



TESIS DOCTORAL

“Estudio del papel protector de DNJ-27/ERdj5 en modelos de enfermedades neurodegenerativas en *Caenorhabditis elegans*”

Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular
Universidad Pablo de Olavide
Sevilla

Fernando Muñoz Lobato

Dirigida por
Dr. Antonio Miranda Vizuete
Sevilla, 2012



El **Dr. Antonio Miranda Vizuete**, científico titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICA:

Que el licenciado Fernando Muñoz Lobato ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Estudio del papel protector de DNJ-27/ERdj5 en modelos de enfermedades neurodegenerativas en *Caenorhabditis elegans*”, el cual reúne las condiciones de originalidad y calidad científica necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Sevilla, a 10 de octubre de 2012.

Fdo.: Dr. Antonio Miranda Vizuete

Índice General

Índice de Figuras	5
Índice de Tablas.....	9
Resumen.....	11
Abreviaturas	13
Capítulo I. Introducción.....	15
1.1 Contexto socio-económico del estudio	17
1.2 Enfermedades neurodegenerativas.....	18
1.2.1 Enfermedad de Alzheimer	18
1.2.2 Enfermedad de Parkinson	20
1.2.3 Enfermedades de poliglutamina	21
1.2.3.1 Enfermedad de Huntington.....	21
1.2.3.2 Ataxias espinocerebelosas	22
1.3 Mecanismos moleculares y celulares de las enfermedades neurodegenerativas	22
1.3.1 Agregación de proteínas y formación de cuerpos de inclusión.....	23
1.3.2 Disfunción mitocondrial.....	24
1.3.3 Daño oxidativo.....	25
1.4 Sistemas antioxidantes	26
1.4.1 Antioxidantes no enzimáticos.....	27
1.4.2 Antioxidantes enzimáticos	27
1.4.2.1 Tiorredoxinas.....	28
1.4.2.2 Glutarredoxinas.....	31
1.4.2.3 Peroxirredoxinas	32
1.5 Plegamiento de proteínas.....	33
1.5.1 El retículo endoplasmático.....	34
1.5.1.1 Estrés del retículo endoplasmático y la respuesta a proteínas mal plegadas	36
1.5.1.2 Plegamiento oxidativo	41
1.5.1.3 Degradación asociada al retículo endoplasmático (ERAD).....	42
1.5.1.3.1 ERdj5, una chaperona de la familia de las tiorredoxinas involucrada en ERAD	45
1.6 <i>C. elegans</i> como organismo modelo	47
1.6.1 <i>C. elegans</i> como modelo de enfermedades neurodegenerativas	51

1.6.1.1 Modelos de Alzheimer.....	52
1.6.1.2 Modelos de Parkinson	53
1.6.1.3 Modelos de enfermedades de poliglutamina.....	54
Capítulo II. Objetivos.....	55
Capítulo III. Resultados.....	59
3.1 Evaluación de fenotipos en estirpes transgénicas de modelos de Alzheimer y Parkinson sometidas a ARNi de genes de la familia de las tiorredoxinas, las glutarredoxinas y las peroxirredoxinas en <i>C. elegans</i>	61
3.2 <i>dnj-27</i> es el ortólogo en <i>C. elegans</i> del gen <i>ERdj5</i> de mamífero.....	64
3.3 Aislamiento, caracterización y evaluación de los fenotipos de estirpes de <i>C. elegans</i> que combinen mutaciones en el gen <i>dnj-27</i> en los fondos genéticos que recapitulan Alzheimer y Parkinson	69
3.4 Estudio del papel protector de <i>dnj-27</i> en estirpes transgénicas de <i>C. elegans</i> modelo de la enfermedad de Alzheimer.....	73
3.5 Estudio del papel protector de <i>dnj-27</i> en estirpes transgénicas de <i>C. elegans</i> modelo de la enfermedad de Parkinson.....	77
3.6 Estudio del papel protector de <i>dnj-27</i> en estirpes transgénicas de <i>C. elegans</i> modelo de enfermedades de poliglutamina.....	81
3.7 Estudio de la expresión de <i>ERdj5</i> humano en estirpes transgénicas de <i>C. elegans</i> modelo de enfermedades neurodegenerativas	85
3.8 Estudio del papel protector de otros genes implicados en ERAD en estirpes transgénicas de <i>C. elegans</i> modelo de enfermedades neurodegenerativas	87
3.9 Análisis de la activación de la UPR en modelos de enfermedades neurodegenerativas en <i>C. elegans</i>	89
3.10 Estudio del efecto de la inhibición de <i>dnj-27</i> sobre la degradación de proteínas y sobre la mitocondria.....	93
3.11 Análisis del efecto del tipo de bacteria utilizada como fuente de alimento en los distintos modelos de enfermedades neurodegenerativas en <i>C. elegans</i>	96
Capítulo IV. Discusión	101
Capítulo V. Conclusiones	111
Capítulo VI. Materiales y Métodos.....	115
I. Materiales	
6.1 Estirpes.....	117
6.1.1 Estirpes de <i>C. elegans</i>	117
6.1.2 Estirpes de <i>E. coli</i>	122

6.2 Medios de cultivos, soluciones y tampones	122
6.2.1 Medios y tampones para el mantenimiento de estirpes de <i>C. elegans</i>	122
6.2.2 Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	123
6.2.3 Otras soluciones y tampones	123
6.3 Plásmidos y vectores.....	124
6.4 Cebadores.....	127
II. Métodos	
6.5 Crecimiento y mantenimiento de organismos	130
6.5.1 Bacterias	130
6.5.2 <i>C. elegans</i>	130
6.5.2.1 Crecimiento de <i>C. elegans</i>	130
6.5.2.2 Conservación de estirpes.....	130
6.5.2.3 Limpieza, preparación de embriones y sincronización	131
6.6 Extracción de ADN genómico de <i>C. elegans</i> y genotipado por PCR.....	132
6.7 Extracción de ARN total de <i>C. elegans</i> y RT-PCR	132
6.8 Cruces genéticos de estirpes de <i>C. elegans</i>	133
6.8.1 Retrocruzamiento.....	134
6.9 Construcción de plásmidos y transgénesis.....	135
6.9.1 Clonación.....	135
6.9.2 Transgénesis.....	136
6.10 Ensayos de ARN de interferencia	138
6.11 Microscopía	139
6.12 Ensayos fenotípicos	139
6.12.1 Ensayos de estrés del retículo endoplasmático.....	139
6.12.2 Ensayos de parálisis y cuantificación de depósitos β -amiloides	139
6.12.3 Ensayos de movilidad	140
6.12.4 Cuantificación de agregados.....	140
6.12.5 Neurodegeneración dopaminérgica inducida por α -sinucleína	141
6.13 Producción de anticuerpos y Western blots	142
6.14 Análisis histológico para la evaluación de la degradación de proteínas en el citosol.....	143
6.15 Análisis estadísticos	143
Bibliografía.....	145
Agradecimientos.....	165

Índice de Figuras

Introducción

Figura 1.1 Reducción de un sustrato proteico por el sistema tiorredoxina	28
Figura 1.2 Reducción de un sustrato proteico por el sistema glutarredoxina.....	32
Figura 1.3 El retículo endoplasmático	34
Figura 1.4 La respuesta de estrés a proteínas mal plegadas (UPR)	38
Figura 1.5 La ruta de la ERAD	42
Figura 1.6 Posible mecanismo de acción de ERdj5	46
Figura 1.7 Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	49
Figura 1.8 Anatomía de un hermafrodita y un macho adulto de <i>C. elegans</i>	50

Resultados

Figura 3.1 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas ERdj5 de humano y DNJ-27 de <i>C. elegans</i>	64
Figura 3.2 Comparación de los dominios de las proteínas ERdj5 humana y DNJ-27 de <i>C. elegans</i>	65
Figura 3.3 Patrón de expresión del transgen <i>Pdnj-27::GFP</i>	66
Figura 3.4 Localización de la proteína de fusión DNJ-27::YFP::KDEL en el retículo endoplasmático	67
Figura 3.5 Inducción del transgen <i>Pdnj-27::GFP</i> por la ruta de la UPR, activada mediante el tratamiento con el inductor de estrés en el retículo endoplasmático tunicamicina (30 µg/ml).....	68
Figura 3.6 Organización genómica y alelos de <i>dnj-27</i>	70
Figura 3.7 Análisis de la expresión del alelo <i>dnj-27 (ok2303)</i>	71
Figura 3.8 Agregados de α -sinucleína::GFP en células musculares de <i>C. elegans</i>	72
Figura 3.9 Eficiencia del ARNi de <i>dnj-27</i> y efecto del silenciamiento de <i>dnj-27</i> por ARNi sobre la parálisis progresiva de la estirpe CL2006, <i>dvls2 [Punc-54::Aβ, rol-6 (su1006)]</i>	73
Figura 3.10 Efecto del silenciamiento de <i>dnj-27</i> por ARNi sobre la formación de depósitos amiloideos	74
Figura 3.11 Efecto de la sobreexpresión de <i>dnj-27</i> sobre la parálisis progresiva asociada a A β	75

Figura 3.12 Efecto de la sobreexpresión de <i>dnj-27</i> sobre la formación de depósitos amiloideos, y del silenciamiento y la sobreexpresión sobre los niveles totales de A β	76
Figura 3.13 Efecto del silenciamiento de <i>dnj-27</i> por ARNi sobre la movilidad de la estirpe NL5901, <i>pkIs2386 (Punc-54::α-syn::YFP)</i>	77
Figura 3.14 Efecto del silenciamiento de <i>dnj-27</i> por ARNi sobre la agregación de α -syn::YFP	78
Figura 3.15 Efecto de la sobreexpresión de <i>dnj-27</i> sobre los defectos de movilidad asociados a α -syn::YFP	79
Figura 3.16 Efecto de la sobreexpresión de <i>dnj-27</i> sobre la agregación de α -syn::YFP, y del silenciamiento y la sobreexpresión sobre los niveles totales de α -syn::YFP.....	80
Figura 3.17 Efecto de la sobreexpresión de <i>dnj-27</i> sobre la neurodegeneración dopaminérgica inducida por α -syn	81
Figura 3.18 Efecto del silenciamiento de <i>dnj-27</i> por ARNi sobre la movilidad de la estirpe AM141, <i>rmls133 (Punc-54::Q40::YFP)</i>	82
Figura 3.19 Efecto del silenciamiento de <i>dnj-27</i> por ARNi sobre la agregación de Q40::YFP	82
Figura 3.20 Efecto de la sobreexpresión de <i>dnj-27</i> sobre los defectos de movilidad asociados a Q40::YFP	83
Figura 3.21 Efecto de la sobreexpresión de <i>dnj-27</i> sobre la agregación de Q40::YFP, y del silenciamiento y la sobreexpresión sobre los niveles totales de Q40::YFP.....	84
Figura 3.22 Efecto de la expresión de <i>ERdj5</i> humano sobre el fenotipo de parálisis progresiva asociado a A β en <i>C. elegans</i>	85
Figura 3.23 Efecto de la expresión de <i>ERdj5</i> humano sobre la agregación de α -syn::YFP en <i>C. elegans</i>	86
Figura 3.24 Efecto de la expresión de <i>ERdj5</i> humano sobre la agregación de Q40::YFP en <i>C. elegans</i>	87
Figura 3.25 Activación de la UPR en <i>C. elegans</i> inducida por la expresión de A β humano.....	90
Figura 3.26 Efecto del silenciamiento por ARNi del gen de A β sobre la activación de la UPR	91
Figura 3.27 El silenciamiento de <i>dnj-27</i> por ARNi aumenta la degradación de proteínas en el citoplasma	94

Figura 3.28 Impacto del silenciamiento por ARNi de <i>dnj-27</i> sobre la estructura de los sarcómeros del músculo y sobre la mitocondria	96
Figura 3.29 Toxicidad y agregación de A β en <i>C. elegans</i> dependiendo del tipo de bacteria utilizada como alimento.....	97
Figura 3.30 Toxicidad y agregación de α -syn::YFP en <i>C. elegans</i> dependiendo del tipo de bacteria utilizada como alimento	98
Figura 3.31 Toxicidad y agregación de Q40::YFP en <i>C. elegans</i> dependiendo del tipo de bacteria utilizada como alimento	99

Materiales y métodos

Figura 6.1 Estrategia de cruce a seguir para la obtención de la estirpe VZ80 <i>dnj-27</i> (<i>ok2302</i>); <i>Punc-54::Aβ</i> ; <i>rol-6</i> (<i>su1006</i>)	134
Figura 6.2 Neuronas dopaminérgicas anteriores.....	141

Índice de Tablas

Resultados

Tabla 3.1 Efecto del silenciamiento por ARNi de los genes de las familias tioredoxina, glutaredoxina y peroxiredoxinas sobre los fenotipos de parálisis y agregación de α -syn::GFP en las estirpes CL647 y UA50, respectivamente	63
Tabla 3.2 Silenciamiento por ARNi de genes implicados en la ruta de la ERAD.....	89
Tabla 3.3 Efecto del silenciamiento por ARNi de genes implicados en las rutas de la UPR y la ERAD sobre la degradación de proteínas citoplasmáticas, y sobre la fragmentación de la mitocondria.....	95

Materiales y métodos

Tabla 6.1 Condiciones de transgénesis.....	137
--	-----

Resumen

El mantenimiento de la homeostasis de proteínas es crítico para la supervivencia de cualquier organismo y su desregulación ha sido asociada con el desarrollo y la progresión de muchas enfermedades en humanos. Por todo ello, las células han desarrollado mecanismos de control para asegurar la proteostasis en todos los compartimentos celulares. En este contexto, el retículo endoplasmático juega un papel fundamental en el correcto plegamiento y en la degradación de las proteínas de la ruta secretora.

Durante este trabajo, se describe el papel protector del gen *dnj-27* de *Caenorhabditis elegans* en diferentes modelos de enfermedades neurodegenerativas desarrollados en este nematodo. *dnj-27* es el ortólogo del gen *ERdj5* de mamífero, que codifica para un miembro de la familia de las tiorredoxinas residente del retículo e involucrado en la reducción de puentes disulfuro de proteínas mal plegadas durante la degradación asociada al retículo endoplasmático. Se demuestra en esta tesis que DNJ-27 también se localiza en el lumen del retículo y que su expresión se induce cuando se activa la respuesta al estrés por proteínas mal plegadas del retículo por la ruta IRE-1/XBP-1, lo que sugiere que la función de *dnj-27/ERdj5* está conservada a lo largo de la evolución.

Niveles reducidos de DNJ-27 aumentan la agregación y los defectos de movilidad de nematodos que expresan los péptidos β -amiloide humanos, α -sinucleína humana y péptidos de poliglutamina asociados a las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y de poliglutamina. Por el contrario, la sobreexpresión de DNJ-27 mejora estos fenotipos, efecto que también se mantiene al sobreexpresar la proteína humana ERdj5. Por último, nuestros resultados apuntan a la implicación de varios orgánulos en esta protección, ya que el silenciamiento de *dnj-27* lleva al aumento de la degradación de proteínas en el citoplasma y a la fragmentación de la mitocondria.

Abreviaturas

°C grados centígrados

∅ diámetro

α-syn (del inglés, *alpha-synuclein*)
alfa-sinucleína

Aβ (del inglés, *amyloid beta*) beta-
amiloide

ADN ácido desoxirribonucleico

ADNc ADN complementario

ADP adenosín difosfato

APP (del inglés, *amyloid precursor protein*) proteína precursora de
amiloide

ARN ácido ribonucleico

ARNi ARN de interferencia

ARNm ARN mensajero

ATP adenosín trifosfato

C. elegans *Caenorhabditis elegans*

CGC (del inglés, *Caenorhabditis Genetics Center*) Centro genético
de *Caenorhabditis*

DIC (del inglés, *differential interference contrast*) contraste de
interferencia diferencial

DsRed (del inglés, *Discosoma species Red*) Rojo del género
Discosoma (proteína fluorescente)

E. coli *Escherichia coli*

ERAD (del inglés, *Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*)
degradación asociada al retículo
endoplasmático

ERO especies reactivas de oxígeno

FAD flavín adenín dinucleótido

GFP (del inglés, *Green Fluorescent Protein*) proteína verde fluorescente

GR glutatión reductasa

Grx glutarredoxina

GSH glutatión reducido

GSSG glutatión oxidado

MAM membrana asociada a la
mitocondria

NADPH nicotinamida adenina
dinucleótido fosfato

NBRP (del inglés, *National BioResource Project*) Proyecto
nacional de bio-recursos (Japón)

pb pares de bases

PCR (del inglés, *polimerase chain reaction*) reacción en cadena de la
polimerasa

PDI proteína disulfuro isomerasa

poliQ poliglutamina

PS péptido señal

RT-PCR (del inglés, *reverse transcriptase PCR*) PCR con
retrotranscriptasa

trx tiorredoxina

trxR tiorredoxina reductasa

UPR (del inglés, *Unfolded Protein Response*) respuesta a proteínas
mal plegadas

vs *versus*

YFP (del inglés, *Yellow Fluorescent Protein*) proteína
amarilla
fluorescente

Capítulo I. Introducción

1.1 Contexto socio-económico del estudio

Desde un punto de vista médico, uno de los mayores retos a los que nuestra sociedad tendrá que enfrentarse en un futuro cada vez más cercano es el de garantizar una vejez digna y saludable a una población que envejece progresivamente. Las mejoras de las condiciones de vida en los países desarrollados han permitido un aumento de la longevidad que, además, ha venido acompañado de una disminución de la natalidad en estos países (Olshansky, Carnes, & Désesquelles, 2001). La combinación de estos dos factores ha dado como resultado un aumento progresivo del porcentaje de ancianos (Harman, 2001), provocando un cambio bastante acusado en la pirámide de población, con un vértice cada vez más ancho en detrimento de una base cada vez más estrecha. En concreto para España, se calcula que en torno al 22% de su población será mayor de 65 años en el año 2025, cifras que concuerdan con otros cálculos para Europa y Estados Unidos (Olshansky *et al.*, 2001).

Un problema muy importante que ha surgido como consecuencia de este incremento en la esperanza de vida, es un aumento de las enfermedades asociadas al envejecimiento. Entre estas patologías cuya incidencia aumenta con la edad del individuo, cabe destacar el cáncer y, sobre todo, las enfermedades neurodegenerativas (Skovronsky, Lee, & Trojanowski, 2006).

Solamente para el caso particular de la enfermedad de Alzheimer, se estima que alrededor de 27 millones de personas en todo el mundo sufren algunas de las formas de este desorden neurodegenerativo, con un nuevo caso diagnosticado cada 68 segundos (Alzheimer Association, 2012). Se calcula además que para el año 2050 la prevalencia de la enfermedad se cuadruplicará (Brookmeyer, Johnson, Ziegler-Graham, & Arrighi, 2007).

El alto impacto social y económico que las enfermedades neurodegenerativas representan tanto para los pacientes como para su entorno familiar, así como para los sistemas nacionales de salud de cada país, es una de las principales características de las mismas. Al propio proceso de la enfermedad hay que sumar la pérdida de habilidades sociales, la incapacidad laboral, la carga física y psíquica de los cuidadores de estas personas (que en la mayoría de los casos suelen ser familiares), y el enorme gasto económico que conlleva su atención social y sanitaria.

Durante los últimos años, el estudio de las enfermedades neurodegenerativas ha permitido un avance enorme en nuestro conocimiento sobre las mismas pero, sin embargo,

Capítulo I

muchos de los eventos moleculares detrás de estos desórdenes permanecen sin resolverse y aún estamos lejos de un tratamiento definitivo.

1.2 Enfermedades neurodegenerativas

Entre las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes se encuentran la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y las enfermedades de poliglutamina. Todas ellas se caracterizan por la vulnerabilidad selectiva de un tipo o tipos específicos de neuronas, dando lugar a la degeneración de regiones específicas del cerebro (Taylor, Hardy, & Fischbeck, 2002).

1.2.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es el más común de los desórdenes neurodegenerativos asociados a la edad y la primera causa de demencia en el mundo. Se caracteriza por la pérdida progresiva de memoria y de las capacidades cognitivas, pudiendo llevar, en última instancia, a la muerte (Martin Citron, 2002). Durante la enfermedad de Alzheimer se produce la degeneración de neuronas, particularmente en el hipocampo y en la corteza, así como pérdida de sinapsis y alteración de conexiones neuronales.

Una de las características distintivas más importantes de esta patología es la aparición de dos clases principales de agregados proteicos: i) las placas seniles, que son depósitos extracelulares que aparecen en el cerebro de los pacientes de Alzheimer y cuyo principal constituyente es el péptido beta-amiloide ($A\beta$) (Cai, Golde, & Younkin, 1993), y ii) los ovillos neurofibrilares, formados por la acumulación intracelular de la proteína tau hiperfosforilada, una proteína estabilizadora de los microtúbulos (Wood, Mirra, Pollock, & Binder, 1986).

El péptido $A\beta$ se genera a partir de una serie secuencial de procesos proteolíticos que ocurren sobre la proteína precursora de amiloide o APP (del inglés, *amyloid precursor protein*), una glicoproteína integral de membrana tipo 1. El procesamiento de la APP es llevado a cabo por dos aspartil proteasas, la β -secretasa (también llamada BACE, del inglés, *β -site APP cleaving enzyme*) y la γ -secretasa (Cai *et al.*, 1993; M Citron *et al.*, 1996). Inicialmente, la β -secretasa genera un fragmento soluble del extremo N-terminal de la APP, mientras que el extremo C-terminal (β -CTF) permanece unido a la membrana. El posterior procesamiento de este extremo β -CTF por la γ -secretasa puede producir dos péptidos, $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$, siendo $A\beta_{1-40}$ el más abundante. Ambos péptidos amiloides son neurotóxicos,

aunque la forma $A\beta_{1-42}$ tiene una naturaleza más hidrofóbica y es considerada la forma más amiloidogénica y, por tanto, más tóxica. Su acumulación está actualmente considerada como uno de los eventos claves en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, lo cual es la base de la hipótesis amiloide (Hardy & Selkoe, 2002), que propone que el primer evento patológico de la enfermedad de Alzheimer es la formación de placas amiloideas, que desencadenarán una serie de respuestas, a nivel inmunológico y oxidativo, que finalmente desembocan en demencia. Sin embargo, estudios recientes sugieren que son las formas oligoméricas solubles de $A\beta_{1-42}$ las realmente tóxicas, que pueden afectar a importantes procesos celulares que resultarían en disfunción y muerte neuronal, lo que parece indicar que, probablemente, los efectos nocivos de la proteína no se deban únicamente a la formación de agregados (Crews & Masliah, 2010).

Desde el punto de vista de su origen, la enfermedad de Alzheimer puede ser familiar o esporádica. La forma familiar se da en menos del 5% de los casos de Alzheimer y se caracteriza por la aparición de los síntomas generalmente antes de los 65 años de edad. Se hereda genéticamente de manera autosómica dominante y se debe a mutaciones en al menos un gen de los tres siguientes: *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* (Bertram & Tanzi, 2008). El gen *APP* codifica la proteína precursora de amiloide, mientras que *PSEN1* y *PSEN2* codifican, respectivamente, la presenilina 1 (PS1) y la presenilina 2 (PS2), dos proteínas que forman parte del centro catalítico del complejo de la γ -secretasa.

Por el contrario, la forma esporádica de la enfermedad de Alzheimer suele presentarse después de los 65 años de edad y no parece estar relacionada con la herencia familiar, sino que probablemente se deba a la combinación de alelos de genes relacionados con diversas rutas, muchas de ellas implicadas en la producción, agregación y eliminación de $A\beta$. Entre estos alelos cabe destacar el polimorfismo $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (*APOE*), que es el factor genético de riesgo más conocido asociado a esta enfermedad (Strittmatter *et al.*, 1993). Fisiológicamente, la apolipoproteína E está implicada en el transporte y metabolismo del colesterol y, aunque el mecanismo por el cual predispone a la enfermedad de Alzheimer no se conoce exactamente, se sabe que la apolipoproteína E favorece la degradación proteolítica del péptido $A\beta$ tanto dentro como fuera de la célula, mientras que la isoforma ApoE- $\epsilon 4$ sería la menos efectiva en la catálisis de estas reacciones (Jiang *et al.*, 2008). Sin embargo, la simple implicación de factores genéticos no es capaz de explicar por sí sola la enfermedad de Alzheimer esporádica por lo que, actualmente, la participación de factores ambientales en connivencia con los genéticos está ampliamente aceptada (Gatz *et al.*, 2006; Ramesh, Rao, Prakasam, & Rao, 2010).

Capítulo I

1.2.2 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer. Fenotípicamente se caracteriza por la aparición de bradicinesia (lentitud de los movimientos voluntarios), rigidez, temblor en reposo y alteraciones neuropsiquiátricas, producidos a consecuencia de la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta* y de la reducción de la concentración de dopamina en el cuerpo estriado y en la *substantia nigra* (Savitt, Dawson, & Dawson, 2006).

Uno de los marcadores patológicos característicos de la enfermedad es la aparición de acumulaciones de proteínas llamadas cuerpos de Lewy, cuyo principal constituyente es la α -sinucleína (α -syn), un polipéptido con tendencia a la agregación intracelular (Spillantini, Crowther, Jakes, Hasegawa, & Goedert, 1998) que también se encuentra en cuerpos de inclusión de otros desórdenes neurológicos, conocidos por este motivo como sinucleopatías. La función biológica de la α -syn no está clara, pero diversos estudios indican que probablemente esté implicada en el transporte de vesículas durante la sinapsis (Cabin *et al.*, 2002).

Aunque la causa de la mayoría de los casos de Parkinson es desconocida, existen casos poco frecuentes de Parkinson familiar para los cuales ha sido posible la identificación de algunos de los genes involucrados. De esta forma, se conocen al menos dieciséis locus asociados a la enfermedad (Gasser, 2007). Así, mutaciones en los genes α -syn y *LRRK2* (del inglés, *leucine rich repeat kinase 2*) son autosómicas dominantes, mientras que mutaciones en *parkina*, *DJ-1*, *PINK1*, y *ATP13A2* son autosómicas recesivas. El estudio de estos genes, así como de las proteínas mutantes que codifican, ha permitido avances muy importantes en el conocimiento de la patogénesis tanto de la forma familiar de Parkinson como de la esporádica, y ha llevado al descubrimiento de muchos de los procesos celulares que se encuentran detrás de esta enfermedad. De esta forma, la α -syn parece jugar un papel en la función sináptica; la parkina (una E3 ubiquitin ligasa) y *ATP13A2* (una ATPasa lisosomal) están relacionadas con la degradación de proteínas (Kitada *et al.*, 1998; Ramirez *et al.*, 2006); *DJ-1* y *PINK1* son proteínas protectoras frente al estrés oxidativo y mitocondrial (Bonifati *et al.*, 2003; Valente *et al.*, 2004); y, aunque la función de *LRRK2* no se conoce exactamente, se sabe que está implicada en la traducción de señales (Zimprich *et al.*, 2004).

Sin embargo, tan sólo un 5-10% de todos los casos de Parkinson siguen un patrón

hereditario. De manera parecida a la enfermedad de Alzheimer, lo más probable es que la combinación de múltiples factores, tanto genéticos como ambientales, sea la causa de los casos esporádicos de la enfermedad de Parkinson.

1.2.3 Enfermedades de poliglutamina

Dentro de este grupo se incluyen al menos nueve desórdenes neurodegenerativos distintos causados por la expansión de repeticiones de tripletes de glutamina (CAG) en genes que codifican para distintas proteínas que no están relacionadas entre sí (H. T. Orr & Zoghbi, 2007). La poliglutamina (poliQ) es un fragmento peptídico, consistente en la repetición del aminoácido glutamina dentro de la secuencia de una proteína. La enfermedad de Huntington, ataxias espinocerebelosas y algunas atrofas musculares se encuentran entre las enfermedades de poliglutamina más conocidas.

Cada uno de estos desórdenes se caracteriza por la vulnerabilidad de un tipo particular de neuronas, que vendrá determinada por la interacción entre los polipéptidos que expresan las expansiones de poliQ y el proteoma particular de cada tipo neuronal, pero prácticamente en todos los casos, la toxicidad se produce cuando la expansión alcanza alrededor de 40 residuos, lo que provoca el mal plegamiento y la agregación de las proteínas que las contienen. Diferentes estudios genéticos han demostrado que individuos portadores de alelos de la huntingtina (la proteína relacionada con la enfermedad de Huntington) que contienen menos de 30-34 repeticiones de CAG son asintomáticos, mientras que individuos portadores de alelos de la huntingtina que contienen más de 35-40 repeticiones desarrollan la enfermedad. Además, la longitud de las expansiones de poliQ también parece determinar la edad de desarrollo de la enfermedad así como la severidad en la progresión de la misma (Group, 1993; Gusella & Macdonald, 1995).

La naturaleza de la transición de las proteínas poliQ a un estado patológico no se conoce con certeza, pero una de las características patológicas detrás de estas enfermedades es, al igual que en Alzheimer y Parkinson, la aparición de agregados proteicos en las regiones del cerebro que degeneran (Davies *et al.*, 1997).

1.2.3.1. Enfermedad de Huntington

Es un trastorno genético que se hereda de forma autosómica dominante y que se manifiesta generalmente en la mitad de la vida de la persona que lo padece, aunque puede aparecer también más tarde y durante la infancia. En esta enfermedad se produce la degeneración progresiva de neuronas, sobre todo de las neuronas espinosas medianas del

Capítulo I

cuerpo estriado (Vonsattel *et al.*, 1985).

Clínicamente, la aparición de corea (movimientos espasmódicos e involuntarios, amplios y bruscos de las extremidades) es, por lo general, uno de los primeros síntomas motores en pacientes adultos. Pérdidas de memoria, cambios en la personalidad y depresión son también característicos de la enfermedad. La muerte del paciente suele ocurrir a los 10-15 años de la aparición de los primeros síntomas (H. T. Orr & Zoghbi, 2007).

Como ya se ha comentado anteriormente, la enfermedad de Huntington se produce por expansiones de poliQ en el extremo N-terminal de la proteína de función desconocida huntingtina, que se expresa en el sistema nervioso central y en tejidos periféricos.

1.2.3.2. Ataxias espinocerebelosas

Son un grupo de trastornos genéticos que muestran un patrón de herencia autosómico dominante y, generalmente, también se presentan en la mitad de la vida, progresando durante 10-20 años hasta resultar en la muerte prematura del paciente (H. T. Orr & Zoghbi, 2007).

Descoordinación en el movimiento, temblor y disartria (dificultad en la articulación de palabras) son trastornos clínicos frecuentes en todas las ataxias espinocerebelosas, si bien en algunos tipos particulares también puede darse degeneración de la retina, disfunción cardíaca, psicosis y demencia (H. T. Orr & Zoghbi, 2007).

La atrofia del cerebelo es común a todas las ataxias espinocerebelosas, aunque diferentes zonas del cerebro pueden estar también afectadas dependiendo de la ataxia en cuestión. Están causadas por expansiones de poliQ en el producto de distintos genes sin homología entre ellos. Algunos de estos genes son *ataxina-1*, *2*, *3* y *7* y *atrofina1*.

1.3 Mecanismos moleculares y celulares de las enfermedades neurodegenerativas

Durante las últimas décadas, el estudio intensivo de las enfermedades neurodegenerativas, así como numerosos descubrimientos en genética humana, han derivado en un mayor conocimiento de los mecanismos implicados en estas enfermedades. De esta forma, cada vez es más claro que algunos de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen detrás de las mismas son compartidos. Entre estos mecanismos

comunes se incluyen la agregación de proteínas, la formación de cuerpos de inclusión, el daño oxidativo y la disfunción mitocondrial.

1.3.1 Agregación de proteínas y formación de cuerpos de inclusión.

El mal plegamiento y la consiguiente agregación de determinadas proteínas definen algunas de las enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad. Aunque distintas proteínas patológicas están asociadas a cada enfermedad, es probable que la patogénesis de todas ellas ocurra por medio de mecanismos comunes que estén relacionados con la formación de inclusiones amiloideas similares (Carrell & Lomas, 1997). Los amiloides son agregados fibrilares altamente ordenados, en los cuales, proteínas en estado no nativo dejan expuestas estructuras de hoja plegada β , formando puentes de hidrógeno con otras proteínas mal plegadas ricas en estructuras de hoja plegada β (Nelson *et al.*, 2005).

Como hemos podido ver en los apartados anteriores, una de las características fundamentales de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson y las enfermedades de poliglutamina es la aparición de cuerpos de inclusión en el cerebro de los pacientes debido a la agregación de los péptidos asociados a estas enfermedades. Las placas seniles, cuyo principal constituyente es el péptido $A\beta$, y los ovillos neurofibrilares, compuestos en su mayoría por la proteína tau hiperfosforilada, aparecen en los pacientes de Alzheimer. Por su parte, los cuerpos de Lewy, con la α -syn como principal componente, son característicos en los pacientes de Parkinson, mientras que en las enfermedades de poliglutamina se presentan cuerpos de inclusión con distintas proteínas poliQ.

Desde el descubrimiento de estos agregados proteicos, se ha desarrollado un intenso debate sobre de la implicación de los mismos en el inicio y el desarrollo de estos desórdenes neurodegenerativos. Durante décadas, estos depósitos amiloideos fueron considerados los causantes de la enfermedad, debido a que su presencia en los cerebros de los pacientes era manifiesta y a que su distribución anatómica coincidía con las áreas de mayor neurodegeneración en el cerebro. Sin embargo, la correlación entre la gravedad de la enfermedad y el grado de acumulación de estos amiloides es relativamente baja (Ross & Poirier, 2004). Por este motivo, trabajos realizados en los últimos años han propuesto que las estructuras amiloideas probablemente se formen como consecuencia de mecanismos protectores de la célula, cuya finalidad es eliminar los intermediarios solubles. Diversos estudios apuntan a que son precisamente los oligómeros solubles de $A\beta$, α -syn y poliQ las especies patológicas (Kirkitadze, Bitan, & Teplow, 2002; Treusch, Cyr, & Lindquist, 2009).

Capítulo I

De cualquier manera, como se describe en apartados posteriores, otros procesos celulares relacionados con la agregación, el plegamiento y la degradación de proteínas también se encuentran entre los mecanismos comunes implicados en las enfermedades neurodegenerativas (Chen & Burgoyne, 2012; Voisine, Pedersen, & Morimoto, 2010).

1.3.2 Disfunción mitocondrial

Son muchos los estudios que relacionan la mitocondria y las enfermedades neurodegenerativas. Las mitocondrias son unos orgánulos celulares que se encuentran en prácticamente todas las células eucariotas. Entre sus funciones principales aparecen: la producción de ATP mediante fosforilación oxidativa, la oxidación de ácidos grasos, la participación en la síntesis de determinados metabolitos, la regulación de la apoptosis, y actuar como reserva de calcio y fuente de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Benard *et al.*, 2007). La alta actividad metabólica de las neuronas las hace particularmente sensibles a cambios en la función mitocondrial dada su alta dependencia energética ligada a la multitud de procesos neuronales, que incluyen transmisión sináptica, transporte axonal y dendrítico y transporte activo de iones (Han *et al.*, 2011). Las mitocondrias son unos orgánulos muy dinámicos que están en constante división y fusión con otras mitocondrias en respuesta a diferentes estímulos y necesidades de la célula, lo cual determina no sólo su morfología, tamaño y número, sino también su función y distribución (Chan, 2006).

Daños en la estructura mitocondrial, así como en sus componentes, están ligados a la enfermedad de Alzheimer (Zhu *et al.*, 2006). Así, las deficiencias en algunas de las enzimas claves en el metabolismo oxidativo, como el complejo α -ketoglutarato deshidrogenasa, el complejo piruvato deshidrogenasa o la citocromo oxidasa están relacionadas con el Alzheimer (G E Gibson, Sheu, & Blass, 1998). Los pacientes de este desorden neurodegenerativo acumulan mutaciones en el ADN mitocondrial (Coskun, Beal, & Wallace, 2004; Hirai *et al.*, 2001) y se ha encontrado, además, que A β puede acumularse en la mitocondria donde es capaz de interactuar con ciertas proteínas, como la ciclofilina D, que reside en la matriz mitocondrial y está implicada en la apertura de los canales de transición de la permeabilidad mitocondrial (Du *et al.*, 2008), o con ABAD (*A β -binding alcohol dehydrogenase*), una proteína mitocondrial que cataliza la oxidación de un amplio repertorio de sustratos y que potencia el estrés celular provocado por A β (Lustbader *et al.*, 2004). También se puede encontrar APP en la mitocondria donde, según algunos estudios, se acumula bloqueando canales de importación de proteínas (Devi, Prabhu, Galati, Avadhani, & Anandatheerthavarada, 2006). Por último, cambios significativos en la forma y número de las mitocondrias, así como un aumento de la fragmentación de las mismas, se

pueden encontrar en neuronas de enfermos de Alzheimer (Hirai *et al.*, 2001), sugiriendo cambios en la dinámica de la mitocondria. Todos estos eventos desembocarían en una disfunción mitocondrial.

Por su parte, también parece haber una clara relación entre mitocondria y la enfermedad de Parkinson. Por ejemplo, se ha demostrado una disminución en la actividad del complejo I de la cadena respiratoria en los pacientes con esta enfermedad (Henchcliffe & Beal, 2008). En este sentido, la inhibición del complejo I con las neurotoxinas MPTP y rotenona así como mutaciones en el ADN mitocondrial, producen Parkinson (Betarbet *et al.*, 2000; Fornai *et al.*, 2005). Igualmente, las neuronas dopaminérgicas en la *substancia nigra* de pacientes de Parkinson acumulan múltiples delecciones en el ADN mitocondrial. Conviene recordar además, que algunos de los genes identificados para el Parkinson familiar codifican proteínas que se localizan en la mitocondria y están relacionados con las funciones de la misma, como PINK-1, Parkina y DJ-1 (Gasser, 2007).

También se han encontrado daños en el ADN mitocondrial y defectos importantes en enzimas de la cadena respiratoria de pacientes de enfermedades de poliglutamina (Banoei *et al.*, 2007; Tabrizi *et al.*, 1999). Se sabe que los agregados de la huntingtina se asocian con la mitocondria teniendo efectos muy negativos en el potencial de membrana, en el almacenamiento de calcio y en el transporte mitocondrial en el axón (A. L. Orr *et al.*, 2008; Panov *et al.*, 2002). La huntingtina produce además fragmentación de la mitocondria y reducción en los niveles de ATP (H. Wang, Lim, Karbowski, & Monteiro, 2009).

1.3.3 Daño oxidativo

Un vínculo común entre los procesos neurodegenerativos es su susceptibilidad al daño oxidativo. Las células del cerebro, especialmente las neuronas, son muy vulnerables a los efectos perjudiciales de las EROs, que se generan cuando se produce la reducción incompleta del oxígeno durante el metabolismo aeróbico. Esta elevada susceptibilidad de las neuronas es consecuencia de su alta actividad metabólica, de sus bajos niveles de antioxidantes, de su alta composición en ácidos grasos que son propensos a la peroxidación y de la alta concentración de metales de transición, capaces de catalizar la formación de radicales hidroxilos reactivos (Reynolds, Laurie, Mosley, & Gendelman, 2007).

Las EROs son sustancias muy reactivas que tienen la capacidad de reaccionar con distintas moléculas presentes en las células, como proteínas, polisacáridos, la bicapa lipídica y ADN, causando daño oxidativo. La producción de EROs en los procesos

Capítulo I

neurodegenerativos es especialmente importante debido a que las células de la glía, que funcionan como soporte de las neuronas, producen radicales libres durante procesos neuroinflamatorios, que a su vez pueden ser activados por los distintos cuerpos de inclusión (McGeer & McGeer, 1998). Además, se sabe que los procesos de agregación y defectos en la eliminación de proteínas, así como la disfunción mitocondria, también generan EROs.

Otro factor muy importante a tener en cuenta en la formación de EROs es la edad. Así, las enfermedades neurodegenerativas son enfermedades asociadas a la edad y una de las hipótesis más aceptadas para explicar las causas moleculares que subyacen detrás del envejecimiento es la teoría del envejecimiento por radicales libres. Esta teoría fue propuesta por primera vez por Denham Harman en el año 1956 y propone que el proceso de envejecimiento se debe a la acción continua de los radicales libres, generados durante los procesos metabólicos normales, sobre los distintos componentes celulares (Harman, 1956). La acumulación de daños conducirá a una producción mayor de EROs en los tejidos viejos debido a la disfunción mitocondrial provocada por los daños oxidativos sobre el ADN de la mitocondria, lo que además se verá agravado por la disminución de la capacidad de las enzimas antioxidantes provocada por el efecto de estas mismas EROs.

La implicación del daño oxidativo en los procesos neurodegenerativos se ve reforzada además por el número creciente de estudios que muestran como la aplicación de terapias antioxidantes resultan en protección o ralentización en la progresión de las mismas (Liu *et al.*, 2007; D. Wang *et al.*, 2006).

1.4 Sistemas antioxidantes

Las células han desarrollado estrategias para utilizar EROs, a bajas concentraciones, como mensajeros celulares durante procesos reguladores del crecimiento celular, la diferenciación y el sistema inmune (Nordberg & Arner, 2001; Thannickal *et al.*, 2000). Sin embargo, como hemos visto en el apartado anterior, a concentraciones superiores las EROs son dañinas para la célula, pudiendo reaccionar con gran variedad de moléculas. Por tanto, su producción debe estar estrictamente controlada de forma que se favorezcan determinadas reacciones celulares, pero evitando que se alcancen niveles que puedan ser perjudiciales. Para ello, las células están equipadas con una extensa batería de sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos (superóxido dismutasas, catalasas, peroxidasas, etc.) como no enzimáticos (glutatiión, vitaminas C y E, coenzima Q, etc.), cuyo fin es mantener los niveles de EROs dentro de los límites deseables (Nordberg & Arner, 2001).

1.4.1 Antioxidantes no enzimáticos

Entre los antioxidantes no enzimáticos más importantes se encuentra la vitamina C, la cual puede llevar a cabo la reducción de radicales libres gracias a la transferencia de uno o dos de sus propios electrones. La vitamina C protege frente a la oxidación de lipoproteínas de baja densidad y puede, además, funcionar como cofactor de múltiples oxigenasas metalo-dependientes. Una vez oxidada, podrá ser reducida nuevamente por múltiples enzimas como las tioredoxina reductasas, glutarredoxinas, NADH-citocromo b₅ reductasa, proteína disulfuro isomerasa o 3- α -dehidrogenasa, o por reductores no enzimáticos como el glutatión (Linster & Van Schaftingen, 2007).

Otro de los antioxidantes no enzimáticos más importantes es la vitamina E, de la que existen ocho isoformas distintas. La vitamina E previene la oxidación de lípidos y, una vez oxidada, puede ser llevada de nuevo a su estado reducido directamente por el glutatión o indirectamente por la vitamina C (Valko *et al.*, 2007).

Sin embargo, el antioxidante no enzimático más importante es el glutatión, muy abundante en citosol, núcleo y mitocondria, siendo el principal antioxidante soluble en estos compartimentos celulares. El glutatión es un tripéptido compuesto por una molécula de glutamato, una cisteína y una glicina (Pompella, Visvikis, Paolicchi, De Tata, & Casini, 2003). Es precisamente el residuo de cisteína el que le confiere su función protectora, permitiéndole la reducción de puentes disulfuro y la eliminación de agentes oxidantes. Así, el glutatión reducido (GSH) es capaz de reducir radicales hidroxilos u oxígeno molecular singlete directamente, y peróxido de hidrógeno o peróxidos lipídicos a través de la acción catalítica de glutatión peroxidasas y glutatión S-transferasas. Además, como hemos visto anteriormente, otros antioxidantes como la vitamina C y E, son llevadas de vuelta a su forma activa reducida por el glutatión (Valko *et al.*, 2007). Después de reaccionar con las distintas especies oxidantes, el glutatión reducido pasa a su forma oxidada disulfuro de glutatión (GSSG). La relación GSH/GSSG es la que determina su capacidad antioxidante. Para aumentar esta proporción, la célula puede recurrir a distintos mecanismos: secretar GSSG del citosol al espacio extracelular por medio de transportadores transmembrana; reducir GSSG a GSH por la acción de la glutatión reductasa, usando los equivalentes de reducción del NADPH; o sintetizar GSH *de novo* (Hill & Bhatnagar, 2007).

1.4.2 Antioxidantes enzimáticos

Entre los antioxidantes enzimáticos podemos encontrar a enzimas tan importantes como la superóxido dismutasa, que cataliza la transformación del anión superóxido en

Capítulo I

peróxido de hidrógeno y oxígeno, y la catalasa, que convierte peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Zámocký & Koller, 1999). Sin embargo, nuestro trabajo se centra fundamentalmente en los sistemas tiorredoxina, glutarredoxina y peroxirredoxinas, los cuales se describen a continuación.

1.4.2.1 Tiorredoxinas

Las proteínas del espacio extracelular y las que se encuentran en la superficie de la célula contienen normalmente muchos enlaces disulfuro que las estabilizan, reflejando el carácter oxidante de estos ambientes. Por el contrario, el interior de la célula se mantiene generalmente en un estado reducido y las proteínas que se encuentran aquí contienen muchos grupos sulfidrilos libres y pocos enlaces disulfuro. Las tiorredoxinas son las disulfuro reductasas más importantes para el mantenimiento de las proteínas en su estado reducido (Arnér & Holmgren, 2000).

Las tiorredoxinas son pequeñas proteínas monoméricas, de aproximadamente 12 kDa, que se expresan de forma ubicua en prácticamente todos los organismos conocidos. Se caracterizan por la secuencia conservada de su sitio activo -Cys-Gly-Pro-Cys-, siendo las dos cisteínas de los extremos de la secuencia la clave para su función como proteína reductora de puentes disulfuro. De esta manera, la reducción de puentes disulfuro se produce mediante la oxidación reversible de estas dos cisteínas (Arnér & Holmgren, 2000). Posteriormente, la tiorredoxina será llevada de vuelta a su estado activo reducido por la flavoenzima tiorredoxina reductasa que utiliza el poder reductor del NADPH (Figura 1.1).

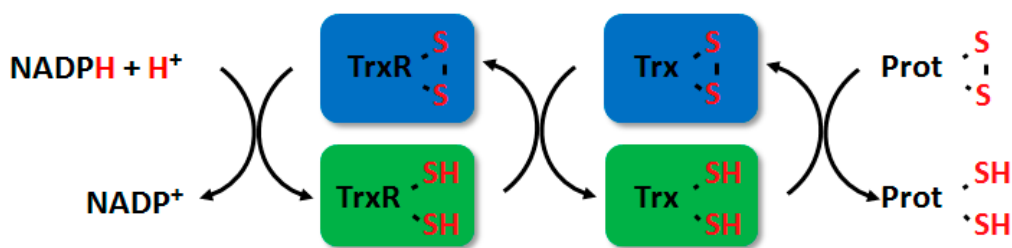


Figura 1.1. Reducción de un sustrato proteico por el sistema tiorredoxina. El sistema tiorredoxina está formado por la tiorredoxina reductasa (TrxR) y la tiorredoxina (Trx), y es capaz de reducir sustratos oxidados utilizando para ello el poder reductor del NADPH.

La tiorredoxina reductasa es una enzima homodimérica presente en casi todos los organismos, donde cada subunidad tiene un tamaño aproximado de 35 kDa en bacterias, plantas y otros eucariotas inferiores, y de 55 kDa en mamíferos y vertebrados. Por esta razón, se diferencian dos subgrupos distintos: tiorredoxinas reductasas pequeñas y

tiorredoxinas reductasas grandes. Las tiorredoxinas reductasas pequeñas contienen en el sitio activo de cada subunidad un sitio de unión a NADPH, un grupo prostético FAD, un sitio disulfuro activo redox cuya secuencia conservada es CVNVGC y un sitio de unión a tiorredoxina (Waksman, Krishna, Williams Jr, & Kuriyan, 1994). Por su parte, las tiorredoxinas reductasas grandes contienen un sitio redox activo adicional situado hacia el lado C-terminal, que puede estar formado por una pareja conservada cisteína-cisteína o bien por una pareja cisteína-selenocisteína, como es el caso de la mayoría de las tiorredoxinas reductasas de mamífero (Gromer *et al.*, 2003). El flujo de electrones se producirá, por tanto, desde NADPH a FAD que entonces será capaz de reducir el sitio disulfuro activo que, en el caso de la tiorredoxina reductasa grande, transferirá los electrones al sitio activo C-terminal, y finalmente a la tiorredoxina correspondiente. En mamíferos, el residuo de selenocisteína es codificado por el codón UGA que es también un condón de parada de la traducción. Sin embargo, la presencia de una secuencia de inserción de selenocisteína, llamada elemento SECIS, localizada en el extremo 3'-UTR del ARN mensajero (ARNm) permite que el codón UGA codifique como selenocisteína en las selenoproteínas (Berry *et al.*, 1991). Este residuo es esencial para el funcionamiento de las tiorredoxinas reductasas de mamífero, ya que les dota de una mayor reactividad y les permite actuar sobre un mayor número de sustratos, como por ejemplo, peróxido de hidrógeno, ubiquinona o ácido lipoico entre otros (Gromer *et al.*, 2003; Nordberg & Arner, 2001; Xia *et al.*, 2003).

La tiorredoxina y la tiorredoxina reductasa juntas forman el sistema tiorredoxina. Diversas tiorredoxinas citosólicas han sido identificadas en bacterias, plantas y otros eucariotas, pero en mamíferos sólo se ha descrito una, Trx1 (Wakasugi *et al.*, 1990). También se ha identificado una tiorredoxina mitocondrial en mamíferos, denominada Trx2 (Spyrou, Enmark, Miranda-Vizueté, & Gustafsson, 1997), y varias específicas de espermatozoide tales como SpTrx-1, SpTrx-2 y SpTrx-3 (Jiménez *et al.*, 2004; Miranda-Vizueté *et al.*, 2001; Sadek *et al.*, 2001). Igualmente, en mamíferos, podemos encontrar tres isoformas distintas de tiorredoxinas reductasas: la tiorredoxina reductasa citosólica, llamada TrxR1 (Tamura & Stadtman, 1996); TrxR2, que se localiza en la mitocondria (Miranda-Vizueté, Damdimopoulos, & Spyrou, 2000); y TrxR3, también conocida como tiorredoxina/glutatión reductasa, que se expresa principalmente en espermatozoides (D. Su *et al.*, 2005).

Una de las principales funciones de los sistemas tiorredoxinas es la de ser una importante defensa antioxidante, la cual pueden ejercer directamente inactivando EROs por

Capítulo I

si mismos, o bien indirectamente proporcionando poder reductor a otras proteínas antioxidantes como peroxirredoxinas, metionina sulfóxido reductasas o glutatión peroxidasa, entre otras (Nordberg & Arner, 2001). Además, las tiorredoxinas pueden realizar muchas otras funciones, entre las que se incluyen: i) modulador de la síntesis y reparación del ADN mediante la reducción de la ribonucleótido reductasa, que es la enzima encargada de reducir los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos (Laurent, Moore, & Reichard, 1964) ii) regulación de la apoptosis, ya que la tiorredoxina reducida, al unirse al extremo N-terminal de ASK1 (*apoptotic signal kinase 1*), es capaz de inhibir su función quinasa y promover su ubiquitinación (Saitoh *et al.*, 1998) iii) inmunomodulación, a través, por ejemplo, de la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (*Activator Protein 1*) (Schenk, Vogt, Droge, & Schulze-Osthoff, 1996) o actuando como quimioatrayente de neutrófilos, monocitos y linfocitos T (Bertini *et al.*, 1999), y iv) función como chaperonas moleculares para el plegamiento de proteínas (Kern, Malki, Holmgren, & Richarme, 2003).

Dado su papel protector frente al estrés oxidativo y sus muchas otras funciones, los sistemas tiorredoxina han sido implicados en múltiples aspectos de diversas enfermedades, entre las que se incluyen las enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, se ha descrito que la tiorredoxina es un importante regulador de neuroprotección y que actúa como factor neurotrófico (Kong *et al.*, 2010; Masutani, Bai, Kim, & Yodoi, 2004). Por otro lado, algunos estudios sugieren que la sobreexpresión de la tiorredoxina es protectora en determinados modelos de enfermedades neurodegenerativas (Akterin *et al.*, 2006; Umeda-Kameyama *et al.*, 2007). Sin embargo, actualmente la información acerca de la implicación de las tiorredoxinas en estas patologías *in vivo*, así como los mecanismos moleculares implicados, es muy limitada. Esto es debido, fundamentalmente, a que la inactivación de la mayoría de los genes de los sistemas tiorredoxinas no es viable en muchos de los organismos modelos más comunes, como ratón o *Drosophila melanogaster* (Missirlis *et al.*, 2002; Nonn, Williams, Erickson, & Powis, 2003).

Dentro de la superfamilia de las tiorredoxinas, que está en constante aumento, se incluyen otras proteínas que pueden estar implicadas en multitud de procesos diferentes y que no forman parte de ningún sistema tiorredoxina clásico. Todas las proteínas de esta superfamilia contienen dominios tiorredoxina, que siguen un plegamiento determinado, con sitios activos conservados CXXC -que, por tanto, no tiene que incluir necesariamente el sitio activo tiorredoxina CGPC canónico- y tienen funciones relacionadas con la reducción de puentes disulfuro.

1.4.2.2 Glutarredoxinas

Como se comentó anteriormente, el glutatión reducido es un compuesto muy importante en el mantenimiento del bajo potencial redox y del alto nivel de grupos sulfidrilos libres en el interior de las células. En este caso, la reducción de enlaces disulfuro mediada por glutatión reducido es catalizada por las glutarredoxinas que, por tanto, tienen funciones solapadas con las tioredoxinas, al menos en parte (Holmgren, 1989). Así, por ejemplo, las glutarredoxinas también pueden ceder electrones a la ribonucleótido reductasa para la síntesis de ADN (Holmgren, 1989) o unirse a ASK1 para inhibir su función, y han sido relacionadas, al igual que la tioredoxinas, con procesos neurodegenerativos (Akterin *et al.*, 2006; Daily *et al.*, 2001).

