vectores de expresión con tripletes CAG seleccionados para inserciones de copia única por MosSCI. En verde están marcados los vectores de expresión con tripletes CAG seleccionados para la generación de líneas extracromosómicas transgénicas para modelizar la toxicidad por ARN, mientras que en rojo están marcados los vectores para modelizar la traducción RAN.

Tabla 2.17. Cebadores empleados para la obtención de amplicones (#P), (#CS) y (#CA) mediante las reacciones PCR#1.1 y PCR#1.2.

¹ Promotor/ Gen	² Cebadores (5'– 3')	³ Región #P solapante	ADN molde
<i>rab-3p</i>	A: M13F		pAPG1
	B: catctgaaaatagggtactgtagat		
<i>unc-1(CS)</i>	C1: atctacagtagccctattttcagatgat gtcaacaaggaaagaacagag	<i>rab-3p</i>	pAPG2
	D1: M13R		
<i>unc-1(CA)</i>	C2: atctacagtagccctattttcagatg tattggctttttcataaatgctcc	<i>rab-3p</i>	pAPG2
	D2: M13F		
<i>AMP^r(CS)</i>	C1: atctacagtagccctattttcagatgg catcttacggatggcatgacag	<i>rab-3p</i>	pUC19
	D1: acagagtcttgaagtgggtggc		
<i>AMP^r(CA)</i>	C2: atctacagtagccctattttcagatgc gtttggatggcttcattcagc	<i>rab-3p</i>	pUC19
	D2: gcttacagacaagctgtgaccg		
<i>inx-2(CS)</i>	C1: atctacagtagccctattttcagatgg taccactgtccttctttccaag	<i>rab-3p</i>	Genómico N2
	D1: gtcaaggaaatgttcagaagaacc		
<i>inx-2(CA)</i>	C2: atctacagtagccctattttcagatgg tcaaggaaatgttcagaagaacc	<i>rab-3p</i>	Genómico N2
	D2: gtaccactgtccttctttccaag		
<i>inx-6(CS)</i>	C1: atctacagtagccctattttcagatgg tcaactttgtgaaccagtact	<i>rab-3p</i>	Genómico N2
	D1: aatgtatacagatggacgtcct		
<i>inx-6(CA)</i>	C2: atctacagtagccctattttcagatga atgtatacagatggacgtcct	<i>rab-3p</i>	Genómico N2
	D2: gtcaactttgtgaaccagtact		
<i>unc-7(CS)</i>	C1: atctacagtagccctattttcagatg ctttgagcactcaagaaaaactct	<i>rab-3p</i>	Genómico N2
	D1: tcagtctatcgtccttgaccgtgt		
<i>unc-7(CA)</i>	C2: atctacagtagccctattttcagatg tcagtctatcgtccttgaccgtgt	<i>rab-3p</i>	Genómico N2
	D2: ctttgagcactcaagaaaaactct		
<i>trx-1p</i>	A: aaccaattgagttggcacttcg		Genómico N2
	B: aaccttgggtgagagacatgatg		
<i>ssu-1(CS)</i>	C1: catcatgtctctaccaagg ttccagagctctgtgtgcaatcgc	<i>trx-1p</i>	Genómico N2
	D1: catgtttcgcgtattttctgc		
<i>ssu-1(CA)</i>	C2: catcatgtctctaccaagg ttccttatacacagcattttcc	<i>trx-1p</i>	Genómico N2
	D2: cgtggcgggacccaaaatctc		
<i>AMP^r(CS)</i>	C1: catcatgtctctaccaagg ttgcatcttacggatggcatgacag	<i>trx-1p</i>	pUC19
	D1: acagagtcttgaagtgggtggc		
<i>AMP^r(CA)</i>	C2: catcatgtctctaccaagg ttcgtttggatggcttcattcagc	<i>trx-1p</i>	pUC19
	D2: gcttacagacaagctgtgaccg		
<i>unc-1(CS)</i>	C1: catcatgtctctaccaagg ttatgtcaacaaggaaagaacagag	<i>trx-1p</i>	
	D1: M13R		
<i>unc-1(CA)</i>	C2: catcatgtctctaccaagg tttattggctttttcataaatgctcc	<i>trx-1p</i>	
	D2: M13F		
<i>oig-1p</i>	A: agagcaagcagtcagtgaaaatgt		Genómico N2
	B: agtcgaacgttttcagaattatg		
→	→	→	→

Anexo I

<i>osm-3p</i>	A: gcttaaaatccggctaaaattca		Genómico N2
	B: tccgacgcatagctggaaatttg		
<i>glr-1p</i>	A: aacaagaaagtcgtagttgttac		Genómico N2
	B: tgtgaatgtgcagattgggtgcc		
<i>gpa-9p</i>	A: gatgggcccgaaacatcatcg		Genómico N2
	B: cccattgcatattcattaaac		
<i>unc-1(CS)</i>	C1: cataattctgcaaaacgftcgactatg tcaacaaggaagaacagag	<i>oig-1p</i>	pAPG2
	D1: M13R		
<i>unc-1(CA)</i>	C2: caaaattccagctatg cgctggattattggctttttcataaatgctcc	<i>osm-3p</i>	pAPG2
	D2: M13F		
<i>unc-1(CS)</i>	C1: ggcacccaatctgacacattcaca atgcaacaaggaagaacagag	<i>glr-1p</i>	pAPG2
	D1: M13R		
<i>unc-1(CA)</i>	C2: gtttaatgaaatgcaatggg ttattggctttttcataaatgctcc	<i>gpa-9p</i>	pAPG2
	D2: M13F		
<i>AMP^r(CS)</i>	C1: cataattctgcaaaacgftcgactg catcttacggatggcatgacag	<i>oig-1p</i>	pUC19
	D1: acagagttctgaagtgggtggc		
<i>AMP^r(CA)</i>	C2: caaaattccagctatg cgctggacgtttggtatggcttcattcagc	<i>osm-3p</i>	pUC19
	D2: gcttacagacaagctgtgaccg		
<i>AMP^r(CS)</i>	C1: ggcacccaatctgacacattcaca gcatcttacggatggcatgacag	<i>glr-1p</i>	pUC19
	D1: acagagttctgaagtgggtggc		
<i>AMP^r(CA)</i>	C2: gtttaatgaaatgcaatggg cgtttggtatggcttcattcagc	<i>gpa-9p</i>	pUC19
	D2: gcttacagacaagctgtgaccg		
<i>unc-1::unc-54^{terminador}</i>	C1: cataattctgcaaaacgftcgactatg tcaacaaggaagaacagag	<i>oig-1p</i>	pAPG4
	D1: aaacagttatgtttggtatattg		
<i>unc-1::unc-54^{terminador}</i>	C1: caaaattccagctatg cgctggaaatgcaacaaggaagaacagag	<i>osm-3p</i>	pAPG4
	D1: aaacagttatgtttggtatattg		

¹Región promotora denotada con una "p" al final del gen. CS: región cadena sentido gen diana. CA: región cadena antisentido gen diana. AMP^r: gen que codifica para la resistencia a ampicilina en bacterias. *unc-1::unc-54^{terminador}*: ADNc del gen *unc-1* en pauta con la secuencia terminadora de la transcripción del gen *unc-54*. ²Región solapante con región promotora marcada en negrita. (*)Inicio traducción ATG de *unc-1* marcado en verde. ³Región promotora contenida en región solapante.

Tabla 2.18. Cebadores empleados para la obtención de construcciones de ADN desnudo obtenidas por PCR de fusión.

¹ Producto de fusión	Cebadores (5'– 3')
<i>rab-3p::unc-1</i> (CS)	A*: atcttcagatgggagcagtgg D1*: aaggaaaatgattattggtc
<i>rab-3p::unc-1</i> (CA)	A*: atcttcagatgggagcagtgg D2*: aaatgtcaacaaggaagaac
<i>rab-3p::AMP^r</i> (CS)	A*: atcttcagatgggagcagtgg D1*: cgttggatggcttcattcagc
<i>rab-3p::AMP^r</i> (CA)	A*: atcttcagatgggagcagtgg D2*: gcatcttacggatggcatgacag
<i>rab-3p::inx-2</i> (CS)	A*: atcttcagatgggagcagtgg D1*: atttgcagaatgcaattgacaa
<i>rab-3p::inx-2</i> (CA)	A*: atcttcagatgggagcagtgg D2*: ctgcatgtttgtgctccctta
<i>rab-3p::inx-6</i> (CS)	A*: atcttcagatgggagcagtgg D1*: tcgaaagctgctagccgagttttg
<i>rab-3p::inx-6</i> (CA)	A*: atcttcagatgggagcagtgg D2*: tgttcactcgaccagcaactagc
<i>rab-3p::unc-7</i> (CS)	A*: atcttcagatgggagcagtgg D1*: tccgcatccaaaattgcgtcgg
<i>rab-3p::unc-7</i> (CA)	A*: atcttcagatgggagcagtgg D2*: actataattcaaagcaacctaag
<i>trx-1p::ssu-1</i> (CS)	A*: agaatggatacctgatcatt D1*: cctatacacagcattttcc
<i>trx-1p::ssu-1</i> (CA)	A*: agaatggatacctgatcatt D2*: ccagagctctgtgtgcaatcgc
<i>trx-1p::AMP^r</i> (CS)	A*: agaatggatacctgatcatt D1*: cgttggatggcttcattcagc
<i>trx-1p::AMP^r</i> (CA)	A*: agaatggatacctgatcatt D2*: gcatcttacggatggcatgacag
<i>trx-1p::unc-1</i> (CS)	A*: agaatggatacctgatcatt D1*: aaggaaaatgattattggtc
<i>trx-1p::unc-1</i> (CA)	A*: agaatggatacctgatcatt D2*: aaatgtcaacaaggaagaac
<i>oig-1p::unc-1</i> (CS)	A*: aacatgtttggagcatatttcgcg D1*: aaggaaaatgattattggtc
<i>osm-3p::unc-1</i> (CA)	A*: aattaaattgcctgaaaatccg D2*: aaatgtcaacaaggaagaac
<i>glr-1p::unc-1</i> (CS)	A*: aataattataagagacgtgtag D1*: aaggaaaatgattattggtc
<i>gpa-9p::unc-1</i> (CA)	A*: accgaatcaaaatatctgaat D2*: aaatgtcaacaaggaagaac
<i>oig-1p::AMP^r</i> (CS)	A*: aacatgtttggagcatatttcgcg D1*: cgttggatggcttcattcagc
<i>osm-3p::AMP^r</i> (CA)	A*: aattaaattgcctgaaaatccg D2*: gcatcttacggatggcatgacag
→	→

<i>glr-1p::AMP^r(CS)</i>	A*: aataattataagagacgtgtag
	D1*: cgtttggtatggcttcattcagc
<i>gpa-9p::AMP^r(CA)</i>	A*: accgaatcaaaatatctgaat
	D2*: gcatcttacggatggcatgacag
<i>oig-1p::unc-1::unc-54t</i>	A*: aacatgttttgagcatatttcgcg
	D1*: aatgtattctgtcatttaaggc
<i>osm-3p::unc-1::unc-54t</i>	A*: aattaaattgcctgaaatccg
	D1*: aatgtattctgtcatttaaggc

¹Región promotora denotada con una “p” al final del gen. CS: región cadena sentido gen diana. CA: región cadena antisentido gen diana. AMP^r: gen que codifica para la resistencia a ampicilina en bacterias. *unc-1::unc-54*^{terminador}: ADNc del gen *unc-1* en pauta con la secuencia terminadora de la transcripción del gen *unc-54*.

Tabla 2.21. Plásmidos empleados en este trabajo.

Nombre	inserto	Fuente/Referencia
pVD105	<i>unc-54p::nhr-1(cDNA)</i>	Cedido por el Dr. Nick Burton (Burton et al., 2019)
pL4440	-	Addgene
pUC57_AP1	<i>(TAA)X6::114CAG::HA::c-Myc::Flag::(TAA)X6</i>	GenScript (Este estudio)
pUC57_AP2	<i>(TAA)X6::HA::c-Myc::Flag::(TAA)X6</i>	GenScript (Este estudio)
pUC57_AP3	<i>(TAA)X6::24CAG::HA::c-Myc::Flag::(TAA)X6</i>	Este estudio
pUC57_AP4	<i>(TAA)x6::ATG::9CAG::TdTomato::(TAA)x6</i>	GenScript (Este estudio)
pUC57_AP5	<i>(TAA)x6::ATG::112CAG::TdTomato::(TAA)x6</i>	Este estudio
pDONR221 TM -P1P5r	<i>ccdB-Cm^R</i>	Addgene
pDONR221 TM -P5P2	<i>ccdB-Cm^R</i>	Addgene
pDONR221 TM -P4P1r	<i>ccdB-Cm^R</i>	Addgene
pDONR221 TM -PIP2	<i>ccdB-Cm^R</i>	Addgene
pDONR221 TM -P2rP3	<i>ccdB-Cm^R</i>	Addgene
pDEST-HP2	<i>ccdB-Cm^R – unc-54t</i>	Cedido por Dr. Denisse Walker (Walker et al., 2009)
pDEST-pCFJ150	<i>ccdB-Cm^R</i>	Addgene
pCFJ601	<i>eft-3p::transposasa</i>	Addgene
pMA122	<i>hsp-16.41p::peel-1</i>	Addgene
pGH8	<i>rab-3p::mCherry</i>	Addgene
pCFJ90	<i>myo-2p::mCherry</i>	Addgene
pCFJ104	<i>myo-3p::mCherry</i>	Addgene
pYES	-	Thermofisher
#119867	<i>myr-tdTomato-SV40pA-FKF</i>	Addgene

Tabla 2.22. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

Nombre cepa	Descripción	Fuente
OP50-1	Cepa de <i>E. coli</i> como fuente de alimentación de los nematodos	Addgene
HT115	Cepa de <i>E. coli</i> como fuente de alimentación de los nematodos en ensayos de ARNi	cedida amablemente por la Dra. Carla Lloret (Flames Lab)
TOP10	Células electrocompetentes de <i>E. coli</i> usadas para la transformación y amplificación de plásmidos sin repeticiones	Addgene
MATCH1	Células electrocompetentes de <i>E. coli</i> usadas para la transformación y amplificación de plásmidos sin repeticiones	Addgene
NEB-Stable	Células electrocompetentes de <i>E. coli</i> usadas para la transformación y amplificación de plásmidos con repeticiones	Invitrogen
ccdB Survival	Cepa de <i>E. coli</i> usada para la amplificación y conservación de vectores Gateway	Addgene

Tabla 2.23. Otros cebadores empleados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Finalidad
M13F	gtaaacgacggccag	PCR colonia
M13R	caggaacagctatgac	PCR colonia
T7	taatagactcactataggg	PCR colonia
APG525_D	ggaa gc^ggcgc(NotI)aaggccttcgagtcctcaag	PCR repeticiones CAG (NotI/SacII)
APG526_R	ggaa ccgc^gg(SacII)ggcggcggcggcggcggc	PCR repeticiones CAG (NotI/SacII)

Tabla 2.24. Colección de 85 compuestos de la librería Pfizer.

