



TESIS DOCTORAL

**Estudio de los mecanismos moleculares que median el
efecto protector del glutatión reducido en el
mantenimiento de la proteostasis celular**

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica
Universidad de Sevilla

David Guerrero Gómez

Dirigida por
Dr. Antonio Miranda Vizquete

El Dr. Antonio Miranda Vizuete, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICA:

Que David Guerrero Gómez, Licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Estudio de los mecanismos moleculares que median el efecto protector del glutatión reducido en el mantenimiento de la proteostasis celular”, el cual reúne las condiciones de originalidad y calidad científica necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, expide el presente certificado en Sevilla, a 15 de Diciembre de 2021.

Fdo: Dr. Antonio Miranda Vizuete.



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Índice general.

Índice de figuras	vii
Índice de tablas	xi
Abreviaturas	xiii
Resumen	xv
Publicaciones	xvii
Capítulo I. Introducción	1
1.1. Proteostasis	3
1.2. Principales enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la pérdida de proteostasis	3
1.2.1. Enfermedad de Alzheimer	4
1.2.2. Enfermedad de Parkinson	6
1.2.3. Enfermedades de poliglutaminas	8
1.3. Procesos moduladores de la neurodegeneración	9
1.3.1. Agregación de proteínas	10
1.3.2. Disfunción mitocondrial	12
1.3.3. Estrés oxidativo	14
1.3.3.1. Antioxidantes	16
1.3.3.1.1. Antioxidantes no enzimáticos	16
1.3.3.1.1.1. Vitaminas E y C	16
1.3.3.1.1.2. Glutatión (GSH)	17
1.3.3.1.2. Antioxidantes enzimáticos	18
1.3.3.1.2.1. Superóxido dismutasa	18
1.3.3.1.2.2. Catalasas	18
1.3.3.1.2.3. Tiorredoxinas	19
1.3.3.1.2.4. Glutarredoxinas	21
1.3.3.1.2.5. Glutatión peroxidasa	23
1.3.3.1.2.6. Peroxirredoxinas	23
1.4. Mecanismos de regulación de la proteostasis	24
1.4.1. Plegamiento de proteínas	24
1.4.1.1. Asistentes de plegamiento	27
1.4.1.1.1. Proteína disulfuro isomerasa (PDI)	27
1.4.1.1.2. Chaperonas moleculares	29
1.4.2. FOXO	30
1.4.3. Respuesta a proteínas mal plegadas	31
1.4.4. Sistema ubiquitina-proteasoma	32

1.4.5. Autofagia.....	33
1.4.6. Mitofagia.....	35
1.5. <i>Caenorhabditis elegans</i>	36
1.5.1. Ciclo de vida y reproducción.....	36
1.5.2. Anatomía.....	38
1.5.3. <i>C. elegans</i> como organismo modelo.....	41
1.5.4. <i>C. elegans</i> como modelo de enfermedades neurodegenerativas.....	42
1.5.4.1. Modelos de A β	42
1.5.4.2. Modelos de α -sinucleína.....	44
1.5.4.3. Modelos de poliglutaminas.....	45
1.5.5. Mantenimiento de la homeostasis redox de grupos tiólicos en <i>C. elegans</i>	47
1.5.6. Glutatión reductasa en <i>C. elegans</i>	49
Capítulo II. Justificación y Objetivos	53
Capítulo III. Resultados	57
3.1. Efecto del silenciamiento del gen <i>gsr-1</i> mediante ARN de interferencia en modelos de agregación de proteínas en <i>C. elegans</i>	59
3.2. Efecto de la inhibición de la síntesis, reducción y disponibilidad del glutatión reducido..	63
3.3. Efecto de la mutación <i>gsr-1(tm3574)</i> en modelos de agregación de proteínas exógenas en <i>C. elegans</i>	65
3.3.1. Modelos de agregación por repeticiones de residuos de glutamina.....	66
3.3.2. Modelos de agregación del péptido A β	70
3.3.3. Modelos de agregación de la proteína α -sinucleína.....	73
3.4. Efecto de la deficiencia de GSR-1 en la agregación de proteínas endógenas de <i>C. elegans</i>	76
3.5. Mecanismo molecular del efecto protector de GSR-1 en la homeostasis proteica.....	79
3.5.1. Identificación de la ruta de control de la proteostasis afectada por la falta de GSR-1.....	79
3.5.1.1. Ruta de estrés citoplasmático.....	79
3.5.1.2. Ruta de la insulina.....	80
3.5.1.3. Rutas de estrés de orgánulo.....	82
3.5.1.3.1. Ruta de estrés de retículo endoplásmico.....	82
3.5.1.3.2. Ruta de estrés mitocondrial.....	84
3.5.1.4. Ruta de degradación de proteínas.....	85
3.5.1.4.1. Proteasoma.....	85
3.5.1.4.2. Autofagia.....	86
3.5.1.4.3. Mitofagia.....	88
3.5.2. Estudio de la actividad autofágica en mutantes <i>gsr-1</i>	89

3.5.3. Reproducción del impacto de la mutación <i>gsr-1</i> en la agregación de proteínas mediante el bloqueo genético de la autofagia.	92
3.5.4. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> en la saturación de la autofagia.....	95
3.5.5. Estudio del flujo autofágico.....	99
3.6. Estudio de la regulación redox de TFEB/TFE3/HLH-30.....	100
3.6.1. Función del residuo de cisteína conservado de TFEB/TFE3.....	103
3.6.2. Función del residuo de cisteína conservado de HLH-30.	106
3.6.3. Evaluación de la translocación nuclear de HLH-30.....	107
3.6.4. Estudio del papel fisiológico de la cisteína 284 de HLH-30.	110
3.6.5. Papel de la C284 de HLH-30 durante el desarrollo.....	111
Capítulo IV. Discusión	117
4.1. La inhibición farmacológica de la disponibilidad de GSH fenocopia el efecto de la falta de GSR-1 en modelos de agregación.....	120
4.2. La falta de GSR-1 tiene efecto sobre los mecanismos de regulación de la proteostasis.	122
4.3. La pérdida de regulación redox debida a la mutación <i>gsr-1</i> impacta principalmente sobre la autofagia.....	124
4.3.1. La mutación <i>gsr-1</i> podría incrementar la agregación de proteínas por supersaturación.	127
4.4. La regulación redox de la cisteína 284 de HLH-30 no afecta a la inducción de la autofagia.	130
4.5. Implicación del GSH en neurodegeneración.....	133
Capítulo V. Conclusiones	137
Capítulo VI. Materiales y Métodos	141
6.1. Estirpes.....	143
6.1.1. Estirpes de <i>Caenorhabditis elegans</i>	143
6.1.2. Estirpes de <i>Escherichia coli</i>	149
6.1.3. Estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	149
6.2. Medios de cultivo, tampones y soluciones.....	150
6.2.1. Mantenimiento de <i>C. elegans</i>	150

6.2.2. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	151
6.2.3. Medios de cultivo para <i>S. aureus</i>	151
6.3. Crecimiento y mantenimiento de organismos.....	153
6.3.1. Estirpes bacterianas.....	153
6.3.1.1. Cultivo de <i>E. coli</i>	153
6.3.1.2. Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i>	153
6.3.2. <i>C. elegans</i>	153
6.3.2.1. Crecimiento de <i>C. elegans</i>	153
6.3.2.2. Conservación de estirpes.....	153
6.3.2.3. Limpieza de contaminación.....	154
6.3.2.4. Sincronización de animales.....	155
6.3.2.5. Extracción de ADN genómico de <i>C. elegans</i>	155
6.4. Inhibición de la ruta del glutatión.....	155
6.5. Ensayos de ARN de interferencia.....	156
6.6. Microscopía.....	157
6.7. Cuantificación de los fenotipos en estirpes poliQ.....	157
6.7.1. Cuantificación de agregados poliQ::YFP.....	157
6.7.2. Determinación de la respuesta mecanosensorial.....	158
6.7.3. Arresto embrionario.....	158
6.8. Cuantificación de los fenotipos en estirpes A β	159
6.8.1. Parálisis.....	159
6.8.2. Evaluación del defecto en la expulsión de embriones.....	159
6.8.3. Evaluación del retraso en el desarrollo.....	159
6.9. Cuantificación de los fenotipos en estirpes α -sinucleína.....	159
6.9.1. Cuantificación de agregados de α -sinucleína.....	159
6.9.2. Neurodegeneración dopaminérgica.....	160
6.9.3. Parálisis.....	160
6.10. Cuantificación de fenotipos de estirpes que expresan proteínas metaestables.....	160
6.10.1. Parálisis de los animales <i>unc-52(ts)</i>	160
6.10.2. Arresto embrionario de animales <i>let-60(ts)</i>	161
6.11. Reporteros de proteostasis.....	161
6.11.1. Reporteros de la ruta de la insulina: DAF-16 y SOD-3.....	161
6.11.2. Reportero de UPR ^{RE} : HSP-4.....	161
6.11.3. Reportero de UPR ^{mit} : HSP-6.....	162
6.11.4. Reporteros de HSR: HSF-1 y HSP-70.....	162
6.11.5. Reportero de proteasoma: UbG76V.....	162

6.11.6. Mitofagia.....	162
6.11.7. Localización subcelular de HLH-30::GFP.....	163
6.12. Cuantificación de la acumulación de SQST-1::GFP.....	164
6.13. Cuantificación de los focos mCherry::GFP::LGG-1.....	165
6.14. Ensayo de longevidad.....	165
6.15. Supervivencia a arsenito sódico.....	166
6.16. Supervivencia a la infección por <i>Staphylococcus aureus</i>	166
6.17. Cuantificación de la longitud de los mutantes <i>eat-2</i>	167
6.18. Formación y recuperación de dauer.....	167
Capítulo VII. Bibliografía.....	169

Índice de figuras.

Capítulo I. Introducción.

Figura 1.1. Ruta proteolítica de APP.....	5
Figura 1.2. Ruta de formación de fibras amiloides.....	11
Figura 1.3. Daño y protección frente a especies reactivas de oxígeno.....	16
Figura 1.4. Plegamiento tiorredoxina.....	19
Figura 1.5. Sistema tiorredoxina.....	20
Figura 1.6. Sistema glutatión.....	22
Figura 1.7. Esquema de embudo de plegamiento.....	26
Figura 1.8. Esquema de formación de agregados.....	27
Figura 1.9. Proceso de macroautofagia.....	34
Figura 1.10. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	37
Figura 1.11. Anatomía del hermafrodita y macho adultos de <i>C. elegans</i>	38
Figura 1.12. Lista de modelos de expresión del péptido A β	43
Figura 1.13. Lista de modelos de expresión de la proteína α -sinucleína.....	45
Figura 1.14. Lista de modelos de expresión de proteínas poliQ.....	47
Figura 1.15. Representación del ARNm de <i>gsr-1</i> y la proteína GSR-1.....	50
Figura 1.16. Comparación del desarrollo embrionario de animales <i>wt</i> y <i>gsr-1(m-z)</i>	51

Capítulo III. Resultados.

Figura 3.1. Efecto del silenciamiento por ARNi de <i>gsr-1</i> en animales que expresan Q35::YFP y Q40::YFP en células musculares.....	62
Figura 3.2. Efecto del silenciamiento por ARNi de <i>gsr-1</i> en animales que expresan el péptido A β humano en células musculares.....	62
Figura 3.3. Efecto del silenciamiento por ARNi de <i>gsr-1</i> en animales que expresan la proteína α -sinucleína en células musculares.....	63
Figura 3.4. Efecto de la inhibición de los genes que afectan a la disponibilidad de GSH en animales que expresan proteínas Q35::YFP y Q40::YFP en células musculares.....	64

Figura 3.5. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> en animales que expresan Q35::YFP y Q40::YFP en células musculares.	66
Figura 3.6. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en animales que expresan proteínas poliQ en neuronas.....	68
Figura 3.7. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en animales que expresan proteínas poliQ en neuronas mecanosenoriales.	69
Figura 3.8. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en animales que expresan proteínas poliQ en células intestinales.	70
Figura 3.9. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en animales que expresan el péptido A β ₃₋₄₂ humano en células musculares.	71
Figura 3.10. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> en animales que expresan el péptido A β ₁₋₄₂ humano en células musculares.	72
Figura 3.11. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en animales que expresan el péptido A β ₁₋₄₂ humano en neuronas.	73
Figura 3.12. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en animales que expresan la proteína α -sinucleína humana en células musculares.	74
Figura 3.13. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> en animales que expresan la proteína α -sinucleína humana en neuronas dopaminérgicas.....	75
Figura 3.14. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en <i>C. elegans</i> que expresan la proteína mestaestable UNC-52.	77
Figura 3.15. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en <i>C. elegans</i> que expresan la proteína mestaestable LET-60.	78
Figura 3.16. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> en la inducción de los reporteros HSF-1::GFP y <i>Phsp-70::gfp</i>	80
Figura 3.17. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> en la inducción del reportero DAF-16::GFP.	81
Figura 3.18. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> en la inducción del reportero fluorescente de <i>sod-3</i>	82
Figura 3.19. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> en la inducción del reportero <i>Phsp-4::gfp</i>	83
Figura 3.20. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> en la inducción del reportero <i>Phsp-6::gfp</i>	85
Figura 3.21. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> en la inducción del reportero UbG76V::GFP.	86

Figura 3.22. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> en la translocación nuclear de HLH-30::GFP.	87
Figura 3.23. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> en la inhibición de la mitofagia.	89
Figura 3.24. Efecto de la mutación <i>gsr-1(m+,z-)</i> en la acumulación de SQST-1::GFP en embriones de <i>C. elegans</i>	91
Figura 3.25. Acumulación del reportero SQST-1::GFP en mutantes <i>gsr1(m+,z-)</i> sometidos a ARNi de <i>lgg-1</i>	92
Figura 3.26. Efecto de la mutación <i>atg-3(bp412)</i> en <i>C. elegans</i> que expresan A β , α -SYN::GFP y Q40::YFP en células musculares.	93
Figura 3.27. Efecto de la mutación <i>atg-3(bp412)</i> y el silenciamiento por ARNi de <i>lgg-1</i> en <i>C. elegans</i> que expresan la proteína mestaestable UNC-52.	94
Figura 3.28. Efecto del silenciamiento mediante ARNi de <i>atg-3</i> y <i>lgg-1</i> en <i>C. elegans</i> que expresan la proteína mestaestable LET-60.	95
Figura 3.29. Fenotipos de los animales <i>atg-3; gsr-1(m+,z-)</i> expresando Q40::YFP y UNC-52.	97
Figura 3.30. Fenotipos de animales que expresan de forma conjunta SQST-1::GFP y proteínas metaestables LET-60 y UNC-52.	98
Figura 3.31. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> en el flujo autofágico de <i>C. elegans</i>	99
Figura 3.32. Efecto de la mutación <i>gsr-1</i> en el flujo autofágico de <i>C. elegans</i> que expresan la proteína termosensible UNC-52.	100
Figura 3.33. Alineamiento de las secuencias de HLH-30, TFEB y TFE3.	102
Figura 3.34. Análisis por Western blot, en condiciones no reductoras, de lisados de células ARPE-19 expresando las proteínas TFEB-FLAG-WT o mutantes y TFE3-GFP-WT o mutantes.	104
Figura 3.35. Localización subcelular de TFEB-FLAG-WT y TFEB-FLAG-C212A sobreexpresadas en células ARPE-19 en respuesta a diferentes tratamientos.	105
Figura 3.36. Análisis por Western blot, en condiciones no reductoras, de lisados de células ARPE-19 y HeLa expresando las proteínas TFEB o TFE3.	105
Figura 3.37. Análisis por Western blot en condiciones no reductoras de lisados de células ARPE-19 sobreexpresando las proteínas de <i>C. elegans</i> HLH-30 silvestre o HLH-30(C284A) marcadas con el epitopo FLAG.	106

Figura 3.38. Análisis por Western blot en condiciones no reductoras de lisados de <i>C. elegans</i> expresando las proteínas HLH-30::FLAG::GFP o HLH-30(C284A)::FLAG::GFP.	107
Figura 3.39. Imágenes representativas de microscopía DIC y fluorescencia de la localización subcelular del reportero HLH-30::FLAG::GFP en <i>C. elegans</i>	108
Figura 3.40. Cuantificación de la distribución subcelular de los reporteros HLH-30::FLAG::GFP y HLH-30(C284)::FLAG::GFP tras el tratamiento de <i>C. elegans</i> con varios estímulos.	109
Figura 3.41. Evaluación del papel fisiológico del residuo de cisteína 284 de HLH-30.	111
Figura 3.42. Cuantificación de la distribución subcelular de los reporteros HLH-30::FLAG::GFP y HLH-30(C284)::FLAG::GFP y de los fenotipos de retraso en el desarrollo larvario en mutantes <i>eat-2(ad1116)</i>	113
Figura 3.43. Cuantificación de la distribución subcelular de los reporteros HLH-30::FLAG::GFP y HLH-30(C284)::FLAG::GFP y de los fenotipos relacionados con la formación y recuperación de dauer en animales mutantes <i>daf-2(e1370)</i>	115

Índice de tablas.

Capítulo I. Introducción.

Tabla 1.1. Enfermedades por expansión de poliglutaminas.	9
---	---

Capítulo III. Resultados.

Tabla 3.1. Efecto del silenciamiento por ARNi de los genes de las familias tiorredoxina, glutarredoxina y peroxirredoxina sobre los fenotipos de parálisis y agregación de las estirpes CL647 (que expresa el péptido A β) y UA50 (que expresa la proteína α -SYN), respectivamente.	60
---	----

Abreviaturas

A β : *Amyloid beta*.

ADN: Ácido dextrorribonucleico.

AICD: Dominio intracelular C-terminal del APP.

AL: Autolisosoma.

ANOVA: Test estadístico de análisis de varianza.

AP: Autofagosoma.

APOE: Apolipoproteína E.

APP: *Amyloid precursor protein*.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNi: ARN de interferencia.

ARNm: ARN mensajero.

Asn: Asparagina.

ATF6: *Activating transcription factor-6*.

ATFS: *Activatin transcription factor associated with stress*.

ATG: *Autofagy-related protein*.

ATP: Adenosín trifosfato.

ATXN: Proteína humana ataxina.

C/Cys: Cisteína.

C. elegans: *Caenorhabditis elegans*.

CAT: Catalasa.

CGC: *Caenorhabditis genetics center*.

CRISPR: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*.

CTF: Fragmento C-terminal.

DEM: Dietil maleato.

DIC: *Differential interference contrast*.

DRPLA: Atrofia dentatorubro-páldoluisiana.

EBSS: *Earle's balanced salt solution*.

E. coli: *Escherichia coli*.

ERO: Especie reactiva de oxígeno.

FAD: Flavín adenín dinucleótido.

GCS: γ -glutamilcisteína sintetasa.

GFP: *Green fluorescent protein*.

Gly: Glicina.

GPx: Glutati3n peroxidasa.

GR: Glutati3n reductasa.

GS: Glutati3n sintetasa.

GSH: Glutati3n reducido.

GSSG: Glutati3n oxidado.

HD: *Huntington disease*.

His: Histidina.

HSF: *Heat shock factor*.

HSP: *Heat shock protein*.

HTT: Gen de la Huntingtina humana.

Htt: Proteína Huntingtina humana.

IRE1: *Inositol-requiring protein-1*.

LB: *Luria Bertani*.

NGM: *Nematode Growth Medium*.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

ORF: *Open reading frame*.

PCR: *Polimerase chain reaction*.

PDI: Proteína disulfuro isomerasa.

PERK: *Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*.

Phe: Fenilalanina.

PoliQ: Poliglutamina.

Pro: Prolina.

Prot: Proteína.

Prx: Peroxirredoxina.
Q: Glutamina.
RE: Retículo endoplasmático.
S. aureus: *Staphylococcus aureus*.
SBMA: Atrofia muscular espinal y bulbar.
SCA: Ataxia espinocerebelosa.
SeCys: Selenocisteína.
Ser: Serina.
SOD: Superóxido dismutasa.
TGR: Tiorredoxina glutatión reductasa.
Trx: Tiorredoxina.
TrxR: Tiorredoxina reductasa.
TSA: *Tryptic soy agar*.
TSB: *Tryptic soy broth*.
Txl: *Tioredoxin like*.
Tyr: Tirosina.
UPR: *Unfolded protein response*.
UPS: *Ubiquitin proteasome system*.
UTR: *Untranslated region*.
Val: Valina.
vs: *versus*.
YFP: *Yellow fluorescent protein*.

Resumen

El mantenimiento de la proteostasis es crucial para la supervivencia de todos los organismos, ya que asegura la funcionalidad de las proteínas. Las células han desarrollado un sofisticado sistema de control de calidad que mantiene el correcto plegamiento de las proteínas, actuando sobre aquellas que pierden su conformación nativa, volviéndolas a plegar correctamente o degradándolas si fuera necesario. Sin embargo, los mecanismos de control de la proteostasis tienen una capacidad limitada, llegando a colapsar ante diferentes estreses y derivando en la acumulación de proteínas mal plegadas con tendencia a la agregación.

En presencia de un estrés proteotóxico como resultado de la acumulación de agregados proteicos, el citosol y el retículo endoplasmático (RE) sufren un cambio en su estado redox, donde el citosol se vuelve más oxidado mientras que el RE cambia a un estado más reducido. En este trabajo hemos investigado cómo el estatus redox celular afecta a la agregación de proteínas. Hemos comprobado cómo la mutación por pérdida de función del gen *gsr-1* que codifica la única glutatión reductasa (GSR-1) del nematodo *C. elegans*, potencia los fenotipos relacionados con la agregación de proteínas en modelos de enfermedades neurodegenerativas humanas, así como en modelos de agregación de proteínas endógenas del nematodo. Además, la mutación *gsr-1* impide la translocación nuclear del factor de transcripción HLH-30/TFEB, inductor clave de la autofagia, provoca la acumulación e inactivación de la proteína p62/SQST-1::GFP necesaria para el transporte de los sustratos destinados a ser degradados al autofagosoma y, por tanto, altera el flujo autofágico. En su conjunto, estos datos sugieren que la glutatión reductasa podría estar jugando un papel clave en la eliminación de agregados proteicos mediante autofagia. De hecho, el bloqueo de la autofagia en animales *gsr-1* que expresan proteínas con tendencia a la agregación conlleva fuertes fenotipos deletéreos, lo que indica que la pérdida de homeostasis redox en estos animales incrementa el estrés proteotóxico debido a una mayor saturación de proteínas agregadas.

El estudio de la posible regulación redox de HLH-30 a través de la única cisteína que posee en su secuencia, demuestra que este residuo es fundamental para la oligomerización de este factor de transcripción, y que es necesario para una respuesta adecuada frente a la infección por patógenos y para el desarrollo larvario

de determinados mutantes. No obstante, éste único residuo de cisteína no es esencial para la translocación nuclear de HLH-30, ya que una variante endógena de HLH-30 con la cisteína mutada a un residuo de alanina sigue localizando en núcleo en condiciones de estrés.

Publicaciones

- Mora-Lorca JA, Sáenz-Narciso B, Gaffney CJ, Naranjo-Galindo FJ, Pedrajas JR, **Guerrero-Gómez D**, Dobrzynska A, Askjaer P, Szewczyk NJ, Cabello J, Miranda-Vizuet A (2016) Glutathione reductase *gsr-1* is an essential gene required for *Caenorhabditis elegans* early embryonic development. *Free Radic. Biol. Med.* 96: 446–461
- Parra-Millán R, **Guerrero-Gómez D**, Ayerbe-Algaba R, Pachón-Ibáñez ME, Miranda-Vizuet A, Pachón J & Smani Y (2018) Intracellular Trafficking and Persistence of *Acinetobacter baumannii* Requires Transcription Factor EB . *mSphere* 3: 1–14
- **Guerrero-Gómez D**, Mora-Lorca JA, Sáenz-Narciso B, Naranjo-Galindo FJ, Muñoz-Lobato F, Parrado-Fernández C, Goikolea J, Cedazo-Minguez Á, Link CD, Neri C, Sequedo MD, Vázquez-Manrique RP, Fernández-Suárez E, Goder V, Pané R, Cabisco E, Askjaer P, Cabello J, Miranda-Vizuet A (2019) Loss of glutathione redox homeostasis impairs proteostasis by inhibiting autophagy-dependent protein degradation. *Cell Death Differ.* 26: 1545–1565
- Martina JA*, **Guerrero-Gómez D***, Gómez-Orte E, Antonio Bárcena J, Cabello J, Miranda-Vizuet A & Puertollano R (2021) A conserved cysteine-based redox mechanism sustains TFEB/HLH-30 activity under persistent stress. *EMBO J.* 40:e105793

* *Igual contribución como primer autor.*

Capítulo I. Introducción

1.1. Proteostasis.

El proteoma se define como el conjunto de proteínas expresadas en un determinado tipo celular u organismo, el cual puede variar con el tiempo y el estado fisiológico. La homeostasis proteica o proteostasis es el proceso que regula la estabilidad del proteoma, asegurando la funcionalidad de las proteínas (Powers *et al*, 2009). Para mantener la proteostasis, las células han desarrollado un sofisticado sistema de control de calidad que asegura el correcto plegamiento de las proteínas y es capaz de actuar sobre aquellas que pierden su conformación nativa funcional, volviéndolas a plegar correctamente o degradándolas si fuera necesario. Este sistema de control está formado por chaperonas, factores de plegamiento (entre los que se incluyen enzimas implicadas en la oxidación e isomerización de enlaces peptídicos), componentes del tráfico y localización de las proteínas en los diferentes compartimentos celulares, así como mecanismos de degradación (Balchin *et al*, 2016).

A pesar de la multitud de factores que controlan la proteostasis, ésta tiene una capacidad limitada y se encuentra particularmente afectada ante estreses crónicos. El colapso de la proteostasis puede verse asociado a estreses ambientales, mutaciones o el envejecimiento, resultando en la acumulación de proteínas mal plegadas, las cuales pueden derivar en la formación de agregados de proteínas (Dubnikov *et al*, 2017). Tales agregados proteicos son tóxicos para las células y están asociados con la manifestación de una serie de enfermedades englobadas dentro de las llamadas proteínopatías, entre las que se incluyen no solo enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson o Huntington sino otras no asociadas al sistema nervioso como cataratas o la miositis por cuerpos de inclusión (Dimachkie & Barohn, 2013; Shiels & Hejtmancik, 2019). Aunque todas estas patologías están estrechamente relacionadas con la proteotoxicidad, las diferencias entre cada una de ellas depende del tipo de proteína que agrega (Paulson, 1999; Hoppe & Cohen, 2020).

1.2. Principales enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la pérdida de proteostasis.

Las enfermedades neurodegenerativas son patologías relacionadas con el envejecimiento que se caracterizan por una muerte neuronal incontrolada la cual

ocasiona una disminución de las funciones del cerebro. Estas enfermedades incurables están asociadas con un amplio espectro de síntomas clínicos, que incluyen disminución cognitiva y/o pérdida de funciones locomotoras (Heemels, 2016).

El número de personas afectados por estas patologías se encuentra en aumento debido a una población cada vez más envejecida. Esto lleva a que los efectos severos de estas enfermedades en la calidad de vida, incrementen la carga en el sistema sanitario mundial.

La limitada eficacia de los tratamientos de las enfermedades neurodegenerativas pone en evidencia la complejidad en cuanto a su etiología y patogenicidad, ya que, además del envejecimiento, múltiples factores de riesgo contribuyen a su susceptibilidad, incluyendo desencadenantes ambientales y factores genéticos (Cummings *et al*, 2014; Olanow *et al*, 2008; Schneider *et al*, 2014; Anderson *et al*, 2017).

1.2.1. Enfermedad de Alzheimer.

La enfermedad de Alzheimer es el desorden neurodegenerativo más común. Clínicamente se manifiesta con pérdida de memoria, disfunción cognitiva y alteración en el comportamiento y que afecta a amplias áreas de la corteza cerebral y del hipocampo. Las anomalías son normalmente detectadas primero en el tejido cerebral de los lóbulos frontal y temporal, progresando lentamente a otras áreas del neocortex en diferentes grados que varían entre individuos (Long & Holtzman, 2019; Dubois *et al*, 2019).

La enfermedad de Alzheimer está asociada con la acumulación de las formas insolubles de péptido β -amiloide ($A\beta$), el cual forma placas seniles en espacios extracelulares del cerebro, así como en las paredes de los vasos sanguíneos, y la agregación intracelular de la proteína hiperfosforilada de microtúbulos Tau, formando ovillos neurofibrilares en neuronas (Iqbal *et al*, 2010; Chen *et al*, 2017a).