Las glutarredoxinas son pequeñas oxidorreductasas que se encuentran en la mayoría de los organismos vivos, desde procariotas a eucariotas. Existen muchas clases de glutarredoxinas, pero todas ellas se caracterizan por su capacidad de unir y utilizar glutatión reducido como sustrato, y por una secuencia de su sitio activo parecido al de las tioredoxinas -Cys-X-X-Cys- ó -Cys-X-X-Ser- (Lillig, Berndt, & Holmgren, 2008). Las que contienen motivos CXXC son capaces de reducir puentes disulfuro por un mecanismo ditiólico, pero a diferencia de las tioredoxinas, tanto las glutarredoxinas con motivos CXXC como aquellas con motivos CXXS son capaces de llevar a cabo, además, la desglutinationilación de proteínas a través de un mecanismo monotiólico en el que la glutarredoxina sólo utiliza un residuo de cisteína. Por medio de este mecanismo son capaces de regular la actividad de proteínas (como, por ejemplo, factores de transcripción) implicadas en importantes procesos celulares, incluyendo diferenciación celular y apoptosis (Chrestensen, Starke, & Mieyal, 2000; Shelton, Chock, & Mieyal, 2005).

Las glutarredoxinas son más versátiles que las tioredoxinas en cuanto a la elección del sustrato y al mecanismo de reacción (Figura 1.2). Pero la diferencia fundamental con las tioredoxinas es que la glutarredoxinas, una vez oxidadas, no son reducidas por ninguna reductasa específica, sino que utilizan glutatión que, como se vio en apartados anteriores, es mantenido a su vez en su estado reducido por la glutatión reductasa (Dickinson & Forman, 2002).

Al igual que las tioredoxinas, en mamífero se han identificado glutarredoxinas citosólicas, como Grx1 que ha sido implicada en diversas funciones fisiológicas, destacando la regulación de factores de transcripción y apoptosis (Anathy *et al.*, 2009; Reynaert *et al.*, 2006), y mitocondriales, como Grx2. Es importante mencionar aquí que el ARNm de Grx2,

Capítulo I

mediante un proceso de *splicing* alternativo, puede dar lugar a dos proteínas distintas que difieren en su zona N-terminal, una de ellas se localiza en el núcleo (donde aún no está clara su función) y la otra en la mitocondria (Lundberg *et al.*, 2001). Esta última es capaz de catalizar la desglutacionilación de proteínas en la mitocondria de manera muy eficiente (Beer *et al.*, 2004) y es la primera proteína conocida de la familia de las glutarredoxinas que contiene un centro hierro-azufre (Lillig *et al.*, 2005). Relacionada con esta última propiedad, quizás una de las funciones más interesante descritas en los últimos años para glutarredoxinas tanto bacterianas como de eucariotas sea su implicación en la biogénesis de centros hierro-azufre, al igual que su papel como sensor y transportador de hierro intracelular (Mühlenhoff *et al.*, 2010; Tamarit *et al.*, 2002; Yeung *et al.*, 2011).

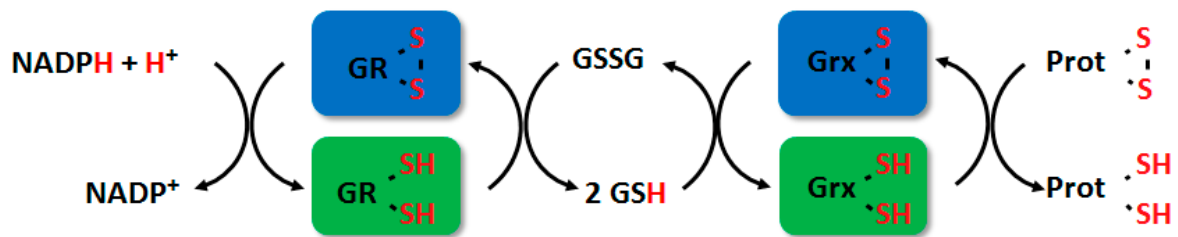


Figura 1.2. Reducción de un sustrato proteico por el sistema glutarredoxina. Como se puede observar en la figura, a diferencia del sistema tioredoxina, el sistema glutarredoxina utiliza un intermediario no proteico en la cadena de reacción, el glutatión reducido (GSH), que es capaz de mantener en estado reducido a la glutarredoxina (Grx) para que, a su vez, ésta pueda reducir a la proteína diana. Aprovechando el poder reductor del NADPH la glutatión reductasa (GR) es capaz de reducir el disulfuro de glutatión (GSSG).

1.4.2.3 Peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas son proteínas antioxidantes que se encuentran conservadas evolutivamente desde procariontes a eucariotes. Todas ellas contienen una cisteína conservada en el extremo N-terminal y, de forma adicional, pueden tener otra cisteína en el extremo C-terminal en función del tipo de peroxirredoxina (Rhee, Kang, Chang, Jeong, & Kim, 2001). Durante la catálisis, el residuo de cisteína del extremo N-terminal es oxidado a un ácido sulfénico que reaccionará con la cisteína C-terminal de la propia peroxirredoxina ó de otra distinta. La función principal de las peroxirredoxinas es la de reducir peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos, aunque también se ha descrito que son capaces de reducir peroxinitritos. Fisiológicamente pueden estar implicadas en gran cantidad de funciones, entre las que se incluyen actuar como defensa antioxidante y modular la señalización celular mediada por H_2O_2 (Rhee *et al.*, 2001). Generalmente, las peroxirredoxinas oxidadas son llevadas a su forma activa reducida por la acción de tioredoxinas, aunque otros donadores de electrones pueden intervenir en la reducción de peroxirredoxinas para algunos casos particulares (Monteiro, Horta, Pimenta, Augusto, & Netto, 2007).

1.5 Plegamiento de proteínas

Las proteínas, gracias a sus propiedades estructurales y a la gran variedad de funciones enzimáticas que son capaces de realizar, determinan prácticamente todos los aspectos de la vida. Pero al mismo tiempo, son unas macromoléculas muy vulnerables en el ambiente fisiológico de la célula. Esto es debido a que el ambiente celular eucariota es químicamente complejo, densamente poblado por multitud de macromoléculas que ocupan entre el 20 y el 40% del volumen total de la célula (Ellis, 2001). La mayoría de las proteínas alcanzan su conformación tridimensional, necesaria para realizar su función, en este ambiente tan intrincado, pero tanto aquellas proteínas que se han sintetizado recientemente como aquellas que fueron sintetizadas hace algún tiempo están en continuo peligro de sufrir un mal plegamiento y agregación (Douglas & Dillin, 2010). Además, la biogénesis de proteínas es un proceso con tendencia a error ya que mutaciones genéticas, compuestos tóxicos y el estrés celular, así como errores espontáneos durante los procesos de transcripción y traducción, pueden darse con cierta frecuencia, pudiendo así comprometer la eficiencia del plegamiento de estas proteínas (Buchberger, Bukau, & Sommer, 2010). Por otro lado, las proteínas están continuamente amenazadas por reactivos químicos y metabolitos que pueden causar oxidación, nitrosilación, carbonilación y otras modificaciones post-traduccionales que afectan la conformación de las mismas. También estados patológicos pueden afectar la homeostasis de proteínas, y de esta manera, como hemos tenido ocasión de indicar previamente en apartados anteriores, la agregación de proteínas juega un papel muy importante en las enfermedades neurodegenerativas (Ross & Poirier, 2004).

Por este motivo, las células han desarrollado mecanismos de control que aseguran la homeostasis de proteínas. Estos mecanismos pueden resumirse en dos respuestas distintas: reparación de las proteínas dañadas y degradación de aquellas proteínas que no se pueden reparar (Buchberger *et al.*, 2010).

Especial importancia en el plegamiento de proteínas tiene el retículo endoplasmático, ya que este orgánulo es el encargado del plegamiento y transporte de las proteínas de la ruta secretora y de las proteínas de membrana, que representan alrededor de un tercio del total de las proteínas de la célula eucariota (Vembar & Bodsky, 2008). Por esta razón, el retículo endoplasmático contiene multitud de chaperonas que participan en el plegamiento y en la degradación, así como enzimas exclusivas de este orgánulo cuya finalidad es mantener el ambiente oxidante dentro del retículo, necesario para catalizar modificaciones post-traduccionales características de las proteínas de membrana y de la

Capítulo I

ruta secretora, como glicosilación y formación de puentes disulfuro.

1.5.1 El retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático es un orgánulo con múltiples funciones, presente en todas las células eucariotas, donde ocupa más del 10% del volumen total de la célula (Voeltz, Rolls, & Rapoport, 2002). Juega un papel fundamental en múltiples procesos celulares necesarios para la supervivencia y el funcionamiento normal de la célula.

Este orgánulo está organizado como una compleja red de membranas formada por ramificaciones de tubos y estructuras con forma de sacos aplanados que se extienden a través del citosol (Figura 1.3). El retículo endoplasmático y la membrana nuclear forman una envoltura continua de manera que el lumen del retículo queda contenido dentro del espacio delimitado por ambos (Voeltz *et al.*, 2002).

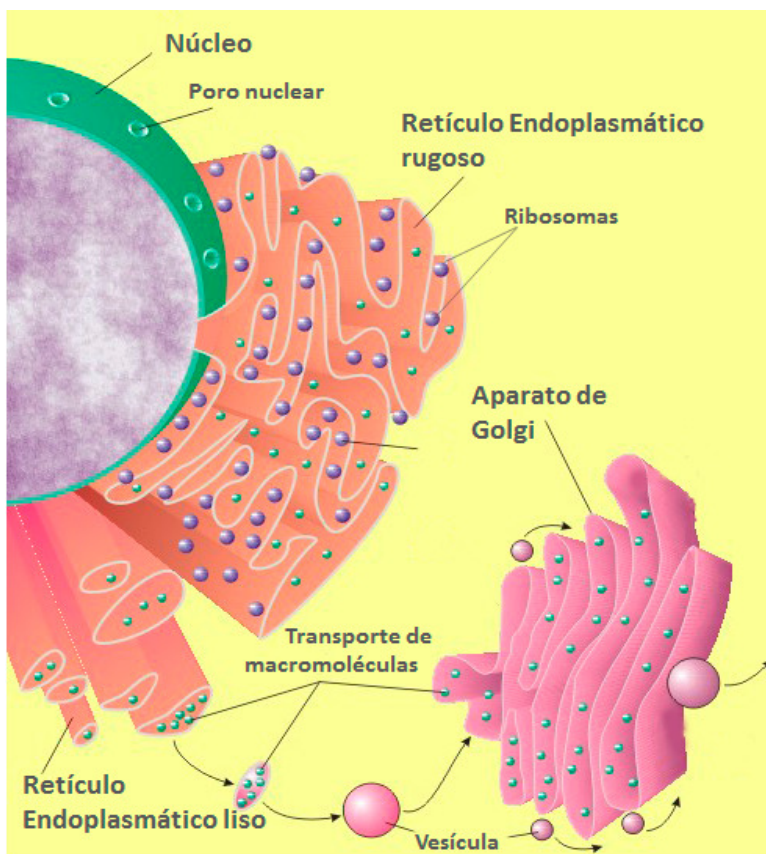


Figura 1.3. El retículo endoplasmático. En esta figura se representa esquemáticamente la disposición del núcleo de la célula, del retículo endoplasmático rugoso (cubierto de ribosomas) y del retículo endoplasmático liso. Por su parte, el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático intercambian macromoléculas gracias al transporte vesicular entre ambos.

Entre las funciones más importantes del retículo endoplasmático se encuentran el plegamiento y el transporte de proteínas de la ruta secretora, la biosíntesis de lípidos y el almacenamiento de calcio intracelular (Fagone & Jackowski, 2009; Ma & Hendershot, 2001; MacLennan, Rice, & Green, 1997). Para poder llevar a cabo todas estas funciones, el lumen

del retículo endoplasmático constituye un entorno único dentro de la célula. Por ejemplo, es aquí donde se encuentran las concentraciones más altas de calcio gracias al transporte activo de ATPasas de Ca^{2+} . Además, dado su papel en el transporte y plegamiento de proteínas, existen una gran cantidad de chaperonas dependientes de calcio como GRP78 (*glucose-regulated protein, 78 kDa*), GRP94 y calreticulina, que ayudan a la estabilización de los intermediarios proteicos que surgen durante el plegamiento (Kim, Xu, & Reed, 2008). Por otro lado, las proteínas de la ruta secretora suelen contener enlaces disulfuro. La formación de estos enlaces es llevada a cabo por proteínas disulfuro isomerasas (PDI) para lo cual es necesario un ambiente oxidante en el lumen reticular (Sevier *et al.*, 2007). Otras modificaciones post-traduccionales, como glicosilaciones, también ocurren en el retículo endoplasmático.

Sin embargo, el retículo endoplasmático es también un orgánulo implicado en señalización ya que es capaz de liberar el Ca^{2+} almacenado en respuesta a determinados estímulos, pudiendo influir en multitud de procesos celulares (Clapham, 2007).

Morfológica y estructuralmente el retículo endoplasmático se puede dividir en retículo endoplasmático rugoso y retículo endoplasmático liso. El retículo endoplasmático rugoso tiene por lo general una apariencia tubular mientras que el liso suele tener una forma más enrevesada. Además, el retículo endoplasmático rugoso presenta una textura granular debido a que en su cara citoplasmática se encuentran unidos ribosomas. Por tanto, la función principal del retículo endoplasmático rugoso será la de la síntesis de proteínas, mientras que el retículo endoplasmático liso se encargará fundamentalmente de la síntesis de lípidos y del almacenamiento de calcio. Así, la abundancia relativa de cada uno vendrá determinada por las funciones del tipo celular en cuestión (Voeltz *et al.*, 2002).

Cabe también destacar que el retículo endoplasmático es una estructura muy dinámica que está íntimamente relacionada con todos los demás orgánulos de la célula, debido a la necesidad que éstos tienen de los lípidos que son sintetizados en el retículo y también a la señalización dependiente de calcio. Especialmente importante es la relación con la mitocondria, con la cual está físicamente conectado por medio de un subcompartimento especializado llamado membrana asociada a la mitocondria (MAM) (Vance, 1990). Esta estructura permite la comunicación bidireccional de ambos orgánulos controlando el flujo de metabolitos, de calcio intracelular, el transporte de proteínas, procesos de señalización y apoptosis (Hayashi & Su, 2007; Szabadkai *et al.*, 2006). Muy importante es también la interacción entre retículo y aparato de Golgi, muy próximos

Capítulo I

físicamente, a través de vesículas, que permiten el transporte y las posteriores modificaciones bioquímicas en el Golgi de lípidos y proteínas.

1.5.1.1 Estrés del retículo endoplasmático y la respuesta a proteínas mal plegadas

Para asegurar el correcto plegamiento y ensamblaje de todas las proteínas que salen del retículo endoplasmático, la célula ha desarrollado mecanismos de control específicos en este orgánulo.

El retículo endoplasmático es capaz de detectar y transmitir señales que se originen en cualquiera de los otros orgánulos de la célula. Gran variedad de factores pueden afectar la homeostasis del retículo y, por tanto, los procesos de plegado de proteínas, lo que desembocará en la acumulación de proteínas mal plegadas y estrés del retículo. Entre estos factores se encuentran: alteraciones en la regulación redox de la célula causadas por hipoxia o agentes reductores y oxidantes que pueden interferir con la formación de puentes disulfuro (Frand, Cuozzo, & Kaiser, 2000); privación de glucosa, probablemente, al influir en los procesos de glicosilación; alteraciones en la regulación de calcio del retículo, dada la naturaleza dependiente de calcio de muchas chaperonas (Ma & Hendershot, 2004); e infecciones por virus, debido al aumento de proteínas en el retículo como consecuencia de la síntesis de proteínas víricas (He, 2006). A parte, como vimos anteriormente, fallos en el proceso natural de transcripción y traducción así como mutaciones pueden dar lugar a estrés del retículo.

Cabe destacar también que el estrés del retículo endoplasmático ha sido ampliamente relacionado con enfermedades neurodegenerativas (Lindholm, Wootz, & Korhonen, 2006; Hiderou Yoshida, 2007). Múltiples mecanismos parecen llevar a estrés del retículo durante estos procesos patológicos. Se ha descrito, por ejemplo, que los agregados proteicos característicos de estas enfermedades pueden interferir con el proteosoma, que inútilmente intenta degradarlos, de forma que se favorece la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo. Sin embargo, mecanismos más complicados pueden contribuir a la patogénesis. Algunos estudios indican que estos agregados proteicos son capaces de retener a componentes de las rutas de degradación de proteínas mal plegadas o del transporte vesicular, impidiendo estos procesos e induciendo estrés en el retículo (Cooper *et al.*, 2006; Duennwald & Lindquist, 2008). Otros sin embargo apuntan a la bajada en la actividad de determinadas chaperonas implicadas en el plegamiento de proteínas, en concreto, las PDI, como consecuencia del estrés oxidativo provocado durante los procesos

neurodegenerativos (Uehara *et al.*, 2006).

Con el fin de mitigar este estrés en el retículo endoplasmático, la célula ha desarrollado una respuesta coordinada conservada a lo largo de la evolución denominada respuesta a proteínas mal plegadas ó UPR (del inglés, *unfolded protein response*) (Ron & Walter, 2007). Los primeros indicios de la existencia de este proceso de señalización intracelular vinieron de la observación de la activación selectiva de genes que codifican chaperonas residentes del retículo, al realizar manipulaciones farmacológicas y genéticas que llevan a un incremento de la carga de proteínas mal plegadas en el retículo (Kozutsumi, Segal, Normington, Gething, & Sambrook, 1988).

Los principios de la UPR están actualmente bastante bien definidos. Un desequilibrio entre la carga de proteínas no plegadas que entran en el retículo y la capacidad de la maquinaria celular encargada de disminuir esta carga, dan lugar, a nivel celular, a la puesta en marcha de tres clases de respuestas protectoras: primero, se produce una reducción en la carga de proteínas que entran en el retículo, mediante la disminución de la síntesis de proteínas y su translocación dentro del mismo. Segundo, se produce un aumento de la capacidad para reducir la carga de proteínas mal plegadas del retículo, por medio de la activación transcripcional de genes involucrados en el plegado y degradación de proteínas. Finalmente, si la homeostasis proteica no puede restablecerse, se activa un tercer mecanismo de muerte celular mediante apoptosis (Ron & Walter, 2007).

Las señales de estrés en el retículo endoplasmático son llevadas a través de la membrana del retículo hasta el citosol por medio de tres transductores distintos. Cada uno de ellos define una rama de señalización distinta de la UPR. Estos transductores son: IRE1 (del inglés *inositol-requiring protein-1*), ATF6 (*activating transcription factor-6*) y PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*). Todos ellos son proteínas de membrana cuya parte no integrada expuesta al lumen del retículo es capaz de detectar el nivel de estrés de este orgánulo y transmitir la información a través de la membrana (Ron & Walter, 2007).

Estos tres sensores son mantenidos en un estado inactivo cuando se encuentran unidos a la chaperona GRP78, más conocida como BiP (del inglés, *immunoglobulin binding protein*). BiP es un miembro de la familia de proteínas de estrés térmico 70 (Hsp70, del inglés *heat shock protein 70*) capaz de unirse de forma transitoria a proteínas que se están translocando al retículo y, más permanentemente, a proteínas mal plegadas. Las fracciones

Capítulo I

N-terminales de los tres sensores transmembranales del retículo se encuentran adheridas a BiP en el lumen del mismo, lo cual previene su agregación. Cuando en el retículo endoplasmático se acumulan proteínas mal plegadas, BiP libera estas proteínas de señalización para asistir como chaperona en el plegamiento de las proteínas mal plegadas, permitiendo así la oligomerización de los transductores y, de esta manera, la activación de la UPR (Kim *et al.*, 2008). También se ha propuesto la unión directa de proteínas mal plegadas en el lumen del retículo a los distintos sensores como un mecanismo alternativo de la activación de estas proteínas de señalización (Credle, Finer-Moore, Papa, Stroud, & Walter, 2005).

De forma conjunta, la activación de estos sensores conduce a una serie de eventos de transducción de señales que llevan al aumento de la expresión de determinadas chaperonas del retículo, a la inhibición de la entrada de proteínas en el retículo impidiendo la traducción del ARNm y a la aceleración de los procesos de exportación retrógrada de proteínas desde el retículo al citosol para su posterior ubiquitinación y degradación en el proteosoma (Figura 1.4).

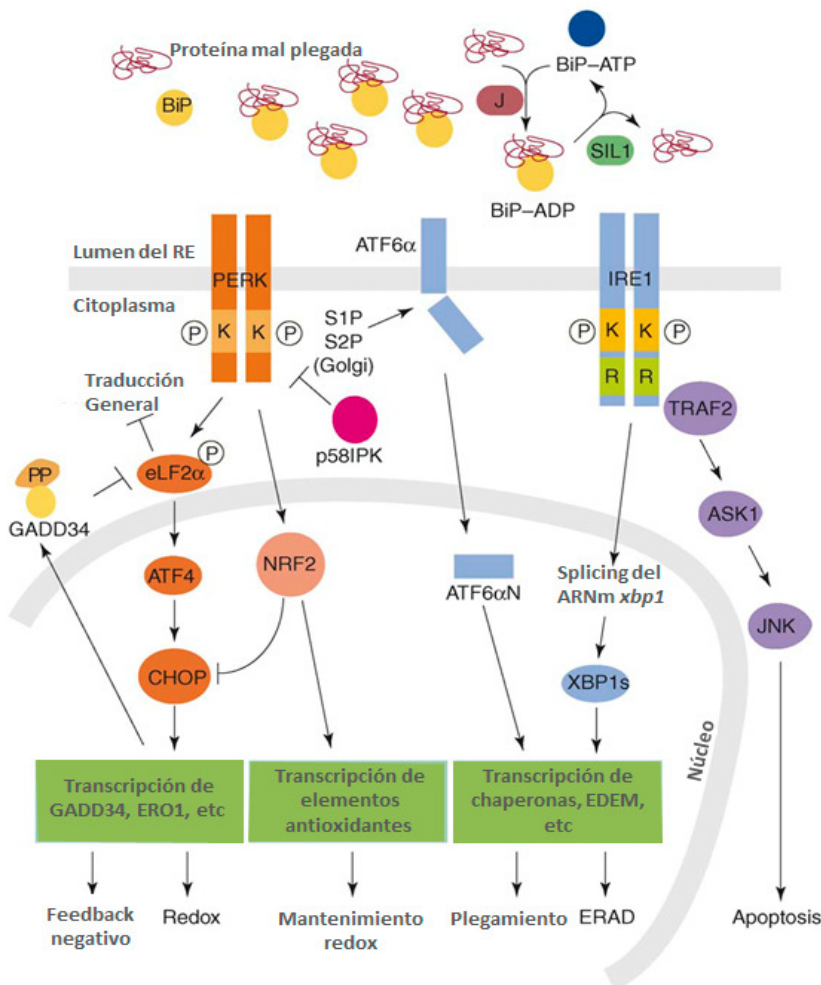


Figura 1.4. La respuesta de estrés a proteínas mal plegadas (UPR). Esquema del funcionamiento de la UPR, donde se muestran los tres receptores de la membrana del retículo implicados en su activación, IRE1, PERK y ATF6, y la posterior cascada de señalización disparada por los mismos, encaminada a mitigar el estrés causado en el retículo por la acumulación de proteínas mal plegadas. Ver en el texto principal la descripción de los componentes de las tres rutas.

Modificada de Zhao, L y Ackerman, SL. 2006.

A continuación, veremos de forma más detallada como funciona cada una de las ramas de la UPR:

– **IRE1:** Es una proteína transmembrana tipo I de aproximadamente 100 kDa que cuenta con actividad quinasa de serina/treonina y también endorribonucleasa. Cuando se produce estrés en el retículo endoplasmático, IRE1 oligomeriza en el plano de la membrana, permitiendo la trans-autofosforilación de los dominios quinasas yuxtapuestos. Cabe destacar que el único sustrato conocido del dominio quinasa de IRE1 es él mismo. La fosforilación de IRE1 produce un cambio alostérico de la proteína que deja expuesto el dominio endorribonucleasa. Esto permite el procesamiento endonucleolítico y escisión de un intrón intermedio del ARNm del factor de transcripción XBP1 (del inglés, *X-box binding protein-1*) en metazoos (H Yoshida, Matsui, Yamamoto, Okada, & Mori, 2001). El ARNm resultante del *splicing* codifica un factor de transcripción capaz de unirse al promotor de genes involucrados en la maduración y el plegamiento de proteínas, así como de genes relacionados con la salida del retículo y degradación en el citoplasma de proteínas no nativas.

Igualmente, el propio IRE1 es capaz de degradar por medio de su dominio endorribonucleasa muchos ARNm, ayudando de esta forma a reducir directamente la carga proteica en el retículo (Hollien & Weissman, 2006).

– **PERK:** Es una proteína transmembrana tipo I con actividad Ser/Thr quinasa. Cuando BiP detecta el mal plegamiento de proteínas en el retículo y libera PERK, se produce la oligomerización del receptor, lo que induce su trans-autofosforilación en el residuo Thr981, en el caso de humanos. Este proceso le confiere a PERK actividad catalítica completa, permitiéndole entonces fosforilar a la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eucariota-2 (eIF2 α) en el residuo Ser51. Esta fosforilación produce la inactivación de eIF2 α resultando en una disminución de la traducción de ARNm y, por tanto, de la síntesis de nuevas proteínas (Harding, Zhang, & Ron, 1999).

Sin embargo, hay que señalar que algunos ARNm, incluyendo el ARNm del factor de transcripción ATF4, son traducidos de manera más eficiente en condiciones en las que eIF2 α está fosforilado (Vattem & Wek, 2004). ATF4 regula la transcripción de diversos genes implicados en la UPR, entre los que se encuentran BiP y GRP94.

– **ATF6:** Es una proteína de 90 kDa que posee un mecanismo de

Capítulo I

activación muy particular. Una secuencia hidrofóbica se ocupa del anclaje de esta proteína a la membrana del retículo endoplasmático en su forma inactiva. En condiciones de estrés, BiP libera ATF6 que es transportada al aparato de Golgi donde es cortada por dos proteasas distintas, S1P y S2P (del inglés, *site 1* y *site 2 protease*). Como resultado de este proceso proteolítico, se libera al citosol el factor de transcripción ATF6-N (fracción N-terminal de ATF6), que podrá entonces entrar en el núcleo para regular la expresión de genes de respuesta a estrés del retículo (J. Ye *et al.*, 2000). Algunas proteínas inducidas por ATF6 incluyen BiP, XBP-1 y proteínas disulfuro isomerasas.

Teniendo en cuenta el alto potencial tóxico de las proteínas mal plegadas o sin plegar que se acumulan en el retículo endoplasmático estresado, no es de extrañar que un retículo sobrecargado y estresado durante un período de tiempo suficientemente largo desemboque en muerte celular. De esta forma, se ha descrito que en metazoos, un estrés excesivo y prolongado provoca apoptosis (Szegezdi, Logue, Gorman, & Samali, 2006).

Los mecanismos por los cuales el estrés en el retículo deriva en muerte celular no se conocen exactamente hoy en día, pero sin embargo, sí se sabe que CHOP (*C/EBP homologous protein*), diferentes miembros de la familia de proteínas Bcl-2 como Bak/Bax, caspasa-12 y JNK (*c-jun NH₂ terminal* kinase) son algunos de los actores implicados en este proceso de apoptosis (Wu & Kaufman, 2006).

CHOP es un factor de transcripción inducido por la ruta de PERK y que, en caso de estrés prolongado, inhibe la expresión de proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas e induce la oxidasa Ero1 α , que lleva a daño oxidativo del retículo. Igualmente, la oligomerización sostenida de IRE1 provoca la activación de la quinasa reguladora de la señal de apoptosis ASK1 y de su diana JNK, que activa la proteína pro-apoptótica BIM e inhibe las Bcl-2 anti-apoptóticas. Además, la actividad endonucleolítica continuada de IRE1 llevaría a una reducción de ARNm y, con el tiempo, a una disminución de la capacidad para el plegamiento de proteínas del retículo (Shore, Papa, & Oakes, 2011). La liberación de calcio del retículo gracias a proteínas Bcl-2, como Bax/Bak, que pueden residir en la membrana del mismo parecen estar detrás de la iniciación de la apoptosis por estrés del retículo.

También parece estar claro el papel de la mitocondria en la apoptosis inducida por estrés del retículo. El mecanismo preciso no se conoce exactamente pero parece haber implicación de proteínas BH3-only que activarían a las proteínas Bax/Bak, las cuales permitirían la permeabilización de la mitocondria. Esto daría lugar a la liberación al citosol

de ciertas proteínas tóxicas como citocromo c que, en última instancia, activarían caspasas efectoras (Boya, Cohen, Zamzami, Vieira, & Kroemer, 2002; Häcki *et al.*, 2000).

1.5.1.2 Plegamiento oxidativo

La formación de puentes disulfuro intramoleculares es un proceso crítico en el plegamiento de proteínas de la ruta secretora y de membrana. Estos enlaces no sólo les confieren estabilidad en el complicado entorno extracelular sino que también permiten llevar a cabo determinadas funciones a las proteínas. La mayoría de los enlaces disulfuro formados en la célula se producen como consecuencia de reacciones de intercambio tiol-disulfuro, donde dos electrones de un par de cisteínas reducidas son transferidos a un enlace disulfuro previamente formado. El intercambio provoca la oxidación de las cisteínas reducidas iniciales, que formarán un nuevo puente disulfuro, y la correspondiente reducción del enlace disulfuro que existía previamente (Tavender & Bulleid, 2010).

En la célula eucariota, el plegamiento oxidativo tiene lugar en el lumen del retículo endoplasmático y es mediado por las enzimas PDI (Frand & Kaiser, 1999). Esta familia de proteínas se caracteriza por su localización en el retículo endoplasmático y la presencia de al menos un dominio con estructura tipo tioredoxina, CXXC (Hawkins & Freedman, 1991). Los residuos de cisteína activos, al igual que en las tioredoxinas, serán los encargados de permitir la oxidación, reducción o isomerización de enlaces disulfuro cambiando constantemente entre el estado tiol y disulfuro (Creighton, Hillson, & Freedman, 1980).

Las PDI, para poder introducir puentes disulfuro, han de ser mantenidas en un estado oxidado. Esta función será llevada a cabo por Ero1 (del inglés, *Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin 1*) que, de forma parecida a las PDI, tiene sitios activos con un par de residuos de cisteína capaces de alternar entre el estado tiol reducido y el disulfuro (Frand & Kaiser, 1999). Sin embargo, Ero1 contiene también un dominio FAD al cual puede transferir electrones para mantener su sitio activo oxidado.

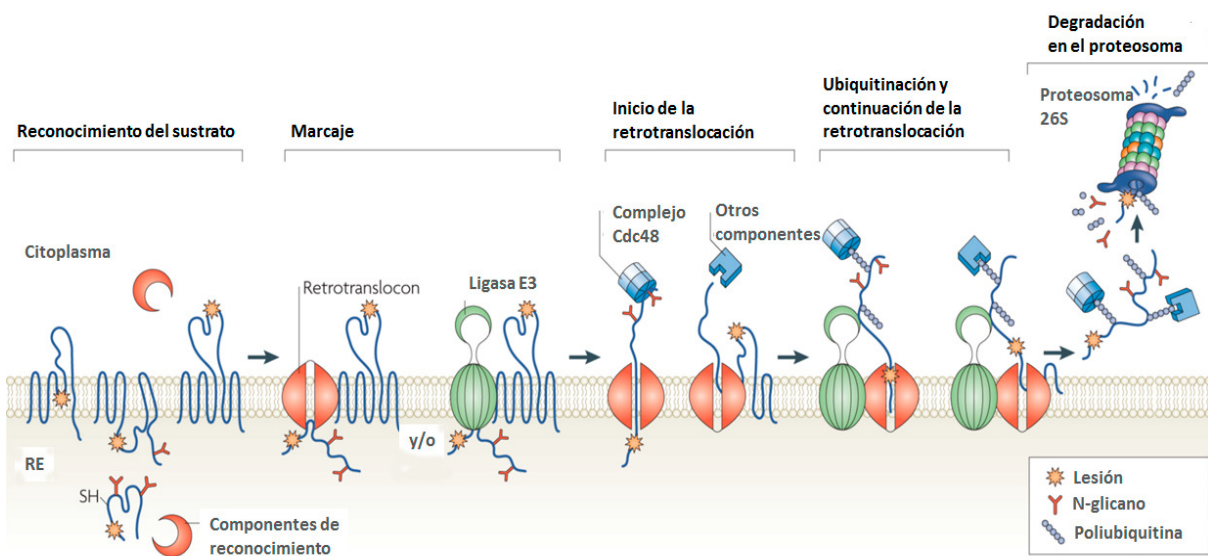
Para la formación de puentes disulfuro será muy importante, por tanto, mantener un ambiente oxidante dentro del retículo endoplasmático. A ello contribuyen tanto los niveles de Ero1 como de glutatión, que de manera natural se regulan para adaptarse a cambios en el estado redox del retículo (Sevier *et al.*, 2007). Así, las reacciones catalizadas por Ero1 suponen una pérdida neta de equivalentes reductores y, por tanto, una oxidación del retículo, ya que, para devolver a Ero1 a su forma oxidada activa, los electrones son transferidos en última instancia a oxígeno molecular para formar agua.

Capítulo I

Es importante señalar aquí que el plegamiento oxidativo y las PDI han sido previamente asociados a enfermedades neurodegenerativas. Se ha comprobado, por ejemplo, que los niveles de PDI se encuentran aumentados en pacientes de Parkinson (Conn *et al.*, 2004) y que algunas cisteínas de las PDI en pacientes de enfermedades neurodegenerativas se encuentran nitrosiladas, lo cual afectaría su función (Uehara *et al.*, 2006).

1.5.1.3 Degradación asociada al retículo endoplasmático (ERAD)

Aquellas proteínas que finalmente no pueden ser plegadas a su forma nativa serán eliminadas por medio de un proceso denominado degradación asociada al retículo endoplasmático o ERAD (del inglés, *Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*). Durante este proceso, las proteínas mal plegadas serán exportadas fuera del retículo hacia el citoplasma para ser posteriormente destruidas por el sistema de ubiquitinación-proteosoma. Como se muestra en la Figura 1.5, varios pasos comprenden esta ruta de degradación: reconocimiento del sustrato, marcaje, retrotranslocación, ubiquitinación y degradación en el proteosoma (Vembar & Bodsky, 2008).



Modificada de Vembar, SS y Bodsky, JL. 2008

Figura 1.5. La ruta de la ERAD. En la imagen se muestra de forma secuencial los distintos pasos de la ruta de la ERAD para la degradación de proteínas mal plegadas del retículo endoplasmático en el proteosoma.

Desde un punto de vista termodinámico, la biogénesis de proteínas es un proceso energéticamente desfavorable y, dado que tanto el plegamiento como la degradación son procesos dependientes de ATP, el balance de energía del plegamiento es menor comparado

con el de la degradación. Igualmente, desde un punto de vista fisiológico, en condiciones de estrés, promover la degradación de proteínas podría ser peligroso ya que se requeriría de la síntesis *de novo* de determinadas proteínas con funciones protectoras (Buchberger *et al.*, 2010). Es por ello que el reconocimiento de las proteínas que serán degradadas por ERAD debe estar sujeto a unos estrictos criterios de selección.

Las proteínas podrán ser seleccionadas mediante el reconocimiento directo de un daño irreparable o mediante mecanismos indirectos basados en el tiempo que una chaperona emplea en intentar plegarlas. Aunque las bases moleculares de este proceso de discriminación no están del todo claras, se conocen muchos de los factores implicados. Así por ejemplo, en la conformación nativa, las zonas hidrofóbicas quedan ocultas en el interior de las proteínas con el fin de mantener el menor estado energético posible (Jahn & Radford, 2005). Sin embargo, estas zonas quedan expuestas en un estado no plegado lo que favorece su agregación. Para minimizar este proceso tóxico para la célula, chaperonas moleculares, como los miembros de la familia Hsp70 (BiP entre ellos), son capaces de unirse a estos motivos hidrofóbicos. Este proceso es dependiente de ATP y requiere de co-chaperonas de la familia Hsp40 y de factores intercambiadores de nucleótidos (Knittler, Dirks, & Haas, 1995; Nishikawa, Fewell, Kato, Brodsky, & Endo, 2001).

La mayoría de la proteínas que se translocan dentro del retículo son modificadas, a la misma vez que son traducidas, por medio de un proceso de N-glicosilación con glucosa₃-manosa₉-N-acetilglucosamina₂ (Glc3Man9GlcNAc₂) (Helenius & Aebi, 2004). Este oligosacárido le confiere estabilidad e hidrofiliidad a la nueva proteína, pero también sirve como una señal plástica de reconocimiento para las lectinas, señal que puede ser modificada por varias glucosidasas y glucosiltransferasas para indicar el destino final de la proteína.

Las glucosidasas I y II eliminan las dos glucosas terminales de la molécula de Glc3Man9GlcNAc₂, lo que permite el reconocimiento por parte de las lectinas calnexina y calreticulina, que ayudan en el plegamiento. Una vez el último residuo de glucosa es eliminado por glucosidasas II, la glicoproteína se separa de estas lectinas y es reconocida como plegada, por lo que será enviada a su destino. Por el contrario, aquellas que no han alcanzado su estado nativo son reconocidas por la enzima UDP-glucosa:glicoprotein glucosiltransferasa, la cual añade una nueva glucosa al glicano Man9GlcNAc₂. Esto hace que la glicoproteína entre en un nuevo ciclo calnexina-calreticulina (Hebert, Foellmer, & Helenius, 1995). Si el plegamiento falla nuevamente, las manosidasas del retículo

Capítulo I

manosidasa I y EDEMs (*ER degradation-enhancing α -mannosidase-like lectins*) recortarán el N-glicano dando lugar a las formas Man8GlcNAc2 y Man7GlcNAc2, respectivamente, dirigiéndolo así a la degradación por ERAD a través de la unión a las lectinas OS-9 y XTP3-B. De esta forma, los pasos de reconocimiento del sustrato y el marcaje son prácticamente indistinguibles dado que, como se ha sugerido recientemente, algunos factores necesarios para el reconocimiento del sustrato forman parte de complejos multiproteicos que están involucrados también en el marcaje (Vembar & Bodsky, 2008).

Una vez separadas del grupo de polipéptidos correctamente plegados, las proteínas mal plegadas tienen que pasar al citosol para ser degradadas en el proteosoma. Lo más probable es que la salida de polipéptidos a través de la membrana del retículo se produzca por medio de un canal, ya que, como varios estudios sugieren, las proteínas transmembrana Derlina-1, -2 y -3, que forman un macrocomplejo con la E3 ubiquitin ligasa asociada a retículo Hrd1, parecen definir un sitio de retrotranslocación en la membrana de este orgánulo (Lilley & Ploegh, 2004; Y. Ye, Shibata, Yun, Ron, & Rapoport, 2004). Es interesante señalar además, que las derlinas poseen cuatro segmentos transmembrana, por lo que podrían actuar como componentes de un canal, y que pueden asociarse tanto con factores luminales –EDEMs por ejemplo- como con componentes citosólicos de la ERAD -como la AAA ATPasa p97-, lo que proporcionaría un enlace físico entre reconocimiento y retrotranslocación. Sin embargo, no todas las proteínas degradadas por ERAD necesitan el complejo Derlina-Hrd1 para su degradación, por lo que seguramente, otros actores puedan entrar también en juego dependiendo del sustrato, como por ejemplo el complejo Sec61, que está implicado en la entrada de proteínas dentro del retículo y podría estar involucrado también en la retrotranslocación de, al menos, algunos sustratos de la ERAD (Pilon, Schekman, & Römisch, 1997).

Al mismo tiempo que las proteínas van saliendo del retículo, éstas sufren un proceso de ubiquitinación con una o más moléculas de ubiquitina, que se unirán a residuos de lisina o serina/treonina. Esta ubiquitinación es necesaria para la dislocación de los polipéptidos y para su envío al proteosoma (Hiller, Finger, Schweiger, & Wolf, 1996). La ubiquitinación requiere de la acción de forma secuencial de tres tipos de enzimas distintos, una enzima activadora E1, una enzima conjugadora E2 y una E3 ubiquitin ligasa. Es importante señalar que la cadena de poliubiquitina debe alcanzar una longitud determinada antes de que la proteína pueda ser retrotranslocada (Jarosch *et al.*, 2002).

Aunque el proteosoma es capaz de retrotranslocar los sustratos en algunos casos, p97 en mamíferos y su homólogo Cdc48 en levaduras han sido descritos como los principales actores en este proceso (Rabinovich, Kerem, Fröhlich, Diamant, & Bar-nun, 2002). El principal cofactor de p97 es un dímero formado por Ufd1 y Np14 con el que forma un complejo que contiene varios motivos de unión a ubiquitina. Como ya se ha comentado, el proceso de extracción de proteínas de la membrana del retículo y el de ubiquitinación ocurren, en la mayoría de los casos, de forma simultánea, y así, existen evidencias que indican que el propio p97 tiene afinidad por proteínas mal plegadas a las que enlazaría al asomar por el lugar de translocación. Esto impediría que el sustrato volviera al retículo y favorecería el proceso de ubiquitinación. Una vez las cadenas de ubiquitina han sido conjugadas al sustrato, éstas son reconocidas por los motivos de unión a ubiquitina del complejo, que extraería el polipéptido (Y. Ye, Meyer, & Rapoport, 2003).

Finalmente, diferentes factores de unión a ubiquitina que son capaces de interactuar con la ATPasa Cdc48/p97 y el proteosoma de forma alternada, permiten el paso del sustrato al proteosoma para su posterior degradación (Richly *et al.*, 2005).

1.5.1.3.1 ERdj5, una chaperona de la familia de las tiorredoxinas involucrada en ERAD

Los sustratos de la ruta de la ERAD necesitan ser exportados al citosol preferiblemente en su forma desplegada, debido a las limitaciones de tamaño del canal de retrotranslocación de la membrana del retículo. Frecuentemente, estos sustratos contienen enlaces disulfuro que, por tanto, tendrán que ser reducidos para permitir una retrotranslocación eficiente.

ERdj5 es una proteína residente del retículo endoplasmático con actividad disulfuro reductasa, implicada en la reducción de enlaces disulfuro de proteínas mal plegadas para su degradación por ERAD (Ushioda, Hoseki, Araki, & Jansen, 2008). Su descubrimiento es relativamente reciente, y es un miembro más de la familia de las tiorredoxinas dado que posee varios dominios tiorredoxina con el sitio activo CXXC (Cunnea *et al.*, 2003). Los dos residuos de cisteína de los extremos son residuos activos y serán los implicados en la reducción de los enlaces disulfuro. La secuencia de ERdj5 contiene además un dominio J en su extremo N-terminal que le permite unirse a BiP, siendo la única proteína conocida,

Capítulo I

hasta el momento, que cuenta con dominios J y dominios tiorredoxina en el mismo polipéptido. Además, ERdj5 es capaz de interactuar y formar un complejo molecular con la proteína EDEM1, también involucrada en ERAD (Ushioda *et al.*, 2008).

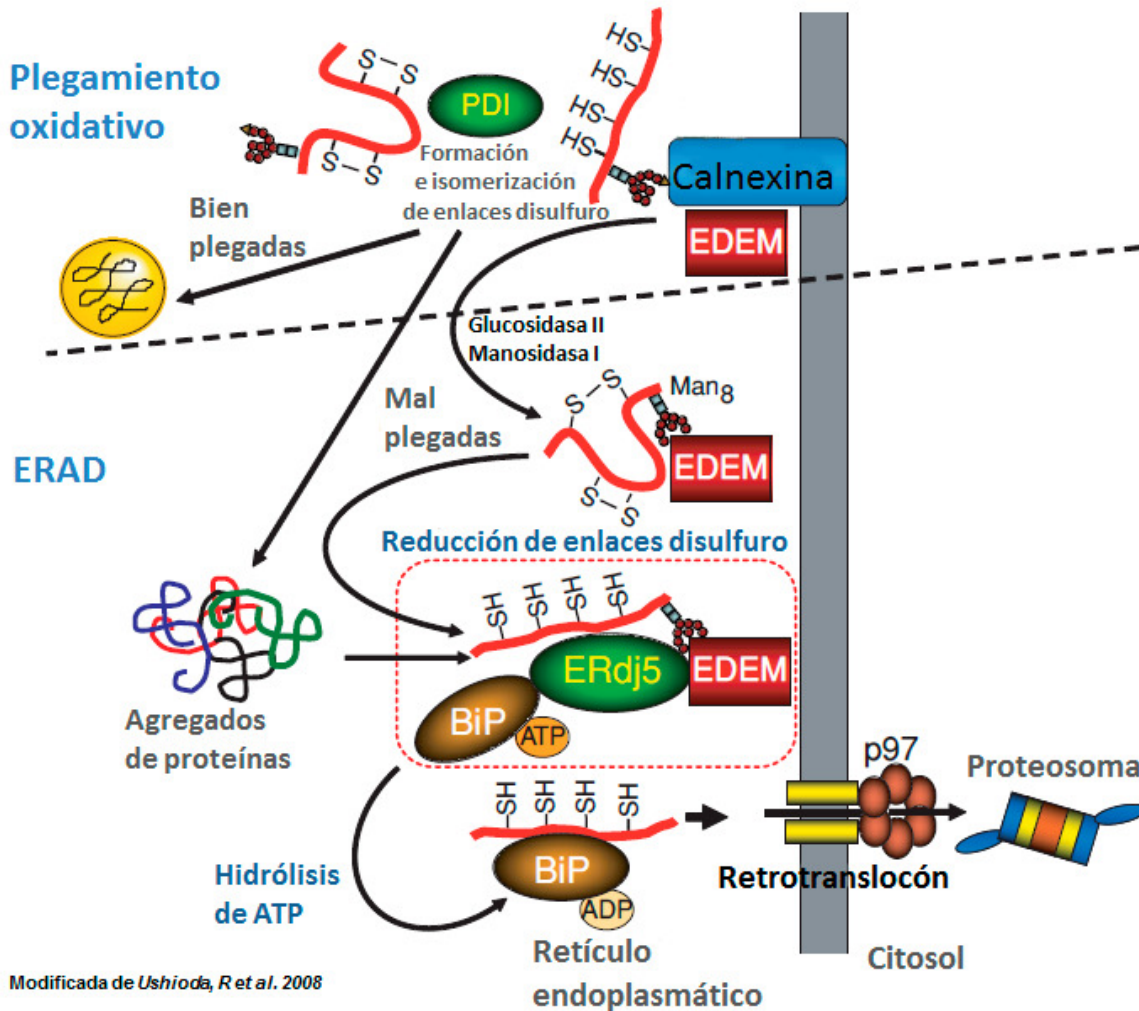


Figura 1.6. Posible mecanismo de acción de ERdj5. Representación esquemática del plegamiento oxidativo de los nuevos polipéptidos y de la ERAD que sufren las proteínas mal plegadas del retículo. Después de sufrir las correspondientes modificaciones con residuos de glucosa y manosa, las proteínas irreversiblemente mal plegadas con N-glicanos Man₈ serán transferidas de la calnexina a EDEM. Presumiblemente, ERdj5 enlazará con EDEM permitiéndose así la reducción de los puentes disulfuro de las proteínas mal plegadas. ERdj5 será capaz entonces de unirse a BiP a través de su dominio J y activar la hidrólisis del ATP de BiP, produciéndose la disociación de ambos. BiP mantendría y llevaría a los sustratos, en su forma reducida, al canal de retrotranslocación.

Aunque inicialmente se predijo que ERdj5 estaba compuesta por cuatro dominios tiorredoxina, la reciente determinación de la estructura tridimensional de ERdj5 de ratón ha revelado la existencia de otros dos dominios con plegamiento tipo tiorredoxina entre el primer y el segundo dominio tiorredoxina (ver Figura 3.2 del capítulo Resultados), que sin

embargo carecen del motivo redox activo CXXC (Hagiwara *et al.*, 2011). Este mismo estudio ha sido capaz de concluir también, usando ERdj5 humano, que los dominios Trx3 y Trx4 situados en la zona C-terminal son los dominios esenciales en la reducción de enlaces disulfuro, al menos con los sustratos utilizados en el estudio. Precisamente es en esta zona C-terminal donde se une EDEM1, lo que parece corroborar que ésta es, probablemente, la parte activa de ERdj5. Los otros dominios tiorredoxina seguramente tengan una función estabilizadora del polipéptido.

El mecanismo que parece estar detrás de la acción de ERdj5 es el que se muestra en la Figura 1.6: los sustratos de la ERAD liberados por calnexina son llevados por EDEM1 a la zona C-terminal de ERdj5. Los puentes disulfuro de las proteínas mal plegadas serán entonces reducidos en esta zona de ERdj5. Finalmente, BiP, que es capaz de unirse al dominio J por medio de un proceso dependiente de ATP, tomará el polipéptido extendido y lo transferirá al canal de retrotranslocación (Hagiwara *et al.*, 2011).

Sin embargo, todavía se desconoce el origen del poder reductor de ERdj5. Un candidato como fuente de equivalentes reductores para ERdj5 podría ser el glutatión presente en el retículo, pero otras posibilidades no pueden ser descartadas, ya que, por ejemplo, ha sido descubierta recientemente una flavoproteína del retículo asociada con degradación (ERFAD) que es capaz de interactuar con ERdj5 (Riemer *et al.*, 2009).

1.6 *C. elegans* como organismo modelo

Caenorhabditis elegans es un nematodo de forma cilíndrica no parasitario que vive en el suelo y que se alimenta principalmente de bacterias. Fue introducido como organismo modelo por primera vez a comienzos de la década de los 60 por Sydney Brenner (Brenner, 1974), ganador del premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2002, por sus estudios en biología del desarrollo, genética y neurobiología. Gracias al gran número de ventajas que este organismo ofrece, entre las que se encuentran su simplicidad anatómica, su pequeño tamaño y su corto ciclo de vida, *C. elegans* se convirtió rápidamente en un sistema modelo muy utilizado.

La longitud del individuo adulto es de alrededor de 1mm y su diámetro de 80 μm . Puede cultivarse en gran número en medio líquido o en placas con agar siendo alimentado

Capítulo I

exclusivamente con *Escherichia coli*, lo que facilita enormemente su manejo en el laboratorio. Además, el genoma de *C. elegans*, el cual comprende unos cien millones de pares de bases, fue el primero de un organismo multicelular en secuenciarse completamente (*C. Elegans* Sequencing Consortium, 1998) y, sorprendentemente, es bastante parecido al humano: se estima que entre el 60-80% de sus genes tienen un homólogo humano. Debido a que su cuerpo es transparente a lo largo de todo su ciclo de vida, puede ser estudiado *in vivo* usando diferentes técnicas microscópicas no disponibles en otros organismos más complejos. Así, es posible seguir los procesos de división y muerte celular en animales vivos usando microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC), lo que ha permitido determinar el linaje celular completo de *C. elegans* (J. E. Sulston, Schierenberg, White, & Thomson, 1983). Además, tejidos y células individuales, como por ejemplo neuronas, pueden ser visualizados por medio de la expresión de una proteína fluorescente, por ejemplo GFP, como por vez primera realizaron el Dr. Martin Chalfie, y sus colegas en 1994 (Chalfie, Tu, Euskirchen, Ward, & Prasher, 1994), estudios por los que fueron galardonados con el premio Nobel de Química en 2008. El uso de GFP y otras proteínas fluorescente tiene otras muchas aplicaciones en *C. elegans* como pueden ser el análisis de patrones de expresión, el reconocimiento de secuencias reguladoras, el estudio de la plasticidad y función neuronal y la visualización de otros procesos fisiológicos y celulares (segregación de cromosomas, ciclo celular, estrés oxidativo, estrés en el retículo endoplasmático, etc.) (Hobert & Loria, 2006).

En condiciones óptimas de alimento y temperatura, el ciclo de vida de *C. elegans* (Figura 1.7) tiene una duración de aproximadamente 3 días e incluye cuatro estadios de larva (L1-L4) y el estadio adulto, y su vida suele extenderse de dos a tres semana una vez llegado a adulto. Si por el contrario las condiciones no son favorables para el desarrollo, en el estadio L1-L2 se activa una ruta de desarrollo alternativa, y la larva L1 pasa a un estadio larvario llamado “dauer”. Estos animales son resistentes a estrés y capaces de sobrevivir durante varios meses en condiciones adversas, como falta de alimento, pudiendo entrar de nuevo en el ciclo normal de vida en el estadio L4 si las condiciones ambientales mejoran en algún momento.

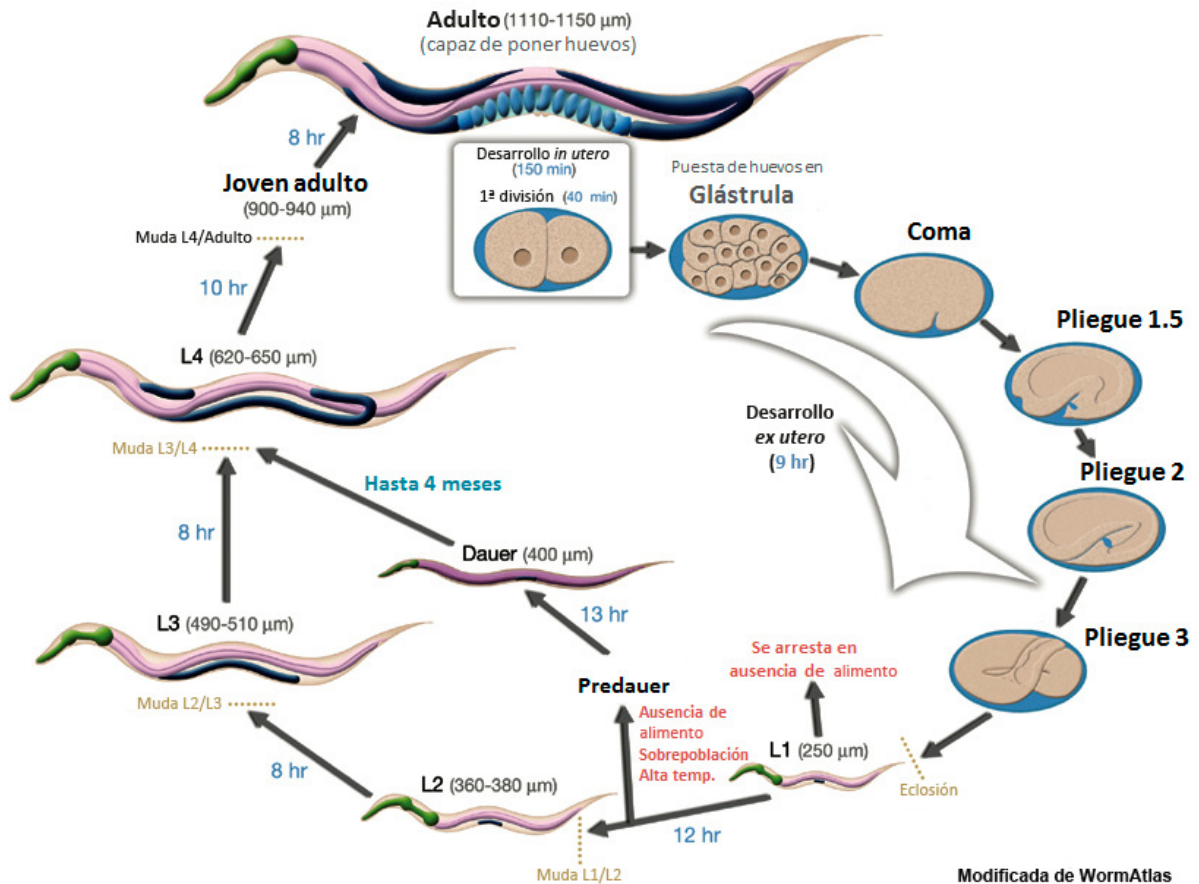


Figura 1.7. Ciclo de vida de *C. elegans*. En esta imagen se muestra el ciclo de vida de *C. elegans* a 22°C. Los números en azul junto a las flechas indican el tiempo que el animal pasa en cada estadio concreto. El tiempo 0 corresponde a la fertilización, produciéndose la primera división a los 40 minutos aproximadamente. Los huevos son expulsados al exterior alrededor de 150 minutos después de la fertilización, en el estado de glástrula. La longitud del animal en cada estadio concreto entre paréntesis se muestra junto al nombre del estadio concreto entre paréntesis.