Número de catálogo	Nombre compuesto
S1005	Axitinib
S1014	Bosutinib (SKI-606)
S1036	PD0325901
S1039	Rapamycin (Sirolimus)
S1042	Sunitinib Malate (Sutent)
S1044	Temsirolimus (Torisel)
S1068	Crizotinib (PF-02341066)
S1080	SU11274
S1094	PF-04217903
S1116	PD 0332991 (Palbociclib) HCl
S1167	CP-724714
S1177	PD98059
S1196	Exemestane
S1198	Irinotecan
S1199	Cladribine
S1208	Doxorubicin (Adriamycin)
S1216	PFI-1
S1223	Epirubicin Hydrochloride
S1235	Letrozole
S1261	Celecoxib
S1264	PD173074
S1283	Asenapine
S1284	Benazepril hydrochloride
S1291	Cetirizine Dihydrochloride
S1294	Cilostazol
S1324	Doxazosin mesylate
S1328	Etodolac (Lodine)
S1331	Fluconazole
S1354	Lansoprazole
S1403	Tigecycline
S1408	Linezolid (Zyvox)
S1431	Sildenafil citrate
S1441	Venlafaxine
S1442	Voriconazole
S1444	Ziprasidone hydrochloride

S1470	TSU-68
S1508	Alprostadil(Caverject)
S1536	CP 673451
S1568	PD318088
S1576	Sulfasalazine (Azulfidine)
S1593	Apixaban
S1611	Cefoperazone (Cefobid)
S1645	Ketoprofen (Actron)
S1658	Dofetilide (Tikosyn)
S1715	Glipizide (Glucotrol)
S1716	Glyburide (Diabeta)
S1727	Levonorgestrel (Levonelle)
S1729	Gemfibrozil (Lopid)
S1733	Methylprednisolone
S1793	Ramipril (Altace)
S1808	Nifedipine (Adalat)
S1835	Azithromycin (Zithromax)
S1905	Amlodipine (Norvasc)
S1958	Sulbactam
S1979	Amiodarone HCl
S2003	Maraviroc
S2077	Atorvastatin calcium (Lipitor)
S2091	Betaxolol (Betoptic)
S2118	Ibutilide fumarate
S2128	Bazedoxifene HCl
S2163	PF-4708671
S2168	PD 128907 HCl
S2222	PF 3716556
S2224	UK 383367
S2457	Clindamycin hydrochloride (Dalacin)
S2525	Phenytoin (Lepitoin)
S2547	Tiotropium Bromide hydrate
S2550	Tolterodine tartrate (Detrol LA)
S2567	Medroxyprogesterone acetate
S2581	Quinapril hydrochloride (Accupril)
S2589	Miglitol (Glyset)
S2590	Pioglitazone (Actos)

Anexo I

S2656	PF-04929113 (SNX-5422)
S2666	PF-3845
S2672	PF-00562271
S2687	PF-2545920
S2717	CP-91149
S2726	PH-797804
S2727	Dacomitinib (PF299804, PF-00299804)
S2743	PF-04691502
S2777	PF-5274857
S2792	Torcetrapib (CP-529414)
S2830	Clindamycin
S2921	PF-4981517
S5001	Tofacitinib citrate (CP-690550 citrate)

Tabla 2.25. Reactivos generales empleados.

Componente	Referencia
Cultivo de <i>C. elegans</i>	
Peptona	#1616.00, Pronadisa
Agar bacteriológico	#1800.00, Pronadisa
NaCl	#MB15901, Nzytech
Colesterol	#C8667, Sigma-Aldrich-Merck
Nistatina	#A3811.0025, PanReac AppliChem
Glicerol	#17904, Thermofisher Scientific
Clonación	
NotI-FD	#FD0594, Thermofisher Scientific
SacII-FD	#ER0205, Thermofisher Scientific
AscI	#ER1891, Thermofisher Scientific
EcoRV-FD	#FD0303, Thermofisher Scientific
Tampón hibridación	#1072570, IDTDNA
Cultivo y transformación bacteriana	
Triptona	#211699, BD
Extracto de levadura	#1196-5365, Fisher Scientific
Ampicilina	#BP1760-25, Fisher Scientific
Carbenicilina	#BP2648-5, Fisher Scientific
Kanamicina	#26899.02, Serva
Estreptomicina	#35500.01, Serva
Tetraciclina	#31741, Sigma-Aldrich-Merck
Cubetas electroporación	#1652089, BioRad
Células electrocompetentes NEB-stable, TOP10 y MATCH1	Este estudio
PCR convencional	
dNTPs	#R0181, Thermofisher Scientific
DMSO	#F515, Thermofisher Scientific
cebadores	IDTDNA
H ₂ O libre de nucleasas	#10977-035, Invitrogen
agarosa	#8023, Pronadisa
Tampón TBE 10X	#15581-044, Invitrogen
Safeview	#NBS-SV, NBS Biologicals
Marcador de peso molecular de ADN (1 kb plus Marker)	#SM1331, Thermofisher Scientific
PCR a tiempo real	
Sondas Taqman	IDTDNA

Placas PCR	#PCR-96-AB-C, Axygen
Film	#UC500, Axygen
Microinyección de <i>C. elegans</i>	
Aceite de montaje	#H8898, Sigma-Aldrich-Merck
Capilares de microinyección (1 x 90mm)	#modelo G1, Narishige
Agujas de microinyección	Este estudio
Extracción de proteínas y análisis bioquímico	
SDS	#L3771, Sigma-Aldrich-Merck
Tris-Base	#H5131, Promega
Beta-mercaptoetanol	#sc-202966, Chem Cruz
Solución de electroforesis 10X (Tris/Glicina/SDS)	#1610772, BioRad
Solución de transferencia 10X (Tris/Glicina)	#1610734, BioRad
Solución de <i>stripping</i>	#T7135A, Takara
Acrilamida 30%	#1610158, BioRad
TEMED	#T9281, Sigma-Aldrich-Merck
APS	#A3678, Sigma-Aldrich-Merck
Marcador de peso molecular de proteínas (<i>Spectra Multicolor ladder</i>)	#26634, Thermofisher Scientific
Membrana PVDF 0,2 µm	#88520, Thermofisher Scientific
Anticuerpo anti-HA	#H9658, Sigma-Aldrich-Merck
Anticuerpo anti-c-myc	#M5546, Sigma-Aldrich-Merck
Anticuerpo anti-Flag	#F3165, Sigma-Aldrich-Merck
Anticuerpo anti-RFP	#600-401-379, Rocklan
Montaje de nematodos	
Azida sódica	#S2002, Sigma-Aldrich-Merck
portaobjetos	#SLIF-005-050, Labbox
cubreobjetos	#D102222, Deltalab
Tratamiento farmacológico y químico de <i>C. elegans</i>	
Metformina	#D150959, Sigma-Aldrich-Merck
Salicilato	#S3007, Sigma-Aldrich-Merck
Cloroquina	#C6628, Sigma-Aldrich-Merck
Ácido dafacrónico	#14100, Cayman Chemical
Dafadine A	#SML0736, Sigma-Aldrich-Merck
Tunicamicina	#ab120296, Abcam

Tabla 2.26. Kits comerciales empleados.

Nombre kit	Finalidad	Referencia
QIAprep spin Miniprep kit	Purificación de vectores plasmídicos para secuenciación y manipulaciones genéticas	#27106, Qiagen
QIAprep spin Midiprep kit	Purificación de vectores plasmídicos con alta pureza	#12643, Qiagen
QIAquick PCR purification kit	Purificación productos PCR	#28106, Qiagen
OMEGA E.Z.N.A Gel extraction kit	Purificación productos PCR de gel	#D2500-02, OMEGA
Kit LB clonasa, Sistema Gateway	Clonación productos PCR en vectores PDONR 221 mediante reacción recombinación BP	#11789-010, Invitrogen
Kit LR clonasa plus, Sistema Gateway	Recombinación homóloga de vectores pDONRs y pDEST mediante reacción LR	#12538-120, Invitrogen

Tabla 2.27. Equipos empleados.

Equipo/aparato	Finalidad	Referencia
Electroporador	Transformación bacteriana	BioRad, Micropulser
Termociclador veriti PCR convencional	PCR, RT	Applied Biosystems, modelo #9902
Equipo electroforesis	PCR	Biocom
Transiluminador	PCR	MaestroGen
Cabina de flujo laminar	Preparación placas NGM	Paster-Bio48
Cabina de extracción de gases	Manipulación de extracciones con compuestos volátiles tóxicos	NUAIRE, modelo #NU-S813-300E
Fastprep	Rotura nematodos	Thermofisher scientific, modelo FP120
Nanodrop	Cuantificación de ácidos nucleicos (ADN y ARN)	Thermofisher Scientific, Spectrophotometer 2000
Termociclador PCR a tiempo real	Ensayos de expresión génica	Applied Biosystems, ViiA 7
Espectrofotómetro para placas	Medida de absorbancia de extractos proteicos	Dynamica, Haloled96
Mini-protean tetra system	Electroforesis de proteínas	BioRad, PowerPac Basic
Trans-Blot Turbo	Electrotransferencia semi-seca	BioRad, trans-blot turbo system
Revelador	Detección proteínas	GE healthcare, Amersham Imager 600
Microinyector	Microinyección <i>C. elegans</i>	Leica, DMI3000 B
Estirador de agujas	Obtención de agujas con calibre determinado para la inyección de <i>C. elegans</i>	Narishige, modelo PC-100

GAGGACACTACCTCGTCGAGTTCAAGACCATCTACATGGCCAAGAAGCCAGTCCA
 CCCAGGATACTACTACGTCGACACCAAGCTCGACATCACCTCCCACAACGAGGACTAC
 ACCATCGTCGAGCAATACGAGCGTTCCGAGGGACGTCACCACCTCTTCCTCGGACACG
 GAACCGGATCCACCGGATCCGGATCCTCCGGAACCGCCTCCTCCGAGGACAACAACAT
 GGCCGTCATCAAGgtaagtttaaacagttcggtaactaactaaccatacatatttaaatttcagGAGTTCATGCGTTTC
 AAGGTCCGTATGGAGGGATCCATGAACGGACACGAGTTTCGAGATCGAGGGAGAGGGA
 GAGGGACGTCCATACGAGGGAACCCAAACCGCCAAGCTCAAGGTCACCAAGGGAGGA
 CCACTCCCATTTCGCCTGGGACATCCTCTCCCCACAATTCATGTACGGATCCAAGGCCTA
 CGTCAAGCACCCAGCCGACATCCAGACTACAAGAAGCTCTCCTTCCCAGAGGGATTC
 AAGTGGGAGCGTGTATGAACCTTCGAGGACGGAGGACTCGTCACCGTCACCCAAGACT
 CCTCCCTCCAAGACGGAACCCTCATCTACAAGgtaagtttaaacatgattttactaactaactaatctgatttaaat
 ttcagGTCAAGATGCGTGGAACCAACTTCCCACCAGACGGACCAGTCATGCAAAAAGAAG
 ACCATGGGATGGGAGGCCTCCACCGAGCGTCTTACCCACGTGACGGAGTCCTCAAGG
 GAGAGATCCACCAAGCCCTCAAGCTCAAGGACGGAGGACACTACCTCGTCGAGTTCAA
 GACCATCTACATGGCCAAGAAGCCAGTCCAACCTCCCAGGATACTACTACGTCGACACC
 AAGCTCGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTCGAGCAATACGAGCGTT
 CCGAGGGACGTCACCACCTTCTCCTTACGGAATGGACGAGCTCTACAAGTAA TTAATT
 AA ACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC

Leyenda:

sitios attB1-B2

TAATAA : 2 codones de parada de traducción por cada pauta de lectura.

CCGCCC : sitio de reconocimiento de corte NotI.

GAATTC : sitio de reconocimiento de corte EcoRI.

CAA : triplete antepenúltimo de expansiones CAG en población con EH, para dar un contexto genómico más natural.

CCGCGG : sitio de reconocimiento de corte SacII.

a : nucleótido para el deslizamiento de pauta.

GGCGCGCC : sitio de reconocimiento de corte AscI.

TTAATTAA : sitio de reconocimiento de corte PacI.

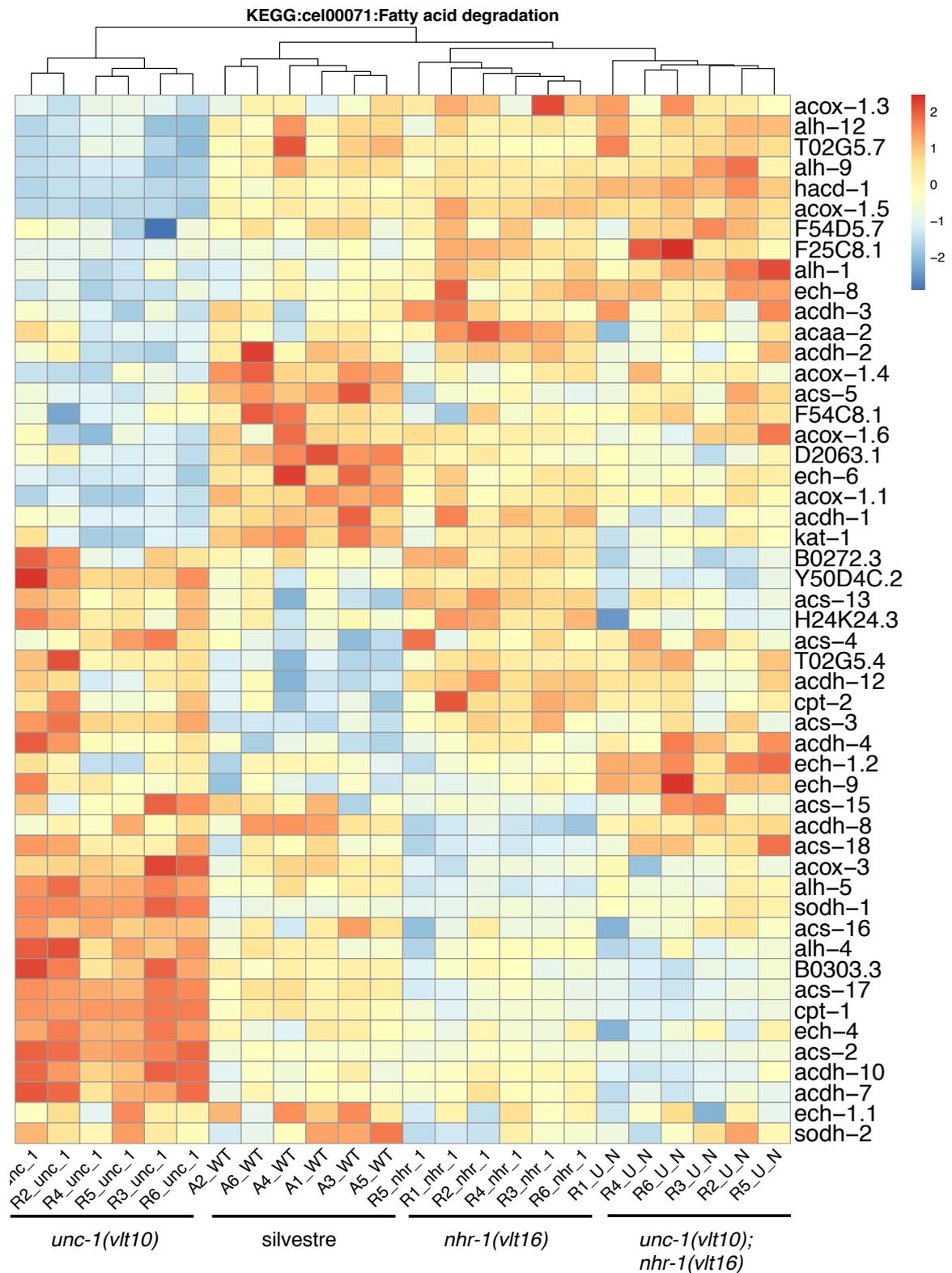
ATC : codón inicio traducción *TdTomato*.