El péptido $A\beta$ deriva del procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP). APP es una glicoproteína de membrana tipo 1 que juega un papel importante en un amplio rango de actividades biológicas, incluyendo el desarrollo neuronal,

señalización, transporte intracelular y otros aspectos de la homeostasis neuronal (Chen *et al*, 2017a). El procesamiento de APP puede realizarse a través de dos rutas proteolíticas, en las que intervienen dos proteasas de forma secuencial (Figura 1.1). Mediante una ruta no amiloidogénica, APP es cortada por la proteasa α -secretasa para liberar un fragmento soluble N-terminal al espacio extracelular (sAPP α). Posteriormente, el fragmento C-terminal de APP (CTF α) que permanece en la membrana es cortado por la γ -secretasa para liberar un pequeño fragmento al espacio extracelular (P3) y el dominio intracelular C-terminal del APP (AICD). Por el contrario, en una ruta amiloidogénica, en el procesamiento del fragmento de APP intervienen las proteasas β -secretasa y γ -secretasa (Nunan & Small, 2000). En primer lugar, la β -secretasa corta APP generando un fragmento N-terminal soluble (sAPP β) y otro C-terminal que permanece unido a la membrana (CTF β). A continuación, la γ -secretasa procesa el fragmento C-terminal liberando al interior celular el dominio AICD y generando dos formas extracelulares de A β , el péptido A β de 40 aminoácidos (A β ₄₀) y el péptido A β de 42 aminoácidos (A β ₄₂) (Olsson *et al*, 2014). Estas dos formas presentan una diferencia importante, ya que, mientras que A β ₄₀ es soluble, la forma A β ₄₂ es hidrofóbica. Análisis de las placas seniles de cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer han demostrado que están compuestas principalmente por la forma A β ₄₂ (Saïdo *et al*, 1995).

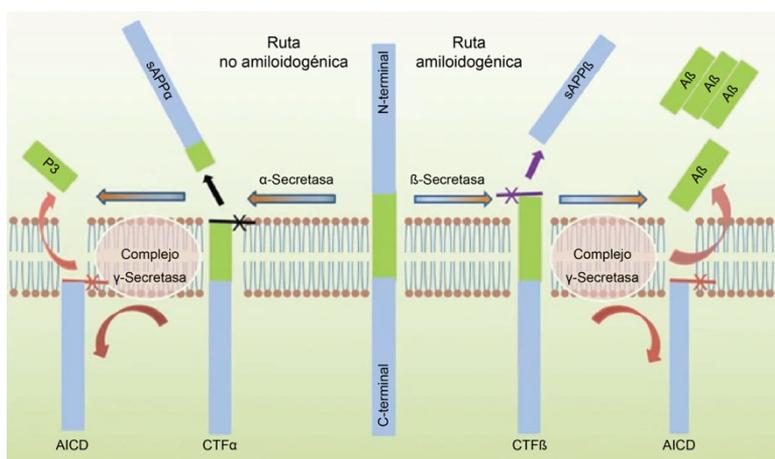


Figura 1.1. Ruta proteolítica de APP. Esquema de las dos vías de procesamiento de APP. Abreviaturas: AICD, dominio C-terminal de APP; CTF, fragmento C-terminal; sAPP, fragmento N-terminal. Modificado de Chen *et al*. 2017.

La segunda proteína asociada a la enfermedad de Alzheimer es Tau, una proteína asociada a microtúbulos, expresada principalmente en los axones de las neuronas, y

que actúa en la estabilización de los microtúbulos, siendo fundamental para el mantenimiento de la estructura neuronal y la migración de vesículas de señalización (Roy *et al*, 2005). La actividad de Tau está controlada por su estado de fosforilación, el cual se modula mediante dos quinasas (la quinasa dependiente de ciclina 5 y la quinasa glicógeno sintetasa 3 β) y dos fosfatasa (las fosfatasa 2A y 2B). En la enfermedad de Alzheimer, esta regulación de la fosforilación es defectiva, resultando en la aparición de Tau hiperfosforilada la cual pierde su plegamiento, llegando a formar agregados intracelulares (Kondo *et al*, 1988).

Existen dos tipos de la enfermedad de Alzheimer según su origen: la familiar o la esporádica. La forma familiar está determinada genéticamente, y ocurre por la mutación en tres genes: el gen *APP*, que codifica para la proteína precursora amiloide, en el cromosoma 21 (Kang *et al*, 1987), y los genes *PSEN1* en el cromosoma 14 (Sherrington *et al*, 1995) y *PSNE2* en el cromosoma 1 (Levy-Lahad *et al*, 1995), que codifican para las presenilinas 1 y 2, implicadas en el procesamiento de APP, ya que constituyen la subunidad catalítica de la γ -secretasa, y cuyas mutaciones incrementan la producción del péptido A β ₄₂ (Passer *et al*, 1999; Naruse *et al*, 1998; Duff *et al*, 1996). Aunque las mutaciones en estos genes llevan a una aparición temprana de la enfermedad y son principalmente autosómicos dominantes, sólo representan el 5-10% de los casos. Por otro lado, se considera que la forma esporádica de la enfermedad de Alzheimer es multifactorial, aunque con una importante predisposición genética. Varios estudios confirman que el alelo ϵ 4 del gen *APOE*, que codifica la proteína plasmática Apolipoproteína E y participa en la redistribución de colesterol y otros lípidos entre células, es el mayor factor de riesgo genético para la predisposición a la enfermedad de Alzheimer (Artiga *et al*, 1998; Saunders *et al*, 1993). Además, existen evidencias de que la obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y la inflamación sistémica, contribuyen al riesgo de padecer la enfermedad de forma esporádica y reducen la edad de aparición de los primeros síntomas (Stewart, 1998; Hildreth *et al*, 2012).

1.2.2. Enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson es la segunda patología neurodegenerativa en orden de incidencia, que afecta aproximadamente al 2-3% de la población mayor de 65 años. Clínicamente se caracteriza por pérdida del equilibrio, bradiquinesia, rigidez y

la presencia de temblores. A medida que la enfermedad progresa, los pacientes experimentan un incremento de disfunciones motoras y también pueden desarrollar otros síntomas como defectos cognitivos y demencia (Lees *et al*, 2009; Poewe *et al*, 2017). A nivel macroscópico, el cerebro de pacientes de Parkinson presenta una progresiva degeneración de neuronas dopaminérgicas principalmente en la sustancia negra, aunque otras regiones pueden estar afectadas. A nivel celular, la enfermedad se caracteriza por agregación intracelular de la proteína pre-sináptica α -sinucleína formando los denominados cuerpos de Lewy (Poewe *et al*, 2017).

Tradicionalmente se consideró que la enfermedad de Parkinson era un desorden enteramente idiopático. Sin embargo, entre un 15-20% de los casos poseen un componente hereditario (Cooper & Van Raamsdonk, 2018; Nuytemans *et al*, 2010). Mutaciones en los genes *PARK1/SNCA* (que codifica para la proteína α -sinucleína) y *LRRK2* (Leucine-Rich Repeat Kinase 2, proteína multidominio conocida como dardarina o PARK8) son responsables de las formas autosómicas dominantes de la enfermedad (Polymeropoulos *et al*, 1997; Cookson, 2010), mientras que las mutaciones en los genes *PARK2*, *PINK1*, *DJ-1* y *ATP13A2* lo son de las formas autosómicas recesivas (Nuytemans *et al*, 2010; Ramirez *et al*, 2006). El estudio de estas mutaciones ha permitido comprender los procesos moleculares que se encuentran afectados en la enfermedad de Parkinson. De esta forma, se sabe que la mutación en el gen *PARK1/SNCA* lleva a la aceleración de la formación de filamentos de α -sinucleína, indicando que este proceso puede ser un paso temprano de la enfermedad (Conway *et al*, 2000). *LRRK2* es una quinasa cuya actividad enzimática tiene un papel en la función mitocondrial y la autofagia (Lewis & Manzoni, 2012); *PARK2* es una E3 ubiquitin quinasa que participa en la degradación de proteínas vía proteasoma (Shimura *et al*, 2000); *PINK1* posee diversas funciones relacionadas con la biología de las mitocondrias (Clark *et al*, 2006); *DJ-1* es un potente antioxidante que trasloca a la membrana mitocondrial y se considera que juega un papel neuroprotector (Canet-Avilés *et al*, 2004), y la ATPasa lisosomal *ATP13A2* parece estar relacionada con la homeostasis de cationes intracelulares y la protección frente a neurodegeneración (Ramirez *et al*, 2006).

1.2.3. Enfermedades de poliglutaminas.

Las enfermedades de poliglutaminas son una familia de nueve enfermedades genéticas neurodegenerativas que incluyen la atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA), atrofia dentatorubro-pálidoluisiana (DRPLA), la enfermedad de Huntington y las ataxias espinocerebelosas (SCA) tipo 1, 2, 3, 6, 7 y 17 (Lieberman *et al*, 2019; Todd & Lim, 2013). Estas enfermedades son causadas por repeticiones del triplete CAG, que codifica para glutamina (Q), en la región codificante de un determinado gen (Malik *et al*, 2021). Estas repeticiones dan lugar a proteínas con una extensión de glutaminas (poliQ), convirtiéndolas en proteínas tóxicas mediante un mecanismo de ganancia de función con capacidad de formar agregados (Orr & Zoghbi, 2007). Aunque la proteína elongada con residuos de glutamina en cada una de las enfermedades es diferente y se ven afectadas distintas áreas del cerebro, todas estas patologías comparten algunas similitudes, incluyendo la progresiva neurodegeneración y la presencia de agregados proteicos insolubles. Con respecto a la herencia, a excepción de la SBMA, la cual se encuentra ligada al cromosoma X, el resto de enfermedades de poliglutaminas son autosómicas dominantes (Weber *et al*, 2014; Todd & Lim, 2013; Orr & Zoghbi, 2007).

Para cada una de estas enfermedades existe un umbral de repeticiones de glutamina crítico, el cual debe ser sobrepasado para que se desarrolle de la enfermedad (Tabla 1). Además, la edad con la que aparece la enfermedad y la severidad de sus síntomas correlaciona con la longitud de las repeticiones de poliQ. Ejemplo de ello se muestra en la enfermedad de Huntington, causada por la elongación patológica con repeticiones de glutamina en la proteína Huntingtina (Htt) que, entre otras funciones, sirve de andamiaje interaccionando con microtúbulos, participa en rutas de señalización neuronales y es esencial para el desarrollo embrionario y del sistema nervioso central (MacDonald, 2003; Jimenez-Sanchez *et al*, 2017; Liu & Zeitlin, 2017). Repeticiones de poliQ menores de 35 residuos en la proteína Htt no se asocian con la enfermedad, repeticiones de 36 a 39 glutaminas pueden inducir la patología y se consideran el umbral para dicha enfermedad, mientras que repeticiones de 40 a 60 causan Huntington en adultos y Htt con más de 60 glutaminas provocan la enfermedad de Huntington en personas jóvenes (Penney Jr *et al*, 1997; Snell *et al*, 1993).

Tabla 1.1. Enfermedades por expansión de poliglutaminas. Abreviaturas: SBMA, atrofia muscular espinal y bulbar; HD, enfermedad de Huntington; DRPLA, atrofia dentatorubro-pálidoluisiana; SCA, ataxia espinocerebelosa. Modificado de Lieberman *et al*, 2019.

Enfermedad	Locus; gen	Proteína	Expansión normal de Q	Expansión patológica de poliQ
SBMA	Xq11-q12; <i>AR</i>	Receptor de andrógeno	6–36	38–≤70
HD	4p16.3; <i>HTT</i>	Huntingtina	6–35	36–121
DRPLA	12p13; <i>ATN1</i>	Atrofina-1	3–38	49–88
SCA1	6p23; <i>ATXN1</i>	Ataxina-1	6–34	39–88
SCA2	12q24; <i>ATXN2</i>	Ataxina-2	14–31	32–77
SCA3	14q24-q31; <i>ATXN3</i>	Ataxina-3	12–40	55–86
SCA6	19p13; <i>CACNA1A</i>	Cav2.1	4–18	21–33
SCA7	3p21-p12; <i>ATXN7</i>	Ataxina-7	7–18	38–200
SCA17	6p27; <i>TBP</i>	Proteína de unión a TATA	25–43	45–63

1.3. Procesos moduladores de la neurodegeneración.

Como se ha descrito anteriormente, la pérdida de proteostasis que lleva a la formación de agregados proteicos es uno de los principales procesos característicos del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Relacionado con la agregación de proteínas se encuentra el desbalance de la homeostasis redox, ya que el aumento del estrés oxidativo lleva a que las proteínas puedan sufrir modificaciones oxidativas irreversibles que hacen que pierdan su conformación, llegando a convertirse en sustratos de agregación. Además, la acumulación de proteínas oxidadas también contribuye a elevar el estrés oxidativo, estableciéndose de este modo una retroalimentación entre la agregación de proteínas y el estrés oxidativo (Lefaki *et al*, 2017; Jellinger, 2010).

Otro de los marcadores relacionados con las enfermedades neurodegenerativas es la disfunción mitocondrial, íntimamente relacionada con los dos anteriores. Existen estudios que muestran que los agregados proteicos afectan directamente a la integridad de la mitocondria y que mutaciones relacionadas con enfermedades neurodegenerativas afectan la actividad normal de la mitocondria (Huang *et al*, 2019).

Además, las enfermedades neurodegenerativas comparten otros procesos asociados con la progresiva disfunción y muerte neuronal, como deficiencias en los sistemas de degradación (proteasoma y autofagia), inducción de muerte celular programada (apoptosis), neuroinflamación debida a una respuesta inmune alterada o defectos en la vascularización cerebral (Gan *et al*, 2018; Sweeney *et al*, 2018; Jellinger, 2010).

1.3.1. Agregación de proteínas.

Las proteínas son sintetizadas por los ribosomas en una cadena polipeptídica lineal que debe ser plegada en una estructura tridimensional para adquirir su conformación funcional. El plegamiento ocurre principalmente de forma espontánea debido a que las partes no polares de la cadena polipeptídica se ocultan del medio acuoso en el que se encuentran, pero también es llevado a cabo por diferentes moléculas que asisten a las proteínas para alcanzar su estructura biológica funcional. La estabilidad del plegamiento de las proteínas depende de factores locales como el pH, la homeostasis redox o la temperatura, pero también se ve afectado por fallos acumulativos en las proteínas debidos a mutaciones o polimorfismos. La pérdida del plegamiento convierte a las proteínas en estructuras débilmente estables con la capacidad de formar agregados, debido principalmente a interacciones entre regiones hidrofóbicas que quedan expuestas entre las proteínas mal plegadas (Chiti *et al*, 2003; Bouziane & Chouarfia, 2020).

Aunque la mayoría de los agregados son amorfos, existen ciertos tipos de agregados mucho más estructurados, como los agregados de oligómeros o las fibrillas amiloides derivadas de éstos. Los amiloides se forman a partir de polipéptidos mal plegados que se congregan formando oligómeros amiloidogénicos con estructura de hoja plegada β en un proceso llamado nucleación primaria (Figura 1.2). Posteriormente, varios oligómeros se unen de forma antiparalela mediante puentes de hidrógeno hasta formar fibrillas amiloides maduras, termodinámicamente estables. Estos agregados amiloides son estructuras que han sido relacionadas con el desarrollo de diferentes proteinopatías, como las cataratas, diabetes tipo II y las enfermedades neurodegenerativas (Chuang *et al*, 2018; Ross & Poirier, 2004).

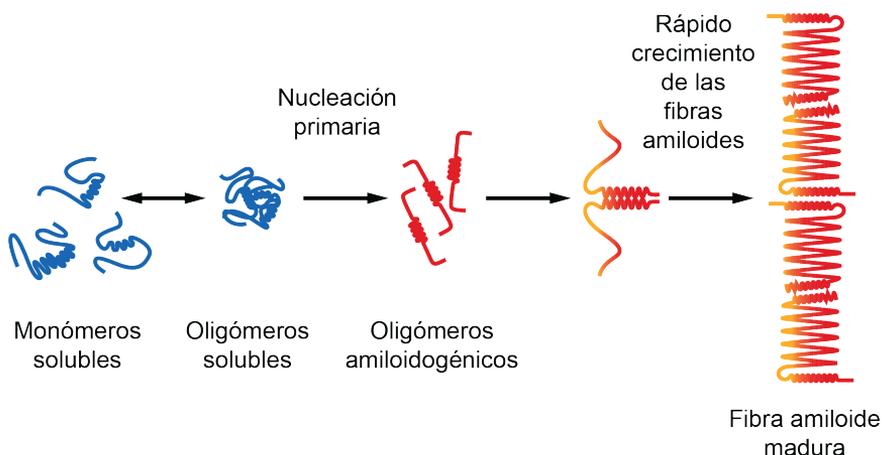


Figura 1.2. Ruta de formación de fibras amiloides. Modificado de Chuang *et al.* 2018.

Como se mostró en apartados anteriores, la agregación de determinados tipos de proteínas es una de características en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Esto se ve reflejado en que la enfermedad de Alzheimer se asocia con la formación de placas seniles por la acumulación extracelular del péptido $A\beta$ y la aparición de ovillos neurofibrilares por la agregación intracelular de la proteína Tau; los pacientes de Parkinson presentan agregados de la proteína α -sinucleína, dando lugar a la aparición de cuerpos de Lewy; y las enfermedades de poliglutaminas son debidas a proteínas elongadas con repeticiones del aminoácido glutamina que les confiere la capacidad de formar agregados. Todas estas proteínas características de cada una de las enfermedades comparten la tendencia a formar fibrillas amiloides (Ross & Poirier, 2004).

Existen numerosos estudios sobre factores que pueden influir en el proceso de agregación relacionado con la neurodegeneración. Entre estos factores se encuentran mutaciones que afectan a su estructura primaria de las proteínas, como en el caso de las enfermedades de poliglutaminas, donde existe una clara correlación entre la expansión en el número de repeticiones de glutaminas y la tendencia a la agregación de la proteína elongada. Otros estudios ven probable que la agregación pueda estar potenciada por el incremento de la concentración de proteínas propensas a la agregación, como resultado de alteraciones genéticas que aumentan su síntesis. Ejemplo de ello es que la enfermedad de Parkinson de origen familiar puede ser causada por la triplicación del locus *PARK1/SNCA*, aumentando la expresión de la

proteína α -sinucleína (Singleton *et al*, 2003), o el hecho de que individuos con síndrome de Down, los cuales llevan una copia extra del locus *APP* en el cromosoma 21, presenten una deposición más temprana de placas de $A\beta$ (Wisniewski *et al*, 1985). Además, se han localizado polimorfismos en promotores de los genes asociados a enfermedades neurodegenerativas que incrementarían la transcripción y, por tanto, la cantidad de las proteínas asociadas a estas patologías, aumentando el riesgo de su desarrollo (Singleton *et al*, 2004).

1.3.2. Disfunción mitocondrial.

Las mitocondrias son los principales orgánulos productores de energía en forma de ATP de la célula, mediante la fosforilación oxidativa. Sin embargo, como consecuencia de su alto metabolismo oxidativo, en particular debido a la actividad de los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones, las mitocondrias son también la mayor fuente de especies reactivas del oxígeno (EROs), cuyo exceso puede dar lugar a la aparición de estrés oxidativo (Murphy, 2009). Dentro de la mitocondria, las EROs pueden afectar a la producción de energía debido a que pueden alterar el ADN mitocondrial, el cual codifica proteínas esenciales para la cadena transportadora de electrones (Islam, 2017).

Las neuronas son células con un alto metabolismo, consumiendo gran parte del ATP producido por las mitocondrias. Esta alta dependencia de la actividad mitocondrial es, en gran parte, la responsable de la relación entre la disfunción mitocondrial y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Multitud de estudios han demostrado que las enfermedades neurodegenerativas manifiestan eventos patológicos comunes relacionados con las mitocondrias, entre los que se incluyen disfunción mitocondrial, la aparición de estrés oxidativo y la muerte celular por apoptosis. De hecho, existen mutaciones características de ciertas enfermedades neurodegenerativas que han sido directamente relacionadas con la alteración de la función mitocondrial (Lin & Beal, 2006; Islam, 2017).

En la enfermedad de Alzheimer, se ha observado que existe neurotoxicidad asociada a daño mitocondrial como consecuencia de la acumulación del péptido $A\beta$. En esta enfermedad, la proteína APP (precursor de proteína amiloide) puede ser translocada y acumulada en la membrana de la mitocondria (Anandatheerthavarada *et al*, 2003)

donde, al ser procesada da lugar al péptido A β , el cual interacciona con proteínas mitocondriales causando disrupción en el potencial de membrana y promoviendo la apoptosis vía liberación del citocromo c, un componente esencial de la cadena respiratoria cuya liberación al citosol desencadena la apoptosis (Lustbader *et al*, 2004). Además, se ha observado que el péptido A β puede causar fragmentación mitocondrial (Wang *et al*, 2008). Esto es debido a que interfiere en la fusión mitocondrial, proceso que se da entre dos o más mitocondrias para intentar reducir el estrés mitocondrial inducido por proteínas dañadas o estrés oxidativo. Por otro lado, la acumulación de A β causa una excesiva generación de EROS debido a su interacción con metales como el cobre, hierro y zinc (Deibel *et al*, 1996), lo que exagera la disfunción mitocondrial y el desbalance redox en las neuronas, provocando daño neuronal.

La proteína α -sinucleína, asociada con la enfermedad de Parkinson, juega un papel importante en neuronas dopaminérgicas, ya que participa en la síntesis, regulación, almacenamiento y liberación de dopamina (Burré, 2015). La α -sinucleína puede ser importada dentro de las mitocondrias y quedar unida a la membrana mitocondrial interna de las neuronas dopaminérgicas, donde su acumulación provoca disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y neuropatologías derivadas de la inhibición del complejo I (Devi *et al*, 2008). Mutaciones relacionadas con la enfermedad de Parkinson también afectan a la integridad de la mitocondria. Ejemplo de ello son las mutaciones en los genes que codifican para las proteínas PINK1 y DJ1. PINK1 se acumula selectivamente en mitocondrias disfuncionales, suprimiendo la toxicidad que provoca la proteína α -sinucleína, a través de la inducción de la autofagia y, por tanto la deficiencia de PINK1 exagera la neurotoxicidad que causan estos agregados de α -sinucleína (Oliveras-Salvá *et al*, 2014). Por su parte, la proteína DJ1 actúa como un antioxidante mitocondrial (Andres-Mateos *et al*, 2007; Guzman *et al*, 2010). Esta proteína posee un residuo de cisteína crítico (C106) que es oxidado en condiciones de estrés oxidativo, haciendo que DJ1 sea translocada al interior mitocondrial donde ejerce su efecto neuroprotector (Canet-Avilés *et al*, 2004).

En pacientes de la enfermedad de Huntington, patología debida a la expansión de tripletes que codifican el aminoácido glutamina en la proteína Huntingtina (Htt), también se ha descrito disfunción mitocondrial. Así, esta enfermedad ha sido

asociada con un descenso en la síntesis de ATP y una menor actividad de los complejos II y III de la cadena respiratoria de electrones (Milakovic & Johnson, 2005). También, la expansión de la proteína Htt contribuye a la fragmentación mitocondrial mediante la desregulación de proteínas que intervienen en el proceso de fusión mitocondrial (Costa *et al*, 2010). Por otro lado, la proteína mutante Htt puede afectar negativamente a procesos de control de la proteostasis como la autofagia y mitofagia (Ochaba *et al*, 2014; Khalil *et al*, 2015).

1.3.3. Estrés oxidativo.

Otro de los marcadores comunes en las enfermedades neurodegenerativas es un alto incremento del estrés oxidativo, el cual puede aparecer debido a factores como el envejecimiento o situaciones patológicas. El cerebro es el órgano metabólicamente más activo del cuerpo y es vulnerable al estrés oxidativo debido a varias razones: posee una alta demanda de oxígeno, consumiendo el 20% del total del oxígeno del cuerpo; metales como el hierro y el cobre se encuentran en altas concentraciones, los cuales contribuyen activamente a la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs); además, las membranas celulares de las células del cerebro son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son sustratos de peroxidación lipídica (Wang & Michaelis, 2010).

La aparición de estrés oxidativo es debida a la pérdida de homeostasis redox, como consecuencia de la excesiva producción de EROs, que superan la capacidad antioxidante de la célula. Los EROs fisiológicamente más relevantes son el radical hidroxilo (OH), el anión superóxido (O_2^-) y, sobre todo, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura 1.3). Los principales productores de EROs son las mitocondrias, a través de la cadena transportadora de electrones (Murphy, 2009), el retículo endoplasmático (RE), mediante el plegamiento oxidativo de las proteínas (Tu & Weissman, 2004), y los peroxisomas, debido a la oxidación de los ácidos grasos (Antonenkov *et al*, 2010). Los EROs son sustancias muy reactivas que tienen la capacidad de reaccionar con diferentes macromoléculas presentes en las células, de modo que pueden causar daño estructural en el ADN, alterar la conformación de las proteínas, o provocar daños en la membrana celular debido a la peroxidación lipídica. Estas modificaciones oxidativas de las macromoléculas pueden iniciar eventos que finalmente desembocan en daño neuronal (Sbodio *et al*, 2019).

Las proteínas constituyen las macromoléculas más susceptibles al daño oxidativo, debido a su elevada concentración celular, así como su alta capacidad de reaccionar con EROs. El H_2O_2 ha sido ampliamente reconocido como un segundo mensajero que modula rutas de señalización a través de modificaciones oxidativas postraduccionales reversibles en las proteínas (Holmström & Finkel, 2014). Son varios los residuos de aminoácidos que pueden sufrir modificaciones oxidativas, pero son las cisteínas, debido a su grupo tiol (-SH), los aminoácidos más sensibles al estado redox de la célula. Entre las modificaciones reversibles de residuos de cisteína se encuentran los puentes disulfuro, que pueden darse de forma intermolecular e intramolecular, dando lugar a cambios de conformación necesarios para la regulación de la función de las proteínas (Tu & Weissman, 2004). Sin embargo, altos niveles de H_2O_2 pueden causar modificaciones irreversibles en el estado de oxidación de las cisteínas (ácido sulfínico, SO_2H y ácido sulfónico, SO_3H), haciendo que las proteínas afectadas pierdan su plegamiento y sufran procesos de dimerización, oligomerización e incluso agregación (Holmström & Finkel, 2014; Wani *et al*, 2014; Pérez *et al*, 2009).

Numerosas condiciones patológicas, o el deterioro normal de la homeostasis celular debido al envejecimiento, llevan a la pérdida del balance entre la producción y degradación de EROs. Para contrarrestar la excesiva acumulación de EROs y prevenir la aparición de estrés oxidativo, las células poseen diferentes sistemas antioxidantes. Cada antioxidante posee una función distinta, así, algunos son responsables de la detoxificación del anión superóxido, otros actúan exclusivamente sobre el H_2O_2 y otros ejercen su función antioxidante sobre macromoléculas como las proteínas (Figura 1.3).

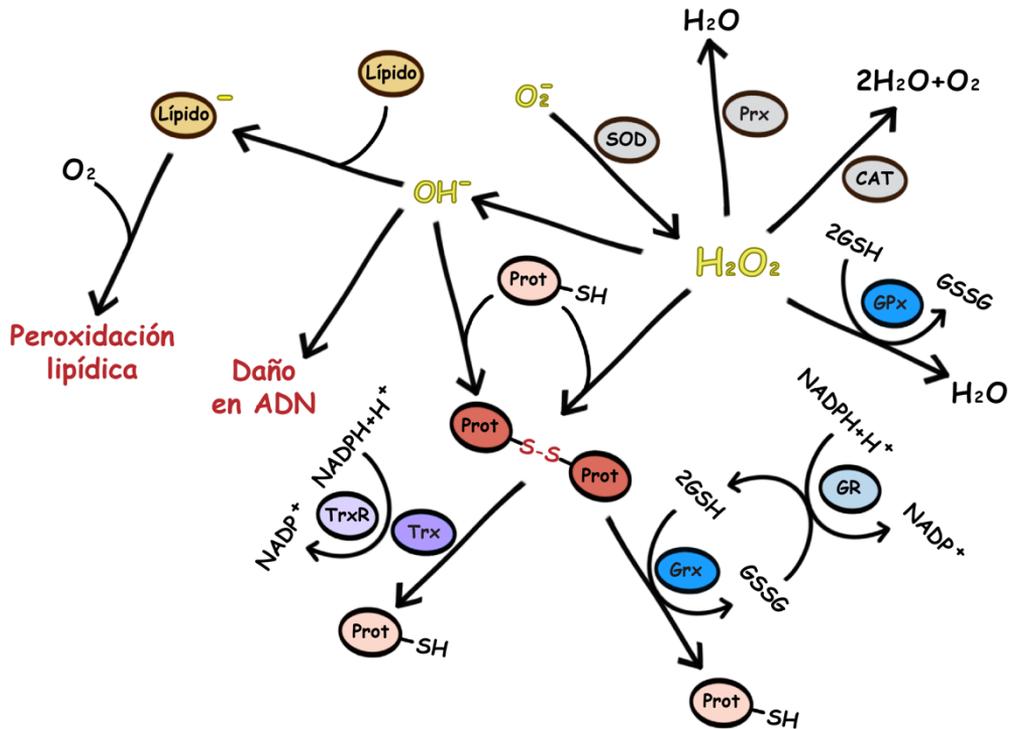


Figura 1.3. Daño y protección frente a especies reactivas de oxígeno. Abreviaturas: SOD, superóxido dismutasa; Prx, peroxirredoxina; CAT, catalasa; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; Grx, glutarredoxina; Prot, proteína; TrxR, tiorredoxina reductasa; Trx, tiorredoxina. Basado en Kupsco & Schlenk, 2015.