C. elegans tiene cinco pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales, existiendo dos sexos distintos: hermafrodita (5AA, XX) y macho (5AA, X0), siendo la proporción de estos últimos alrededor del 0.1% de la población total. Esta característica permite el mantenimiento de una progenie genéticamente idéntica a partir de la autofertilización de hermafroditas, o por el contrario, cruces genéticos utilizando machos. Una hermafrodita es capaz de dar una progenie de entre 300 a 350 individuos.

C. elegans presenta un linaje celular invariable, que en el caso del hermafrodita adulto es de 959 células somáticas y de 1031 en el macho. Sorprendentemente, un tercio del total de células, 302 en concreto para el hermafrodita, son neuronas, cuyas sinapsis y conectividades han sido mapeadas al completo, haciendo de este nematodo un organismo modelo muy interesante para estudios relacionados con aspectos moleculares y funcionales del sistema nervioso (White, Southgate, Thomson, & Brenner, 1986).

Capítulo I

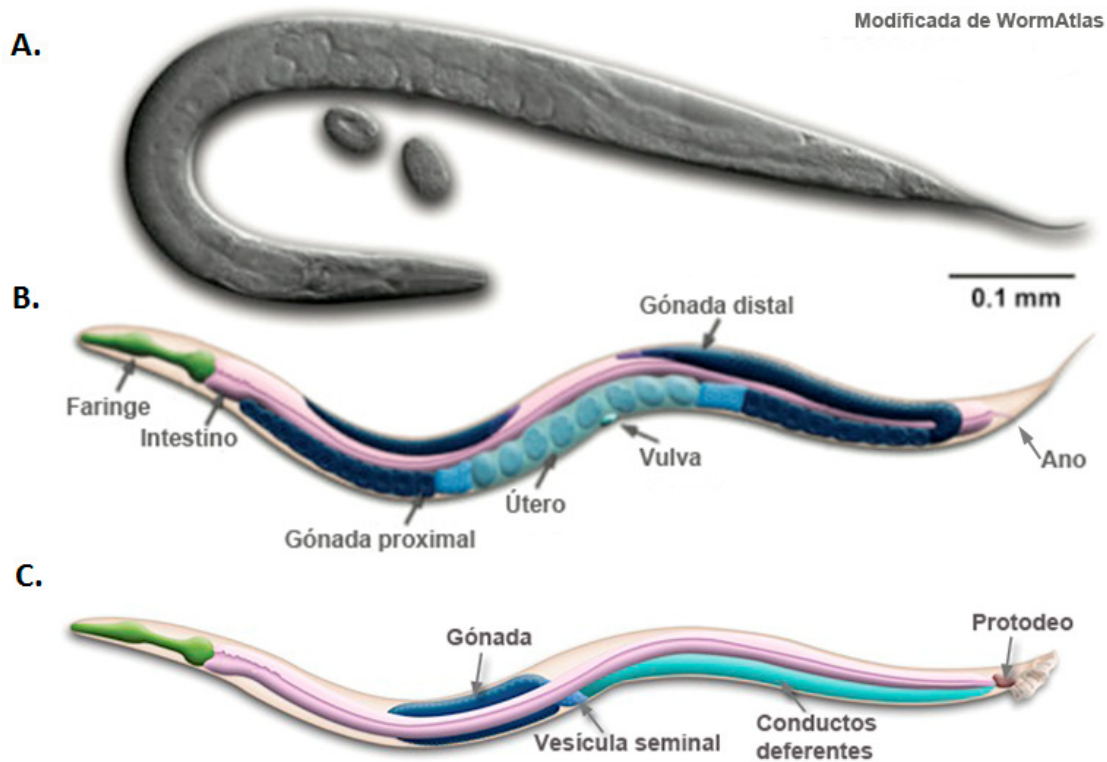


Figura 1.8. Anatomía de un hermafrodita y un macho adulto de *C. elegans*. A) Imagen DIC de un hermafrodita adulto. B) Representación esquemática de las estructuras anatómicas más importantes de un nematodo hermafrodita. C) Representación esquemática de las estructuras anatómicas más importantes de un nematodo macho. Para todos los casos se representa el lado lateral izquierdo.

Es importante resaltar que una información detallada y exhaustiva relativa a la estructura de los genes, patrones de expresión, interacciones proteicas, fenotipos de los mutantes y ARN de interferencia (ARNi) está disponible online. La manipulación genética del animal se puede realizar de manera muy sencilla por medio de microinyección, bombardeo genético o ARNi. La técnica de ARNi utilizando ARN de doble cadena fue descrita por primera vez por los Dr. Andrew Fire y Craig Mello (Fire *et al.*, 1998), descubrimiento por el cual fueron galardonados con el premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2006. En la actualidad, es especialmente simple de utilizar, ya que basta con alimentar a los nematodos con la bacteria que produce el correspondiente ARN de doble cadena para obtener un efecto estable y robusto en la mayoría de los casos (Timmons, Court, & Fire, 2001).

Las obvias ventajas que ofrece *C. elegans*, junto con la alta homología encontrada entre su genoma y el de humanos, y el hecho de que las principales rutas de señalización de ambos están sorprendentemente conservadas, se han plasmado en la generación de estirpes transgénicas que recapitulan muchas enfermedades que afectan a humanos, entre ellas las enfermedades neurodegenerativas más importantes. Se estima que alrededor del

42% de los genes asociados a enfermedades humanas tienen un ortólogo en *C. elegans*, incluyendo genes relacionados con la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad del riñón poliquístico y cáncer de colon hereditario, entre otras (Markaki & Tavernarakis, 2010). El estudio de muchos de estos genes en *C. elegans* ha contribuido enormemente en el avance del entendimiento de la regulación de las rutas implicadas en estas enfermedades.

1.6.1 *C. elegans* como modelo de enfermedades neurodegenerativas

A lo largo de los años se han desarrollado multitud de modelos con el propósito de facilitar el estudio de los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a las enfermedades neurodegenerativas, y de disponer de herramientas donde poder evaluar los resultados obtenidos previamente por medio de análisis genéticos humanos.

Así, por ejemplo, en la actualidad se utilizan una gran variedad de líneas celulares humanas neuronales y no neuronales para el análisis de determinados aspectos relacionados con estos desórdenes, y para testar la eficacia de nuevos tratamientos terapéuticos. Sin lugar a dudas, estos ensayos son de gran utilidad en el estudio de los mecanismos moleculares específicos asociados, pero sin embargo, con el uso de células de cultivo no se pueden reproducir las complejas interacciones que surgen entre los distintos tipos celulares, que sólo se pueden conseguir usando organismos completos.

Por esta razón, los investigadores han recurrido a numerosos modelos animales, asumiendo el hecho de que los mecanismos patológicos fundamentales detrás de la enfermedad humana están también presentes en estos modelos. En línea con esta idea, existe una alta correlación entre los síntomas ligados a estas patologías y la reducción de las capacidades cognitivas de los animales utilizados en modelos de mamíferos (Götz *et al.*, 2004; Meredith, Sonsalla, & Chesselet, 2008). No obstante, aunque los modelos en mamíferos han dado lugar a grandes avances en el conocimiento de determinados aspectos de estas enfermedades, la complejidad de su cerebro así como las limitaciones experimentales derivadas de su uso, entre las que se encuentran el elevado coste económico y temporal asociado a la generación de transgénicos en mamíferos, suponen un obstáculo importante en el análisis de muchos de los factores que participan en las enfermedades neurodegenerativas *in vivo*.

Teniendo en cuenta todos estos motivos y el hecho de que muchos de los genes ligados a enfermedades humanas funcionan en rutas evolutivamente conservadas, que

Capítulo I

pueden ser fácilmente estudiadas en organismos modelos simples, el frente de batalla de este esfuerzo se empieza a derivar hacia el uso de invertebrados modelo.

La utilidad de *C. elegans* como modelo de enfermedades neurodegenerativas queda patente por el hecho de que numerosas rutas implicadas en estas patologías han sido identificadas gracias al estudio con este nematodo. Así por ejemplo, la investigación con *C. elegans* ha permitido determinar la participación de la ruta de la insulina/IGF-1 en la toxicidad asociada a poliQ o a A β (Cohen, Bieschke, Perciavalle, Kelly, & Dillin, 2006; Hsu, Murphy, & Kenyon, 2003), resultados que han podido ser confirmados posteriormente en mamíferos (Cohen *et al.*, 2009). Igualmente, el trabajo con modelos de Parkinson en *C. elegans* ha contribuido a desentrañar como la α -syn es capaz de bloquear el tráfico vesicular entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, uno de los mecanismos celulares implicados en la toxicidad de este péptido (Cooper *et al.*, 2006).

1.6.1.1. Modelos de Alzheimer

Varias estirpes transgénicas que recapitulan muchas de las características asociadas a esta enfermedad han sido desarrolladas en *C. elegans*. En la mayoría de estos modelos, la proteína humana A β se sobreexpresa de forma constitutiva o inducible en células musculares o en neuronas (C. Link, 2003; C. D. Link, 1995; Treusch *et al.*, 2011). En humanos, el péptido A β se genera a partir del procesamiento de APP, que ocurre durante la ruta secretora. Así, el A β se libera secuencialmente a la red del trans-Golgi, a endosomas y, de aquí, al espacio extracelular. En este momento, el péptido A β será capaz de interaccionar con la membrana plasmática para sufrir endocitosis y, nuevamente, transporte vesicular dentro de la célula (Thinakaran & Koo, 2008). *C. elegans* carece de un homólogo de la β -secretasa, por lo que es imposible imitar el procesamiento de APP en el nematodo. Con el fin de reproducir el tráfico entre múltiples compartimentos de la célula en los modelos de Alzheimer en *C. elegans*, el péptido A β lleva fusionado una señal diana en su extremo N-terminal que lo envía al retículo endoplasmático, de forma que después de entrar en el retículo y eliminar esta secuencia, el A β circulará a través de la ruta secretora, debido a que no lleva una secuencia de retención en el mismo. Sin embargo, en estos modelos, aunque el péptido A β es enviado a la ruta secretora como demuestra el hecho de que el péptido señal es eliminado de forma adecuada (C. D. Link, 1995), no se produce su salida al espacio extracelular (o es reabsorbido de forma muy eficiente), acumulándose principalmente en el citoplasma, probablemente debido a que el péptido es reconocido como una proteína aberrante y se evita su secreción al espacio extracelular (C. D. Link *et al.*, 2001).

De esta forma, la sobreexpresión de A β en células musculares del nematodo provoca la agregación de la proteína y la formación de cuerpos amiloideos en el citoplasma celular y un fenotipo de parálisis progresiva, características que se relacionan con la aparición de placas seniles en los cerebros afectados y deficiencias motoras en personas que manifiestan la enfermedad. La expresión del péptido A β se dirige de forma específica a células musculares mediante el uso de los promotores de los genes *unc-54* y *myo-3*, que codifican para cadenas pesadas de miosina (Miller, Stockdale, & Karn, 1986). Recientemente han sido descritas varias estirpes que sobreexpresan A β específicamente en neuronas glutamatérgicas de *C. elegans* lo que desencadena la degeneración de las mismas, así como defectos en el comportamiento del nematodo (Dosanjh, Brown, Rao, Link, & Luo, 2010; Treusch *et al.*, 2011).

Existe otro modelo de Alzheimer en *C. elegans*, generado mediante la sobreexpresión de la proteína tau humana de forma pan-neuronal, que también presenta un fenotipo de neurodegeneración y deficiencias motoras como consecuencia de la acumulación de la forma hiperfosforilada de la proteína (Kraemer *et al.*, 2003).

1.6.1.2 Modelos de Parkinson

Las rutas implicadas en el procesamiento, empaquetado y transporte de dopamina se han conservado durante la evolución, lo que sugiere que *C. elegans* podría ser un modelo válido para los estudios relacionados con la degeneración de neuronas dopaminérgicas. Siguiendo una estrategia similar a la desarrollada para los modelos de Alzheimer, se han caracterizado estirpes transgénicas de *C. elegans* que sobreexpresan tanto las formas silvestres como mutadas de α -syn en células musculares y en neuronas dopaminérgicas (Hamamichi *et al.*, 2008; Karpinar *et al.*, 2009; van Ham *et al.*, 2008).

Aunque detectar la agregación de α -syn en neuronas es complicado, la expresión de α -syn fusionada a GFP en células musculares, bajo el control del promotor de *unc-54*, permite el fácil seguimiento de la formación de agregados de α -syn::GFP en el citoplasma de las células. Por otro lado, la sobreexpresión de α -syn humana en las neuronas dopaminérgicas del nematodo conduce a la degeneración de estas neuronas, por lo que, al igual que los modelos de Alzheimer, estos animales transgénicos recapitulan muchas de las características observadas en humanos. *C. elegans*, además, presenta la ventaja de poseer tan sólo 8 neuronas dopaminérgicas en el hermafrodita, 6 de ellas anteriores (lo que incluye 4 neuronas llamadas CEP y 2 llamadas ADE) y 2 posteriores (llamadas PDE), lo cual facilita extraordinariamente su seguimiento (J. Sulston, Dew, & Brenner, 1975). El estudio de la

Capítulo I

neurodegeneración inducida por α -syn se consigue en estos modelos mediante la co-expresión de GFP (que permite la identificación de las neuronas dopaminérgicas) y α -syn bajo el control del promotor de gen *dat-1*, que codifica un transportador de membrana de dopamina y que se expresa específicamente en neuronas dopaminérgicas (Jayanthi *et al.*, 1998).

1.6.1.3 Modelos de enfermedades de poliglutamina

Para estudiar los procesos por los que la agregación de proteínas con expansiones de poliQ es capaz de alterar algunas funciones neuronales, diversas líneas transgénicas de *C. elegans* han sido generadas. Así, por ejemplo, se ha recurrido a la expresión en neuronas de *C. elegans* de fragmentos de huntingtina humana, la proteína relacionada con la enfermedad de Huntington, fusionados a expansiones de poliglutamina, lo cual resulta en neurodegeneración y alteraciones de la conducta del animal (Bates, Victor, Jones, Shi, & Hart, 2006; Faber, Alter, MacDonald, & Hart, 1999). Sin embargo, para el estudio de las enfermedades de poliglutamina de una manera más general, se han desarrollado diferentes estirpes transgénicas que sobreexpresan proteínas fluorescentes fusionadas a expansiones de poliglutamina de distintos tamaños, ya que se ha demostrado que la simple adición de expansiones de poliglutamina a una proteína fluorescente, como GFP o YFP, es capaz de inducir la agregación de la proteína (Morley, Brignull, Weyers, & Morimoto, 2002). La fusión a una proteína fluorescente permite además el seguimiento de la formación de agregados *in vivo* en el nematodo.

Como en los modelos anteriores, estas fusiones de poliQ pueden ser expresadas en músculo y en neuronas, dando lugar a la agregación de estas proteínas en el citoplasma celular y a deficiencias motoras y de desarrollo (Gidalevitz, Ben-Zvi, Ho, Brignull, & Morimoto, 2006; Morley *et al.*, 2002; van Ham *et al.*, 2010), fenotipos que pueden ser analizados fácilmente.

Además, estos modelos de enfermedades de poliglutamina muestran una agregación y toxicidad que también depende de la longitud de las expansiones de poliQ. La agregación y la disfunción celular suelen ocurrir, al igual que en humanos, a partir de 40 residuos de glutamina, aunque este umbral puede cambiar dependiendo de la edad del nematodo (Morley *et al.*, 2002).

Capítulo II. **Objetivos**

Objetivos

Teniendo en cuenta la imposibilidad de estudiar en la mayoría de los organismos modelos utilizados más comúnmente la inactivación de los genes de los sistemas tiorredoxina, debido a la inducción de fenotipos de letalidad embrionaria/larvaria, el objetivo general de esta tesis fue determinar si se podría establecer el nematodo *C. elegans* como organismo modelo para el estudio de la implicación de las tiorredoxinas en diferentes enfermedades neurodegenerativas, así como estudiar el papel protector del gen de la familia de las tiorredoxinas *dnj-27*, ortólogo del gen *ERdj5* de mamífero, en diferentes modelos de estas enfermedades en el nematodo. Para alcanzar estos objetivos generales se siguieron los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la participación de los genes de las familias de las tiorredoxinas, las glutarredoxinas y las peroxirredoxinas en los fenotipos patológicos asociados a distintos modelos de enfermedades neurodegenerativas en *C. elegans*.
2. Analizar los patrones de expresión a nivel celular y subcelular del gen *dnj-27*, y su posible implicación en el estrés del retículo endoplasmático.
3. Estudiar la influencia de este gen sobre los fenotipos de toxicidad y agregación asociados a los modelos de enfermedades neurodegenerativas en el nematodo.
4. Examinar la posible conservación en organismos superiores del papel protector de *dnj-27* expresando el gen humano *ERdj5* en los diferentes modelos de enfermedades neurodegenerativas.
5. Identificar los posibles mecanismos por los que *dnj-27* ejerce su función protectora en los modelos de enfermedades neurodegenerativas.

Capítulo III. **Resultados**

3.1 Evaluación de fenotipos en estirpes transgénicas de modelos de Alzheimer y Parkinson sometidas a ARNi de genes de la familia de las tiorredoxinas, las glutarredoxinas y las peroxirredoxinas en *C. elegans*

La implicación del estrés oxidativo en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas ha sido claramente demostrada (Mattson, 2004; Reddy & Reddy, 2011; Reynolds *et al.*, 2007). Como hemos visto anteriormente, las tiorredoxinas se encuentran entre las principales defensas antioxidantes de tipo enzimático y están íntimamente relacionadas con las glutarredoxinas y las peroxirredoxinas.

Varios estudios señalan a las tiorredoxinas como enzimas que podrían jugar un papel protector en el desarrollo y la progresión de diversas enfermedades neurodegenerativas (Akterin *et al.*, 2006; Umeda-Kameyama *et al.*, 2007). Sin embargo, la mayoría de estos análisis han sido desarrollados a nivel celular, *in vitro* o en muestras *postmortem*, y la información acerca del efecto de las tiorredoxinas *in vivo* es bastante limitada. Esto es debido fundamentalmente a que la inactivación de los genes de los sistemas tiorredoxina produce un fenotipo de letalidad embrionaria/larvaria en la mayoría de los organismos modelos utilizados más comúnmente, como ratón o *Drosophila melanogaster* (Missirlis *et al.*, 2002; Nonn *et al.*, 2003).

Por todo ello, decidimos empezar nuestro estudio haciendo un análisis fenotípico de las estirpes transgénicas que recapitulan las enfermedades de Alzheimer y Parkinson sometidas a ARNi de todos los genes de la familia de las tiorredoxinas, las glutarredoxinas y las peroxirredoxinas conocidos en *C. elegans*, para buscar una posible implicación de los mismos en estos desórdenes a nivel de un organismo completo. Los distintos miembros de las familias de las glutarredoxinas y de las peroxirredoxinas incluidos en este estudio, ya estaban descritos en www.wormbase.org, pero no así todas las tiorredoxinas. Por esta razón, en primer lugar se procedió a la identificación de todos los posibles miembros de la familia de las tiorredoxinas. Para dicha identificación se buscaron en el proteoma de *C. elegans* proteínas que contuviesen la secuencia del sitio activo conservado tiorredoxina CGPC, mientras que las tiorredoxinas reductasas se eligieron por la presencia del sitio activo conservado CVNVGC correspondiente a estas enzimas. La Tabla 3.1 muestra todos los genes de las familias tiorredoxina, glutarredoxina y peroxirredoxinas incluidas en este estudio.

Para este análisis inicial, utilizamos como estirpe modelo de Alzheimer la estirpe transgénica CL647, que sobrexprende de forma inducible el péptido A β humano desde el

Capítulo III

array integrado *dvls27* (ver apartado 6.1.1 del capítulo Materiales y Métodos) en células musculares del nematodo, bajo el control del promotor del gen *myo-3* (C. Link, 2003), y que además incluye la mutación *rrf-3 (pk1426)* que confiere hipersensibilidad al ARNi (Simmer *et al.*, 2002). Como se ha mencionado en apartados anteriores, la expresión de A β en las células musculares de *C. elegans* produce la parálisis progresiva del animal. En este caso, la inducción de la expresión de A β es dependiente de temperatura, de forma que la expresión se consigue al crecer los animales a temperaturas superiores a 20°C, gracias a que esta estirpe contiene el alelo sensible a la temperatura *cc546* del gen *smg-1*, que forma parte del sistema de vigilancia de ARNm de *C. elegans* (sistema *smg-1* (Mango, 2001)). Así, en el transgen *dvls27*, la secuencia 3' UTR del ARNm de A β es más larga de lo común, lo cual resulta en un ARNm inestable que será degradado por el sistema *smg-1* a temperatura no restrictiva. Temperaturas superiores a los 20°C producen la inactivación del alelo de *smg-1* permitiendo la subsecuente traducción del ARNm de A β (C. Link, 2003).

Durante estos ensayos, los animales silenciados con los distintos ARNi fueron crecidos a 16°C hasta el estadio larvario L3, y entonces transferidos a una temperatura de 23°C ó 25°C para permitir la inducción de A β . Este protocolo posibilita un análisis rápido del efecto de los distintos ARNi sobre el fenotipo de parálisis asociado a la expresión de A β , ya que los animales empiezan a paralizarse a las 24-48 horas del choque térmico, produciéndose la parálisis de todos los animales en apenas 12 horas desde la aparición del fenotipo en los primeros animales.

Como se puede observar en la tabla 3.1, varios de los genes incluidos en el estudio provocaron un aumento claro y reproducible de la parálisis inducida por A β al silenciarse por ARNi. Estos genes incluyen *trxr-1*, *trxr-2*, *trx-3* y *dnj-27* dentro del grupo de la familia de las tiorredoxinas, *gsr-1* dentro de la familia de las glutarredoxinas y glutatión reductasas, y *prdx-3* y *prdx-6* dentro del grupo de la familia de las peroxirredoxinas. Sorprendentemente, hubo incluso un miembro de la familia de las tiorredoxinas, *trx-1*, cuyo silenciamiento provocó una mejoría del fenotipo de parálisis de la estirpe CL647.

Seguidamente, procedimos a evaluar el papel de estos genes en un modelo de la enfermedad de Parkinson en *C. elegans*. En este análisis inicial, utilizamos la estirpe transgénica UA50 (ver apartado 6.1.1 del capítulo Materiales y Métodos), que expresa la proteína humana α -syn fusionada a GFP en las células musculares del nematodo, la cual agrega en el citoplasma de dichas células conforme el animal envejece (Hamamichi *et al.*, 2008). En la tabla 3.1 se puede observar que sólo el silenciamiento por ARNi de un gen dentro de la familia de las tiorredoxinas, *dnj-27*, produjo un aumento claro del patrón

temporal de agregación de α -syn::GFP. El silenciamiento de varios genes de la familia de las glutarredoxinas (*gsr-1*, *glrx-10*, *glrx-21* y *glrx-22*) así como el de una peroxirredoxina (*prdx-2*) también produjeron un aumento de la agregación de α -syn::GFP.

Tabla 3.1. Efecto del silenciamiento por ARNi de los genes de las familias tiorredoxina, glutarredoxina y peroxirredoxinas sobre los fenotipos de parálisis y agregación de α -syn::GFP en las estirpes CL647 y UA50, respectivamente.

Categoría	Nombre del gen	Secuencia	Fenotipo en CL647	Fenotipo en UA50
Tiorredoxinas	<i>trx-1</i>	B0228.5	Disminuye parálisis	-
	<i>trxr-1</i>	C06G3.7	Aumenta parálisis	-
	<i>trx-2</i>	B0024.9	-	-
	<i>trxr-2</i>	ZK637.10	Aumenta parálisis	-
	<i>trx-3</i>	M01H9.1	Aumenta parálisis	-
	<i>trx-4</i>	Y44E3A.3	-	-
	<i>trx-5</i>	K02H11.6	-	-
	<i>dnj-27</i>	Y47H9C.5	Aumenta parálisis	Mayor agregación
	<i>txl</i>	Y54E10A.3	-	-
Glutarredoxinas y glutatión reductasas	<i>glrx-5</i>	Y49E10.2	No ensayado ^a	No ensayado ^a
	<i>glrx-10</i>	Y34D9A.6	-	Mayor agregación
	<i>glrx-21</i>	ZK121.1	-	Mayor agregación
	<i>glrx-22</i>	C07G1.8	-	Mayor agregación
	<i>gsr-1</i>	C46F11.2	Aumenta parálisis	Mayor agregación
Peroxirredoxinas	<i>prdx-2</i>	F09E5.15	No ensayado ^a	No ensayado ^a
	<i>prdx-3</i>	R07E5.2	Aumenta parálisis	-
	<i>prdx-6</i>	Y38C1AA.11	Aumenta parálisis	-

Aquellos casos en los que el ARNi del gen en cuestión no produjo ningún efecto están representados por un guión.

^a No se pudo ensayar porque el tratamiento con ARNi produce un fenotipo de letalidad o de arresto larvario.

De estos resultados se puede extraer que, de todos los genes ensayados, solamente dos, *dnj-27* y *gsr-1*, parecen tener un papel protector en los dos modelos de enfermedades neurodegenerativas utilizados. De ellos, tan sólo *dnj-27* forma parte de la familia de las tiorredoxinas, mientras que *gsr-1* codifica para la glutatión reductasa de *C. elegans*. Por tanto, dado que *dnj-27* es el único miembro de la familia tiorredoxina con una potencial función protectora en ambos modelos, decidimos centrar todos nuestros esfuerzos en el estudio del impacto de este gen en distintos modelos de enfermedades neurodegenerativas en *C. elegans*.

Capítulo III

3.2 *dnj-27* es el ortólogo en *C. elegans* del gen *ERdj5* de mamífero

El gen *dnj-27* de *C. elegans* fue identificado hace algunos años por nuestro grupo como el ortólogo del gen humano *ERdj5*, por medio de una aproximación *in silico* (Cunnea *et al.*, 2003). Como se puede observar en la Figura 3.1, las secuencias de aminoácidos de las proteínas *DNJ-27* y *ERdj5*, presentan una alta homología con una identidad compartida del 37%.

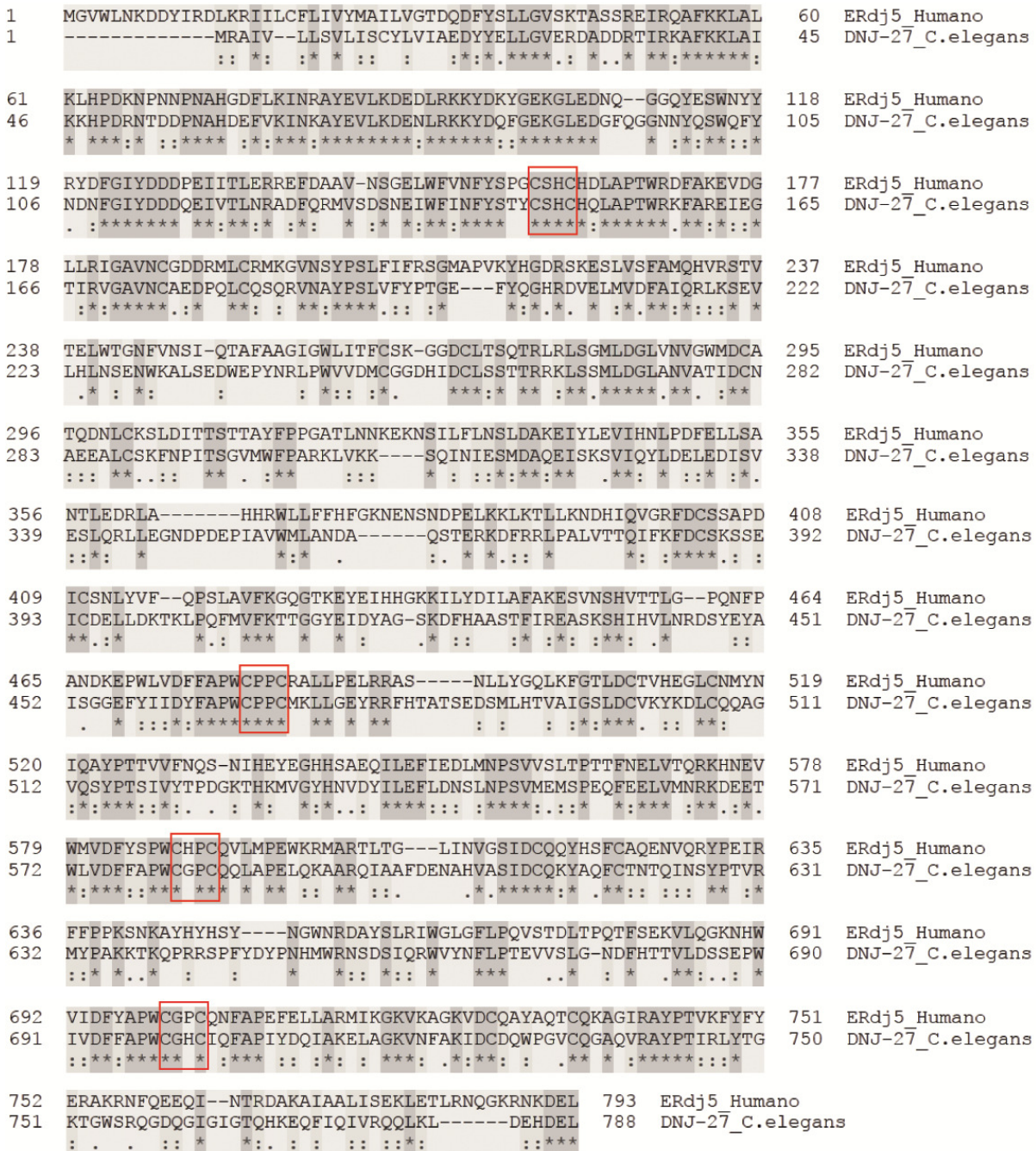


Figura 3.1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas *ERdj5* de humano y *DNJ-27* de *C. elegans*¹.

Ambas proteínas constan de un dominio DnaJ/Hsp-40 en su extremo amino terminal (que, en humanos, se ha demostrado interactúa físicamente con proteínas Hsp70 como BiP), seguido de cuatro dominios tiorredoxina, cada uno de ellos conteniendo un motivo redox CXXC (Fig. 3.2). Recientemente, el análisis tridimensional de la proteína ERdj5 de ratón ha revelado la existencia de otros dos dominios con plegamiento tipo tiorredoxina (Trxb1 y Trxb2) entre el primer y el segundo dominio tiorredoxina (Trx1 y Trx2), que sin embargo carecen del motivo redox activo CXXC (Hagiwara *et al.*, 2011). Estos dos nuevos dominios tiorredoxina están también presentes en la secuencia de DNJ-27 (Fig. 3.2).

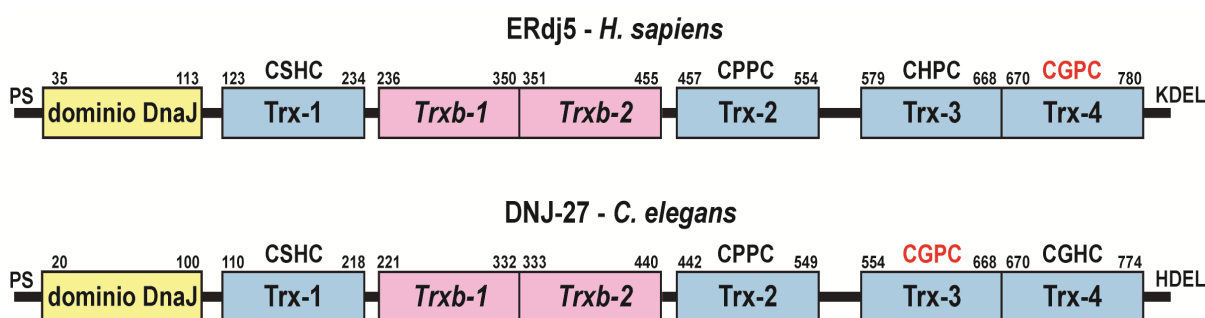


Figura 3.2. Comparación de los dominios de las proteínas ERdj5 humana y DNJ-27 de *C. elegans*. Los números encima de los diferentes dominios indican el residuo aminoacídico dentro de la proteína. Las cajas azules representan dominios tiorredoxina con sitios redox activos CXXC, mientras que las cajas rosas representan dominios tiorredoxina que no contienen ningún sitio activo CXXC identificable pero que mantienen el plegamiento tipo tiorredoxina (Hagiwara *et al.*, 2011). La secuencia de los respectivos sitios redox activos se muestra encima de los dominios correspondientes, resaltándose en rojo el sitio activo tiorredoxina CGPC canónico. La abreviatura PS al principio de las secuencias se refiere al péptido señal N-terminal, mientras que las secuencias HDEL y KDEL son los respectivos tetrapéptidos responsables de la retención de las proteínas en el lumen del retículo endoplasmático (Lewis & Pelham, 1990).

En primer lugar, procedimos a determinar cuáles son los tipos celulares y los tejidos del nematodo donde *dnj-27* se expresa. El estudio de la expresión de *dnj-27* se realizó primero mediante la generación de animales transgénicos conteniendo el transgen *Pdnj-27::GFP*, el cual permite la expresión de GFP bajo el control del promotor de *dnj-27*. De manera similar a ERdj5 en mamíferos, DNJ-27 muestra un patrón de expresión bastante ubicuo. De esta forma, aunque *Pdnj-27::GFP* se expresa fundamentalmente en células musculares de la vulva y la faringe, como se indica en www.wormbase.org, un análisis más detallado nos permitió determinar también expresión de *dnj-27*, a niveles más bajos, en otros tejidos como células de la pared muscular, intestino, células de la cubierta de la gónada, recto e hipodermis (Fig. 3.3).

¹(Viene de la página anterior) Los asteriscos debajo de las secuencias y el color gris oscuro indican residuos idénticos. Con uno o dos puntos se indican residuos conservados entre las dos secuencias, siendo los dos puntos el mayor grado de conservación. Los sitios activos de los dominios tiorredoxinas se muestran dentro de los rectángulos rojos. Se utilizó el método Clustal W en UnitProt.org para realizar el alineamiento de las secuencias. Los números a los lados de las secuencias indican los residuos de aminoácidos correspondientes a ambas proteínas.

Capítulo III

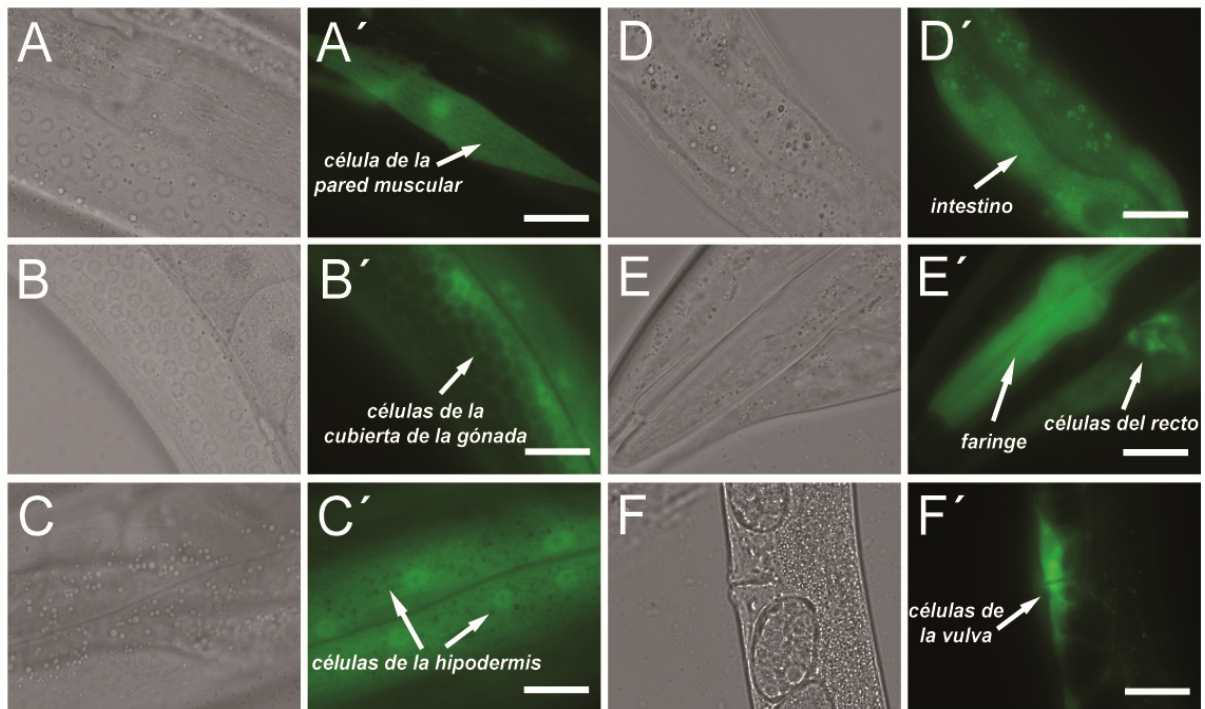


Figura 3.3. Patrón de expresión del transgen *Pdnj-27::GFP*. Fotos de animales transgénicos tomadas con DIC (A-F) y fluorescencia (A'-F'). Barra = 50 μ m.

Cabe destacar, que las secuencias de ERdj5 y DNJ-27 contienen en el extremo N-terminal un péptido señal de entrada en el retículo y una señal de retención en el mismo en su extremo C-terminal, lo que sugiere una localización en el lumen del retículo endoplasmático para ambas proteínas. La secuencia de retención en el retículo de ERdj5 es KDEL mientras que la de DNJ-27 es la secuencia HDEL. Ambas secuencias son equivalentes en su función (Lewis & Pelham, 1990). Por ello y para confirmar esta localización subcelular, construimos el transgen *Pdnj-27::dnj-27::YFP::KDEL* que permite la expresión de DNJ-27 fusionado a la proteína fluorescente YFP que, a su vez, porta la secuencia de retención en el retículo KDEL en su extremo C-terminal. Como se puede observar en la Figura 3.4, este marcador muestra un patrón de expresión reticular en el citoplasma de las células musculares, compatible con una localización en el retículo endoplasmático. La expresión simultánea en nematodos transgénicos *Pdnj-27::dnj-27::YFP::KDEL* del marcador de retículo endoplasmático de *C. elegans* *mCherry::TRAM-1* (una proteína localizada en la membrana del retículo implicada en la translocación de proteínas) (Tian *et al.*, 2010), expresado bajo el control del promotor de *myo-3*, nos permitió corroborar la localización de DNJ-27 en el lumen del retículo, ya que, como se muestra en la Figura 3.4, existe una colocalización muy marcada entre ambas proteínas en células musculares.

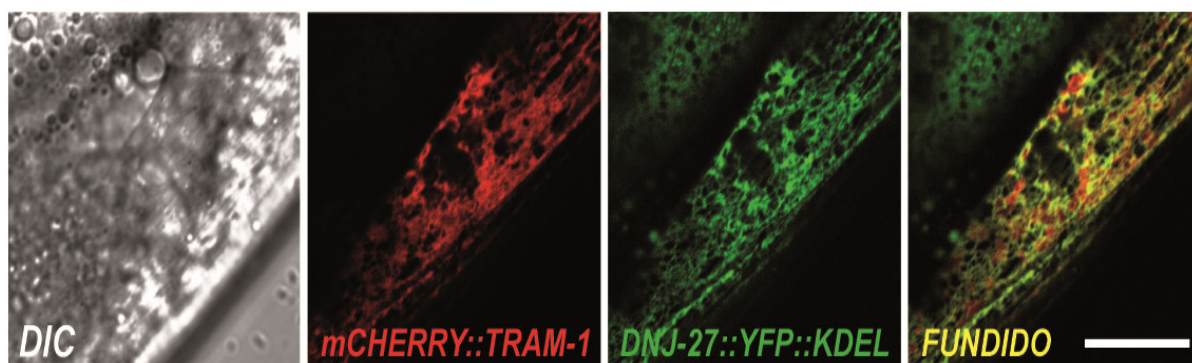


Figura 3.4. Localización de la proteína de fusión DNJ-27::YFP::KDEL en el retículo endoplasmático. Utilizando animales transgénicos que co-expresan los transgenes *Pmyo-3::mCherry::TRAM-1* (canal rojo) y *Pdnj-27::dnj-27::YFP::KDEL* (canal verde), se pudo determinar que ambas proteínas colocalizan en el lumen del retículo endoplasmático de células musculares de *C. elegans*, como se demuestra por el color amarillo de las imágenes fundidas. Barra = 20 μ m.

Por otro lado, se sabe que la UPR -la ruta celular encargada de aliviar el estrés del retículo endoplasmático- y la ERAD -implicada en la degradación de proteínas no nativas del retículo- están íntimamente coordinadas (Travers *et al.*, 2000). De esta forma, ERdj5, al igual que otras proteínas involucradas en ERAD, se induce al utilizar sustancias que provocan estrés en el retículo y activación de la UPR (Cunnea *et al.*, 2003). Con el fin de demostrar una posible regulación de la expresión de *dnj-27* por estrés del retículo también en *C. elegans*, tratamos animales transgénicos que expresan el marcador *Pdnj-27::GFP* con tunicamicina, un inductor típico de estrés en el retículo endoplasmático (Shen *et al.*, 2001). El tratamiento de estos animales con 10, 20 o 30 μ g/ml de tunicamicina dio como resultado una fuerte inducción de GFP (Fig. 3.5), confirmando el aumento de la expresión de *dnj-27* como consecuencia de la inducción de estrés en el retículo. Para determinar la ruta de la UPR por la que se produce esta inducción de *dnj-27*, silenciamos mediante ARNi los genes *ire-1*, *xbp-1*, *atf-6* y *pek-1* (ortólogos en *C. elegans* de los genes *IRE1*, *XBP1*, *ATF6* Y *PERK* de mamífero). Como se puede observar en la Figura 3.5, IRE-1 y XBP-1 son necesarios para la inducción de *dnj-27* por tunicamicina, mientras que ATF-6 y PEK-1 son prescindibles. Es importante apuntar aquí que la inducción de *dnj-27* por medio de esta vía está en consonancia con una posible implicación en ERAD, ya que la ruta IRE-1/XBP-1 ha sido específicamente implicada en la inducción de la transcripción de otros genes relacionados con ERAD, como por ejemplo EDEM (Hiderou Yoshida *et al.*, 2003), que forma parte, junto con ERdj5, del mismo complejo supramolecular implicado en la reducción de puentes disulfuro.

Capítulo III

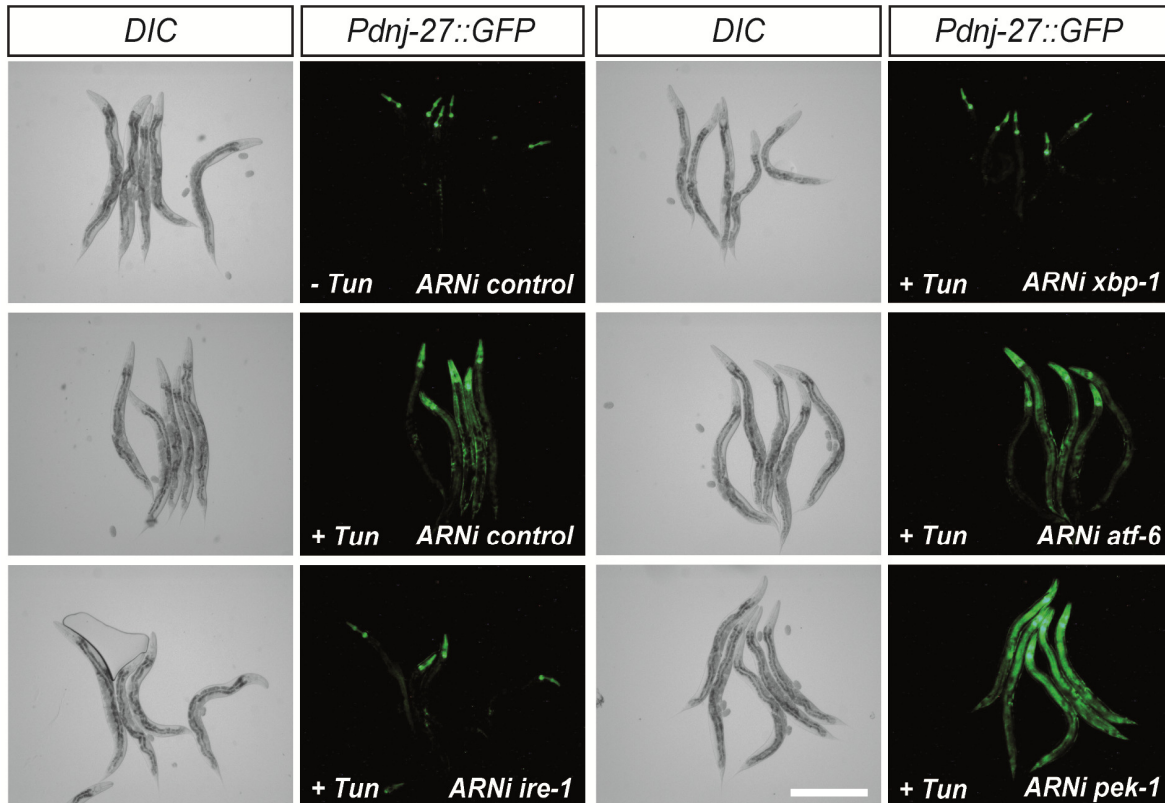


Figura 3.5. Inducción del transgen *Pdnj-27::GFP* por la ruta de la UPR, activada mediante el tratamiento con el inductor de estrés en el retículo endoplasmático tunicamicina (30 µg/ml). El tratamiento con tunicamicina induce la expresión de GFP, la cual es inhibida en animales en los cuales la ruta de señalización *ire-1/xbp-1* de la UPR ha sido silenciada con ARNi. Barra = 400 µm.

El posible papel que DNJ-27 pueda desempeñar en ERAD queda así probado de una manera indirecta. No obstante, uno de los mayores problemas a los que nos hemos enfrentado durante el desarrollo de esta tesis es la escasa disponibilidad de herramientas para estudiar la ruta de la ERAD en *C. elegans*. Por ello, nos propusimos confirmar la implicación de *dnj-27* en ERAD de una forma más directa generando nosotros mismos una batería de construcciones con el gen *cpl-1* fusionado a YFP (ver apartado 6.3 del capítulo Materiales y Métodos). *cpl-1* es un gen de *C. elegans* que codifica para una cisteín proteasa catepsina tipo L (Hashmi *et al.*, 2002). Este tipo de proteasas son sintetizadas en el retículo endoplasmático, dando lugar inicialmente a una pro-enzima no madura. Para que la enzima alcance su estado maduro final habrá de eliminarse una región situada en la zona N-terminal de la pro-enzima llamada pro-región, a la que se le atribuyen funciones en el plegamiento y en el transporte de la enzima. Estudios previos han demostrado como la introducción de algunas mutaciones en la pro-región del gen que codifica para la proteína humana homóloga (CPL-1), convierten a esta enzima en un sustrato luminal de ERAD (Kreusch *et al.*, 2000). Un estudio reciente ha demostrado como la introducción de las mutaciones equivalentes en el gen *cpl-1* de *C. elegans* puede ser utilizado como marcador de ERAD en el nematodo (Miedel *et al.*, 2012).

Tras expresar la forma silvestre de *cpl-1* fusionada a YFP en células musculares bajo el control del promotor de *myo-3*, se observa un patrón de expresión punteado consistente con la localización esperada para la proteína CPL-1 en lisosomas. Este patrón de expresión no aparece, sin embargo, con la construcción de *cpl-1* que incluye mutaciones en la pro-región, que muestra una expresión muy baja, quizás debido precisamente a su degradación por ERAD. Esto parece confirmarse por la aparición de agregados intracelulares de YFP al silenciar mediante ARNi diversos genes involucrados en ERAD, como *cdc-48.1*, *cdc-48.2* y *sel-1*. Sin embargo, la inhibición por ARNi de otros genes de *C. elegans* relacionados con ERAD, como fueron *cup-2*, *R151.6*, *sel-11*, *hrdl-1* (ver apartado 3.8 para una descripción de los mismos) y también *dnj-27*, no produjeron este mismo efecto. Esto quizás se deba al hecho de que distintas rutas y proteínas específicas de la ERAD pueden funcionar en cada caso dependiendo del sustrato (Vembar & Bodsky, 2008) y, por tanto, pudiera ser que DNJ-27 (al igual que los otros genes de ERAD ensayados que no dieron el resultado esperado) no estuviera implicado en la degradación específica de la forma mutante de CPL-1, por lo que la implicación directa de DNJ-27 en la ERAD no pudo ser confirmada por esta vía.

A continuación decidimos estudiar la posible activación de la UPR por medio del silenciamiento mediante ARNi de *dnj-27*. Para ello recurrimos a un marcador de estrés en el retículo ampliamente utilizado en *C. elegans*, *Phsp-4::GFP* (Urano *et al.*, 2002), siendo *hsp-4* el homólogo de BiP de mamífero. Al igual que para ERdj5 en mamíferos (Ushioda *et al.*, 2008), la inhibición de *dnj-27* no condujo a la activación de la UPR en *C. elegans*. Tampoco animales silvestres tratados con ARNi para *dnj-27* mostraron ningún fenotipo obvio, lo cual es compatible con la ausencia de fenotipo de ratones *knock-out* para *ERdj5* (Hosoda, Tokuda, Akai, Kohno, & Iwawaki, 2010).

En resumen, la alta homología existente entre *ERdj5* y *dnj-27*, junto con la localización de DNJ-27 en el retículo y su inducción por la ruta IRE-1/XBP-1 al provocarse estrés en el retículo, nos sugieren que la función de ambas proteínas en ERAD está conservada.

3.3 Aislamiento, caracterización y evaluación de los fenotipos de estirpes de *C. elegans* que combinen mutaciones en el gen *dnj-27* en los fondos genéticos que recapitulan Alzheimer y Parkinson

Con la intención de corroborar los resultados obtenidos al silenciar por ARNi el gen

Capítulo III

dnj-27 en las estirpes transgénicas modelo de Alzheimer y Parkinson, decidimos recurrir a dos alelos de delección disponibles en el *Caenorhabditis Genetic Center* (CGC) y en el *National Bioresource Project*, respectivamente.

El gen *dnj-27* se localiza en el cromosoma I de *C. elegans* y está constituido por siete exones (Fig. 3.6). En el momento en el cual se desarrolló el período experimental de esta tesis, había disponibles dos alelos de delección distintos del gen *dnj-27*: el alelo *ok2302* y el *tm2785*. Debido a que la delección *tm2785* elimina sólo 309 pares de bases del penúltimo (sexto) exón mientras que la delección *ok2302* elimina este mismo exón completo y parte de las secuencias de los dos intrones que lo flanquean, decidimos trabajar únicamente con el alelo *ok2302*. Además, la secuencia después de la zona delecionada en el alelo *tm2785* entra en fase de lectura, mientras que la eliminación del sexto exón completo en el alelo *ok2303* cambia la pauta de lectura de la secuencia posterior, justificando aún más el uso de este último alelo como más hipomórfico (Fig. 3.6). Cabe señalar que durante los últimos meses del período experimental de esta tesis apareció un tercer alelo para el gen *dnj-27*, que también se representa en la Figura 3.6. Este alelo es el *tm4850* y contiene una delección de 379 pares de bases en la zona N-terminal, la cual elimina parte del primer intrón así como parte del segundo exón. Por falta de tiempo no pudimos estudiar este último mutante, pero sin embargo, hay que recalcar que esta delección no cambia la pauta de lectura de la secuencia, por lo que, en la proteína que teóricamente resultaría de este alelo, se conservarían todos los sitios activos de los dominios tiorredoxina.

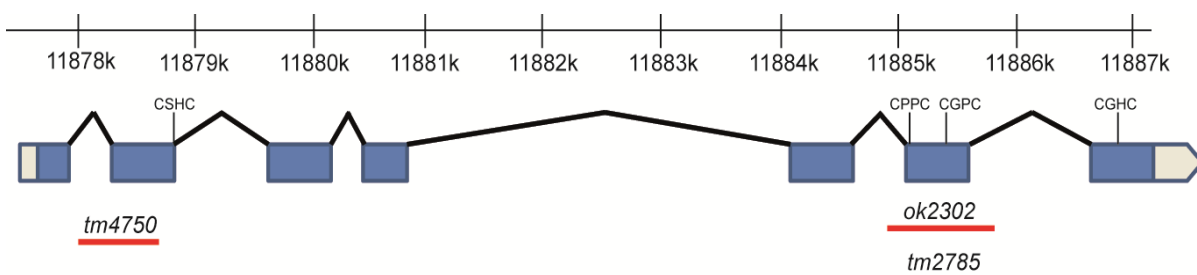


Figura 3.6. Organización genómica y alelos de *dnj-27*. Representación esquemática de la estructura del gen *dnj-27*. La escala superior indica la posición en kilobases dentro del cromosoma I. Los exones del gen se encuentran representados por rectángulos (la parte azul es la fase abierta de lectura y la gris las secuencias 5' y 3'-UTRs respectivamente), mientras que las líneas que los unen indican los intrones. Las regiones eliminadas por los correspondientes alelos de delección se encuentran señaladas en rojo. La posición de los sitios activos redox se indica sobre los respectivos exones.