Mayúsculas: secuencia codificante *TdTomato*.

Minúsculas: secuencia no codificante *TdTomato*.

TAA : codón parada traducción *TdTomato*.

ANEXO III



REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Ahmadian, E., Eftekhari, A., Samiei, M., Maleki Dizaj, S., Vinken, M., 2019. The role and therapeutic potential of connexins, pannexins and their channels in Parkinson's disease. *Cellular Signalling* 58, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.03.010>
- Alcoriza-Balaguer, M.I., García-Cañaveras, J.C., López, A., Conde, I., Juan, O., Carretero, J., Lahoz, A., 2019. LipidMS: An R Package for Lipid Annotation in Untargeted Liquid Chromatography-Data Independent Acquisition-Mass Spectrometry Lipidomics. *Anal. Chem.* 91, 836–845. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03409>
- Altun, Z.F., Chen, B., Wang, Z.-W., Hall, D.H., 2009a. High resolution map of *Caenorhabditis elegans* gap junction proteins. *Dev. Dyn.* 238, 1936–1950. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22025>
- Andrae, J., Gallini, R., Betsholtz, C., 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & Development* 22, 1276–1312. <https://doi.org/10.1101/gad.1653708>
- Andreassen, O., 2002. Huntington's Disease of the Endocrine Pancreas: Insulin Deficiency and Diabetes Mellitus due to Impaired Insulin Gene Expression. *Neurobiology of Disease* 11, 410–424. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2002.0562>
- Angeles-Albores, D., Lee, R.Y.N., Chan, J., Sternberg, P.W., 2018. Two new functions in the WormBase Enrichment Suite. <https://doi.org/10.17912/W25Q2N>
- Angeles-Albores, D., N. Lee, R.Y., Chan, J., Sternberg, P.W., 2016. Tissue enrichment analysis for *C. elegans* genomics. *BMC Bioinformatics* 17, 366. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1229-9>
- Antebi, A., 2015. Nuclear receptor signal transduction in *C. elegans*. *WormBook* 1–49. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.64.2>
- Antebi, A., Yeh, W.H., Tait, D., Hedgecock, E.M., Riddle, D.L., 2000. *daf-12* encodes a nuclear receptor that regulates the dauer diapause and developmental age in *C. elegans*. *Genes Dev.* 14, 1512–1527.
- Apfeld, J., 2004. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes & Development* 18, 3004–3009. <https://doi.org/10.1101/gad.1255404>
- Arda, H.E., Taubert, S., MacNeil, L.T., Conine, C.C., Tsuda, B., Van Gilst, M., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Yamamoto, K.R., Walhout, A.J.M., 2010. Functional modularity of nuclear hormone receptors in a *Caenorhabditis elegans* metabolic gene regulatory network. *Mol Syst Biol* 6, 367. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.23>
- Arneson, D., Zhang, Y., Yang, X., Narayanan, M., 2018. Shared mechanisms among neurodegenerative diseases: from genetic factors to gene networks. *J. Genet.* 97, 795–806.
- Arnoux, I., Willam, M., Griesche, N., Krummeich, J., Watari, H., Offermann, N., Weber, S., Narayan Dey, P., Chen, C., Monteiro, O., Buettner, S., Meyer, K., Bano, D., Radyushkin, K., Langston, R., Lambert, J.J., Wanker, E., Methner, A., Krauss, S., Schweiger, S., Stroh, A., 2018. Metformin reverses early cortical network dysfunction and behavior changes in Huntington's

- disease. *eLife* 7, e38744.
<https://doi.org/10.7554/eLife.38744>
- Artal-Sanz, M., Tavernarakis, N., 2009. Prohibitin couples diapause signalling to mitochondrial metabolism during ageing in *C. elegans*. *Nature* 461, 793–797.
<https://doi.org/10.1038/nature08466>
- Ash, P.E.A., Bieniek, K.F., Gendron, T.F., Caulfield, T., Lin, W.-L., DeJesus-Hernandez, M., van Blitterswijk, M.M., Jansen-West, K., Paul, J.W., Rademakers, R., Boylan, K.B., Dickson, D.W., Petrucelli, L., 2013. Unconventional Translation of C9ORF72 GGGGCC Expansion Generates Insoluble Polypeptides Specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 77, 639–646.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.004>
- Banerjee, A., Khemka, V.K., Ganguly, A., Roy, D., Ganguly, U., Chakrabarti, S., 2015. Vitamin D and Alzheimer’s Disease: Neurocognition to Therapeutics. *International Journal of Alzheimer’s Disease* 2015, 1–11.
<https://doi.org/10.1155/2015/192747>
- Bañez-Coronel, M., Ayhan, F., Tarabochia, A.D., Zu, T., Perez, B.A., Tusi, S.K., Pletnikova, O., Borchelt, D.R., Ross, C.A., Margolis, R.L., Yachnis, A.T., Troncoso, J.C., Ranum, L.P.W., 2015a. RAN Translation in Huntington Disease. *Neuron* 88, 667–677.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.038>
- Bansal, A., Zhu, L.J., Yen, K., Tissenbaum, H.A., 2015. Uncoupling lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* longevity mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, E277–E286.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1412192112>
- Bargmann, C., Horvitz, H., 1991. Control of larval development by chemosensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 251, 1243–1246.
<https://doi.org/10.1126/science.2006412>
- Barish, G.D., 2006. PPAR: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 116, 590–597.
<https://doi.org/10.1172/JCI27955>
- Barnes, K., Ingram, J.C., Porras, O.H., Barros, L.F., Hudson, E.R., Fryer, L.G.D., Fougelle, F., Carling, D., Hardie, D.G., Baldwin, S.A., 2002. Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J. Cell. Sci.* 115, 2433–2442.
- Bayliss, J.A., Lemus, M.B., Santos, V.V., Deo, M., Davies, J.S., Kemp, B.E., Elsworth, J.D., Andrews, Z.B., 2016. Metformin Prevents Nigrostriatal Dopamine Degeneration Independent of AMPK Activation in Dopamine Neurons. *PLoS ONE* 11, e0159381.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159381>
- Begandt, D., Good, M.E., Keller, A.S., DeLalio, L.J., Rowley, C., Isakson, B.E., Figueroa, X.F., 2017. Pannexin channel and connexin hemichannel expression in vascular function and inflammation. *BMC Cell Biol.* 18, 2.
<https://doi.org/10.1186/s12860-016-0119-3>
- Berthier, A., Payá, M., García-Cabrero, A.M., Ballester, M.I., Heredia, M., Serratos, J.M., Sánchez, M.P., Sanz, P., 2016. Pharmacological Interventions to Ameliorate Neuropathological Symptoms in a Mouse Model of Lafora Disease. *Mol Neurobiol* 53, 1296–1309.
<https://doi.org/10.1007/s12035-015-9091-8>
- Beyer, E.C., Berthoud, V.M., 2018. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and

- pannexins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1860, 5–8.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.016>
- Bhanwra, S., Ahluwalia, K., 2014. The new factor Xa inhibitor: Apixaban. *J Pharmacol Pharmacother* 5, 12. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.124409>
- Bhat, 2009. Does aspirin acetylate multiple cellular proteins? (Review). *Mol Med Rep* 2. https://doi.org/10.3892/mmr_00000132
- Blackwell, T.K., Steinbaugh, M.J., Hourihan, J.M., Ewald, C.Y., Isik, M., 2015. SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine* 88, 290–301.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.008>
- Blondeau, N., Lipsky, R.H., Bourourou, M., Duncan, M.W., Gorelick, P.B., Marini, A.M., 2015. Alpha-Linolenic Acid: An Omega-3 Fatty Acid with Neuroprotective Properties—Ready for Use in the Stroke Clinic? *BioMed Research International* 2015, 1–8.
<https://doi.org/10.1155/2015/519830>
- Bogomazova, A.N., Eremeev, A.V., Pozmogova, G.E., Lagarkova, M.A., 2019. [The Role of Mutant RNA in the Pathogenesis of Huntington's Disease and Other Polyglutamine Diseases]. *Mol. Biol. (Mosk.)* 53, 954–967.
<https://doi.org/10.1134/S002689841906003X>
- Bono-Yagüe, J., Gómez-Escribano, A.P., Millán, J.M., Vázquez-Manrique, R.P., 2020. Reactive Species in Huntington Disease: Are They Really the Radicals You Want to Catch? *Antioxidants* 9, 577.
<https://doi.org/10.3390/antiox9070577>
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71–94.
- Brignull, H. R., Moore, F.E., Tang, S.J., Morimoto, R.I., 2006a. Polyglutamine Proteins at the Pathogenic Threshold Display Neuron-Specific Aggregation in a Pan-Neuronal *Caenorhabditis elegans* Model. *Journal of Neuroscience* 26, 7597–7606.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0990-06.2006>
- Brignull, Heather R., Morley, J.F., Garcia, S.M., Morimoto, R.I., 2006. Modeling Polyglutamine Pathogenesis in *C. elegans*, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 256–282.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)12016-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)12016-9)
- Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.-P., Hudson, T., Sohn, R., Zemelman, B., Snell, R.G., Rundle, S.A., Crow, S., Davies, J., Shelbourne, P., Buxton, J., Jones, C., Juvonen, V., Johnson, K., Harper, P.S., Shaw, D.J., Housman, D.E., 1992. Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68, 799–808. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90154-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90154-5)
- Brooks, K.K., Liang, B., Watts, J.L., 2009. The Influence of Bacterial Diet on Fat Storage in *C. elegans*. *PLoS ONE* 4, e7545.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007545>
- Burton, N.O., Dwivedi, V.K., Burkhart, K.B., Kaplan, R.E.W., Baugh, L.R., Horvitz, H.R., 2018. Neurohormonal signaling via a sulfotransferase antagonizes insulin-like signaling to regulate a *Caenorhabditis elegans* stress response. *Nat Commun* 9, 5152.

- <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07640-w>
- Butcher, N.J., Horne, M.K., Mellick, G.D., Fowler, C.J., Masters, C.L., Minchin, R.F., 2018. Sulfotransferase 1A3/4 copy number variation is associated with neurodegenerative disease. *Pharmacogenomics J* 18, 209–214. <https://doi.org/10.1038/tpj.2017.4>
- Cai, H., Cong, W., Ji, S., Rothman, S., Maudsley, S., Martin, B., 2012. Metabolic Dysfunction in Alzheimers Disease and Related Neurodegenerative Disorders. *CAR* 9, 5–17. <https://doi.org/10.2174/156720512799015064>
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., Ron, D., 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92–96. <https://doi.org/10.1038/415092a>
- Carroll, B.T., Dubyak, G.R., Sedensky, M.M., Morgan, P.G., 2006. Sulfated Signal from ASJ Sensory Neurons Modulates Stomatin-dependent Coordination in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 281, 35989–35996. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606086200>
- Çelen, İ., Doh, J.H., Sabanayagam, C.R., 2018. Effects of liquid cultivation on gene expression and phenotype of *C. elegans*. *BMC Genomics* 19, 562. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4948-7>
- Chamouton, J., Latruffe, N., 2012. PPAR α /HNF4 α ; Interplay on Diversified Responsive Elements. Relevance in the Regulation of Liver Peroxisomal Fatty Acid Catabolism. *CDM* 13, 1436–1453. <https://doi.org/10.2174/138920012803762738>
- Chapman, E., Ding, S., Schultz, P.G., Wong, C.-H., 2002. A Potent and Highly Selective Sulfotransferase Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 14524–14525. <https://doi.org/10.1021/ja021086u>
- Chawla, A., 2001. Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files. *Science* 294, 1866–1870. <https://doi.org/10.1126/science.294.5548.1866>
- Chelur, D.S., Chalfie, M., 2007. Targeted cell killing by reconstituted caspases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 2283–2288. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610877104>
- Chen, B., Liu, Q., Ge, Q., Xie, J., Wang, Z.-W., 2007. UNC-1 Regulates Gap Junctions Important to Locomotion in *C. elegans*. *Current Biology* 17, 1334–1339. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.060>
- Chen, J., Ou, Y., Li, Y., Hu, S., Shao, L.-W., Liu, Y., 2017. Metformin extends *C. elegans* lifespan through lysosomal pathway. *eLife* 6, e31268. <https://doi.org/10.7554/eLife.31268>
- Chen, Y., Zhou, K., Wang, R., Liu, Y., Kwak, Y.-D., Ma, T., Thompson, R.C., Zhao, Y., Smith, L., Gasparini, L., Luo, Z., Xu, H., Liao, F.-F., 2009. Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 3907–3912. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807991106>
- Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2016. Terrace Aware Data Structure for Phylogenomic Inference from Supermatrices. *Syst Biol* 65, 997–1008. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syw037>

- Chiang, M.-C., Chen, C.-M., Lee, M.-R., Chen, H.-W., Chen, H.-M., Wu, Y.-S., Hung, C.-H., Kang, J.-J., Chang, C.-P., Chang, C., Wu, Y.-R., Tsai, Y.-S., Chern, Y., 2010. Modulation of energy deficiency in Huntington's disease via activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Human Molecular Genetics* 19, 4043–4058. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq322>
- Chitwood, D.J., Lusby, W.R., Thompson, M.J., Kochansky, J.P., Howarth, O.W., 1995. The glycosylceramides of the nematode *Caenorhabditis elegans* contain an unusual, branched-chain sphingoid base. *Lipids* 30, 567–573. <https://doi.org/10.1007/BF02537032>
- Cho, D.H., Thienes, C.P., Mahoney, S.E., Analau, E., Filippova, G.N., Tapscott, S.J., 2005. Antisense Transcription and Heterochromatin at the DM1 CTG Repeats Are Constrained by CTCF. *Molecular Cell* 20, 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.09.002>
- Choi, H.W., Tian, M., Manohar, M., Harraz, M.M., Park, S.-W., Schroeder, F.C., Snyder, S.H., Klessig, D.F., 2015. Human GAPDH Is a Target of Aspirin's Primary Metabolite Salicylic Acid and Its Derivatives. *PLoS ONE* 10, e0143447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143447>
- Chung, D.W., Rudnicki, D.D., Yu, L., Margolis, R.L., 2011. A natural antisense transcript at the Huntington's disease repeat locus regulates HTT expression. *Human Molecular Genetics* 20, 3467–3477. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr263>
- Ciechanover, A., Kwon, Y.T., 2017. Protein Quality Control by Molecular Chaperones in Neurodegeneration. *Front. Neurosci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00185>
- Clifford, J.J., Drago, J., Natoli, A.L., Wong, J.Y.F., Kinsella, A., Waddington, J.L., Vaddadi, K.S., 2002. Essential fatty acids given from conception prevent topographies of motor deficit in a transgenic model of Huntington's disease. *Neuroscience* 109, 81–88. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00409-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00409-2)
- Cook, S.J., Jarrell, T.A., Brittin, C.A., Wang, Y., Bloniarz, A.E., Yakovlev, M.A., Nguyen, K.C.Q., Tang, L.T.-H., Bayer, E.A., Duerr, J.S., Bülow, H.E., Hobert, O., Hall, D.H., Emmons, S.W., 2019. Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature* 571, 63–71. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1352-7>
- Crespo Yanguas, S., Willebrods, J., Johnstone, S.R., Maes, M., Decrock, E., De Bock, M., Leybaert, L., Cogliati, B., Vinken, M., 2017. Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.006>
- Cruz-Mariño, T., Laffita-Mesa, J.M., Gonzalez-Zaldivar, Y., Velazquez-Santos, M., Aguilera-Rodriguez, R., Estupinan-Rodriguez, A., Vazquez-Mojena, Y., Macleod, P., Paneque, M., Velazquez-Perez, L., 2014. Large Normal and Intermediate Alleles in the Context of SCA2 Prenatal Diagnosis. *J Genet Counsel* 23, 89–96. <https://doi.org/10.1007/s10897-013-9615-1>
- Curry, D.W., Stutz, B., Andrews, Z.B., Elsworth, J.D., 2018. Targeting AMPK Signaling as a Neuroprotective Strategy in Parkinson's Disease. *JPD* 8, 161–181. <https://doi.org/10.3233/JPD-171296>
- Dachineni, R., Kumar, D.R., Callegari, E., Kesharwani, S.S., Sankaranarayanan, R., Seefeldt, T., Tummala, H., Bhat, G.J., 2017.