1.3.3.1. Antioxidantes.

Un antioxidante es una sustancia que reduce o previene la oxidación de un sustrato oxidable. Los organismos han desarrollado complejos sistemas antioxidantes que pueden ser tanto enzimáticos como no enzimáticos, los cuales trabajan de forma conjunta para proteger al organismo frente al daño oxidativo.

1.3.3.1.1. Antioxidantes no enzimáticos.

1.3.3.1.1.1. Vitaminas E y C.

Pequeñas moléculas como las vitaminas E y C forman una potente defensa antioxidante frente a altos niveles de EROs. La vitamina E es soluble en lípidos y tiene la capacidad de reaccionar más rápidamente con los radicales peróxidos de los ácidos grasos poliinsaturados, rompiendo la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. Esto hace que la vitamina E tenga una función antioxidante esencial en membranas celulares y lipoproteínas (Singh *et al*, 2005).

Por su parte, la vitamina C o ácido ascórbico, actúa como potente antioxidante en ambientes acuosos, jugando un papel importante en la protección de los grupos tiol de las proteínas frente a la oxidación. La vitamina C puede actuar como cofactor de antioxidantes enzimáticos, pero también es un agente reductor por sí sólo con capacidad de detoxificar EROs como el peróxido de hidrógeno (Kojo, 2005).

1.3.3.1.1.2. Glutación (GSH).

El glutatión es sin duda el antioxidante no enzimático más importante debido a su multifuncionalidad y abundancia. Se trata de tripéptido sintetizado a partir de glutamato, cisteína y glicina por la acción consecutiva de dos enzimas dependientes de ATP. La primera enzima, γ -glutamilcisteína sintetasa (GCS) forma un inusual enlace peptídico entre el grupo γ -carboxil del glutamato y el grupo amino de la cisteína formando γ -glutamilcisteína. En el segundo paso, la enzima glutatión sintetasa (GS) cataliza la adición de glicina a la γ -glutamilcisteína formada en el paso anterior. Una vez sintetizado en el citoplasma, es distribuido al interior de orgánulos tales como la mitocondria, el núcleo o el retículo endoplasmático (Lu, 2013; Forman *et al*, 2009).

El glutatión puede existir como dos formas, una forma tiol-reducida (GSH) y otra disulfuro-oxidada (GSSG, compuesta por dos moléculas de GSH unidas por puente disulfuro), siendo la forma reducida la más predominante bajo condiciones fisiológicas, suponiendo alrededor del 98% del glutatión total presente en la célula. El GSSG es formado cuando el GSH actúa como reductor biológico, y debe ser reciclado por la enzima glutatión reductasa (GSR), la cual cataliza la reducción del GSSG a expensas del poder reductor del NADPH (Forman *et al*, 2009; Ballatori *et al*, 2009).

El GSH se encuentra predominantemente en su forma reducida, en una ratio GSH/GSSG de aproximadamente 100/1, excepto en el retículo endoplasmático, donde existe un ambiente más oxidante en comparación con el ambiente reductor del citoplasma, con una ratio GSH/GSSG en torno a 2/1 (Hwang *et al*, 1992). Este ambiente oxidante del retículo endoplasmático es fundamental para el correcto plegamiento y la ruta secretora de las proteínas que tiene lugar en su interior (Hwang *et al*, 1992).

La capacidad antioxidante del GSH viene dada por el grupo tiol de la cisteína, el cual tiene capacidad de donar un electrón. El GSH puede reaccionar directamente con O_2^- y OH para su eliminación, ser conjugado con compuestos xenobióticos por la acción de las enzimas glutatión transferasas para su detoxificación, actuar como cofactor de varias enzimas antioxidantes, así como regenerar las vitaminas C y E a sus formas activas (Aquilano *et al*, 2014; Singh *et al*, 2019; Townsend *et al*, 2003).

Aparte de su importante papel como molécula antioxidante, el GSH participa en la regulación de la señalización redox, ya que puede unirse de forma reversible al grupo tiol de las cisteínas de las proteínas (Prot-SH), mediante un proceso llamado glutationilación, generando proteínas glutationiladas (Prot-SSG). Las glutarredoxinas son las enzimas responsables de llevar a cabo este proceso reversible, ya que catalizan tanto la formación como la reducción del enlace disulfuro entre los grupos tiol de las proteínas y el GSH. La glutationilación supone un importante mecanismo de regulación de la actividad de las proteínas, ya que tiene la capacidad de activar o inactivar a las proteínas, además de proteger de una oxidación irreversible a proteínas con residuos de cisteína sensibles a regulación redox (Xiong *et al*, 2011).

1.3.3.1.2. Antioxidantes enzimáticos.

1.3.3.1.2.1. Superóxido dismutasa.

La superóxido dismutasa (SOD) es una de las más potentes enzimas antioxidantes celulares. Esta enzima está constituida por dos subunidades, cada una de las cuales posee un sitio activo con un ion metálico unido (cobre, zinc o manganeso) que permite la conversión de los aniones superóxido a H_2O_2 . Así, a través de sucesivos ciclos de oxidación y reducción de los iones metálicos del sitio activo, la SOD es capaz de neutralizar los aniones superóxido. La SOD existe en varias isoformas, las cuales difieren en la naturaleza del metal del sitio activo y su localización subcelular. En humanos existen tres formas: la citosólica Cu/Zn-SOD (SOD1), la mitocondrial Mn-SOD (SOD2) y la forma extracelular Cu/Zn-SOD (SOD3) (Sheng *et al*, 2014; Sirangelo & Iannuzzi, 2017).

1.3.3.1.2.2. Catalasas.

Las catalasas son las enzimas responsables de la conversión del H_2O_2 en agua y oxígeno, utilizando como cofactor hierro o manganeso en una reacción de dos pasos.

En un primer paso, la reacción con el H_2O_2 da lugar a un intermediario enzimático oxidado y la liberación de una molécula de agua. En el segundo paso, el intermediario es reducido mediante la donación de dos electrones por parte de una segunda molécula de H_2O_2 , regenerándose la enzima libre, agua y oxígeno. Las catalasas se localizan principalmente en el interior de los peroxisomas, pero también se encuentran en el citoplasma y las mitocondrias (Nandi *et al*, 2019).

1.3.3.1.2.3. Tiorredoxinas.

Otro de los sistemas antioxidantes más importantes de la célula son las tiorredoxinas (Trx), proteínas con actividad oxidorreductasa que están conservadas evolutivamente desde procariontas hasta mamíferos. Poseen una estructura terciaria característica que consiste, en la forma más básica, en tres α -hélices que rodean a un núcleo central con cuatro hebras de hoja plegada β . Los organismos superiores pueden poseer una α -hélice o una hoja plegada β adicional (Figura 1.4) (Collet & Messens, 2010; Lillig & Holmgren, 2007). El grupo de proteínas que comparten este tipo de plegamiento se engloban en la llamada “familia con plegamiento tiorredoxina”, cuyos principales componentes son las tiorredoxinas, glutarredoxinas y las proteínas disulfuro isomerasa, todas ellas involucradas en reacciones de intercambio tiol-disulfuro. Miembros de esta familia son también la glutatión peroxidasa y las peroxirredoxinas, cuya principal función es la detoxificación de H_2O_2 (Hanschmann *et al*, 2013).

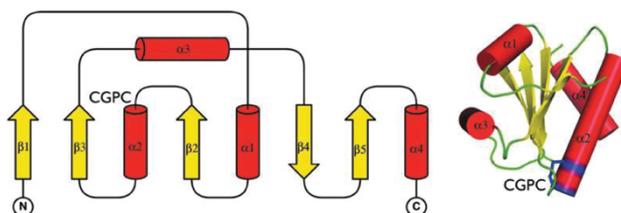


Figura 1.4. Plegamiento tiorredoxina. Representación de las estructuras secundarias y tridimensional de Trx. La estructura consiste en 4 hélices α (rojo) y 5 hojas plegadas β (amarillo). El sitio conservado CXXC se localiza cerca del extremo N terminal de la hélice α_2 . Modificado de Collet & Messens, 2010.

Las tiorredoxinas poseen un sitio activo conservado con dos cisteínas (Cys-Gly-Pro-Cys), cuyos grupos tiol (SH) son esenciales para la reducción de puentes disulfuro (S-S) de las proteínas en un proceso de dos pasos. Primero, la cisteína en posición N-terminal inicia un ataque nucleofílico al enlace disulfuro de la proteína sustrato, formándose un intermediario entre la tiorredoxina y la proteína. Posteriormente, la

cisteína en posición C-terminal de la tiorredoxina reduce el enlace intermedio formado anteriormente dando como resultado la formación de un enlace disulfuro en la tiorredoxina, la cual queda oxidada, y la rotura del puente disulfuro de la proteína sustrato, la cual queda reducida. La tiorredoxina es entonces reducida por la tiorredoxina reductasa (TrxR), la cual utiliza NADPH como donador de electrones (Figura 1.5) (Collet & Messens, 2010; Lillig & Holmgren, 2007).

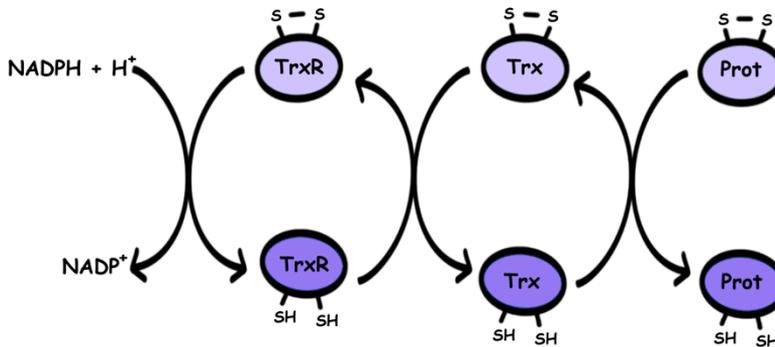


Figura 1.5. Sistema tiorredoxina. Representación esquemática del flujo de electrones en el sistema tiorredoxina. Las tiorredoxinas (Trx) reducen proteínas oxidadas con electrones procedentes del NADPH vía tiorredoxina reductasa (TrxR).

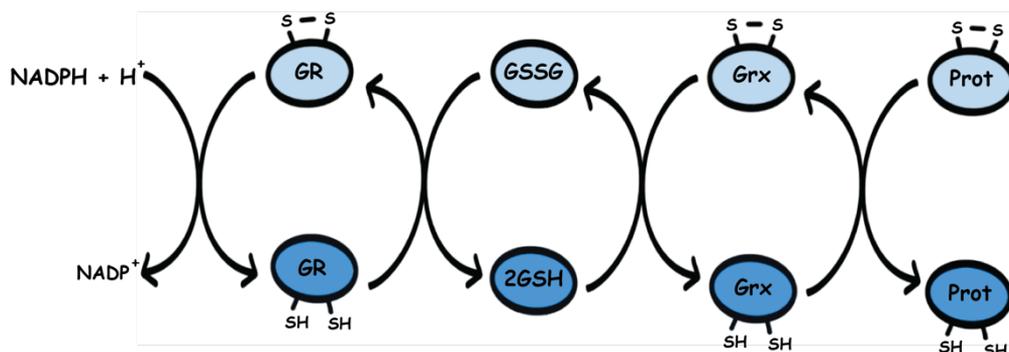
Las tiorredoxina reductasas son oxidoreductasas necesarias para la reducción del disulfuro en el sitio activo de las tiorredoxinas, siendo por tanto responsable del mantenimiento del pool de tiorredoxina reducida activa. Las tiorredoxinas reductasas son flavoenzimas homodiméricas con una conformación antiparalela, donde cada subunidad contiene un dominio de unión al FAD y otro al NADPH, además de dos sitios activos redox (en mamíferos, Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys en el extremo N-terminal y Gly-Cys-SeCys-Gly en el extremo C-terminal). El hecho de la presencia de selenocisteína en uno de los sitios activos permite identificar a las tiorredoxina reductasas como selenoproteínas. Las selenocisteínas son residuos análogos a la cisteína que poseen un grupo selenol (SeH) en lugar del grupo tiol de la cisteína y que confieren a las selenoproteínas una alta reactividad y propiedades redox únicas debido a las características químicas inherentes al átomo de selenio (Johansson *et al*, 2005). Además de ser las responsables del reciclaje de tiorredoxinas oxidadas, otros sustratos de las tiorredoxinas reductasas incluyen la glutarredoxina 2 (Grx2), proteína disulfuro isomerasa A y otros sustratos no proteicos como el selenito, ubiquinona o el citocromo c (Arnér, 2009).

En conjunto, las tiorredoxinas y las tiorredoxinas reductasas componen el sistema tiorredoxina. En mamíferos existen dos sistemas tiorredoxinas: Trx1 y TrxR1 constituyen el sistema citosólico (Gasdaska *et al*, 1995), en el que Trx1 puede ser traslocada al núcleo o ser secretada fuera de la célula bajo ciertas circunstancias (Rubartelli *et al*, 1992); y Trx2 y TrxR2 que forman el sistema mitocondrial (Miranda-Vizuite *et al*, 1999). Además, existen otros miembros de la familia tiorredoxina específicos de tejido y/o orgánulo que incluyen a las tiorredoxinas específicas de espermátidas SpTrx1, SpTrx2 y SpTrx3, así como la Tx12 (thioredoxin-like 2), específica de microtúbulos (Miranda-Vizuite *et al*, 2004) y una tiorredoxina glutatión reductasa (TGR) expresada principalmente en células germinales masculinas (Arnér, 2009).

Debido a su variedad de sustratos, el sistema tiorredoxina mediante su actividad oxidoreductasa regula procesos diversos como la síntesis de ADN, proliferación celular, protección contra la apoptosis, regulación de la transcripción, modulación de la respuesta inmune y el control de los niveles de H₂O₂ y peroxidación lipídica (Torvard C. Laurent *et al*, 1964; Saitoh *et al*, 1998; Matthews *et al*, 1992; Schenk *et al*, 1996; Berggren *et al*, 2001).

1.3.3.1.2.4. Glutarredoxinas.

Las glutarredoxinas (Grxs) son oxidoreductasas que participan en el intercambio tiol-disulfuro y que pertenecen a la familia de proteínas tiorredoxinas. Las glutarredoxinas son estructuralmente similares a las tiorredoxinas pero se diferencian de estas en que son enzimas dependientes de GSH. Catalizan la reducción de puentes disulfuro a través de un sistema que involucra NADPH, glutatión reductasa (GR) y GSH y que en su conjunto componen el sistema glutatión (Figura 1.6) (Lillig *et al*, 2008).



◀ **Figura 1.6. Sistema glutatión.** Representación esquemática del flujo de electrones en el sistema glutatión. Las glutarredoxinas (Grx) reducen proteínas oxidadas con electrones procedentes del glutatión (GSH), el cual queda oxidado (GSSG) y es reciclado a su forma reducida por la favoenzima dependiente de NADPH glutatión reductasa (GR).

Dependiendo del número de cisteínas en su sitio activo, las glutarredoxinas se clasifican como ditiólicas (Cys-Pro-Tyr-Cys) o monotiólicas (Cys-Gly-Phe-Ser). Los mamíferos poseen cuatro isoformas de glutarredoxinas: las ditiol Grx1 y Grx2, y las monotiol Grx3 y Grx5. Las glutarredoxinas Grx1 y Grx3 se localizan en el citoplasma y el núcleo, aunque Grx1 puede ser encontrada en la superficie de las mitocondrias o ser secretada al exterior de la célula (Fernando *et al*, 1994; Witte *et al*, 2000). Las isoformas Grx2 y Grx5 tienen una localización mitocondrial (Hudemann *et al*, 2009; Johansson *et al*, 2011). Ambas formas, ditiol y monotiol, son capaces de utilizar GSH como sustrato y de participar en la glutationilación y deglutationilación de proteínas, sin embargo, son las glutarredoxinas ditiólicas las que realizan la reducción de puentes disulfuro (Lillig *et al*, 2008; Hanschmann *et al*, 2013).

Las glutarredoxinas son oxidorreductasas más versátiles que las tiorredoxinas en cuanto a la variedad de sustratos. Al igual que las tiorredoxinas, las glutarredoxinas catalizan la reducción de puentes disulfuros reversibles en las proteínas utilizando los residuos tiol del sitio activo Cys-Pro-Tyr-Cys, donde la cisteína N-terminal se encuentra expuesta en la superficie favoreciendo ser atacada por el GSH, mientras que la cisteína C-terminal se encuentra en el interior hidrofóbico de la enzima. En un primer paso, la cisteína N-terminal realiza un ataque nucleofílico sobre el enlace disulfuro de la proteína diana, quedándose unido a ella. A continuación, este enlace es atacado por la cisteína C-terminal, formándose un enlace disulfuro en la glutarredoxina y liberándose la proteína diana reducida. Este enlace disulfuro de la glutarredoxina no es eliminado de forma enzimática como en el caso de las tiorredoxinas (que eran reducidas por la tiorredoxina reductasa), sino que la acción secuencial de dos moléculas de GSH, que actúan sobre la cisteína N-terminal de la glutarredoxina, la devuelven a su estado reducido. Finalmente, las dos moléculas de GSH que han quedado oxidadas (GSSG) en el proceso de reducción de la glutarredoxina, son de nuevo reducidas por la glutatión reductasa, la cual obtiene poder reductor del NADPH (Hanschmann *et al*, 2013). Al igual que la tiorredoxina reductasa, la glutatión reductasa es una flavoenzima homodimérica antiparalela, en

la que cada subunidad posee tres dominios principales, uno de unión a FAD, otro a NADPH y un tercero para la unión a GSSG.

Entre sus funciones, además de estar involucradas en el intercambio general de tio-disulfuro de las proteínas, las glutarredoxinas, al igual que las tiorredoxinas, son fuente de electrones para ribonucleótido reductasa, permitiendo la conversión de ribonucleótidos a deoxiribonucleótidos (Holmgren, 1976). Además, son responsables de la reducción del ácido ascórbico (vitamina C), ofrecen protección frente apoptosis y participan en la homeostasis del hierro (Wells *et al*, 1990; Enoksson *et al*, 2005; Berndt *et al*, 2007; Lillig *et al*, 2008).

1.3.3.1.2.5. Glutación peroxidasas.

Las glutación peroxidasas (GPx) son una familia de enzimas que catalizan la reducción del H₂O₂ y peróxidos lipídicos utilizando GSH como donador de electrones. Se encuentran localizadas tanto en el citoplasma como en la mitocondria. Existen cinco isoformas de glutación peroxidasas que poseen selenocisteína en su sitio activo, y otras tres isoformas en las que el sitio activo contiene cisteína (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013).

1.3.3.1.2.6. Peroxirredoxinas.

Las peroxirredoxinas (Prxs) son, al igual que tiorredoxinas y glutarredoxinas, oxidorreductasas pertenecientes a la familia con plegamiento de tiorredoxinas. Estas enzimas se expresan en diferentes isoformas (en mamífero son seis) y se localizan en varios compartimentos celulares, como el citoplasma, núcleo, peroxisomas, mitocondria o retículo endoplasmático. Las peroxirredoxinas intervienen en la reducción del H₂O₂, a través de la interacción directa entre el H₂O₂ y un residuo conservado de cisteína de su sitio activo (Wood *et al*, 2003; Hofmann *et al*, 2002). Se clasifican en dos categorías, 1-Cys Prxs o 2-Cys Prxs, basadas en el número de residuos de cisteína que participan directamente en la catálisis. Además, las 2-Cys Prxs se dividen en dos clases llamadas “típica” o “atípica”, siendo las primeras homodímeros y las segundas monómeros. La reducción del H₂O₂ por parte de las 2-Cys Prxs conlleva la formación de un enlace disulfuro entre las cisteínas que intervienen en la reacción, el cual es reducido por el sistema tiorredoxina, completando el ciclo catalítico (Hofmann *et al*, 2002).

1.4. Mecanismos de regulación de la proteostasis.

El mantenimiento de la proteostasis tiene lugar a lo largo de todas las etapas de la vida de las proteínas. En primer lugar, debe asegurarse una correcta síntesis de la cadena polipeptídica, la cual debe ser plegada para adquirir su conformación funcional. El adecuado control para que las proteínas mantengan su conformación, así como la reparación por la pérdida del plegamiento es llevado a cabo por un sistema de chaperonas moleculares. En caso de que estas proteínas mal plegadas no puedan ser reparadas, serán degradadas mediante el proteasoma, mientras que la autofagia se encargará de la eliminación de aquellos agregados que forman estas proteínas mal plegadas. Por otro lado, existen otros mecanismos secundarios, pero esenciales, como la UPR (unfolded protein response), que participan en el mantenimiento de la proteostasis respondiendo ante situaciones de estrés.

1.4.1. Plegamiento de proteínas.

Las proteínas deben ser plegadas en su estado nativo activo cuando emergen del ribosoma, así como tras los cambios de plegamiento que sufre su conformación a lo largo de su vida media. Del éxito de este proceso depende la salud de la célula y el fracaso conlleva a la aparición de enfermedades.

Las primeras aportaciones al campo del plegamiento de las proteínas fueron realizadas por Christian B. Anfinsen y colaboradores en los años 60. En sus experimentos, realizados con la ribonucleasa pancreática, una pequeña proteína de 124 aminoácidos, observaron como tras su completa desnaturalización, esta proteína espontáneamente se volvía a plegar y adquirir su conformación activa una vez restablecidas las condiciones fisiológicas "*in vitro*" (Anfinsen *et al*, 1961). Estos resultados llevaron a establecer la "hipótesis termodinámica", por la cual, la estructura tridimensional nativa de una proteína dentro de su medio fisiológico normal (solventes, pH, fuerza iónica, presencia de otros componentes como iones metálicos o grupos prostéticos, temperatura y otros) es aquella en la que la energía libre de Gibbs de todo el conjunto es menor, y que por tanto, la conformación nativa de cada proteína vendría determinada por la secuencia de aminoácidos (Anfinsen, 1973). Posteriormente, Cyrus Levinthal planteó que ningún proceso de plegado no dirigido sería capaz de encontrar la estructura nativa por búsqueda aleatoria a través de la gran cantidad de opciones estructurales (Levinthal, 1968). Lo que se planteó en la

conocida como “paradoja Levinthal” es que, debido al gran número de grados de libertad que posee una cadena polipeptídica lineal, la molécula posee un número de posibles conformaciones astronómico y, aunque la proteína fuese capaz de explorar estas conformaciones a una enorme velocidad, le tomaría un tiempo de muchos años explorar todas las posibilidades para alcanzar su conformación nativa. Por lo tanto, Levinthal propuso que la búsqueda conformacional estocástica no es el mecanismo real de plegamiento, sino que este deber ser un proceso dirigido, señalando que este proceso es acelerado y guiado por la formación rápida de interacciones locales que determinan el futuro del plegado de la cadena y sugiriendo la existencia secuencias de aminoácidos locales que forman interacciones estables y sirven como puntos de nucleación en el proceso de plegado. Es decir, lo que propuso es que las proteínas se plegarían a través de una serie de estados metaestables intermedios (Levinthal, 1968; Englander & Mayne, 2014).

En este sentido han ido encaminados los más recientes estudios, formando una “nueva visión” sobre el plegamiento de proteínas. Así, se han desarrollado teorías que establecen que el plegamiento de las proteínas ocurre a través de una serie de intermediarios transitorios, donde cada uno de los cuales tiene menor energía que el anterior, desde las conformaciones más lineales, pasando por otras más compactadas, hasta alcanzar el estado nativo (Dill & Chan, 1997; Dinner *et al*, 2000; Baldwin, 1995). Esta interpretación sobre el plegamiento ha podido ser validada para muchas proteínas gracias a que sus intermediarios de plegamiento son lo suficientemente estables para acumularse y poder ser detectados (Bachmann *et al*, 2011; Georgescu *et al*, 1998; Jamin & Baldwin, 1996; Roder *et al*, 1988; Jennings & Wright, 1993; Udgaonkar & Baldwin, 1988; Khorasanizadeh *et al*, 1996).

El plegamiento se inicia con interacciones débiles, no covalentes y de corto alcance, que forman estructuras secundarias en regiones locales del polipéptido. Las fuerzas hidrofóbicas conducen al colapso de la cadena y el enterramiento de los aminoácidos no polares dentro del núcleo de la estructura, conformando el estado de “glóbulo fundido” (Kuwajima, 1989; Roder, 1995). A continuación, se forman interacciones de medio y largo alcance mediante el reordenamiento del estado de “glóbulo fundido” hasta llegar a la conformación nativa de la proteína. De este modo, una proteína puede alcanzar su estado nativo a través de una de las muchas rutas e intermediarios posibles, cada una de las rutas quedando definida por la línea de menor energía entre

un estadio intermedio y siguiente. El conjunto de las energías correspondientes a todas las conformaciones posibles se le conoce como “paisaje energético” (Dill & Chan, 1997), el cual tendría forma de embudo, donde el estado desnaturalizado se compone de un gran número de conformaciones con mayor energía, en la parte superior del embudo, mientras que las posibles conformaciones que puede adquirir la proteína se van reduciendo hasta llegar al estado nativo de menor energía en el fondo del embudo (Figura 1.7) (Dill & Chan, 1997; Balchin *et al*, 2016). Sin embargo, este descenso en la energía libre hasta un estado nativo termodinámicamente favorable es irregular, apareciendo barreras de energía cinética entre los intermediarios, principalmente en las proteínas de mayor tamaño (>100aa) (Brockwell & Radford, 2007; Dinner *et al*, 2000).

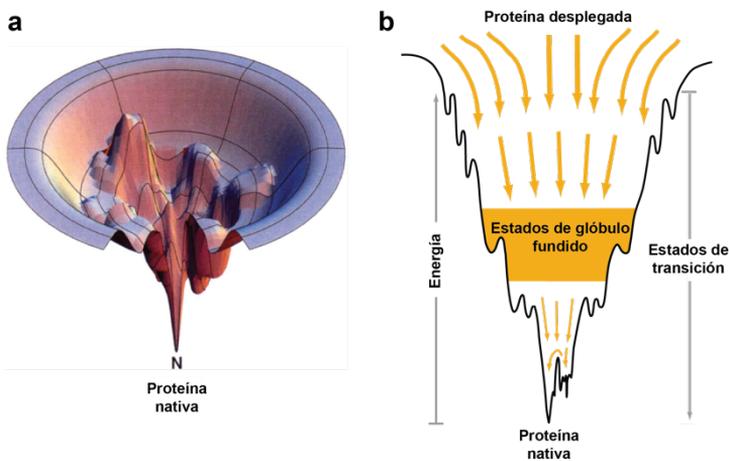


Figura 1.7. Esquema de embudo de plegamiento. a) Representación tridimensional con barreras cinéticas y estrechamientos hacia el estado nativo. Modificado de Dill & Chan, 1997. b) Representación en dos dimensiones con barreras cinéticas dibujadas en los bordes. Modificada de Englander & Mayne, 2014.

