

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 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 poliglutaminas (poliQs), que hacen que estos péptidos sean propensos a la agregación, y causan los problemas que describimos arriba. Además de la EH, se incluyen 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 dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA; del inglés *dentatorubral – pallidoluysian atrophy*). Estas nueve patologías son promovidas por largas expansiones CAG en regiones codificantes de cada gen causal 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 poliglutaminas. Por tanto, la identificación de estos genes permitirá profundizar en los mecanismos moduladores de la dinámica de agregación de poliglutaminas. 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. Por tanto, en este trabajo hemos desarrollado modelos, empleando *Caenorhabditis elegans*, en los que se produce estrés 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 de estos modelos, que perturba la función de las neuronas GABAérgicas del gusano, ha sido empleado 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 de CAG, está reconocido que este tipo de patologías 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 ya generados 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 pleiotrópicas, pudiendo activar dianas no deseadas. Por tanto, en el primer 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 quizás evitamos que posibles dianas no deseadas resulten activadas. También diseccionamos las subunidades de AMPK que resultan esenciales en esta activación. Y por último, hemos demostrado que este tratamiento sinérgico podría ser empleado para reducir otras fuentes de toxicidad inducida por otras proteínas tóxicas, como la  $\alpha$ -sinucleína, causante de la enfermedad de Parkinson.

Por otro lado, hemos caracterizado 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 qué genes regula este gen. Para ello hemos analizado el transcriptoma de mutantes que portan mutaciones en *unc-1* y *nhr-1*. La supresión de *nhr-1* sobre un fondo 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 lipídicas, 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 agregados. 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.