- Salicylic acid metabolites and derivatives inhibit CDK activity: Novel insights into aspirin's chemopreventive effects against colorectal cancer. *International Journal of Oncology* 51, 1661–1673. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4167>
- Davies, J.E., Rubinsztein, D.C., 2006. Polyalanine and polyserine frameshift products in Huntington's disease. *Journal of Medical Genetics* 43, 893–896. <https://doi.org/10.1136/jmg.2006.044222>
- Davletov, B., Montecucco, C., 2010. Lipid function at synapses. *Current Opinion in Neurobiology* 20, 543–549. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.06.008>
- de Mezer, M., Wojciechowska, M., Napierala, M., Sobczak, K., Krzyzosiak, W.J., 2011. Mutant CAG repeats of Huntingtin transcript fold into hairpins, form nuclear foci and are targets for RNA interference. *Nucleic Acids Research* 39, 3852–3863. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1323>
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T., Ozato, K., 2003. The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8758–8763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1433065100>
- Dickey, A.S., Pineda, V.V., Tsunemi, T., Liu, P.P., Miranda, H.C., Gilmore-Hall, S.K., Lomas, N., Sampat, K.R., Buttgereit, A., Torres, M.-J.M., Flores, A.L., Arreola, M., Arbez, N., Akimov, S.S., Gaasterland, T., Lazarowski, E.R., Ross, C.A., Yeo, G.W., Sopher, B.L., Magnuson, G.K., Pinkerton, A.B., Masliah, E., La Spada, A.R., 2016. PPAR- δ is repressed in Huntington's disease, is required for normal neuronal function and can be targeted therapeutically. *Nat Med* 22, 37–45. <https://doi.org/10.1038/nm.4003>
- Djouadi, F., Weinheimer, C.J., Saffitz, J.E., Pitchford, C., Bastin, J., Gonzalez, F.J., Kelly, D.P., 1998. A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 102, 1083–1091. <https://doi.org/10.1172/JCI3949>
- Djousse, L., Knowlton, B., Cupples, L.A., Marder, K., Shoulson, I., Myers, R.H., 2002. Weight loss in early stage of Huntington's disease. *Neurology* 59, 1325–1330. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000031791.10922.CF>
- Duffy, D., Rader, D.J., 2005. Drugs in development: targeting high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport. *Current Opinion in Cardiology* 20, 301–306. <https://doi.org/10.1097/01.hco.0000168532.69342.26>
- Dumas, K.J., Guo, C., Shih, H.-J., Hu, P.J., 2013. Influence of Steroid Hormone Signaling on Life Span Control by *Caenorhabditis elegans* Insulin-Like Signaling. *G3* 3, 841–850. <https://doi.org/10.1534/g3.112.005116>
- Dupont, N., Chauhan, S., Arko-Mensah, J., Castillo, E.F., Masedunskas, A., Weigert, R., Robenek, H., Proikas-Cezanne, T., Deretic, V., 2014. Neutral Lipid Stores and Lipase PNPLA5 Contribute to Autophagosome Biogenesis. *Current Biology* 24, 609–620. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.02.008>
- Echeverria, G.V., Cooper, T.A., 2012. RNA-binding proteins in microsatellite expansion disorders: Mediators of RNA toxicity. *Brain Research* 1462, 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.030>

- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Escorcía, W., Ruter, D.L., Nhan, J., Curran, S.P., 2018. Quantification of Lipid Abundance and Evaluation of Lipid Distribution in *Caenorhabditis elegans* by Nile Red and Oil Red O Staining. *JoVE* 57352. <https://doi.org/10.3791/57352>
- Espada, L., Dakhovnik, A., Chaudhari, P., Martirosyan, A., Miek, L., Poliezhayeva, T., Schaub, Y., Nair, A., Döring, N., Rahnis, N., Werz, O., Koeberle, A., Kirkpatrick, J., Ori, A., Ermolaeva, M.A., 2019. Late life metformin treatment limits cell survival and shortens lifespan by triggering an aging-associated failure of energy metabolism (preprint). *Physiology*. <https://doi.org/10.1101/863357>
- Fardaei, M., 2001. In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Research* 29, 2766–2771. <https://doi.org/10.1093/nar/29.13.2766>
- Farias-Pereira, R., Park, Y., 2019. Cafestol Increases Fat Oxidation and Energy Expenditure in *Caenorhabditis Elegans* via DAF-12-dependent Pathway (OR34-02-19). *Current Developments in Nutrition* 3, nzz031. OR34-02-19. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzz031.0R34-02-19>
- Farina, F., Lambert, E., Commeau, L., Lejeune, F.-X., Roudier, N., Fonte, C., Parker, J.A., Boddaert, J., Verny, M., Baulieu, E.-E., Neri, C., 2017. The stress response factor daf-16/FOXO is required for multiple compound families to prolong the function of neurons with Huntington’s disease. *Sci Rep* 7, 4014. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04256-w>
- Fisher, A.L., Lithgow, G.J., 2006. The nuclear hormone receptor DAF-12 has opposing effects on *Caenorhabditis elegans* lifespan and regulates genes repressed in multiple long-lived worms. *Aging Cell* 5, 127–138. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00203.x>
- Fisher, K., Gee, F., Wang, S., Xue, F., Knapp, S., Philpott, M., Wells, C., Rodriguez, M., Snoek, L.B., Kammenga, J., Poulin, G.B., 2013. Maintenance of muscle myosin levels in adult *C. elegans* requires both the double bromodomain protein BET-1 and sumoylation. *Biology Open* 2, 1354–1363. <https://doi.org/10.1242/bio.20136007>
- Fischer, A., Krzyzosiak, W.J., 2013. RNA toxicity in polyglutamine disorders: concepts, models, and progress of research. *J Mol Med* 91, 683–691. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1016-2>
- Florence, B., Faller, D.V., 2001. You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators. *Front. Biosci.* 6, D1008-1018. <https://doi.org/10.2741/florence>
- Folick, A., Oakley, H.D., Yu, Y., Armstrong, E.H., Kumari, M., Sanor, L., Moore, D.D., Ortlund, E.A., Zechner, R., Wang, M.C., 2015. Lysosomal signaling molecules regulate longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 347, 83–86. <https://doi.org/10.1126/science.1258857>
- Ford, R.J., Fullerton, M.D., Pinkosky, S.L., Day, E.A., Scott, J.W., Oakhill, J.S., Bujak, A.L., Smith, B.K., Crane, J.D., Blümer, R.M., Marcinko, K., Kemp, B.E., Gerstein, H.C., Steinberg, G.R., 2015. Metformin and salicylate synergistically activate liver AMPK, inhibit lipogenesis and improve insulin sensitivity. *Biochemical Journal* 468, 125–132. <https://doi.org/10.1042/BJ20150125>

- Forouzandeh, F., Salazar, G., Patrushev, N., Xiong, S., Hilenski, L., Fei, B., Alexander, R.W., 2014. Metformin Beyond Diabetes: Pleiotropic Benefits of Metformin in Attenuation of Atherosclerosis. *JAHA* 3. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001202>
- Frøkjær-Jensen, C., Davis, M.W., Ailion, M., Jorgensen, E.M., 2012a. Improved Mos1-mediated transgenesis in *C. elegans*. *Nat Methods* 9, 117–118. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1865>
- Frøkjær-Jensen, C., Wayne Davis, M., Hopkins, C.E., Newman, B.J., Thummel, J.M., Olesen, S.-P., Grunnet, M., Jorgensen, E.M., 2008. Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* 40, 1375–1383. <https://doi.org/10.1038/ng.248>
- Fu, H., Hardy, J., Duff, K.E., 2018. Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 21, 1350–1358. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0221-2>
- Fullerton, M.D., Ford, R.J., McGregor, C.P., LeBlond, N.D., Snider, S.A., Stypa, S.A., Day, E.A., Lhoták, Š., Schertzer, J.D., Austin, R.C., Kemp, B.E., Steinberg, G.R., 2015. Salicylate improves macrophage cholesterol homeostasis via activation of Ampk. *J. Lipid Res.* 56, 1025–1033. <https://doi.org/10.1194/jlr.M058875>
- Fullerton, M.D., Galic, S., Marcinko, K., Sikkema, S., Pulinilkunnil, T., Chen, Z.-P., O'Neill, H.M., Ford, R.J., Palanivel, R., O'Brien, M., Hardie, D.G., Macaulay, S.L., Schertzer, J.D., Dyck, J.R.B., van Denderen, B.J., Kemp, B.E., Steinberg, G.R., 2013. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat Med* 19, 1649–1654. <https://doi.org/10.1038/nm.3372>
- G. Vonsattel, J.P., DiFiglia, M., 1998. Huntington Disease: Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 57, 369–384. <https://doi.org/10.1097/00005072-199805000-00001>
- Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R.G., Windmill, K.F., Martin, J.L., McManus, M.E., 2006. Human Sulfotransferases and Their Role in Chemical Metabolism. *Toxicological Sciences* 90, 5–22. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj061>
- Gao, F.-B., Richter, J.D., 2017. Microsatellite Expansion Diseases: Repeat Toxicity Found in Translation. *Neuron* 93, 249–251. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.001>
- Garcia, S.M., Casanueva, M.O., Silva, M.C., Amaral, M.D., Morimoto, R.I., 2007. Neuronal signaling modulates protein homeostasis in *Caenorhabditis elegans* post-synaptic muscle cells. *Genes & Development* 21, 3006–3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1575307>
- Garcia, S.M.D.A., Tabach, Y., Lourenço, G.F., Armakola, M., Ruvkun, G., 2014. Identification of genes in toxicity pathways of trinucleotide-repeat RNA in *C. elegans*. *Nat Struct Mol Biol* 21, 712–720. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2858>
- Gaspar, C., 2000. CAG tract of MJD-1 may be prone to frameshifts causing polyalanine accumulation. *Human Molecular Genetics* 9, 1957–1966. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.13.1957>
- Gerisch, B., Rottiers, V., Li, D., Motola, D.L., Cummins, C.L., Lehrach, H., Mangelsdorf, D.J., Antebi, A., 2007. A bile acid-like steroid modulates *Caenorhabditis elegans* lifespan through nuclear receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 5014–5019.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0700847104>

Gillette-Guyonnet, S., Nourhashemi, F., Andrieu, S., de Glisezinski, I., Ousset, P.J., Riviere, D., Albarède, J.-L., Vellas, B., 2000. Weight loss in Alzheimer disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71, 637S-642S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.2.637s>

Gilst, M.R.V., Hadjivassiliou, H., Jolly, A., Yamamoto, K.R., 2005. Nuclear Hormone Receptor NHR-49 Controls Fat Consumption and Fatty Acid Composition in *C. elegans*. *PLoS Biol* 3, e53. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030053>

Giunti, P., 1998. The role of the SCA2 trinucleotide repeat expansion in 89 autosomal dominant cerebellar ataxia families. Frequency, clinical and genetic correlates. *Brain* 121, 459-467. <https://doi.org/10.1093/brain/121.3.459>

Goh, G.Y.S., Winter, J.J., Bhanshali, F., Doering, K.R.S., Lai, R., Lee, K., Veal, E.A., Taubert, S., 2018. NHR-49/HNF4 integrates regulation of fatty acid metabolism with a protective transcriptional response to oxidative stress and fasting. *Aging Cell* 17, e12743. <https://doi.org/10.1111/accel.12743>

Gómez-Escribano, A., Bono-Yagüe, J., García-Gimeno, M., Sequedo, M., Hervás, D., Fornés-Ferrer, V., Torres-Sánchez, S., Millán, J., Sanz, P., Vázquez-Manrique, R., 2020. Synergistic activation of AMPK prevents from polyglutamine-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacological Research* 161, 105105. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105105>

Gonzalez-Barrios, M., Fierro-Gonzalez, J.C., Krpelanova, E., Mora-Lorca, J.A., Pedrajas, J.R., Penate, X.,

Chavez, S., Swoboda, P., Jansen, G., Miranda-Vizuete, A., 2015. Cis- and Trans-Regulatory Mechanisms of Gene Expression in the ASJ Sensory Neuron of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 200, 123-134. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176172>

Gottlieb, B., Auld, W.H.R., 1962. Metformin in Treatment of Diabetes Mellitus. *BMJ* 1, 680-682. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5279.680>

Goudeau, J., Bellemin, S., Toselli-Mollereau, E., Shamalnasab, M., Chen, Y., Aguilaniu, H., 2011. Fatty Acid Desaturation Links Germ Cell Loss to Longevity Through NHR-80/HNF4 in *C. elegans*. *PLoS Biol* 9, e1000599. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000599>

Guerrero-Gómez, D., Mora-Lorca, J.A., Sáenz-Narciso, B., Naranjo-Galindo, F.J., Muñoz-Lobato, F., Parrado-Fernández, C., Goikolea, J., Cedazo-Minguez, Á., Link, C.D., Neri, C., Sequedo, M.D., Vázquez-Manrique, R.P., Fernández-Suárez, E., Goder, V., Pané, R., Cabisco, E., Askjaer, P., Cabello, J., Miranda-Vizuete, A., 2019. Loss of glutathione redox homeostasis impairs proteostasis by inhibiting autophagy-dependent protein degradation. *Cell Death Differ* 26, 1545-1565. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0270-9>

Güiza, J., Barriá, I., Sáez, J.C., Vega, J.L., 2018. Innexins: Expression, Regulation, and Functions. *Front. Physiol.* 9, 1414. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01414>

Gureev, A.P., Shaforostova, E.A., Popov, V.N., 2019. Regulation of Mitochondrial Biogenesis as a Way for Active Longevity: Interaction Between the Nrf2 and PGC-1 α Signaling Pathways. *Front. Genet.* 10, 435.