Mediante el análisis por RT-PCR del alelo *ok2302* pudimos determinar que este alelo produce, como se puede observar en la Figura 3.7A, el ARNm correspondiente. Este ARNm fue secuenciado y se comprobó que su secuencia coincide exactamente con la secuencia predicha tras la eliminación del sexto exón, produciéndose la fusión de los exones 5 y 7 y

un cambio en la pauta de lectura tras el exón 5 que generaría una proteína truncada a la que le faltarían los últimos 305 aminoácidos del extremo C-terminal. Decidimos a continuación analizar si el ARNm del alelo *ok2302* sería traducido y si, en tal caso, la correspondiente proteína truncada es estable o, por el contrario, es degradada, lo que significaría que estaríamos ante un alelo nulo. Para ello, analizamos animales homocigotos para la mutación *ok2302* realizando un western blot para la detección de DNJ-27, usando un anticuerpo policlonal anti-DNJ-27 diseñado para reaccionar con péptidos sintéticos derivados de la zona N-terminal de la secuencia de la proteína. La proteína DNJ-27 silvestre está formada por un total de 788 aminoácidos, mientras que la traducción de la variante del ARNm del alelo *ok2302* debería producir una proteína truncada de tan sólo 473 aminoácidos. Como se puede observar en la Figura 3.7B, mediante western blot con el anticuerpo anti-DNJ-27 no pudimos detectar la proteína truncada Δ DNJ-27 correspondiente al alelo *ok2302*, mientras que DNJ-27 silvestre pudo ser detectada tanto en extractos totales de *C. elegans* silvestres (aunque de forma extremadamente débil) como en extractos de animales transgénicos que sobrepresan *dnj-27*, que fueron utilizados como controles positivos. La detección de la proteína truncada resultante de animales homocigotos para el alelo *tm2785*, que se incluyó como control, tampoco fue posible. Dada la baja efectividad del anticuerpo para detectar la proteína DNJ-27 endógena silvestre, no podemos concluir de forma inequívoca si las proteínas truncadas generadas por los alelos *ok2302* y *tm2785* son estables o bien son degradadas tras su síntesis.

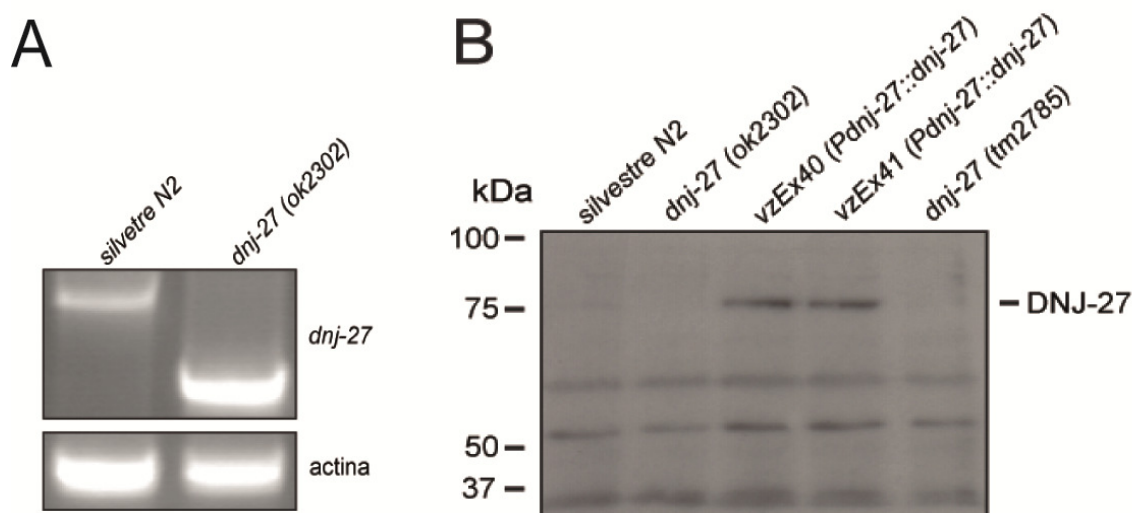


Figura 3.7. Análisis de la expresión del alelo *dnj-27 (ok2303)*. A) RT-PCR para la detección del ARNm de *dnj-27* expresado en animales silvestre y en la estirpe VZ65 *dnj-27 (ok2303)*. Como se puede observar, el ARNm del alelo mutante es sintetizado. La actina se utilizó como control de carga. B) Western blot para la detección de DNJ-27 utilizando el anticuerpo policlonal anti-DNJ-27. Animales que sobrepresan *dnj-27* desde los arrays extracromosómicos *vzEx40* y *vzEx41* fueron incluidos como control positivo (carriles 3 y 4), y animales homocigotos para el alelo *dnj-27 (tm2785)* se utilizaron como control negativo (carril 5). Una muy débil banda correspondiente a DNJ-27 se pudo detectar en los extractos de proteína de animales silvestres N2, mientras que no se obtuvo ninguna banda para la proteína truncada Δ DNJ-27 correspondiente a los alelos *dnj-27 (ok2302)* y *dnj-27 (tm2785)*. Las bandas inespecíficas de menor peso molecular se utilizaron como control de carga.

Capítulo III

Pese a no poder determinar el tipo funcional del alelo *dnj-27 (ok2302)*, y con la intención de confirmar los datos obtenidos en los ensayos de ARNi, procedimos a generar, mediante cruces, estirpes que combinaran el alelo *dnj-27 (ok2302)* en los fondos genéticos de los modelos de Alzheimer y Parkinson en el nematodo. Sorprendentemente, y a diferencia de los datos obtenidos con el ARNi, no se observó ningún efecto del alelo *ok2302* sobre el fenotipo de parálisis asociado a la estirpe modelo de Alzheimer ni sobre la agregación de α -syn::GFP (Fig. 3.8). Estos resultados pueden dar lugar a varias interpretaciones: 1) con el ARNi obtuvimos un falso positivo para el caso de *dnj-27*, 2) el silenciamiento parcial y la ausencia total de *dnj-27* producen efectos distintos en los modelos de enfermedades neurodegenerativas estudiados, ó 3) el alelo *ok2302* no es realmente un alelo nulo y la proteína truncada, aunque no sea detectada por el anticuerpo, es producida y retiene parte de la función de la proteína DNJ-27 silvestre. Nosotros sospechamos que esta última posibilidad es la real, ya que la sensibilidad y la especificidad de nuestro anticuerpo para DNJ-27 son muy bajas, como se puede comprobar por la extremadamente baja intensidad de la banda en el carril correspondiente a nematodos silvestres, y es bastante probable que no seamos capaces de detectar la proteína truncada.

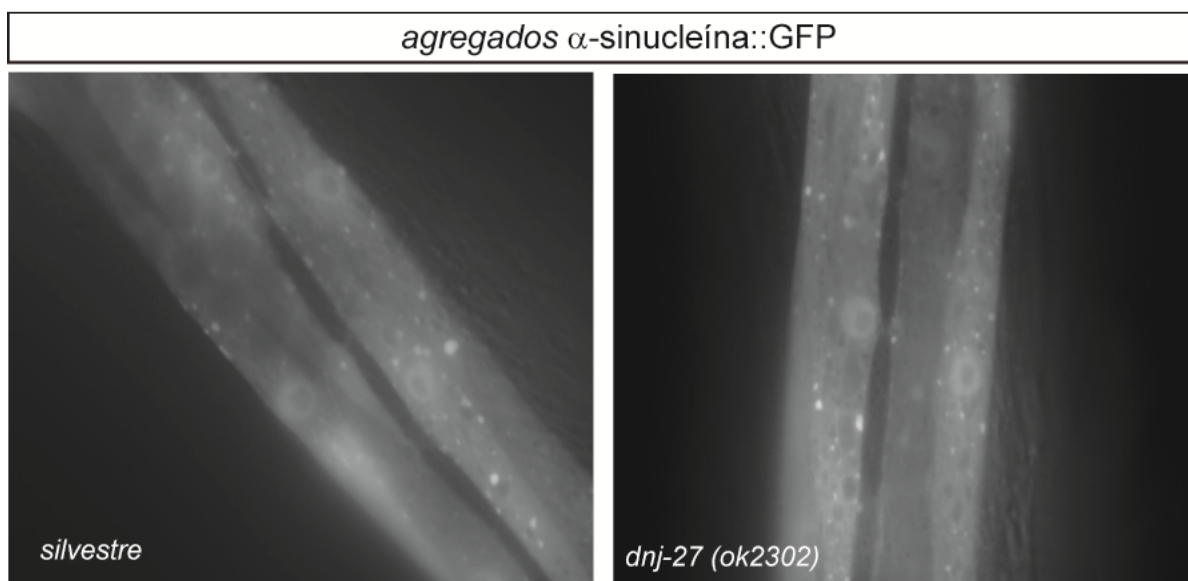


Figura 3.8. Agregados de α -sinucleína::GFP en células musculares de *C. elegans*. Fotografías de células musculares tomadas con fluorescencia, donde se puede observar que no existen diferencias significativas de agregación entre animales silvestres utilizados como control (izquierda) y animales que portan el alelo *dnj-27 (ok2302)* (derecha).

A la vista de estos resultados, decidimos continuar nuestros estudios usando únicamente ARNi o sobreexpresión de *dnj-27*.

3.4 Estudio del papel protector de *dnj-27* en estirpes transgénicas de *C. elegans* modelo de la enfermedad de Alzheimer

Dado que los mutantes por delección disponibles para el gen *dnj-27* se mostraron poco útiles para nuestros objetivos, nos centramos en otras estrategias basadas, fundamentalmente, en el silenciamiento mediante ARNi (cuya eficiencia se muestra en la Figura 3.9A) y el estudio del efecto de la sobreexpresión de *dnj-27*.

En el estudio inicial de evaluación de los distintos ARNi de los miembros de las familias tioredoxina, glutaredoxina y peroxirredoxina, la estirpe transgénica que se utilizó como modelo de Alzheimer fue la CL647, que expresa el A β humano de forma inducible para temperaturas superiores a 20°C. Teniendo en cuenta que la aproximación con los mutantes resultó fallida, decidimos confirmar los resultados obtenidos con el ARNi para *dnj-27* utilizando esta vez una estirpe modelo de Alzheimer distinta. Esta estirpe es la CL2006 (ver apartado 6.1.1 del capítulo Materiales y Métodos) que expresa el péptido A β de forma constitutiva desde un array distinto al de la estirpe CL647 y presenta la ventaja, con respecto a los estudios con *dnj-27*, de eliminar los posibles efectos que una temperatura más elevada pueda tener sobre la maquinaria de respuesta al estrés en el retículo endoplasmático.

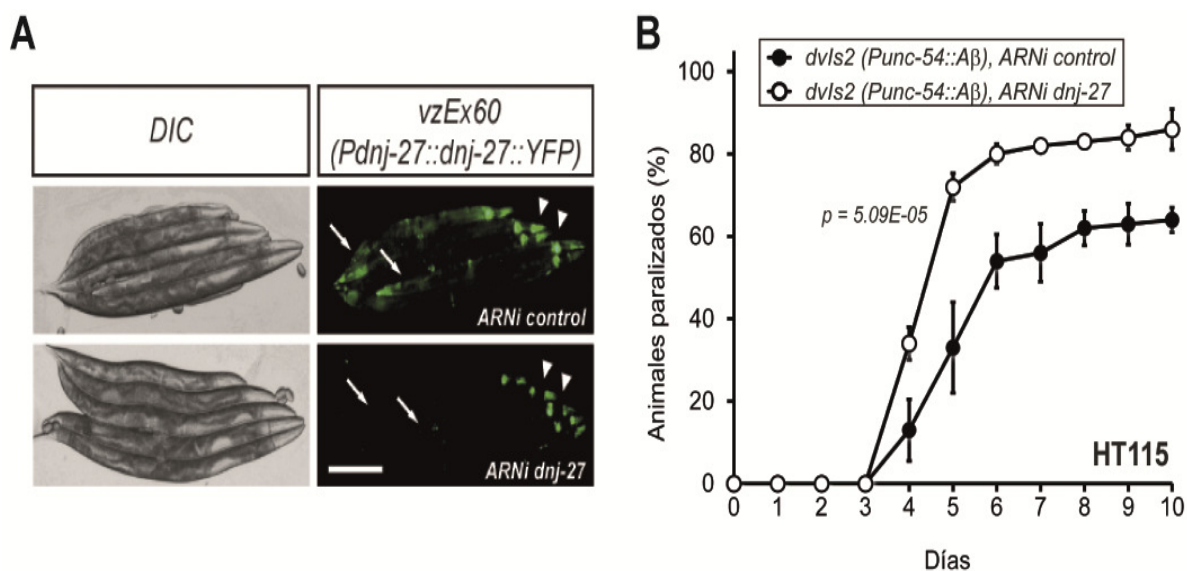


Figura 3.9. Eficiencia del ARNi de *dnj-27* y efecto del silenciamiento de *dnj-27* por ARNi sobre la parálisis progresiva de la estirpe CL2006, *dvIs2* [*Punc-54::A β* , *rol-6* (*su1006*)]. A) La eficiencia del ARNi de *dnj-27* se analizó por medio de la disminución de la señal fluorescente (paneles derechos) de la estirpe transgénica VZ184, que expresa el array extracromosómico *vzEx60* (*Pdnj-27::dnj-27::YFP::KDEL*). Nótese que la señal en el intestino disminuye substancialmente, mientras que en la faringe el efecto es menos acentuado. Barra = 200 μ m. B) Parálisis progresiva de animales CL2006 crecidos en bacteria HT115 que lleva sólo el vector pL4440 sin inserto (y que por tanto no expresa ARN de doble cadena) , como control, o en bacteria HT115 que expresa el ARN de doble cadena de *dnj-27*. En la gráfica se representa la media de tres experimentos independientes, siendo las diferencias significativas ($p = 5.09E-05$).

Capítulo III

Como se muestra en la Figura 3.9B, al igual que con la estirpe inducible, la bajada en los niveles de *dnj-27* resultó en un aumento significativo en el patrón de parálisis de la estirpe CL2006 crecida a una temperatura constante de 20°C, con respecto al control sin silenciar. Con el fin de avanzar en el conocimiento del mecanismo detrás de esta protección por parte de *dnj-27*, estudiamos la posible asociación entre el agravamiento del fenotipo de parálisis y la formación de agregados de A β . El colorante fluorescente X-34 es un colorante vital de gran sensibilidad capaz de detectar específicamente depósitos de amiloide, tanto en el cerebro de pacientes con Alzheimer como en *C. elegans* transgénicos que expresen A β humano (C. D. Link *et al.*, 2001; Styren., Hamilton, Styren, & Klunk, 2000). Mediante inmunohistoquímica de animales CL2006 tratados con ARNi de *dnj-27* usando el colorante X-34, pudimos determinar que la inhibición de *dnj-27* produce un incremento moderado, aunque estadísticamente significativo, en la formación de depósitos amiloideos (Fig. 3.10).

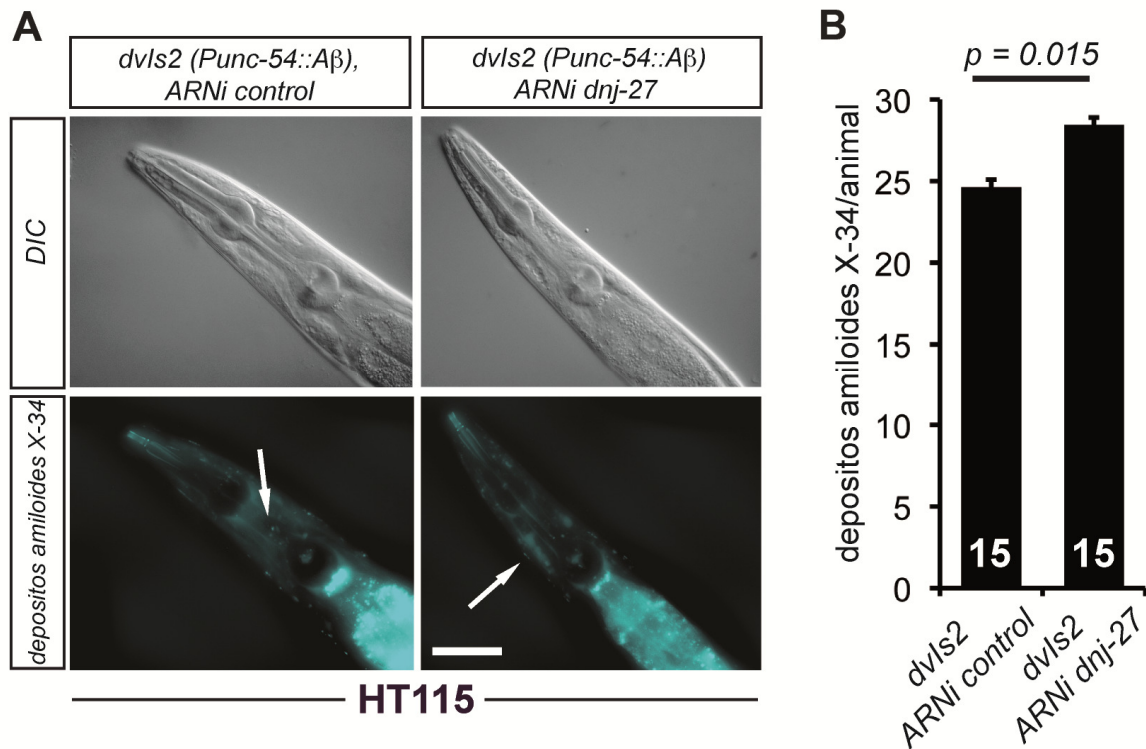


Figura 3.10. Efecto del silenciamiento de *dnj-27* por ARNi sobre la formación de depósitos amiloideos. A) Tinción con el colorante X-34 de los depósitos de A β en los músculos de la cabeza de animales CL2006, *dvls2 (Punc-54::A β)* en el primer día de adulto, crecidos en bacteria HT115 que lleva sólo el vector pL4440 sin inserto como control (paneles izquierdos) o en bacteria HT115 que expresa el ARN de doble cadena de *dnj-27* (paneles derechos). Las flechas indican los depósitos de A β . Barra = 50 μ m. B) Cuantificación del número de depósitos de A β reactivos a X-34 de animales tratados con ARNi control y ARNi para *dnj-27*. El número sobre cada columna indica el número de animales utilizados para cada tratamiento con ARNi. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0.015$).

Debido a que la inhibición de *dnj-27* empeora el fenotipo de parálisis dependiente de A β , a continuación nos preguntamos si niveles mayores de la proteína DNJ-27 darían lugar a una mejoría de la parálisis. Para ello generamos animales transgénicos que expresan la

Resultados

construcción *Pdnj-27::dnj-27*, a partir de la cual se producen niveles altos de DNJ-27 dirigida por el propio promotor endógeno de *dnj-27* (Fig. 3.11A). La sobreexpresión de *dnj-27* en nematodos A β transgénicos produjo una reducción en el patrón de parálisis comparado con sus hermanos no transgénicos que fueron utilizados como control (Fig 3.11B). Además, esta reducción vino acompañada de una acusada disminución de los depósitos de amiloides (Fig. 3.12A-B).

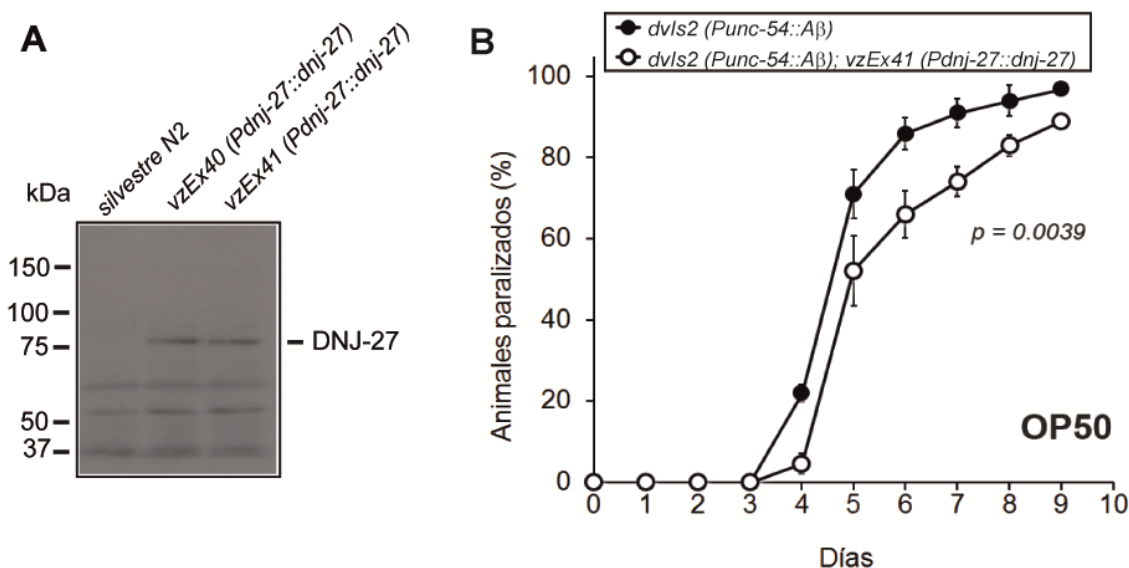


Figura 3.11. Efecto de la sobreexpresión de *dnj-27* sobre la parálisis progresiva asociada a A β . A) Los arrays *vzEx40* y *vzEx41* inducen la expresión de mayores niveles de la proteína DNJ-27. Western blot usando anticuerpos anti-DNJ-27 en animales silvestres N2 (carril 1), utilizados como control, y en estirpes transgénicas que sobreexpresan DNJ-27, a partir de los arrays *vzEx40* y *vzEx41* (carriles 2 y 3, respectivamente). Todos los carriles se cargaron con extractos de proteína total procedentes de 100 animales en primer día de adulto de la estirpe correspondiente, sincronizados previamente. Las bandas inespecíficas de menor tamaño se usaron como control de carga. B) Parálisis progresiva de animales transgénicos VZ158, que portan el array extracromosómico *vzEx41 (Pdnj-27::dnj-27 3'-UTR; Punc-122::GFP)*, y de sus hermanos no transgénicos, utilizados como control, crecidos en bacteria OP50. La gráfica representa la media de tres experimentos independientes, siendo las diferencias significativas ($p = 0.0039$).

Tanto el incremento en la formación de depósitos amiloides observados al interferir con el ARNi de *dnj-27*, como la disminución provocada por la sobreexpresión, podrían ser debidos a un aumento o una bajada, respectivamente, en los niveles totales de A β motivados, por ejemplo, por diferencias en la expresión, en la síntesis o en la degradación del péptido A β como consecuencia del silenciamiento o la sobreexpresión de *dnj-27*. Para examinar esta posibilidad, realizamos ensayos de western blot usando el anticuerpo monoclonal 6E10 específico contra el péptido A β , que es capaz de detectar todas las formas de A β : depósitos de amiloides, agregados amorfos, oligómeros, monómeros y A β soluble. Como se puede observar en la Figura 3.12C, no se encontraron diferencias importantes en los niveles de A β para ninguno de los casos, ni tampoco en la formación de las distintas especies oligoméricas de A β .

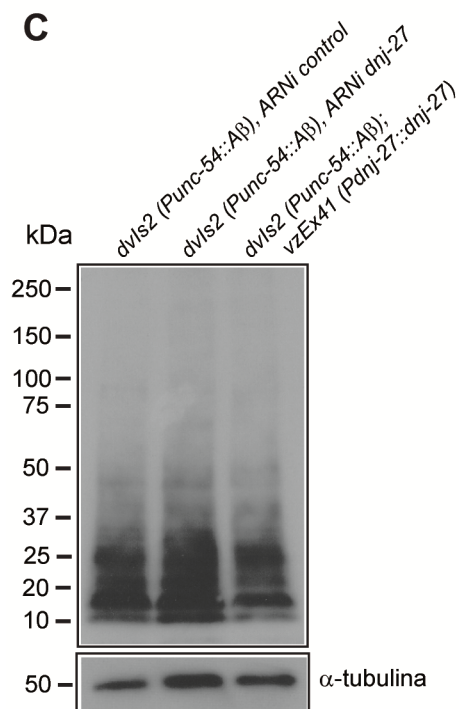
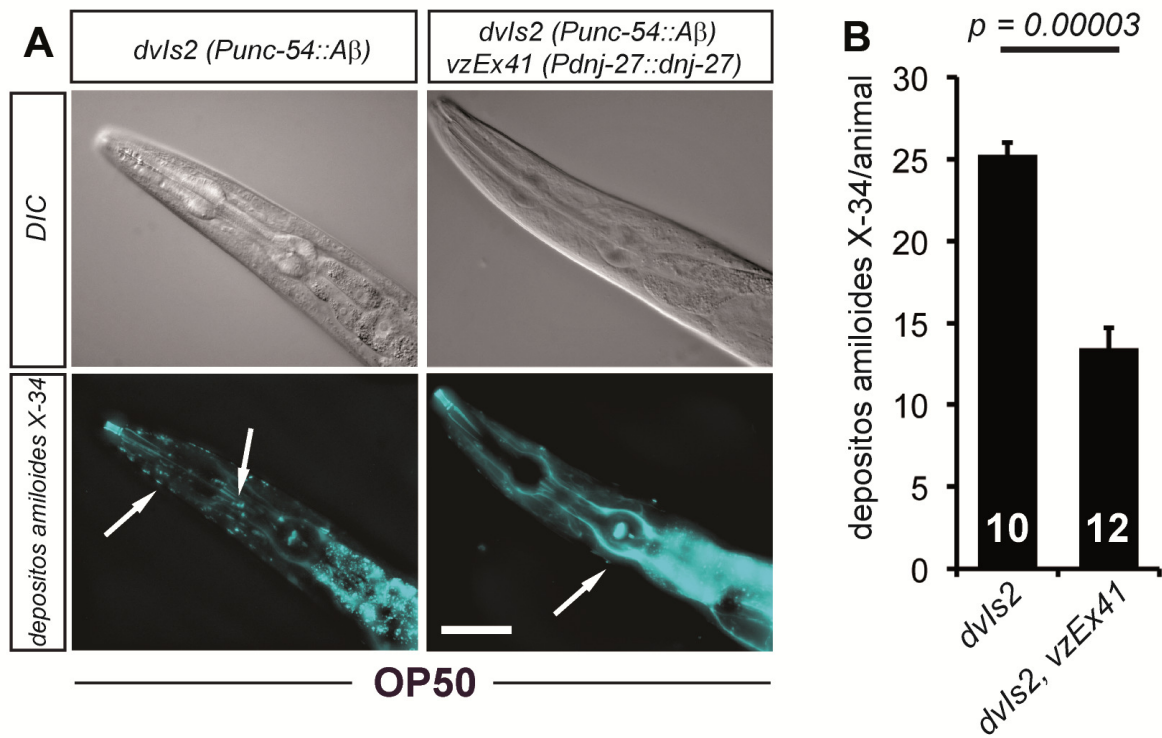


Figura 3.12. Efecto de la sobreexpresión de *dnj-27* sobre la formación de depósitos amiloides, y del silenciamiento y la sobreexpresión sobre los niveles totales de Aβ. A) Tinción con el colorante X-34 de los depósitos de Aβ en los músculos de la cabeza de animales CL2006, *dvls2 (Punc-54::Aβ)* (paneles izquierdos) y VZ158, que portan el array extracromosómico *vzEx41 [Pdnj-27::dnj-27::dnj-27 3'-UTR; Punc-122::GFP]* (paneles derechos), en el primer día de adultos crecidos en bacteria OP50. Las flechas indican los depósitos de Aβ. Barra = 50 μ m. B) Cuantificación del número de depósitos de Aβ reactivos a X-34 de animales CL2006 y VZ158. El número sobre cada columna indica el número de animales utilizados para cada caso. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0.00003$). C) Western blot para la detección de Aβ usando el anticuerpo monoclonal 6E10. Se cargaron todos los carriles con extractos de proteína total de 100 animales CL2006 y VZ158 en el primer día de adulto, sincronizados previamente y crecidos en bacteria HT115 que no expresa ningún ARN de doble cadena (carriles 1 y 3, respectivamente), y animales CL2006 crecidos en bacteria HT115 que expresa ARN de doble cadena de *dnj-27* (carril 2). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de Aβ ni en la formación de especies oligoméricas. Como control de carga se muestran los niveles de α -tubulina.

En conjunto, estos resultados demuestran una implicación *in vivo* de *dnj-27* tanto en la toxicidad asociada a Aβ como en la formación de depósitos amiloides en *C. elegans*.

3.5 Estudio del papel protector de *dnj-27* en estirpes transgénicas de *C. elegans* modelo de la enfermedad de Parkinson

La estirpe transgénica modelo de Parkinson que se utilizó para la evaluación inicial de los distintos ARNi fue la estirpe UA50 (ver apartado 6.1.1 del capítulo Materiales y Métodos) que incluye en el array integrado *baln13*, junto con la construcción $\alpha\text{-syn}::\text{GFP}$ que permite el seguimiento de la formación de los agregados, un plásmido para la co-expresión del gen *tor-2* también en células musculares del nematodo (Hamamichi *et al.*, 2008). *tor-2* es el ortólogo del gen humano *TOR1A*, que ha sido relacionado con la distonia de torsión, y cuya expresión en *C. elegans* lleva a una disminución de la agregación tanto de poliQ como de $\alpha\text{-syn}$ (Caldwell *et al.*, 2003; Hamamichi *et al.*, 2008). La estirpe UA50, por tanto, presenta una cantidad de agregados fluorescentes bastante baja permitiendo así fácilmente la identificación de genes que aumenten la agregación.

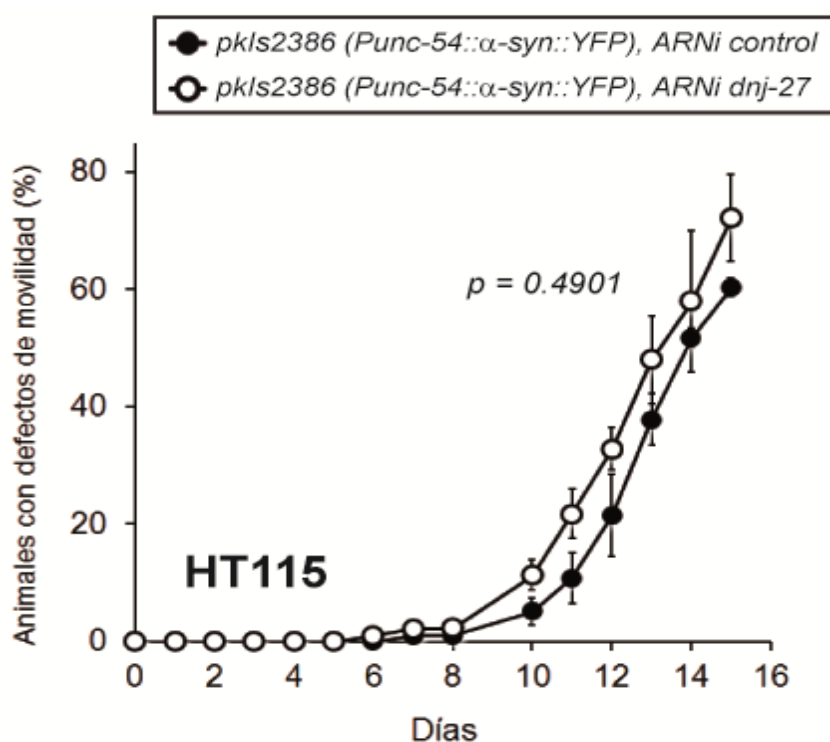


Figura 3.13. Efecto del silenciamiento de *dnj-27* por ARNi sobre la movilidad de la estirpe NL5901, *pkIs2386* (*Punc-54:: $\alpha\text{-syn}::\text{YFP}$*). Se crecieron los animales en bacteria HT115 que lleva sólo el vector pL4440 sin inserto (y que por tanto no expresa ARN de doble cadena), como control, o en bacteria HT115 que expresa el ARN de doble cadena de *dnj-27*. En la gráfica se representa la media de tres experimentos independientes, no encontrándose diferencias significativas ($p = 0.4901$).

Sin embargo, los agregados de $\alpha\text{-syn}::\text{GFP}$ originados en esta estirpe son de un tamaño muy pequeño siendo sólo observables a nivel celular, lo que dificulta enormemente

Capítulo III

la cuantificación de la agregación. Por esta razón, para cuantificar el número de agregados, decidimos recurrir a la estirpe NL5901 (ver apartado 6.1.1 del capítulo Materiales y Métodos) que expresa α -syn::YFP, y que da lugar a agregados fluorescentes de mayor tamaño en células musculares del gusano, mediante el uso del promotor de *unc-54* (van Ham *et al.*, 2008). Además, esta estirpe presenta una disminución progresiva de la movilidad de los nematodos con la edad asociada a la expresión de α -syn::YFP, que puede ser fácilmente cuantificada (van Ham *et al.*, 2010). Como se puede observar en la Figura 3.13, el silenciamiento de *dnj-27* en estos animales transgénicos condujo a un aumento en el porcentaje de individuos con defectos de movilidad, aunque en este caso no se alcanzó la significancia estadística. Sin embargo, confirmando los resultados obtenidos en la estirpe UA50, la reducción de los niveles de DNJ-27 provocó un aumento muy marcado de la agregación de α -syn::YFP (Fig. 3.14).

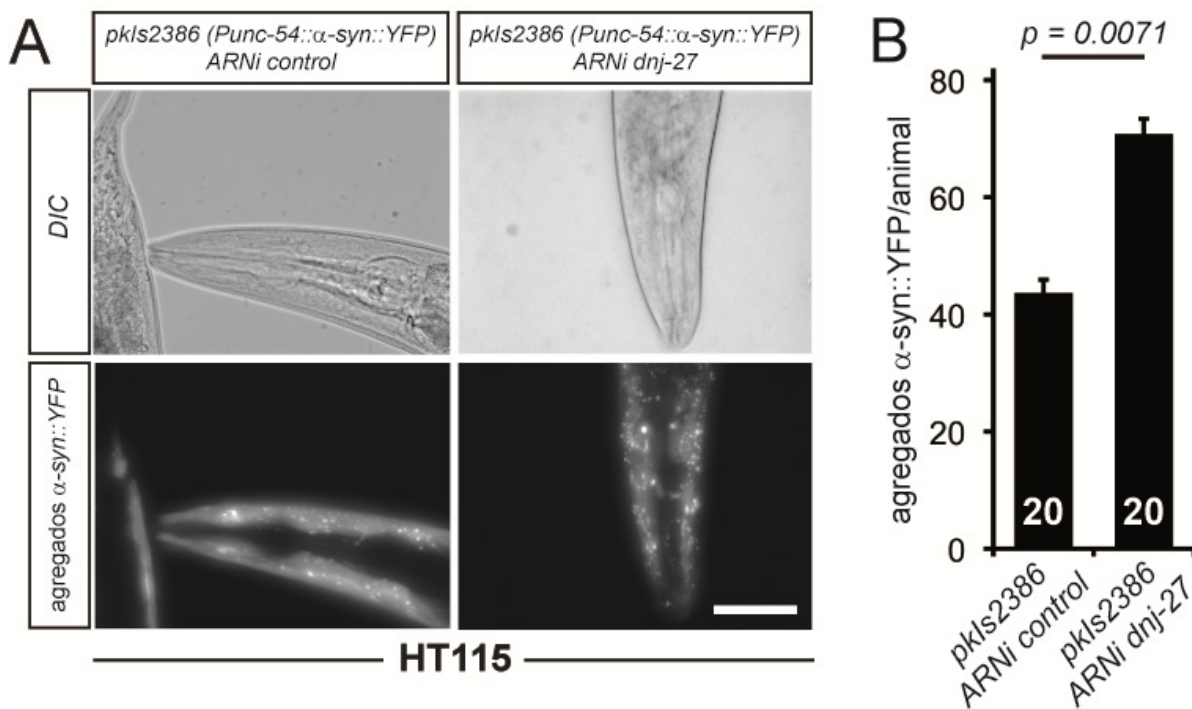


Figura 3.14. Efecto del silenciamiento de *dnj-27* por ARNi sobre la agregación de α -syn::YFP. A) Agregación de α -syn::YFP en células musculares de la cabeza de animales NL5901 en el primer día de adultos, crecidos en bacteria HT115 que lleva sólo el vector pL4440 sin inserto, como control (paneles izquierdos), o en bacteria HT115 que expresa el ARN de doble cadena de *dnj-27* (paneles derechos). Barra = 50 μ m. B) Cuantificación del número de agregados α -syn::YFP de animales tratados con ARNi control y ARNi para *dnj-27*. Se realizaron dos experimentos independientes, siendo el número sobre cada columna el número total de animales utilizados para cada tratamiento. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0.0071$).

Seguidamente nos planteamos estudiar si, al igual que ocurre con los animales transgénicos modelo de Alzheimer, la sobreexpresión de *dnj-27* protege de la toxicidad asociada a α -syn::YFP, así como de su agregación. Con este propósito generamos

animales α -syn transgénicos que además expresaban *dnj-27* desde su propio promotor. No obstante, los resultados obtenidos en este caso fueron bastante variables y poco reproducibles. Por este motivo, decidimos forzar la expresión de DNJ-27 directamente en las células musculares del nematodo mediante el uso del promotor de *myo-3* (Fig. 3.15A). De esta forma fuimos capaces de determinar que, efectivamente, animales α -syn transgénicos que sobrepresan *dnj-27* en sus células musculares, muestran una clara mejoría de la movilidad comparados con los nematodos control no transgénicos (Fig. 3.15B).

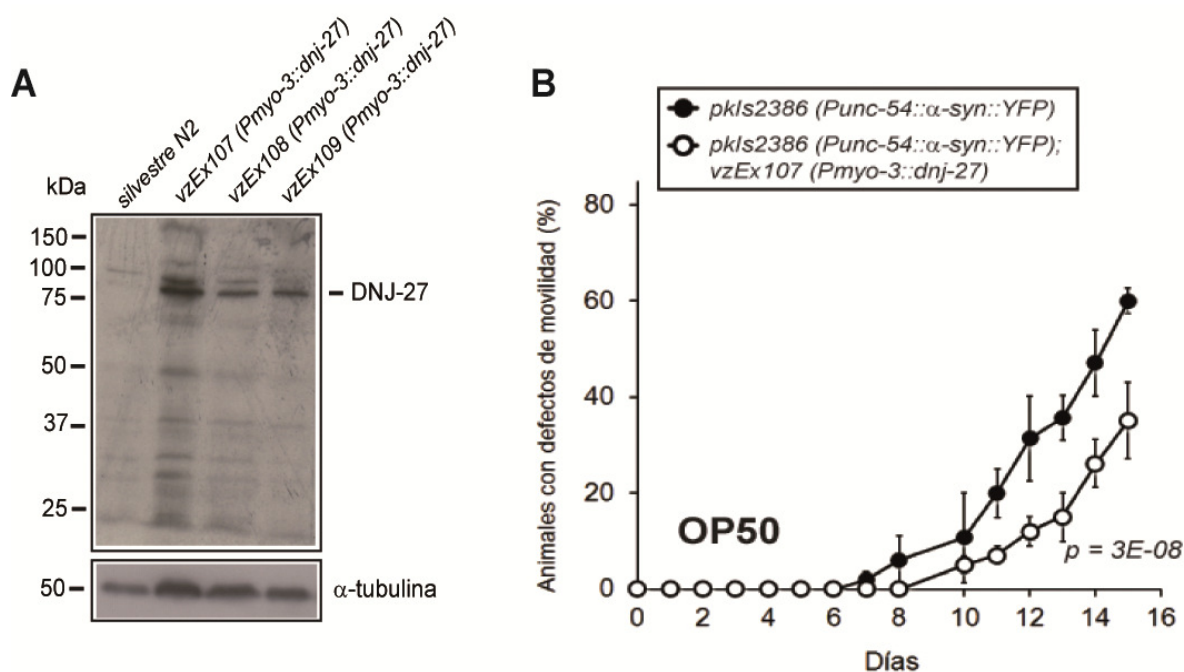


Figura 3.15. Efecto de la sobrexpresión de *dnj-27* sobre los defectos de movilidad asociados a α -syn::YFP. A) Western blot para la detección de DNJ-27. Se utilizó el anticuerpo policlonal anti-DNJ-27 en animales silvestres N2 (carril 1) y en tres estirpes transgénicas independientes que sobrepresan *dnj-27* bajo el control del promotor de *myo-3* (carriles 2,3 y 4). Como control de carga se muestran los niveles de α -tubulina. B) Defectos de movilidad de animales transgénicos VZ303, que portan el array extracromosómico *vzEx107* (*Pmyo-3::dnj-27* ADNc; *Ptrx-3::mCherry*), y de sus hermanos no transgénicos, utilizados como control, crecidos en bacteria OP50. La gráfica representa la media de tres experimentos independientes, encontrándose diferencias significativas ($p = 3E-08$).

Esta reducción de la toxicidad de la α -syn está acompañada, además, de un descenso muy acusado en el número de agregados de α -syn::YFP (Fig. 3.16A-B). Al igual que hicimos con las estirpes que expresan $A\beta$, y para descartar una posible influencia de DNJ-27 en la síntesis, expresión o procesamiento de α -syn, realizamos ensayos de western blot usando un anticuerpo anti-GFP, capaz de detectar también YFP, para determinar los niveles totales de α -syn::YFP. Como se muestra en la Figura 3.16C, la cantidad de α -syn::YFP no se vio afectada ni por el ARNi de *dnj-27* ni por la sobrexpresión del mismo.

Capítulo III

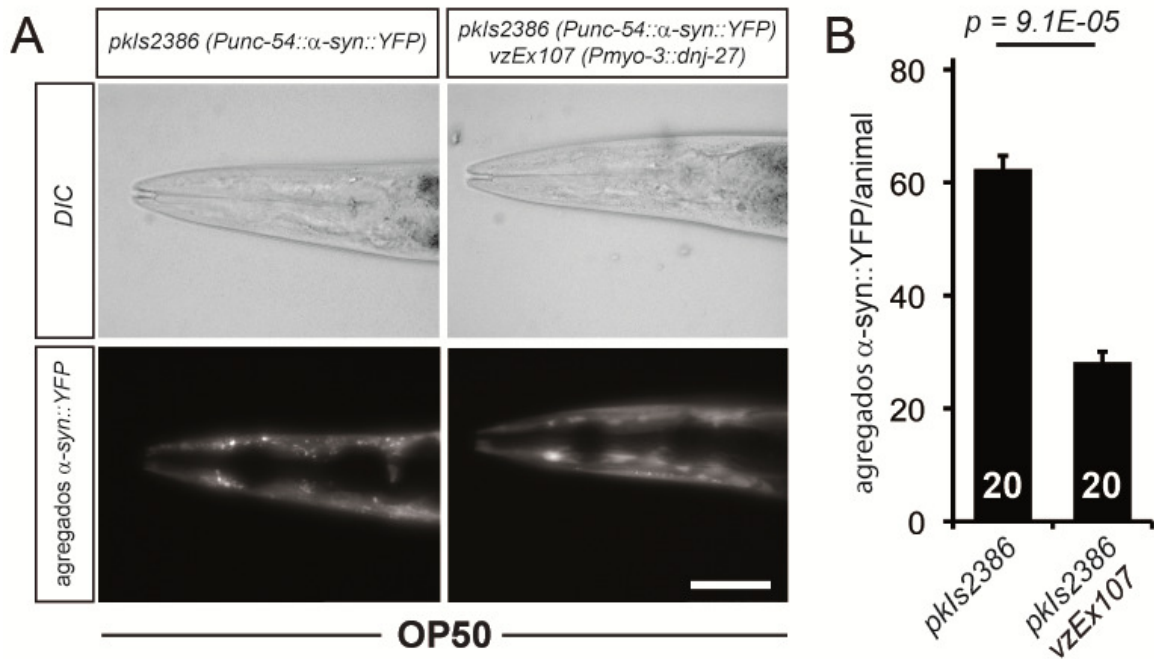
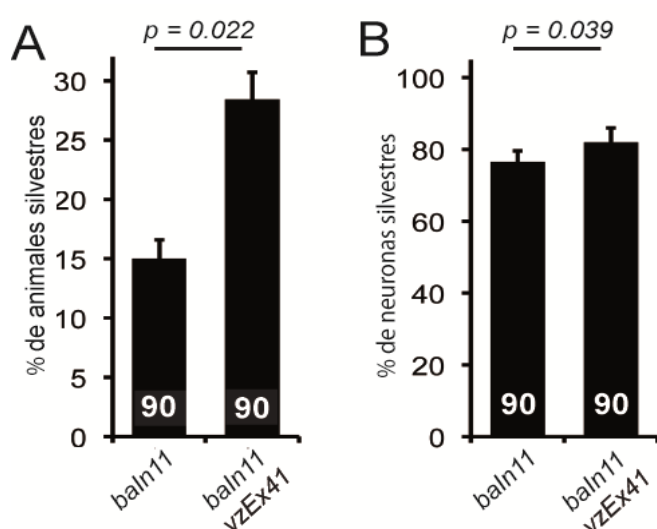


Figura 3.16. Efecto de la sobreexpresión de *dnj-27* sobre la agregación de α-syn::YFP, y del silenciamiento y la sobreexpresión sobre los niveles totales de α-syn::YFP.

A) Agregación de α-syn::YFP en células musculares de la cabeza de animales en el primer día de adulto NL5901 (paneles izquierdos) y VZ303 (paneles derechos), crecidos en bacteria OP50. Barra = 50 μm. B) Cuantificación del número de agregados de los animales NL5901 y VZ303. Se realizaron dos experimentos independientes, siendo el número sobre cada columna el número total de animales para cada caso. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 9.1E-05$). C) Western blot para la detección de α-syn::YFP usando un anticuerpo anti-GFP. Se cargaron todos los carriles con extractos de proteína total de 100 animales NL5901 y VZ303 (que sobreexpresan *dnj-27*) en el primer día de adulto, sincronizados previamente y crecidos en bacteria HT115 que no expresa ningún ARN de doble cadena (carriles 1 y 3, respectivamente), y animales NL5901 crecidos en bacteria HT115 que expresa ARN de doble cadena de *dnj-27* (carril 2). Como control de carga se muestran los niveles de α-tubulina.

Como ya se indicó anteriormente, la principal característica a nivel celular de la enfermedad de Parkinson es la degeneración de neuronas dopaminérgicas (Spillantini *et al.*, 1998). Por esa razón, a continuación decidimos analizar si la protección de *dnj-27* sería extensiva también a un modelo de neurodegeneración dopaminérgica inducida por α-syn en *C. elegans* (Cooper *et al.*, 2006). Para este objetivo, se utilizó la estirpe UA44 (ver apartado

6.1.1 del capítulo Materiales y Métodos), que expresa específicamente α -syn humana en neuronas dopaminérgicas, usando para ello el promotor del transportador de dopamina DAT-1. Esto provoca la degeneración de estas neuronas dopaminérgicas, las cuales pueden ser identificadas gracias el marcaje de las mismas mediante la co-expresión de *Pdat-1::GFP* (Cooper *et al.*, 2006). La sobreexpresión de *dnj-27* bajo el control de su propio promotor endógeno propició una mejoría tanto en el porcentaje de animales con todas sus neuronas dopaminérgicas intactas, como en la proporción de neuronas no degeneradas (Fig. 3.17).



de 7 días de edad. La gráfica representa la media de tres experimentos independientes, siendo el número sobre cada columna el número total de animales utilizados por cada estirpe. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0.039$).

En conclusión, nuestros datos revelan también el papel protector *in vivo* de *dnj-27* sobre la toxicidad de α -syn, tanto en células musculares como en células neuronales, así como su implicación en la inhibición de la agregación de este péptido.

3.6 Estudio del papel protector de *dnj-27* en estirpes transgénicas de *C. elegans* modelo de enfermedades de poliglutamina

Para comprobar si la protección de *dnj-27* podría hacerse extensiva a otros modelos de proteotoxicidad basados en proteínas con tendencia a agregar distintas a las estudiadas hasta ahora, recurrimos a una estirpe transgénica de *C. elegans* ampliamente utilizada como modelo de enfermedades de poliglutamina (Morley *et al.*, 2002). Esta estirpe es la AM141 (ver apartado 6.1.1 del capítulo Materiales y Métodos), la cual presenta problemas de movilidad como resultado de la expresión de 40 residuos de glutamina fusionados a YFP (Q40::YFP) en células musculares del nematodo, utilizando para ello el promotor de *unc-54*.

Capítulo III

En primer lugar decidimos estudiar el efecto del silenciamiento de *dnj-27* por ARNi en la movilidad de la estirpe AM141. Como se muestra en la Figura 3.18, la disminución de los niveles de DNJ-27 resultó en un mayor porcentaje de animales con problemas de movilidad.

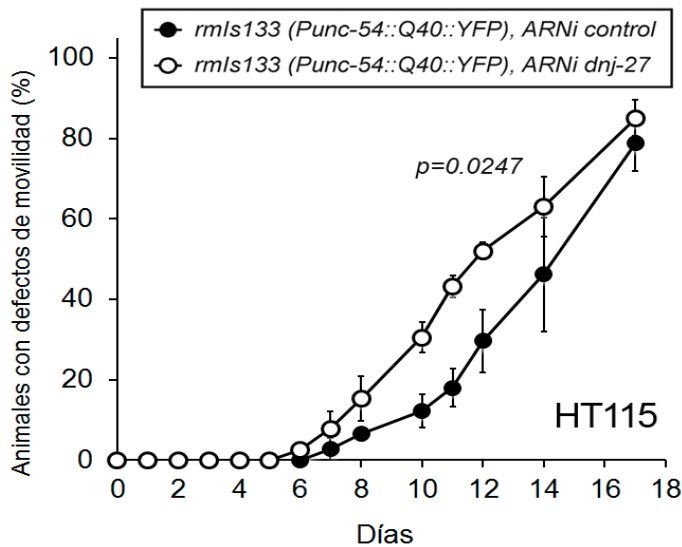


Figura 3.18. Efecto del silenciamiento de *dnj-27* por ARNi sobre la movilidad de la estirpe AM141, *rmls133* (*Punc-54::Q40::YFP*). Se criaron los animales en bacteria HT115 que lleva sólo el vector pL4440 sin inserto (y que por tanto no expresa ARN de doble cadena) como control o en bacteria HT115 que expresa el ARN de doble cadena de *dnj-27*. En la gráfica se representa la media de tres experimentos independientes, siendo las diferencias significativas ($p = 0.0247$).

Este aumento de los problemas de movilidad vino también acompañado por un incremento de 4 veces el número de agregados de Q40::YFP del control (Fig. 3.19).

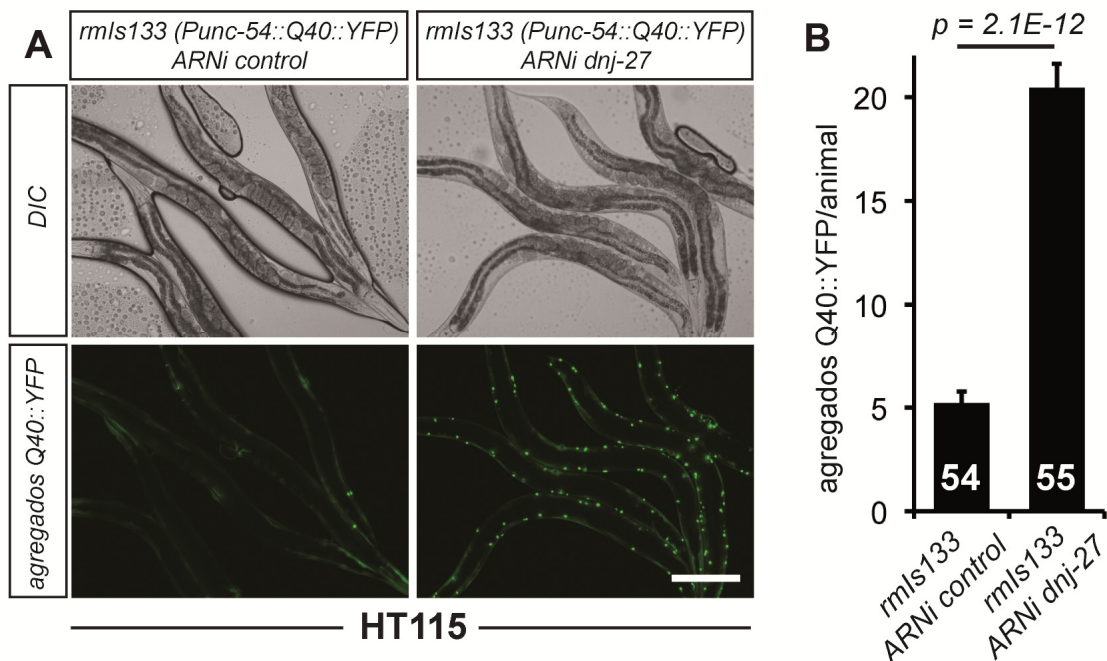


Figura 3.19. Efecto del silenciamiento de *dnj-27* por ARNi sobre la agregación de Q40::YFP. A) Agregación de Q40::YFP en las células musculares de animales AM141 en el primer día de adultos, crecidos en bacteria HT115 que lleva sólo el vector pL4440 sin inserto, como control (paneles izquierdos), o en bacteria HT115 que expresa el ARN de doble cadena de *dnj-27* (paneles derechos). Barra = 200 μ m. B) Cuantificación del número de agregados Q40::YFP de animales tratados con ARNi control y ARNi para *dnj-27*. Se realizaron tres experimentos independientes, siendo el número sobre cada columna el número total de animales utilizados para cada tratamiento. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 2.1E-12$).

Por el contrario, los defectos de movilidad de la estirpe AM141 no disminuyeron al sobreexpresar *dnj-27* en células musculares, como se muestra en la Figura 3.20, si comparamos animales transgénicos con altos niveles de DNJ-27 con sus correspondientes hermanos no transgénicos usados como control.