Estas barreras cinéticas constituyen un peligro de pérdida del plegamiento de los intermediarios, debido a la formación de interacciones inespecíficas. Para superar estas barreras, las proteínas son asistidas por componentes celulares como las chaperonas moleculares, que previenen la pérdida de plegamiento y rebajan la energía libre de las barreras cinéticas proporcionando una ruta más eficiente para que la proteína adquiera su conformación correcta (Figura 1.8) (Dobson, 2003; Balchin *et al*, 2016), así como por proteínas catalíticas que aceleran la transición de un intermediario a otro, como la proteína disulfuro isomerasa, con capacidad de generar puentes disulfuro que estabilizan a las proteínas, así como de modificar y

eliminar estos enlaces cuando se forman de manera incorrecta (Wilkinson & Gilbert, 2004).

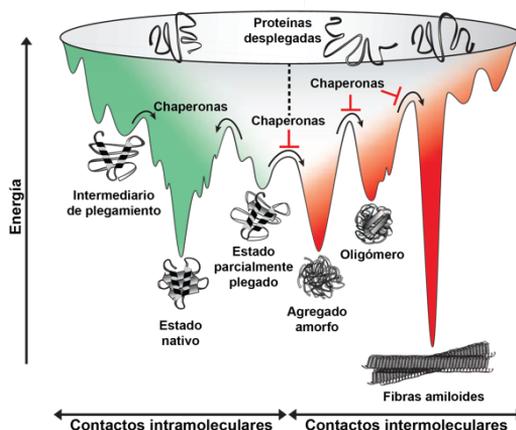


Figura 1.8. Esquema de formación de agregados. Durante el plegamiento, las proteínas adquieren varias conformaciones mientras descienden hasta el estado nativo termodinámicamente favorable (zona verde). Las barreras cinéticas retienen a los intermediarios de plegamiento y proteínas parcialmente plegadas. Las chaperonas moleculares asisten en el plegamiento rebajando la energía libre para superar las barreras y previniendo interacciones intermoleculares aberrantes (zona roja). Modificado de Balchin *et al*, 2016.

1.4.1.1. Asistentes de plegamiento.

1.4.1.1.1. Proteína disulfuro isomerasa (PDI).

En situaciones fisiológicas, la conformación funcional de muchas proteínas es estabilizada mediante los puentes disulfuro. La formación de estos enlaces es poco habitual dentro del ambiente reductor del citoplasma. Por el contrario, son favorecidos en el ambiente oxidante que posee el retículo endoplasmático (RE), donde se da el plegamiento oxidativo de las proteínas, sobre todo en aquellas proteínas destinadas a la ruta secretora y de membrana (Kosuri *et al*, 2012; Linke & Jakob, 2003).

El RE es un orgánulo fundamental responsable del plegamiento, modificaciones post-traduccionales, transporte y control de calidad de las proteínas recién sintetizadas. En el lumen de este orgánulo se da el plegamiento oxidativo de las proteínas, mediado por las PDI (Proteínas disulfuro isomerasas), un grupo de proteínas con dominios tiorredoxina, que fueron primeramente localizadas en el RE pero que posteriormente han sido detectadas también en el citoplasma, núcleo y en el espacio extracelular (Turano *et al*, 2002).

Las PDI tienen dos funciones principales: actividad como chaperona y como oxidorreductasa (Ferrari & Söling, 1999). El dominio catalítico de las PDI posee un

sitio activo compuesto por dos cisteínas separadas por una glicina y una histidina (Cys-Gly-His-Cys) siendo los grupos tiol de las dos cisteínas donde recae la actividad oxidorreductasa. El estado redox de las dos cisteínas del sitio activo, así como las propiedades de sus sustratos, determinan si las PDI tienen actividad de oxidación (formación), reducción (romper) o isomerización (reestructuración) de puentes disulfuro (Wilkinson & Gilbert, 2004).

Cuando la PDI media el plegamiento oxidativo de proteínas recién sintetizadas, dos cisteínas de la proteína diana se oxidan a disulfuro, mientras que el sitio activo de la PDI, que se encontraba oxidado, es reducido al estado ditiol. Al quedar reducida al formar el puente disulfuro a la proteína naciente, la PDI es rápidamente oxidada mediante oxidantes presentes en el RE tanto enzimáticos, principalmente por la oxidorreductasa Ero1, asociada a la membrana del RE, así como por oxidantes no enzimáticos, como el GSSG (Hudson *et al*, 2015).

El plegamiento oxidativo de las proteínas no está exento de errores y se puede dar un plegamiento incorrecto de las proteínas. Los puentes disulfuro erróneos pueden ser corregidos mediante las actividades de isomerización o reducción de las PDI. En la reacción de reducción, la PDI debe encontrarse en estado reducido previamente. Esta reducción la llevan a cabo agentes reductores como el GSH, que donan electrones para reducir el disulfuro de la PDI a estado ditiol. A partir de la PDI reducida, el enlace disulfuro de la proteína mal plegada es reducido por la PDI al estado ditiol, mientras que la PDI queda oxidada nuevamente. Cuando el mal plegamiento de las proteínas requiere la isomerización del puente disulfuro, la PDI debe ser reducida para poder romper el puente disulfuro de la proteína y posteriormente, crear el enlace correcto mediante su actividad oxidativa (Wilkinson & Gilbert, 2004).

Como se ha visto, el estado redox de la PDI viene determinado en gran medida por el ratio GSH/GSSG, donde en el RE es más oxidado que en el citoplasma, siendo éste un ambiente óptimo para la formación de puentes disulfuro en las proteínas. Como consecuencia, variaciones en el ratio GSH/GSSG afectan directamente en la capacidad de plegamiento de las proteínas por parte de la PDI (Hwang *et al*, 1992).

1.4.1.1.2. Chaperonas moleculares.

Las chaperonas moleculares, también conocidas como HSPs (heat shock proteins), son proteínas que tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular tanto en situaciones normales, asistiendo al plegamiento de proteínas recién sintetizadas, como participando en la reparación, evitando la agregación de proteínas mal plegadas o potenciando la proteólisis en el caso de no poder solventar el mal plegamiento. Las chaperonas moleculares previenen interacciones impropias entre la cadena polipeptídica, pero no crean enlaces en las proteínas. Las proteínas mal plegadas presentan sus residuos hidrofóbicos al ambiente acuoso celular, lo que lleva a formar interacciones entre ellas y agregar. Las chaperonas moleculares son capaces de unirse a estos residuos hidrofóbicos, impidiendo que se produzcan interacciones inapropiadas, además de revertir el mal plegamiento de las proteínas para darles una nueva opción de plegamiento (Hinault *et al*, 2006; Mamipour *et al*, 2017).

En las células eucariotas, las chaperonas se encuentran en el citoplasma, núcleo y orgánulos como la mitocondria o el RE. Se pueden clasificar dentro de cinco familias en función de su peso molecular, que incluyen las HSP100 (heat shock protein 100), HSP90, HSP70, HSP60 y las sHsps (small Hsps) (Mamipour *et al*, 2017).

La expresión de chaperonas está principalmente controlada por un pequeño grupo de factores de transcripción llamados HSFs (heat shock factors), entre los cuales, HSF1 es el más conservado en eucariotas. HSF1 es mantenido en el citoplasma en un estado inactivo en ausencia de estrés por su asociación con las chaperonas HSP70 y HSP90 (Zou *et al*, 1998; Morimoto, 1998). Ante situaciones de estrés, como las altas temperaturas o el estrés oxidativo, que supondrían un incremento de proteínas mal plegadas, estas chaperonas se separan de HSF1 y se unen a las proteínas mal plegadas. De este modo, HSF1 quedaría libre para pasar al núcleo y transcribir genes de HSPs así como un amplio rango de componentes del mantenimiento de la proteostasis (Morimoto, 1998).

Ya que la pérdida de homeostasis redox provoca daños en la estabilidad del proteoma, no es de extrañar que las chaperonas se encuentren reguladas a nivel transcripcional y traduccional bajo condiciones de estrés oxidativo. Se ha descrito

que HSF1 posee la capacidad de sensar el estrés oxidativo a través de dos residuos de cisteína que posee dentro del dominio de unión a ADN (Ahn & Thiele, 2003). Además, la chaperona HSP70 participa en la regulación de la degradación de proteínas vía proteasoma durante la adaptación al estrés oxidativo, proporcionando a la célula un incremento de la capacidad de degradar proteínas oxidadas (Grune *et al*, 2011).

1.4.2. FOXO.

Los factores de transcripción FOXO son unos reguladores conservados evolutivamente desde invertebrados hasta mamíferos, que están involucrados en multitud de procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo el envejecimiento, cáncer, estrés oxidativo o en enfermedades neurodegenerativas. Mientras que *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila* poseen un solo factor FOXO, la familia FOXO en mamíferos está compuesta por cuatro miembros (FOXO 1, 3, 4 y 6), cuya principal diferencia radica en el tejido en el que son expresados (Webb *et al*, 2016).

La actividad de FOXO está inhibida en presencia de insulina o IGF (insulin-like growth factor), que desencadenan una cascada de señalización que resulta en la fosforilación y retención de FOXO en el citoplasma. Ante la ausencia de insulina o IGF, o en respuesta a estímulos como la falta de alimento o el estrés oxidativo, FOXO es desfosforilado y trasloca dentro del núcleo donde activa genes relacionados con la resistencia a estrés (Kenyon, 2010).

Entre los genes diana sobre los que actúa FOXO en su regulación, se encuentran aquellos relacionados con el envejecimiento y la longevidad, el mantenimiento de células madre, resistencia a estrés oxidativo, regulación del metabolismo, inflamación y reparación del ADN (Tothova *et al*, 2007; Paik *et al*, 2009; Ouyang *et al*, 2012; Tran *et al*, 2002). Otros estudios indican que FOXO está también involucrado en la expresión de genes relacionados con el control de la proteostasis, en concreto, parece estar regulando mecanismos de eliminación de proteínas como el proteasoma y la autofagia (Webb *et al*, 2016; Cohen *et al*, 2010, 2009).

1.4.3. Respuesta a proteínas mal plegadas.

Como se describió anteriormente, el retículo endoplasmático es el mayor responsable del correcto plegamiento, modificaciones post-traduccionales y transporte de proteínas destinadas a otros orgánulos, membrana plasmática o compartimentos extracelulares. El RE es por tanto un componente clave para el mantenimiento de la proteostasis, integrando mecanismos que controlan la regulación de la síntesis, plegamiento, tráfico y degradación de las proteínas (Zhang *et al*, 2019).

La acumulación de proteínas mal plegadas dentro del RE ocasiona la pérdida de la homeostasis dentro de este orgánulo y, por tanto, estrés. Esta situación desencadena la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas del RE (UPR^{ER}, del inglés Unfolded Protein Response), cuyo objetivo es aliviar la situación de estrés (Ron & Walter, 2007). La UPR es un mecanismo adaptativo diseñado para lidiar con alteraciones en el plegamiento de proteínas dentro del RE y así restaurar la proteostasis. Este mecanismo es orquestado por tres proteínas transmembrana del RE que actúan como sensores de proteínas mal plegadas: PERK (del inglés, protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase), IRE1 (inositol-requiring protein-1) y ATF6 (activating transcription factor-6). En condiciones basales, estas tres proteínas transmembrana son mantenidas en un estado inactivo a través de su asociación con la proteína BiP (binding immunoglobulin protein) en el lumen del RE. Cuando existe una moderada acumulación de proteínas mal plegadas, BiP se disocia de ellos y los tres sensores son activados. Como resultado se produce la inducción de la UPR^{ER}, que transmite la información desde el RE hasta el núcleo y el citosol, donde se desencadena un programa de señalización y transcripción de genes que reduce la traducción de proteínas, expande el tamaño del RE, incrementa la síntesis de chaperonas dentro del RE para asistir en el correcto plegamiento de proteínas, y dirige proteínas mal plegadas al citosol para ser degradadas (Ron & Walter, 2007). Sin embargo, cuando el estrés en el RE es crónico o irreversible, la UPR^{ER} promueve la muerte celular mediante apoptosis. Este hecho conecta el estrés dentro del RE con la neurodegeneración, donde ocurre una activación crónica de la UPR^{ER}, promoviendo la muerte neuronal vía apoptosis (Perri *et al*, 2016; Smith & Mallucci, 2016; Ghemrawi & Khair, 2021).

De igual modo que en el RE, la mitocondria también posee una respuesta a proteínas mal plegadas (UPR^{mit}) (Zhao *et al*, 2002). Factores que causan disfunción mitocondrial como defectos en la fosforilación oxidativa, excesiva acumulación de EROs o un aumento de proteínas mal plegadas, inducen la activación de la UPR^{mit} (Houtkoper *et al*, 2013; Haynes & Ron, 2010). Esta respuesta es regulada por el factor de transcripción ATFS1 (del inglés, *activating transcription factor associated with stress*), en cuya secuencia existe dominio tanto para su localización mitocondrial como nuclear (Melber & Haynes, 2018). En condiciones normales de crecimiento, ATFS1 es eficientemente transportado a la matriz mitocondrial donde es constitutivamente degradado. Ante situaciones de disfunción mitocondrial, como estrés oxidativo o presencia de proteínas mal plegadas, el transporte mitocondrial de ATFS1 es reducido, acumulándose en el citoplasma y translocándose al núcleo, donde induce la expresión de chaperonas mitocondriales, proteasas y enzimas de detoxificación de EROs que reestablecen la proteostasis mitocondrial (Zhao *et al*, 2002; Shpilka & Haynes, 2018; Friedman & Nunnari, 2014).

1.4.4. Sistema ubiquitina-proteasoma.

La degradación de proteínas cumple un papel fundamental en el mantenimiento de la proteostasis celular, ya se es la responsable de eliminar proteínas mal plegadas que potencialmente pueden llegar a formar agregados. Para eliminar estas proteínas dañadas, la célula emplea el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS, del inglés Ubiquitin Proteasome System). Este mecanismo consiste, por un lado, en el sistema ubiquitina, responsable del reconocimiento de la proteína candidata para la degradación y marcarla con ubiquitina, una pequeña molécula de 76 aminoácidos. El segundo componente de la UPS es el proteasoma, encargado de la degradación de la proteína marcada.

El proteasoma es un complejo proteico formado por dos subunidades regulatorias (19S) y una subunidad catalítica (20S) (Peters *et al*, 1993). La subunidad 19S es la responsable del reconocimiento de las proteínas marcadas, su desubiquitinación y translocación hacia la subunidad 20S, responsable de degradar dichas proteínas dañadas mediante proteólisis (Budenholzer *et al*, 2017). En presencia de un bajo estrés oxidativo, la actividad del proteasoma se incrementa, ya que es el responsable de la eliminación de proteínas que sufren daño oxidativo. Un estrés oxidativo intenso,

puede inducir a la separación de las subunidades del proteasoma (19S y 20S), inhibiendo su actividad (Pajares *et al*, 2015).

1.4.5. Autofagia.

La autofagia es un proceso catabólico de degradación y reciclaje de macromoléculas y orgánulos por parte de los lisosomas. Es un proceso conservado desde levaduras hasta mamíferos, el cual funciona como un mecanismo de supervivencia que mantiene la homeostasis celular bajo condiciones normales de crecimiento y permite la adaptación ante diferentes tipos de estreses, incluyendo falta de alimentos, infecciones o estrés oxidativo (Dikic & Elazar, 2018).

Se han descrito tres tipos de autofagia: Microautofagia, en la que parte del contenido citoplasmático entra en el lisosoma directamente a través de una invaginación o deformación de la membrana del lisosoma (Marzella *et al*, 1981); Autofagia mediada por chaperonas, donde los sustratos a ser degradado son selectivamente marcados y reconocidos por chaperonas que los transportan directamente al lisosoma (Dice, 1990); Finalmente, la macroautofagia que es un mecanismo consistente en envolver los sustratos a degradar mediante una doble membrana sintetizada *de novo*, formándose una vesícula llamada autofagosoma la cual se fusiona con el lisosoma para degradar el contenido de su interior (Yang & Klionsky, 2009).

La principal función del proceso de macroautofagia, a partir de ahora referido como autofagia, es proveer nutrientes para las funciones vitales de la célula durante diferentes estreses, considerándose un proceso no selectivo. Sin embargo, se ha demostrado que la autofagia puede eliminar de forma selectiva material perjudicial del citoplasma como orgánulos dañados o proteínas agregadas (Dikic & Elazar, 2018).

La inducción de la autofagia tiene como consecuencia el reclutamiento de más de 30 proteínas relacionadas con la autofagia (ATGs, Autofagy-related proteins), la mayoría de ellas asociadas directamente con la biogénesis del autofagosoma. El mecanismo de autofagia se compone de varias fases: Iniciación, donde se comienza a formar una membrana a partir del RE, aunque actualmente se ha considerado que esta membrana puede surgir también de la membrana plasmática u otros orgánulos como

el aparato de Golgi o mitocondrias; Elongación, en la que la membrana inicial se expande formando una doble membrana (fagoforo) que rodea una porción del citoplasma; Maduración y fusión, donde la doble membrana madura y se cierra formando una vesícula llamada autofagosoma, la cual se fusiona con el lisosoma formándose un autolisosoma que degrada el contenido que portaba el autofagosoma (Figura 1.9) (Parzych & Klionsky, 2014; Dikic & Elazar, 2018; Hansen *et al*, 2018).

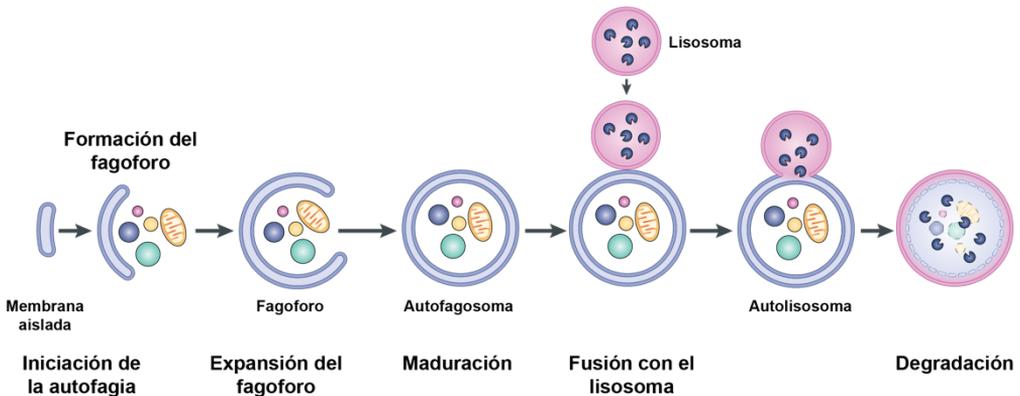


Figura 1.9. Proceso de macroautofagia. Ilustración esquemática del proceso de macroautofagia, compuesto por las fases de iniciación del proceso, expansión del fagoforo, maduración hasta formar el autofagosoma y su fusión con el lisosoma, finalizando con la degradación del contenido del autolisosoma. Modificado de Hansen *et al.* 2018.

El principal control de la inducción de la autofagia es llevado a cabo por la quinasa TOR (mTOR en mamíferos), un regulador clave para la homeostasis celular. mTOR se encuentra en forma de dos complejos de proteínas diferentes, mTORC1 y mTORC2. Aunque ambos complejos regulan el metabolismo celular, sólo mTORC1 está directamente ligado a la regulación de la autofagia (Abada & Elazar, 2014; Yang & Klionsky, 2009).

mTORC1 sensa la disponibilidad de nutrientes, siendo activado en la superficie de la membrana de los lisosomas en respuesta a la presencia de aminoácidos. Mientras se encuentra activado, mTORC1 fosforila a los factores de transcripción TFEB y TFE3, lo que hace que se unan a las proteínas 14-3-3, reteniéndolos en el citoplasma (Rocznik-Ferguson *et al*, 2012). Bajo situaciones de falta de alimento, se produce una inactivación de mTORC1 que se traduce en la defosforilación de TFEB y TFE3, haciendo que se disocien de las proteínas 14-3-3, llevando a una rápida acumulación

en el núcleo de estos factores de transcripción, los cuales promueven la transcripción de genes implicados en la biogénesis de lisosomas y la inducción de la autofagia (Martina *et al*, 2016). Aunque TFEB y TFE3 se encuentran regulados por mTORC1 y la falta de nutrientes, numerosos estudios han demostrado que ambos factores de transcripción también responden a una amplia variedad de estreses, incluyendo el daño mitocondrial, la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, patógenos y estrés oxidativo. Muchos de estos estreses no causan una inactivación obvia de mTORC1, lo que sugiere que existe una regulación de TFEB y TFE3 independiente de mTORC1 (Martina & Puertollano, 2018).

1.4.6. Mitofagia.

Como se describió en apartados anteriores, son varios los orgánulos de la célula que tienen la capacidad de producir EROs, siendo la mitocondria el mayor productor de ellos. En la mitocondria, el anión superóxido (O_2^-) es producido en la matriz mediante la reducción del O_2 a través del complejo I de la cadena transportadora de electrones (Murphy, 2009). La defensa más importante de la mitocondria contra el O_2^- son las enzimas superóxido dismutasas (SODs) localizadas en la matriz mitocondrial. Las SODs generan H_2O_2 cuya acumulación puede inducir daño oxidativo en proteínas, DNA y lípidos (Kupsco & Schlenk, 2015). La detoxificación de H_2O_2 y sus derivados es llevado a cabo en la mitocondria por el sistema glutatión peroxidasa y por peroxirredoxinas, mientras que las modificaciones en las cisteínas (glutathionilación y puentes disulfuro), son revertidas por el sistema glutatión y el sistema tiorredoxina (Hanschmann *et al*, 2013; Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013).

Ante defectos en los mecanismos de detoxificación que conllevan a la acumulación de EROs dentro de la mitocondria y, por tanto, daño oxidativo, se desencadena un mecanismo específico de autofagia encargado de la eliminación de mitocondrias defectivas conocido como mitofagia (Lemasters, 2005). De esta forma, las mitocondrias disfuncionales junto con sus EROs acumuladas son eliminadas para preservar la homeostasis celular (Pickles *et al*, 2018; Garza-Lombó *et al*, 2020).

Diferentes estudios muestran que la alteración de la mitofagia está ligada a varias enfermedades, incluidos desórdenes neurodegenerativos como el Parkinson, Huntington y el Alzheimer (Shefa *et al*, 2019; Fang *et al*, 2019; Fivenson *et al*, 2017;

Wang *et al*, 2019). Por ejemplo, PINK1, cuya mutación se asocia a la enfermedad de Parkinson, actúa como sensor para la degradación de mitocondrias dañadas, acumulándose en la superficie mitocondrial e induciendo la mitofagia (Lazarou *et al*, 2012). Por otro lado, se ha descrito que expansiones de la proteína Htt con repeticiones de glutamina, responsable de la enfermedad de Huntington, causa la formación de mitocondrias esféricas que pueden impedir su degradación vía mitofagia, conllevando a la acumulación de mitocondrias disfuncionales (Wong & Holzbaur, 2014).

1.5. *Caenorhabditis elegans*.

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) es un nematodo de vida libre, no parásito, cuyo hábitat natural es el suelo y puede ser encontrado por todo el mundo. Fue introducido por primera vez como organismo modelo por Sidney Brenner en 1963 para el estudio de la biología del desarrollo y neurobiología (Brenner, 1974).

1.5.1. Ciclo de vida y reproducción.

El ciclo de vida de *C. elegans* está compuesto por un desarrollo embrionario dentro del huevo, cuatro fases larvianas postembrionarias (L1-L4) y el estadio adulto (Figura 1.10). Tras la fertilización, se forma una cubierta alrededor del embrión y las divisiones mitóticas comienzan. Los embriones son retenidos dentro del progenitor hasta el estadio de 24 células aproximadamente y después son expulsados, continuando la embriogénesis *ex-utero*. Una vez el embrión eclosiona, éste crece y atraviesa cuatro estadios larvianos (L1-L4), cada uno de ellos marcado por una muda, en la que una cutícula nueva es sintetizada, reemplazando a la cutícula antigua que es desprendida. La muda final es del estadio larvario L4 hacia adulto, terminando un ciclo que, a 20°C, tiene una duración de aproximadamente 3,5 días (Corsi *et al*, 2015). Ante condiciones desfavorables como la falta de alimento, alta temperatura o una población elevada, entre los estadios L1-L2 se activa una ruta alternativa del ciclo de vida y la larva muda a un estadio especial llamado “dauer” (Golden & Riddle, 1984) el cual permite al animal resistir durante varios meses a la espera de que las condiciones ambientales mejoren, reactivando el ciclo de vida normal en el estadio L4.

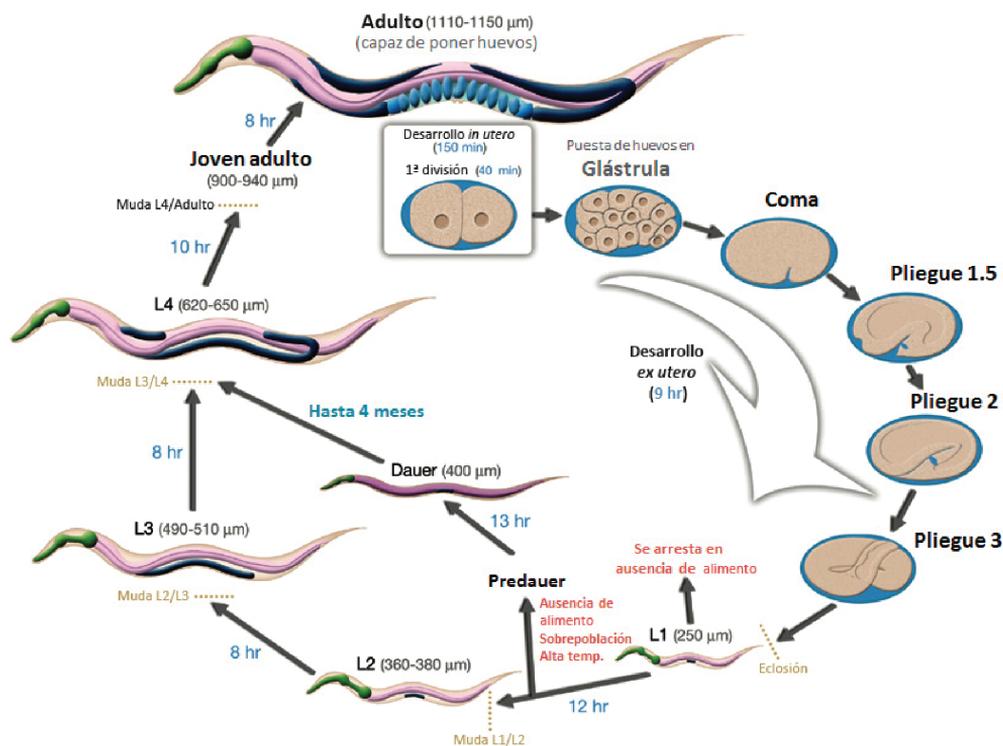


Figura 1.10. Ciclo de vida de *C. elegans*. Esquema del ciclo de vida de *C. elegans* a 22°C. El ciclo se inicia tras la fecundación, continúa con el desarrollo del embrión dentro del útero de la hermafrodita y un desarrollo extrauterino, continuando con cuatro estadios larvarios hasta llegar a adulto. Se muestra también el momento del desarrollo en el que el ciclo puede seguir la ruta hacia el estadio de resistencia dauer. Los números en azul indican los tiempos entre estadios. Modificado de Wormatlas.

C. elegans posee dos formas sexuales: hermafroditas, con capacidad de autofecundarse, y machos (Figura 1.11). La gónada del hermafrodita forma una ovotestis, que primero produce esperma que es almacenado en la espermateca en el estadio L4 y luego, próximo al estadio adulto, la línea germinal produce oocitos (Corsi *et al*, 2015). Una hermafrodita es capaz de producir una progenie de unos 300 individuos por autofecundación, pero cuando es fecundada por un macho, la progenie puede alcanzar los 1000 individuos. Ambos sexos son diploides para los cinco cromosomas autosómicos que posee *C. elegans* (5AA), sin embargo, los sexos difieren en que la hermafrodita tiene dos cromosomas X (XX) mientras que los machos solo poseen un único cromosoma X (X0), debido a una no disyunción de este cromosoma durante la meiosis (Zarkower, 2006). La mayoría de la progenie producida por autofecundación son hermafroditas, apareciendo sólo un 0,1-0,2% de machos. La capacidad de autofecundación de las hermafroditas proporciona una ventaja al empleo de *C. elegans* como organismo modelo, ya que permite el

mantenimiento de poblaciones isogénicas a partir de un solo animal. Por otro lado, el cruce entre machos y hermafroditas permite realizar fácilmente cruces y aproximaciones genéticas complejas.