- <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00435>
- Hall, D.H., 2017. Gap junctions in *C. elegans*: Their roles in behavior and development: Gap Junctions in *C. elegans*. *Devel Neurobio* 77, 587–596. <https://doi.org/10.1002/dneu.22408>
- Hart, A., 2006. Behavior. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.87.1>
- Hashimoto, T., Cook, W.S., Qi, C., Yeldandi, A.V., Reddy, J.K., Rao, M.S., 2000. Defect in Peroxisome Proliferator-activated Receptor α -inducible Fatty Acid Oxidation Determines the Severity of Hepatic Steatosis in Response to Fasting. *J. Biol. Chem.* 275, 28918–28928. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910350199>
- Hattori, K., Inoue, M., Inoue, T., Arai, H., Tamura, H., 2006. A Novel Sulfotransferase Abundantly Expressed in the Dauer Larvae of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biochemistry* 139, 355–362. <https://doi.org/10.1093/jb/mvj041>
- Hawley, S.A., Fullerton, M.D., Ross, F.A., Schertzer, J.D., Chevtzoff, C., Walker, K.J., Pegg, M.W., Zibrova, D., Green, K.A., Mustard, K.J., Kemp, B.E., Sakamoto, K., Steinberg, G.R., Hardie, D.G., 2012. The Ancient Drug Salicylate Directly Activates AMP-Activated Protein Kinase. *Science* 336, 918–922. <https://doi.org/10.1126/science.1215327>
- Hayhurst, G.P., Lee, Y.H., Lambert, G., Ward, J.M., Gonzalez, F.J., 2001. Hepatocyte nuclear factor 4 α (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1393–1403. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.4.1393-1403.2001>
- Herndon, L.A., Schmeissner, P.J., Dudaronek, J.M., Brown, P.A., Listner, K.M., Sakano, Y., Paupard, M.C., Hall, D.H., Driscoll, M., 2002. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature* 419, 808–814. <https://doi.org/10.1038/nature01135>
- Hervás, D., Fornés-Ferrer, V., Gómez-Escribano, A.P., Sequedo, M.D., Peiró, C., Millán, J.M., Vázquez-Manrique, R.P., 2017. Metformin intake associates with better cognitive function in patients with Huntington’s disease. *PLoS ONE* 12, e0179283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179283>
- Hilliard, M.A., Apicella, A.J., Kerr, R., Suzuki, H., Bazzicalupo, P., Schafer, W.R., 2005. In vivo imaging of *C. elegans* ASH neurons: cellular response and adaptation to chemical repellents. *EMBO J* 24, 63–72. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600493>
- Hobert, O., 2013. The neuronal genome of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* 1–106. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.161.1>
- Hobert, O., 2002. PCR Fusion-Based Approach to Create Reporter Gene Constructs for Expression Analysis in Transgenic *C. elegans*. *BioTechniques* 32, 728–730. <https://doi.org/10.2144/02324bm01>
- Holmans, P.A., Massey, T.H., Jones, L., 2017. Genetic modifiers of Mendelian disease: Huntington’s disease and the trinucleotide repeat disorders. *Human Molecular Genetics* 26, R83–R90. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx261>
- Houge, G., Bruland, O., Bjornevoll, I., Hayden, M.R., Semaka, A., 2013. De novo Huntington disease caused by 26–44 CAG repeat expansion on a low-risk haplotype.

- Neurology 81, 1099–1100.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a4a4af>
- Houseley, J.M., Wang, Z., Brock, G.J.R., Soloway, J., Artero, R., Perez-Alonso, M., O'Dell, K.M.C., Monckton, D.G., 2005. Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to Drosophila. Human Molecular Genetics 14, 873–883.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi080>
- Hsu, R.-J., Hsiao, K.-M., Lin, M.-J., Li, C.-Y., Wang, L.-C., Chen, L.-K., Pan, H., 2011. Long Tract of Untranslated CAG Repeats Is Deleterious in Transgenic Mice. PLoS ONE 6, e16417.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016417>
- Hu, P.J., 2007. Dauer. WormBook.
<https://doi.org/10.1895/wormbook.1.144.1>
- Huang, E.S., Strate, L.L., Ho, W.W., Lee, S.S., Chan, A.T., 2011. Long-Term Use of Aspirin and the Risk of Gastrointestinal Bleeding. The American Journal of Medicine 124, 426–433.
<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2010.12.022>
- Huang, P., Chandra, V., Rastinejad, F., 2014. Retinoic Acid Actions through Mammalian Nuclear Receptors. Chem. Rev. 114, 233–254.
<https://doi.org/10.1021/cr400161b>
- Hurlbert, M.S., Zhou, W., Wasmeier, C., Kaddis, F.G., Hutton, J.C., Freed, C.R., 1999. Mice transgenic for an expanded CAG repeat in the Huntington's disease gene develop diabetes. Diabetes 48, 649–651.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.48.3.649>
- Imanikia, S., Sheng, M., Castro, C., Griffin, J.L., Taylor, R.C., 2019. XBP-1 Remodels Lipid Metabolism to Extend Longevity. Cell Reports 28, 581–589.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.057>
- Iser, W.B., Wolkow, C.A., 2007. DAF-2/Insulin-Like Signaling in C. elegans Modifies Effects of Dietary Restriction and Nutrient Stress on Aging, Stress and Growth. PLoS ONE 2, e1240.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001240>
- Ishiguro, T., Sato, N., Ueyama, M., Fujikake, N., Sellier, C., Kanegami, A., Tokuda, E., Zamiri, B., Gall-Duncan, T., Mirceta, M., Furukawa, Y., Yokota, T., Wada, K., Taylor, J.P., Pearson, C.E., Charlet-Berguerand, N., Mizusawa, H., Nagai, Y., Ishikawa, K., 2017. Regulatory Role of RNA Chaperone TDP-43 for RNA Misfolding and Repeat-Associated Translation in SCA31. Neuron 94, 108–124.e7.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.046>
- Jang, H., Levy, S., Flavell, S.W., Mende, F., Latham, R., Zimmer, M., Bargmann, C.I., 2017. Dissection of neuronal gap junction circuits that regulate social behavior in *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci USA 114, E1263–E1272.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1621274114>
- Jasinska, A., Krzyzosiak, W.J., 2004. Repetitive sequences that shape the human transcriptome. FEBS Letters 567, 136–141.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.109>
- Jedrusik, M.A., Schulze, E., 2001. A single histone H1 isoform (H1.1) is essential for chromatin silencing and germline development in *Caenorhabditis elegans*. Development (Cambridge, England) 128, 1069–1080.
- Jia, K., Albert, P.S., Riddle, D.L., 2002. DAF-9, a cytochrome P450

- regulating *C. elegans* larval development and adult longevity. *Development* 129, 221–231.
- Jia, K., Hart, A.C., Levine, B., 2007. Autophagy Genes Protect Against Disease Caused by Polyglutamine Expansion Proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* 3, 21–25. <https://doi.org/10.4161/auto.3528>
- Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M.S., Moxley, R.T., Thornton, C.A., 2004. Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Human Molecular Genetics* 13, 3079–3088. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh327>
- Kabeya, Y., 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *The EMBO Journal* 19, 5720–5728. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720>
- Kashihara, K., 2006. Weight loss in Parkinson's disease. *J Neurol* 253, vii38–vii41. <https://doi.org/10.1007/s00415-006-7009-0>
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., Kimura, J., Narumiya, S., Kakizuka, A., 1994. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8, 221–228. <https://doi.org/10.1038/ng1194-221>
- Kearse, M.G., Green, K.M., Krans, A., Rodriguez, C.M., Linsalata, A.E., Goldstrohm, A.C., Todd, P.K., 2016. CGG Repeat-Associated Non-AUG Translation Utilizes a Cap-Dependent Scanning Mechanism of Initiation to Produce Toxic Proteins. *Molecular Cell* 62, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.034>
- Kennedy, W.R., Alter, M., Sung, J.H., 1968. Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset: A sex-linked recessive trait. *Neurology* 18, 671–671. <https://doi.org/10.1212/WNL.18.7.671>
- Khristich, A.N., Mirkin, S.M., 2020. On the wrong DNA track: Molecular mechanisms of repeat-mediated genome instability. *J. Biol. Chem.* 295, 4134–4170. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.07678>
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., Guan, K.-L., 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13, 132–141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
- Kim, Joungmok, Yang, G., Kim, Y., Kim, Jin, Ha, J., 2016. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp Mol Med* 48, e224–e224. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.16>
- Kniazeva, M., Crawford, Q.T., Seiber, M., Wang, C.-Y., Han, M., 2004. Monomethyl Branched-Chain Fatty Acids Play an Essential Role in *Caenorhabditis elegans* Development. *PLoS Biol* 2, e257. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020257>
- Kopito, R.R., 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology* 10, 524–530. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01852-3](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01852-3)
- Kramer, N.J., Carlomagno, Y., Zhang, Y.-J., Almeida, S., Cook, C.N., Gendron, T.F., Prudencio, M., Van Blitterswijk, M., Belzil, V., Couthouis, J., Paul, J.W., Goodman, L.D., Daugherty, L., Chew, J., Garrett, A., Pregent, L., Jansen-West, K., Tabassian, L.J., Rademakers, R.,

- Boylan, K., Graff-Radford, N.R., Josephs, K.A., Parisi, J.E., Knopman, D.S., Petersen, R.C., Boeve, B.F., Deng, N., Feng, Y., Cheng, T.-H., Dickson, D.W., Cohen, S.N., Bonini, N.M., Link, C.D., Gao, F.-B., Petrucelli, L., Gitler, A.D., 2016. Spt4 selectively regulates the expression of C9orf72 sense and antisense mutant transcripts. *Science* 353, 708–712. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7791>
- Kratter, I.H., Finkbeiner, S., 2010. PolyQ Disease: Too Many Qs, Too Much Function? *Neuron* 67, 897–899. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.012>
- Krol, J., Fiszer, A., Mykowska, A., Sobczak, K., de Mezer, M., Krzyzosiak, W.J., 2007. Ribonuclease Dicer Cleaves Triplet Repeat Hairpins into Shorter Repeats that Silence Specific Targets. *Molecular Cell* 25, 575–586. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.031>
- Kuhla, A., Brichmann, E., Rühlmann, C., Thiele, R., Meuth, L., Vollmar, B., 2019. Metformin Therapy Aggravates Neurodegenerative Processes in ApoE^{-/-} Mice. *JAD* 68, 1415–1427. <https://doi.org/10.3233/JAD-181017>
- Labbadia, J., Morimoto, R.I., 2013. Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends in Biochemical Sciences* 38, 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.05.003>
- Ladd, P.D., Smith, L.E., Rabaia, N.A., Moore, J.M., Georges, S.A., Hansen, R.S., Hagerman, R.J., Tassone, F., Tapscott, S.J., Filippova, G.N., 2007. An antisense transcript spanning the CGG repeat region of FMR1 is upregulated in premutation carriers but silenced in full mutation individuals. *Human Molecular Genetics* 16, 3174–3187. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm293>
- Lapatsina, L., Brand, J., Poole, K., Daumke, O., Lewin, G.R., 2012. Stomatin-domain proteins. *European Journal of Cell Biology* 91, 240–245. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.01.018>
- Lee, A.L., Ung, H.M., Sands, L.P., Kikis, E.A., 2017. A new *Caenorhabditis elegans* model of human huntingtin 513 aggregation and toxicity in body wall muscles. *PLoS ONE* 12, e0173644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173644>
- Lee, D., An, S.W.A., Jung, Y., Yamaoka, Y., Ryu, Y., Goh, G.Y.S., Beigi, A., Yang, J.-S., Jung, G.Y., Ma, D.K., Ha, C.M., Taubert, S., Lee, Y., Lee, S.-J.V., 2019. MDT-15/MED15 permits longevity at low temperature via enhancing lipidostasis and proteostasis. *PLoS Biol* 17, e3000415. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000415>
- Lee, G.D., Wilson, M.A., Zhu, M., Wolkow, C.A., de Cabo, R., Ingram, D.K., Zou, S., 2006. Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5, 515–524. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00241.x>
- Lee, H., Noh, J.-Y., Oh, Y., Kim, Y., Chang, J.-W., Chung, C.-W., Lee, S.-T., Kim, M., Ryu, H., Jung, Y.-K., 2012. IRE1 plays an essential role in ER stress-mediated aggregation of mutant huntingtin via the inhibition of autophagy flux. *Human Molecular Genetics* 21, 101–114. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr445>
- Lee, J.-M., Correia, K., Loupe, J., Kim, K.-H., Barker, D., Hong, E.P., Chao, M.J., Long, J.D., Lucente, D., Vonsattel, J.P.G., Pinto, R.M., Abu Elneel, K., Ramos, E.M., Mysore, J.S., Gillis, T., Wheeler, V.C., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., McAllister, B., Massey, T., Medway, C., Stone, T.C., Hall, L., Jones, L., Holmans, P., Kwak, S., Ehrhardt, A.G., Sampaio, C., Ciosi,

- M., Maxwell, A., Chatzi, A., Monckton, D.G., Orth, M., Landwehrmeyer, G.B., Paulsen, J.S., Dorsey, E.R., Shoulson, I., Myers, R.H., 2019. CAG Repeat Not Polyglutamine Length Determines Timing of Huntington's Disease Onset. *Cell* 178, 887-900.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.036>
- Lehrbach, N.J., Ruvkun, G., 2019. Endoplasmic reticulum-associated SKN-1A/Nrf1 mediates a cytoplasmic unfolded protein response and promotes longevity. *eLife* 8, e44425. <https://doi.org/10.7554/eLife.44425>
- Lehrke, M., Lazar, M.A., 2005. The Many Faces of PPAR γ . *Cell* 123, 993-999. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.026>
- Lejeune, F.-X., Mesrob, L., Parmentier, F., Bicep, C., Vazquez-Manrique, R.P., Parker, J.A., Vert, J.-P., Tourette, C., Neri, C., 2012. Large-scale functional RNAi screen in *C. elegans* identifies genes that regulate the dysfunction of mutant polyglutamine neurons. *BMC Genomics* 13, 91. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-91>
- Lemieux, G.A., Ashrafi, K., 2016. Investigating Connections between Metabolism, Longevity, and Behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27, 586-596. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.05.004>
- Li, D., Song, J.-Z., Li, H., Shan, M.-H., Liang, Y., Zhu, J., Xie, Z., 2015. Storage lipid synthesis is necessary for autophagy induced by nitrogen starvation. *FEBS Letters* 589, 269-276. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.050>
- Li, H., 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. [arXiv:1303.3997 \[q-bio\]](https://arxiv.org/abs/1303.3997).
- Li, H., 2011. Improving SNP discovery by base alignment quality. *Bioinformatics* 27, 1157-1158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr076>
- Li, L.-B., Yu, Z., Teng, X., Bonini, N.M., 2008. RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*. *Nature* 453, 1107-1111. <https://doi.org/10.1038/nature06909>
- Li, P.P., Sun, X., Xia, G., Arbez, N., Paul, S., Zhu, S., Peng, H.B., Ross, C.A., Koeppen, A.H., Margolis, R.L., Pulst, S.M., Ashizawa, T., Rudnicki, D.D., 2016. *ATXN2-AS*, a gene antisense to *ATXN2*, is associated with spinocerebellar ataxia type 2 and amyotrophic lateral sclerosis: Neurotoxicity in SCA2 and ALS. *Ann Neurol* 80, 600-615. <https://doi.org/10.1002/ana.24761>
- Li, S., Dent, J.A., Roy, R., 2003. Regulation of Intermuscular Electrical Coupling by the *Caenorhabditis elegans* Innexin *inx-6*. *Mol. Biol. Cell* 14, 2630-2644. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-11-0716>
- Li, W., 2003. *daf-28* encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway. *Genes & Development* 17, 844-858. <https://doi.org/10.1101/gad.1066503>
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y.-J., Gao, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T.J., Shaw, R.J., Cohen, R.A., Zang, M., 2011. AMPK Phosphorylates and Inhibits SREBP Activity to Attenuate Hepatic Steatosis and Atherosclerosis in Diet-Induced Insulin-Resistant Mice. *Cell Metabolism* 13, 376-388. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.009>