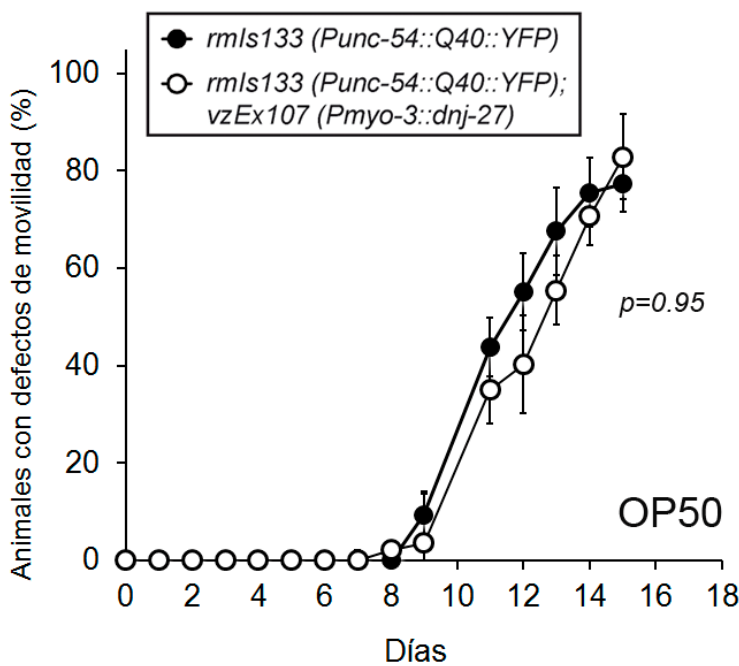


Figura 3.20. Efecto de la sobreexpresión de *dnj-27* sobre los defectos de movilidad asociados a Q40::YFP. Defectos de movilidad de animales VZ299 que portan el array extracromosómico *vzEx107 (Pmyo-3::dnj-27 ADNc; Ptrx-3::mCherry)* y de sus hermanos no transgénicos, utilizados como control, crecidos en bacteria OP50. La gráfica representa la media de dos experimentos independientes, sin que se encontraran diferencias significativas ($p = 0.95$).

Se encontró, sin embargo, una reducción estadísticamente significativa en el número de agregados fluorescentes en los animales que sobreexpresaban *dnj-27* (Fig. 3.21A-B). Al igual que hicimos anteriormente con los modelos de Alzheimer y Parkinson, y para descartar que DNJ-27 pudiera tener algún efecto sobre los niveles totales de Q40::YFP, realizamos ensayos de western blot sobre los extractos totales de nematodos AM141 y VZ299, que portan el array extracromosómico *vzEx107 (Pmyo-3::dnj-27 ADNc; Ptrx-3::mCherry)*, usando anticuerpos anti-GFP, que también son capaces de reconocer la proteína fluorescente YFP. En este caso, como se puede observar en la Figura 3.21C, aparece una doble banda para Q40::YFP, probablemente como consecuencia de algún proceso proteolítico sobre esta proteína de fusión. Sin embargo, de manera similar a los resultados obtenidos para A β y α -syn, los niveles totales de Q40::YFP no cambiaron por el efecto del silenciamiento ni de la sobreexpresión de *dnj-27*.

Capítulo III

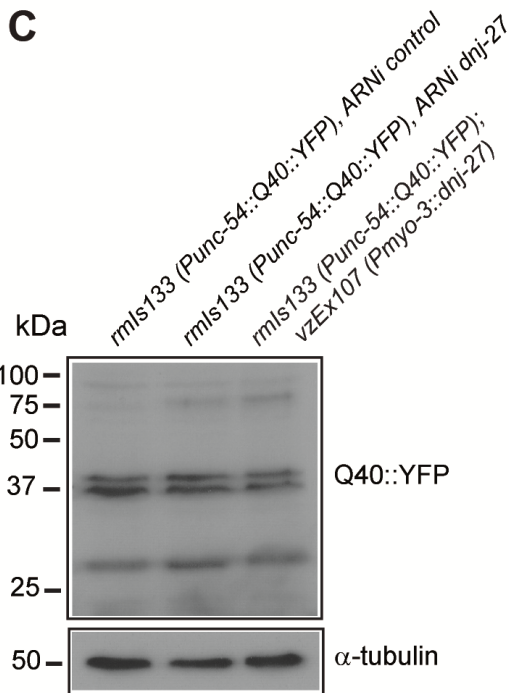
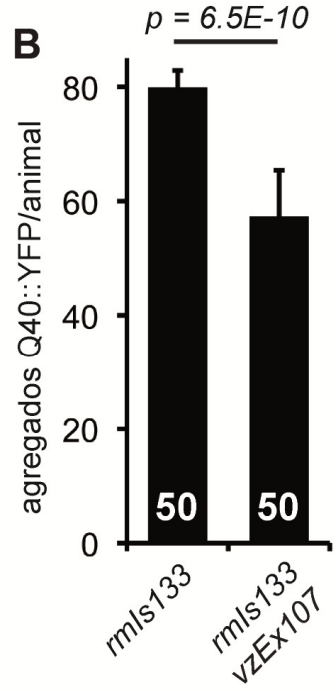
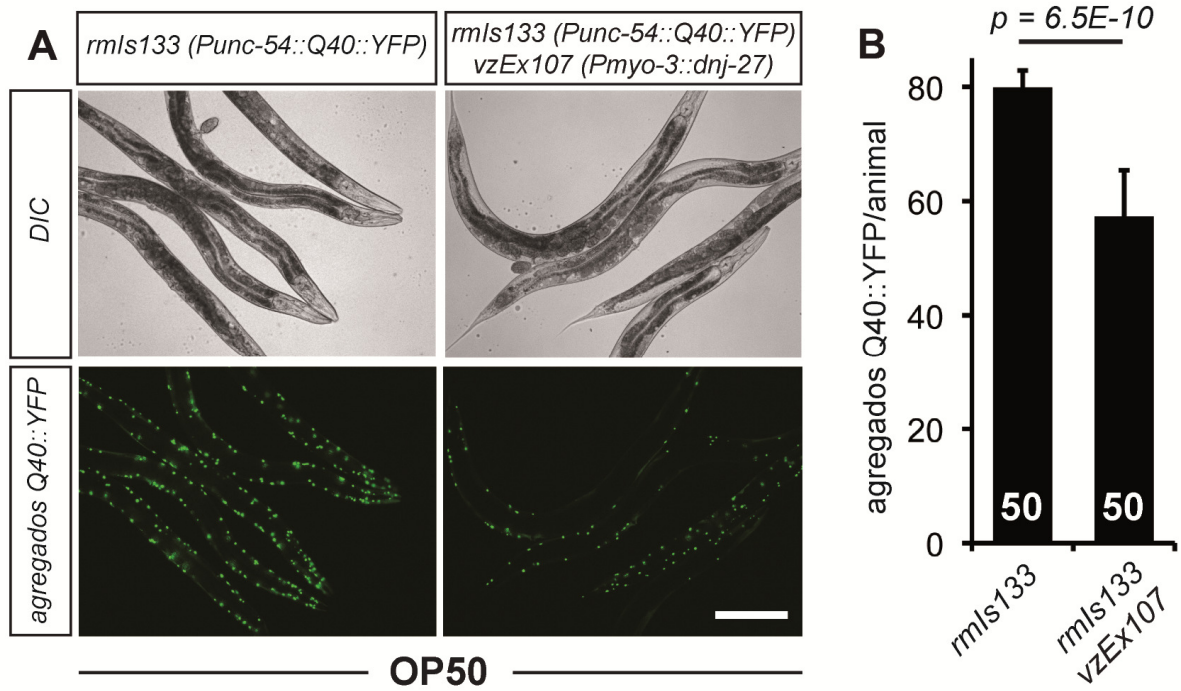


Figura 3.21. Efecto de la sobreexpresión de *dnj-27* sobre la agregación de Q40::YFP, y del silenciamiento y la sobreexpresión sobre los niveles totales de Q40::YFP. A) Agregación de Q40::YFP en células musculares de animales en el primer día de adulto AM141 (paneles izquierdos) y VZ299, que expresa el transgen *vzEx107* (*Pmyo-3::dnj-27* ADNc; *Ptrx-3::mCherry*) (paneles derechos), crecidos en bacteria OP50. Barra = 200 μ m. B) Cuantificación del número de agregados de los animales AM141 y VZ299. Se realizaron tres experimentos independientes, siendo el número sobre cada columna el número total de animales para cada caso. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 6.5E-10$). C) Western blot para la detección de Q40::YFP usando un anticuerpo anti-GFP. Se cargaron todos los carriles con extractos de proteína total de 100 animales AM141 y VZ299 en el primer día de adulto, sincronizados previamente y crecidos en bacteria HT115 que no expresa ningún ARN de doble cadena (carriles 1 y 3, respectivamente), y animales AM141 crecidos en bacteria HT115 que expresa ARN de doble cadena de *dnj-27* (carril 2). Como control de carga se muestran los niveles de α -tubulina.

En conjunto, los datos mostrados en los tres últimos apartados demuestran que *dnj-27* es un gen que juega un papel protector *in vivo* sobre la agregación y la toxicidad asociada a los péptidos con tendencia a agregar A β , α -syn y poliQ en modelos de enfermedades de Alzheimer, Parkinson y poliglutamina en el nematodo *C. elegans*.

3.7 Estudio de la expresión de *ERdj5* humano en estirpes transgénicas de *C. elegans* modelo de enfermedades neurodegenerativas

Como se comentó en apartados anteriores, *dnj-27* es el ortólogo del gen *ERdj5* de mamífero. Para determinar si el efecto protector de *dnj-27* se ha conservado a lo largo de la evolución, decidimos expresar el gen *ERdj5* humano en los distintos modelos de enfermedades neurodegenerativas utilizados en este estudio. Para ello se clonó el ADN complementario (ADNc) del gen *ERdj5* humano en el vector pPD95.77, uno de los vectores desarrollados en el laboratorio de Andrew Fire para la expresión de genes en *C. elegans*. Tras ello, se incorporó a esta construcción el promotor del gen *myo-3*, para dirigir la expresión de *ERdj5* a las células musculares de *C. elegans*, y se generaron los correspondientes animales transgénicos mediante microinyección.

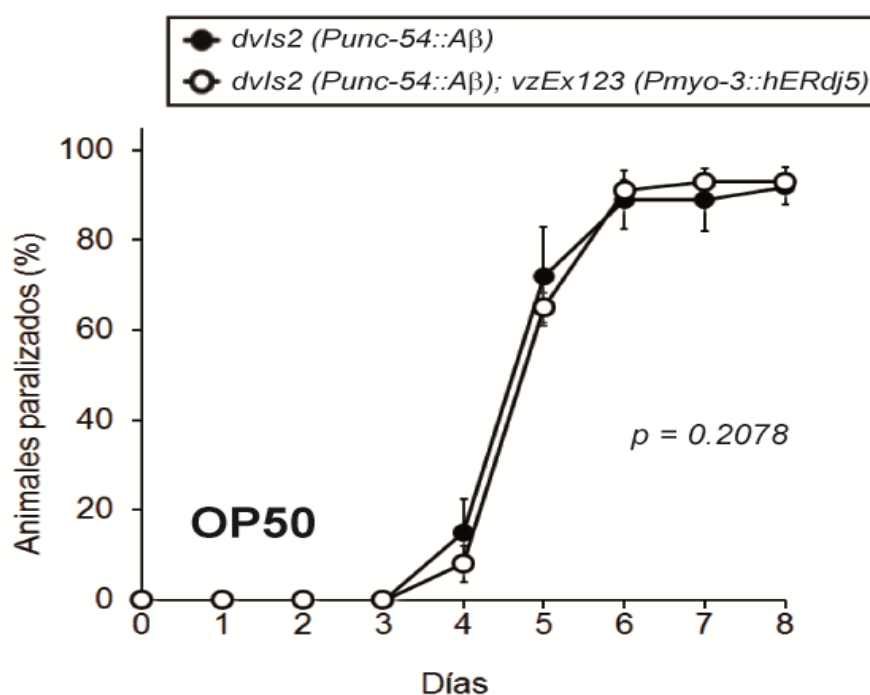


Figura 3.22. Efecto de la expresión de *ERdj5* humano sobre el fenotipo de parálisis progresiva asociado a A β en *C. elegans*. Parálisis de animales CL2006, *dvIs2* (*Punc-54::Aβ*) y de su estirpe derivada VZ317, que porta el array extracromosómico *vzEx123* (*Pmyo-3::hERdj5*), crecidos en bacteria OP50. La gráfica representa la media de dos experimentos independientes, no encontrándose diferencias significativas ($p = 0.2078$).

Para estudiar el efecto de la expresión de *ERdj5* humano en el modelo de Alzheimer, recurrimos al análisis del fenotipo de parálisis asociado a la expresión de A β . Al contrario de lo ocurrido al sobreexpresar *dnj-27*, no se produjo ninguna mejoría en el patrón de parálisis de nematodos transgénicos que expresaban *ERdj5* (Fig. 3.22). Sin embargo, es importante mencionar en este punto, que la sobreexpresión de *ERdj5* en estos animales modelo de Alzheimer provoca un fuerte fenotipo de arresto embrionario y larvario, posiblemente debido

Capítulo III

a que la co-expresión de altos niveles de ERdj5 y de A β , ambos en el retículo endoplasmático, resulta deletérea para el animal. Por tanto, dado que los ensayos de parálisis se realizan con nematodos adultos, es razonable pensar que los animales seleccionados para los ensayos, que lógicamente han alcanzado el estado adulto, son aquellos que expresan los niveles más bajos de *ERdj5*, explicando así la falta de mejoría de la parálisis.

Por el contrario, la expresión del gen *ERdj5* humano en nematodos transgénicos de modelos de Parkinson y de enfermedades de poliglutamina condujo a una reducción significativa del número de agregados de α -syn::YFP y de Q40::YFP, respectivamente (Fig. 3.23 y 3.24).

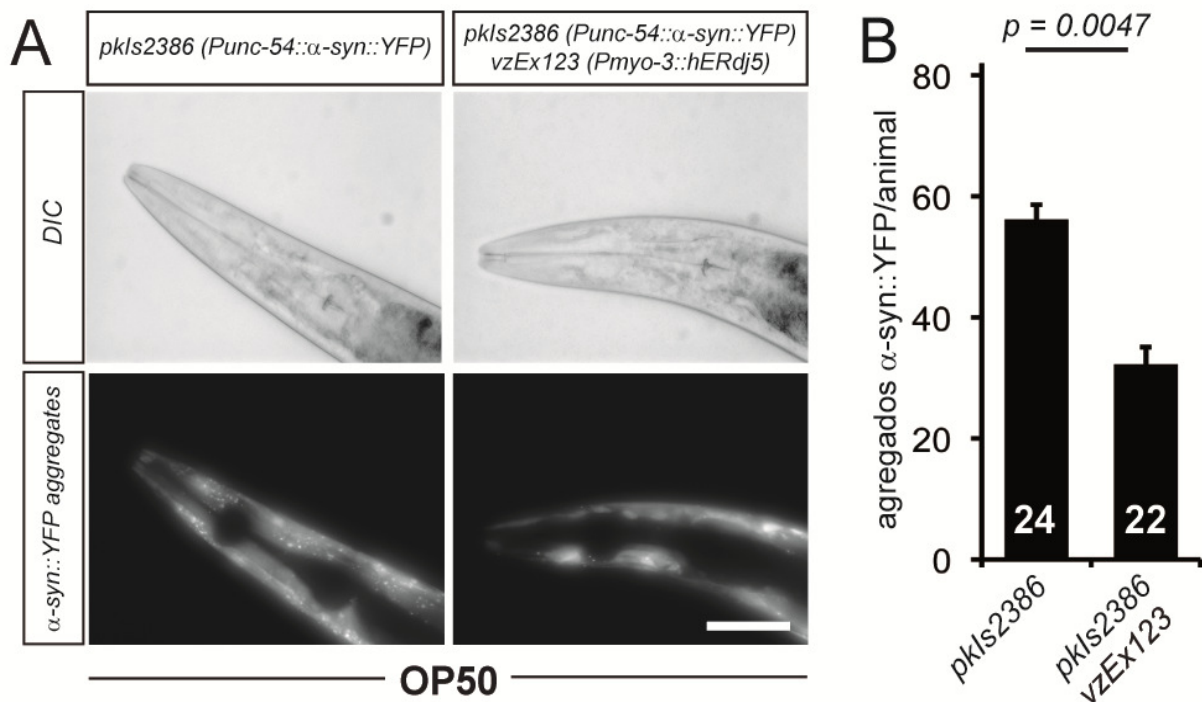


Figura 3.23. Efecto de la expresión de *ERdj5* humano sobre la agregación de α -syn::YFP en *C. elegans*. A) Agregación de α -syn::YFP en el músculo de la cabeza de animales NL5901 (paneles izquierdos) y de su estirpe transgénica derivada VZ316, que porta el array extracromosómico *vzEx123 (Pmyo-3::hERdj5)*, crecidos en bacteria OP50, en el primer día de adulto. Barra = 50 μ m. B) Cuantificación del número de agregados α -syn::YFP de los animales NL5901 y VZ316. Se realizaron dos experimentos independientes, siendo el número sobre cada columna el número total de animales para cada estirpe. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0.0047$).

De esta forma, estos resultados vienen a confirmar que el papel protector de *dnj-27* sobre la proteostasis citoplasmática está conservada en *ERdj5* de humano, apoyando que *dnj-27* es funcionalmente el homólogo de *ERdj5*. Se pone así de manifiesto el posible papel protector que *ERdj5* pueda jugar en estas patologías en humanos.

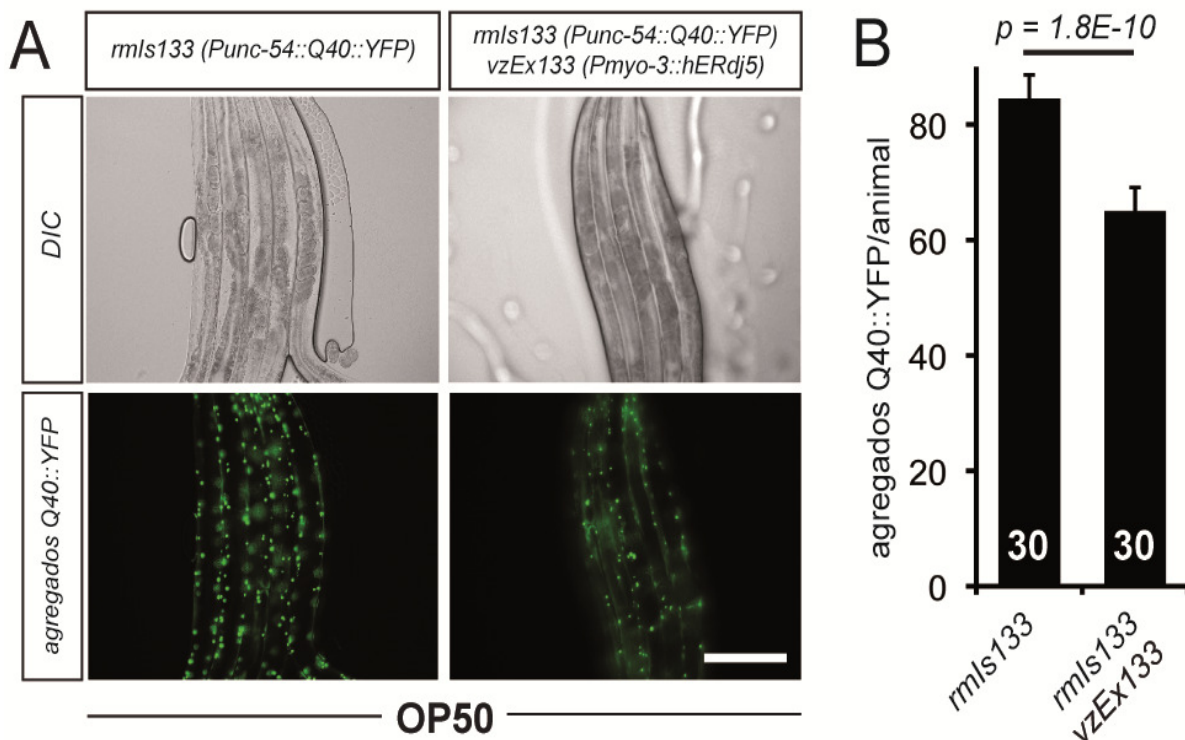


Figura 3.24. Efecto de la expresión de *ERdj5* humano sobre la agregación de Q40::YFP en *C. elegans*. A) Agregación de Q40::YFP en las células musculares de animales en el primer día de adulto AM141 (paneles izquierdos) y de su estirpe transgénica derivada VZ363, que porta el array extracromosómico *vzEx133* (*Pmyo-3::hERdj5*), crecidos en bacteria OP50. Barra = 200 μ m. B) Cuantificación del número de agregados Q40::YFP de los animales AM141 y VZ363. Se realizaron dos experimentos independientes, siendo el número sobre cada columna el número total de animales para cada estirpe. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 1.8E-10$).

3.8 Estudio del papel protector de otros genes implicados en ERAD en estirpes transgénicas de *C. elegans* modelo de enfermedades neurodegenerativas

Varios genes de *C. elegans* implicados en ERAD han sido identificados anteriormente. Entre ellos se encuentran: *cup-2* y *R151.6*, que codifican para derlinas, proteínas propuestas como candidatos miembros del canal de retrotranslocación (Schaheen, Dang, & Fares, 2009; Schekman, 2004; Y. Ye *et al.*, 2004); *sel-1*, ortólogo del gen *SEL1L* de humano (Urano *et al.*, 2002), cuya proteína forma parte del complejo HRD encargado de la degradación de proteínas residentes del retículo endoplasmático (Hampton, Gardner, & Rine, 1996); *sel-11/hrd-1* y *hrdl-1*, que codifican para dos E3 ubiquitin ligasas (Sasagawa, Yamanaka, & Ogura, 2007); y *cdc-48.1* y *cdc-48.2*, que codifican para unas chaperonas, homólogas de p97, que son capaces de llevar sustratos ubiquitinados del retículo al proteosoma (Mouysset, Kähler, & Hoppe, 2006).

Como se comentó en la introducción, las proteínas mal plegadas que se degradan

Capítulo III

por medio de la ruta de la ERAD pasan por diferentes fases, las cuales comprenden el reconocimiento del sustrato, marcaje, retrotranslocación, ubiquitinación y degradación en el proteosoma (Vembar & Bodsky, 2008). Así, el complejo supramolecular formado por EDEM y ERdj5 formaría parte de las fases de reconocimiento y marcaje del sustrato. Por otro lado, *cup-2* y *R151.6* estarían implicados en la retrotranslocación, *sel-1*, *sel-11/hrd-1* y *hrdl-1* participarían en la ubiquitinación del sustrato, mientras que *cdc-48.1* y *cdc-48.2* estarían implicados en el envío del sustrato al proteosoma y en su degradación en el mismo.

Nos preguntamos a continuación si estos otros genes, que realizan su función en fases distintas de la ERAD, tendrían algún impacto en los procesos de agregación y toxicidad de los péptidos con tendencia a agregar objeto de estudio. Por ello, decidimos estudiar el efecto del silenciamiento de estos genes por ARNi sobre la parálisis asociada a A β así como sobre la agregación de poliQ, y aprovechar datos publicados anteriormente para conocer el efecto sobre la agregación de α -syn. Como se muestra en la tabla 3.2, se encontró un incremento en la parálisis de los animales modelo de Alzheimer y en la agregación de poliQ para los cinco genes relacionados con la ERAD que fueron interferidos con ARNi. Cabe destacar además que, entre todos ellos, la bajada de los niveles de *sel-11/hrd-1* dio lugar a un fenotipo sintético de letalidad en ambos modelos.

Como se ha comentado, el efecto de la interferencia de estos genes sobre la agregación de α -syn fue analizado utilizando los datos publicados de dos estudios genéticos realizados en los dos modelos de Parkinson en *C. elegans* descritos en esta tesis, trabajos en los cuales se estudió la modulación de la agregación de α -syn (Hamamichi *et al.*, 2008; van Ham *et al.*, 2008). Estos datos no son reproducibles en su totalidad ya que, como se muestra en la tabla 3.2, aparecen algunas diferencias entre ambos trabajos para los resultados obtenidos con los ARNi de *hrdl-1* y *R151.6*, genes que favorecen la agregación de α -syn en uno de los estudios y no así en el otro. Sin duda, esto podría explicarse como consecuencia de las posibles diferencias en la sensibilidad al silenciamiento por ARNi de las estirpes utilizadas en cada ensayo o al número de copias de α -syn, ya que se usaron diferentes estirpes y, por tanto, distintos arrays integrados. De cualquier manera, cuando se combinaron los resultados procedentes de los dos estudios se pudo comprobar que cuatro de los cinco genes candidatos fueron incluidos en ambos, y que, dos de estos genes (*hrdl-1* y *R151.6*) aumentaron la agregación de α -syn. En conjunto, se puede inferir de estos estudios que, probablemente, no todos los genes de ERAD juegan un papel en la agregación de α -syn, como parece ser el caso para *cup-2* y *sel-11*.

Tabla 3.2. Silenciamiento por ARNi de genes implicados en la ruta de la ERAD.

Gen	ortólogo humano	Efecto sobre la parálisis de CL2006 ^a	Efecto sobre la agregación de UA50 ^b	Efecto sobre la agregación de NL5901 ^c	Efecto sobre la agregación de AM141 ^a
<i>sel-1</i>	<i>SEL1L</i>	+	No ensayado	No ensayado	+
<i>sel-11/hrd-1</i>	<i>SYVN1</i>	letalidad sintética	Ningún efecto	No ensayado	letalidad sintética
<i>hrdl-1</i>	<i>AMFR</i>	+	++	Ningún efecto	++
<i>cup-2</i>	<i>DERL1</i>	++	No ensayado	Ningún efecto	+
<i>R151.6</i>	<i>DERL2</i>	++	Ningún efecto	++	++

+ aumento moderado del fenotipo

++ fuerte aumento del fenotipo

^a Este estudio

^b (Hamamichi *et al.*, 2008)

^c (van Ham *et al.*, 2008)

Los ARNi de los genes implicados en el marcaje para el proteosoma y la degradación, *cdc-48.1* y *cdc-48.2*, no pudieron ser ensayados debido a que ambos presentan por sí solos un fenotipo de letalidad embrionaria y larvaria. Sin embargo, cabe mencionar que un trabajo publicado anteriormente ha demostrado que la sobreexpresión de ambos genes es capaz de suprimir la formación de agregados de poliQ en *C. elegans*, sugiriendo por tanto un papel protector de estos genes en este modelo (Yamanaka, Okubo, Suzuki, & Ogura, 2004).

En conjunto, estos datos nos indican que la mayoría de los genes relacionados con ERAD protegen frente a la toxicidad y la agregación de las distintas proteínas con tendencia a agregar ensayadas, aunque esta protección no es completa en todos los casos.

3.9 Análisis de la activación de la UPR en modelos de enfermedades neurodegenerativas en *C. elegans*

Dado que la ruta de la ERAD y la UPR están íntimamente relacionadas, y teniendo en cuenta la protección mostrada por la mayoría de los genes involucrados en ERAD estudiados, incluido *dnj-27*, decidimos analizar si en los distintos modelos de enfermedades neurodegenerativas utilizados, la UPR se encuentra activa. Para ello recurrimos nuevamente al marcador de estrés en el retículo *Phsp-4::GFP*.

Capítulo III

Cuando los niveles de expresión de este marcador de estrés fueron analizados en la estirpe modelo de Alzheimer que expresa A β de forma constitutiva, se pudo observar inducción del promotor de *hsp-4* (Fig. 3.25), que además se produce de forma específica en las células musculares del nematodo, donde se dirige la expresión de A β humano.

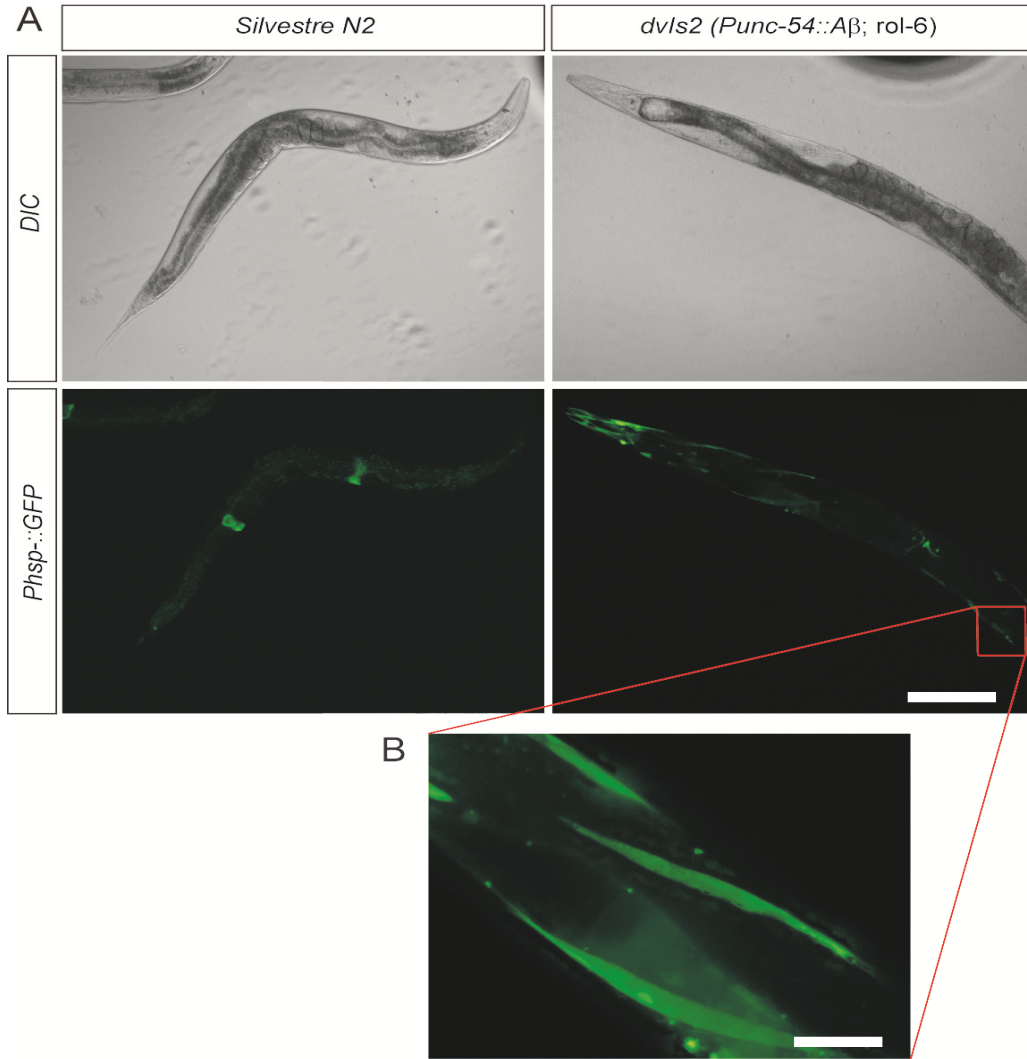


Figura 3.25. Activación de la UPR en *C. elegans* inducida por la expresión de A β humano. A) Expresión del marcador de estrés del retículo endoplasmático *Phsp-4::GFP* en animales silvestres (paneles izquierdos) y en la estirpe CL2006, *dvIs2 (Punc-54::A β ; rol-6)* (paneles derechos). Barra = 200 μ m B) Detalle aumentado de la imagen correspondiente a la expresión de *Phsp-4::GFP* en la estirpe CL2006, donde se puede observar la inducción de GFP específicamente en músculo. El patrón de expresión de GFP en espiral es debido al marcador *rol-6* del array integrado *dvIs2*, que produce fenotipo "Roller", el cual consiste en un movimiento rotario del animal sobre su eje longitudinal. Barra = 50 μ m.

Estos resultados nos indican que la expresión de A β en *C. elegans* provoca activación de la UPR y, por tanto, estrés en el retículo. Usando ARNi para la inhibición de A β en estos animales pudimos corroborar que la inducción de estrés es debida a la expresión de A β (Fig. 3.26).

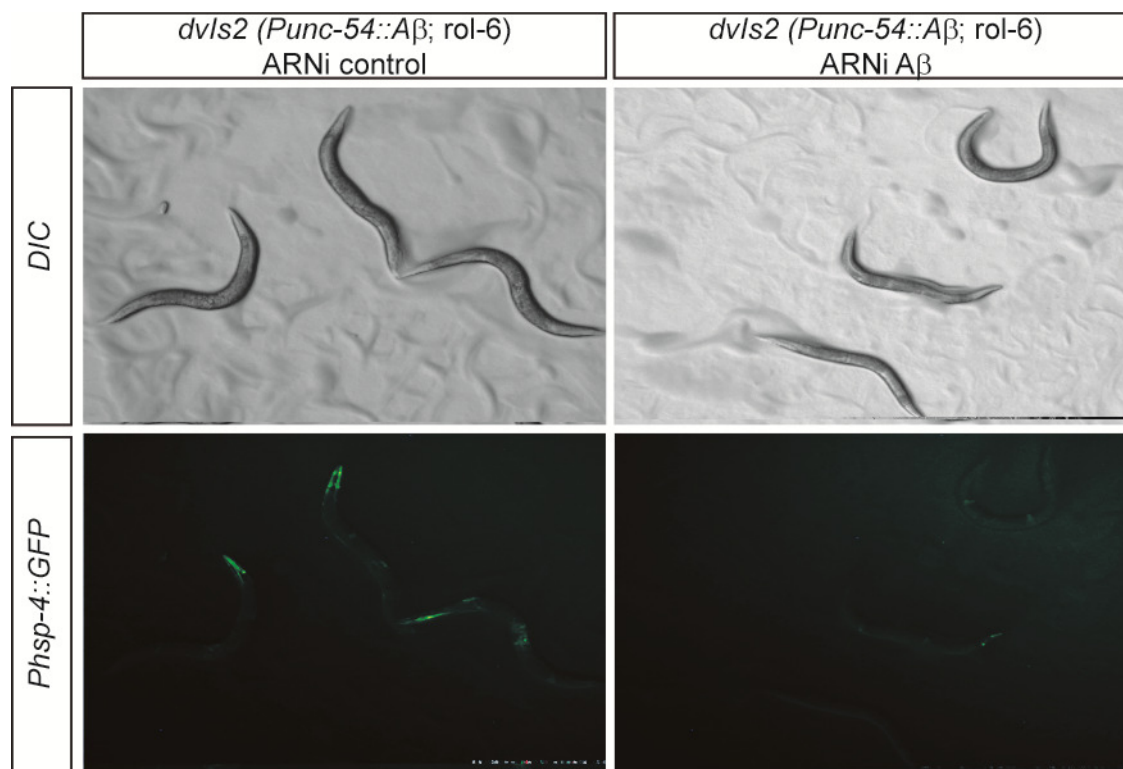


Figura 3.26. Efecto del silenciamiento por ARNi del gen de A β sobre la activación de la UPR. Expresión del marcador de estrés del retículo endoplasmático *Phsp-4::GFP* en animales CL2006, *dvls2 (Punc-54::A β ; rol-6)* crecidos en bacteria HT115 que no expresa ARNi de doble cadena (paneles izquierdos) y en bacteria HT115 que expresa ARNi de doble cadena de A β (paneles derechos). La inducción de GFP, y por tanto la activación de la UPR, se eliminan al silenciar A β .

Debido a que tanto α -syn como poliQ en los modelos de agregación se encuentran fusionados a YFP y a que el marcador de estrés utilizado se basa en la inducción de GFP, proteínas fluorescentes cuyos espectros de absorción solapan, el estudio de la activación de la UPR en estos dos modelos se abordó de dos formas distintas. En primer lugar generamos una estirpe transgénica que expresa α -syn humana (sin proteína fluorescente fusionada) en células musculares usando para ello el promotor de *unc-54*. Se estudió en esta estirpe la expresión del marcador de estrés pero, al contrario de la estirpe que expresa A β , no se encontró inducción del mismo.

Una segunda aproximación al problema consistió en la construcción de un nuevo marcador de estrés en el retículo endoplasmático, consistente en la expresión de la proteína fluorescente mCherry bajo el control del promotor de *hsp-4*. Los niveles de expresión de este nuevo marcador *Phsp-4::mCherry* fueron entonces analizados en las estirpes modelos de Parkinson y de enfermedades de poliglutamina que expresan α -syn::YFP y poliQ::YFP. En ninguno de los casos se encontró inducción de mCherry.

Estos datos contrastan con los publicados anteriormente en diferentes trabajos

Capítulo III

realizados con otros modelos en levaduras y cultivos de células humanas, donde se ha demostrado que la expresión de α -syn y de proteínas con expansiones de poliQ producen la activación de la UPR (Cooper *et al.*, 2006; Duennwald & Lindquist, 2008; Smith *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2005). Sin embargo, el papel del estrés del retículo endoplasmático y de la UPR en estas enfermedades neurodegenerativas en humanos todavía no se conoce completamente y, aunque parece haber alguna participación de estas rutas en el desarrollo y progresión de estos desórdenes (Lindholm *et al.*, 2006), su implicación sigue siendo hoy en día motivo de controversia.

Conviene puntualizar aquí que la activación de la UPR encontrada en el modelo de Alzheimer –y que no se observa en los modelos de Parkinson y de enfermedades de poliglutamina-, podría ser debida, al menos en parte, al hecho de que en este modelo el A β humano es dirigido inicialmente a retículo, con el fin de reproducir en *C. elegans* el tráfico vesicular que sufre el péptido en humanos. Para estudiar esta hipótesis, decidimos analizar la activación de la UPR, usando el marcador *Phsp-4::GFP*, en la estirpe CL3109, que expresa el dímero A β de cadena simple, una variante no amiloidogénica de A β (Fay, Fluet, Johnson, & Link, 1998). Estos animales transgénicos son parecidos a los de la estirpe constitutiva CL2006, pero expresan una proteína que consiste en dos secuencias de A β unidas por un pequeño péptido que también se dirige a retículo. Aunque esta estirpe expresa niveles altos de esta proteína dimérica, no se producen niveles detectables de depósitos amiloides y la parálisis se ve reducida de forma drástica. Se ha demostrado, además, que en esta estirpe se produce una respuesta de las proteínas chaperonas citoplasmáticas significativamente menor (Fonte *et al.*, 2002). Aunque no podemos descartar una cierta contribución del A β dimérico citoplasmático en la inducción de estrés del retículo (teniendo en cuenta el pequeño grado de parálisis y de activación de chaperonas), la inducción del marcador *Phsp-4::GFP* en esta estirpe alcanzó niveles comparables a los obtenidos con la estirpe CL2006. Esto parece indicarnos que, al menos en parte, la activación de la UPR observada en el modelo de Alzheimer es debida al A β que se dirige al retículo.

Con todos estos datos no podemos concluir que la UPR se encuentre activa en estos modelos de enfermedades neurodegenerativas con la excepción del modelo de Alzheimer, en donde, probablemente, la activación de la UPR sea debida a la entrada inicial de A β en el retículo, aunque finalmente sea retrotranslocado al citosol donde agrega.

3.10 Estudio del efecto de la inhibición de *dnj-27* sobre la degradación de proteínas y sobre la mitocondria

¿Cómo es posible que una proteína como DNJ-27, residente del retículo endoplasmático, sea capaz de alterar el estado de agregación de proteínas con tendencia a agregar en un compartimento subcelular distinto como es el citoplasma? Hoy en día sabemos que ERdj5 acelera el proceso de degradación por ERAD gracias a la reducción de los enlaces disulfuro que pueden estar presentes en las proteínas mal plegadas (Hagiwara *et al.*, 2011; Ushioda *et al.*, 2008). De esta forma, la reducción de puentes disulfuro permite que las proteínas adopten su forma desplegada para facilitar su salida a través del canal de retrotranslocación. Parece lógico pensar, por tanto, que la inhibición de la función de *dnj-27* provocaría un aumento en la carga de proteínas mal plegadas del retículo endoplasmático que, tarde o temprano, tendrán que salir al citoplasma para ser degradadas, aumentando así, en última instancia, la cantidad de proteínas mal plegadas también en el citoplasma de la célula. Estas proteínas mal plegadas podrían entonces interferir con la maquinaria de plegado del citoplasma y alterar la proteostasis del mismo, lo que, como se ha descrito anteriormente, favorecería la agregación de otras proteínas citoplasmáticas (Gidalevitz *et al.*, 2006), como es el caso de los péptidos A β , α -syn y poliQ.

Con el fin de explorar esta posibilidad, recurrimos a una estirpe transgénica que expresa el transgen *Punc-54:: Δ unc-54::lacZ* en el citoplasma de células musculares en *C. elegans*, el cual se usa como marcador de degradación de proteínas y de proteostasis (Zdinak *et al.*, 1997). Este marcador consiste en la fusión de un pequeño fragmento de la región N-terminal de la cadena pesada de miosina UNC-54 con la β -galactosidasa de *E. coli*. Como resultado de la expresión de este transgen desde el promotor de *unc-54*, la proteína de fusión se sintetiza de manera continua hasta la fase adulta específicamente en las 95 células de la pared muscular y en las 8 del músculo de la vulva, permaneciendo estable hasta por lo menos las primeras 72 horas de adulto. *C. elegans* no produce β -galactosidasa de forma endógena, por lo que la degradación de la proteína de fusión UNC-54:: β -galactosidasa, que se acumula en el citoplasma, puede ser seguida fácilmente mediante tinción histoquímica con X-gal (Zdinak *et al.*, 1997).

Así pues, los animales transgénicos *unc-54::lacZ* fueron crecidos en ARNi para *dnj-27* y se analizó el marcador LacZ. Como se muestra en la Figura 3.27, el silenciamiento de *dnj-27* promovió la degradación de LacZ vía autofagia -ya que es bloqueada por mutaciones de pérdida de función de los genes *unc-51*, *mpk-1* y *daf-18*, implicados en autofagia- y proteosoma -cuyo funcionamiento se bloquea con el inhibidor del proteosoma

Capítulo III

MG132-, lo que sugiere que la disminución de los niveles de DNJ-27 provoca un incremento de la degradación de proteínas citoplasmáticas. Por el contrario, esta degradación no es dependiente de apoptosis, ya que no fue bloqueada al utilizar mutaciones de pérdida de función del gen *ced-3* (Shephard, 2011; Szewczyk, 2007).

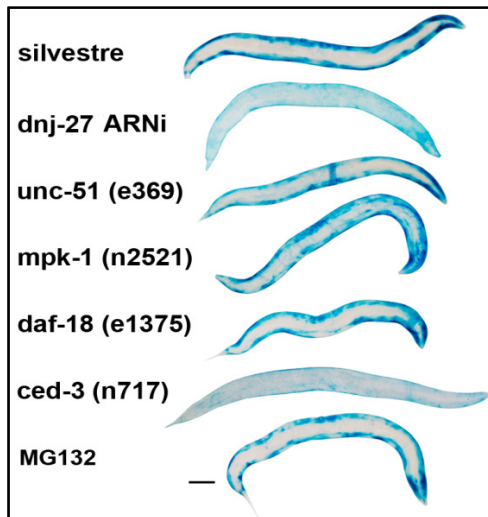


Figura 3.27. El silenciamiento de *dnj-27* por ARNi aumenta la degradación de proteínas en el citoplasma. El tratamiento con ARNi para *dnj-27* de individuos adultos que contienen el marcador transgénico de degradación proteica *ccls55* (*Punc-54::Δunc-54::lacZ*) durante 72 horas, induce la degradación de este marcador en animales silvestres y en animales mutantes del gen *ced-3*. Sin embargo, esta degradación se suprime en los fondos genéticos mutantes *unc-51*, *mpk-1* y *daf-18*, al igual que en animales tratados con el inhibidor del proteosoma MG132. Barra = 100 μ m.

A continuación, decidimos determinar si este efecto sobre la degradación de proteínas en el citosol es específico para *dnj-27* o, si por el contrario, es una consecuencia más general como resultado de un retículo endoplasmático comprometido, ya que cabría esperar un efecto parecido al ensayar otros genes implicados en estas rutas de estrés. Para ello, ensayamos el marcador LacZ usando ARNi de genes implicados en ERAD y UPR. El silenciamiento de algunos de estos genes, aunque no de todos, también provocó una mayor degradación de proteínas, como se muestra en la tabla 3.3. Los genes cuyo silenciamiento resultó en un aumento de la degradación de proteínas en el citosol son *ire-1*, *xbp-1*, *pek-1*, *sel-1* y *hrdl-1*. Sin embargo, la inhibición de los genes *atf-6*, *cup-2*, *R151.6* y *sel-11/hrd-1* en la estirpe transgénica que expresa *unc-54::lacZ* no produjo ningún cambio en la degradación del marcador, efecto que podría ser explicado por un fenómeno de redundancia con otros genes. Como se puede observar también en la tabla 3.3, resulta interesante que la degradación citoplasmática encontrada al tratar con estos ARNi fue suprimida, en todos los casos, al inhibir la vía de la autofagia -usando el alelo de pérdida de función *unc-51 (e369)*- y el proteosoma. Hay que tener en cuenta que estas dos rutas son precisamente las más importantes en la degradación de proteínas mal plegadas, y que incluso, en algunos casos, la ruta de la autofagia es capaz de reemplazar a la ERAD en la degradación de algunos sustratos cuando esta última se encuentra comprometida (Kario, Amar, Elazar, & Navon, 2011; Vembar & Bodsky, 2008). Además, se ha descrito que tanto la ERAD como la autofagia comparten algunos factores comunes (Clague & Urbé, 2010).

ARNi	silvestre	<i>unc-51</i>	<i>mpk-1</i>	<i>daf-18</i>	<i>ced-3</i>	MG132	mitocondria
<i>dnj-27</i>	rojo	verde	verde	verde	rojo	verde	rojo
<i>ire-1</i>	rojo	verde	verde	verde	rojo	verde	rojo
<i>xbp-1</i>	rojo	verde	rojo	rojo	verde	verde	verde
<i>sel-1</i>	rojo	verde	rojo	rojo	rojo	verde	verde
<i>pek-1</i>	rojo	verde	verde	rojo	rojo	verde	verde
<i>hrdl-1</i>	rojo	verde	verde	verde	rojo	verde	verde
<i>cup-2</i>	verde	verde	verde	rojo	rojo	verde	verde
R151.6	verde	verde	verde	rojo	verde	verde	verde
<i>sel-11/hrd-1</i>	verde	verde	verde	verde	verde	verde	verde
<i>atf-6</i>	verde	verde	verde	verde	verde	verde	verde

Tabla 3.3. Efecto del silenciamiento por ARNi de genes implicados en las rutas de la UPR y la ERAD sobre la degradación de proteínas citoplasmáticas, y sobre la fragmentación de la mitocondria. Tratamiento de animales adultos que contienen el marcador transgénico de degradación proteica *ccls55* (*Punc-54::Δunc-54::lacZ*) (seis primeras columnas) o el marcador para la evaluación de la mitocondria *Pmyo-3::MitGFP* (última columna) durante 72 horas con ARNi para el gen indicado. El color rojo significa degradación citoplasmática o fragmentación mitocondrial, mientras que el color verde indica que no hubo degradación o que no ocurrió fragmentación de la mitocondria.

Aparte de influir en la agregación de las proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas, otros mecanismos podrían estar detrás de la protección de *dnj-27* sobre la toxicidad de estas proteínas. Así, dado que la toxicidad ha sido registrada en la mayoría de los casos por medio de ensayos de parálisis o de movilidad, no sería extraño pensar que *dnj-27* pudiera tener algún efecto sobre el desarrollo o el mantenimiento muscular. Sin embargo, esta posibilidad fue descartada usando el transgen *jls01* (*myo-3::GFP*), al comprobar que la estructura miofibrilar de los músculos al inhibir *dnj-27* con ARNi era completamente normal (Fig. 3.28). El transgen *jls01* consiste en una fusión traduccional del gen *myo-3* (cadena A pesada de miosina) a *GFP* (Fostel, Benner Coste, & Jacobson, 2003).

Por otro lado, se conoce desde hace algún tiempo que el retículo endoplasmático y la mitocondria están en contacto directo. Mediante estudios bioquímicos se ha podido demostrar que ambas estructuras celulares están físicamente conectadas por un subcompartimento especializado llamado membrana asociada a la mitocondria (MAM) (Vance, 1990), el cual permite una comunicación bidireccional que regula procesos fisiológicos fundamentales entre los dos orgánulos (Hayashi & Su, 2007; Simmen *et al.*, 2005; Szabadkai *et al.*, 2006). Como ya se comentó anteriormente, la mitocondria juega un papel fundamental en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas (Reddy & Reddy, 2011; B. Su, Wang, Zheng, Perry, & Smith, 2010), de igual modo que ha sido también relacionada con los fenotipos patológicos de los modelos de enfermedades neurodegenerativas en *C. elegans* (Cacho-Valadez *et al.*, 2012; Kirstein-Miles & Morimoto, 2010; H. Wang *et al.*, 2009). Por estas razones nos preguntamos si quizás la inhibición de

Capítulo III

dnj-27 tendría algún efecto sobre la mitocondria. El transgen *Pmyo-3::MitGFP* dirige la expresión de una proteína de fusión de la secuencia señal de entrada en mitocondria de la aspartato aminotransferasa de pollo y GFP a células musculares del nematodo, y permite analizar la estructura de las mitocondrias de las células musculares (Fire *et al.*, 1998). Usando este transgen pudimos determinar que, efectivamente, el tratamiento con ARNi para *dnj-27* induce claramente la fragmentación de la mitocondria (Fig. 3.28).

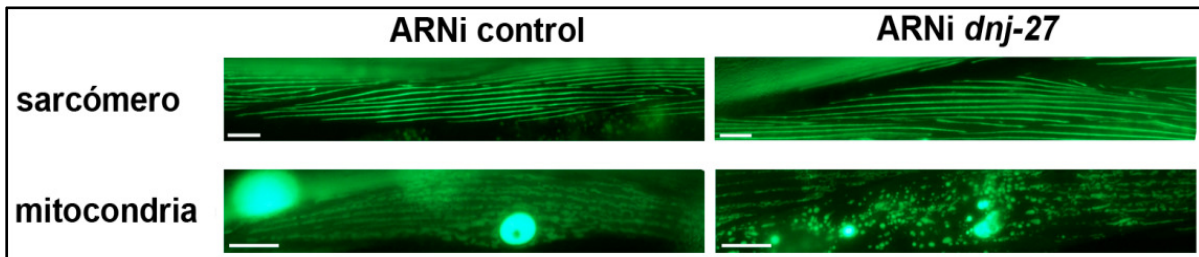


Figura 3.28. Impacto del silenciamiento por ARNi de *dnj-27* sobre la estructura de los sarcómeros del músculo y sobre la mitocondria. Efecto del tratamiento con ARNi para *dnj-27* durante 72 horas en animales adultos sobre la integridad de los sarcómeros (paneles superiores) o de las mitocondrias (paneles inferiores) marcados con GFP en las células musculares. Barra = 10 μ m.

En resumen, estos últimos datos demuestran que, posiblemente, detrás de la protección de DNJ-27 funcionen distintos mecanismos entre los que se encontrarían la influencia sobre la proteostasis del citoplasma y el papel protector frente a la disfunción mitocondrial.

3.11 Análisis del efecto del tipo de bacteria utilizada como fuente de alimento en los distintos modelos de enfermedades neurodegenerativas en *C. elegans*

Un resultado completamente inesperado que surgió durante el desarrollo experimental de esta tesis, y que conviene resaltar aquí, es la influencia del tipo de bacteria utilizada como fuente de alimento sobre la toxicidad y la agregación de los péptidos relacionados con enfermedades neurodegenerativas. Durante el desarrollo de los experimentos se utilizaron dos estirpes de *Escherichia coli* distintas: la estirpe HT115 fue utilizada para los ensayos de ARNi, y la OP50, para el resto de los ensayos. Esto se debe a que la bacteria OP50 es la estirpe que se utiliza de forma estándar como fuente de alimento de *C. elegans*, mientras que la estirpe HT115 es la utilizada, de forma rutinaria, para la interferencia de *C. elegans* por ARNi mediante la ingestión de bacterias que expresen el correspondiente ARN de doble cadena. El uso de esta última se justifica por el hecho de que esta bacteria no posee la ARNasa III, una enzima que degrada la mayoría del ARN de doble cadena en la bacteria (Timmons *et al.*, 2001).

Si comparamos, en primer lugar, los nematodos que expresan A β humano a partir del array integrado *dvls2* crecidos en OP50 y HT115 en los experimentos anteriores, observaremos un aumento claro en el patrón de parálisis de los animales crecidos en OP50 (Fig. 3.29A, círculos negros). Sin embargo, para este caso, la formación de depósitos amiloideos permaneció prácticamente igual (24.07 depósitos en HT115 vs 24.67 depósitos en OP50) (Fig. 3.29B). Decidimos entonces repetir los experimentos de parálisis con el sobrepresante de *dnj-27* pero creciendo los animales esta vez con la bacteria HT115. Como era de esperar, el fenotipo de parálisis mejoró en los animales transgénicos comparados con los controles no transgénicos, pero sin embargo, el patrón de parálisis se vio dramáticamente reducido en comparación con el experimento realizado en OP50, de tal forma que las diferencias dejaron de ser estadísticamente significativas (Fig. 3.29C).