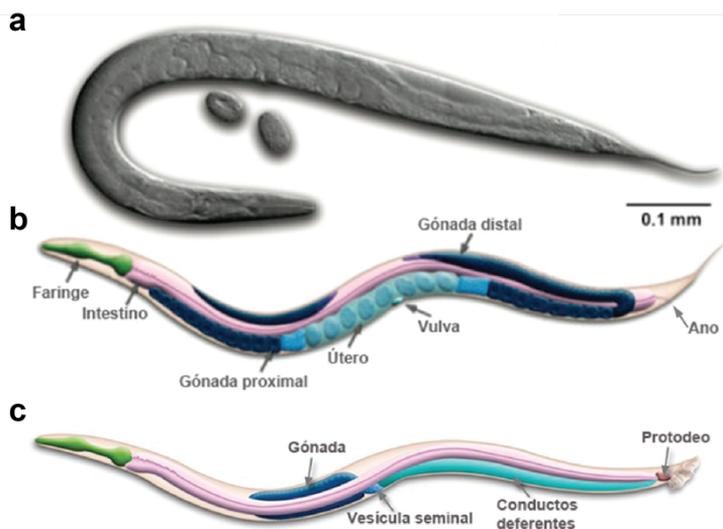


Figura 1.11. Anatomía del hermafrodita y macho adultos de *C. elegans*. a) Imagen DIC de una hermafrodita. b) Dibujo esquemático de estructuras anatómicas de un hermafrodita. c) Dibujo esquemático de estructuras anatómicas de un macho. Modificado de Wormatlas.

1.5.2. Anatomía.

Al igual que otros nematodos, *C. elegans* presenta un cuerpo cilíndrico no segmentado compuesto por dos tubos concéntricos separados por un espacio relleno de fluido, el pseudoceloma. El tubo externo está constituido por la cutícula, hipodermis, musculatura y neuronas, mientras que el tubo interno lo componen la faringe y el intestino y en los adultos las gónadas. Todos los tejidos están bajo presión hidrostática interna regulada por el sistema osmorregulador. A continuación, se describen los tejidos y órganos presentes en *C. elegans*, utilizando como referencia la última actualización de wormatlas (www.wormatlas.org):

La cutícula es el exoesqueleto del animal. Cubre toda la superficie del nematodo protegiéndolo del medio, manteniendo la forma del cuerpo y permitiendo su movilidad. Es secretada por el epitelio subyacente y está compuesta principalmente por colágenos. En cada estadio larvario se sintetiza una nueva cutícula y la anterior se desprende.

El sistema epitelial está formado por la hipodermis y células epiteliales especializadas. La hipodermis envuelve el cuerpo del animal y está compuesta por células sincitiales, y entre sus funciones está el actuar como barrera para la cavidad pseudocelómica, secretar la cutícula y almacén de nutrientes. Las células epiteliales especializadas secretan parte de la cutícula, actúan como células de soporte para receptores sensoriales y unen la hipodermis con el tejido interno.

El sistema muscular está separado de las neuronas e hipodermis por una fina lámina basal. Está compuesto por dos tipos musculares: el somático, formado por músculo estriado oblicuo, mononucleado y multisarcomérico organizado en cuadrantes, dos dorsales y dos ventrales, dispuestos a lo largo de toda la longitud del animal; y el no estriado, monosarcomérico, más pequeño y localizado en la faringe, alrededor de la vulva, el intestino y el recto.

El sistema excretor es el responsable de la osmorregulación y eliminación de desechos. Está formado por cuatro tipos de células: la célula del poro, que abre al exterior, la célula del conducto, dos células glandulares fusionadas y la célula canal, que recorre todo el cuerpo del animal.

Los coelomocitos son unas células mesodérmicas ovoideas que se encuentran en la cavidad pseudocelómica, junto a la musculatura somática. Existen tres pares de coelomocitos en adultos. Estas células son capaces de endocitar y acumular diferentes macromoléculas por lo que se ha sugerido que tienen funciones parecidas a un sistema inmune y hepático primitivo. Los coelomocitos carecen de capacidad de fagocitosis y su posición en el cuerpo es relativamente fija, por lo que requieren de los movimientos propios del animal y de los fluidos de la cavidad corporal para acceder a las sustancias a incorporar.

El sistema digestivo está compuesto por una cavidad bucal, una faringe bilobulada, el intestino, el recto y el ano. Está cubierto por una membrana basal que lo separa del espacio pseudocelómico. La faringe es una bomba neuromuscular formada por células epiteliales, musculares y nerviosas organizadas en simetría trirradial. La ingesta del alimento se produce gracias a contracciones musculares coordinadas de la faringe, la cual presenta dos estructuras bulbares conectadas entre sí que permiten

el procesamiento del alimento. El intestino está formado por 20 células con numerosas microvellosidades organizadas en forma de tubo con un lumen central. El contenido intestinal es excretado al exterior a través de la válvula rectal, que conecta el intestino con el recto y el ano.

El sistema nervioso de los hermafroditas está formado por 302 neuronas mientras que los machos poseen 385 neuronas, 81 de ellas específicas de este sexo e involucradas en el proceso de la cópula. Este sistema está organizado en varios ganglios, formados por los cuerpos celulares de las neuronas y localizados en la cabeza, el cordón nervioso ventral y la cola. La mayoría de las neuronas tienen una estructura simple con una o dos neuritas (extensiones citoplasmáticas del soma de la neurona). Las prolongaciones de la mayoría de las neuronas forman un anillo circumfaríngeo alrededor de la membrana basal de la faringe o están unidas a los cordones nerviosos dorsal o ventral. Además de neuronas, presenta células similares a las de la glía, aunque no son tan numerosas como en vertebrados, con una función de soporte trófico y estructural.

El sistema reproductor es el tejido que presenta más dimorfismo sexual en el nematodo. En hermafroditas este sistema consiste en dos tubos en forma de U con simetría bilateral que se divide en gónada somática, línea germinal y un útero común, el cual se encuentra conectado con la vulva, situada ventralmente en la mitad del nematodo, comunicando con el exterior y que sirve tanto para la salida de embriones como para la entrada del esperma del macho (Figura 1.11b). La línea germinal de la hermafrodita genera tanto gametos masculinos (espermatozoides) como femeninos (oocitos). En las espermatecas, situadas a ambos lados del útero, se genera el esperma durante la fase larvaria L4. La línea germinal está altamente polarizada desde la zona distal, donde se encuentra una zona sincitial en la que se da exclusivamente mitosis, hasta la zona proximal, donde se da la meiosis dando lugar a los oocitos. El sistema reproductor del macho presenta una gónada un único lóbulo que consta de una parte somática, la línea germinal y una vesícula seminal que almacena el esperma. La vesícula seminal se conecta a través de un vaso deferente con la cloaca y con las espículas copulatorias para expulsar el esperma durante la cópula (Figura 11.1c). Al igual que en la hermafrodita, la línea germinal del macho presenta polaridad distal-proximal desde una zona mitótica hasta una meiótica.

1.5.3. *C. elegans* como organismo modelo.

C. elegans se ha convertido en un prominente modelo para el estudio de varios aspectos de la biología debido a varias características ventajosas como son su pequeño tamaño (los individuos adultos miden aproximadamente 1mm), un ciclo de vida corto y una vida media de los adultos de unas 2-3 semanas. Además, este nematodo es transparente durante todos los estadios de su desarrollo y vida adulta, lo que ha permitido trazar completamente los linajes celulares embriónicos y post-embriónicos *in vivo* mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) (Sulston & Horvitz, 1977; Sulston *et al*, 1983). La transparencia del animal ha permitido también el uso de reporteros fluorescentes para investigar el patrón de expresión de genes y sus proteínas, además de su localización a nivel de tejido y en compartimentos subcelulares, así como para el estudio de procesos del desarrollo, búsqueda de mutaciones que afectan al desarrollo y función de las células y la caracterización de interacciones proteicas *in vivo* (Chalfie *et al*, 1994; Boulin *et al*, 2006; Feinberg *et al*, 2008).

En condiciones de laboratorio, *C. elegans* es cultivado en placas con agar sembradas con cepas no patógenas de *Escherichia coli*, lo que supone que puede ser mantenido con un bajo coste y facilidad de manejo. Además, también pueden ser cultivados en medio líquido, obteniéndose un número elevado de nematodos (Corsi *et al*, 2015).

El genoma de *C. elegans* fue el del primer organismo multicelular secuenciado (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Posee en torno a 19.000 genes, de los que el 60-80% poseen ortólogo en humanos y que el 40% de los genes asociados a enfermedades humanas tienen un ortólogo en *C. elegans* (Kaletta & Hengartner, 2006; Culetto & Sattelle, 2000). El uso de mutágenos permite la realización de escrutinios genéticos para encontrar mutantes con un particular fenotipo que, por comparación con el animal silvestre, permite establecer el papel de dicha mutación (Kutscher & Shaham, 2014; Brenner, 1974). El uso de ARN de interferencia (ARNi) es otro método bien establecido, el cual permite el silenciamiento temporal de genes para investigar la función de dichos genes en *C. elegans*. Mediante esta técnica, es posible reducir la actividad de un gen usando ARN de doble cadena, el cual es generado por una bacteria transformada con un plásmido que incorpora parte de la región codificante del gen a silenciar y con la que *C. elegans* es alimentado (Lisa

Timmons & Andrew Fire, 1998). Más reciente es el uso de la edición genética mediante la técnica CRISPR/Cas9, la cual permite generar modificaciones heredables dentro del genoma de *C. elegans* (Friedland *et al*, 2013). Gracias a esta técnica es posible la generación de pequeñas inserciones o deleciones de forma dirigida, o la integración de largos fragmentos de ADN dentro del genoma, incluyendo genes exógenos en una sola copia como, por ejemplo, aquellos genes que codifican para reporteros fluorescentes (Dickinson & Goldstein, 2016).

Todas las características que presenta *C. elegans*, junto con la posibilidad de la aplicación de técnicas de manipulación genética establecidas y emergentes, son la clave del éxito y la continua relevancia de *C. elegans* como organismo modelo.

1.5.4. *C. elegans* como modelo de enfermedades neurodegenerativas.

C. elegans ha sido ampliamente utilizado como modelo de estudio de estas patologías, principalmente mediante la expresión de proteínas humanas con capacidad de formar agregados en diferentes órganos del animal.

1.5.4.1. Modelos de A β .

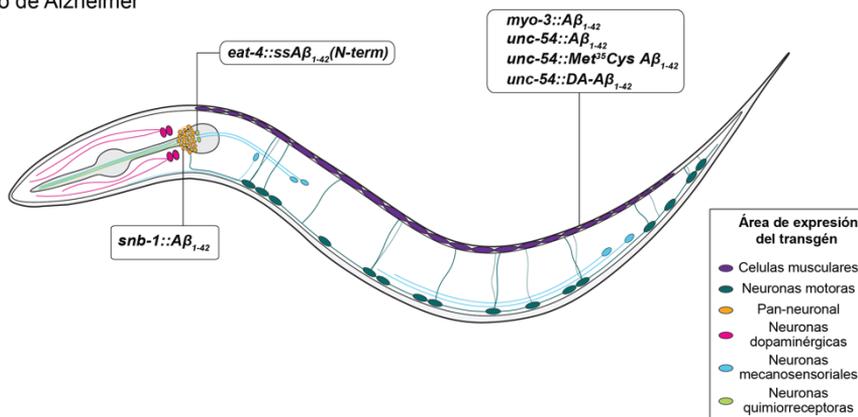
Como se describió anteriormente, una de las características de la enfermedad de Alzheimer es la presencia de placas insolubles del péptido A β en el cerebro. En mamíferos, el péptido A β es generado a partir del procesamiento de la proteína transmembrana APP mediante la acción secuencial de dos proteasas, la β -secretasa y la γ -secretasa. En *C. elegans*, la proteína APL-1 comparte un 71% de similitud con el dominio transmembrana de la APP humana, sin embargo, carece de un dominio A β (Daigle & Li, 1993). Además, no existe un ortólogo claro de la β -secretasa humana en el nematodo (Link, 2006). Esto hace que los modelos de *C. elegans* para la recapitulación de la enfermedad de Alzheimer deban ser generados mediante la sobreexpresión de forma constitutiva o inducible del péptido A β humano (Figura 1.12) y que la evaluación de la agregación se haga sin interferencia de un péptido A β endógeno en el nematodo.

El modelo original y más comúnmente usado expresa el péptido A β humano bajo el control del promotor del gen *unc-54* de *C. elegans* que codifica para una miosina muscular, de forma que el péptido A β humano se expresa de forma constitutiva en

las células musculares del animal donde agrega en el citoplasma (Link, 1995). Este modelo muestra una parálisis progresiva dependiente de la edad a 20°C, parálisis que ocurre más rápidamente y es más severa cuando los animales son crecidos a 25°C. Este fenotipo permite correlacionar la parálisis de estos animales con la agregación del péptido Aβ visualizada por marcaje con tioflavina S (Link, 1995)..

Posteriormente se han desarrollado otros modelos más elaborados que recapitulan la enfermedad de Alzheimer en *C. elegans*, y aunque la mayoría de ellos expresan el péptido Aβ humano en células musculares (Link, 1995; Yatin *et al*, 1999; Mccoll *et al*, 2012; Drake *et al*, 2003), también existen modelos que expresan el péptido Aβ en neuronas y que han demostrado la formación de depósitos amiloides así como una neurodegeneración dependiente del envejecimiento (Treusch *et al*, 2011; Link, 2006; Wu *et al*, 2006; Gallrein *et al*, 2021).

Modelo de Alzheimer



Modelo	Expresión	Fenotipos
<i>Is[unc-54::Aβ₁₋₄₂]</i>	Constitutivo muscular	Parálisis dependiente del envejecimiento y formación de depósitos amiloides.
<i>Is[unc-54::Met²⁵Cys Aβ₁₋₄₂]</i>	Constitutivo muscular	No formación de depósitos amiloides, ni incremento de estrés oxidativo.
<i>smg-1(cc546); Is[snb-1::Aβ₁₋₄₂ + mtl-2::gfp]</i>	Inducible pan-neuronal	Quimiotaxis defectiva, formación de depósitos amiloides e hipersensibilidad a serotonina.
<i>smg-1(cc546); Is[myo-3::Aβ₁₋₄₂::let UTR) + rol-6(su1006)]</i>	Inducible muscular	Rápida parálisis, estrés oxidativo que precede a la formación de fibras Aβ.
<i>dvlIs100[CL354(unc-54::DA-Aβ₁₋₄₂) + CL26(mtl-2::gfp)]</i>	Constitutivo muscular	Parálisis severa a 25°C.
<i>Is[eat-4::ssAβ₁₋₄₂(N-term) + eat-4::gfp + myo-2::mCherry]</i>	Neuronas glutamatérgicas	Pérdida de neuronas glutamatérgicas dependiente de la edad.

Figura 1.12. Lista de modelos de expresión del péptido Aβ. Se indica el genotipo, tejido de expresión y fenotipos observados. Modificado de Van Pelt & Truttmann, 2020.

1.5.4.2. Modelos de α -sinucleína.

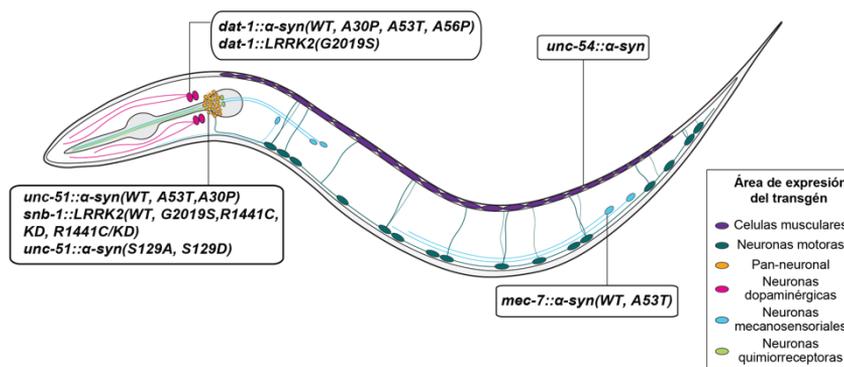
A nivel celular, la enfermedad de Parkinson es causada por la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta*, una región del ganglio basal crítica para la planificación de funciones motoras. Esta muerte neuronal es acompañada por la presencia de cuerpos de Lewy intracelulares, los cuales están constituidos principalmente por densos agregados de la proteína α -sinucleína (Poewe *et al*, 2017).

C. elegans carece de ortólogo para el gen *PARK1/SNCA*, el cual codifica para la proteína α -sinucleína, por lo que convierte al nematodo en un modelo ideal ya que permite estudiar la sobreexpresión de α -sinucleína humana sin interferencia de la proteína endógena.

Numerosos modelos de *C. elegans* para la enfermedad de Parkinson se han desarrollado expresando bien α -sinucleína o una proteína de fusión α -sinucleína::GFP bajo el control de promotores pan-neuronales (Kuwahara *et al*, 2008, 2012) o de neuronas dopaminérgicas (Figura 1.13). Ejemplo de ello es el promotor del transportador de dopamina *dat-1*, que permite la expresión de α -sinucleína humana y su asociación a neurodegeneración dopaminérgica (Karpinar *et al*, 2009; Lakso *et al*, 2003; Liu *et al*, 2011).

También se han desarrollados modelos que expresan α -sinucleína fusionada a GFP o YFP en células musculares bajo el promotor del gen *unc-54*, lo que permite la cuantificación de agregados de α -sinucleína a lo largo del envejecimiento del animal, y que, además, han servido para realizar cribados genéticos basados en ARN de interferencia en busca de moduladores genéticos de la agregación de la proteína α -sinucleína (Hamamichi *et al*, 2008; Van Ham *et al*, 2008). Los trabajos con estos modelos permiten la identificación de nuevos genes que ofrecen protección frente a la toxicidad de α -sinucleína, así como el desarrollo de nuevos tratamientos.

Modelo de Parkinson



Modelo	Expresión	Fenotipos
<i>Is[dat-1::α-syn (WT, A53T) + dat-1::gfp]</i>	Neuronas dopaminérgicas	Pérdida neuronal y roturas dendríticas en animales WT y A53T.
<i>Is[unc-54::α-syn::yfp + unc-119(+)]</i>	Constitutivo muscular	Formación de cuerpos de inclusión durante el envejecimiento.
<i>Is[unc-54::α-syn::gfp + rol-6(su1006)]</i>	Constitutivo muscular	Acumulación de agregados de α-sinucleína.
<i>Is[unc-51::α-syn(WT, A53T, A30P) + unc-51::egfp]</i>	Constitutivo pan-neuronal	Sin disfunción motora ni defectos en el desarrollo; ARNi de AP-2 induce anomalías motoras/crecimiento.
<i>Is[mec-7::α-syn(WT, A53T) + rol-6(su1006)]</i>	Neuronas mecanosensoriales	Defecto moderado en respuesta al contacto, defecto en la transmisión neuromuscular.
<i>Is[dat-1::α-syn(A30P, A53T, A56P) + dat-1::mCherry]</i>	Neuronas dopaminérgicas	Pronunciada neurodegeneración, pérdida de neuronas dopaminérgicas.
<i>lin-15(n765ts); w1z1s1-7[snb-1::lrrk2(WT, G2019S, R1441C, KD, R1441C/KD) + mec-4::gfp; lin-15(+)]</i>	Constitutivo pan-neuronal	WT LRRK2 protege frente a disfunción mitocondrial. G2019S: neuronas dopaminérgicas vulnerables a estrés mitocondrial.
<i>unc-51::α-syn(S129A, S129D) + unc-51::egfp</i>	Constitutivo pan-neuronal	Disfunción motora severa durante el desarrollo temprano, retraso en crecimiento, sinapsis anormal.
<i>baln20[dat-1::lrrk2(G2019S) + dat-1::gfp]</i>	Neuronas dopaminérgicas	Progresiva neurodegeneración de n. dopaminérgicas. Disminución de dopamina acompañada por locomoción.

Figura 1.13. Lista de modelos de expresión de la proteína α-sinucleína. Se indica el genotipo, tejido de expresión y fenotipos observados. Modificado de Van Pelt & Truttmann, 2020.

1.5.4.3. Modelos de poliglutaminas.

La base molecular de las enfermedades de poliglutaminas subyace en la expansión patológica del aminoácido glutamina en distintas proteínas. Como se describió anteriormente (Introducción 1.2.3.), existen nueve enfermedades de poliglutaminas que se diferencian en la proteína afectada y el umbral de repeticiones de glutaminas que desencadena la enfermedad (Lieberman *et al*, 2019). De forma general, en individuos sanos, las repeticiones se encuentran entre 35-50 glutaminas, dependiendo de la proteína afectada. Sin embargo, las proteínas que dan lugar a estas patologías contienen más de 40 repeticiones, alcanzando sobre 100 glutaminas en algunas condiciones (Adegbuyiro *et al*, 2017; Todd & Lim, 2013).

Varios modelos de enfermedades de poliglutaminas han sido generados en *C. elegans*, los cuales han permitido ampliar el conocimiento sobre los procesos patológicos relacionados con la agregación de proteínas y alteración de la proteostasis que comparten esta familia de enfermedades neurodegenerativas. Ejemplo de ello es el modelo de Huntington, en el que varios grupos de animales transgénicos que expresan repeticiones de poliQ fusionadas a fragmentos de la huntingtina humana en neuronas, han permitido estudiar esta enfermedad (Faber *et al*, 1999; Bates *et al*, 2006; Faber *et al*, 2002; Lee *et al*, 2017).

Sin embargo, la aproximación más popular en el uso de *C. elegans* como modelo para enfermedades de poliglutamina, es fusionar repeticiones puras de diferentes tamaños de poliQ con proteínas reporteras fluorescentes, como GFP o YFP (Figura 1.14) (Morley *et al*, 2002; Satyal *et al*, 2000). Estas proteínas formadas solamente por repeticiones de glutamina son suficientes para formar agregados en los diferentes tejidos de *C. elegans* donde son expresadas y, además, la fusión con proteínas fluorescentes permite la observación y cuantificación de estos agregados *in situ*.

Al igual que en otros modelos de enfermedades neurodegenerativas, las proteínas poliQ han sido expresadas en diferentes tejidos del animal (Figura 1.14) y se ha comprobado que *C. elegans* permite recapitular la patología dependiente de longitud que presentan las enfermedades de poliglutaminas (Brignull *et al*, 2006a; Teixeira-Castro *et al*, 2011; Gidalevitz *et al*, 2006). Como ejemplo, la expresión de la proteína humana ataxina-3 (ATXN3) en neuronas de *C. elegans* ha sido utilizado como modelo para el estudio de patogenicidad de la enfermedad de Machado-Joseph (o ataxia espinocerebelar tipo 3). En este modelo, la expresión de ATXN3 con diferente número de repeticiones de glutamina, da lugar a un consistente patrón de agregación que afecta a las neuronas de los cordones dorsal y ventral del animal (Teixeira-Castro *et al*, 2011).

Modelo de poliglutaminas

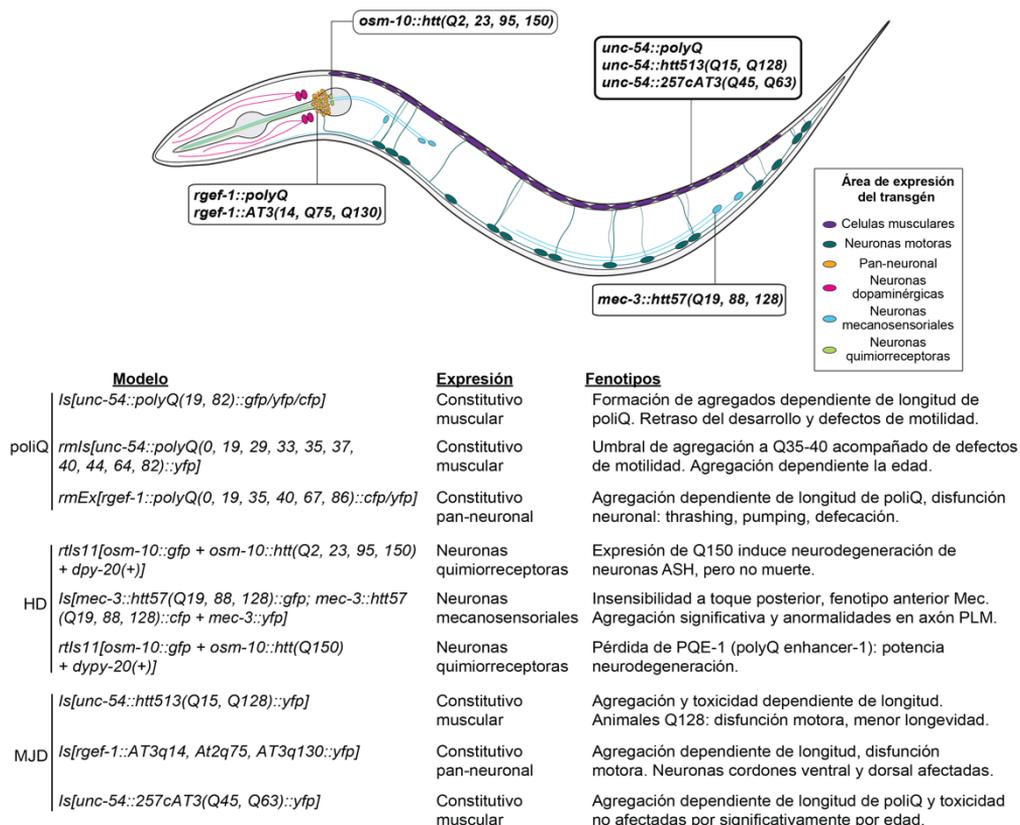


Figura 1.14. Lista de modelos de expresión de proteínas poliQ. Se indica el genotipo, tejido de expresión y fenotipos observados. Los modelos generales de enfermedades de poliglutaminas se indican como poliQ; los modelos para las enfermedades de Huntington y Machado Joseph se engloban dentro de HD y MJD, respectivamente. Modificado de Van Pelt & Truttmann, 2020.

1.5.5. Mantenimiento de la homeostasis redox de grupos tiólicos en *C. elegans*.

La oxidación reversible del grupo tiol de las cisteínas supone una forma de regulación redox que controla un amplio rango de funciones de las proteínas, incluyendo la regulación de su actividad, estabilización de su estructura, formación de complejos de activación y control de su distribución (Kemp *et al*, 2008). Cambios en el estado redox de los grupos tiol pueden alterar tanto la conformación como la función de las proteínas, ya que la oxidación de las cisteínas conlleva modificaciones postraduccionales, tanto reversibles (formación de puentes disulfuro o glutationilación) como irreversibles (SO₂H o SO₃H) (Moldogazieva *et al*, 2018). La abundancia de los residuos de cisteína en las proteínas incrementa con la

complejidad de los organismos, desde aproximadamente un 0,5% de cisteínas en arqueas hasta unos 2,25% en mamíferos. En *C. elegans*, el porcentaje de cisteínas que presenta su proteoma es del 1,97%, similar al de humanos (Miseta & Csutora, 2000). Por otro lado, análisis de los genes que codifican los principales sistemas que mantienen la homeostasis redox de los grupos tiol, muestran que existe gran similitud entre las proteínas humanas y de *C. elegans* (Johnston & Ebert, 2012), haciendo de este nematodo un modelo útil para el estudio de los mecanismos de regulación del estado redox de los grupos tiol del proteoma.

El mantenimiento de los grupos tiol de las proteínas en su estado reducido, tanto en el citoplasma como en las mitocondrias, es llevado a cabo por los sistemas tiorredoxina y glutatión. En *C. elegans*, el sistema tiorredoxina está compuesto por varias tiorredoxinas (entre ellas, TRX-1 a TRX-5, DNJ-27, PNG-1, TXL-1) y dos tiorredoxinas reductasas (TRXR-1, citoplasmática y TRXR-2, mitocondrial) responsables de la reducción de las tiorredoxinas oxidadas a sus formas reducidas utilizando NADPH como cofactor (Feleciano *et al*, 2016; Johnston & Ebert, 2012). Por otro lado, el sistema glutatión está formado en *C. elegans* por cinco glutarredoxinas (GLRX-3, GLRX-5, GLRX-10, GLRX-21 y GLRX-22) (Johnston & Ebert, 2012), el tripéptido glutatión (GSH), responsable de la reducción no enzimática de las glutarredoxinas, quedando éste oxidado (GSSG) y una única glutatión reductasa (GSR-1), la cual convierte el glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida (GSH) utilizando como cofactor NADPH (Lüersen *et al*, 2013).