- Liang, B., Ferguson, K., Kadyk, L., Watts, J.L., 2010. The Role of Nuclear Receptor NHR-64 in Fat Storage Regulation in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* 5, e9869. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.009869>
- Liang, H., Ward, W.F., 2006. PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Advances in Physiology Education* 30, 145–151. <https://doi.org/10.1152/advan.00052.2006>
- Lieberman, A.P., Shakkottai, V.G., Albin, R.L., 2019. Polyglutamine Repeats in Neurodegenerative Diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 14, 1–27. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012857>
- Lim, J.-H., Gerhart-Hines, Z., Dominy, J.E., Lee, Y., Kim, S., Tabata, M., Xiang, Y.K., Puigserver, P., 2013. Oleic Acid Stimulates Complete Oxidation of Fatty Acids through Protein Kinase A-dependent Activation of SIRT1-PGC1 α Complex. *J. Biol. Chem.* 288, 7117–7126. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.415729>
- Lin, X., Miller, J.W., Mankodi, A., Kanadia, R.N., Yuan, Y., Moxley, R.T., Swanson, M.S., Thornton, C.A., 2006. Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Human Molecular Genetics* 15, 2087–2097. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl132>
- Link, C.D., 1995. Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 9368–9372. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9368>
- Link, C.D., Johnson, C.J., Fonte, V., Paupard, M.-C., Hall, D.H., Styren, S., Mathis, C.A., Klunk, W.E., 2001. Visualization of fibrillar amyloid deposits in living, transgenic *Caenorhabditis elegans* animals using the sensitive amyloid dye, X-34. *Neurobiology of Aging* 22, 217–226. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(00\)00237-2](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00237-2)
- Liu, G., Leffak, M., 2012. Instability of (CTG) n •(CAG) n trinucleotide repeats and DNA synthesis. *Cell Biosci* 2, 7. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-7>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, M., Su, C., Qiao, C., Bian, Y., Ding, J., Hu, G., 2016. Metformin Prevents Dopaminergic Neuron Death in MPTP/P-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease via Autophagy and Mitochondrial ROS Clearance. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw047>
- Luciani, G.M., Magomedova, L., Puckrin, R., Urbanus, M.L., Wallace, I.M., Giaever, G., Nislow, C., Cummins, C.L., Roy, P.J., 2011. Dafadine inhibits DAF-9 to promote dauer formation and longevity of *Caenorhabditis elegans*. *Nat Chem Biol* 7, 891–893. <https://doi.org/10.1038/nchembio.698>
- Ludewig, A.H., 2004. A novel nuclear receptor/coregulator complex controls *C. elegans* lipid metabolism, larval development, and aging. *Genes & Development* 18, 2120–2133. <https://doi.org/10.1101/gad.312604>
- Ma, T.C., Buescher, J.L., Oatis, B., Funk, J.A., Nash, A.J., Carrier, R.L., Hoyt, K.R., 2007. Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience Letters* 411, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.10.039>

- Maciel, P., Gaspar, C., DeStefano, A.L., Silveira, I., Coutinho, P., Radvany, J., Dawson, D.M., Sudarsky, L., Guimarães, J., Loureiro, J.E., 1995. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 54–61.
- Maglich, J.M., Sluder, A., Guan, X., Shi, Y., McKee, D.D., Carrick, K., Kamdar, K., Willson, T.M., Moore, J.T., 2001. Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. *Genome Biol.* 2, RESEARCH0029. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-8-research0029>
- Magner, D.B., Wollam, J., Shen, Y., Hoppe, C., Li, D., Latza, C., Rottiers, V., Hutter, H., Antebi, A., 2013. The NHR-8 Nuclear Receptor Regulates Cholesterol and Bile Acid Homeostasis in *C. elegans*. *Cell Metabolism* 18, 212–224. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.07.007>
- Mak, H.Y., 2012. Lipid droplets as fat storage organelles in *Caenorhabditis elegans*: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *J. Lipid Res.* 53, 28–33. <https://doi.org/10.1194/jlr.R021006>
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R.M., 1995. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 83, 835–839. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90199-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90199-X)
- Mankodi, A., 2000. Myotonic Dystrophy in Transgenic Mice Expressing an Expanded CUG Repeat. *Science* 289, 1769–1772. <https://doi.org/10.1126/science.289.5485.1769>
- Mark, K.A., Dumas, K.J., Bhaumik, D., Schilling, B., Davis, S., Oron, T.R., Sorensen, D.J., Lucanic, M., Brem, R.B., Melov, S., Ramanathan, A., Gibson, B.W., Lithgow, G.J., 2016. Vitamin D Promotes Protein Homeostasis and Longevity via the Stress Response Pathway Genes *skn-1*, *ire-1*, and *xbp-1*. *Cell Reports* 17, 1227–1237. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.086>
- Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., de Vries, R., Arias, E., Harris, S., Sulzer, D., Cuervo, A.M., 2010. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci* 13, 567–576. <https://doi.org/10.1038/nn.2528>
- Massey, T.H., Jones, L., 2018. The central role of DNA damage and repair in CAG repeat diseases. *Dis. Model. Mech.* 11, dmm031930. <https://doi.org/10.1242/dmm.031930>
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K.-J., Coppes, R.P., Engedal, N., Mari, M., Reggiori, F., 2018. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 14, 1435–1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>
- Melendez, A., 2003. Autophagy Genes Are Essential for Dauer Development and Life-Span Extension in *C. elegans*. *Science* 301, 1387–1391. <https://doi.org/10.1126/science.1087782>
- Mello, C., Fire, A., 1995. DNA transformation. *Methods Cell Biol.* 48, 451–482.
- Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J.P., Chatterjee, V.K., Glass, C.K., Gonzalez, F.J., Grimaldi, P.A., Kadowaki, T., Lazar, M.A., O'Rahilly, S., Palmer, C.N.A., Plutzky, J., Reddy,

- J.K., Spiegelman, B.M., Staels, B., Wahli, W., 2006. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol Rev* 58, 726–741. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.5>
- Miller, D.M., Ortiz, I., Berliner, G.C., Epstein, H.F., 1983. Differential localization of two myosins within nematode thick filaments. *Cell* 34, 477–490. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90381-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90381-1)
- Miller, J.W., 2000. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *The EMBO Journal* 19, 4439–4448. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.17.4439>
- Miller, R.A., Chu, Q., Xie, J., Foretz, M., Viollet, B., Birnbaum, M.J., 2013. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* 494, 256–260. <https://doi.org/10.1038/nature11808>
- Miranda-Vizuete, A., Veal, E.A., 2017. *Caenorhabditis elegans* as a model for understanding ROS function in physiology and disease. *Redox Biology* 11, 708–714. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.020>
- Mirkin, S.M., 2007. Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* 447, 932–940. <https://doi.org/10.1038/nature05977>
- Moldavski, O., Amen, T., Levin-Zaidman, S., Eisenstein, M., Rogachev, I., Brandis, A., Kaganovich, D., Schuldiner, M., 2015. Lipid Droplets Are Essential for Efficient Clearance of Cytosolic Inclusion Bodies. *Developmental Cell* 33, 603–610. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.04.015>
- Moreno-Arriola, E., EL Hafidi, M., Ortega-Cuellar, D., Carvajal, K., 2016. AMP-Activated Protein Kinase Regulates Oxidative Metabolism in *Caenorhabditis elegans* through the NHR-49 and MDT-15 Transcriptional Regulators. *PLoS ONE* 11, e0148089. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148089>
- Mori, K., Weng, S.-M., Arzberger, T., May, S., Rentzsch, K., Kremmer, E., Schmid, B., Kretzschmar, H.A., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., Haass, C., Edbauer, D., 2013. The C9orf72 GGGGCC Repeat Is Translated into Aggregating Dipeptide-Repeat Proteins in FTL/ALS. *Science* 339, 1335–1338. <https://doi.org/10.1126/science.1232927>
- Morley, J.F., Brignull, H.R., Weyers, J.J., Morimoto, R.I., 2002. The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 10417–10422. <https://doi.org/10.1073/pnas.152161099>
- Moseley, M.L., Zu, T., Ikeda, Y., Gao, W., Mosemiller, A.K., Daughters, R.S., Chen, G., Weatherspoon, M.R., Clark, H.B., Ebner, T.J., Day, J.W., Ranum, L.P.W., 2006. Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8. *Nat Genet* 38, 758–769. <https://doi.org/10.1038/ng1827>
- Moshourab, R.A., Wetzel, C., Martinez-Salgado, C., Lewin, G.R., 2013. Stomatin-domain protein interactions with acid-sensing ion channels modulate nociceptor mechanosensitivity. *J. Physiol. (Lond.)* 591, 5555–5574. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.261180>
- Motola, D.L., Cummins, C.L., Rottiers, V., Sharma, K.K., Li, T., Li,

- Y., Suino-Powell, K., Xu, H.E., Auchus, R.J., Antebi, A., Mangelsdorf, D.J., 2006. Identification of Ligands for DAF-12 that Govern Dauer Formation and Reproduction in *C. elegans*. *Cell* 124, 1209–1223. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.037>
- Moutinho, M., Codocedo, J.F., Puntambekar, S.S., Landreth, G.E., 2019. Nuclear Receptors as Therapeutic Targets for Neurodegenerative Diseases: Lost in Translation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 59, 237–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021807>
- Mueller, J.W., Gilligan, L.C., Idkowiak, J., Arlt, W., Foster, P.A., 2015. The Regulation of Steroid Action by Sulfation and Desulfation. *Endocrine Reviews* 36, 526–563. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1036>
- Muñoz-Lobato, F., Rodríguez-Palero, M.J., Naranjo-Galindo, F.J., Shephard, F., Gaffney, C.J., Szewczyk, N.J., Hamamichi, S., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Link, C.D., Miranda-Vizuete, A., 2014. Protective Role of DNJ-27/ERdj5 in *Caenorhabditis elegans* Models of Human Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* 20, 217–235. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5051>
- Musi, N., Hirshman, M.F., Nygren, J., Svanfeldt, M., Bavenholm, P., Rooyackers, O., Zhou, G., Williamson, J.M., Ljunqvist, O., Efendic, S., Moller, D.E., Thorell, A., Goodyear, L.J., 2002. Metformin Increases AMP-Activated Protein Kinase Activity in Skeletal Muscle of Subjects With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 51, 2074–2081. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2074>
- Mykowska, A., Sobczak, K., Wojciechowska, M., Kozłowski, P., Krzyzosiak, W.J., 2011a. CAG repeats mimic CUG repeats in the misregulation of alternative splicing. *Nucleic Acids Research* 39, 8938–8951. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr608>
- N. Morozkina, S., G. Shavva, A., 2020. Estrone Sulfatase Inhibitors as New Anticancer Agents, in: António Ribeiro Salvador, J., Manuel Cruz Silva, M. (Eds.), *Chemistry and Biological Activity of Steroids*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85850>
- Nalavade, R., Griesche, N., Ryan, D.P., Hildebrand, S., Krauß, S., 2013. Mechanisms of RNA-induced toxicity in CAG repeat disorders. *Cell Death Dis* 4, e752–e752. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.276>
- Nguyen, L., Cleary, J.D., Ranum, L.P.W., 2019. Repeat-Associated Non-ATG Translation: Molecular Mechanisms and Contribution to Neurological Disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 42, 227–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050405>
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2015. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32, 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Nitschke, F., Ahonen, S.J., Nitschke, S., Mitra, S., Minassian, B.A., 2018. Lafora disease – from pathogenesis to treatment strategies. *Nat Rev Neurol* 14, 606–617. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0057-0>
- Nollen, E.A.A., Garcia, S.M., van Haaften, G., Kim, S., Chavez, A., Morimoto, R.I., Plasterk, R.H.A., 2004. From The Cover: Genome-wide RNA interference screen identifies previously undescribed regulators of polyglutamine aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 6403–6408.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0307697101>

O'Brien, A.J., Villani, L.A., Broadfield, L.A., Houde, V.P., Galic, S., Blandino, G., Kemp, B.E., Tsakiridis, T., Muti, P., Steinberg, G.R., 2015. Salicylate activates AMPK and synergizes with metformin to reduce the survival of prostate and lung cancer cells ex vivo through inhibition of de novo lipogenesis. *Biochemical Journal* 469, 177–187. <https://doi.org/10.1042/BJ20150122>

Ohsaki, Y., Cheng, J., Fujita, A., Tokumoto, T., Fujimoto, T., 2006. Cytoplasmic Lipid Droplets Are Sites of Convergence of Proteasomal and Autophagic Degradation of Apolipoprotein B. *MBoC* 17, 2674–2683. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-07-0659>

Onami, K., Kimura, Y., Ito, Y., Yamauchi, T., Yamasaki, K., Aiba, S., 2014. Nonmetal Haptens Induce ATP Release from Keratinocytes through Opening of Pannexin Hemichannels by Reactive Oxygen Species. *Journal of Investigative Dermatology* 134, 1951–1960. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.93>

Onken, B., Driscoll, M., 2010. Metformin Induces a Dietary Restriction–Like State and the Oxidative Stress Response to Extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS ONE* 5, e8758. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.008758>

O'Rourke, E.J., Kuballa, P., Xavier, R., Ruvkun, G., 2013. -6 Polyunsaturated fatty acids extend life span through the activation of autophagy. *Genes & Development* 27, 429–440. <https://doi.org/10.1101/gad.205294.112>

Orr, H.T., 2012. Polyglutamine neurodegeneration: expanded glutamines enhance native functions.

Current Opinion in Genetics & Development 22, 251–255. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.01.001>

Ouellet, J., Li, S., Roy, R., 2008. Notch signalling is required for both dauer maintenance and recovery in *C. elegans*. *Development* 135, 2583–2592. <https://doi.org/10.1242/dev.012435>

Owen, M.R., Doran, E., Halestrap, A.P., 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* 348 Pt 3, 607–614.