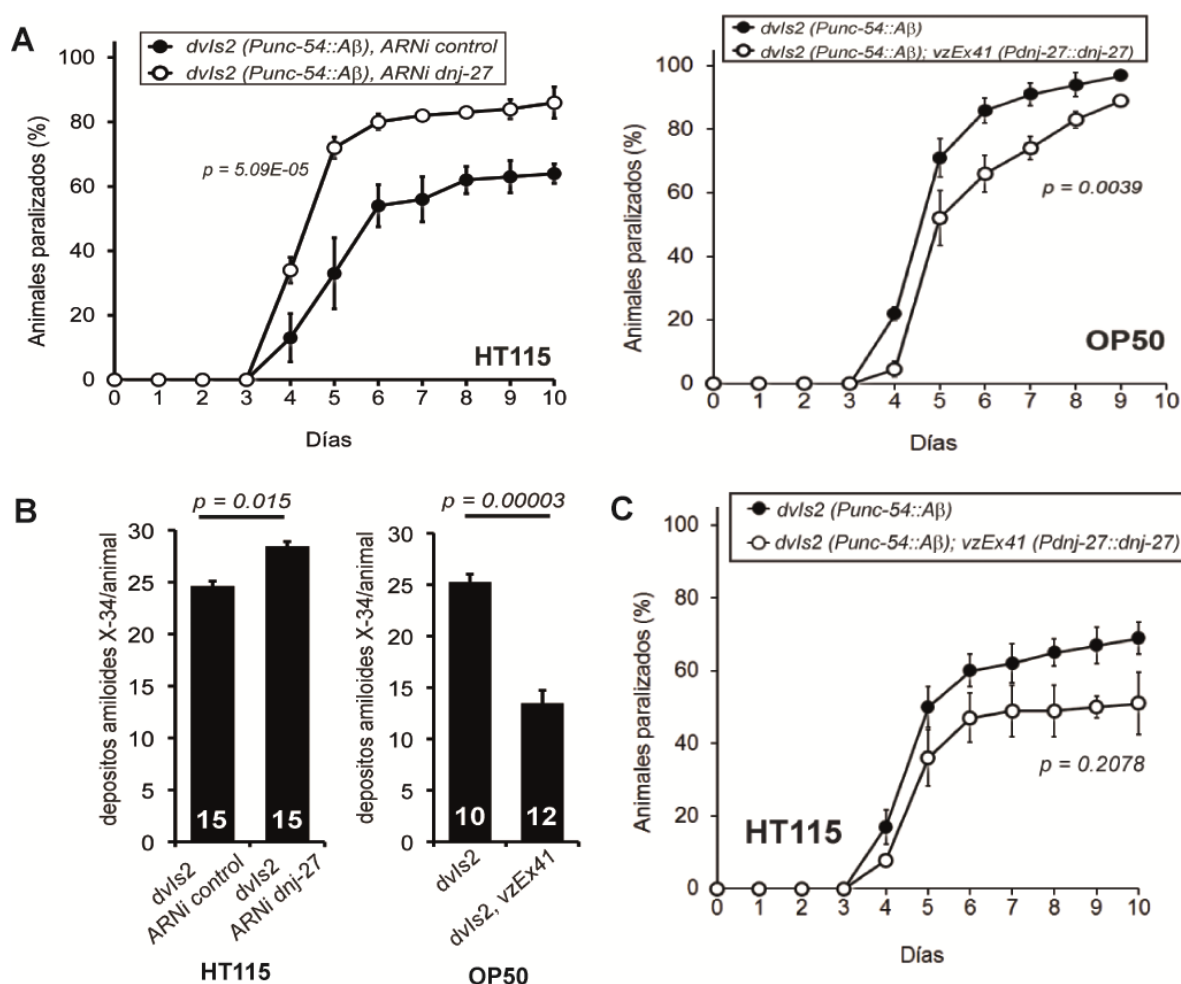


Figura 3.29. Toxicidad y agregación de A β en *C. elegans* dependiendo del tipo de bacteria utilizada como alimento. Las gráficas de los apartados A y B son idénticas a las de la sección 3.4, para facilitar su consulta. A) Parálisis progresiva de animales que expresan A β humano, crecidos en bacteria HT115 (gráfica izquierda) y en OP50 (gráfica derecha). B) Cuantificación de la formación de depósitos amiloideos en animales crecidos en bacteria HT115 (gráfica izquierda) y en OP50 (gráfica derecha). C) Parálisis de animales transgénicos VZ158, que portan el array extracromosómico *vzEx41 (Pdnj-27::dnj-27 3'-UTR; Punc-122::GFP)* y de sus hermanos no transgénicos, utilizados como control, crecidos en bacteria HT115. La gráfica representa la media de tres experimentos independientes, no encontrándose diferencias significativas ($p = 0.2078$).

Capítulo III

Para el caso de los nematodos que expresan α -syn a partir del array integrado *pkIs2386*, las diferencias de toxicidad dependiendo de la estirpe de bacteria utilizada no fueron tan obvias (Fig. 3.30A, círculos negros). Lógicamente en este caso, cuando repetimos los experimentos de movilidad con el sobreexpresante de *dnj-27* en HT115, las diferencias se mantuvieron con respecto a OP50 (Fig. 3.30C). Es curioso que para estos animales modelos de Parkinson, por el contrario, aunque no se observaron diferencias en términos de movilidad asociadas a la fuente de alimento, la agregación de α -syn::YFP sí se vio claramente aumentada cuando los animales fueron crecidos en OP50 (42.05 agregados en HT115 vs 68.30 agregados en OP50) (Fig. 3.30B).

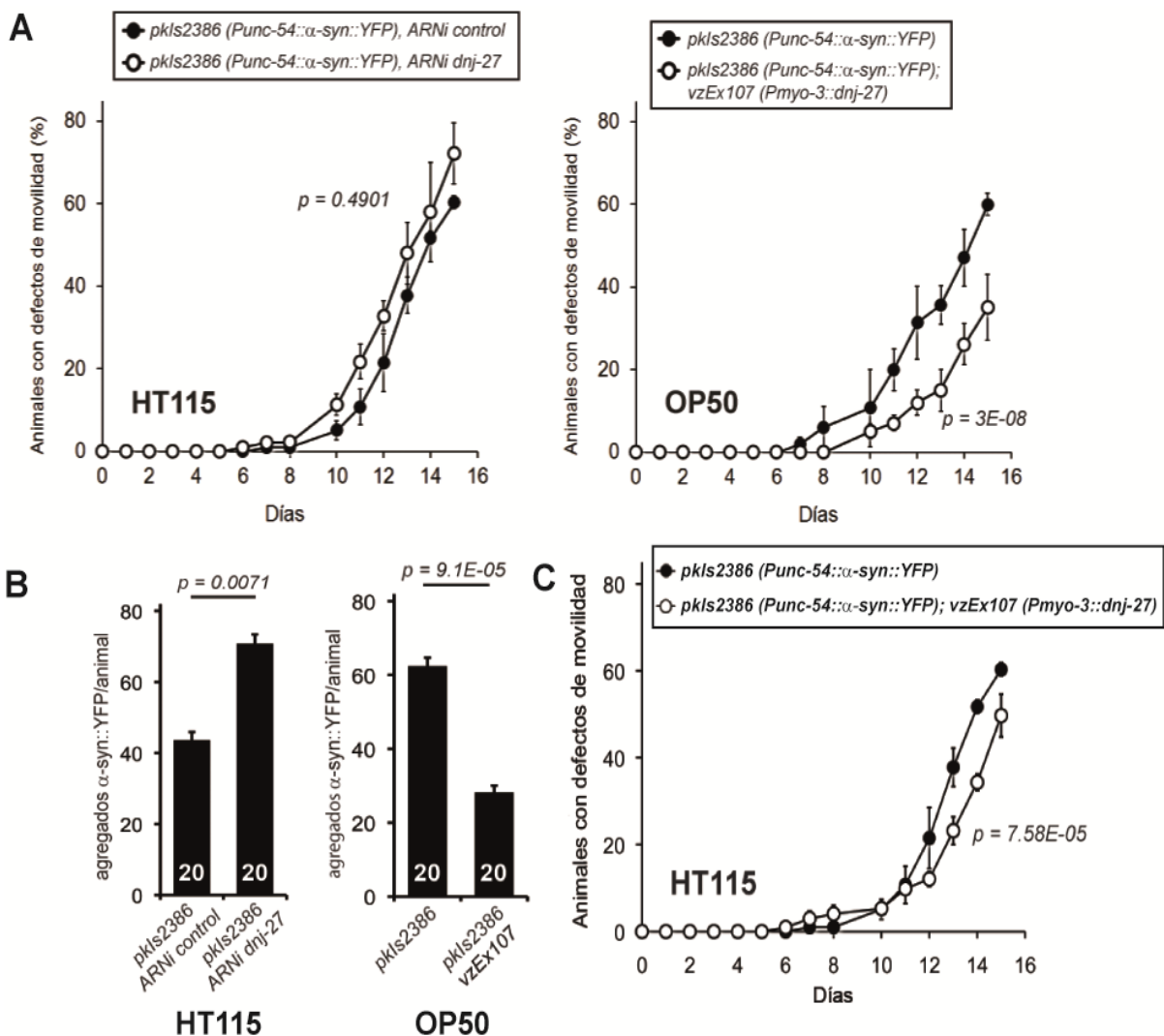


Figura 3.30. Toxicidad y agregación de α -syn::YFP en *C. elegans* dependiendo del tipo de bacteria utilizada como alimento. Las gráficas de los apartados A y B son idénticas a las de la sección 3.5, para facilitar su consulta. A) Defectos de movilidad en animales que expresan α -syn::YFP, crecidos en bacteria HT115 (gráfica izquierda) y en OP50 (gráfica derecha). B) Cuantificación de la formación de agregados α -syn::YFP en animales crecidos en bacteria HT115 (gráfica izquierda) y en OP50 (gráfica derecha). C) Problemas de movilidad de animales transgénicos VZ303, que portan el array extracromosómico *vzEx107* (*Pmyo-3::dnj-27 ADNc; Ptrx-3::mCherry*,) y de sus hermanos no transgénicos, utilizados como control, crecidos en bacteria HT115. La gráfica representa la media de tres experimentos independientes, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p = 7.58E-05$).

Resultados

Por último, como se puede observar en la Figura 3.31, el tipo de bacteria utilizada también influye sobre la agregación de Q40::YFP así como sobre su toxicidad. De esta forma, los nematodos crecidos en OP50 muestran un fuerte aumento tanto en el porcentaje de animales con defectos de movilidad (Fig. 3.31A, círculos negros) como en el número de agregados, comparados con nematodos crecidos en HT115 (4.89 agregados en HT115 vs 78.27 agregados en OP50).

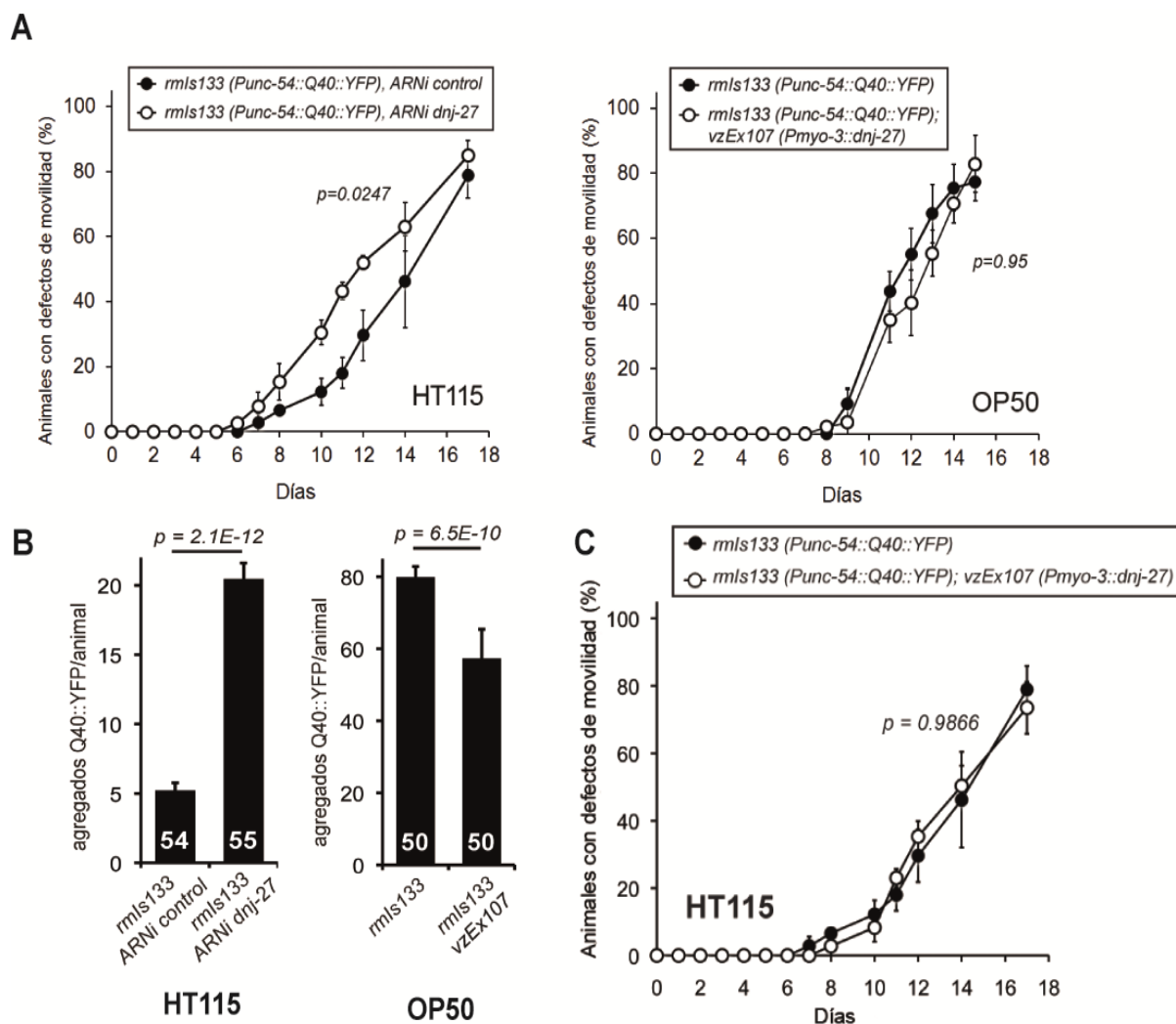


Figura 3.31. Toxicidad y agregación de Q40::YFP en *C. elegans* dependiendo del tipo de bacteria utilizada como alimento. Las gráficas de los apartados A y B son idénticas a las de la sección 3.6, para facilitar su consulta. A) Defectos de movilidad en animales que expresan Q40::YFP, crecidos en bacteria HT115 (gráfica izquierda) y en OP50 (gráfica derecha). B) Cuantificación de la formación de agregados Q40::YFP en animales crecidos en bacteria HT115 (gráfica izquierda) y en OP50 (gráfica derecha). C) Problemas de movilidad de animales transgénicos VZ299, que portan el array extracromosómico *vzEx107* (*Pmyo-3::dnj-27 ADNc; Ptrx-3::mCherry*), y de sus hermanos no transgénicos, utilizados como control, crecidos en bacteria HT115. La gráfica representa la media de dos experimentos independientes, no encontrándose diferencias significativas ($p = 0.9866$).

Capítulo IV. **Discusión**

A lo largo de la evolución, las células han desarrollado elaborados sistemas de control para asegurar el mantenimiento de la proteostasis. En el complicado ambiente celular, densamente cargado con multitud de macromoléculas, las proteínas se encuentran en riesgo constante de experimentar errores en su plegamiento. Cambios genéticos y factores ambientales, como los experimentados por ejemplo durante el desarrollo de una patología, también son capaces de alterar la homeostasis de proteínas dentro de la célula. De esta manera, la formación aberrante de agregados de proteínas y de oligómeros solubles característica de muchas enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento (Ross & Poirier, 2004), desafían los sistemas de proteostasis de la célula.

El retículo endoplasmático es un orgánulo multifuncional donde todas las proteínas de la ruta secretora y las proteínas integrales de membranas son plegadas y modificadas post-transcripcionalmente. Dado que estas proteínas representan un alto porcentaje del total de proteínas de la célula eucariota (alrededor de un tercio) (Vembar & Bodsky, 2008), el retículo endoplasmático juega un papel clave en el control del plegamiento y en el transporte de proteínas. Por esta razón, se han desarrollado mecanismos de control específicos dentro del retículo que aseguran el correcto plegamiento de las nuevas proteínas así como la eliminación, por medio de la ruta de la ERAD, de aquellas proteínas no nativas que el retículo no es capaz de plegar. La ERAD representa, por tanto, un mecanismo celular esencial dentro del complejo sistema de mantenimiento de la homeostasis de proteínas (Knittler *et al.*, 1995).

A la luz de los resultados obtenidos durante este estudio, se identificó *dnj-27* y su homólogo humano *ERdj5* como genes protectores en diferentes modelos de proteotoxicidad citoplasmática en *C. elegans*. En mamíferos, *ERdj5* codifica para una proteína residente del retículo endoplasmático que, recientemente, ha sido descrita como una disulfuro reductasa implicada en ERAD, donde lleva a cabo la reducción de puentes disulfuro de proteínas mal plegadas (Ushioda *et al.*, 2008). En primer lugar, demostramos que el gen *dnj-27* de *C. elegans*, al igual que *ERdj5*, codifica una proteína que se dirige y localiza en el retículo endoplasmático *in vivo*, como sugiere el péptido señal de retención en el retículo HDEL en el extremo C-terminal de la proteína. La expresión de *dnj-27* se induce además al provocar estrés en el retículo mediante el tratamiento con tunicamicina, lo que viene a respaldar el hecho de que *dnj-27* sea el ortólogo de *ERdj5* y su papel durante la degradación de proteínas en la ERAD. Se pudo determinar mediante ARNi que esta inducción de *dnj-27* se produce por medio de la ruta de IRE-1/XBP-1, una de las tres ramas de la UPR. Este último resultado resulta muy interesante ya que es precisamente esta ruta la que está implicada en la inducción transcripcional de otros genes implicados en ERAD, como por ejemplo el gen

Capítulo IV

que codifica para EDEM, una de las proteínas asociadas a ERdj5 en el complejo supramolecular formado para la reducción de enlaces disulfuro de proteínas mal plegadas (Hiderou Yoshida *et al.*, 2003). Todos estos datos, junto con la elevada homología de secuencia y estructural de la proteína del nematodo y la de mamífero, parecen confirmar realmente la conservación a lo largo de la evolución del papel de *ERdj5/dnj-27* en la ERAD.

Los diferentes ensayos realizados muestran el papel protector del gen *dnj-27* en la agregación de A β humano, de α -syn humana y de proteínas poliQ en el citoplasma de células musculares de *C. elegans*, resultados que fueron corroborados cuando el gen *ERdj5* humano se expresó en estos modelos. Una mayor/menor agregación no es debida a un aumento/disminución de los niveles de estos péptidos, ya que como muestran los resultados obtenidos con los experimentos de western blots, los niveles totales de A β , α -syn y proteínas poliQ no se vieron afectados ni por la sobreexpresión ni por la bajada en los niveles de *dnj-27*, lo que descarta que DNJ-27 pueda intervenir en la degradación o en la síntesis de estos péptidos. Por el contrario, estos resultados indican que el efecto de DNJ-27 es específico sobre el estado de agregación, y no sobre la cantidad de los mismos, planteándose la cuestión de cómo una proteína localizada en el retículo puede influir sobre la agregación en el citoplasma de péptidos con tendencia a agregar. Uno podría especular que, como ocurre para otras enzimas, DNJ-27 podría ejercer al menos parte de su función (especialmente en los experimentos donde se sobreexpresa *dnj-27*) en el citoplasma, localización subcelular de la proteína que podría haber pasado inadvertida fácilmente al microscopio. Sin embargo, debemos considerar que el citoplasma tiene un ambiente redox mucho más reducido que el del retículo endoplasmático, necesariamente más oxidante para permitir la formación de puentes disulfuro y otras modificaciones de las proteínas de la ruta secretora (Sevier *et al.*, 2007). Por este motivo, lo más probable es que la actividad reductasa de DNJ-27 necesite de este ambiente altamente oxidante para realizar su función y que no presente actividad enzimática en el citoplasma de la célula, o que incluso el plegamiento de la proteína no sea el adecuado en estas condiciones redox más reducidas.

Un resultado que podría arrojar luz sobre el posible mecanismo implicado en el efecto de DNJ-27 sobre la agregación citoplasmática, es el hecho de que la bajada de los niveles de DNJ-27 mediante ARNi resulta en un aumento de la degradación de proteínas citoplasmáticas vía autofagia y proteosoma. Una explicación lógica a este dato podría ser que la inhibición de *dnj-27* probablemente comprometa la ERAD, o al menos, como es el caso de su homólogo en mamífero *ERdj5*, la ralentice (Ushioda *et al.*, 2008). Así, se ha demostrado que la inhibición de *ERdj5* no impide completamente la ERAD, y se ha propuesto que quizás esto se deba a que otras enzimas del retículo, como quizás las PDI,

puedan ser destinadas a la reducción de los puentes disulfuro de las proteínas mal plegadas (Braakman & Otsu, 2008), proceso que se produciría, con toda seguridad, de manera menos eficiente. El reclutamiento de estas otras enzimas para estos menesteres, distintos a los suyos propios, junto con la alteración de la homeostasis del retículo endoplasmático, probablemente contribuya aún más al aumento de las proteínas mal plegadas en este orgánulo, que saldrían al citosol para ser degradadas como respuesta a la disfunción provocada por la bajada de los niveles de DNJ-27. Por tanto, la inhibición de *dnj-27* seguramente provocaría, en última instancia, un aumento de la carga de proteínas mal plegadas -procedentes del retículo- también en el citoplasma. De ahí el aumento de la degradación proteica encontrada en el citoplasma de las células musculares de *C. elegans*, que intentarían eliminar esta carga extra de proteínas mal plegadas. En nuestros modelos de enfermedades neurodegenerativas, la maquinaria de degradación del citoplasma, ya de por sí alterada por la acumulación de A β , α -syn y poliQ, junto con el incremento de proteínas mal plegadas provenientes del retículo, llevarían a una situación donde se favorecería la agregación proteica, ya que esta reducción de la capacidad en el mantenimiento de la proteostasis, como ha sido descrito anteriormente (Gidalevitz *et al.*, 2006), favorece la agregación de otras proteínas (sobre todo de proteínas con tendencia a agregar como A β , α -syn y poliQ). Esto sería debido a que la maquinaria de degradación proteica no podría eliminar de forma eficiente el conjunto de los agregados de A β , α -syn o poliQ y los provenientes del retículo. Apoyando esta línea argumental, se ha encontrado en estudios anteriores que la expresión de A β en *C. elegans* lleva a que muchas de las chaperonas del citoplasma se destinen a la reducción de la agregación del mismo (Fonte *et al.*, 2002, 2008). Otra explicación alternativa, aunque no mutuamente excluyente, al hecho de que la inhibición de *ERdj5* no bloquee completamente la ERAD sería que las proteínas mal plegadas del retículo endoplasmático pudieran ser retrotranslocadas al citoplasma, de manera menos eficiente, sin ser completamente desplegadas. Por lo tanto, al interferir *dnj-27*, las proteínas mal plegadas del retículo serían capaces de salir al citosol sin que se redujeran previamente sus enlaces disulfuro, o al menos no todos ellos, lo que disminuiría todavía más la capacidad de plegamiento del citoplasma al tener que dirigir también parte de sus recursos a la reducción de los puentes disulfuro de esta carga adicional de proteínas mal plegadas.

Se podría argumentar que si la inhibición de *dnj-27* conduce a disfunción del retículo, lo cual deriva en una mayor degradación de proteínas en el citoplasma, sería de esperar activación de la UPR. Sin embargo, nosotros no encontramos inducción del marcador de estrés del retículo *hsp-4::GFP* cuando se redujeron los niveles de expresión de *dnj-27* por

Capítulo IV

ARNi. Un razonamiento que podría explicar esta situación es considerar que la inhibición con ARNi de *dnj-27* seguramente tan sólo produzca una pequeña alteración en la homeostasis del retículo que podría ser compensada por la maquinaria de plegado del citoplasma, de forma que el aumento de proteínas mal plegadas en el retículo sería fácilmente eliminado en el citoplasma, evitándose así estrés del retículo y la activación de la UPR. Esto concordaría además con el aumento en la degradación de proteínas en el citoplasma encontrada al bajar los niveles de DNJ-27. No obstante, cuando en el citoplasma se encuentren agregados de A β , α -syn y poliQ, es fácil imaginar que la maquinaria de degradación y plegado citoplasmática encontraría mayores problemas para eliminar estas proteínas mal plegadas provenientes del retículo.

Nuestra hipótesis se ve apoyada además por los resultados que se obtuvieron cuando otros genes implicados en ERAD y UPR fueron estudiados, ya que, como era de esperar, se obtuvieron resultados parecidos en términos de degradación citoplasmática al estudiar estos otros genes implicados también en el plegamiento y degradación de proteínas mal plegadas. De esta manera, al igual que para *dnj-27*, el tratamiento con ARNi de los genes *ire-1*, *xbp-1*, *pek-1*, *sel-1* y *hrdl-1* dio lugar a un incremento de la degradación de las proteínas del citoplasma. Sin embargo, esta degradación de proteínas no se vio afectada cuando se utilizó ARNi de otros genes implicados en estas mismas rutas, como es el caso de *atf-6*, *cup-2*, *R151.6* y *sel-11*. La falta de aumento en la degradación encontrada en estos últimos genes podría explicarse, no obstante, como consecuencia de una posible redundancia con otros genes. Ciertamente, por ejemplo, una redundancia parcial en la función de los genes *cup-2* y *R151.6* ha sido descrita en *C. elegans* (Schaheen *et al.*, 2009), lo que parece apuntar en esta dirección. Conviene remarcar aquí que, con la única excepción de *R151.6*, estos últimos genes que no aumentan la degradación de proteínas citoplasmáticas, son precisamente aquellos en los que la protección no se extiende a los tres modelos de enfermedades neurodegenerativas estudiados. Todo esto parece indicarnos que, al menos para estos genes, los mecanismos de protección para los modelos en los que corresponda, han de ser necesariamente distintos a los que aquí proponemos para *dnj-27*. Entre estos mecanismos podrían encontrarse algunos de los que han sido previamente descritos en relación con la ERAD y la toxicidad a A β , α -syn y poliQ (Cooper *et al.*, 2006; Duennwald & Lindquist, 2008; Kaneko *et al.*, 2010). Así por ejemplo, se ha demostrado que el α -syn inhibe el tráfico entre retículo endoplasmático y aparato de Golgi en levaduras, produciéndose como resultado la acumulación específica de ciertas proteínas mal plegadas sustratos de la ERAD (Cooper *et al.*, 2006). Por otro lado, también se ha demostrado que las expansiones de poliQ unidas a huntingtina son capaces de retener

algunas de las enzimas fundamentales implicadas en ERAD, siendo éste uno de los primeros eventos relacionados con la toxicidad de estas proteínas, tanto en levaduras como en células de mamífero (Duennwald & Lindquist, 2008).

Por otro lado, la agregación citoplasmática de A β , α -syn o poliQ está relacionada con los fenotipos patológicos observados en los modelos de enfermedades neurodegenerativas en *C. elegans* (Hamamichi *et al.*, 2008; C. D. Link, 1995; Satyal *et al.*, 2000). En consonancia con estos resultados, nosotros encontramos que el efecto de *dnj-27* sobre la toxicidad de estos péptidos muestra una alta correlación con los cambios en sus niveles de agregación. Sin embargo, todavía es objeto de debate si la formación de agregados es causa o consecuencia del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, ya que las inclusiones proteicas y los agregados característicos de estos desórdenes han sido relacionados tanto con toxicidad como con protección (Arrasate, Mitra, Schweitzer, Segal, & Finkbeiner, 2004; Morley *et al.*, 2002; Ross & Poirier, 2004; Treusch *et al.*, 2009). Un estudio publicado recientemente concluye que un gen supresor de la agregación tendrá distintos efectos sobre la toxicidad dependiendo de la función celular afectada, así como de su red de interacción con otros genes (Silva *et al.*, 2011). Si tenemos en cuenta que procesos relacionados con el plegamiento y la degradación en el retículo han sido asociados repetidamente a la patología de estas enfermedades, y la alta correlación encontrada entre toxicidad y agregación durante nuestros estudios, éste parece ser el caso para *dnj-27*, pero de cualquier manera, no se puede descartar que otros mecanismos se encuentren detrás del papel protector de *dnj-27*.

Entre los sucesos claves que se pueden encontrar en la mayoría de los desórdenes neurodegenerativos destacan la aparición de estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Drake, 2003; Gary E Gibson & Huang, 2005; Reddy & Reddy, 2011; B. Su *et al.*, 2010). Durante este estudio se encontró que la inhibición de *dnj-27* desencadena la fragmentación de la mitocondria, por lo que habría que tener en cuenta la participación de la mitocondria como otro posible factor potencial implicado en la protección de *dnj-27*. El retículo endoplasmático y la mitocondria están físicamente conectados y en estrecha comunicación por medio del subcompartimento especializado llamado MAM (Vance, 1990). En este contexto, es lógico pensar que la disfunción provocada en el retículo por la inhibición de *dnj-27* podría afectar directamente también la función de la mitocondria.

Las PDI son una familia de proteínas que también participan en los sistemas de control encargados del correcto plegamiento de las proteínas del retículo, permitiendo la isomerización de enlaces disulfuro (Ferrari & Söling, 1999). Además, estructuralmente se

Capítulo IV

encuentran relacionadas con ERdj5/DNJ-27. En distintos estudios, las PDI han sido identificadas como un factor protector de la neurotoxicidad y, como tales, muestran un incremento de su expresión en pacientes de distintas enfermedades neurodegenerativas (Conn *et al.*, 2004; Uehara *et al.*, 2006; Walker & Atkin, 2011). Por otro lado, un estudio publicado recientemente propone un papel dual para las PDI debido a que, en contraste con su función protectora inicial sugerida anteriormente que tendría como propósito reparar proteínas mal plegadas, las PDI son también capaces de activar un proceso de muerte celular por apoptosis provocando la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria, cuando se acumulan a altos niveles durante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Hoffstrom *et al.*, 2010). Se encontró además que, durante este proceso, las PDI se localizan preferentemente en este compartimento llamado MAM, lo cual podría ofrecer algunas claves sobre el mecanismo implicado en la fragmentación de la mitocondria inducida al inhibir *dnj-27*. Como ya se comentó en la introducción, la permeabilización de la mitocondria en mamíferos se produce mediante la formación de canales homo-oligoméricos de Bax o Bak en la membrana externa de la mitocondria (Leber, Lin, & Andrews, 2007). Las PDI parecen favorecer la oligomerización de Bak en la membrana de la mitocondria mediante la oxidación inter-molecular de residuos de cisteína. Aunque en *C. elegans* no existe un auténtico homólogo de las proteínas Bax/Bak, ya que no parece haber implicación mitocondrial en la apoptosis del nematodo, existen algunos homólogos de proteínas Bcl-2 que se localizan en la membrana mitocondrial que, como CED-9, están implicados en la regulación de la fisión mitocondrial (Delivani, Adrain, Taylor, Duriez, & Martin, 2006). De esta forma, dos posibles mecanismos pueden aventurarse a la luz de estos datos, siempre y cuando consideremos que estos procesos están conservados en el nematodo: 1) la reducción de los niveles de DNJ-27 llevaría lógicamente a un aumento de proteínas con puentes disulfuro anómalos que, como respuesta, las PDI del retículo intentarían remediar. Esto podría dar lugar a un aumento en la expresión de PDI que, si alcanzara niveles elevados, podría desencadenar la fragmentación de la mitocondria, y 2) se podría especular también sobre el hecho de que DNJ-27 pueda actuar directamente sobre proteínas Bcl-2 impidiendo así la permeabilización de la membrana.

Nuestros datos, junto con los estudios mencionados, ponen de manifiesto la importancia del mantenimiento de la homeostasis del retículo endoplasmático y el papel de la formación de puentes disulfuro durante las enfermedades neurodegenerativas, ya que incluso pequeñas alteraciones en la homeostasis del retículo pueden dar lugar a una mayor toxicidad. Esta última consideración es particularmente importante en los desórdenes neurodegenerativos, debido a que son enfermedades asociadas al envejecimiento y a que

se conoce que la agregación de proteínas y las alteraciones de la proteostasis aumentan con la edad del individuo (David *et al.*, 2010; Demontis & Perrimon, 2010). De esta forma, células envejecidas muestran problemas cada vez mayores para mantener en un estado de plegamiento adecuado a proteínas metaestables, como consecuencia, entre otros factores, de una disminución en la expresión y en la inducción de ciertas chaperonas residentes del retículo endoplasmático, como pueden ser BiP, calnexina o PDI (Naidoo, 2009).

Es importante señalar, que durante estos estudios la protección de *dnj-27* fue también compartida en la mayoría de los casos por el gen homólogo humano *ERdj5*. Estos datos no vienen sino a confirmar la función conservada durante la evolución de *dnj-27/ERdj5*. Así, la expresión de *ERdj5* en células musculares de modelos de Parkinson y enfermedades de poliQ condujo a una reducción de la agregación de los dos péptidos con tendencia a agregar implicados. Sin embargo, la protección de *ERdj5* no se hizo extensiva cuando se estudió la parálisis asociada al modelo de Alzheimer. En este caso hay que mencionar que los animales transgénicos que sobreexpresan *ERdj5* muestran un fenotipo muy marcado de letalidad embrionaria y larvaria, probablemente debido a la sobreexpresión simultánea de *ERdj5* y $A\beta$ en el retículo. Dado que los experimentos de parálisis se llevan a cabo con animales adultos, una más que razonable explicación a la falta de protección de *ERdj5* en este modelo sea que los animales que llegan a adulto, y por tanto los utilizados para realizar los ensayos, sean los que expresen menores niveles de *ERdj5* desde el array extracromosómico.

Otra cuestión importante que surgió durante el desarrollo de los distintos ensayos realizados fue la influencia del tipo de fuente de alimento sobre la toxicidad y la agregación de los péptidos asociados a las distintas enfermedades neurodegenerativas estudiadas. Para explicar estos resultados, conviene apuntar primero que las diferencias en la fuente de alimento pueden tener un efecto muy importante en el tiempo de vida de *C. elegans*, así como sobre otros parámetros (Maier, Adilov, Regenass, & Alcedo, 2010; Reinke, Hu, Sykes, & Lemire, 2010). Se ha demostrado que las estirpes de *E. coli* utilizadas de forma rutinaria como fuente de alimento para el cultivo de *C. elegans* en el laboratorio poseen valores nutricionales distintos, ya que los perfiles metabólicos y el almacenamiento de grasas de los nematodos se ve afectado. Este podría ser, por tanto, un factor a tener en cuenta en estas diferencias causadas por el tipo de bacteria utilizada, pero también conviene resaltar la posible implicación de la ruta de la insulina/IGF-1. Ésta es una ruta de señalización conservada evolutivamente y clave en el control de la longevidad de todos los organismos pluricelulares, y que modula tanto el efecto de gran parte de las señales sensoriales sobre la longevidad (Apfeld & Kenyon, 1999) como la resistencia a bacterias patógenas (Garsin *et*

Capítulo IV

al., 2003). En este sentido, se ha demostrado que probablemente sea la ruta de la insulina la que esté detrás de las diferencias de longevidad observadas en nematodos crecidos en HT115 y en OP50 (Maier *et al.*, 2010). Además, diversos estudios han revelado como los diferentes modelos de enfermedades neurodegenerativas en *C. elegans* se ven influenciados por la ruta de la insulina (Cohen *et al.*, 2010, 2006; Florez-McClure, Hohsfield, Fonte, Bealor, & Link, 2007; Morley *et al.*, 2002), lo que directamente sugiere una conexión entre fuente de alimento y proteotoxicidad. Salvando las obvias diferencias entre las dietas de humanos y nematodos, nuestras observaciones concuerdan con el número creciente de estudios que indican un papel protagonista de factores externos, como puedan ser la dieta o toxinas ambientales, en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Priyadarshi, Khuder, Schaub, & Priyadarshi, 2001; Ramesh *et al.*, 2010; Tanner, 2003) .

En resumen, durante esta tesis se descubrió que DNJ-27/ERdj5 funciona como un nuevo regulador de la proteotoxicidad relacionada con la edad en modelos de enfermedades neurodegenerativas en *C. elegans*. En esta protección, la comunicación entre diferentes compartimentos subcelulares parece estar implicada, dado que se encontraron tanto alteraciones en la proteostasis citoplasmática como en la estructura de la mitocondria, mecanismos previamente relacionados con estos desórdenes.

Capítulo V. Conclusiones

Conclusiones

1. El silenciamiento por ARNi de diferentes genes de las familias de las tiorredoxinas, las glutarredoxinas y las peroxirredoxinas afecta a los fenotipos asociados a los modelos de Alzheimer y Parkinson estudiados, aunque sólo los genes *dnj-27* y *gsr-1* muestran un papel protector en ambos modelos.
2. *dnj-27* muestra un patrón de expresión relativamente ubicuo y la proteína DNJ-27 se localiza en el lumen del retículo endoplasmático.
3. La activación de la UPR induce la expresión del gen *dnj-27* por medio de la ruta IRE-1/XBP-1.
4. El gen *dnj-27* juega un papel protector frente al fenotipo de parálisis progresiva y frente a la formación de depósitos amiloides de las estirpes modelo de Alzheimer estudiadas.
5. *dnj-27* protege de la toxicidad y la agregación asociada a α -sinucleína en diferentes modelos de la enfermedad de Parkinson en *C. elegans*.
6. La protección del gen *dnj-27* sobre la toxicidad y la agregación se extiende a un modelo de enfermedades de poliglutamina en *C. elegans*.
7. El gen de humano *ERdj5* juega un papel protector sobre la agregación de α -syn::YFP y poliQ::YFP en los modelos estudiados.
8. Otros genes de *C. elegans* implicados en la ERAD también juegan un papel protector en la mayoría de los modelos de enfermedades neurodegenerativas, aunque sólo los genes *hrdl-1* y *R151.6* parecen proteger en todos los modelos estudiados.
9. Dada la alta correlación encontrada entre agregación y toxicidad, el efecto de *dnj-27* sobre la agregación de los péptidos característicos de cada modelo podría, al menos en parte, estar detrás de su papel protector.
10. El silenciamiento de *dnj-27* por ARNi produce un aumento de la degradación de proteínas en el citoplasma de células musculares de *C. elegans* y la fragmentación de la mitocondria, aunque no tiene ningún efecto sobre la estructura de las miofibrillas del músculo.
11. El tipo de bacteria utilizada como fuente de alimento influye sobre los fenotipos asociados a los modelos de enfermedades neurodegenerativas estudiados.

Capítulo VI. **Materiales y Métodos**

I. Materiales

6.1 Estirpes

6.1.1 Estirpes de *C. elegans*

ESTIRPES	GENOTIPO	REF./FUENTE
Estirpes básicas		
Bristol N2	Estirpe Silvestre	CGC ^a
RB1784	<i>dnj-27 (ok2302) I</i>	CGC
VZ65	<i>dnj-27 (ok2302) I</i> (retrocruzada 6x)	Este estudio
TM2785	<i>dnj-27 (tm2785) I</i>	NBRP ^b
Derivados de rrf-3		
NL2099	<i>rrf-3 (pk1426) II</i>	(Sijen <i>et al.</i> , 2001)
CL647	<i>smg-1 (cc546ts) I; rrf-3 (pk1426) II; dvls27 [pAF29 (Pmyo-3::Aβ 3-42::let-858 3'-UTR); pRF4(rol-6 (su1006))] X</i>	Cedida por el Dr. Chris D. Link
Estirpes de fusión de <i>dnj-27</i> y <i>GFP</i>		
BC10640	<i>dpy-5(e907) I; sEX10640 [Pdnj-27::GFP; pCeh361 (dpy-5)]</i>	CGC
VZ188	<i>vzEx64 [pVZ34 (Pdnj-27::GFP::unc-54 3'-UTR)]</i>	Este estudio
VZ189	<i>vzEx65 [pVZ34 (Pdnj-27::GFP::unc-54 3'-UTR)]</i>	Este estudio
VZ190	<i>vzEx66 [pVZ34 (Pdnj-27::GFP::unc-54 3'-UTR)]</i>	Este estudio
VZ184	<i>vzEx60 [pVZ378 (Pdnj-27::dnj-27::YFP::KDEL::unc-54 3'-UTR)]</i>	Este estudio

Capítulo VI

Estirpes sobrepresantes de *dnj-27*

VZ148	<i>vzEx40 [pVZ325 (Pdnj-27::dnj-27::dnj-27 3'-UTR); Punc-122::GFP]</i>	Este estudio
VZ149	<i>vzEx41 [pVZ325 (Pdnj-27::dnj-27::dnj-27 3'-UTR); Punc-122::GFP]</i>	Este estudio
VZ152	<i>vzEx42 [pVZ325 (Pdnj-27::dnj-27::dnj-27 3'-UTR); Punc-122::GFP]</i>	Este estudio
VZ293	<i>vzEx107 [pVZ451 (Pmyo-3::dnj-27 ADNc::unc-54 3'-UTR); Ptrx-3::mCherry]</i>	Este estudio
VZ294	<i>vzEx108 [pVZ451 (Pmyo-3::dnj-27 ADNc::unc-54 3'-UTR); Ptrx-3::mCherry]</i>	Este estudio
VZ295	<i>vzEx109 [pVZ451 (Pmyo-3::dnj-27 ADNc::unc-54 3'-UTR); Ptrx-3::mCherry]</i>	Este estudio

Estirpes de colocación del retículo endoplasmático^c

VZ254	<i>vzEx90 [pVZ448 (Pmyo-3::mCherry::TRAM-1)]</i>	Este estudio
VZ255	<i>vzEx91 [pVZ448 (Pmyo-3::mCherry::TRAM-1)]</i>	Este estudio
VZ256	<i>vzEx92 [pVZ448 (Pmyo-3::mCherry::TRAM-1)]</i>	Este estudio

Derivados del péptido β -amiloide

CL4176	<i>smg-1 (cc546ts) I; dvls27 [pAF29 (Pmyo-3::Aβ 3-42::let-858 3'-UTR); pRF4 (rol-6 (su1006))] X</i>	(Drake <i>et al.</i> , 2003)
CL2006	<i>dvls2 [pCL12 (Punc-54::Aβ 3-42::unc-54 3'-UTR); pRF4 (rol-6 (su1006))] II</i>	(Link <i>et al.</i> , 1995)
CL3109	<i>dvls10 [pDF1 (Punc-54::Aβ 3-42 dímero::unc-54 3'-UTR); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	(Fay <i>et al.</i> , 1998)
VZ80	<i>dnj-27 (ok2302) I; dvls2 [pCL12 (Punc-54::Aβ 3-42::unc-54 3'-UTR); pRF4 (rol-6 (su1006))] II</i>	Este estudio
VZ158	<i>dvls2 [pCL12 (Punc-54::Aβ 3-42::unc-54 3'-UTR); pRF4 (rol-6 (su1006))] II; vzEx41 [pVZ325 (Pdnj-27::dnj-27::dnj-27 3'-UTR); Punc-122::GFP]</i>	Este estudio

Derivados de α -sinucleína

UA50	<i>baln13 [Punc-54::α-syn::GFP::unc-54 3'-UTR; Punc-54::tor-2]</i>	(Hamamichi <i>et al.</i> , 2008)
VZ201	<i>dnj-27 (ok2302) I; baln13 [Punc-54::α-syn::GFP::unc-54 3'-UTR; Punc-54::tor-2]</i>	Este estudio
NL5901	<i>unc-119 (ed3) III; pkIs2386 [Punc-54::α-syn::YFP::unc-54 3'-UTR; unc-119(+)] IV</i>	(van Ham <i>et al.</i> , 2008)
VZ303	<i>unc-119 (ed3) III; pkIs2386 [Punc-54::α-syn::YFP::unc-54 3'-UTR; unc-119(+)] IV; vzEx107 [pVZ451 (Pmyo-3::dnj-27 ADNc::unc-54 3'-UTR); Ptrx-3::mCherry]</i>	Este estudio
UA44	<i>baln11 [Pdat-1::α-syn::unc-54 3'-UTR; Pdat-1::GFP]</i>	(Cooper <i>et al.</i> , 2006)
VZ199	<i>baln11 [Pdat-1::α-syn::unc-54 3'-UTR; Pdat-1::GFP]; vzEx41 [pVZ325 (Pdnj-27::dnj-27::dnj-27 3'-UTR); Punc-122::GFP]</i>	Este estudio
VZ136	<i>vzEx37 [pVZ320 (Punc-54::α-syn::unc-54 3'-UTR); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ147	<i>vzEx39 [pVZ320 (Punc-54::α-syn::unc-54 3'-UTR); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio

Derivados de poliglutamina

AM141	<i>rmls133 [Punc-54::Q40::YFP] X</i>	(Morley <i>et al.</i> , 2002)
VZ299	<i>rmls133 [Punc-54::Q40::YFP] X; vzEx107[pVZ451(Pmyo-3::dnj-27 ADNc::unc-54 3'-UTR) ; Ptrx-3::mCherry]</i>	Este estudio

Estirpes de estrés en el retículo endoplasmático

SJ4005	<i>zcls4 [Phsp-4::GFP] V</i>	(Urano <i>et al.</i> , 2002)
VZ146	<i>vzEx38 [pVZ326 (Phsp-4::DsRed::unc-54 3'-UTR); pRF4 (rol-6 (su1006))]</i>	Este estudio
VZ86	<i>dvIs2 [pCL12(Punc-54::Aβ 3-42::unc-54 3'-UTR); pRF4 (rol-6(su1006))] II; zcls4 [Phsp-4::GFP] V</i>	Este estudio

Capítulo VI

VZ259	<i>zcls4 [Phsp-4::GFP] V; vzEx37 [pVZ320 (Punc-54::α-syn::unc-54 3'-UTR); pRF4 (rol-6(su1006))]</i>	Este estudio
VZ277	<i>zcls4 [Phsp-4::GFP] V; dvls10 [pDF1 (Punc-54::Aβ 3-42 dímero::unc-54 3'-UTR); pRF4(rol-6(su1006))]</i>	Este estudio

Estirpes de inducción de ERAD

VZ160	<i>vzEx43 [pVZ350 (Pmyo-3::cpl-1::YFP::unc-54 3'-UTR); Punc-122::GFP]</i>	Este estudio
VZ161	<i>vzEx44 [pVZ350 (Pmyo-3::cpl-1::YFP::unc-54 3'-UTR); Punc-122::GFP]</i>	Este estudio
VZ162	<i>vzEx45 [pVZ350 (Pmyo-3::cpl-1::YFP::unc-54 3'-UTR); Punc-122::GFP]</i>	Este estudio
VZ169	<i>vzEx50 [pVZ352 (Pmyo-3::cpl-1^{W32A;Y35A}::YFP::unc-54 3'-UTR); Punc-122::GFP]</i>	Este estudio
VZ170	<i>vzEx51 [pVZ352 (Pmyo-3::cpl-1^{W32A;Y35A}::YFP::unc-54 3'-UTR); Punc-122::GFP]</i>	Este estudio
VZ171	<i>vzEx52 [pVZ352 (Pmyo-3::cpl-1^{W32A;Y35A}::YFP::unc-54 3'-UTR); Punc-122::GFP]</i>	Este estudio

Estirpes derivadas de ERdj5 humano

VZ314	<i>vzEx123 [pVZ476 (Pmyo-3::hERdj5 ADNc::unc-54 3'-UTR); Punc-122::GFP]</i>	Este estudio
VZ315	<i>vzEx124 [pVZ476 (Pmyo-3::hERdj5 ADNc::unc-54 3'-UTR); Punc-122::GFP]</i>	Este estudio
VZ316	<i>unc-119 (ed3) III; pkls2386 [Punc-54::α-syn::YFP::unc-54 3'-UTR; unc-119(+)] IV ; vzEx123 [pVZ476 (Pmyo-3::hERdj5 ADNc::unc-54 3'-UTR); Punc-122::GFP]</i>	Este estudio
VZ317	<i>dvls2 [pCL12 (Punc-54::Aβ 3-42::unc-54 3'-UTR); pRF4 (rol-6 (su1006))] II; vzEx123 [pVZ476 (Pmyo-3::hERdj5 ADNc::unc-54 3'-UTR); Punc-122::GFP]</i>	Este estudio
VZ336	<i>vzEx131 [pVZ476 (Pmyo-3::hERdj5 ADNc::unc-54 3'-UTR); Pmyo-2::mCherry]</i>	Este estudio
VZ337	<i>vzEx132 [pVZ476 (Pmyo-3::hERdj5 ADNc::unc-54 3'-UTR); Pmyo-2::mCherry]</i>	Este estudio

VZ338	<i>vzEx133 [pVZ476 (Pmyo-3::hERdj5 ADNc::unc-54 3'-UTR); Pmyo-2 ::mCherry]</i>	Este estudio
VZ361	<i>rmls133 [Punc-54::Q40::YFP] X; vzEx131 [pVZ476 (Pmyo-3::hERdj5 ADNc::unc-54 3'-UTR); Pmyo-2 ::mCherry]</i>	Este estudio
VZ362	<i>rmls133 [Punc-54::Q40::YFP] X; vzEx132 [pVZ476 (Pmyo-3::hERdj5 ADNc::unc-54 3'-UTR); Pmyo-2 ::mCherry]</i>	Este estudio
VZ363	<i>rmls133 [Punc-54::Q40::YFP] X; vzEx133 [pVZ476 (Pmyo-3::hERdj5 ADNc::unc-54 3'-UTR); Pmyo-2 ::mCherry]</i>	Este estudio

Estirpes de degradación citoplasmática en el músculo

PD55	<i>ccls55 [Punc-54::Δunc-54::lacZ::unc-54 3'-UTR] V</i>	(Zdinak <i>et al.</i> , 1997)
PJ1009	<i>unc-51(e369) V, ccls55 [Punc-54::Δunc-54::lacZ::unc-54 3'-UTR] V</i>	(Szewczyk, 2007)
PJ1103	<i>mpk-1 (n2521) III; him-8 (e1489), ccls55 [Punc-54::Δunc-54::lacZ::unc-54 3'-UTR] V</i>	(Szewczyk, 2002)
PJ1132	<i>daf-18 (e1375) IV; ccls55 [Punc-54::Δunc-54::lacZ::unc-54 3'-UTR] V</i>	(Szewczyk, 2007)
PJ1288	<i>ced-3(n717) IV; ccls55 [Punc-54::Δunc-54::lacZ::unc-54 3'-UTR] V</i>	(Etheridge, 2012)

Estirpes para la evaluación de la mitocondria y las miofibrillas

CB5600	<i>him-8 (e1489) IV; ccls4251 [Pmyo-3::NLS::GFP-lacZ; Pmyo-3::MitGFP] I</i>	(Fire <i>et al.</i> , 1998)
PJ727	<i>jls01 [myo-3::GFP, rol-6(su1006)]; ccls55 [Punc-54::Δunc-54::lacZ::unc-54 3'-UTR] V</i>	(Fostel <i>et al.</i> , 2003)

^a *Caenorhabditis* Genetics Center

^b National BioResource Project

^c La estirpe con genotipo *vzEx60 [pVZ378 (Pdnj-27::dnj-27::YFP::KDEL)]; vzEx90 [pVZ448 (Pmyo-3::mCherry::TRAM-1)]* utilizada para demostrar la colocalización de DNJ-27 con TRAM-1 en el retículo endoplasmático, se generó cruzando las estirpes VZ184 y VZ254. Sin embargo, no pudo obtenerse progenie transgénica doble viable derivada de esta estirpe, por lo que la colocalización tuvo que realizarse en la generación F1.