En mamíferos, la deficiencia en la síntesis de GSH debida a mutaciones en los genes que codifican para las enzimas γ -glutamilcisteína sintetasa y glutatión sintetasa, conlleva letalidad embrionaria (Shi *et al*, 2000). Sin embargo, la falta de glutatión reductasa es completamente viable (Rogers *et al*, 2004). Una posible explicación de este hecho puede ser por la existencia de redundancia funcional entre los sistemas glutatión y tiorredoxina. Por otro lado, mutaciones del sistema tiorredoxina citosólico y mitocondrial dan lugar a letalidad embrionaria en mamíferos (Matsui *et al*, 1996; Jakupoglu *et al*, 2005; Conrad *et al*, 2004; Nonn *et al*, 2003), aunque utilizando mutantes condicionales que permiten el funcionamiento normal del sistema tiorredoxina durante el desarrollo embrionario pero que bloquean esta ruta una vez ha finalizado esta fase, no existe problema de viabilidad (Mandal *et al*, 2010;

Suvorova *et al*, 2009), sugiriendo que en ausencia del sistema tiorredoxina, es el sistema glutatión el responsable del mantenimiento de la homeostasis redox. Esta idea es apoyada por el hecho de que la eliminación de la tiorredoxina reductasa citosólica (TrxR1) y la glutatión reductasa (GR) en hepatocitos de ratón cause letalidad, pero que el suplemento de metionina como precursor para la síntesis *de novo* de GSH mediante la ruta de transsulfuración permite la supervivencia de estas células (Eriksson *et al*, 2015).

A diferencia de mamíferos, el sistema tiorredoxina en *C. elegans* no es esencial en ninguna fase de su desarrollo, ya que mutaciones nulas en los genes de las dos tiorredoxinas reductasas que posee el nematodo (*txxr-1* y *txxr-2*) permiten la viabilidad y el desarrollo hasta el estadio adulto sin que suponga ninguna diferencia con los animales silvestres (Stenvall *et al*, 2011; Cacho-Valadez *et al*, 2012). Por el contrario, la mutación del gen *gsr-1*, que codifica para la única glutatión reductasa en *C. elegans* (Lüersen *et al*, 2013), causa letalidad embrionaria (Mora-Lorca *et al*, 2016).

1.5.6. Glutatión reductasa en *C. elegans*.

El locus *gsr-1*, que codifica para la única glutatión reductasa en *C. elegans*, está organizado en 5 exones y 4 intrones. Este gen expresa dos variantes de ARN mensajero (ARNm), *gsr-1a* y *gsr-1b1*, cuya traducción da lugar a dos isoformas de la enzima glutatión reductasa, GSR-1a y GSR-1b, presentando la primera de ellas 14 amino ácidos adicionales en posición N-terminal, que constituyen una secuencia de localización mitocondrial de la isoforma GSR-1a, mientras que la isoforma GSR-1b es la forma citoplásmica (Figura 1.15). Se han descrito otras dos variantes del ARNm, *gsr-1b2* y *gsr-1b3*, que sólo se diferencian en la secuencia de la región 5'-UTR pero que también generan la isoforma GSR-1b (<http://www.wormbase.org/>).

En un trabajo previo a esta tesis doctoral, nuestro grupo investigó la función de la enzima GSR-1 usando la cepa de *C. elegans* con la mutación *gsr-1(tm3574)*, la cual consiste en una delección de 383 pares de bases que elimina la mayor parte del dominio NADPH y parte del dominio FAD, generando una enzima GSR-1 incapaz de unirse al NADPH que es el donador de electrones para la actividad enzimática GSR-1.

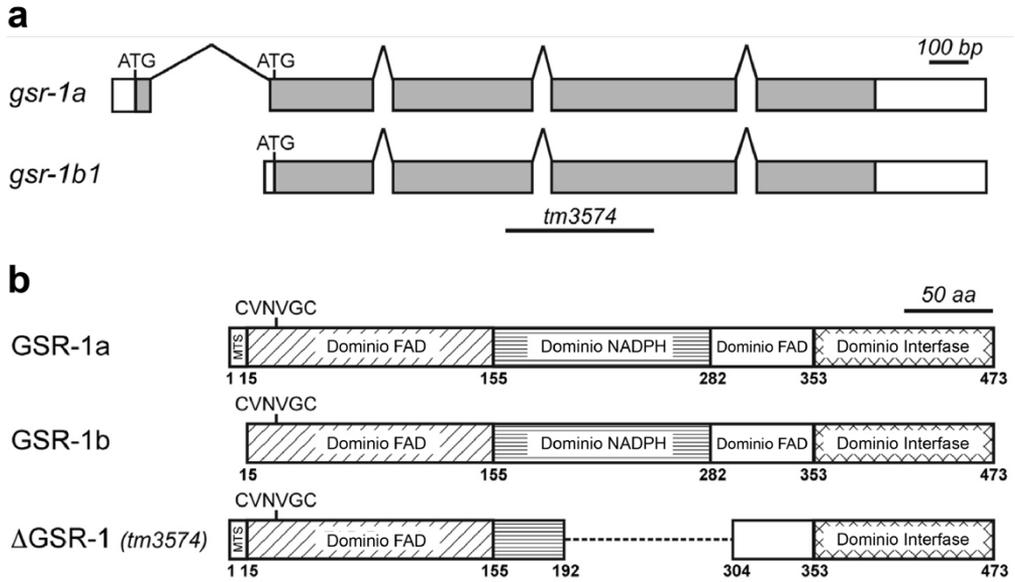


Figura 1.15. Representación del ARNm de *gsr-1* y la proteína GSR-1. a) Esquema de las dos principales variantes del ARNm del gen *gsr-1*. Los rectángulos representan los exones y las líneas los intrones. Los rectángulos blancos indican las 5'-UTR y 3'-UTR respectivamente, y las cajas grises indican el ORF. La región de la delección en el mutante *gsr-1(tm3574)* se indica mediante una línea. b) Organización de las isoformas de las proteínas GSR-1a y GSR-1b, así como de la proteína truncada Δ GSR-1 como resultado de la traducción del alelo *gsr-1(tm3574)*. Los números indican los aminoácidos que limitan cada dominio. Basado en la organización descrita para el ortólogo humano GSR (Krauth-Siegel *et al*, 1982) y modificado de (Mora-Lorca *et al*, 2016).

Los animales *gsr-1(tm3574)* presentan letalidad embrionaria (Figura 1.16), por lo que este alelo fue mantenido en heterocigosis mediante una versión del balanceador *qC1* que expresa GFP o RFP (Edgley *et al*, 2006). En la segregación de estos animales balanceados, aparecen individuos homocigotos para la mutación *gsr-1(tm3574)*, los cuales poseen un desarrollo embrionario y postembrionario normal, alcanzando el estadio adulto de forma indistinguible de los animales silvestres. Esto es debido a la contribución materna (m^+), ya sea de ARNm de *gsr-1* y/o de proteína GSR-1, que permite a los mutantes zigóticamente homocigotos (z^-) superar la letalidad embrionaria y desarrollarse completamente [individuos denominados *gsr-1(m^+,z^-)*]. Sin embargo, estos individuos no aportan carga materna a su descendencia [individuos denominados *gsr-1(m^-,z^-)*], la cual presenta letalidad embrionaria temprana (Mora-Lorca *et al*, 2016).

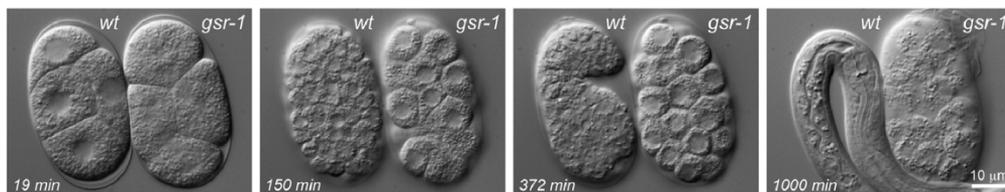


Figura 1.16. Comparación del desarrollo embrionario de animales wt y *gsr-1(m-z)*. Los animales con la mutación *gsr-1(tm3574)* en homocigosis presentan letalidad embrionaria en la fase de pregástrula (Mora-Lorca *et al*, 2016). Imágenes realizadas con DIC.

Se ha descrito que el silenciamiento del gen *gsr-1* mediante ARNi en *C. elegans* disminuye la vida media, sensibiliza al prooxidante juglona y al generador de anión superóxido paraquat y afecta negativamente al proceso de muda de los animales en ausencia de la enzima tiorredoxina reductasa (Stenvall *et al*, 2011). Estos mismos fenotipos fueron encontrados en los animales *gsr-1(m+,z-)*, indicando que la carga materna es suficiente para alcanzar el estadio adulto en condiciones de crecimiento favorables, pero que es insuficiente para ofrecer protección frente a condiciones de estrés. Además, los animales *gsr-1(m+,z-)* mostraron un claro fenotipo de fragmentación mitocondrial, una reducción en el potencial de membrana mitocondrial y una fuerte inducción de la UPR^{mit}, lo que indica que la falta de GSR-1 causa en *C. elegans* estrés y disfunción mitocondrial (Mora-Lorca *et al*, 2016).

Durante la caracterización del gen *gsr-1* comprobamos que el fenotipo de arresto embrionario de los embriones *gsr-1(m-,z-)* pudo ser rescatado expresando la enzima GSR-1 mediante los transgenes *vzEx105 [P_{gsr-1}::gsr-1::3'-UTRgsr-1; P_{unc-122}::gfp]* y *vzEx93 [P_{gsr-1}::gsr-1::gfp; rol-6(su1006)]* (este último expresando la proteína GSR-1 fusionada a GFP), lo que indica que el fenotipo de letalidad es debido a la falta de *gsr-1* y no a una mutación cercana generada por el protocolo de mutagénesis indiscriminada usado para aislar la delección *gsr-1(tm3574)*. Interesante fue el hecho de que el rescate de la letalidad embrionaria ocurrió cuando los mutantes *gsr-1(m+,z-)* expresaron la enzima GSR-1 citoplasmática (isoforma GSR-1b, mediante los transgenes *vzEx145 [P_{gsr-1}::gsr-1(Δ1st exon)::gfp]* o *vzEx147 [P_{gsr-1}::gsr-1(1st ATG->CCT)::gfp]*) pero no la mitocondrial (isoforma GSR-1a, con el transgen *vzEx158 [P_{gsr-1}::gsr-1(2nd ATG->GGT)::gfp]*), implicando que la actividad glutatión reductasa en el citoplasma, pero no en la mitocondria, es esencial para la viabilidad de *C. elegans*. Además, descartamos que la no esencialidad de GSR-1 en la mitocondria fuese debida a redundancia entre los sistemas glutatión y tiorredoxina

en este orgánulo, ya que la letalidad embrionaria de animales *gsr-1(m-,z-)* fue rescatada mediante la expresión de la GSR-1 citoplasmática aún eliminando la TRXR-2 mitocondrial con la mutación *trxr-2(tm2047)*. Estos datos plantean la posibilidad de que el GSSG mitocondrial pudiese ser reducido por otro sistema aún no descrito en ausencia de GSR-1 y TRXR-2, o alternativamente, que el GSSG generado en la mitocondria pudiese ser exportado al citoplasma para su reducción por GSR-1 en esa localización.

Capítulo II. Justificación y Objetivos.

En condiciones basales sin estrés, el citoplasma de las células eucariotas es mantenido en un estado reducido para favorecer la estabilización de los grupos tiol libres, mientras que el lumen del RE se encuentra más oxidado para promover la formación de puentes disulfuro (Go & Jones, 2008; Hwang *et al*, 1992). Sin embargo, el estado redox de estos compartimentos se invierte ante diferentes estreses como el envejecimiento, la agregación de proteínas o la inhibición de la degradación de proteínas por parte del proteasoma, de modo que en respuesta a estos estreses proteotóxicos crónicos, el citoplasma se vuelve más oxidante, mientras que el RE cambia a un estado más reductor (Kirstein *et al*, 2015).

Este efecto de la alteración de la homeostasis redox como consecuencia de un estrés proteotóxico supuso el punto de partida del desarrollo de esta tesis doctoral, en la que nos planteamos explorar esta misma idea, pero en sentido inverso, es decir, si la pérdida de la homeostasis redox podría promover la agregación de proteínas. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Caracterizar el efecto de la mutación *gsr-1* en modelos de agregación de proteínas.
2. Evaluar el papel del GSH como modulador general de la proteostasis celular.
3. Identificar los mecanismos moleculares que median el efecto modulador del GSH en el mantenimiento de la proteostasis celular.

Capítulo III. Resultados.

3.1. Efecto del silenciamiento del gen *gsr-1* mediante ARN de interferencia en modelos de agregación de proteínas en *C. elegans*.

En un trabajo previo del grupo se llevó a cabo un ensayo de ARN de interferencia de todos los genes de la familia de las tiorredoxinas, glutarredoxinas y peroxirredoxinas en dos estirpes transgénicas de *C. elegans*, que sobreexpresan el péptido β -amiloide ($A\beta$) y la proteína α -sinucleína (α -SYN), respectivamente, en células musculares (Tabla 3.1). El objetivo de este ensayo era determinar si el mantenimiento de la homeostasis redox podía tener un papel protector en el desarrollo y progresión de enfermedades que cursan con agregación patológica de proteínas como el Alzheimer o el Parkinson, usando para ello el nematodo *C. elegans* como modelo preclínico.

Para el modelo de la enfermedad de Alzheimer se utilizó la estirpe CL647 que porta el transgén *dvIs27 [Pmyo-3::A β 1-42::let-851 3'-UTR]* y que expresa el péptido $A\beta$ humano en las células musculares de forma inducible por temperatura, causando en los animales un fenotipo de parálisis cuando éstos pasan de una temperatura de crecimiento de 16°C a 23°C (Drake *et al*, 2003). En el caso del modelo de la enfermedad de Parkinson, se empleó la estirpe UA50 que porta el transgén *baln13 [Punc-54:: α -syn::gfp]*, que expresa en células musculares la proteína α -sinucleína humana fusionada a GFP (α -SYN::GFP), la cual agrega conforme el animal envejece (Hamamichi *et al*, 2008). En el primer modelo se cuantifica la parálisis de los animales y en el segundo la formación de agregados fluorescentes en las células musculares.

Como resultado de este estudio se concluyó que, entre todos los genes ensayados, el silenciamiento de solamente dos genes, *dnj-27* y *gsr-1*, tuvo efecto en ambos modelos provocando una parálisis más temprana en animales expresando $A\beta$ y una mayor agregación de la proteína α -SYN::GFP (Tabla 1). El papel del gen *dnj-27* (que codifica una proteína del retículo endoplásmico con cuatro dominios tiorredoxina) en la proteostasis celular ha sido previamente descrita por otros miembros de nuestro grupo (Muñoz-Lobato *et al*, 2014).

Resultados

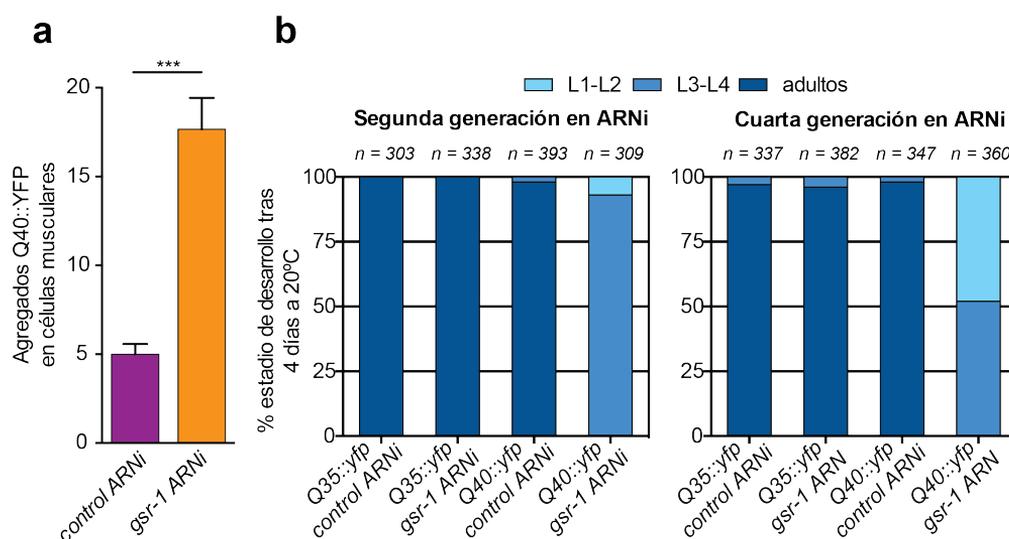
Tabla 3.1. Efecto del silenciamiento por ARNi de los genes de las familias tiorredoxina, glutarredoxina y peroxirredoxina sobre los fenotipos de parálisis y agregación de las estirpes CL647 (que expresa el péptido A β) y UA50 (que expresa la proteína α -SYN), respectivamente.

Categoría	Nombre del gen	Fenotipo en CL647(Aβ)	Fenotipo en UA50(α-SYN)
Tiorredoxinas y tiorredoxinas reductasas	<i>trx-1</i>	Disminuye parálisis	-
	<i>trxr-1</i>	Aumenta parálisis	-
	<i>trx-2</i>	-	-
	<i>trxr-2</i>	Aumenta parálisis	-
	<i>trx-3</i>	Aumenta parálisis	-
	<i>trx-4</i>	-	-
	<i>trx-5</i>	-	-
	<i>dnj-27</i>	Aumenta parálisis	Mayor agregación
	<i>txl-1</i>	-	-
Glutarredoxinas y glutación reductasa	<i>glrx-5</i>	No ensayado ^a	No ensayado ^a
	<i>glrx-10</i>	-	Mayor agregación
	<i>glrx-21</i>	-	Mayor agregación
	<i>glrx-22</i>	-	Mayor agregación
	<i>gsr-1</i>	Aumenta parálisis	Mayor agregación
Peroxirredoxinas	<i>prdx-2</i>	No ensayado ^a	No ensayado
	<i>prdx-3</i>	Aumenta parálisis	-
	<i>prdx-6</i>	Aumenta parálisis	-

Aquellos casos en los que el ARNi del gen no produjo ningún efecto están representados con un guión. ^a No se pudo ensayar porque el tratamiento con ARNi produjo un fenotipo de letalidad o de arresto embrionario (Muñoz-Lobato *et al*, 2014).

En la presente tesis nos enfocamos en la caracterización molecular del efecto protector del gen *gsr-1* frente a la agregación de proteínas y en el mantenimiento de la proteostasis. El gen *gsr-1* codifica para la única glutación reductasa presente en *C. elegans*, la cual obtiene poder reductor del NADPH que usa para convertir el glutación oxidado (GSSG) en glutación reducido (GSH). El GSH, tal y como se detalla en el apartado de la introducción, es el antioxidante enzimático más importante de la célula debido a su abundancia y multifuncionalidad, siendo capaz de reaccionar directamente con EROs, detoxificar compuestos xenobióticos, actuar como cofactor de enzimas antioxidantes o participar en la señalización redox mediante glutationilación (Aquilano *et al*, 2014; Deponte, 2013).

Como primer paso, y para ampliar los resultados obtenidos previamente en los modelos de Alzheimer y Parkinson, realizamos ensayos de ARNi del gen *gsr-1* en un modelo de enfermedades por repetición de residuos de glutamina (poliQ) que constituyen la base molecular de enfermedades neurodegenerativas como el Huntington o las Ataxia de Friedreich y Machado-Joseph, entre otras (Lieberman *et al*, 2019). Para ello usamos la estirpe AM141 que porta el transgén *rmls133 [Punc-54::Q40::yfp]* y que expresa en células musculares un polipéptido de 40 repeticiones de glutamina fusionado a YFP en su extremo C-terminal, de modo que permiten la visualización y cuantificación de agregados poliQ mediante microscopía de fluorescencia (Morley *et al*, 2002). El silenciamiento del gen *gsr-1* en animales que expresan Q40::YFP supuso un incremento en el número de agregados con respecto a la agregación que presentaron los individuos crecidos con el ARNi control (Figura 3.1a). Además, tras dos generaciones en ARNi de *gsr-1*, la estirpe que expresaba Q40::YFP mostró un fenotipo de arresto larvario, fenotipo que fue exacerbado a las cuatro generaciones. Este efecto en el desarrollo del ARNi de *gsr-1* no se observó en animales que expresaban el polipéptido de 35 repeticiones de glutamina fusionado a YFP (Q35::YFP) a partir del transgén *rmls132 [Punc-54::Q35::yfp]* y que se usa como control de agregación ya que 35 repeticiones de glutamina se consideran como el umbral de agregación de este modelo y que coincide con el umbral de patogenicidad para la enfermedad de Huntington (Morley *et al* 2002) (Figura 3.1b).



◀ **Figura 3.1. Efecto del silenciamiento por ARNi de *gsr-1* en animales que expresan Q35::YFP y Q40::YFP en células musculares.** a) El ARNi de *gsr-1* incrementa el número de agregados de Q40::YFP. Los datos corresponden con la media de dos experimentos independientes (n=12 por ensayo y condición) realizados a día 3 tras la puesta sincronizada. La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ***p<0.001, usando *t-test* de dos colas. b) El silenciamiento por ARNi de *gsr-1* provoca un retraso en el desarrollo de los animales que expresan Q40::YFP, evidente tras dos generaciones, siendo más penetrante a la cuarta generación. n= número total de animales ensayados en tres experimentos independientes

Dado que en el modelo de poliQ observamos no sólo un incremento de la agregación, sino también un claro efecto en el desarrollo del animal tras varias generaciones en ARNi de *gsr-1*, quisimos volver a evaluar este fenotipo de desarrollo en ensayos de ARNi en los animales que expresan Aβ y α-SYN. En el primer caso usamos una estirpe CL2006 que porta el transgén *dvIs2 [Punc-54::Aβ 3-42::unc-54 3'-UTR]* y que expresa Aβ de forma constitutiva en células musculares (Link, 1995), a diferencia del modelo descrito anteriormente, que expresaba Aβ de forma inducible por temperatura a partir del transgén *dvIs27*. En este modelo, los animales *dvIs2* muestran un fenotipo de parálisis progresiva dependiente de temperatura, siendo ésta más rápida a 20°C que a 16°C. Pese a que los animales que expresan Aβ sometidos a ARNi de *gsr-1* presentaron un claro incremento de la parálisis a 16°C en comparación con aquellos individuos crecidos en ARNi control (Figura 3.2a), el ARNi de *gsr-1* no provocó ningún efecto en el desarrollo de los mismos (Figura 3.2b).

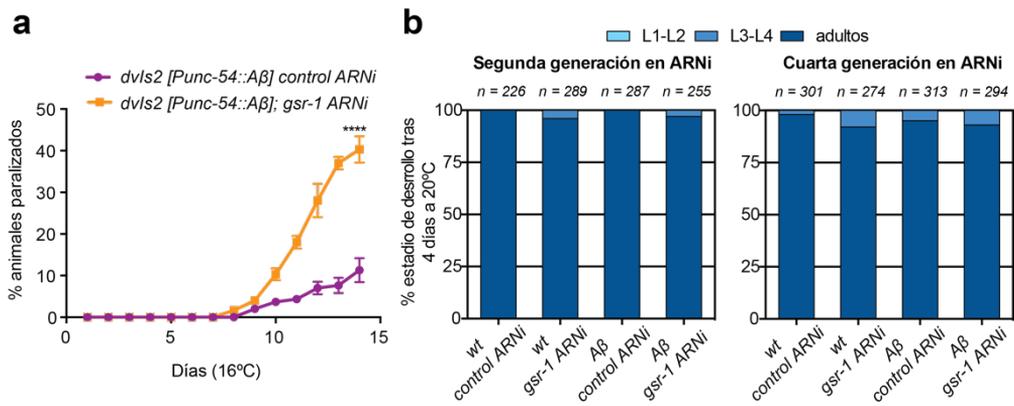


Figura 3.2. Efecto del silenciamiento por ARNi de *gsr-1* en animales que expresan el péptido Aβ humano en células musculares. a) La parálisis de los animales *dvIs2* se incrementa ante el silenciamiento por ARNi de *gsr-1* a la temperatura permisiva de 16°C. Los datos corresponden con la media de dos experimentos independientes (n=25 por ensayo y condición). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.0001, mediante el test log-rank (Mantel-Cox). b) El silenciamiento por ARNi de *gsr-1* no provoca ningún retraso en el desarrollo de los animales que expresan el péptido Aβ. n= número total de animales ensayados en tres experimentos independientes.

Por último, empleamos un modelo adicional de la enfermedad de Parkinson mediante la estirpe NL5901 que porta el transgén *pkl52386 [Punc-54:: α -syn::yfp]* y que expresa la proteína α -SYN fusionada a YFP en células musculares (Van Ham *et al*, 2008). En este caso se observó un incremento significativo de la agregación de α -SYN::YFP causado por el silenciamiento de *gsr-1* (Figura 3.3a) pero tampoco observamos ningún efecto en el desarrollo (Figura 3.3b), de forma similar a lo que describimos para los animales que expresan A β .

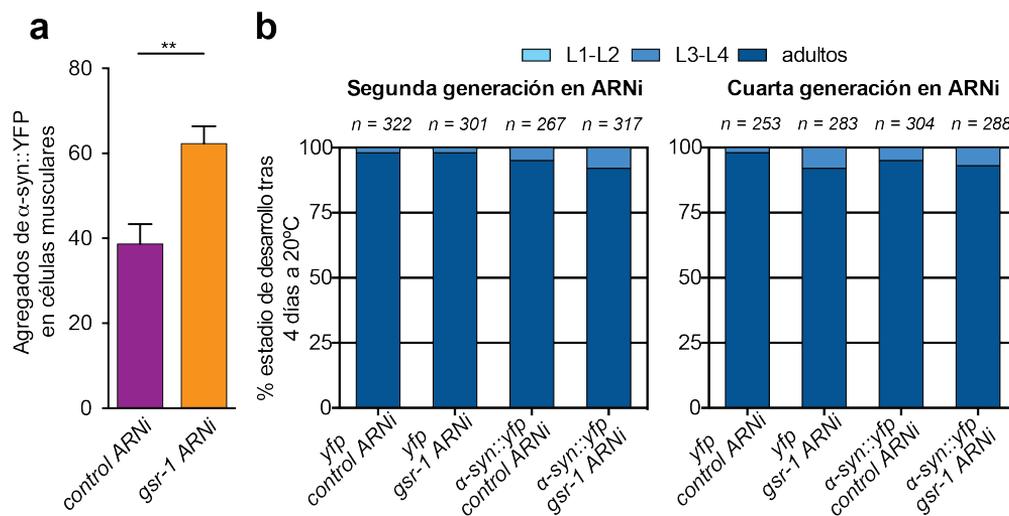


Figura 3.3. Efecto del silenciamiento por ARNi de *gsr-1* en animales que expresan la proteína α -sinucleína en células musculares. a) El ARNi de *gsr-1* incrementa el número de agregados de α -SYN::YFP. Los datos corresponden con la media de dos experimentos independientes (n=12 por ensayo y condición). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). **p<0.01, usando *t-test* de dos colas. **b)** El silenciamiento por ARNi de *gsr-1* no provoca ningún retraso en el desarrollo de los animales que expresan la proteína α -SYN::YFP. n= número total de animales ensayados en tres experimentos independientes.

En su conjunto, estos resultados en los que se observó que el silenciamiento del gen *gsr-1* supuso un aumento en la agregación o parálisis de los modelos estudiados, así como en algunos casos, un retraso en el desarrollo, sugieren que la disminución de la expresión de *gsr-1* tiene un efecto deletéreo en el mantenimiento de la proteostasis celular en distintos modelos de agregación de proteínas.

3.2. Efecto de la inhibición de la síntesis, reducción y disponibilidad del glutatión reducido.

Tras comprobar que el silenciamiento de *gsr-1* provoca un empeoramiento de los fenotipos derivados de la agregación de proteínas, nos propusimos fenocopiar dichos

resultados con diferentes compuestos que afectan a la disponibilidad del GSH en *C. elegans*. Para ello, empleamos la butionina sulfoximina (BSO, un inhibidor de la γ -glutamil cisteil sintetasa que cataliza la primera reacción en la síntesis del GSH) (Ford *et al*, 1996); 1,3-Bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU, un inhibidor de la glutatión reductasa) (Frischer & Ahmad, 1977) y dietilmaleato (DEM, un compuesto que alquila e inactiva al GSH) (Boyland & Chasseaud, 1967).

