

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.....xlv

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 *C. elegans* 21

5. Moduladores de la agregación de poliQs en *C. elegans* 24

 5.1. AMPK como diana terapéutica contra la EH 25

 5.2. Receptores nucleares..... 28

 5.2.1 Señalización endocrina en *C. elegans* 29

 5.2.2 Metabolismo lipídico en *C. elegans* 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 *C. elegans* 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
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>.		86
1.1	Generación de modelos de toxicidad por ARN en <i>C. elegans</i>	87
1.2	La expresión de múltiples copias del transgén con tripletes CAG en neuronas GABAérgicas altera la capacidad motora de forma sustancial	92
1.3	Detección de moléculas potenciales frente a la toxicidad asociada a transcritos CAG en neuronas GABAérgicas	94
1.4	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