Palikaras, K., Mari, M., Petanidou, B., Pasparaki, A., Filippidis, G., Tavernarakis, N., 2017. Ectopic fat deposition contributes to age-associated pathology in *Caenorhabditis elegans*. *J. Lipid Res.* 58, 72–80. <https://doi.org/10.1194/jlr.M069385>

Park, E.C., Horvitz, H.R., 1986. Mutations with dominant effects on the behavior and morphology of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 113, 821–852.

Parker, J.A., Arango, M., Abderrahmane, S., Lambert, E., Tourette, C., Catoire, H., Néri, C., 2005. Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nat Genet* 37, 349–350. <https://doi.org/10.1038/ng1534>

Parker, J.A., Connolly, J.B., Wellington, C., Hayden, M., Dausset, J., Neri, C., 2001. Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 13318–13323. <https://doi.org/10.1073/pnas.231476398>

Pathare, P.P., Lin, A., Bornfeldt, K.E., Taubert, S., Van Gilst, M.R., 2012. Coordinate Regulation of Lipid

- Metabolism by Novel Nuclear Receptor Partnerships. *PLoS Genet* 8, e1002645.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002645>
- Paulson, H., 2018. Repeat expansion diseases, in: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, pp. 105–123. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63233-3.00009-9>
- Peng, Q., Wu, B., Jiang, M., Jin, J., Hou, Z., Zheng, J., Zhang, J., Duan, W., 2016. Characterization of Behavioral, Neuropathological, Brain Metabolic and Key Molecular Changes in zQ175 Knock-In Mouse Model of Huntington's Disease. *PLoS ONE* 11, e0148839.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148839>
- Penuela, S., Harland, L., Simek, J., Laird, D.W., 2014. Pannexin channels and their links to human disease. *Biochemical Journal* 461, 371–381.
<https://doi.org/10.1042/BJ20140447>
- Pérez-Jiménez, M.M., Sansigre, P., Valladares, A., Venegas-Calderón, M., Sánchez-García, A., Monje, J.M., Esteban-García, S., Suarez-Pereira, I., Vitorica, J., Ríos, J.J., Artal-Sanz, M., Carrión, Á.M., Muñoz, M.J., 2019. Steroid hormones sulfatase inactivation extends lifespan and ameliorates age-related diseases (preprint). *Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1101/541730>
- Picaud, S., Da Costa, D., Thanasopoulou, A., Filippakopoulos, P., Fish, P.V., Philpott, M., Fedorov, O., Brennan, P., Bunnage, M.E., Owen, D.R., Bradner, J.E., Taniere, P., O'Sullivan, B., Muller, S., Schwaller, J., Stankovic, T., Knapp, S., 2013. PFI-1, a Highly Selective Protein Interaction Inhibitor, Targeting BET Bromodomains. *Cancer Research* 73, 3336–3346.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3292>
- Pietrocola, F., Castoldi, F., Markaki, M., Lachkar, S., Chen, G., Enot, D.P., Durand, S., Bossut, N., Tong, M., Malik, S.A., Loos, F., Dupont, N., Mariño, G., Abdelkader, N., Madeo, F., Maiuri, M.C., Kroemer, R., Codogno, P., Sadoshima, J., Tavernarakis, N., Kroemer, G., 2018. Aspirin Recapitulates Features of Caloric Restriction. *Cell Reports* 22, 2395–2407.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.024>
- Ploumi, C., Daskalaki, I., Tavernarakis, N., 2017. Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. *FEBS J* 284, 183–195.
<https://doi.org/10.1111/febs.13820>
- Podshivalova, K., Kerr, R.A., Kenyon, C., 2017. How a Mutation that Slows Aging Can Also Disproportionately Extend End-of-Life Decrepitude. *Cell Reports* 19, 441–450.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.062>
- Prior, H., Jawad, A.K., MacConnachie, L., Beg, A.A., 2017. Highly Efficient, Rapid and Co-CRISPR-Independent Genome Editing in *Caenorhabditis elegans*. *G3* 7, 3693–3698.
<https://doi.org/10.1534/g3.117.300216>
- Qi, Y., Andolfi, L., Frattini, F., Mayer, F., Lazzarino, M., Hu, J., 2015. Membrane stiffening by STOML3 facilitates mechanosensation in sensory neurons. *Nat Commun* 6, 8512.
<https://doi.org/10.1038/ncomms9512>
- Rajaram, S., Sedensky, M.M., Morgan, P.G., 1998. unc-1: A stomatin homologue controls sensitivity to volatile anesthetics in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 8761–8766.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8761>
- Ramachandran, P.V., Savini, M., Follick, A.K., Hu, K., Masand, R.,

- Graham, B.H., Wang, M.C., 2019. Lysosomal Signaling Promotes Longevity by Adjusting Mitochondrial Activity. *Developmental Cell* 48, 685-696.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.12.022>
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O’Kane, C.J., Rubinsztein, D.C., 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36, 585-595. <https://doi.org/10.1038/ng1362>
- Rena, G., Hardie, D.G., Pearson, E.R., 2017. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 60, 1577-1585. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>
- Rižner, T.L., 2016. The Important Roles of Steroid Sulfatase and Sulfotransferases in Gynecological Diseases. *Front. Pharmacol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00030>
- Robert, V., Bessereau, J.-L., 2007. Targeted engineering of the *Caenorhabditis elegans* genome following Mos1-triggered chromosomal breaks. *EMBO J* 26, 170-183. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601463>
- Robinson-Rechavi, M., Maina, C.V., Gissendanner, C.R., Laudet, V., Sluder, A., 2005. Explosive Lineage-Specific Expansion of the Orphan Nuclear Receptor HNF4 in Nematodes. *J Mol Evol* 60, 577-586. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0175-8>
- Rojas, L.B.A., Gomes, M.B., 2013. Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr* 5, 6. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-5-6>
- Ross, C.A., Poirier, M.A., 2004. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10, S10-S17. <https://doi.org/10.1038/nm1066>
- Rottiers, V., Motola, D.L., Gerisch, B., Cummins, C.L., Nishiwaki, K., Mangelsdorf, D.J., Antebi, A., 2006. Hormonal Control of *C. elegans* Dauer Formation and Life Span by a Rieske-like Oxygenase. *Dev. Cell* 10, 473-482. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.02.008>
- Rudich, P., Lamitina, T., 2018. Models and mechanisms of repeat expansion disorders: a worm’s eye view. *J Genet* 97, 665-677. <https://doi.org/10.1007/s12041-018-0950-8>
- Rudich, P., Snoznik, C., Watkins, S.C., Monaghan, J., Pandey, U.B., Lamitina, S.T., 2017. Nuclear localized C9orf72-associated arginine-containing dipeptides exhibit age-dependent toxicity in *C. elegans*. *Human Molecular Genetics* 26, 4916-4928. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx372>
- Rudich, P., Watkins, S., Lamitina, T., 2020. PolyQ-independent toxicity associated with novel translational products from CAG repeat expansions. *PLoS ONE* 15, e0227464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227464>
- Rui, Y.-N., Xu, Z., Patel, B., Chen, Z., Chen, D., Tito, A., David, G., Sun, Y., Stimming, E.F., Bellen, H.J., Cuervo, A.M., Zhang, S., 2015. Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. *Nat Cell Biol* 17, 262-275. <https://doi.org/10.1038/ncb3101>
- Rungaldier, S., Umlauf, E., Mairhofer, M., Salzer, U., Thiele, C., Prohaska, R., 2017. Structure-function analysis of human stomatin: A mutation study. *PLoS ONE* 12, e0178646.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178646>
- Russell, D.W., 2003. The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 137–174.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712>
- Sanchis, A., García-Gimeno, M.A., Cañada-Martínez, A.J., Sequedo, M.D., Millán, J.M., Sanz, P., Vázquez-Manrique, R.P., 2019. Metformin treatment reduces motor and neuropsychiatric phenotypes in the zQ175 mouse model of Huntington disease. *Exp Mol Med* 51, 1–16.
<https://doi.org/10.1038/s12276-019-0264-9>
- Santos, J., Leitão-Correia, F., Sousa, M.J., Leão, C., 2016. Dietary Restriction and Nutrient Balance in Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016, 1–10.
<https://doi.org/10.1155/2016/4010357>
- Sanz, P., Rubio, T., Garcia-Gimeno, M.A., 2013. AMPKbeta subunits: more than just a scaffold in the formation of AMPK complex. *FEBS J* 280, 3723–3733.
<https://doi.org/10.1111/febs.12364>
- Sardiello, M., Annunziata, I., Roma, G., Ballabio, A., 2005. Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Human Molecular Genetics* 14, 3203–3217.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi351>
- Schackwitz, W.S., Inoue, T., Thomas, J.H., 1996. Chemosensory Neurons Function in Parallel to Mediate a Pheromone Response in *C. elegans*. *Neuron* 17, 719–728.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80203-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80203-2)
- Schmahl, J., Rizzolo, K., Soriano, P., 2008. The PDGF signaling pathway controls multiple steroid-producing lineages. *Genes & Development* 22, 3255–3267.
<https://doi.org/10.1101/gad.1723908>
- Schmeisser, S., Li, S., Bouchard, B., Ruiz, M., Des Rosiers, C., Roy, R., 2019. Muscle-Specific Lipid Hydrolysis Prolongs Lifespan through Global Lipidomic Remodeling. *Cell Reports* 29, 4540–4552.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.1.090>
- Schulten, H.-J., 2018. Pleiotropic Effects of Metformin on Cancer. *IJMS* 19, 2850.
<https://doi.org/10.3390/ijms19102850>
- Schuske, K., Beg, A.A., Jorgensen, E.M., 2004. The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends in Neurosciences* 27, 407–414.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.005>
- Sedensky, M., Meneely, P., 1987. Genetic analysis of halothane sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 236, 952–954.
<https://doi.org/10.1126/science.3576211>
- Sedensky, M.M., Siefker, J.M., Morgan, P.G., 2001. *Model Organisms: New Insights Into Ion Channel and Transporter Function*. Stomatin homologues interact in *Caenorhabditis elegans*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 280, C1340–C1348.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.5.C1340>
- Sellier, C., Buijsen, R.A.M., He, F., Natla, S., Jung, L., Tropel, P., Gaucherot, A., Jacobs, H., Meziane, H., Vincent, A., Champy, M.-F., Sorg, T., Pavlovic, G., Wattenhofer-Donze, M., Birling, M.-C., Oulad-Abdelghani, M., Eberling, P., Ruffenach, F., Joint, M., Anheim, M., Martinez-Cerdeno, V., Tassone, F., Willemsen, R., Hukema, R.K., Viville, S., Martinat, C., Todd, P.K., Charlet-Berguerand, N., 2017. Translation of Expanded CGG Repeats into FMRpolyG Is

- Pathogenic and May Contribute to Fragile X Tremor Ataxia Syndrome. *Neuron* 93, 331–347. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.016>
- Shamalnasab, M., Gravel, S.-P., St-Pierre, J., Breton, L., Jäger, S., Aguilaniu, H., 2018. A salicylic acid derivative extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* by activating autophagy and the mitochondrial unfolded protein response. *Aging Cell* 17, e12830. <https://doi.org/10.1111/ace1.12830>
- Shamim, A., Mahmood, T., Ahsan, F., Kumar, A., Bagga, P., 2018. Lipids: An insight into the neurodegenerative disorders. *Clinical Nutrition Experimental* 20, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2018.05.001>
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., Tsien, R.Y., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22, 1567–1572. <https://doi.org/10.1038/nbt103>
- Shao, Q., Lindstrom, K., Shi, R., Kelly, J., Schroeder, A., Juusola, J., Levine, K.L., Esseltine, J.L., Penuela, S., Jackson, M.F., Laird, D.W., 2016. A Germline Variant in the PANX1 Gene Has Reduced Channel Function and Is Associated with Multisystem Dysfunction. *J. Biol. Chem.* 291, 12432–12443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.717934>
- Shi, X., Li, J., Zou, X., Greggain, J., Rødkær, S.V., Færgeman, N.J., Liang, B., Watts, J.L., 2013. Regulation of lipid droplet size and phospholipid composition by stearoyl-CoA desaturase. *J. Lipid Res.* 54, 2504–2514. <https://doi.org/10.1194/jlr.M039669>
- Shpilka, T., Welter, E., Borovsky, N., Amar, N., Mari, M., Reggiori, F., Elazar, Z., 2015. Lipid droplets and their component triglycerides and steryl esters regulate autophagosome biogenesis. *EMBO J* 34, 2117–2131. <https://doi.org/10.15252/embj.201490315>
- Sidharthan, N.P., Minchin, R.F., Butcher, N.J., 2013. Cytosolic Sulfotransferase 1A3 Is Induced by Dopamine and Protects Neuronal Cells from Dopamine Toxicity: ROLE OF D1 RECEPTOR-N-METHYL-d-ASPARTATE RECEPTOR COUPLING. *J. Biol. Chem.* 288, 34364–34374. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.493239>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7, 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Silva, M.C., Amaral, M.D., Morimoto, R.I., 2013. Neuronal Reprograming of Protein Homeostasis by Calcium-Dependent Regulation of the Heat Shock Response. *PLoS Genet* 9, e1003711. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003711>
- Song, J., Kim, Y.-S., Lee, D.H., Lee, S.H., Park, H.J., Lee, D., Kim, H., 2019. Neuroprotective effects of oleic acid in rodent models of cerebral ischaemia. *Sci Rep* 9, 10732. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47057-z>
- Sonobe, Y., Aburas, J., Islam, P., Gendron, T.F., Brown, A.E.X., Roos, R.P., Kratsios, P., 2020. A *C. elegans* model of *C9orf72*-associated ALS/FTD uncovers a conserved role for eIF2D in RAN translation (preprint). *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1101/2020.06.13.150029>

- Sopher, B.L., Ladd, P.D., Pineda, V.V., Libby, R.T., Sunkin, S.M., Hurley, J.B., Thienes, C.P., Gaasterland, T., Filippova, G.N., La Spada, A.R., 2011. CTCF Regulates Ataxin-7 Expression through Promotion of a Convergent Transcribed, Antisense Noncoding RNA. *Neuron* 70, 1071–1084. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.027>
- Soragni, E., Petrosyan, L., Rinkoski, T.A., Wieben, E.D., Baratz, K.H., Fautsch, M.P., Gottesfeld, J.M., 2018. Repeat-Associated Non-ATG (RAN) Translation in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 59, 1888. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-23265>
- Steinbaugh, M.J., Narasimhan, S.D., Robida-Stubbs, S., Moronetti Mazzeo, L.E., Dreyfuss, J.M., Hourihan, J.M., Raghavan, P., Operaña, T.N., Esmailie, R., Blackwell, T.K., 2015. Lipid-mediated regulation of SKN-1/Nrf in response to germ cell absence. *eLife* 4, e07836. <https://doi.org/10.7554/eLife.07836>
- Stoffel, M., Duncan, S.A., 1997. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4 regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 13209–13214. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13209>
- Stopford, M.J., Higginbottom, A., Hautbergue, G.M., Cooper-Knock, J., Mulcahy, P.J., De Vos, K.J., Renton, A.E., Pliner, H., Calvo, A., Chio, A., Traynor, B.J., Azzouz, M., Heath, P.R., ITALSGEN Consortium, NeuroX Consortium, Kirby, J., Shaw, P.J., 2017. C9ORF72 hexanucleotide repeat exerts toxicity in a stable, inducible motor neuronal cell model, which is rescued by partial depletion of Pten. *Human Molecular Genetics* 26, 1133–1145. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx022>
- Stoyas, C.A., La Spada, A.R., 2018. The CAG–polyglutamine repeat diseases: a clinical, molecular, genetic, and pathophysiologic nosology, in: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, pp. 143–170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63233-3.00011-7>
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D.K., Bachoo, R., Spiegelman, B.M., 2006. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell* 127, 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.024>
- Taha, A.Y., 2020. Linoleic acid—good or bad for the brain? *npj Sci Food* 4, 1. <https://doi.org/10.1038/s41538-019-0061-9>
- Takahashi, T., Katada, S., Onodera, O., 2010. Polyglutamine Diseases: Where does Toxicity Come from? What is Toxicity? Where are We Going? *Journal of Molecular Cell Biology* 2, 180–191. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq005>
- Talarico, G., Orecchioni, S., Dallaglio, K., Reggiani, F., Mancuso, P., Calleri, A., Gregato, G., Labanca, V., Rossi, T., Noonan, D.M., Albin, A., Bertolini, F., 2016. Aspirin and atenolol enhance metformin activity against breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells. *Sci Rep* 6, 18673. <https://doi.org/10.1038/srep18673>
- Taneja, K.L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., Singer, R.H., 1995. Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *The Journal of Cell Biology* 128, 995–1002. <https://doi.org/10.1083/jcb.128.6.995>