Decidimos tratar con estos fármacos animales que expresan Q35::YFP y Q40::YFP en células musculares y comprobar si existía algún fenotipo deletéreo desde su desarrollo embrionario hasta la etapa adulta. Tras partir de una puesta sincronizada de huevos, observamos que ninguno de los tratamientos utilizados causó efecto alguno en los animales que expresaban Q35::YFP, los cuales alcanzaron la edad adulta sin mostrar ninguna alteración en su desarrollo (Figura 3.4). Sin embargo, los animales Q40::YFP sufrieron arresto en el desarrollo larvario al estar expuestos a cada uno de los tres inhibidores (Figura 3.4), consistente con el umbral de patogenicidad descrito para este modelo de 35 residuos de poliglutamina (Morley et al 2002). Este fenotipo de parada en el desarrollo larvario tuvo diferente grado de penetrancia en cada uno de los tratamientos, siendo el más destacable el fenotipo de los animales tratados con DEM, en el que todos los animales interrumpieron su desarrollo en los primeros estadios larvarios L1-L2.

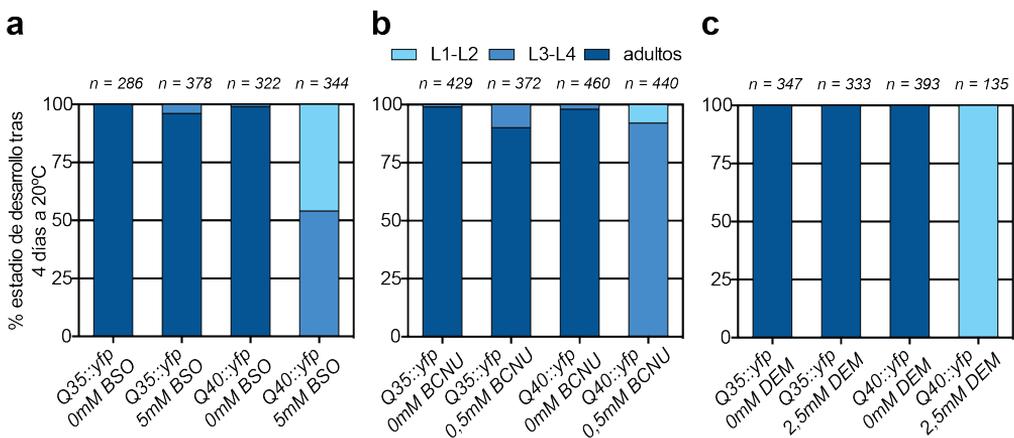


Figura 3.4. Efecto de la inhibición de los genes que afectan a la disponibilidad de GSH en animales que expresan proteínas Q35::YFP y Q40::YFP en células musculares. La inhibición química de (a) la síntesis de GSH mediante BSO, (b) la reducción de GSSG mediante BCNU y (c) la depleción de GSH mediante DEM provoca arresto larvario en animales que expresan Q40::YFP pero no Q35::YFP. n = número total de animales ensayados en tres experimentos independientes.

Estos experimentos demuestran que la disminución de los niveles de GSH mediante el uso de inhibidores específicos de la síntesis, reducción y disponibilidad del glutatión aumenta los fenotipos asociados a la agregación de proteínas y refuerzan los datos obtenidos previamente con el silenciamiento por ARNi de *gsr-1*.

3.3. Efecto de la mutación *gsr-1(tm3574)* en modelos de agregación de proteínas exógenas en *C. elegans*.

Una vez demostrada (farmacológicamente y por silenciamiento del gen *gsr-1*) la relación entre una menor disponibilidad de GSH y la alteración de la proteostasis celular, el siguiente objetivo que nos propusimos fue confirmar dichos resultados mediante la utilización de animales mutantes para el gen *gsr-1*. Para ello, usamos el alelo *gsr-1(tm3574)*, que consiste en una delección de 383pb que elimina parte del tercer exón, el tercer intrón y parte del cuarto exón del gen *gsr-1* (Figura 1.14). Este alelo codifica una proteína GSR-1 que carece de la mayor parte del dominio de unión a NADPH y parte del segundo dominio FAD y que carece de actividad enzimática glutatión reductasa *in vitro* (Mora-Lorca *et al*, 2016). Por tanto, *gsr-1(tm3574)* es un alelo de pérdida de función.

Los mutantes *gsr-1(tm3574)* homocigotos tienen un fenotipo de letalidad embrionaria con un 100% de penetrancia, por lo que esta mutación se mantiene en heterocigosis mediante el balanceador qC1 que lleva incorporado GFP o RFP (Mora-Lorca *et al*, 2016; Edgley *et al*, 2006). Así, un 25% de la descendencia de los animales balanceados dará lugar a individuos con la mutación *gsr-1(tm3574)* en homocigosis (*z-*) que, gracias al aporte materno (*m+*) bien de ARN mensajero de *gsr-1*, bien de la propia proteína GSR-1 o ambos, consiguen alcanzar la edad adulta sin aparente fenotipo visible [individuos denominados *gsr-1(m+,z-)*]. No obstante, los animales adultos *gsr-1(m+,z-)* no aportan la carga materna a la siguiente generación, de forma que su descendencia [individuos denominados *gsr-1(m-,z-)*] presenta arresto embrionario.

Por tanto, la viabilidad durante una generación de los animales *gsr-1(m+,z-)* posibilita la evaluación del efecto de la mutación *gsr-1* en homocigosis sobre los diferentes modelos de agregación que nos propusimos ensayar y así, validar los resultados previos obtenidos mediante ARNi y tratamientos farmacológicos.

3.3.1. Modelos de agregación por repeticiones de residuos de glutamina.

Como se comentó anteriormente, las enfermedades de poliglutamina se caracterizan por la agregación de proteínas que presentan repeticiones del aminoácido glutamina, siendo su patogenicidad dependiente de la longitud de dichas repeticiones (Brignull *et al*, 2006b).

Para el estudio del efecto de la deficiencia de *gsr-1* en modelos de enfermedades de poliglutamina, generamos animales *gsr-1(m+,z-)* en fondos genéticos que expresaban Q35::YFP y Q40::YFP en células musculares (a partir de los transgénos *rmls132 [Punc-54::Q35::yfp]* y *rmls133 [Punc-54::Q40::yfp]*) y realizamos la cuantificación de los agregados fluorescentes a lo largo del envejecimiento de los nematodos a los días 3, 4 y 7 desde la puesta sincronizada de huevos. Como resultado obtuvimos que, mientras que los animales Q35::yfp o *gsr-1(m+,z-); Q35::yfp* mostraron una baja agregación, sí que existió mayor número de agregados en animales Q40::yfp durante el envejecimiento. Además, este fenotipo de los individuos Q40::yfp fue potenciado en el mutante *gsr-1(m+,z-)* ya que el número de agregados fue significativamente más elevado que en los individuos control Q40::yfp durante los primeros días, con tendencia a equilibrarse dicha diferencia en la agregación en los animales más envejecidos (Figura 3.5).

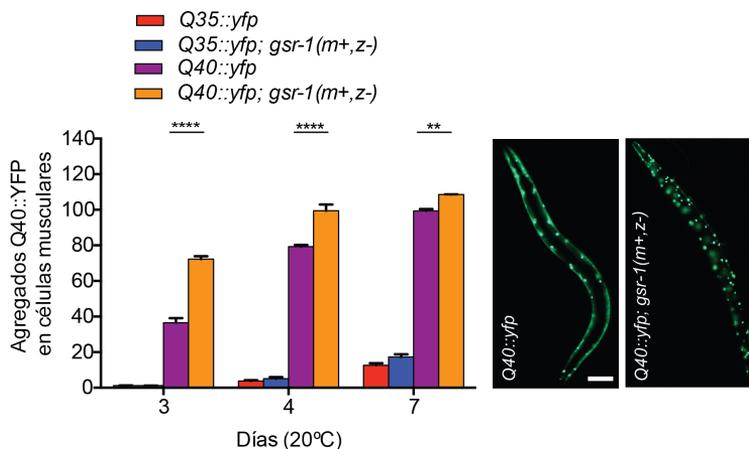


Figura 3.5. Efecto de la mutación *gsr-1* en animales que expresan Q35::YFP y Q40::YFP en células musculares. La mutación *gsr-1(m+,z-)* incrementa el número de agregados Q40::YFP pero no en animales Q35::YFP. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes (n=10 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). **p<0.01, ****p<0.0001, usando *t-test* de dos colas. Las fotografías de fluorescencia muestran ejemplos representativos de los genotipos que expresan Q40::YFP en células musculares a día tres tras la puesta sincronizada (barra de escala 100µm).

A continuación, nos propusimos estudiar si el efecto protector de GSR-1 está limitado a las células musculares o se presenta también en otros órganos, por lo que decidimos analizar la agregación de las proteínas poliQ, pero esta vez siendo expresadas en las neuronas de los animales *gsr-1(m+,z-)*. Para ello, usamos un modelo de *C. elegans* para la enfermedad de Machado-Joseph en el que se expresa la proteína humana ataxina-3 (ATXN3) fusionada a YFP en todas las neuronas del nematodo (Teixeira-Castro *et al*, 2011). Al igual que en el caso de la expresión de poliQ en células musculares, comparamos el número de agregados en animales control que expresan la proteína ATXN3::Q75::YFP (75 repeticiones de glutamina en este modelo están por debajo del umbral de patogenicidad), con animales que expresan la proteína patógena ATXN3::Q130::YFP desde los transgenes *rmls237 [Prgef-1::AT3v1-1::Q75::yfp]* y *rmls263 [Prgef-1::AT3v1-1::Q130::yfp]*, respectivamente. La cuantificación de los agregados se realizó en el segmento del cordón nervioso ventral que va desde el final de la faringe hasta la vulva. Como muestra la figura 3.6a, apenas se observaron agregados en los animales que expresan ATXN3::Q75::YFP y ATXN3::Q130::YFP a lo largo del envejecimiento, fenotipo similar al observado en los animales *gsr-1(m+,z-)* que expresan ATXN3::Q75::YFP. Por el contrario, y al igual que ocurría con la expresión de poliQ en células musculares, donde la falta de GSR-1 potenció la agregación de la proteína fluorescente Q40::YFP, la mutación *gsr-1* causó un robusto incremento de la agregación de la proteína ATXN3::Q130::YFP en neuronas.

De forma complementaria decidimos realizar ensayos de inhibición farmacológica para fenocopiar el efecto de la mutación de *gsr-1* en este modelo poliQ neuronal. Debido a que el empleo de DEM en animales que expresan Q40::YFP en células musculares mostró el fenotipo más severo, con un arresto total en los primeros estadios del desarrollo larvario L1 y L2, decidimos que éste sería el tratamiento a utilizar en este tipo de ensayos. Sin embargo, sorprendentemente, mientras que la expresión en células musculares de la proteína Q40::YFP causó un efecto deletéreo en el desarrollo de los animales en presencia de 2,5mM DEM, sin que tuviera ningún efecto en los animales que expresan Q35::YFP, en el modelo de poliQ expresado de forma pan-neuronal encontramos afectado el desarrollo larvario en animales que expresan la proteína control ATXN3::Q75::YFP, pero ningún efecto en los animales que expresaron la proteína patógena ATXN3::Q130::YFP (Figura 3.6b).

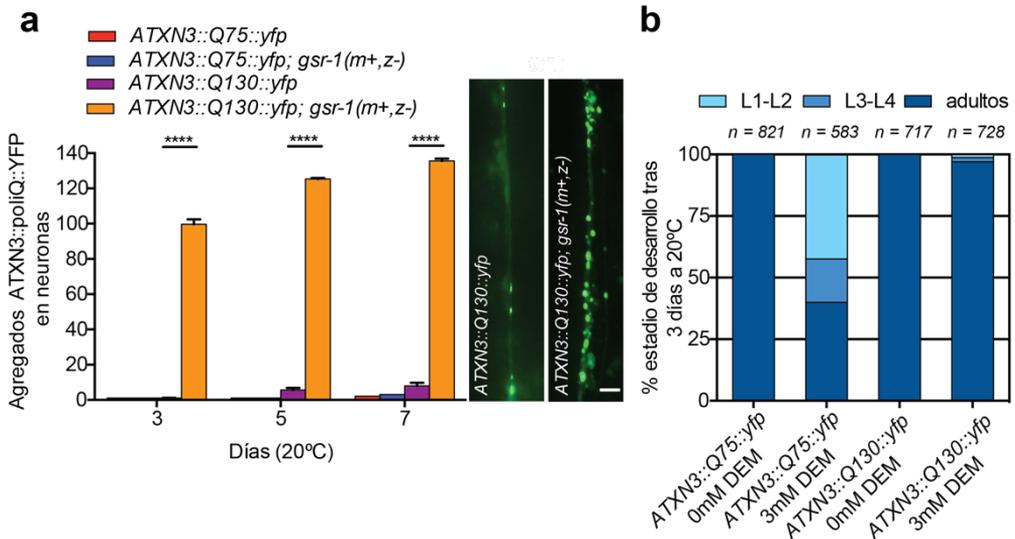


Figura 3.6. Efecto de la mutación *gsr-1* y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en animales que expresan proteínas poliQ en neuronas. a) La mutación *gsr-1(m+,z-)* incrementa el número de agregados de ATXN3::Q130::YFP mientras que no se observa ningún efecto en animales control que expresan ATXN3::Q75::YFP. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n=12 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.0001, usando *t*-test de dos colas. Las fotografías de fluorescencia muestran ejemplos representativos de los genotipos que expresan ATXN3::Q130::YFP en neuronas a día cinco tras la puesta sincronizada (barra de escala 20µm). **b)** El tratamiento con 3mM DEM afecta al desarrollo de animales que expresan de forma pan-neuronal ATXN3::Q75::YFP pero no a aquellos que expresan ATXN3::Q130::YFP. n= número total de animales ensayados en tres experimentos independientes.

Para una mayor confirmación del efecto que causa la mutación *gsr-1* en modelos de poliQ neuronales, evaluamos la respuesta a la estimulación mecánica de animales *gsr-1(m+,z-)* que expresan los primeros 57 aminoácidos de la proteína humana Huntingtina (HTT57) seguida de dos repeticiones diferentes de glutamina (Q19 y Q128) y fusionada a CFP, expresadas en las neuronas mecanosensoriales a partir de los transgénicos *igls245 [Pmec-3::htt57-19Q::cfp; lin-15(+); Pmec-7::yfp]* e *igls1[Pmec-3::htt57-128Q::cfp; lin-15(+); Pmec-7::yfp]*, respectivamente (Parker *et al*, 2001). Estos animales, ante el estímulo de ser tocados en la cabeza o en la cola con una pestaña, reaccionan moviéndose hacia atrás si se estimulan en la zona de la cabeza o hacia delante si se estimulan en la zona de la cola. Al evaluar la respuesta a la estimulación mecánica observamos que la falta de *gsr-1* no provocó ninguna diferencia en los animales control que expresaban la proteína HTT57::Q19::CFP. Por otro lado, los animales que expresan HTT57::Q128::CFP fueron menos sensibles a la estimulación que aquellos que expresaban HTT57::Q19::CFP y este fenotipo fue potenciado por la mutación *gsr-1*, ya que la respuesta sensorial fue significativamente menor que en individuos control HTT57::Q128::CFP (Figura 3.7a). Por otro lado, no

observamos diferencias significativas en el desarrollo larvario ante la exposición a DEM en animales que expresan las dos variantes de HTT57 (Figura 3.7b).

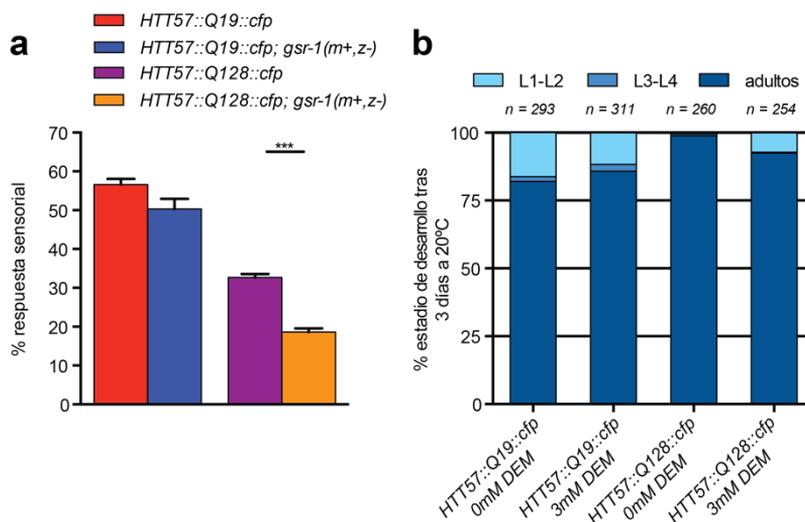


Figura 3.7. Efecto de la mutación *gsr-1* y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en animales que expresan proteínas poliQ en neuronas mecanosensoriales. **a)** Los animales que expresan HTT57::Q128::CFP muestran una menor respuesta mecanosensorial comparados con animales que expresan HTT57::Q19::CFP. Esta menor respuesta es potenciada por la mutación *gsr-1(m+,z-)*. Los datos corresponden a la media de dos experimentos independientes ($n \geq 100$ animales por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). *** $p < 0.001$, usando *t-test* de dos colas. **b)** El tratamiento con 3mM de DEM no afecta al desarrollo larvario de animales que expresan en neuronas mecanosensoriales las proteínas HTT57::Q19::CFP y HTT57::Q128::CFP. $n =$ número total de animales ensayados en tres experimentos independientes.

Finalmente, también evaluamos la agregación de proteínas poliQ en mutantes *gsr-1(m+,z-)* que expresan la proteína Q44::YFP en células intestinales a partir del transgén *drls20 [Pvha-6::Q44::yfp; rol-6(su1006)]* (Moronetti Mazzeo *et al*, 2012). Aunque a la temperatura de 20°C no existió ninguna diferencia en la agregación de Q44::YFP a lo largo del envejecimiento, a 16°C los animales *gsr-1(m+,z-)* mostraron una agregación más temprana y con agregados de mayor tamaño que los controles Q44::YFP (Figura 3.8a). Al igual que en el modelo de Q40::YFP en músculo, el tratamiento con DEM en animales Q44::YFP afectó negativamente al desarrollo larvario (Figura 3.8b).

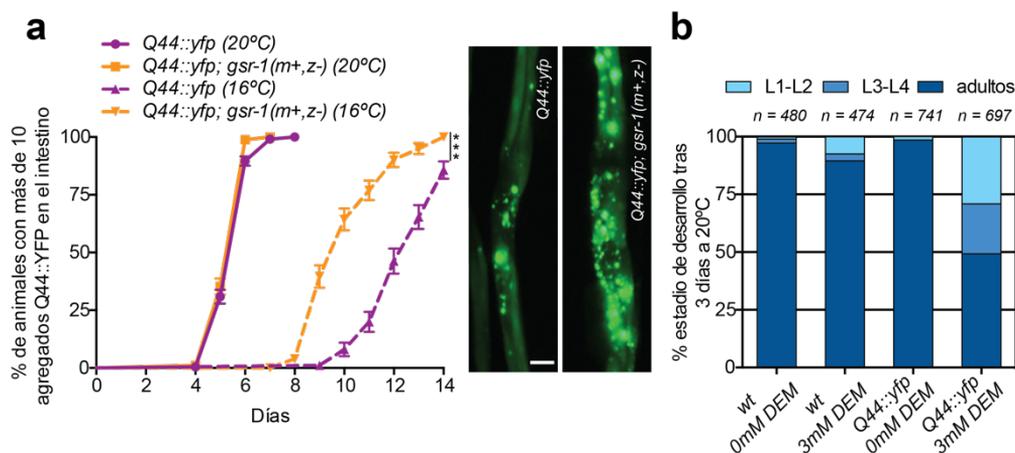


Figura 3.8. Efecto de la mutación *gsr-1* y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en animales que expresan proteínas poliQ en células intestinales. **a)** Aparición de agregados Q44::YFP en el intestino a lo largo del tiempo. La mutación *gsr-1(m+,z-)* causa una agregación más temprana de los animales Q44::YFP cuando se incuban a 16°C pero no a 20°C, en comparación con individuos control. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes (n=50 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ***p<0.001, mediante el test log-rank (Mantel-Cox). Las fotografías de fluorescencia muestran ejemplos representativos de los genotipos que expresan Q44::YFP en células intestinales a día 10 desde la puesta sincronizada (barra de escala 20µm). **b)** El tratamiento con 3mM de DEM afecta al desarrollo de animales que expresan de Q44::YFP en células intestinales. n= número total de animales ensayados en tres experimentos independientes.

En su conjunto, todos estos resultados confirman una función protectora de la glutatión reductasa frente a la agregación proteica en diversos modelos de enfermedades de poliglutamina en *C. elegans*. Este efecto protector resultó ser independiente del tipo de tejido u órgano donde se expresan las proteínas con los residuos de poliglutamina. Sin embargo, el tratamiento con DEM no parece tener el mismo efecto en el desarrollo larvario en animales que expresan las proteínas poliQ en neuronas en comparación con los individuos que las expresan en otros órganos como músculo o intestino.

3.3.2. Modelos de agregación del péptido Aβ.

Como se mostró anteriormente, el silenciamiento por ARNi de *gsr-1* causó un aumento de la parálisis en los animales que expresan Aβ en células musculares desde el transgén integrado *dvls2 [Punc-54::Aβ₃₋₄₂::unc-54 3'-UTR]* cuando fueron crecidos a la temperatura permisiva de 16°C (Figura 3.2). Quisimos validar este resultado expresando este mismo transgén *dvls2* en mutantes *gsr-1(m+,z-)* y, al igual que lo observado mediante el ensayo con ARNi, la parálisis de individuos que expresan Aβ en células musculares se incrementó significativamente a lo largo del envejecimiento en individuos *gsr-1(m+,z-)* a 16°C en comparación con los animales

control (Figura 3.9a). Además, la exposición de animales *dvls2* a 2 mM DEM causó un completo arresto del desarrollo larvario en el estadio L1-L2 (Figura 3.9b), similar al observado en los animales que expresan el transgén *rmls133* [*Punc-54::Q40::yfp*] (Figura 3.4).

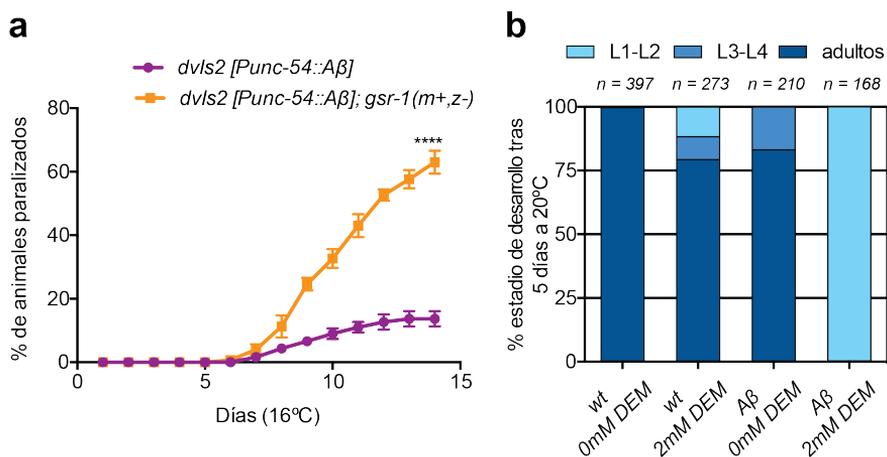


Figura 3.9. Efecto de la mutación *gsr-1* y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en animales que expresan el péptido $A\beta_{3-42}$ humano en células musculares. **a)** La mutación *gsr-1(m+,z-)* incrementa el fenotipo de parálisis en animales $A\beta_{3-42}$. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes ($n=25$ por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). **** $p<0.0001$, mediante el test log-rank (Mantel-Cox). **b)** El tratamiento con 2mM de DEM afecta al desarrollo de animales que expresan $A\beta_{3-42}$. Como control *wt* se emplearon animales que expresan el transgen *dvls22* [*rol-6(su1006)*]. n =número total de animales ensayados en tres experimentos independientes.

Decidimos ensayar a continuación animales que expresan $A\beta$ en células musculares desde el transgén *dvls14* [*Punc-54:: Aβ₁₋₄₂*; *Pmtl-2::gfp*], y que muestran también un fenotipo de parálisis (McColl *et al*, 2009). La razón de usar estos animales estriba en el hecho de que el transgén *dvls2* expresa el péptido $A\beta_{3-42}$ mientras que el transgén *dvls14* expresa la forma completa $A\beta_{1-42}$. Del mismo modo que ocurrió con los animales *dvls2*, los individuos *dvls14; gsr-1(m+,z-)* presentaron una mayor parálisis con respecto al control *dvls14* a la temperatura permisiva de 16°C. Es importante resaltar que el fenotipo de parálisis causado por la mutación *gsr-1* es mucho más rápido en los animales *dvls14* posiblemente debido a que éste expresa la forma completa de $A\beta$ (Figura 3.10a). Además, estos individuos *dvls14; gsr-1(m+,z-)* fueron incapaces de expulsar los embriones fuera del útero, mostrando un robusto fenotipo de matricidio por eclosión de la progenie en el útero de los progenitores (Figura 3.10b). Dada la imposibilidad de realizar puestas sincronizadas de huevos con esta

estirpe y, por lo tanto, observar el desarrollo de los animales decidimos no realizar ensayos farmacológicos con DEM.

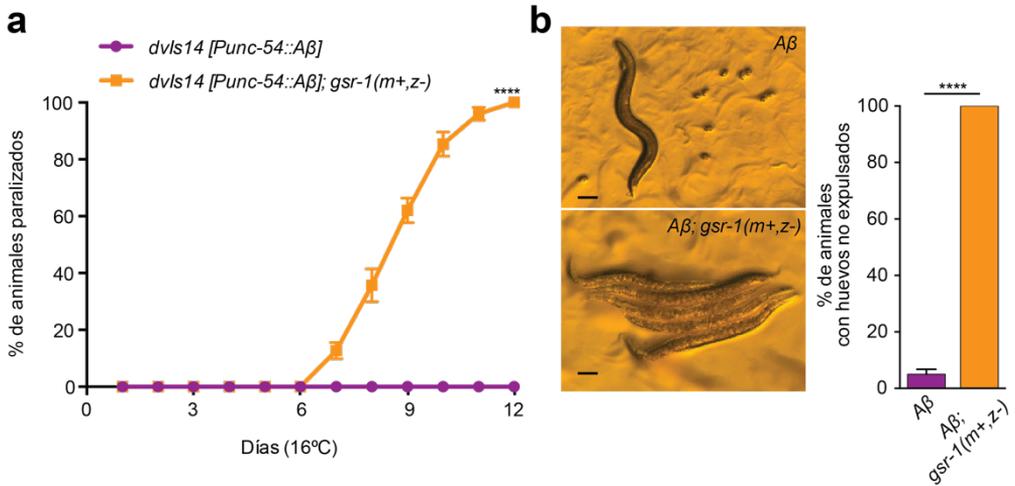


Figura 3.10. Efecto de la mutación *gsr-1* en animales que expresan el péptido A β ₁₋₄₂ humano en células musculares. a) La expresión de A β ₁₋₄₂ desde el transgén *dvlS14* provoca un rápido incremento de la parálisis en animales *gsr-1(m+,z-)*. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes (n=25 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.0001, mediante el test log-rank (Mantel-Cox). **b)** La mutación *gsr-1(m+,z-)* provoca una completa incapacidad de expulsar embriones en animales que expresan A β ₁₋₄₂ mediante el transgén *dvlS14*. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes (n=50 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.0001, usando *t-test* de dos colas. Las fotografías muestran ejemplos representativos de animales adultos *dvlS14* y *dvlS14; gsr-1(m+,z-)*. Barra de escala 100 μ m.

Posteriormente quisimos saber si esta interacción entre la expresión de A β y la mutación *gsr-1* se daba en otros tipos celulares además del muscular, de igual modo que hicimos con los modelos de enfermedades de poliglutamina. Para ello generamos mutantes *gsr-1* expresando A β en neuronas desde el transgén *gnals2 [Punc-119::Aβ; Pmyo-2::yfp]* (Fong *et al*, 2016). Los animales *gnals2; gsr-1(m+,z-)* presentaron un importante retraso en el desarrollo larvario en comparación con los controles, demostrando que el efecto negativo de la mutación *gsr-1* en fenotipos asociados a la agregación del péptido A β también ocurre en el sistema nervioso (Figura 3.11a). Además, este efecto fue fenocopiado mediante el tratamiento con DEM, donde los individuos *gnals2* presentaron mayor sensibilidad al compuesto (Figura 3.11b).