Capítulo VI

6.1.2 Estirpes de *E. coli*

OP50	Auxótrofo a uracilo	(Brenner, 1974)
HT115	F-, <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> , <i>IN(rrnD-rrnE)1</i> , <i>rnc14::Tn10</i> (DE lysogen: <i>lacUV5</i> promoter-T7 polymerase).	(Sijen <i>et al.</i> , 2001)
DH5 α	F- Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	(Studier & Moffatt, 1986)

6.2 Medios de cultivo, soluciones y tampones

6.2.1 Medios y tampones para el mantenimiento de estirpes de *C. elegans*

MEDIO/TAMPÓN	COMPOSICIÓN
Placas NGM (<i>Nematode Growth Medium</i>)	3 g/L NaCl 2.5 g/L peptona 17 g/L agar 5 g/L colesterol 1 mM MgSO ₄ 0.05 M tampón fosfato
Placas NGM para ARNi	A la receta anterior se añade: 25 μ g/ml carbenicilina 1 mM IPTG
Tampón M9	3 g/L KH ₂ PO ₄ 6 g/L Na ₂ HPO ₄ 5 g/L NaCl 1 mM MgSO ₄
Tampón S	5.85 g/L NaCl 1 g/L K ₂ HPO ₄ 6 g/L KH ₂ PO ₄
Solución de <i>bleaching</i>	1.5% NaOCl 1 M NaOH

6.2.2 Medios de cultivo para *E. coli*

MEDIO	COMPOSICIÓN
Luria-Bertani (LB)	10 g/L triptona 5 g/L extracto de levadura 10 g/L NaCl → para hacer placas se añade 15 g/L agar
Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC)	20 g/L triptona 5 g/L extracto de levadura 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 20 mM MgSO ₄ 20 mM glucosa

6.2.3 Otras soluciones y tampones

SOLUCIÓN/TAMPÓN	COMPOSICIÓN
Tampón de lisis	50 mM KCl 2.5 mM MgCl ₂ 0.45% NP-40 0.45% Tween-20 0.01% Gelatina 10 mM Tris/HCl pH 8.3
Tampón de lisis de proteínas	150 mM NaCl 1% NP-40 50 mM Tris-HCl pH 8
Tampón Laemmli (5x)	50% glicerol 10% SDS 0.05% azul de bromofenol 5% β-mercaptoetanol 31.3 mM Tris
25x Phosphate Buffer Saline (PBS)	44 mM KH ₂ PO ₄ 253 mM Na ₂ HPO ₄ 3.42 M NaCl 67 mM KCl

Capítulo VI

6.3 Plásmidos y vectores

NÚMERO	PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	REF./FUENTE
--------	----------	-------------	-------------

VECTORES DE CLONACIÓN

pGEM-T Easy Vector		Vector que facilita la clonación directa de fragmentos de PCR, gracias a un residuo de T añadido en cada uno de los extremos 3'. Contiene los promotores SP6 y T7.	Promega
pL4440		Vector para ensayos de ARNi con dos promotores T7 para la producción de ARN de doble cadena en bacterias HT115. Sin inserto se utiliza como control negativo en los ensayos de ARNi.	(Timmons & Fire, 1998)
pPD95.77		Vector de expresión en <i>C. elegans</i> , sin promotor, que incluye el gen <i>GFP</i> . Presenta la región 3'-UTR del gen <i>unc-54</i> de <i>C. elegans</i> .	(Boulin, Etchberger, & Hobert, 2006)
pCJ102		Vector de expresión en <i>C. elegans</i> , sin promotor, que incluye el gen <i>DsRed</i> . Presenta la región 3'-UTR del gen <i>unc-54</i> de <i>C. elegans</i> .	(Winkelbauer <i>et al.</i> , 2005)
pDEST		Vector de expresión que facilita la clonación de fragmentos mediante un proceso de recombinación	Gateway technology (Invitrogen)

PLÁSMIDOS PARA ENSAYOS DE ARNi

pVZ5	pL4440/ <i>unc-22</i>	Plásmido usado como control positivo en ensayos de ARNi. Produce un fenotipo de movimiento descoordinado.	(Timmons & Fire, 1998)
pVZ18	pL4440/ <i>dnj-27</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>dnj-27</i> .	Este estudio
pVZ12	pL4440/ <i>trx-1</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>trx-1</i> .	Este estudio
pVZ9	pL4440/ <i>trxr-1</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>trxr-1</i> .	Este estudio
pVZ16	pL4440/ <i>trx-2</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>trx-2</i> .	(Cacho-Valadez <i>et al.</i> , 2012)
pVZ10	pL4440/ <i>trxr-2</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>trxr-2</i> .	(Cacho-Valadez <i>et al.</i> , 2012)
pVZ15	pL4440/ <i>trx-4</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>trx-4</i> .	Este estudio
pVZ17	pL4440/ <i>trx-5</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>trx-5</i> .	Este estudio
pVZ19	pL4440/ <i>trx-3</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>trx-3</i> .	Este estudio
pVZ11	pL4440/ <i>txl</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>txl</i> .	Este estudio

pVZ72	pL4440/ <i>gsr-1</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>gsr-1</i> .	(Kamath & Ahringer, 2003)
pVZ232	pL4440/ <i>glrx-5</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>glrx-5</i> .	(Kamath & Ahringer, 2003)
pVZ20	pL4440/ <i>glrx-10</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>glrx-10</i> .	Este estudio
pVZ21	pL4440/ <i>glrx-21</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>glrx-21</i> .	Este estudio
pVZ229	pL4440/ <i>glrx-22</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>glrx-22</i> .	Este estudio
pVZ137	T7pSport/ <i>prdx-2</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>prdx-2</i> .	(Isermann <i>et al.</i> , 2004)
pVZ136	T7pSport/ <i>prdx-3</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>prdx-3</i> .	(Isermann <i>et al.</i> , 2004)
pVZ139	T7pSport/ <i>prdx-6</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>prdx-6</i> .	(Isermann <i>et al.</i> , 2004)
pVZ245	pL4440/ <i>ire-1</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>ire-1</i> .	(Kamath & Ahringer, 2003)
pVZ271	pL4440/ <i>xbp-1</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>xbp-1</i> .	(Kamath & Ahringer, 2003)
pVZ243	pL4440/ <i>pek-1</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>pek-1</i> .	(Kamath & Ahringer, 2003)
pVZ244	pL4440/ <i>atf-6</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>atf-6</i> .	(Kamath & Ahringer, 2003)
pVZ276	pL4440/ <i>hrdl-1</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>hrdl-1</i> .	(Kamath & Ahringer, 2003)
pVZ277	pL4440/ <i>cup-2</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>cup-2</i> .	(Kamath & Ahringer, 2003)
pVZ278	pL4440/ <i>sel-11</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>sel-11</i> .	(Kamath & Ahringer, 2003)
pVZ279	pL4440/ <i>sel-1</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>sel-1</i> .	(Kamath & Ahringer, 2003)
pVZ280	pL4440/ <i>R151.6</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>R151.6</i> .	(Kamath & Ahringer, 2003)
pVZ281	pL4440/ <i>cdc-48.1</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>cdc-48.1</i> .	(Kamath & Ahringer, 2003)
pVZ282	pL4440/ <i>cdc-48.2</i>	Plásmido para interferir la expresión del gen <i>cdc-48.2</i> .	(Kamath & Ahringer, 2003)
pVZ217	pL4440/ <i>Aβ</i>	Plásmido para interferir la expresión de <i>Aβ</i> .	Construido por el Dr. Chris D. Link

PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS FLUORESCENTES

pVZ34	pPD95.77/ <i>Pdnj27::GFP::unc-54 3'-UTR</i>	Plásmido para estudiar la expresión del gen <i>dnj-27</i> .	Este estudio
pVZ378	pPD95.85/ <i>Pdnj27::dnj-27::YFP::KDEL::unc-54 3'-UTR</i>	Plásmido para estudiar la expresión y localización subcelular del gen <i>dnj-27</i> .	Este estudio

Capítulo VI

PLÁSMIDOS DE SOBREXPRESIÓN

pVZ325	pPD95.77/ <i>Pdnj-27::dnj-27:: dnj-27 3'-UTR</i>	Plásmido para sobreexpresar <i>dnj-27</i> bajo el control de su promotor endógeno.	Este estudio
pVZ451	pDEST/ <i>Pmyo-3:: dnj-27 ADNc:: unc-54 3'-UTR</i>	Plásmido para sobreexpresar <i>dnj-27</i> en células musculares de <i>C. elegans</i> .	Este estudio

MARCADORES DE TRANSGÉNESIS

pVZ309	pRF4(pUC16)/ <i>rol-6 (su1006)</i>	Co-inyectado como marcador produce fenotipo "Roller".	(Mello <i>et al.</i> , 1991)
pVZ225	pPD95.77/ <i>unc-122::GFP</i>	Co-inyectado como marcador induce la expresión de GFP en coelomocitos.	(Miyabayashi <i>et al.</i> , 1999)
pVZ374	pPD95.77/ <i>Ptrx-3::mCherry</i>	Co-inyectado como marcador induce la expresión de mCherry en intestino.	Este estudio
pVZ495	pCFJ90 (<i>Pmyo-2::mCherry</i>)	Co-inyectado como marcador induce la expresión de mCherry en faringe.	(Frøkjær-jensen <i>et al.</i> , 2008)

MARCADORES DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

pVZ448	pPD49.26/ <i>Pmyo-3::mCherry:: TRAM-1</i>	Marcador de retículo endoplasmático en células musculares de <i>C. elegans</i> .	Este estudio
--------	--	--	--------------

PLÁSMIDOS DE α -SINUCLEÍNA

pVZ320	pDEST/ <i>Punc-54::α-syn:: unc-54 3'-UTR</i>	Plásmido que permite la expresión de α -sinucleína sin GFP en células musculares de <i>C. elegans</i> .	Este estudio
--------	---	--	--------------

PLÁSMIDOS DE ESTRÉS EN EL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO Y ERAD

pVZ326	pCJ102/ <i>Phsp-4::DsRed:: unc-54 3'-UTR</i>	<i>DsRed</i> se induce cuando se activa la UPR.	Este estudio
pVZ350	pPD49.26/ <i>Pmyo-3:: cpl-1::YFP:: unc-54 3'-UTR</i>	Induce la expresión de <i>cpl-1</i> fusionado a YFP en lisosomas. Se utiliza como control negativo de la inducción de ERAD.	Este estudio
pVZ352	pPD49.26/ <i>Pmyo-3:: cpl-1^{W32A;Y35A}::YFP:: unc-54 3'-UTR</i>	La forma mutada de <i>cpl-1</i> fusionada a YFP se acumula en el retículo y permite observar la inducción de ERAD.	Este estudio

PLÁSMIDOS DE ERdj5

pVZ476	pPD95.77/ <i>Pmyo-3:: hERdj5 ADNc:: unc-54 3'-UTR</i>	Permite la expresión del gen humano <i>ERdj5</i> en células musculares de <i>C. elegans</i> .	Este estudio
--------	---	---	--------------

6.4 Cebadores

NÚMERO	SECUENCIA (5'→3')	DESCRIPCIÓN
---------------	--------------------------	--------------------

CEBADORES DE SECUENCIACIÓN GENERALES

T7	GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTG	Secuenciación de insertos clonados en el vector pGEM-T Easy Vector. Cebador directo.
SP6	GGTGACACTATAGAATACTCAAGCTATGC	Secuenciación de insertos clonados en el vector pGEM-T Easy Vector. Cebador inverso.
AMV-03	CTCACTATAGGGAGACCGGCAG	Secuenciación de insertos clonados en el vector pL4440. Cebador directo.
AMV-04	GTAATACGACTCACTATAGGGC	Secuenciación de insertos clonados en el vector pL4440. Cebador inverso.
AMV-05	GCTGAAATCACTCACAACGATG	Secuenciación de insertos clonados en el vector pPD95.77. Cebador directo.
AMV-06	ACCATCTAATTCAACAAGAATTGG	Secuenciación de insertos clonados en el vector pPD95.77. Cebador inverso.
AMV-07	AAAGTTCTTCTCCTTTACTC	Secuenciación de insertos clonados en el vector pPD95.77. Cebador inverso.

CEBADORES DE RASTREO DE ALELOS

AMV-266	GCCGGTGTGTCATAAGGATT	Rastreo y secuenciación del alelo <i>ok2302</i> del gen <i>dnj-27</i> . Cebador directo para las PCR interna y externa.
AMV-268	ATCCATGGTTCCGATGAGTC	Rastreo y secuenciación del alelo <i>ok2302</i> del gen <i>dnj-27</i> . Cebador inverso de la PCR externa.
AMV-279	CATGTGCATTTTCATCGAACG	Rastreo del alelo <i>ok2302</i> del gen <i>dnj-27</i> . Cebador inverso de la PCR interna.
AMV-236	TATAAATATTTCTGCGATTGCGATTGG	Rastreo del alelo <i>pk1426</i> del gen <i>rrf-3</i> . Cebador directo para las PCR interna y externa.
AMV-237	CTCAAATCTCGCATACGAGAGG	Rastreo del alelo <i>pk1426</i> del gen <i>rrf-3</i> . Cebador inverso de la PCR interna.
AMV-238	ATCAACGTCTTCTGGACAAATC	Rastreo del alelo <i>pk1426</i> del gen <i>rrf-3</i> . Cebador inverso de la PCR externa.

CEBADORES PARA CONSTRUCCIONES DE ARNi

AMV-90	CTAGTCTAGAATGAGGGCAATTG	Construcción del plásmido pL4440/ <i>dnj-27</i> para ensayos de ARNi. Cebador directo.
--------	-------------------------	--

Capítulo VI

AMV-91	CCATCTCGAGTTATAGCTCATCATG	Construcción del plásmido pL4440/ <i>dnj-27</i> para ensayos de ARNi. Cebador inverso.
AMV-45	ATGCTCTAGAATGTTGAAACGATG	Construcción del plásmido pL4440/ <i>trx-1</i> para ensayos de ARNi. Cebador directo.
AMV-46	GCATCTCGAGTCATTGAGCAGATAC	Construcción del plásmido pL4440/ <i>trx-1</i> para ensayos de ARNi. Cebador inverso.
AMV-23	TTTATCTAGAATGAAATCTCTCAC	Construcción del plásmido pL4440/ <i>trx-1</i> para ensayos de ARNi. Cebador directo.
AMV-24	TGGACTGCAGTTAACCTCAGCAAC	Construcción del plásmido pL4440/ <i>trx-1</i> para ensayos de ARNi. Cebador inverso.
AMV-95	CTAGTCTAGAATGGCTAAGAAC	Construcción del plásmido pL4440/ <i>trx-3</i> para ensayos de ARNi. Cebador directo.
AMV-96	GTGCACTGCAGTTATGCACGGATTC	Construcción del plásmido pL4440/ <i>trx-3</i> para ensayos de ARNi. Cebador inverso.
AMV-75	ATGCTCTAGAATGTCTATCGCAATC	Construcción del plásmido pL4440/ <i>trx-4</i> para ensayos de ARNi. Cebador directo.
AMV-76	GCATCTCGAGTCATTGAAGAGCTG	Construcción del plásmido pL4440/ <i>trx-4</i> para ensayos de ARNi. Cebador inverso.
AMV-85	TGCATCTAGAATGGATATTTTGGC	Construcción del plásmido pL4440/ <i>trx-5</i> para ensayos de ARNi. Cebador directo.
AMV-86	TGCACTCGAGTTACTTTAAGCATT	Construcción del plásmido pL4440/ <i>trx-5</i> para ensayos de ARNi. Cebador inverso.
AMV-43	CCCCTCTAGAATGCCAGTTATCAAC	Construcción del plásmido pL4440/ <i>txl</i> para ensayos de ARNi. Cebador directo.
AMV-44	ATTGCTCGAGTCAATGAGCTGCATC	Construcción del plásmido pL4440/ <i>txl</i> para ensayos de ARNi. Cebador inverso.
AMV-100	CTGATCTAGAATGTCAAAGCCTTTGTGCGACGG	Construcción del plásmido pL4440/ <i>glrx-10</i> para ensayos de ARNi. Cebador directo.
AMV-101	GCCGCTCGAGCTATAGAGCTCCGG	Construcción del plásmido pL4440/ <i>glrx-10</i> para ensayos de ARNi. Cebador inverso.
AMV-106	CTAGTCTAGAATGGGAGGAGTCAC	Construcción del plásmido pL4440/ <i>glrx-21</i> para ensayos de ARNi. Cebador directo.
AMV-107	GCCGCTCGAGTTATTCTTTTCGGCG	Construcción del plásmido pL4440/ <i>glrx-21</i> para ensayos de ARNi. Cebador inverso.
AMV-253	TAGCTCTAGAATGGGAGGATCTGCATC	Construcción del plásmido pL4440/ <i>glrx-22</i> para ensayos de ARNi. Cebador directo.
AMV-255	TAGCCTGACGTCAAATTTTCGATGC	Construcción del plásmido pL4440/ <i>glrx-22</i> para ensayos de ARNi. Cebador inverso.

CEBADORES PARA CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN DE GFP

AMV-87	ACCTCTGCAGATTTTCATAACAAAATACCT	Expresión transcripcional y traduccional del gen <i>dnj-27</i> . Cebador directo.
AMV-88	TTCTGGATCCGACAATTGCCCTCATTTTCT	Expresión transcripcional del gen <i>dnj-27</i> . Cebador inverso.
AMV-395	CATGGGTACCTGCTCATCAAGCTTCAACTG	Expresión traduccional del gen <i>dnj-27</i> . Cebador inverso.

CEBADORES PARA CONSTRUCCIONES DE SOBREPRESIÓN DE DNJ-27

AMV-87	ACCTCTGCAGATTTTCATAACAAAATACCT	Sobrexpresión de <i>dnj-27</i> bajo el control de su promotor endógeno y su propio 3'-UTR. Cebador directo.
AMV-334	CGTACGGAGGGGCAAATTGGCTGAAA	Sobrexpresión de <i>dnj-27</i> bajo el control de su promotor endógeno y su propio 3'-UTR. Cebador inverso.
UA-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTCCATGAGGGCAATTGTCCTATT	Sobrexpresión de <i>dnj-27</i> en el vector pDEST bajo el control del promotor del gen <i>myo-3</i> . Cebador directo.
UA-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCTTATAGCTCATCATGCTCATC	Sobrexpresión de <i>dnj-27</i> en el vector pDEST bajo el control del promotor del gen <i>myo-3</i> . Cebador inverso.

CEBADORES PARA REACCIONES DE RT-PCR

AMV-309	CATCAGCTGGCTCCTACGTGG	Reacciones de RT-PCR del gen <i>dnj-27</i> . Cebador directo para la primera ronda de amplificación.
AMV-310	CTGAGCTCTACTACGAGACG	Reacciones de RT-PCR del gen <i>dnj-27</i> . Cebador directo para la segunda ronda de amplificación.
AMV-311	CGGATAAGCTCTAACTTGAGC	Reacciones de RT-PCR del gen <i>dnj-27</i> . Cebador inverso.

II. Métodos

6.5 Crecimiento y mantenimiento de organismos

6.5.1 Bacterias

El medio utilizado de forma rutinaria para cultivar las distintas estirpes de *E. coli* durante nuestros ensayos fue el medio LB, mientras que el medio SOC se utilizó cuando se necesitó crecer grandes cantidades de bacteria. Según necesidad, al medio en cuestión se le añadió el antibiótico de selección requerido. Los antibióticos ampicilina y tetraciclina se utilizaron a una concentración final de 50 µg/ml y 15 µg/ml respectivamente. En medio líquido, las bacterias se crecieron a 37°C con agitación (120-200 rpm) y en medio sólido en estufa a la misma temperatura.

La conservación de estirpes bacterianas por largos períodos de tiempo se realizó en medio LB líquido con glicerol al 15% a -80°C.

6.5.2 *C. elegans*

6.5.2.1 Crecimiento de *C. elegans*

C. elegans se mantiene generalmente en el laboratorio a 16°C ó 20°C en placas de NGM sembradas previamente con un césped bacteriano de *E. coli* OP50 (Brenner, 1974). Para transferir los nematodos de una placa de Petri a otra se utilizó una pica hecha con hilo de platino. La frecuencia de transferencia de los nematodos a nuevas placas depende del genotipo de los mismos, de la temperatura de crecimiento y del experimento. En general, los stocks se mantuvieron a 16°C por un período de hasta 3 meses, y los experimentos se realizaron a 20°C, aunque otras temperaturas fueron también usadas en función de las condiciones de experimentación.

6.5.2.2 Conservación de estirpes

La conservación de estirpes de *C. elegans* durante largos períodos de tiempo se llevó a cabo a -80°C. De esta forma, *C. elegans* puede ser guardado durante años a -80°C o indefinidamente en nitrógeno líquido, siendo los animales en el estadio larvario L1-L2 los que mejor resisten el proceso de congelado.

Para optimizar al máximo el rendimiento de la congelación, se partió, en cada caso, de tres placas NGM (Ø 6 cm) saturadas de animales sin comida. Se procuró un número elevado de animales en estadio larvario L1-L2 resistentes al proceso de congelación. Los

nematodos fueron recogidos de las placas usando para ello tampón S al que se le añadió, posteriormente, un volumen igual de glicerol al 30%. Finalmente, se transfirieron los animales a distintos criotubos en donde fueron congelados gradualmente a -80°C , utilizando para ello un bloque de poliestireno expandido perforado. Al día siguiente, tras descongelar un vial para comprobar la eficiencia del proceso de congelación, los tubos fueron colocados en las respectivas cajas de stocks, donde se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

Para la utilización de estirpes congeladas, la descongelación se hizo a temperatura ambiente. El contenido del criotubo se vertió entonces sobre una placa NGM sembrada con bacteria OP50.

6.5.2.3 Limpieza, preparación de embriones y sincronización

Una de las ventajas de trabajar con *C. elegans* es que puede ser tratado con una solución llamada de “bleaching”, que contiene hipoclorito e hidróxido de sodio, con la que se puede eliminar cualquier tipo de contaminación y degradar a todos los nematodos de cualquier estadio larvario, pero a la que son resistentes los embriones, que serán los únicos que sobreviven gracias a la protección de la cubierta del huevo. Así, cuando se necesite descontaminar una placa que se encuentre contaminada con bacterias, hongos o levaduras, bastará con transferir a una gota de unos 15 μl de solución de *bleaching* depositada en una esquina, fuera del césped de una placa, alrededor de 10 hermafroditas adultas grávidas. A este proceso sólo sobrevivirán los embriones que portaban las hermafroditas, ahora descontaminados.

Este mismo proceso también permite la sincronización de animales en el mismo estadio. Con este fin, placas saturadas con hermafroditas grávidas y huevos fueron recogidas con tampón M9 en tubos de polipropileno de 15 mL. Tras centrifugar a 1200 rpm durante 2 minutos, el sobrenadante fue eliminado por aspiración y se realizó un nuevo lavado con 14 mL de tampón M9. Posteriormente, se añadió 3 mL de solución de *bleaching* al pellet y la mezcla se incubó alrededor de 5 minutos con agitación vigorosa, para aislar los huevos resistentes al tratamiento. Para evitar la degradación de los embriones, se vigiló constantemente a la lupa. Cuando la mayoría de los animales adultos aparecieron degradados, se realizaron al menos tres lavados con tampón M9 centrifugando a 2000 rpm durante 2 minutos, para eliminar los restos de hipoclorito e hidróxido de sodio. En este momento, tendremos lista una preparación de embriones, que podrá ser utilizada para sincronizar a los nematodos siguiendo el procedimiento que se indica en el párrafo siguiente, o para otros propósitos.

Capítulo VI

Cuando se pretendió sincronizar los animales, se resuspendió el pellet en 3 mL de M9 y se incubó durante toda la noche a 20°C en un rotor. Las larvas L1 que salen de los huevos al eclosionar, no podrán progresar al siguiente estadio de desarrollo al encontrarse en ausencia de alimento. Tras centrifugar a 1200 rpm durante 2 minutos, se transfieren estas larvas L1 a placas NGM sembradas con bacteria OP50, que a partir de ahora seguirán su proceso normal de desarrollo de manera sincronizada. También es posible realizar una sincronización a menor escala colocando, como se comentó anteriormente, varias hermafroditas grávidas en una gota de solución de *bleaching* dispuesta en el filo de una placa.

Un método alternativo para la sincronización de animales consiste en dejar a varios adultos poner huevos en una placa NGM sembrada con OP50 durante dos o tres horas. Después se retiran los adultos de la placa y se deja incubando los huevos a la temperatura deseada.

6.6 Extracción de ADN genómico de *C. elegans* y genotipado por PCR

El protocolo seguido para la extracción de ADN genómico consiste en la colocación de uno o varios nematodos en un vial de PCR, al que se añadió previamente 1 µl de tampón de lisis y 1% de proteinasa K (20 mg/mL) por cada individuo. A continuación se congelaron las muestras a -80°C durante al menos una hora, ya que esto favorece la rotura de los animales, tras lo cual se sometieron a una incubación de 65°C durante una hora, dando como resultado la lisis de los gusanos y la salida del ADN genómico, gracias a la acción de la proteinasa. Finalmente, la proteinasa K fue inactivada mediante un proceso de incubación a 95°C durante quince minutos.

Para el genotipado de animales y la detección de mutantes, este ADN genómico fue usado como molde para la amplificación por PCR de las regiones de interés con cebadores diseñados específicamente para la distinción entre alelos mutantes y silvestre, ya que los diferentes alelos darán lugar a fragmentos de ADN de distinto tamaño.

6.7 Extracción de ARN total de *C. elegans* y RT-PCR (*reverse transcriptase PCR*)

Las reacciones de RT-PCR se usan para retro-transcribir una cadena de ARN, dando así lugar a su ADN complementario (ADNc), seguida de una amplificación del ADN resultante mediante PCR.

Para purificar ARN total de *C. elegans*, se realizó una preparación de embriones, como se describe en la sección 6.5.2.3, partiendo de varias placas con gran número de hermafroditas grávidas. Tras ello, la extracción de ARN de los embriones se efectuó utilizando el kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) disponible comercialmente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el ARN aislado fue tratado con Amplification Grade DNase I (Sigma) para eliminar posibles trazas de ADN genómico de la muestra.

El segundo paso del proceso, convertir el ARN en ADNc, se llevó a cabo partiendo de 1 µg del ARN total purificado y usando el kit iScript™ cDNA Synthesis (Biorad), mediante el cual se puede transformar todo el ARN en ADN, utilizando cebadores inespecíficos. Tras completarse la reacción de retro-transcripción, el ADNc generado se usó como molde para su amplificación mediante PCR con cebadores específicos.

La amplificación del ADNc completo del gen *dnj-27*, para su posterior clonación en el vector de expresión pDEST del sistema de clonación Gateway (Invitrogen), se realizó utilizando los cebadores específicos UA-F y UA-R, que incluyen las secuencias de recombinación necesarias para utilizar esta tecnología. Sin embargo, cuando la finalidad fue conocer si el ARNm del gen en cuestión era transcrito, la amplificación del ADNc se realizó mediante PCR anidada. Este tipo de PCR tiene mayor sensibilidad en la detección de fragmentos, ya que se hacen dos rondas de PCR, la segunda utilizando cebadores cuyas secuencias complementarias se encuentran dentro de la secuencia amplificada por los cebadores de la primera ronda. Así, para amplificar el ADNc del gen *dnj-27* de la estirpe silvestre y del alelo mutante *dnj-27 (ok2302)* se recurrió a la pareja de cebadores AMV-309 y AMV-311 para la primera ronda y la pareja AMV-310 y AMV-311 para la segunda.

6.8 Cruces genéticos de estirpes de *C. elegans*

Aunque las hermafroditas de *C. elegans* generalmente se reproducen por autofertilización, también pueden aparearse con machos, produciéndose así fertilización cruzada. Esta propiedad se utiliza en el laboratorio para transferir material genético de una estirpe a otra y producir progenie con genotipos específicos.

De forma general, se utilizaron dos placas NGM sembradas con OP50 por cada cruce, para aumentar la posibilidad de obtener progenie proveniente del cruce. En cada placa se colocaron hermafroditas L4, que aún no son fértiles y por tanto todavía no han sufrido ningún proceso de autofertilización, acompañadas de machos en una proporción aproximada de 2:5, para favorecer así los encuentros entre machos y hermafroditas y, de

Capítulo VI

esta forma, las fertilizaciones cruzadas. Alrededor de tres días después, debería haber progenie suficiente para seleccionar individuos provenientes del cruce de la F1. Una forma sencilla de comprobar si los cruces han funcionado, consiste en examinar el número de machos en la generación F1, donde la proporción de hermafroditas y machos deberá ser aproximadamente de 1:1. El seguimiento de las mutaciones o del material genético que se desea transferir se hizo por PCR, utilizando marcadores fluorescentes (GFP, mCherry, etc.) o fenotipos visibles. En la Figura 6.1 se muestra un ejemplo de la estrategia de cruce a seguir para la obtención de progenie con un fenotipo determinado.

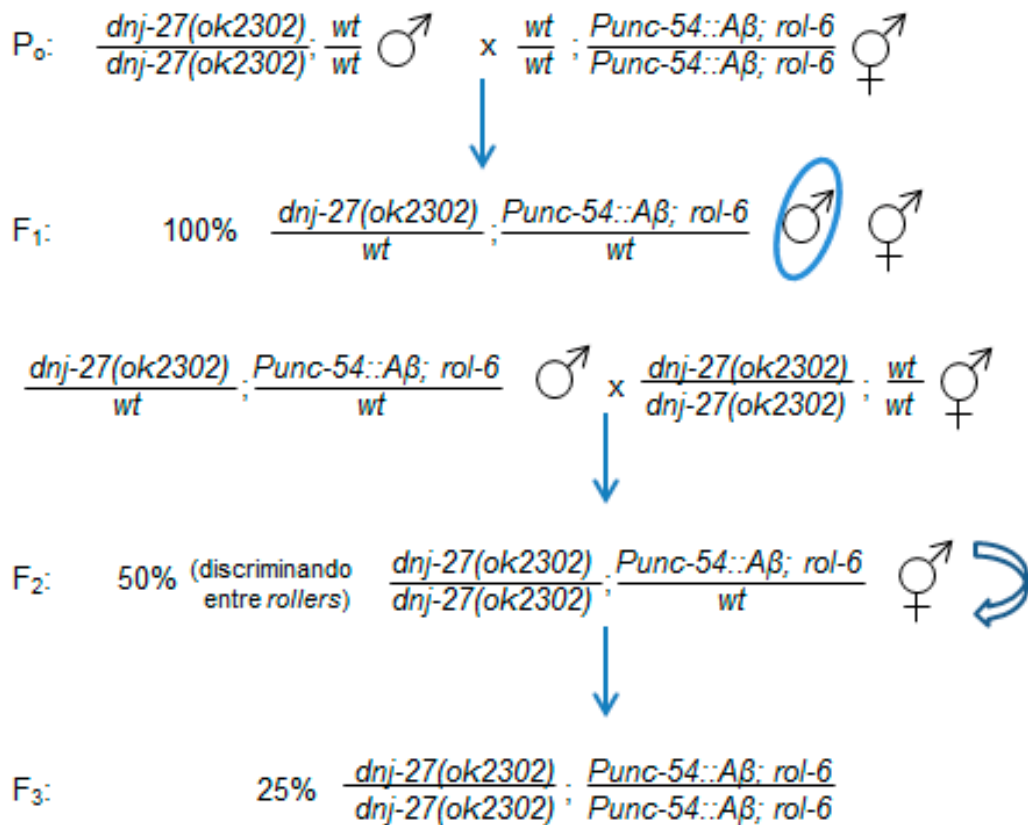


Figura 6.1. Estrategia de cruce a seguir para la obtención de la estirpe VZ80 *dnj-27 (ok2302); Punc-54::Aβ; rol-6 (su1006)*. Se cruzaron machos *dnj-27 (ok2302)* con hermafroditas *Punc-54::Aβ; rol-6 (su1006)*. Los machos provenientes del cruce habrán de ser, necesariamente, heterocigotos para ambos genes. Para aumentar la frecuencia de homocigotos para la mutación *dnj-27 (ok2302)*, estos machos se volvieron a cruzar con hermafroditas *dnj-27 (ok2302)* homocigotas. El seguimiento del gen *Punc-54::Aβ; rol-6 (su1006)* se realizó por el fenotipo *roller*, y así, se tomaron nematodos hermafroditas *roller* de la F₂ (que habrán de ser *Punc-54::Aβ; rol-6* heterocigotos) para la identificación, por PCR, de los animales homocigotos para la mutación *dnj-27 (ok2302)*. Finalmente, estos animales se retrocruzaron y se separaron varios *roller* de la F₃. Los individuos con el genotipo deseado serán aquellos cuya descendencia sea 100% *roller*.

6.8.1 Retrocruzamiento

Las estirpes de *C. elegans* obtenidas de los repositorios internacionales, han de ser necesariamente cruzadas varias veces con nematodos silvestres para eliminar posibles mutaciones en otros genes, que podrían haberse originado durante el proceso de

mutagénesis indiscriminada usada para generar mutantes en este organismo (Ahringer & ed., 2006). Si no fuera así, estas mutaciones no deseadas podrían interferir con el fenotipo de nuestro mutante.

En este estudio, todas las estirpes mutantes fueron retrocruzadas seis veces con la estirpe silvestre Bristol N2.

6.9 Construcción de plásmidos y transgénesis

6.9.1 Clonación

Por medio de procesos de clonación, los fragmentos de ADN en cuestión fueron insertados en diferentes vectores para su expresión en *C. elegans* o en bacteria. De manera general, el fragmento de ADN de interés fue amplificado mediante PCR usando cebadores que permitieron la introducción de sitios de restricción específicos en los extremos de dicho fragmento. La enzima polimerasa High Fidelity Enzyme (Fermentas) de alta fidelidad, que es capaz de corregir errores en la adición de nucleótidos, se empleó para la amplificación del ADN, que fue posteriormente clonado en el vector pGEM-T easy vector (Promega) incubando con la ligasa T4 (Fermentas) durante toda la noche a 4°C. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes *E. coli* DH5 α según el siguiente protocolo: 50 μ l de bacteria y 5 μ l de la mezcla de ligación se incubaron durante 20 minutos en hielo. Tras ello, se dio un choque térmico de 42°C durante 1 minuto para permitir la entrada del plásmido en la célula. Se incubó durante dos minutos en hielo y se crecieron las bacterias durante 1 hora a 37°C en LB para permitir su crecimiento antes de exponerlas al antibiótico (ampicilina en el caso del vector pGEM-T). Por último, se sembraron las bacterias en placas de LB-agar con ampicilina y se creció a 37°C durante toda la noche. A estas mismas placas se les añadió además IPTG 0.5 mM y X-Gal 80 μ g/ml. El sitio de clonación del vector pGEM-T se encuentra dispuesto dentro de la región codificante del gen *lacZ*, que codifica la enzima β -galactosidasa. La adición de IPTG permite la inducción de la β -galactosidasa que será entonces capaz de metabolizar el X-Gal, dando como resultado un producto de color azul. De esta forma, la inactivación por inserción del gen *lacZ*, permite la identificación directa por color de plásmidos con inserto. Se descartaron pues las colonias de bacterias de color azul y, de las restantes, se identificaron los clones positivos por PCR y posterior secuenciación, utilizando los cebadores T7 y SP6 cuyos promotores se encuentran flanqueando el sitio de clonación del vector pGEM-T.

Los clones positivos se crecieron toda la noche a 37°C con agitación en 5 ml de medio LB con ampicilina, y se realizó la purificación del plásmido con el kit de minipreps

Capítulo VI

NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido y el vector de destino fueron cortados con la enzima de restricción apropiada, de acuerdo con las condiciones del fabricante, y posteriormente ligados con la ligasa T4. El fragmento de ADN y el vector se mezclaron en una proporción 3:1 y se incubó durante toda la noche a 16°C. El resultado de la ligación fue nuevamente transformado en *E. coli* DH5 α , purificado y secuenciado en Secugen S.L.

Todos los plásmidos generados durante este estudio con el fin de producir estirpes transgénicas (ver sección 6.3) fueron construidos usando los siguientes vectores de clonación: los plásmidos pVZ34, pVZ325 y pVZ476 se generaron a partir del vector de clonación pPD95.77; el plásmido pVZ378 fue construido usando una versión modificada del vector pPD95.85 que contiene un péptido señal de entrada en el retículo y una secuencia KDEL de retención en el mismo (Labrousse, Zappaterra, Rube, & van der Bliet, 1999); para la construcción de los plásmidos pVZ320 y pVZ451 se usaron dos vectores pDEST del sistema de clonación Gateway (Invitrogen), modificados con los promotores de los genes *unc-54* y *myo-3* respectivamente; el plásmido pVZ448 se generó sustituyendo el promotor *Pges-1* por el *Punc-54* en el plásmido *Pges-1::mCherry::TRAM-1* construido previamente (Tian *et al.*, 2010); pVZ326 se construyó usando el vector de clonación pCJ102 (Winkelbauer *et al.*, 2005); y los plásmidos pVZ350 y pVZ350 fueron derivados de otros plásmidos descritos anteriormente (Miedel *et al.*, 2012), sustituyendo el promotor del gen *nhx-2* por el del gen *myo-3*.

6.9.2 Transgénesis

Para generar las distintas estirpes transgénicas, estos plásmidos fueron inyectados, junto con los correspondientes marcadores, a las concentraciones que se indican en la tabla 6.1.

En la zona distal de la gónada del adulto, los núcleos de la línea germinal están rodeados por un citoplasma común, formando un sincitio. Es precisamente en este citoplasma donde debe efectuarse la microinyección del ADN. El ADN microinyectado podrá ser entonces asimilado por los núcleos del sincitio que, al migrar hacia la parte proximal de la gónada, serán envueltos por una membrana dando lugar a ovocitos maduros preparados para su fecundación. Este método permite la formación de arrays de ADN extracromosómico, que contienen cientos de copias de los plásmidos co-inyectados, y que pueden ser transmitidos a parte de la progenie. La mezcla de inyección contiene, normalmente, un marcador seleccionable que facilita la identificación de los

transformantes (ver sección 6.3) (Evans & ed., 2006).

Los animales se inmovilizaron colocándolos sobre una capa de agarosa al 2% dispuesta en una laminilla cubre objetos, a la que previamente se le añadió una gota de aceite Halocarbon 700 (Sigma) para evitar la deshidratación de los animales. La localización exacta de la zona distal de la gónada se realizó utilizando un microscopio invertido Nikon con sistema de contraste de fase, mientras que para la microinyección se empleó un microinyector FemtoJet (eppendorf). En algunos casos, los plásmidos se linealizaron antes de ser inyectados, ya que se ha publicado que este método aumenta la eficiencia del proceso (Etchberger & Hobert, 2008).

Tabla 6.1. Condiciones de transgénesis. Se muestran el plásmido y el marcador inyectados para la obtención de los distintos transgénicos, junto con las concentraciones utilizadas en cada caso.

Estirpe	Plásmido inyectado /concentración	Marcador /concentración
VZ188 VZ189 VZ190	pVZ34 (<i>Pdnj-27::GFP::unc-54 3'-UTR</i>) 50 ng/μl	-
VZ184	pVZ378 (<i>Pdnj-27::dnj-27::YFP::KDEL::unc-54 3'-UTR</i>) 10 ng/μl	-
VZ148 VZ149 VZ152	pVZ325 (<i>Pdnj-27::dnj-27::dnj-27 3'-UTR</i>) 10 ng/μl	<i>Punc-122::GFP</i> 50 ng/μl
VZ293 VZ294 VZ295	pVZ451 (<i>Pmyo-3::dnj-27 ADNc::unc-54 3'-UTR</i>) 10 ng/μl (lineal)	<i>Ptrx-3::mCherry</i> 10 ng/μl
VZ254 VZ255 VZ256	pVZ448 (<i>Pmyo-3::mCherry::TRAM-1</i>) 20 ng/μl	-
VZ136 VZ147	pVZ320 (<i>Punc-54::α-syn</i>) 50 ng/μl y 10 ng/μl	pRF4/ <i>rol-6</i> (<i>su1006</i>) 50 ng/μl
VZ146	pVZ326 (<i>Phsp-4::DsRed</i>) 50 ng/μl	pRF4/ <i>rol-6</i> (<i>su1006</i>) 50 ng/μl
VZ160 VZ161 VZ162	pVZ350 (<i>Pmyo-3::cpl-1::YFP</i>) 10 ng/μl	<i>Punc-122::GFP</i> 50 ng/μl
VZ169 VZ170 VZ171	pVZ352 (<i>Pmyo-3::cpl-1^{W32A;Y35A}::YFP</i>) 10 ng/μl	<i>Punc-122::GFP</i> 50 ng/μl
VZ314 VZ315	pVZ476 (<i>Pmyo-3::hERdj5 ADNc::unc-54 3'-UTR</i>) 10 ng/μl	<i>Punc-122::GFP</i> 50 ng/μl
VZ336 VZ337 VZ338	pVZ476 (<i>Pmyo-3::hERdj5 ADNc::unc-54 3'-UTR</i>) 5 ng/μl (lineal)	<i>Pmyo-2::mCherry</i> 1.2 ng/μl

Capítulo VI

6.10 Ensayos de ARN de interferencia (ARNi)

Algunas de las bacterias portadoras de los clones de ARNi utilizadas para estos ensayos fueron adquiridas de la librería de ARNi desarrollada en el laboratorio de la Dra. Ahringer (Kamath & Ahringer, 2003) o construidas anteriormente por otros grupos (Fire *et al.*, 1998; Isermann *et al.*, 2004). Otras fueron generadas en nuestro laboratorio clonando el gen de interés en el vector de expresión pL4440 y transformando posteriormente estas construcciones en la cepa HT115 de *E.coli*. El plásmido pL4440 contiene dos promotores T7 para la ARN polimerasa que flanquean el sitio de clonación, y por su lado, la bacteria HT115 posee una ARN polimerasa inducible por IPTG. Esta estirpe de *E. coli* es además mutante para la ARNasa III, lo cual aumenta la estabilidad de cualquier ARN. Por lo tanto, cuando estas bacterias se exponen a IPTG se induce la expresión de la ARN polimerasa T7, y dado que el ADN insertado será transcrito en ambos sentidos, esto da como resultado la producción del ARN de doble cadena necesario para la interferencia. En un proceso que aún no se conoce con exactitud, cuando los nematodos se alimentan con bacterias que expresan este ARN de doble cadena, se silencia la expresión del gen en cuestión (Timmons *et al.*, 2001).

Los clones de bacterias se crecieron durante toda la noche a 37°C con agitación en medio LB con 50 µg/ml ampicilina. Entonces, placas de ARNi, que contienen IPTG, se sembraron con los cultivos de bacterias y se incubaron a 37°C durante toda la noche para permitir la inducción del ARN de doble cadena. Como control negativo se utilizaron placas con bacterias que contienen el vector pL4440 vacío y como control positivo bacterias que contienen el plásmido pL4440/*unc-22*, que produce un fenotipo de movimiento descoordinado. Los nematodos de la primera generación fueron sincronizados colocando hermafroditas grávidas en una gota de solución de *bleaching* depositada en el filo de la placa de ARNi. Las siguientes generaciones se sincronizaron permitiendo a hermafroditas interferidas de la generación previa poner huevos durante dos o tres horas en placas de ARNi frescas. Los animales fueron analizados sólo cuando al menos dos generaciones habían sido interferidas previamente.

En algunos casos, como por ejemplo durante la evaluación inicial de los fenotipos obtenidos al someter a la estirpe modelo de Alzheimer CL647 a ARNi de los genes de las familias de las tiorredoxinas, las glutarredoxinas y las peroxirredoxinas, la mutación *rrf-3 (pk1426)*, que confiere hipersensibilidad al silenciamiento por ARNi (Simmer *et al.*, 2002), fue utilizada.

6.11 Microscopía

Los animales se depositaron en una gota de levamisol 10 mM sobre una fina lámina de agarosa al 3% en agua dispuesta sobre un porta objetos y se cubrieron con un cubre objetos. El levamisol es un agonista de la acetilcolina que se utiliza como anestesia para inmovilizar a los gusanos. Para los estudios de expresión, así como para los ensayos de agregación, las imágenes de DIC y de fluorescencia fueron adquiridas en un microscopio de fluorescencia Zeiss AxioImager M2 ApoTome equipado con una cámara AxioCam MRn. Las capturas de las imágenes se realizaron con el programa AxioVision 4.8 (Zeiss). Los ensayos de colocalización subcelular se llevaron a cabo mediante microscopía confocal, utilizando un microscopio Leica AOBS SP2. Ajustes idénticos en el brillo y en el contraste de los controles y de las correspondientes imágenes experimentales se hicieron con el programa Adobe Photoshop 10 (Adobe Systems) e ImageJ (NIH).

6.12 Ensayos fenotípicos

6.12.1 Ensayos de estrés del retículo endoplasmático

Con el fin de inducir estrés en el retículo endoplasmático, animales en el estadio larvario L4 fueron colocados en placas NGM con 10, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina (Sigma), un inhibidor de la glicosilación de proteínas y, por tanto, inductor de estrés en el retículo. Los animales fueron analizados en fase adulto joven tras 16-24 horas de tratamiento.

6.12.2 Ensayos de parálisis y cuantificación de depósitos β -amiloides

Se sincronizaron los animales modelo de la enfermedad de Alzheimer mediante puesta de huevos de hermafroditas adultas durante 2-3 horas a 16°C. Tras retirar a las hermafroditas de las placas, la evaluación de la parálisis de la estirpe CL647 tras el tratamiento con los diferentes ARNi, se llevó a cabo creciendo la progenie durante 48 horas a 16°C hasta el estadio larvario L3, momento en el cual se dio un choque térmico a 23 o 25°C para permitir la inducción del péptido A β . La parálisis de los nematodos comienza a producirse a aproximadamente las 48 después del choque térmico (para el caso de 23°C) o a las 24 horas (choque térmico a 25°C), produciéndose la parálisis de todos los individuos después de las 12 horas del inicio de la misma. Para determinar la parálisis de la estirpe CL2006, los individuos sincronizados fueron crecidos de manera continua a 20°C. Para este último caso, el seguimiento de la parálisis se realizó diariamente desde el primer día de adulto, retirándose de la placa los animales paralizados. Un animal se considera paralizado cuando, en respuesta a un estímulo mecánico con una pica de platino, es incapaz de ejecutar su movimiento normal, aunque sea capaz de mover la cabeza. Un halo sin bacteria alrededor de la cabeza del animal es indicativo de parálisis, ya que al tener impedida la

Capítulo VI

movilidad el nematodo comerá únicamente la bacteria a su alcance. Cuando se quiso determinar la parálisis de estirpes transgénicas, los animales transgénicos se identificaron por medio del marcador fluorescente incluido en el array extracromosómico.

Para la detección de los depósitos de amiloide, los gusanos fueron teñidos con el colorante fluorescente específico para amiloides X-34 (regalo del Prof. William Klunk). Para ello, los animales fueron crecidos a 20°C hasta el primer día de adulto, momento en el cual fueron incubados durante 2 horas a temperatura ambiente en gotas de 20 µl de X-34 1 mM disuelto en tampón Tris pH 7.5 10 mM. Posteriormente, se lavó a los nematodos una vez en una gota de PBS y se dispusieron en placas NGM sembradas con OP50, para permitir que se destiñeran durante toda la noche a 20°C por medio de su metabolismo normal. Los animales fueron inmovilizados con azida de sodio para su visualización en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiophot y las imágenes fueron adquiridas de forma similar a como se ha descrito anteriormente en la sección 6.11.

6.12.3 Ensayos de movilidad

Se sincronizaron animales que expresan α -syn o poliQ mediante puesta de huevos de hermafroditas adultas durante 2-3 horas a 20°C. Tras retirar a las hermafroditas de las placas, los individuos sincronizados fueron crecidos de manera continua a 20°C, realizándose el seguimiento de la movilidad diariamente desde el primer día de adulto. Se consideró que un animal presentaba defectos de movilidad cuando no era capaz de desplazarse más de unos pocos milímetros en respuesta a un estímulo mecánico con la pica de platino. Cuando se quiso determinar la movilidad de estirpes transgénicas, los animales transgénicos se identificaron por medio del marcador fluorescente incluido en el array extracromosómico.

6.12.4 Cuantificación de agregados

El número de agregados de α -syn se determinó contando agregados fluorescentes a una magnificación de 40x, desde la punta de la nariz del nematodo hasta el final del segundo bulbo de la faringe. Para cada ensayo y cada condición se analizaron diez animales en el primer día de adulto, sincronizados previamente por puesta de huevos y crecidos de manera continua a 20°C.

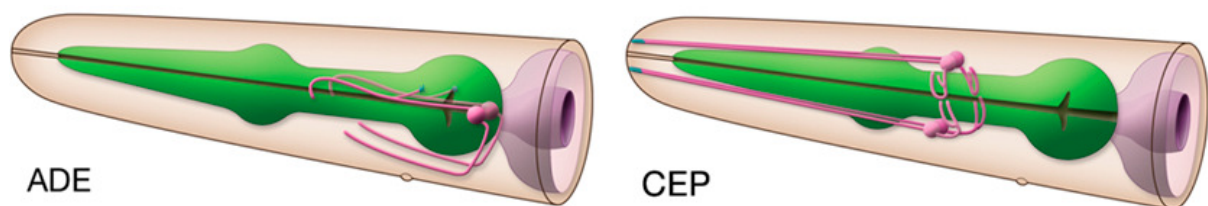
De igual manera, para la cuantificación de los agregados de poliQ, se emplearon veinte animales en el primer día de adulto, sincronizados previamente por puesta de huevos y crecidos de manera continua a 20°C, para cada experimento y condición. En este caso, se

determinó el número total de agregados presentes en el animal completo utilizando una magnificación de 40x.

6.12.5 Neurodegeneración dopaminérgica inducida por α -sinucleína

En los nematodos utilizados para el análisis de la neurodegeneración dopaminérgica, el promotor del gen *dat-1* dirige la expresión de α -syn humana y de GFP específicamente a neuronas dopaminérgicas. De esta forma, estas neuronas quedan marcadas con el GFP, lo que permite seguir fácilmente su degeneración inducida por la co-expresión de α -syn.

Se obtuvieron poblaciones sincronizadas mediante la puesta de huevos de hermafroditas grávidas durante 3 horas en placas NGM sembradas con *E. coli* OP50 y, a continuación, se creció la progenie a 20°C hasta el estadio larvario L4. Los animales fueron entonces transferidos a nuevas placas con 0.4 mg/ml de 5-Fluoro-2'-deoxiuridina (FUDR), compuesto que previene la eclosión de los futuros huevos, con lo que se evita la confusión entre los individuos a estudiar y su futura descendencia. Para cada experimento independiente, treinta animales con 7 días de edad por cada estirpe fueron analizados usando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E800 equipado con un juego de filtros Endow GFP HYQ (Chroma). Se determinó la degeneración de las seis neuronas dopaminérgicas anteriores (las cuatro neuronas CEP y las dos ADE. Ver Figura 6.2) según los criterios establecidos anteriormente (Cao, Gelwix, Caldwell, & Caldwell, 2005). De manera general, una neurona se computó como degenerada cuando el cuerpo celular había desaparecido, cuando mostraba una forma circular con pérdida de las prolongaciones neuronales o cuando la neurona presentaba formas irregulares o anómalas.



Modificado de *WormAtlas*

Figura 6.2. Neuronas dopaminérgicas anteriores. En la parte izquierda de la figura se muestra una representación esquemática de las dos neuronas ADE, izquierda y derecha, situadas al final del segundo bulbo de la faringe. En la parte derecha se muestran las cuatro neuronas CEP, dorsal izquierda, dorsal derecha, lateral izquierda y lateral derecha, situadas entre los dos bulbos de la faringe.

Un animal con todas sus neuronas dopaminérgicas anteriores intactas se consideró

Capítulo VI

un animal silvestre. Por el contrario, una neurona que no ha sufrido ningún proceso de neurodegeneración, sea en un animal silvestre o en un animal con alguna neurona degenerada, se consideró, a nivel de análisis, una neurona silvestre.

6.13 Producción de anticuerpos y Western blots

Los péptidos sintéticos amida-CKHPDRNTDDPNAHD-Ac y amida-CNWKALSEDWEPYNR-Ac derivados de la secuencia de la proteína DNJ-27 de *C. elegans* se conjugaron con KLH y se emplearon para inmunizar distintos conejos (Biomedal, España). Tras cuatro inmunizaciones, se recolectó el suero de los conejos y se purificó el anticuerpo policlonal por cromatografía de afinidad, usando una mezcla de los dos péptidos.

La extracción de proteínas para la realización de western blots, se efectuó partiendo de 100 animales en el primer día de adulto por cada estirpe, sincronizados previamente y crecidos a 20°C. Se emplearon individuos con esta edad porque es en este momento cuando los animales que expresan A β empiezan a paralizarse, y cuando, tanto estos últimos como los nematodos que expresan α -syn y poliQ, muestran diferencias a nivel de la agregación de los correspondientes péptidos. Se crecieron los gusanos durante al menos dos generaciones en ARNi, o por una sola generación en OP50, y se recolectaron manualmente en 15 μ l de solución de lisis de proteínas, con la excepción del western blot para la detección de A β , donde los animales se recolectaron directamente en 15 μ l de tampón Laemmli. Después de congelar en nitrógeno líquido, se añadió tampón Laemmli 5x a la mezcla (excepto para el western blot de A β) y se calentó a 95°C durante 10 minutos. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) y transferidas posteriormente, en condiciones semi-secas, a una membrana Inmobilon-P PVDF (Millipore) durante 1 hora a 75 mA. A continuación, las membranas se bloquearon con una solución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS-Tween (0.05%) y se probaron con los distintos anticuerpos. El western blot para la detección de A β se realizó usando geles de gradiente de poliacrilamida 4-20% (BioRad), y el anti-A β monoclonal 6E10 (Convance) como anticuerpo primario a una dilución 1:1.000 y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (Sigma) a 1:10.000. Para la detección de DNJ-27, se empleó una dilución 1:500 del anticuerpo de conejo anti-DNJ-27 y una dilución 1:10.000 del anticuerpo de cabra conjugado a peroxidasa anti-IgG de conejo (Sigma) como anticuerpo secundario. La detección de α -syn::YFP y Q40::YFP, se realizó utilizando un anticuerpo de conejo anti-GFP (Santa Cruz) a una dilución 1:500 y, como anticuerpo secundario, una dilución 1:10.000 del anticuerpo anti-IgG de conejo. El kit ECL (GE Healthcare) se empleó para la detección de la señal siguiendo las instrucciones del fabricante. El anticuerpo

monoclonal de ratón anti- α -tubulina (Sigma) a una dilución 1:10.000 se utilizó como control de carga en todos los casos.

6.14 Análisis histológico para la evaluación de la degradación de proteínas en el citosol

Para la interferencia con los ARNi de los genes a estudiar, se sincronizaron los animales, mediante puesta de huevos de hermafroditas adultos, en placas de NGM para ARNi sembradas con bacteria que expresen el ARN de doble cadena de los genes correspondientes. Se analizó la progenie después de 72 horas y también las dos generaciones posteriores siguiendo el mismo protocolo.

La tinción para la evaluación de la actividad β -galactosidasa, que nos permitió determinar la degradación de proteínas en el citosol, se realizó siguiendo un protocolo descrito anteriormente (Zdinak *et al.*, 1997). Los animales se colocaron en gotas de 20 μ l de tampón M9 dispuestas sobre porta objetos y se secaron en una bomba desecadora durante 10-20 minutos. Se sumergieron entonces los porta objetos en acetona a -20°C durante 3.5 minutos y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se colocó a continuación 20 μ l de la solución de tinción (5 mM ferricianuro de potasio, 5 mM ferrocianuro de potasio, 1 mM MgCl_2 , 0.4 mg/ml X-gal en 0.2 M fosfato de sodio pH 7.5) sobre cada muestra y se incubaron los porta objetos a temperatura ambiente durante toda la noche en placas Petri selladas con papel húmedo en su interior. Al día siguiente se tomaron fotografías de las diferentes muestras.

6.15 Análisis estadísticos

Los diferentes análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa Microsoft Excel. Para calcular el valor p de los ensayos de neurodegeneración y de cuantificación de depósitos de $\text{A}\beta$ y de agregados, se realizó una prueba t de Student con una distribución de dos colas. El valor p en los ensayos de parálisis y movilidad se determinó usando un análisis ANOVA bidireccional. Se consideró significancia estadística cuando el valor p fue menor de 0.05. Las barras de error de las gráficas representan el error estándar de la media o SEM (del inglés, *Standard Error of the Mean*).

Bibliografía

- Ahringer, J., ed. Reverse genetics (April 6, 2006). *WormBook*, ed. *The C. elegans Research Community*, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.47.1.
- Akterin, S., Cowburn, R. F., Miranda-Vizuete, a, Jiménez, a, Bogdanovic, N., Winblad, B., & Cedazo-Minguez, a. (2006). Involvement of glutaredoxin-1 and thioredoxin-1 in beta-amyloid toxicity and Alzheimer's disease. *Cell death and differentiation*, 13(9), 1454–65. doi:10.1038/sj.cdd.4401818
- Anathy, V., Aesif, S. W., Guala, A. S., Havermans, M., Reynaert, N. L., Ho, Y.-S., Budd, R. C., et al. (2009). Redox amplification of apoptosis by caspase-dependent cleavage of glutaredoxin 1 and S-glutathionylation of Fas. *The Journal of cell biology*, 184(2), 241–52. doi:10.1083/jcb.200807019
- Apfeld, J., & Kenyon, C. (1999). Regulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 402(6763), 804–9. doi:10.1038/45544
- Arnér, E. S., & Holmgren, a. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267(20), 6102–9.
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R., & Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, 431(7010), 805–10. doi:10.1038/nature02998
- Association, A. (2012). 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's and Dementia*, 8(2), 131–168. doi:10.1016/j.jalz.2012.02.001
- Banoei, M. M., Houshmand, M., Panahi, M. S. S., Shariati, P., Rostami, M., Manshadi, M. D., & Majidzadeh, T. (2007). Huntington's disease and mitochondrial DNA deletions: event or regular mechanism for mutant huntingtin protein and CAG repeats expansion?! *Cellular and Molecular Neurobiology*, 27(7), 867–875.
- Bates, E. a, Victor, M., Jones, A. K., Shi, Y., & Hart, A. C. (2006). Differential contributions of *Caenorhabditis elegans* histone deacetylases to huntingtin polyglutamine toxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(10), 2830–8. doi:10.1523/JNEUROSCI.3344-05.2006
- Beer, S. M., Taylor, E. R., Brown, S. E., Dahm, C. C., Costa, N. J., Runswick, M. J., & Murphy, M. P. (2004). Glutaredoxin 2 catalyzes the reversible oxidation and glutathionylation of mitochondrial membrane thiol proteins: implications for mitochondrial redox regulation and antioxidant DEFENSE. *The Journal of biological chemistry*, 279(46), 47939–51. doi:10.1074/jbc.M408011200
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., & Rossignol, R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *Journal of cell science*, 120(Pt 5), 838–48. doi:10.1242/jcs.03381
- Berry, M. J., Banu, L., Chen, Y. Y., Mandel, S. J., Kieffer, J. D., Harney, J. W., & Larsen, P. R. (1991). Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature*, 353(6341), 273–276.
- Bertini, R., Howard, O. M. Z., Dong, H., Oppenheim, J. J., Bizzarri, C., Sergi, R., Caselli, G., et al. (1999). Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells. *The journal of experimental medicine*, 189(11), 1783–1789.