- Tao, Z., Wang, H., Xia, Q., Li, K., Li, K., Jiang, X., Xu, G., Wang, G., Ying, Z., 2015. Nucleolar stress and impaired stress granule formation contribute to C9orf72 RAN translation-induced cytotoxicity. *Human Molecular Genetics* 24, 2426–2441. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv005>
- Tarsitano, M., De Falco, S., Colonna, V., McGhee, J.D., Persico, M.G., 2006. The *C. elegans pvf-1* gene encodes a PDGF/VEGF-like factor able to bind mammalian VEGF receptors and to induce angiogenesis. *FASEB j.* 20, 227–233. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4147com>
- Taubert, S., 2006. A Mediator subunit, MDT-15, integrates regulation of fatty acid metabolism by NHR-49-dependent and -independent pathways in *C. elegans*. *Genes & Development* 20, 1137–1149. <https://doi.org/10.1101/gad.1395406>
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17, 6463–6471. <https://doi.org/10.1093/nar/17.16.6463>
- Taylor, R.C., Dillin, A., 2013. XBP-1 Is a Cell-Nonautonomous Regulator of Stress Resistance and Longevity. *Cell* 153, 1435–1447. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.042>
- The *C. elegans* Deletion Mutant Consortium, 2012. Large-Scale Screening for Targeted Knockouts in the *Caenorhabditis elegans* Genome. G3amp58 *GenesGenomesGenetics* 2, 1415–1425. <https://doi.org/10.1534/g3.112.003830>
- The Diabetes Prevention Program Research Group, 2012. Long-Term Safety, Tolerability, and Weight Loss Associated With Metformin in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Diabetes Care* 35, 731–737. <https://doi.org/10.2337/dc11-1299>
- Timmons, L., Court, D.L., Fire, A., 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263, 103–112. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00579-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00579-5)
- Todd, P.K., Oh, S.Y., Krans, A., He, F., Sellier, C., Frazer, M., Renoux, A.J., Chen, K., Scaglione, K.M., Basrur, V., Elenitoba-Johnson, K., Vonsattel, J.P., Louis, E.D., Sutton, M.A., Taylor, J.P., Mills, R.E., Charlet-Berguerand, N., Paulson, H.L., 2013. CGG Repeat-Associated Translation Mediates Neurodegeneration in Fragile X Tremor Ataxia Syndrome. *Neuron* 78, 440–455. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.026>
- Toulouse, A., Au-Yeung, F., Gaspar, C., Roussel, J., Dion, P., Rouleau, G.A., 2005. Ribosomal frameshifting on MJD-1 transcripts with long CAG tracts. *Human Molecular Genetics* 14, 2649–2660. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi299>
- Trinklein, N.D., 2003. An Abundance of Bidirectional Promoters in the Human Genome. *Genome Research* 14, 62–66. <https://doi.org/10.1101/gr.1982804>
- Trottier, Y., Biancalana, V., Mandel, J.L., 1994. Instability of CAG repeats in Huntington’s disease: relation to parental transmission and age of onset. *Journal of Medical Genetics* 31, 377–382. <https://doi.org/10.1136/jmg.31.5.377>
- Tsoi, H., Chan, H.Y.E., 2013. Expression of Expanded CAG Transcripts Triggers Nucleolar Stress in Huntington’s Disease. *Cerebellum* 12, 310–312. <https://doi.org/10.1007/s12311-012-0447-6>

- Tsoi, H., Lau, T.C.-K., Tsang, S.-Y., Lau, K.-F., Chan, H.Y.E., 2012. CAG expansion induces nucleolar stress in polyglutamine diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 13428–13433. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204089109>
- Van Gilst, M.R., Hadjivassiliou, H., Yamamoto, K.R., 2005. From The Cover: A *Caenorhabditis elegans* nutrient response system partially dependent on nuclear receptor NHR-49. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 13496–13501. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506234102>
- van Ham, T.J., Holmberg, M.A., van der Goot, A.T., Teuling, E., Garcia-Arencibia, M., Kim, H., Du, D., Thijssen, K.L., Wiersma, M., Burggraaff, R., van Bergeijk, P., van Rheenen, J., Jerre van Veluw, G., Hofstra, R.M.W., Rubinsztein, D.C., Nollen, E.A.A., 2010. Identification of MOAG-4/SERF as a Regulator of Age-Related Proteotoxicity. *Cell* 142, 601–612. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.020>
- van Ham, T.J., Thijssen, K.L., Breitling, R., Hofstra, R.M.W., Plasterk, R.H.A., Nollen, E.A.A., 2008a. *C. elegans* Model Identifies Genetic Modifiers of α -Synuclein Inclusion Formation During Aging. *PLoS Genet* 4, e1000027. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000027>
- Vázquez-Manrique, R.P., Farina, F., Cambon, K., Dolores Sequedo, M., Parker, A.J., Millán, J.M., Weiss, A., Déglon, N., Neri, C., 2016. AMPK activation protects from neuronal dysfunction and vulnerability across nematode, cellular and mouse models of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 25, 1043–1058. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv513>
- Velázquez, A.P., Tatsuta, T., Gillebert, R., Drescher, I., Graef, M., 2016. Lipid droplet-mediated ER homeostasis regulates autophagy and cell survival during starvation. *Journal of Cell Biology* 212, 621–631. <https://doi.org/10.1083/jcb.201508102>
- Vicencio, J., Martínez-Fernández, C., Serrat, X., Cerón, J., 2019. Efficient Generation of Endogenous Fluorescent Reporters by Nested CRISPR in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 211, 1143–1154. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.301965>
- Vohl, M.C., Lepage, P., Gaudet, D., Brewer, C.G., Bétard, C., Perron, P., Houde, G., Cellier, C., Faith, J.M., Després, J.P., Morgan, K., Hudson, T.J., 2000. Molecular scanning of the human PPAR α gene: association of the L162v mutation with hyperapobetalipoproteinemia. *J. Lipid Res.* 41, 945–952.
- Wahli, W., Michalik, L., 2012. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 23, 351–363. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.001>
- Walker, D.S., Schafer, W.R., 2020. Distinct roles for innexin gap junctions and hemichannels in mechanosensation. *eLife* 9, e50597. <https://doi.org/10.7554/eLife.50597>
- Walker, D.S., Vázquez-Manrique, R.P., Gower, N.J.D., Gregory, E., Schafer, W.R., Baylis, H.A., 2009. Inositol 1,4,5-Trisphosphate Signalling Regulates the Avoidance Response to Nose Touch in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 5, e1000636. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000636>
- Wang, L.-C., Chen, K.-Y., Pan, H., Wu, C.-C., Chen, P.-H., Liao, Y.-T., Li, C., Huang, M.-L., Hsiao, K.-M., 2011. Muscleblind participates in RNA

- toxicity of expanded CAG and CUG repeats in *Caenorhabditis elegans*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, 1255–1267. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0522-4>
- Wang, X., Zimmermann, H.R., Ma, T., 2019. Therapeutic Potential of AMP-Activated Protein Kinase in Alzheimer's Disease. *JAD* 68, 33–38. <https://doi.org/10.3233/JAD-181043>
- Wang, Z., Stoltzfus, J., You, Y., Ranjit, N., Tang, H., Xie, Y., Lok, J.B., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., 2015. The Nuclear Receptor DAF-12 Regulates Nutrient Metabolism and Reproductive Growth in Nematodes. *PLoS Genet* 11, e1005027. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005027>
- Watts, J.L., 2009. Fat synthesis and adiposity regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 20, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.11.002>
- Watts, J.L., Browse, J., 2002. Genetic dissection of polyunsaturated fatty acid synthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 5854–5859. <https://doi.org/10.1073/pnas.092064799>
- Watts, J.L., Ristow, M., 2017. Lipid and Carbohydrate Metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 207, 413–446. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300106>
- Wheeler, T.M., Thornton, C.A., 2007. Myotonic dystrophy: RNA-mediated muscle disease: Current Opinion in Neurology 20, 572–576. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3282ef6064>
- Wilburn, B., Rudnicki, D.D., Zhao, J., Weitz, T.M., Cheng, Y., Gu, X., Greiner, E., Park, C.S., Wang, N., Sopher, B.L., La Spada, A.R., Osmand, A., Margolis, R.L., Sun, Y.E., Yang, X.W., 2011. An Antisense CAG Repeat Transcript at JPH3 Locus Mediates Expanded Polyglutamine Protein Toxicity in Huntington's Disease-like 2 Mice. *Neuron* 70, 427–440. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.021>
- Wollam, J., Magomedova, L., Magner, D.B., Shen, Y., Rottiers, V., Motola, D.L., Mangelsdorf, D.J., Cummins, C.L., Antebi, A., 2011. The Rieske oxygenase DAF-36 functions as a cholesterol 7-desaturase in steroidogenic pathways governing longevity: DAF-36/Rieske oxygenase is a cholesterol 7-desaturase. *Aging Cell* 10, 879–884. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00733.x>
- Wong, E., Cuervo, A.M., 2010. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 13, 805–811. <https://doi.org/10.1038/nn.2575>
- Xi, Y., Chen, M., Liu, X., Lu, Z., Ding, Y., Li, D., 2014. CP-673451, a platelet-derived growth-factor receptor inhibitor, suppresses lung cancer cell proliferation and migration. *OTT* 1215. <https://doi.org/10.2147/OTT.S62946>
- Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P.J., Menzel, S., Cox, N.J., Fajans, S.S., Signorini, S., Stoffel, M., Bell, G.I., 1996. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384, 458–460. <https://doi.org/10.1038/384458a0>
- Ye, W., Ramos, E.H., Wong, B.C., Belsham, D.D., 2016. Beneficial Effects of Metformin and/or Salicylate on Palmitate- or TNF α -Induced Neuroinflammatory Marker and Neuropeptide Gene Regulation in Immortalized NPY/AgRP Neurons. *PLoS ONE* 11, e0166973.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166973>
- Yi, Y.-H., Chien, C.-H., Chen, W.-W., Ma, T.-H., Liu, K.-Y., Chang, Y.-S., Chang, T.-C., Lo, S.J., 2013. Lipid droplet pattern and nondroplet-like structure in two *fat* mutants of *Caenorhabditis elegans* revealed by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *J. Biomed. Opt* 19, 011011. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.1.011011>
- Yoshiyama-Yanagawa, T., Enya, S., Shimada-Niwa, Y., Yaguchi, S., Haramoto, Y., Matsuya, T., Shiomi, K., Sasakura, Y., Takahashi, S., Asashima, M., Kataoka, H., Niwa, R., 2011. The Conserved Rieske Oxygenase DAF-36/Neverland Is a Novel Cholesterol-metabolizing Enzyme. *J. Biol. Chem.* 286, 25756–25762. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.244384>
- Yue, X.-H., Tong, J.-Q., Wang, Z.-J., Zhang, J., Liu, X., Liu, X.-J., Cai, H.-Y., Qi, J.-S., 2016. Steroid sulfatase inhibitor DU-14 protects spatial memory and synaptic plasticity from disruption by amyloid β protein in male rats. *Hormones and Behavior* 83, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.05.019>
- Zanon, A., Hicks, A., Pramstaller, P., Pichler, I., 2017. SLP-2: a potential new target for improving mitochondrial function in Parkinson's disease. *Neural Regen Res* 12, 1435. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.215251>
- Zeiser, E., Frøkjær-Jensen, C., Jorgensen, E., Ahringer, J., 2011. MosSCI and Gateway Compatible Plasmid Toolkit for Constitutive and Inducible Expression of Transgenes in the *C. elegans* Germline. *PLoS ONE* 6, e20082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.020082>
- Zhou, X., Chen, J., Yi, G., Deng, M., Liu, H., Liang, M., Shi, B., Fu, X., Chen, Y., Chen, L., He, Z., Wang, J., Liu, J., 2016. Metformin suppresses hypoxia-induced stabilization of HIF-1 α through reprogramming of oxygen metabolism in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 7, 873–884. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6418>
- Zoghbi, H.Y., Orr, H.T., 2000. Glutamine Repeats and Neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 217–247. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.217>
- Zu, T., Cleary, J.D., Liu, Y., Bañez-Coronel, M., Bubenik, J.L., Ayhan, F., Ashizawa, T., Xia, G., Clark, H.B., Yachnis, A.T., Swanson, M.S., Ranum, L.P.W., 2017. RAN Translation Regulated by Muscleblind Proteins in Myotonic Dystrophy Type 2. *Neuron* 95, 1292–1305.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.039>
- Zu, T., Gibbens, B., Doty, N.S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M.D., Margolis, J., Peterson, M., Markowski, T.W., Ingram, M.A.C., Nan, Z., Forster, C., Low, W.C., Schoser, B., Somia, N.V., Clark, H.B., Schmechel, S., Bitterman, P.B., Gourdon, G., Swanson, M.S., Moseley, M., Ranum, L.P.W., 2011. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 260–265. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013343108>
- Zu, T., Guo, S., Bardhi, O., Ryskamp, D.A., Li, J., Khoramian Tusi, S., Engelbrecht, A., Klippel, K., Chakrabarty, P., Nguyen, L., Golde, T.E., Sonenberg, N., Ranum, L.P.W., 2020. Metformin inhibits RAN translation through PKR pathway and mitigates disease in *C9orf72* ALS/FTD mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 202005748. <https://doi.org/10.1073/pnas.200574817>

Zu, T., Liu, Y., Banez-Coronel, M., Reid, T., Pletnikova, O., Lewis, J., Miller, T.M., Harms, M.B., Falchook, A.E., Subramony, S.H., Ostrow, L.W., Rothstein, J.D., Troncoso, J.C., Ranum, L.P.W., 2013. RAN proteins and RNA foci from antisense

transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, E4968–E4977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315438110>