Bibliografía

- Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2008). Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(10), 768–78. doi:10.1038/nrn2494
- Betarbet, R., Sherer, T. B., Mackenzie, G., Garcia-osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson ' s disease. *Nature neuroscience*, 3(12), 1301–1306.
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., Dekker, M. C. J., et al. (2003). Mutations in the *DJ-1* gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5604), 256–9. doi:10.1126/science.1077209
- Boulin, T., Etchberger, J. F., & Hobert, O. (2006). Reporter gene fusions. (V. Ambros, Ed.) *WormBook the online review of C elegans biology*, 1–23.
- Boya, P., Cohen, I., Zamzami, N., Vieira, H. L. a, & Kroemer, G. (2002). Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization. *Cell death and differentiation*, 9(4), 465–7. doi:10.1038/sj/cdd/4401006
- Braakman, I., & Otsu, M. (2008). Cargo Load Reduction. *Science*, 321(5888), 499–500.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77, 71–94.
- Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., & Arrighi, H. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 3(3), 186–91.
- Buchberger, A., Bukau, B., & Sommer, T. (2010). Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. *Molecular cell*, 40(2), 238–52. doi:10.1016/j.molcel.2010.10.001
- The *C. Elegans* Sequencing Consortium. (1998). Genome sequence of the nematode *Caenorhabditis elegans*:: A platform for investigating biology. *Science*, 282(5396), 2012–2018.
- Cabin, D. E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N. B., Gottschalk, W., Mcilwain, K. L., Orrison, B., et al. (2002). Synaptic Vesicle Depletion Correlates with Attenuated Synaptic alpha-Synuclein, 22(20), 8797–8807.
- Cacho-Valadez, B., Muñoz-Lobato, F., Pedrajas, J. R., Cabello, J., Fierro-González, J. C., Navas, P., Swoboda, P., et al. (2012). The characterization of the *Caenorhabditis elegans* mitochondrial thioredoxin system uncovers an unexpected protective role of TRXR-2 in β -amyloid peptide toxicity. *Antioxidants & redox signaling*. doi:10.1089/ars.2011.4265
- Cai, X., Golde, T., & Younkin, S. (1993). Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science*, 259(5094), 457–8.
- Caldwell, G. A., Cao, S., Sexton, E. G., Gelwix, C. C., Bevel, J. P., & Caldwell, K. A. (2003). Suppression of polyglutamine-induced protein aggregation in *Caenorhabditis elegans* by torsin proteins. *Human Molecular Genetics*, 12(3), 307–319. doi:10.1093/hmg/ddg027
- Cao, S., Gelwix, C. C., Caldwell, K. a, & Caldwell, G. a. (2005). Torsin-mediated protection from cellular stress in the dopaminergic neurons of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(15), 3801–12. doi:10.1523/JNEUROSCI.5157-04.2005
- Carrell, R. W., & Lomas, D. a. (1997). Conformational disease. *Lancet*, 350(9071), 134–8. doi:10.1016/S0140-6736(97)02073-4

- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science*, *263*(5148), 802–805.
- Chan, D. C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*, *125*(7), 1241–52. doi:10.1016/j.cell.2006.06.010
- Chen, X., & Burgoyne, R. D. (2012). Identification of common genetic modifiers of neurodegenerative diseases from an integrative analysis of diverse genetic screens in model organisms. *BMC genomics*, *13*(1), 71. doi:10.1186/1471-2164-13-71
- Chrestensen, C. a, Starke, D. W., & Mieyal, J. J. (2000). Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (Glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-gluthionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, *275*(34), 26556–65. doi:10.1074/jbc.M004097200
- Citron, M, Diehl, T. S., Gordon, G., Biere, a L., Seubert, P., & Selkoe, D. J. (1996). Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(23), 13170–5.
- Citron, Martin. (2002). Alzheimer's disease: treatments in discovery and development. *Nature neuroscience*, *5 Suppl*, 1055–7. doi:10.1038/nn940
- Clague, M. J., & Urbé, S. (2010). Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell*, *143*(5), 682–5. doi:10.1016/j.cell.2010.11.012
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, *131*(6), 1047–58. doi:10.1016/j.cell.2007.11.028
- Cohen, E., Bieschke, J., Perciavalle, R. M., Kelly, J. W., & Dillin, A. (2006, September 15). Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science (New York, N.Y.)*. doi:10.1126/science.1124646
- Cohen, E., Du, D., Joyce, D., Kapernick, E. a, Volovik, Y., Kelly, J. W., & Dillin, A. (2010, April). Temporal requirements of insulin/IGF-1 signaling for proteotoxicity protection. *Aging cell*. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00541.x
- Cohen, E., Paulsson, J. F., Blinder, P., Burstyn-Cohen, T., Du, D., Estepa, G., Adame, A., et al. (2009). Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. *Cell*, *139*(6), 1157–69. doi:10.1016/j.cell.2009.11.014
- Conn, K. J., Gao, W., McKee, A., Lan, M. S., Ullman, M. D., Eisenhauer, P. B., Fine, R. E., et al. (2004). Identification of the protein disulfide isomerase family member PD1p in experimental Parkinson's disease and Lewy body pathology. *Brain research*, *1022*(1-2), 164–72. doi:10.1016/j.brainres.2004.07.026
- Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Kathryn, J., Bhullar, B., Liu, K., et al. (2006). Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science*, *313*(5785), 324–328.
- Coskun, P. E., Beal, M. F., & Wallace, D. C. (2004). Alzheimer ' s brains harbor somatic mtDNA control- region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(29), 10726–10731.
- Credle, J. J., Finer-Moore, J. S., Papa, F. R., Stroud, R. M., & Walter, P. (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(52), 18773–84. doi:10.1073/pnas.0509487102

Bibliografía

- Creighton, T. E., Hillson, D. a, & Freedman, R. B. (1980). Catalysis by protein-disulphide isomerase of the unfolding and refolding of proteins with disulphide bonds. *Journal of molecular biology*, 142(1), 43–62.
- Crews, L., & Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*, 19(R1), R12–20. doi:10.1093/hmg/ddq160
- Cunnea, P. M., Miranda-Vizueté, A., Bertoli, G., Simmen, T., Damdimopoulos, A. E., Hermann, S., Leinonen, S., et al. (2003). ERdj5, an endoplasmic reticulum (ER)-resident protein containing DnaJ and thioredoxin domains, is expressed in secretory cells or following ER stress. *The Journal of biological chemistry*, 278(2), 1059–66. doi:10.1074/jbc.M206995200
- Daily, D., Vlamis-Gardikas, a, Offen, D., Mittelman, L., Melamed, E., Holmgren, a, & Barzilai, a. (2001). Glutaredoxin protects cerebellar granule neurons from dopamine-induced apoptosis by activating NF-kappa B via Ref-1. *The Journal of biological chemistry*, 276(2), 1335–44. doi:10.1074/jbc.M008121200
- David, D. C., Ollikainen, N., Trinidad, J. C., Cary, M. P., Burlingame, A. L., & Kenyon, C. (2010). Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*. *PLoS biology*, 8(8), e1000450. doi:10.1371/journal.pbio.1000450
- Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. a, DiFiglia, M., Sharp, a H., Ross, C. a, Scherzinger, E., et al. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, 90(3), 537–48.
- Delivani, P., Adrain, C., Taylor, R. C., Duriez, P. J., & Martin, S. J. (2006). Role for CED-9 and Egl-1 as regulators of mitochondrial fission and fusion dynamics. *Molecular cell*, 21(6), 761–73. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.034
- Demontis, F., & Perrimon, N. (2010). FOXO/4E-BP signaling in *Drosophila* muscles regulates organism-wide proteostasis during aging. *Cell*, 143(5), 813–825. doi:10.1016/j.cell.2010.10.007.FOXO/4E-BP
- Devi, L., Prabhu, B. M., Galati, D. F., Avadhani, N. G., & Anandatheerthavarada, H. K. (2006). Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(35), 9057–68. doi:10.1523/JNEUROSCI.1469-06.2006
- Dickinson, D. A., & Forman, H. J. (2002). Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 973(CELL SIGNALING, TRANSCRIPTION, AND TRANSLATION AS THERAPEUTIC TARGETS), 488–504.
- Dosanjh, L. E., Brown, M. K., Rao, G., Link, C. D., & Luo, Y. (2010). Behavioral phenotyping of a transgenic *Caenorhabditis elegans* expressing neuronal amyloid-beta. *Journal of Alzheimers disease JAD*, 19(2), 681–690.
- Douglas, P. M., & Dillin, A. (2010). Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *The Journal of cell biology*, 190(5), 719–29. doi:10.1083/jcb.201005144
- Drake, J. (2003). Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid β -peptide (1–42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiology of Aging*, 24(3), 415–420. doi:10.1016/S0197-4580(02)00225-7
- Du, H., Guo, L., Fang, F., Chen, D., Sosunov, A. A., Mckhann, G. M., Yan, Y., et al. (2008). Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nature medicine*, 14(10), 1097–1105. doi:10.1038/nm.1868.Cyclophilin

- Duennwald, M. L., & Lindquist, S. (2008). Impaired ERAD and ER stress are early and specific events in polyglutamine toxicity. *Genes & Development*, 22(23), 3308–3319. doi:10.1101/gad.1673408.Lindquist
- Ellis, R. J. (2001). Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends in biochemical sciences*, 26(10), 597–604.
- Etchberger, J. F., & Hobert, O. (2008). Vector-free DNA constructs improve transgene expression in *C. elegans*. *Nature methods*, 5(1), 3. doi:10.1038/nmeth0108-3
- Etheridge, T., Oczypok, E. a, Lehmann, S., Fields, B. D., Shephard, F., Jacobson, L. a, & Szewczyk, N. J. (2012). Calpains mediate integrin attachment complex maintenance of adult muscle in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics*, 8(1), e1002471. doi:10.1371/journal.pgen.1002471
- Evans, T.C., ed. Transformation and microinjection (April 6, 2006). *WormBook*, ed. *The C. elegans Research Community*, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.108.1.
- Faber, P. W., Alter, J. R., MacDonald, M. E., & Hart, a C. (1999). Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(1), 179–84.
- Fagone, P., & Jackowski, S. (2009). Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *Journal of lipid research*, 50 Suppl, S311–6. doi:10.1194/jlr.R800049-JLR200
- Fay, D. S., Fluet, a, Johnson, C. J., & Link, C. D. (1998). In vivo aggregation of beta-amyloid peptide variants. *Journal of neurochemistry*, 71(4), 1616–25.
- Ferrari, D. M., & Söling, H.-D. (1999). The protein disulphide-isomerase family : unravelling a string of folds. *Biochem. J.*, 339(Pt 1), 1–10.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811.
- Florez-McClure, M., Hohsfield, L., Fonte, G., Bealor, M., & Link, C. D. (2007). Decreased Insulin-Receptor Signalling Promotes the Autophagic Degradation of b-Amyloid Peptide in *C. elegans*. *Autophagy*, 3(6), 569–580.
- Fonte, V., Kapulkin, V., Taft, A., Fluet, A., Friedman, D., & Link, C. D. (2002). Interaction of intracellular beta amyloid peptide with chaperone proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14), 9439–44. doi:10.1073/pnas.152313999
- Fonte, V., Kipp, D. R., Yerg, J., Merin, D., Forrestal, M., Wagner, E., Roberts, C. M., et al. (2008). Suppression of in vivo beta-amyloid peptide toxicity by overexpression of the HSP-16.2 small chaperone protein. *The Journal of biological chemistry*, 283(2), 784–91. doi:10.1074/jbc.M703339200
- Fornai, F., Schlüter, O. M., Lenzi, P., Gesi, M., Ruffoli, R., Ferrucci, M., Lazzeri, G., et al. (2005). Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), 3413–8. doi:10.1073/pnas.0409713102
- Fostel, J. L., Benner Coste, L., & Jacobson, L. A. (2003). Degradation of transgene-coded and endogenous proteins in the muscles of *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(1), 173–177.

Bibliografía

- Frand, a R., Cuozzo, J. W., & Kaiser, C. a. (2000). Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends in cell biology*, 10(5), 203–10.
- Frand, a R., & Kaiser, C. a. (1999). Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Molecular cell*, 4(4), 469–77.
- Frøkjær-jensen, C., Davis, M. W., Hopkins, C. E., Newman, B., Thummel, J. M., Olesen, S., Grunnet, M., et al. (2008). Single copy insertion of transgenes in *C. elegans*. *Nature genetics*, 40(11), 1375–1383. doi:10.1038/ng.248.Single
- Garsin, D. A., Villanueva, J. M., Begun, J., Kim, D. H., Sifri, C. D., Calderwood, S. B., Ruvkun, G., et al. (2003). Long-Lived *C. elegans daf-2* Mutants Are Resistant to Bacterial Pathogens. *Science*, 300(5627), 1921.
- Gasser, T. (2007). Update on the genetics of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 22 Suppl 1(May), S343–50. doi:10.1002/mds.21676
- Gatz, M., Reynolds, C. a, Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J. a, Berg, S., Fiske, A., et al. (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Archives of general psychiatry*, 63(2), 168–74. doi:10.1001/archpsyc.63.2.168
- Gibson, G E, Sheu, K. F., & Blass, J. P. (1998). Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 105(8-9), 855–70.
- Gibson, Gary E, & Huang, H.-M. (2005). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 26(5), 575–8. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.07.017
- Gidalevitz, T., Ben-Zvi, A., Ho, K. H., Brignull, H. R., & Morimoto, R. I. (2006). Progressive Disruption of Cellular Protein Folding in Models of Polyglutamine Diseases. *Science*, 311(5766), 1471–74. doi:10.1126/science.1124514
- Gromer, S., Johansson, L., Bauer, H., Arscott, L. D., Rauch, S., Ballou, D. P., Williams, C. H., et al. (2003). Active sites of thioredoxin reductases: why selenoproteins? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), 12618–23. doi:10.1073/pnas.2134510100
- Group, T. H. D. C. R. (1993). A Novel Gene Containing a Trinucleotide That Is Expanded and Unstable on Huntington ' s Disease Chromosomes. *Cell*, 72(6), 971–983.
- Gusella, J. F., & Macdonald, M. E. (1995). Huntington ' s disease : CAG genetics expands neurobiology. *Current Opinion in Neurobiology*, 5(5), 656–662.
- Götz, J., Streffer, J. R., David, D., Schild, a, Hoerndli, F., Pennanen, L., Kurosinski, P., et al. (2004). Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. *Molecular psychiatry*, 9(7), 664–83. doi:10.1038/sj.mp.4001508
- Hagiwara, M., Maegawa, K.-I., Suzuki, M., Ushioda, R., Araki, K., Matsumoto, Y., Hoseki, J., et al. (2011). Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5. *Molecular cell*, 41(4), 432–44. doi:10.1016/j.molcel.2011.01.021
- Hamamichi, S., Rivas, R. N., Knight, A. L., Cao, S., Caldwell, K. A., & Caldwell, G. A. (2008). Hypothesis-based RNAi screening identifies neuroprotective genes in a Parkinson ' s disease model. *PNAS*, 105(2), 728–733.
- Hampton, R. Y., Gardner, R. G., & Rine, J. (1996). Role of 26S proteasome and *HRD* genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Molecular biology of the cell*, 7(12), 2029–44.

- Han, X.-J., Tomizawa, K., Fujimura, A., Ohmori, I., Nishiki, T.-I., Matsushita, M., & Matsui, H. (2011). Regulation of mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Acta medica Okayama*, *65*(1), 1–10.
- Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an resident kinase letters to nature Protein translation and folding are coupled by an resident kinase. *Nature*, *397*(6716), 271–274.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5580), 353–6. doi:10.1126/science.1072994
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*, *11*(3), 298–300.
- Harman, D. (2001). Aging: overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *928*, 1–21.
- Hashmi, S., Britton, C., Liu, J., Guiliano, D. B., Oksov, Y., & Lustigman, S. (2002). Cathepsin L is essential for embryogenesis and development of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry*, *277*(5), 3477–86. doi:10.1074/jbc.M106117200
- Hawkins, H. C., & Freedman, R. B. (1991). The reactivities and ionization properties of the active-site dithiol groups of mammalian protein disulphide-isomerase. *Biochem. J.*, *275*(2), 335–339.
- Hayashi, T., & Su, T.-P. (2007). Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell*, *131*(3), 596–610. doi:10.1016/j.cell.2007.08.036
- He, B. (2006). Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell death and differentiation*, *13*(3), 393–403. doi:10.1038/sj.cdd.4401833
- Hebert, D. N., Foellmer, B., & Helenius, a. (1995). Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell*, *81*(3), 425–33.
- Helenius, A., & Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry*, *73*, 1019–49. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073752
- Henchcliffe, C., & Beal, M. F. (2008). Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nature clinical practice. Neurology*, *4*(11), 600–9. doi:10.1038/ncpneuro0924
- Hill, B. G., & Bhatnagar, A. (2007). Role of glutathiolation in preservation, restoration and regulation of protein function. *IUBMB life*, *59*(1), 21–6. doi:10.1080/15216540701196944
- Hiller, M. M., Finger, A., Schweiger, M., & Wolf, D. H. (1996). ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, *273*(5282), 1725–1728.
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R. L., Atwood, C. S., Johnson, A. B., et al. (2001). Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer ' s Disease. *The Journal of neuroscience*, *21*(9), 3017–3023.
- Hobert, O., & Loria, P. (2006). Uses of GFP in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Biochem. Anal.*, *47*, 203–26.
- Hoffstrom, B. G., Kaplan, A., Letso, R., Schmid, R., Turmel, G. J., Lo, D. C., & Stockwell, B. R. (2010). Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by

Bibliografía

- misfolded proteins. *Nature Chemical Biology*, 6(12), 900–906. doi:10.1038/nchembio.467. Inhibitors
- Hollien, J., & Weissman, J. S. (2006). Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5783), 104–7. doi:10.1126/science.1129631
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and Glutaredoxin Systems. *The Journal of biological chemistry*, 264(24), 13963–13966.
- Hosoda, A., Tokuda, M., Akai, R., Kohno, K., & Iwawaki, T. (2010). Positive contribution of ERdj5/JPD1 to endoplasmic reticulum protein quality control in the salivary gland. *The Biochemical journal*, 425(1), 117–25. doi:10.1042/BJ20091269
- Hsu, A.-L., Murphy, C. T., & Kenyon, C. (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5622), 1142–5. doi:10.1126/science.1083701
- Häcki, J., Egger, L., Monney, L., Conus, S., Rossé, T., Fellay, I., & Borner, C. (2000). Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene*, 19(19), 2286–95. doi:10.1038/sj.onc.1203592
- Isermann, K., Liebau, E., Roeder, T., & Bruchhaus, I. (2004). A peroxiredoxin specifically expressed in two types of pharyngeal neurons is required for normal growth and egg production in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*, 338(4), 745–755. doi:10.1016/j.jmb.2004.03.021
- Jahn, T. R., & Radford, S. E. (2005). The Yin and Yang of protein folding. *The FEBS journal*, 272(23), 5962–70. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.05021.x
- Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D. H., & Sommer, T. (2002). Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nature cell biology*, 4(2), 134–9. doi:10.1038/ncb746
- Jayanthi, L. D., Apparsundaram, S., Malone, M. D., Ward, E., Miller, D. M., Eppler, M., & Blakely, R. D. (1998). The *Caenorhabditis elegans* gene *T23G5.5* encodes an antidepressant- and cocaine-sensitive dopamine transporter. *Molecular pharmacology*, 54(4), 601–9.
- Jiang, Q., Lee, C. Y. D., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Zelcer, N., Mann, K., Lamb, B., et al. (2008). ApoE promotes the proteolytic degradation of Aβ. *Neuron*, 58(5), 681–693.
- Jiménez, A., Zu, W., Rawe, V. Y., Pelto-Huikko, M., Flickinger, C. J., Sutovsky, P., Gustafsson, J.-A., et al. (2004). Spermatocyte/spermatid-specific thioredoxin-3, a novel Golgi apparatus-associated thioredoxin, is a specific marker of aberrant spermatogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 279(33), 34971–82. doi:10.1074/jbc.M404192200
- Kamath, R., & Ahringer, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*, 30(4), 313–321. doi:10.1016/S1046-2023(03)00050-1
- Kaneko, M., Koike, H., Saito, R., Kitamura, Y., Okuma, Y., & Nomura, Y. (2010). Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid-beta generation. *The Journal of neuroscience*, 30(11), 3924–32. doi:10.1523/JNEUROSCI.2422-09.2010
- Kario, E., Amar, N., Elazar, Z., & Navon, A. (2011). A new autophagy-related checkpoint in the degradation of an ERAD-M target. *The Journal of biological chemistry*, 286(13), 11479–91. doi:10.1074/jbc.M110.177618
- Karpinar, D. P., Balija, M. B. G., Kügler, S., Opazo, F., Rezaei-Ghaleh, N., Wender, N., Kim, H.-Y., et al. (2009). Pre-fibrillar alpha-synuclein variants with impaired beta-structure

- increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *The EMBO journal*, 28(20), 3256–68. doi:10.1038/emboj.2009.257
- Kern, R., Malki, A., Holmgren, A., & Richarme, G. (2003). Chaperone properties of Escherichia coli thioredoxin and thioredoxin reductase. *The Biochemical journal*, 371(Pt 3), 965–72. doi:10.1042/BJ20030093
- Kim, I., Xu, W., & Reed, J. C. (2008). Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery*, 7(12), 1013–30. doi:10.1038/nrd2755
- Kirkitadze, M. D., Bitan, G., & Teplow, D. B. (2002). Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies. *Journal of neuroscience research*, 69(5), 567–77. doi:10.1002/jnr.10328
- Kirstein-Miles, J., & Morimoto, R. I. (2010). *Caenorhabditis elegans* as a model system to study intercompartmental proteostasis: Interrelation of mitochondrial function, longevity, and neurodegenerative diseases. *Developmental dynamics*, 239(5), 1529–38. doi:10.1002/dvdy.22292
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., et al. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605–608.
- Knittler, M. R., Dirks, S., & Haas, I. G. (1995). Molecular chaperones involved in protein degradation in the endoplasmic reticulum: quantitative interaction of the heat shock cognate protein BiP with partially folded immunoglobulin light chains that are degraded in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(5), 1764–8.
- Kong, L., Zhou, X., Li, F., Yodoi, J., McGinnis, J., & Cao, W. (2010). Neuroprotective Effect of Over Expression of Thioredoxin on Photoreceptor Degeneration in Tubby Mice. *Neurobiology of disease*, 38(3), 446–455. doi:10.1016/j.nbd.2010.03.005. Neuroprotective
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M. J., & Sambrook, J. (1988). The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*, 332(6163), 462–464.
- Kraemer, B. C., Zhang, B., Leverenz, J. B., Thomas, J. H., Trojanowski, J. Q., & Schellenberg, G. D. (2003). Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17), 9980–5. doi:10.1073/pnas.1533448100
- Kreusch, S., Fehn, M., Maubach, G., Nissler, K., Rommerskirch, W., Schilling, K., Weber, E., et al. (2000). An evolutionarily conserved tripartite tryptophan motif stabilizes the prodomains of cathepsin L-like cysteine proteases. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267(10), 2965–2972.
- Labrousse, a M., Zappaterra, M. D., Rube, D. a, & van der Bliet, a M. (1999). *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Molecular cell*, 4(5), 815–26.
- Laurent, T. C., Moore, E. C., & Reichard, P. (1964). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. IV. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THIOREDOXIN, THE HYDROGEN DONOR FROM ESCHERICHIA COLI B. *The international journal of biochemistry*, 239(10), 3436–3444.

Bibliografía

- Leber, B., Lin, J., & Andrews, D. W. (2007). Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis*, *12*(5), 897–911.
- Lewis, M. J., & Pelham, H. R. B. (1990). A human homologue of the HDEL receptor. *Nature*, *348*(6297), 162–3.
- Lilley, B. N., & Ploegh, H. L. (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature*, *429*(6994), 834–40. doi:10.1038/nature02592
- Lillig, C. H., Berndt, C., & Holmgren, A. (2008). Glutaredoxin systems. *Biochimica et biophysica acta*, *1780*(11), 1304–17. doi:10.1016/j.bbagen.2008.06.003
- Lillig, C. H., Berndt, C., Vergnolle, O., Lönn, M. E., Hudemann, C., Bill, E., & Holmgren, A. (2005). Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: a possible role as redox sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(23), 8168–73. doi:10.1073/pnas.0500735102
- Lindholm, D., Wootz, H., & Korhonen, L. (2006). ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell death and differentiation*, *13*(3), 385–92. doi:10.1038/sj.cdd.4401778
- Link, C. (2003). Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. *Neurobiology of Aging*, *24*(3), 397–413. doi:10.1016/S0197-4580(02)00224-5
- Link, C. D. (1995). Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(20), 9368–72.
- Link, C. D., Johnson, C. J., Fonte, V., Paupard, M., Hall, D. H., Styren, S., Mathis, C. a, et al. (2001). Visualization of fibrillar amyloid deposits in living, transgenic *Caenorhabditis elegans* animals using the sensitive amyloid dye, X-34. *Neurobiology of aging*, *22*(2), 217–26.
- Linster, C. L., & Van Schaftingen, E. (2007). Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *The FEBS journal*, *274*(1), 1–22. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05607.x
- Liu, Q., Xie, F., Rolston, R., Moreira, P. I., Nunomura, A., Zhu, X., Smith, M. a, et al. (2007). Prevention and treatment of Alzheimer disease and aging: antioxidants. *Mini reviews in medicinal chemistry*, *7*(2), 171–80.
- Lundberg, M., Johansson, C., Chandra, J., Enoksson, M., Jacobsson, G., Ljung, J., Johansson, M., et al. (2001). Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms. *The Journal of biological chemistry*, *276*(28), 26269–75. doi:10.1074/jbc.M011605200
- Lustbader, J. W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H. W., Takuma, K., Wang, N., Caspersen, C., et al. (2004). ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science (New York, N.Y.)*, *304*(5669), 448–52. doi:10.1126/science.1091230
- Ma, Y., & Hendershot, L. M. (2001). The unfolding tale of the Unfolded Protein Response. *Cell*, *107*, 827–830.
- Ma, Y., & Hendershot, L. M. (2004). ER chaperone functions during normal and stress conditions. *Journal of chemical neuroanatomy*, *28*(1-2), 51–65. doi:10.1016/j.jchemneu.2003.08.007
- MacLennan, D. H., Rice, W. J., & Green, N. M. (1997). The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *The Journal of biological chemistry*, *272*(46), 28815–8.

- Maier, W., Adilov, B., Regenass, M., & Alcedo, J. (2010). A neuromedin U receptor acts with the sensory system to modulate food type-dependent effects on *C. elegans* lifespan. *PLoS biology*, *8*(5), e1000376. doi:10.1371/journal.pbio.1000376
- Mango, S. E. (2001). Stop making nonSense: the *C. elegans smg* genes. *Trends in genetics : TIG*, *17*(11), 646–53.
- Markaki, M., & Tavernarakis, N. (2010). Modeling human diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Biotechnology journal*, *5*(12), 1261–76. doi:10.1002/biot.201000183
- Masutani, H., Bai, J., Kim, Y.-C., & Yodoi, J. (2004). Thioredoxin as a neurotrophic cofactor and an important regulator of neuroprotection. *Molecular Neurobiology*, *29*(3), 229–242.
- Mattson, M. P. (2004). Pathways Towards and Away from Alzheimer's Disease. *Nature*, *430*(7000), 631–639. doi:10.1038/nature02621.Pathways
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (1998). Glial cell reactions in neurodegenerative diseases: pathophysiology and therapeutic interventions. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, *12 Suppl 2*(2), S1–S6.
- Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D., & Ambros, V. (1991). Efficient maintenance. *The EMBO journal*, *10*(12), 3959–3970.
- Meredith, G. E., Sonsalla, P., & Chesselet, M. (2008). Animal Models of Parkinson's Disease Progression. *Acta Neuropathol*, *115*(4), 385–398. doi:10.1007/s00401-008-0350-x.Animal
- Miedel, M. T., Graf, N. J., Stephen, K. E., Long, O. S., Pak, S. C., Perlmutter, D. H., Silverman, G. a., et al. (2012). A Pro-Cathepsin L Mutant Is a Luminal Substrate for Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation in *C. elegans*. (T. Lamitina, Ed.) *PLoS ONE*, *7*(7), e40145. doi:10.1371/journal.pone.0040145
- Miller, D. M., Stockdale, F. E., & Karn, J. (1986). Immunological identification of the genes encoding the four myosin heavy chain isoforms of *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(8), 2305–9.
- Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A. E., & Spyrou, G. (2000). The mitochondrial thioredoxin system. *Antioxidants redox signaling*, *2*(4), 801–810.
- Miranda-Vizuete, A., Ljung, J., Damdimopoulos, A., Gustafsson, J., Oko, R., Pelto-Huikko, M., & Spyrou, G. (2001). Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *The Journal of biological chemistry*, *276*(34), 31567–74. doi:10.1074/jbc.M101760200
- Missirlis, F., Ulschmid, J. K., Hirosawa-Takamori, M., Grönke, S., Schäfer, U., Becker, K., Phillips, J. P., et al. (2002). Mitochondrial and cytoplasmic thioredoxin reductase variants encoded by a single *Drosophila* gene are both essential for viability. *The Journal of biological chemistry*, *277*(13), 11521–6. doi:10.1074/jbc.M111692200
- Miyabayashi, T., Palfreyman, M. T., Sluder, a E., Slack, F., & Sengupta, P. (1999). Expression and function of members of a divergent nuclear receptor family in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, *215*(2), 314–31. doi:10.1006/dbio.1999.9470
- Monteiro, G., Horta, B. B., Pimenta, D. C., Augusto, O., & Netto, L. E. S. (2007). Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(12), 4886–91. doi:10.1073/pnas.0700481104

Bibliografía

- 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 of the United States of America*, *99*(16), 10417–22. doi:10.1073/pnas.152161099
- Mouysset, J., Kähler, C., & Hoppe, T. (2006). A conserved role of *Caenorhabditis elegans* CDC-48 in ER-associated protein degradation. *Journal of structural biology*, *156*(1), 41–9. doi:10.1016/j.jsb.2006.02.015
- Mühlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J. R., Uzarska, M. a, Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., et al. (2010). Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell metabolism*, *12*(4), 373–85. doi:10.1016/j.cmet.2010.08.001
- Naidoo, N. (2009). The endoplasmic reticulum stress response and aging. *Reviews in the neurosciences*, *20*(1), 23–37.
- Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A. Ø., Grothe, R., & Eisenberg, D. (2005). Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, *435*(7043), 773–778.
- Nishikawa, S. I., Fewell, S. W., Kato, Y., Brodsky, J. L., & Endo, T. (2001). Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *The Journal of cell biology*, *153*(5), 1061–70.
- Nonn, L., Williams, R. R., Erickson, R. P., & Powis, G. (2003). The Absence of Mitochondrial Thioredoxin 2 Causes Massive Apoptosis , Exencephaly , and Early Embryonic Lethality in Homozygous Mice. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(3), 916–922. doi:10.1128/MCB.23.3.916
- Nordberg, J., & Arner, E. (2001). Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology & Medicine*, *31*(11), 1287–1312.
- Olshansky, S. J., Carnes, B. A., & Désesquelles, A. (2001). Prospects for human longevity. *Science*, *291*(5508), 1491–1492.
- Orr, A. L., Li, S., Wang, C.-E., Li, H., Wang, J., Rong, J., Xu, X., et al. (2008). N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *28*(11), 2783–92. doi:10.1523/JNEUROSCI.0106-08.2008
- Orr, H. T., & Zoghbi, H. Y. (2007). Trinucleotide repeat disorders. *Annual review of neuroscience*, *30*, 575–621. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.113042
- Panov, A. V., Gutekunst, C.-A., Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J., & Greenamyre, J. T. (2002). Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nature neuroscience*, *5*(8), 731–6. doi:10.1038/nn884
- Pilon, M., Schekman, R., & Römisch, K. (1997). Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *The EMBO journal*, *16*(15), 4540–8. doi:10.1093/emboj/16.15.4540
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., & Casini, A. F. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical pharmacology*, *66*(8), 1499–1503.
- Priyadarshi, a, Khuder, S. a, Schaub, E. a, & Priyadarshi, S. S. (2001). Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environmental research*, *86*(2), 122–7. doi:10.1006/enrs.2001.4264

- Rabinovich, E., Kerem, A., Fröhlich, K., Diamant, N., & Bar-nun, S. (2002). Chaperone Required for Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation AAA-ATPase p97 / Cdc48p , a Cytosolic Chaperone Required for Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(2), 626–34. doi:10.1128/MCB.22.2.626
- Ramesh, B. N., Rao, T. S. S., Prakasam, A., & Rao, K. S. J. (2010). Neuronutrition and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer Disease*, 19(4), 1123–1139. doi:10.3233/JAD-2010-1312.Neuronutrition
- Ramirez, A., Heimbach, A., Gründemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L. P., Goebel, I., et al. (2006). Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in *ATP13A2*, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nature genetics*, 38(10), 1184–91. doi:10.1038/ng1884
- Reddy, P., & Reddy, P. (2011). Mitochondria as a Therapeutic Target for Aging and Neurodegenerative Diseases. *Curr Alzheimer Res*, 8(4), 393–409.
- Reinke, S. N., Hu, X., Sykes, B. D., & Lemire, B. D. (2010). *Caenorhabditis elegans* diet significantly affects metabolic profile, mitochondrial DNA levels, lifespan and brood size. *Molecular genetics and metabolism*, 100(3), 274–82. doi:10.1016/j.ymgme.2010.03.013
- Reynaert, N. L., Vliet, A. V. D., Guala, A. S., MCGovern, T., Hristova, M., Pantano, C., Heintz, N. H., et al. (2006). Dynamic redox control of NF-κB through glutaredoxin-regulated S-glutathionylation of inhibitory κB kinase beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), 13086–91.
- Reynolds, A., Laurie, C., Mosley, R. L., & Gendelman, H. E. (2007). Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *International review of neurobiology*, 82(07), 297–325. doi:10.1016/S0074-7742(07)82016-2
- Rhee, S. G., Kang, S. W., Chang, T. S., Jeong, W., & Kim, K. (2001). Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB life*, 52(1-2), 35–41. doi:10.1080/15216540252774748
- Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoegel, C., & Jentsch, S. (2005). A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell*, 120(1), 73–84. doi:10.1016/j.cell.2004.11.013
- Riemer, J., Appenzeller-Herzog, C., Johansson, L., Bodenmiller, B., Hartmann-Petersen, R., & Ellgaard, L. (2009). A luminal flavoprotein in endoplasmic reticulum-associated degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35), 14831–6. doi:10.1073/pnas.0900742106
- Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(7), 519–29. doi:10.1038/nrm2199
- Ross, C. a., & Poirier, M. a. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine*, 10 Suppl(July), S10–7. doi:10.1038/nm1066
- Sadek, C. M., Damdimopoulos, a E., Pelto-Huikko, M., Gustafsson, J. a, Spyrou, G., & Miranda-Vizuete, a. (2001). Sptrx-2, a fusion protein composed of one thioredoxin and three tandemly repeated NDP-kinase domains is expressed in human testis germ cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 6(12), 1077–90.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., et al. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *The EMBO journal*, 17(9), 2596–606. doi:10.1093/emboj/17.9.2596

Bibliografía

- Sasagawa, Y., Yamanaka, K., & Ogura, T. (2007). ER E3 ubiquitin ligase HRD-1 and its specific partner chaperone BiP play important roles in ERAD and developmental growth in *Caenorhabditis elegans*. *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms*, 12(9), 1063–73. doi:10.1111/j.1365-2443.2007.01108.x
- Satyal, S. H., Schmidt, E., Kitagawa, K., Sondheimer, N., Lindquist, S., Kramer, J. M., & Morimoto, R. I. (2000). Polyglutamine aggregates alter protein folding homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), 5750–5. doi:10.1073/pnas.100107297
- Savitt, J. M., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2006). Science in medicine Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1744–54. doi:10.1172/JCI29178.1744
- Schaheen, B., Dang, H., & Fares, H. (2009). Derlin-dependent accumulation of integral membrane proteins at cell surfaces. *Journal of cell science*, 122(Pt 13), 2228–39. doi:10.1242/jcs.048892
- Schekman, R. (2004). A channel for protein waste. *Nature*, 429(6994), 817–8.
- Schenk, H., Vogt, M., Droge, W., & Schulze-Osthoff, K. (1996). Thioredoxin as a Potent Costimulus of Cytokine Expression. *Journal of Immunology*, 156(2), 765–71.
- Sevier, C. S., Qu, H., Heldman, N., Gross, E., Fass, D., & Kaiser, C. a. (2007). Modulation of cellular disulfide-bond formation and the ER redox environment by feedback regulation of Ero1. *Cell*, 129(2), 333–44. doi:10.1016/j.cell.2007.02.039
- Shelton, M. D., Chock, P. B., & Mieyal, J. J. (2005). Glutaredoxin: role in reversible protein s-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. *Antioxidants redox signaling*, 7(3-4), 348–366.
- Shen, X., Ellis, R. E., Lee, K., Liu, C. Y., Yang, K., Solomon, a, Yoshida, H., et al. (2001). Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell*, 107(7), 893–903.
- Shephard, F., Adenle, A. a, Jacobson, L. a, & Szewczyk, N. J. (2011). Identification and functional clustering of genes regulating muscle protein degradation from amongst the known *C. elegans* muscle mutants. *PLoS one*, 6(9), e24686. doi:10.1371/journal.pone.0024686
- Shore, G. C., Papa, F. R., & Oakes, S. A. (2011). Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol*, 23(2), 143–149. doi:10.1016/j.ceb.2010.11.003.Signaling
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H., et al. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, 107(4), 465–76.
- Silva, M. C., Fox, S., Beam, M., Thakkar, H., Amaral, M. D., & Morimoto, R. I. (2011). A Genetic Screening Strategy Identifies Novel Regulators of the Proteostasis Network. (T. R. Serio, Ed.) *PLoS Genetics*, 7(12), e1002438. doi:10.1371/journal.pgen.1002438
- Simmen, T., Aslan, J. E., Blagoveshchenskaya, A. D., Thomas, L., Wan, L., Xiang, Y., Feliciangeli, S. F., et al. (2005). PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *The EMBO journal*, 24(4), 717–29. doi:10.1038/sj.emboj.7600559
- Simmer, F., Tijsterman, M., Parrish, S., Koushika, S. P., Nonet, M. L., Fire, A., Ahringer, J., et al. (2002). Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes *C. elegans* hypersensitive to RNAi. *Current biology*, 12(15), 1317–9.

- Skovronsky, D., Lee, V., & Trojanowski, J. (2006). Neurodegenerative Diseases: New Concepts of Pathogenesis and Their Therapeutic Implications. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1, 151–170. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100113
- Smith, W. W., Jiang, H., Pei, Z., Tanaka, Y., Morita, H., Sawa, A., Dawson, V. L., et al. (2005). Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Human molecular genetics*, 14(24), 3801–11. doi:10.1093/hmg/ddi396
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6469–6473.
- Spyrou, G., Enmark, E., Miranda-Vizuete, a, & Gustafsson, J. (1997). Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *The Journal of biological chemistry*, 272(5), 2936–41.
- Strittmatter, W. J., Saunders, a M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., & Roses, a D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 1977–81.
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130.
- Styren,, S. D., Hamilton, R. L., Styren, G. C., & Klunk, W. E. (2000). X-34, A Fluorescent Derivative of Congo Red: A Novel Histochemical Stain for Alzheimer's Disease Pathology. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 48(9), 1223–1232. doi:10.1177/002215540004800906
- Su, B., Wang, X., Zheng, L., Perry, G., & Smith, M. A. (2010). Abnormal Mitochondrial Dynamics and Neurodegenerative Diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1802(1), 135–142. doi:10.1016/j.bbadis.2009.09.013.Abnormal
- Su, D., Novoselov, S. V., Sun, Q.-A., Moustafa, M. E., Zhou, Y., Oko, R., Hatfield, D. L., et al. (2005). Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *The Journal of biological chemistry*, 280(28), 26491–8. doi:10.1074/jbc.M503638200
- Sulston, J., Dew, M., & Brenner, S. (1975). Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. (W. B. Wood, Ed.) *Journal of Comparative Neurology*, 163(2), 215–26. doi:10.1002/cne.901630207
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., & Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100(1), 64–119.
- Szabackai, G., Bianchi, K., Várnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M. R., Cavagna, D., Nagy, A. I., et al. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *The Journal of cell biology*, 175(6), 901–11. doi:10.1083/jcb.200608073
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., & Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*, 7(9), 880–5. doi:10.1038/sj.embor.7400779

Bibliografía

- Szewczyk, N. J., Peterson, B. K., Barmada, S. J., Parkinson, L. P., & Jacobson, L. a. (2007). Opposed growth factor signals control protein degradation in muscles of *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal*, *26*(4), 935–43. doi:10.1038/sj.emboj.7601540
- Szewczyk, N. J., Peterson, B. K., & Jacobson, L. A. (2002). Activation of Ras and the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Promotes Protein Degradation in Muscle Cells of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(12), 4181–4188. doi:10.1128/MCB.22.12.4181
- Tabrizi, S. J., Cleeter, M. W. J., Xuereb, J., Taanman, J.-W., Cooper, J. M., & Schapira, a. H. V. (1999). Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Annals of Neurology*, *45*(1), 25–32. doi:10.1002/1531-8249(199901)45:1<25::AID-ART6>3.0.CO;2-E
- Tamarit, J., Belli, G., Ros, J., & Herrero, E. (2002). Grx5 Is a Mitochondrial Glutaredoxin Required for the Activity of Iron / Sulfur Enzymes ´ a Teresa Rodri. *Molecular biology of the cell*, *13*(4), 1109–1121. doi:10.1091/mbc.01
- Tamura, T., & Stadtman, T. C. (1996). A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(3), 1006–11.
- Tanner, C. (2003). Is the cause of Parkinson's disease environmental or hereditary? Evidence from twin studies. *Adv Neurol*, *91*, 133–142.
- Tavender, T. J., & Bulleid, N. J. (2010). Molecular mechanisms regulating oxidative activity of the Ero1 family in the endoplasmic reticulum. *Antioxidants & redox signaling*, *13*(8), 1177–87. doi:10.1089/ars.2010.3230
- Taylor, J. P., Hardy, J., & Fischbeck, K. H. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5575), 1991–5. doi:10.1126/science.1067122
- Thannickal, V. J., Fanburg, B. L., Chirico, E. N., Martin, C., Faës, C., Féasson, L., Oyonenguéllé, S., et al. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *279*(6), L1005–28.
- Thinakaran, G., & Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *The Journal of biological chemistry*, *283*(44), 29615–9. doi:10.1074/jbc.R800019200
- Thomas, M., Yu, Z., Dadgar, N., Varambally, S., Yu, J., Chinnaiyan, A. M., & Lieberman, A. P. (2005). The unfolded protein response modulates toxicity of the expanded glutamine androgen receptor. *The Journal of biological chemistry*, *280*(22), 21264–71. doi:10.1074/jbc.M500144200
- Tian, Y., Li, Z., Hu, W., Ren, H., Tian, E., Zhao, Y., Lu, Q., et al. (2010). *C. elegans* screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms. *Cell*, *141*(6), 1042–55. doi:10.1016/j.cell.2010.04.034
- 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*(1-2), 103–12.
- Timmons, L., & Fire, a. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, *395*(6705), 854. doi:10.1038/27579
- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S., & Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, *101*(3), 249–58.

- Treusch, S., Cyr, D. M., & Lindquist, S. (2009). Amyloid deposits: Protection against toxic protein species? *Cell Cycle*, *8*(11), 1668–74.
- Treusch, S., Hamamichi, S., Goodman, J. L., Matlack, K. E., Chung, C. Y., Baru, V., M, S. J., et al. (2011). Functional links between A β toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast.pdf. *Science*, *334*(6060), 1241–1245.
- Uehara, T., Nakamura, T., Yao, D., Shi, Z.-Q., Gu, Z., Ma, Y., Masliah, E., et al. (2006). S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature*, *441*(7092), 513–7. doi:10.1038/nature04782
- Umeda-Kameyama, Y., Tsuda, M., Ohkura, C., Matsuo, T., Namba, Y., Ohuchi, Y., & Aigaki, T. (2007). Thioredoxin suppresses Parkin-associated endothelin receptor-like receptor-induced neurotoxicity and extends longevity in *Drosophila*. *The Journal of biological chemistry*, *282*(15), 11180–7. doi:10.1074/jbc.M700937200
- Urano, F., Calfon, M., Yoneda, T., Yun, C., Kiraly, M., Clark, S. G., & Ron, D. (2002). A survival pathway for *Caenorhabditis elegans* with a blocked unfolded protein response. *The Journal of cell biology*, *158*(4), 639–46. doi:10.1083/jcb.200203086
- Ushioda, R., Hoseki, J., Araki, K., & Jansen, G. (2008). ERdj5 Is Required as a Disulfide Reductase for Degradation of Misfolded Proteins in the ER. *Science*, *321*(5888), 569–72.
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M. K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., et al. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in *PINK1*. *Science (New York, N.Y.)*, *304*(5674), 1158–60. doi:10.1126/science.1096284
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *39*(1), 44–84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Vance, J. (1990). Phospholipid Synthesis in a Membrane Fraction Associated with Mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, *265*(13), 7248–7256.
- Vattem, K. M., & Wek, R. C. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates *ATF4* mRNA translation in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(31), 11269–74. doi:10.1073/pnas.0400541101
- Vembar, S. S., & Bodsky, J. L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *9*(12), 944–957. doi:10.1038/nrm2546.One
- Voeltz, G. K., Rolls, M. M., & Rapoport, T. a. (2002). Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO reports*, *3*(10), 944–50. doi:10.1093/embo-reports/kvf202
- Voisine, C., Pedersen, J. S., & Morimoto, R. I. (2010). Chaperone networks: tipping the balance in protein folding diseases. *Neurobiology of disease*, *40*(1), 12–20. doi:10.1016/j.nbd.2010.05.007
- Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., & Richardson, E. P. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, *44*(6), 559–577.
- Wakasugi, N., Tagaya, Y., Wakasugi, H., Mitsui, a, Maeda, M., Yodoi, J., & Tursz, T. (1990). Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type I- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(21), 8282–6.

Bibliografía

- Waksman, G., Krishna, T., Williams Jr, C., & Kuriyan, J. (1994). Crystal structure of *Escherichia coli* thioredoxin reductase refined at 2 Å resolution. Implications for a large conformational change during catalysis. *Journal of molecular biology*, *236*(3), 800–816.
- Walker, A. K., & Atkin, J. D. (2011). Mechanisms of neuroprotection by protein disulphide isomerase in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology research international*, *2011*, 317340. doi:10.1155/2011/317340
- Wang, D., Qian, L., Xiong, H., Liu, J., Neckameyer, W. S., Oldham, S., Xia, K., et al. (2006). Antioxidants protect *PINK1*-dependent dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(36), 13520–5. doi:10.1073/pnas.0604661103
- Wang, H., Lim, P. J., Karbowski, M., & Monteiro, M. J. (2009). Effects of overexpression of huntingtin proteins on mitochondrial integrity. *Human molecular genetics*, *18*(4), 737–52. doi:10.1093/hmg/ddn404
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., & Brenner, S. (1986). The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, *314*(1165), 1–340. doi:10.1098/rstb.1986.0056
- Winkelbauer, M. E., Schafer, J. C., Haycraft, C. J., Swoboda, P., & Yoder, B. K. (2005). The *C. elegans* homologs of nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are cilia transition zone proteins involved in chemosensory perception. *Journal of cell science*, *118*(Pt 23), 5575–87. doi:10.1242/jcs.02665
- Wood, J. G., Mirra, S. S., Pollock, N. J., & Binder, L. I. (1986). Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(11), 4040–3.
- Wu, J., & Kaufman, R. J. (2006). From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell death and differentiation*, *13*(3), 374–84. doi:10.1038/sj.cdd.4401840
- Xia, L., Nordman, T., Olsson, J. M., Damdimopoulos, A., Björkhem-Bergman, L., Nalvarte, I., Eriksson, L. C., et al. (2003). The mammalian cytosolic selenoenzyme thioredoxin reductase reduces ubiquinone. A novel mechanism for defense against oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, *278*(4), 2141–6. doi:10.1074/jbc.M210456200
- Yamanaka, K., Okubo, Y., Suzaki, T., & Ogura, T. (2004). Analysis of the two p97/VCP/Cdc48p proteins of *Caenorhabditis elegans* and their suppression of polyglutamine-induced protein aggregation. *Journal of structural biology*, *146*(1-2), 242–50. doi:10.1016/j.jsb.2003.11.017
- Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U. P., Prywes, R., Brown, M. S., et al. (2000). ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. *Molecular cell*, *6*(6), 1355–1364.
- Ye, Y., Meyer, H. H., & Rapoport, T. a. (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *The Journal of cell biology*, *162*(1), 71–84. doi:10.1083/jcb.200302169
- Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., & Rapoport, T. a. (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature*, *429*(6994), 841–7. doi:10.1038/nature02656

- Yeung, N., Gold, B., Liu, N. L., Prathapam, R., Sterling, H. J., Willams, E. R., & Butland, G. (2011). The *E. coli* monothiol glutaredoxin GrxD forms homodimeric and heterodimeric FeS cluster containing complexes. *Biochemistry*, *50*(41), 8957–8969. doi:10.1021/bi2008883
- Yoshida, H, Matsui, T., Yamamoto, a, Okada, T., & Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*, *107*(7), 881–91.
- Yoshida, Hiderou. (2007). ER stress and diseases. *The FEBS journal*, *274*(3), 630–58. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05639.x
- Yoshida, Hiderou, Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R. J., Nagata, K., & Mori, K. (2003). A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Developmental cell*, *4*(2), 265–71.
- Zdinak, L. a, Greenberg, I. B., Szewczyk, N. J., Barmada, S. J., Cardamone-Rayner, M., Hartman, J. J., & Jacobson, L. a. (1997). Transgene-coded chimeric proteins as reporters of intracellular proteolysis: starvation-induced catabolism of a lacZ fusion protein in muscle cells of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of cellular biochemistry*, *67*(1), 143–53.
- Zhao, L., & Ackerman, S. L. (2006). Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Current opinion in cell biology*, *18*(4), 444–52. doi:10.1016/j.ceb.2006.06.005
- Zhu, X., Perry, G., Moreira, P. I., Aliev, G., Cash, A. D., Hirai, K., & Smith, M. a. (2006). Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, *9*(2), 147–53.
- Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., et al. (2004). Mutations in *LRRK2* cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, *44*(4), 601–7. doi:10.1016/j.neuron.2004.11.005
- Zámocký, M., & Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in biophysics and molecular biology*, *72*(1), 19–66.
- van Ham, T. J., Holmberg, M. a, van der Goot, A. T., Teuling, E., Garcia-Arencibia, M., Kim, H., Du, D., et al. (2010). Identification of MOAG-4/SERF as a regulator of age-related proteotoxicity. *Cell*, *142*(4), 601–12. doi: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. (2008). *C. elegans* model identifies genetic modifiers of alpha-synuclein inclusion formation during aging. *PLoS genetics*, *4*(3), e1000027. doi:10.1371/journal.pgen.1000027

Agradecimientos

Aún ahora cuando me encuentro escribiendo estas líneas, todavía no me creo que, en breve (espero), cerraré este capítulo de mi vida. Ha sido un camino sembrado de dudas, la mayoría de las cuales continúan acompañándome, pero un camino que finalmente me decidí a recorrer y que, parece, se acerca a su meta. Desde pequeño me educaron dentro de la máxima andaluza “es de mal *nasío* ser *desagradesío*”, así que aquí van mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas:

Por supuesto a Antonio Miranda, mi director de tesis y, sobre todo, mi amigo. Gracias por la confianza incondicional que depositaste en mí desde el principio, por animarme a aventurarme en este camino y por ser una persona tan cercana, siempre dispuesta a escuchar. Nunca dudaste de mí y me dejaste libertad total para hacer y deshacer. Me llevo un buen amigo. Gracias también a Guillermo López Lluch por su disposición inmediata y altruista a tutorizar este trabajo.

No podría olvidarme aquí de mis compañeros de laboratorio durante estos años en el CABD; Ana, Briseida, Fran, Machupi, María G. y María J., muchas gracias por vuestra ayuda, pero sobre todo, por tantas risas y tan buenos momentos. Ha sido un gustazo trabajar con tan buen ambiente y tan buenos compañeros. Hago extensivo este agradecimiento a Peter Askjaer, Manolo Muñoz y a los compañeros que trabajan en sus laboratorios. Me lo he pasado en grande trabajando a vuestro lado.

Mi corta estancia en la Universidad de Alabama ocupa una parte de estos años de tesis que recuerdo con mucho cariño, por lo que no querría dejar pasar la oportunidad de agradecer su ayuda y hospitalidad a todos los compañeros que allí encontré, muy especialmente a Ace, A.J., Guy, Kim y Laura.

También me gustaría dedicarle unas palabras a todos mis compañeros en los laboratorios anteriores en los que trabajé, que de alguna manera, han formado parte de este camino. A mis compañeros del Wolfson Institute de Londres, especialmente a Dimitra, Dimitris, Gus, Juanma, Sean, Sham y Tyson, por guiarme durante mis primeros años en la ciencia y por hacer que ese tiempo en Londres fuera tan especial. También a mis compañeros de Virgen del Rocío y de CABIMER por los lotes de reír que me he dado con vosotros, sobre todo con David, Marcela, Marco, Rubén, Sergio Mora y Vicente.

Pero tampoco quiero olvidarme de aquellos que durante todos estos años que he pasado en el mundo de la investigación me han puesto las cosas más difíciles. Gracias porque muchas veces se aprende más de las experiencias menos buenas, que nos enseñan a entender lo que queremos y no queremos en nuestra vida.

Gracias a todos mis amigos porque sin ellos los momentos y las cervezas más allá del trabajo no serían lo mismo. Y ¡qué habría sido de esta tesis sin esos momentos de relax!

Muchas gracias a Ana por tu optimismo, por tu apoyo incondicional y por alegrar siempre mi camino. Las cosas son siempre más fáciles a tu lado.

Por supuesto, muchas gracias a mi familia por apoyarme en todo momento y por intentar entender mis decisiones, tantas veces a contracorriente de lo establecido. Sé que no siempre es fácil.

¡Muchas gracias a todos!