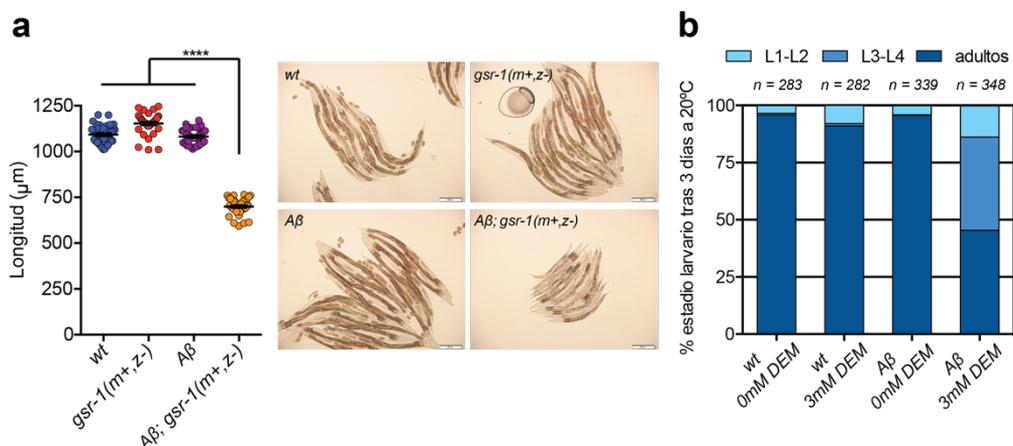


Figura 3.11. Efecto de la mutación *gsr-1* y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en animales que expresan el péptido $A\beta_{1-42}$ humano en neuronas. a) El desarrollo de los animales que expresan $A\beta_{1-42}$ en neuronas se ve afectado por la mutación *gsr-1(m+,z-)*. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes (n=40 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.0001, usando *t*-test de dos colas. Las fotografías muestran ejemplos representativos de los tamaños cada genotipo. b) El tratamiento con 3mM de DEM afecta al desarrollo de animales que expresan $A\beta$ en neuronas. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. n=número total de animales ensayados en tres experimentos independientes.

Con todos estos datos podemos concluir que la falta de disponibilidad de GSH, como consecuencia de la mutación *gsr-1* o por el tratamiento con DEM, tiene un efecto deletéreo en los fenotipos derivados de la expresión de $A\beta$ tanto en neuronas como en células musculares.

3.3.3. Modelos de agregación de la proteína α -sinucleína.

Tras confirmar que la mutación *gsr-1* impacta negativamente en diversos fenotipos derivados de la agregación del péptido $A\beta$ y de proteínas con repeticiones de glutamina, quisimos saber si existía la misma interacción en animales que expresan la proteína α -sinucleína humana (α -SYN), recapitulando la enfermedad de Parkinson en *C. elegans*. Para ello, usamos animales que portan el transgén *pkIs2386 [Punc-54:: α -synuclein::yfp; unc-119(+)]* que expresa en células musculares la proteína humana α -SYN fusionada a YFP, lo que permite cuantificar los agregados de α -SYN::YFP mediante microscopía de fluorescencia (Van Ham *et al*, 2008). En mutantes *gsr-1(m+,z-)* de 3 días de edad, la agregación de α -SYN::YFP fue significativamente superior que en animales silvestres control. Además, este fenotipo fue potenciado durante el envejecimiento, ya que los agregados en los mutantes *gsr-1(m+,z-)* fueron mucho más abundantes que en los animales control en individuos de 5 días de edad (Figura 3.12a). A pesar de este efecto de la mutación *gsr-1* en el

aumento de los agregados de la proteína α -SYN::YFP en células musculares, no observamos ningún fenotipo en el tratamiento con DEM en este modelo (Figura 3.12b). Esta la falta de sensibilidad ante la exposición a DEM puede ser debida al poco efecto que tiene la agregación de α -SYN en la motilidad del animal (Van Ham *et al*, 2010), lo que sugiere que la agregación de α -SYN no causa una toxicidad severa como para afectar al desarrollo, a diferencia de los modelos de poliglutamina o $A\beta$.

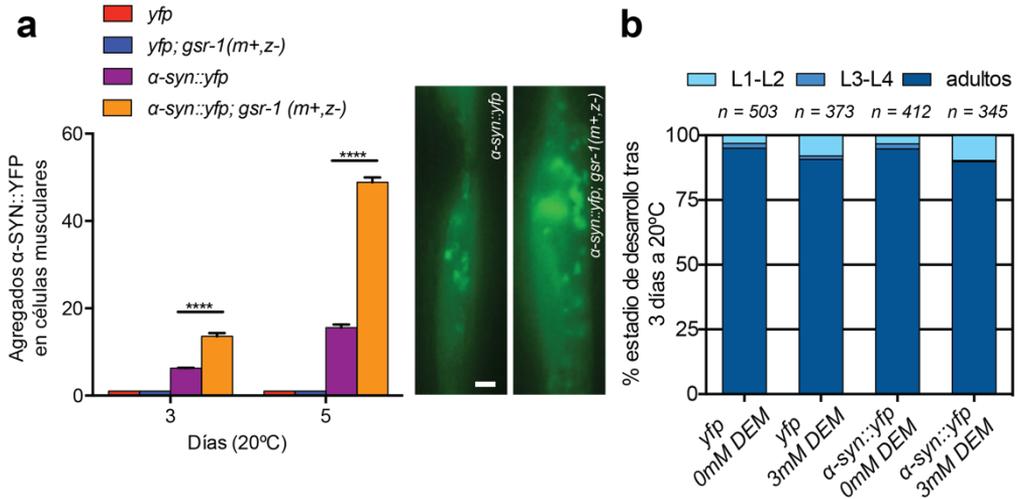


Figura 3.12. Efecto de la mutación *gsr-1* y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en animales que expresan la proteína α -sinucleína humana en células musculares. **a)** La mutación *gsr-1(m+,z-)* causa un aumento en el número de agregados de α -SYN::YFP en células musculares. La cuantificación de los agregados se llevó a cabo en la región entre los dos bulbos faríngeos. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n=12 por ensayo y stirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.0001, usando *t-test* de dos colas. Las fotografías de fluorescencia muestran una representación de cada genotipo a día 5 tras la puesta sincronizada de huevos (barra de escala 10 μ m). **b)** Los animales que expresan la proteína α -SYN::YFP humana en células musculares no sufren ningún efecto en su desarrollo ante la exposición a DEM. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. n=número total de animales ensayados en tres experimentos independientes.

Tras este resultado, y continuando con la metodología de evaluar agregación en diferentes tipos celulares de mutantes *gsr-1*, usamos el transgén *baln11 [Pdat-1:: α -synuclein; Pdat-1::gfp]*, el cual expresa α -SYN en las seis neuronas dopaminérgicas de la cabeza de *C. elegans* (4 CEP y 2 ADE) (Sulston *et al*, 1975), con el objetivo de evaluar la posible neurodegeneración dopaminérgica ante la falta de GSR-1. El transgén *baln11* permite la observación de las seis neuronas dopaminérgicas mediante GFP expresada bajo el control del promotor del transportador de la dopamina *dat-1* (Jayanthi *et al*, 1998). La expresión de la proteína α -SYN provoca la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas, que se manifiesta por la pérdida

de fluorescencia, de manera que es posible cuantificar el daño causado por la expresión de la proteína α -SYN cuantificando la integridad del marcaje fluorescente en dendritas, axones y cuerpos neuronales. En este caso, la expresión de α -SYN en los animales *gsr-1(m+,z-)* provocó una mayor neurodegeneración dopaminérgica a lo largo del envejecimiento en comparación con los individuos control que expresan la proteína α -SYN en fondo silvestre, confirmando el impacto negativo de la falta de GSR-1 en este otro modelo de agregación (Figura 3.13a). Al igual que en el caso de la expresión de α -SYN en células musculares, el tratamiento con DEM no afectó al desarrollo en el modelo de neuronas dopaminérgicas (Figura 3.13b). El hecho que la función dopaminérgica no es esencial para el desarrollo de *C. elegans* (Sanyal *et al*, 2004) podría explicar la resistencia al tratamiento con DEM en este modelo.

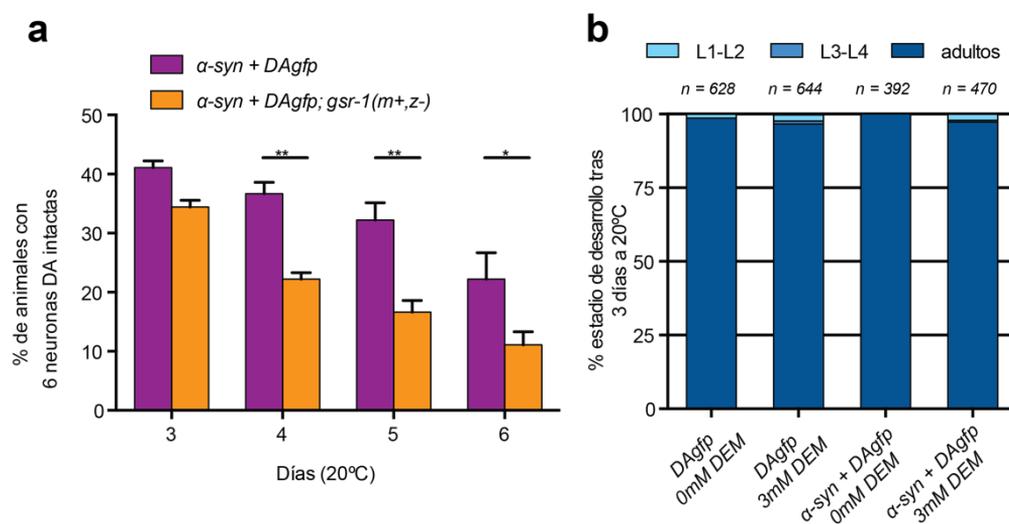


Figura 3.13. Efecto de la mutación *gsr-1* en animales que expresan la proteína α -sinucleína humana en neuronas dopaminérgicas. La mutación *gsr-1(m+,z-)* acelera la neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas durante el envejecimiento en animales que expresan la proteína α -SYN humana. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n=30 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). *p<0.1, **p<0.01, usando *t-test* de dos colas. **b)** Los animales que expresan la proteína α -SYN humana en neuronas dopaminérgicas no sufren ningún efecto en su desarrollo ante la exposición a DEM. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. n=número total de animales ensayados en tres experimentos independientes.

En su conjunto, los datos obtenidos en el modelo de agregación de α -sinucleína, junto con los anteriormente comentados en los modelos de A β y proteínas de poliQ, corroboran el papel protector de la glutatión reductasa y del correcto balance de GSH en el mantenimiento de la proteostasis celular.

3.4. Efecto de la deficiencia de GSR-1 en la agregación de proteínas endógenas de *C. elegans*.

Los modelos descritos hasta el momento expresan en el nematodo proteínas exógenas tendentes a la agregación, bien artificiales como las fusiones de poliglutaminas con proteínas fluorescentes, bien presentes en células humanas como A β y α -sinucleína, pero no en células de *C. elegans*.

Para comprobar si el efecto protector de GSR-1 ante la agregación de estas proteínas humanas descrito anteriormente se extiende también al caso de proteínas endógenas de *C. elegans* que forman agregados, usamos los mutantes termosensibles *unc-52(e669su250)* y *let-60(ga89)*, los cuales presentan fenotipos asociados a estrés proteotóxico en función de la temperatura de crecimiento del nematodo (Gidalevitz *et al*, 2006).

El gen *unc-52* de *C. elegans* codifica para varias proteínas homólogas a perlecan, un proteoglicano de heparán sulfato de la membrana basal de mamíferos (Rogalski *et al*, 1995). Los animales que portan la mutación termosensible *unc-52(e669su250)* presentan una parálisis de prácticamente todo el cuerpo, permitiendo sólo el movimiento de la cabeza. Este fenotipo es progresivo a lo largo del envejecimiento del animal y es dependiente de la temperatura, de modo que la parálisis es mucho más temprana cuando los animales son crecidos a 25°C mientras que, a la temperatura permisiva de 16°C, la parálisis se ve considerablemente retrasada (Gidalevitz *et al*, 2006). La introducción de la mutación *gsr-1(m+,z-)* en los animales *unc-52(e669su250)* causó un fuerte incremento de la parálisis cuando los animales fueron crecidos a la temperatura permisiva de 16°C (Figura 3.14a). Este resultado indica que la falta de GSR-1 provoca una pérdida de la proteostasis celular, que se traduce en la desestabilización de la proteína metaestable UNC-52, similar a la que ocurre cuando los animales *unc-52(e669su250)* son crecidos a 25°C. Además, el tratamiento con DEM a 16°C causó una parada completa en el desarrollo larvario de animales *unc-52(e669su250)* en el estadio L1-L2, fenocopiando el efecto negativo de la mutación *gsr-1(m+,z-)* (Figura 3.14b), mismo resultado que se observó en los modelos de poliQ (Figura 3.4a) y A β (Figura 3.9b) expresados en células musculares.

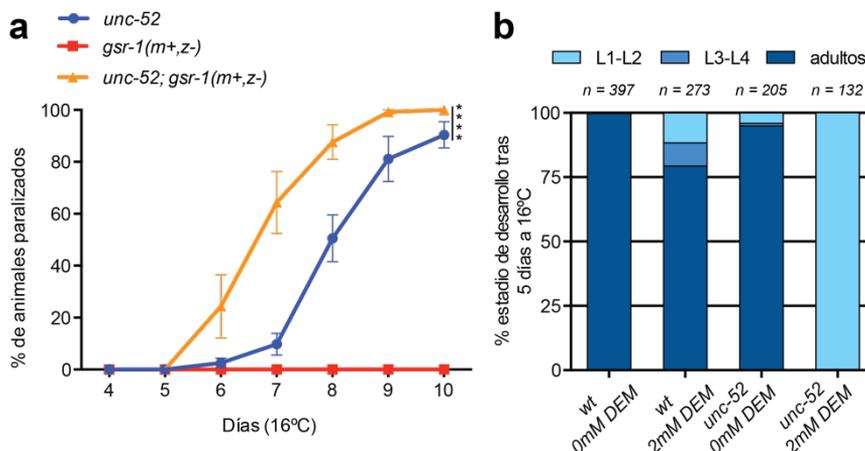


Figura 3.14. Efecto de la mutación *gsr-1* y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en *C. elegans* que expresan la proteína metaestable UNC-52. a) La mutación *gsr-1(m+,z-)* incrementa el fenotipo de parálisis de animales *unc-52(e699su250)* cuando son crecidos a la temperatura permisiva de 16°C. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n=50 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.0001, mediante el test log-rank (Mantel-Cox). b) El tratamiento con 2mM de DEM causa un completo arresto larvario en los estadios L1-L2 en mutantes *unc-52(e699su250)* crecidos a la temperatura permisiva de 16°C. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. n=número total de animales ensayados en tres experimentos independientes.

De igual manera, la mutación *let-60(ga89)* causa un fenotipo de letalidad embrionaria con un 100% de penetrancia a la temperatura restrictiva de 25°C, mientras que el desarrollo embrionario de estos animales es normal a 16°C (Gidalevitz *et al*, 2006). Debido a que los animales *gsr-1(m+,z-)* presentan el mismo fenotipo de letalidad embrionaria de su descendencia que los mutantes *let-60(ga89)* a 25°C, no podíamos realizar los ensayos fenotípicos con los animales con la mutación *gsr-1(m+,z-)* en homocigosis y que expresasen la proteína LET-60 metaestable. Por esta razón, decidimos generar un doble mutante en el que la mutación *let-60* en homocigosis se combina con la mutación *gsr-1* en heterocigosis mediante el balanceador *qC1::rfp*. Sin embargo, cuando generamos el doble mutante *let-60(ga89); gsr-1/qC1::rfp*, encontramos que estos animales también presentaban una letalidad embrionaria del 100%, lo cual nos impedía mantener esta estirpe (Figura 3.15a). Esta letalidad embrionaria la encontramos hasta en cuatro intentos independientes de generar este doble mutante, lo que sugería que el balanceador *qC1::rfp* podía tener algún efecto sobre la mutación *let-60(ga89)*. Por esta razón, decidimos generar el doble mutante manteniendo la mutación *gsr-1* balanceada con otra versión del balanceador *qC1* que lleva como marcador GFP en lugar de RFP. Así, con esta versión del balanceador conseguimos generar el doble mutante *let-60(ga89); gsr-1/qC1::gfp* viable, pero fue

interesante encontrar que a la temperatura permisiva de 16°C, estos animales no segregaron ningún individuo *let-60(ga89); gsr-1(m+,z-)*, confirmando que existe un interacción letal que impide obtener animales que expresen esta proteína metaestable LET-60 en un fondo genético *gsr-1* incluso a temperatura permisiva (Figura 3.15b). Además, este resultado fue apoyado por el fenotipo de arresto larvario que presentaron los mutantes *let-60(ga89)* expuestos a DEM (Figura 3.15c).

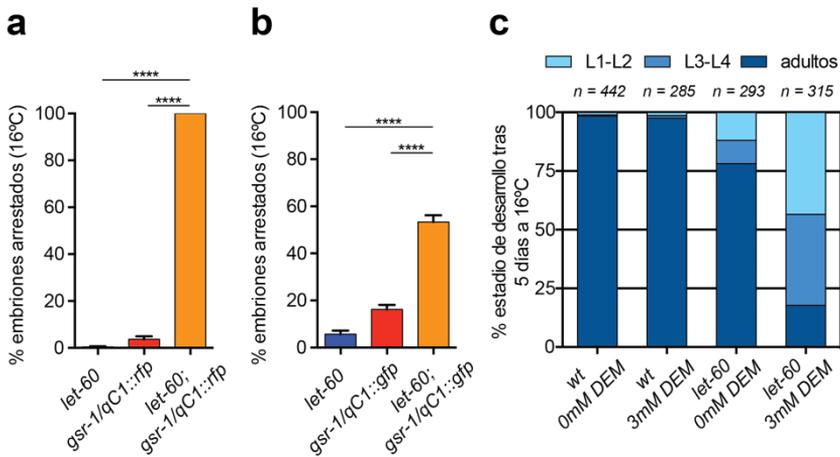


Figura 3.15. Efecto de la mutación *gsr-1* y el tratamiento con dietil maleato (DEM) en *C. elegans* que expresan la proteína metaestable LET-60. a, b) La mutación *gsr-1* incrementa el fenotipo de arresto embrionario en los animales *let-60(ga89)* cuando son crecidos a la temperatura permisiva de 16°C. (a) Los individuos *let-60(ga89); gsr-1/qC1::rfp* únicamente producen embriones arrestados mientras que (b) los individuos *let-60(ga89); gsr-1/qC1::gfp* generan únicamente animales balanceados y embriones arrestados *qC1::gfp* homocigotos pero no individuos viables *gsr-1(m+,z-); let-60(ga89)*. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes ($n \geq 100$ animales/embriones por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). **** $p < 0.0001$, usando *t-test* de dos colas. c) El tratamiento con 3mM de DEM causa un fenotipo de arresto embrionario en animales que expresan LET-60 metaestable. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. n= número total de animales ensayados en tres experimentos independientes.

Los ensayos de expresión de proteínas endógenas metastables de *C. elegans*, nos permiten concluir que el papel protector de la glutatión reductasa y un correcto mantenimiento de los niveles de GSH son críticos para el mantenimiento de la proteostasis en este organismo y refuerzan su posicionamiento como un mecanismo de protección esencial frente al estrés proteotóxico, que ocurre independientemente de la naturaleza de la proteína que agrega (endógena o exógena) y del tipo celular donde dicha agregación se produce.

3.5. Mecanismo molecular del efecto protector de GSR-1 en la homeostasis proteica.

La proteostasis es un mecanismo por el cual las células responden rápidamente a su ambiente intracelular y extracelular para mantener las proteínas en su estado óptimo de actividad. Se encuentra controlada por numerosos mecanismos que promueven el correcto plegamiento de las proteínas, previenen o corrigen la pérdida de conformación y la agregación, e incluso dirigen proteínas hacia su degradación (Powers & Balch, 2013).

Con todos los resultados obtenidos mediante ARNi, tratamiento con DEM y con mutantes *gsr-1(m+,z-)* en varios modelos de agregación de proteínas, resulta evidente que la mutación *gsr-1* tiene un impacto importante sobre la proteostasis celular en *C. elegans*. Por tanto, como siguiente paso, nos planteamos identificar el mecanismo molecular por el cual la glutatión reductasa, y por tanto un correcto mantenimiento del estado redox del glutatión, regula la proteostasis celular.

Para resolver esta cuestión, decidimos generar mutantes *gsr-1(m+,z-)* que expresasen diferentes reporteros de regulación de la proteostasis, y así evaluar la posible alteración que causase la mutación *gsr-1* en la inducción de cada uno de los reporteros, tanto en situaciones basales como en distintas situaciones de estrés. De esta forma comprobaríamos si la mutación *gsr-1* estaría causando una respuesta inadecuada de alguno de los mecanismos que controlan la proteostasis o evitando su inducción ante un estímulo determinado.

3.5.1. Identificación de la ruta de control de la proteostasis afectada por la falta de GSR-1.

3.5.1.1. Ruta de estrés citoplasmático.

Una ruta importante de regulación de la proteostasis es la llevada a cabo a través de la HSR (heat shock response) y la activación del factor de transcripción HSF1 (heat shock factor 1), que tiene como consecuencia la protección celular frente al daño proteotóxico en el citoplasma (Tatum *et al*, 2015). HSF1 regula la transcripción de una familia de genes que codifican HSPs (heat shock proteins), las cuales actúan como chaperonas moleculares para mantener la conformación de las proteínas durante estrés (Guisbert *et al*, 2013).

Para continuar investigando el posible mecanismo de regulación de la proteostasis afectado por la ausencia GSH, cuantificamos la inducción del factor de transcripción HSF-1 de *C. elegans* fusionado a GFP cuya expresión está mediada por el transgén *drSi13[Phsf-1::hsf-1::gfp::unc-54 3'-UTR]* (Morton & Lamitina, 2013). Además, empleamos el reportero transcripcional *rmls223[Phsp-70::gfp; rol-6(su1006)]* que expresa la proteína GFP bajo el control del promotor del gen *hsp-70*, regulado por HSF-1 (Morley & Morimoto, 2004). Cuantificamos la inducción de ambos reporteros tanto en condiciones basales como ante un estrés, que en este caso fue la exposición a 35°C durante una hora. No existió ninguna variación significativa en la inducción de los dos marcadores en animales *gsr-1(m+,z-)* bajo ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 3.16), lo cual sugiere que la falta de GSR-1 no altera el mecanismo de regulación de la proteostasis mediante la HSR.

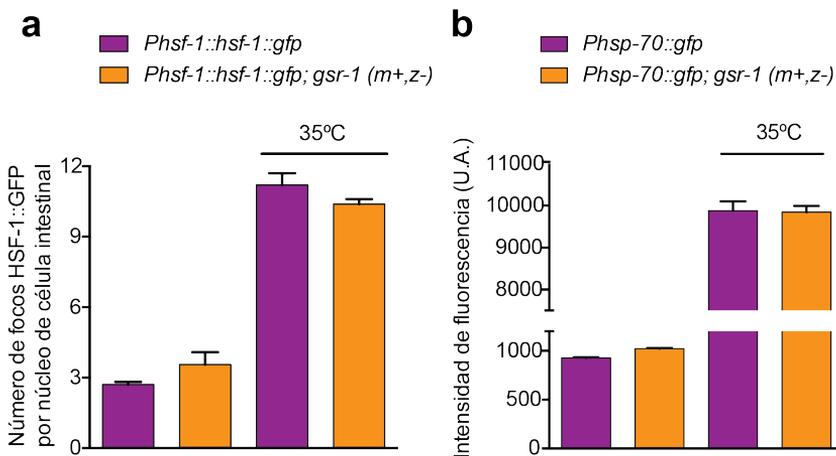


Figura 3.16. Efecto de la mutación *gsr-1* en la inducción de los reporteros HSF-1::GFP y *Phsp-70::gfp*. La inducción de los reporteros HSF-1::GFP (a) y *Phsp-70::gfp* (b) no se ve alterada en animales *gsr-1(m+,z-)* tanto en condiciones normales de crecimiento (20°C) como ante un choque térmico por exposición a 35°C. Los datos corresponden con la media de dos experimentos independientes (n=30 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM).

3.5.1.2. Ruta de la insulina

DAF-16 es un factor de transcripción que integra la señalización por la ruta de la insulina y que es activado ante diferentes estreses. En condiciones basales DAF-16 se encuentra fosforilado e inactivo en el citoplasma y cuando los animales se exponen a distintos tipos de estreses, DAF-16 se desfosforila y transloca al núcleo para transcribir una batería de genes importantes para la resistencia a estrés. Así, la localización nuclear de DAF-16 puede verse inducida ante estrés térmico, anoxia, ayuno, estrés oxidativo o la exposición a patógenos (Senchuk *et al*, 2018). Para

comprobar la posible relación entre GSH y DAF-16, generamos mutantes *gsr-1(m+,z-)* expresando el reportero DAF-16::GFP desde el transgén *zls356[Pdaf-16::daf-16::gfp; rol-6 (su1006)]* (Henderson & Johnson, 2001) y cuantificamos la localización subcelular del reportero en animales mantenidos tanto en condiciones normales de crecimiento a 20°C, como sometidos a un estrés térmico de 35°C o ayuno durante 1 hora. Como muestra la figura 3.17, no existió ninguna diferencia en la localización de DAF-16::GFP en animales *gsr-1(m+,z-)* en comparación con los individuos control en condiciones basales de crecimiento, permaneciendo el reportero en el citoplasma celular. Al provocar la inducción del reportero mediante estrés térmico a 35°C o ayuno, DAF-16::GFP pasó al núcleo celular de igual forma tanto en animales control como mutantes *gsr-1(m+,z-)*, indicando que el GSH no altera la inducción de DAF-16 ante un estrés proteotóxico.

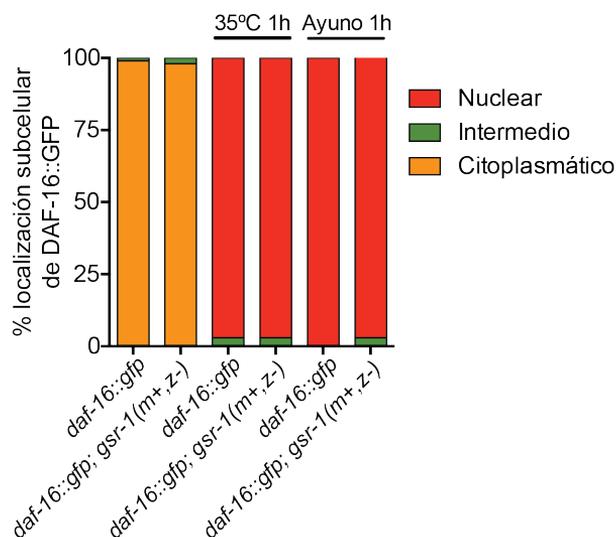


Figura 3.17. Efecto de la mutación *gsr-1* en la inducción del reportero DAF-16::GFP. La mutación *gsr-1(m+,z-)* no afecta la localización subcelular del reportero DAF-16::GFP cuando los animales son crecidos en condiciones normales a 20°C ni altera la inducción del reportero ante el estrés térmico de 35°C o el ayuno durante 1 hora. Los datos corresponden a la media de dos experimentos independientes (n = 30 animales por estirpe y ensayo).

A continuación, quisimos investigar si la la mutación *gsr-1* afectaba a la respuesta a estrés oxidativo mediada por la ruta de la insulina. Para ello generamos animales *gsr-1(m+,z-)* que expresaban GFP bajo el control del promotor del gen *sod-3* desde el transgén *muls84 [Psod-3::gfp; rol-6(su1006)]* (Libina *et al*, 2003). La superóxido dismutasa SOD-3 es una proteína ortóloga a SOD2 de humanos, responsable de la detoxificación de aniones superóxidos, cuya expresión en *C. elegans* está regulada por DAF-16 (Furuyama *et al*, 2000; Honda & Honda, 1999).

Para activar la respuesta de este reportero transcripcional, recurrimos al tratamiento con juglona, compuesto que genera anión superóxido y que ha sido ampliamente

utilizado para generar estrés oxidativo en *C. elegans* (Link & Johnson, 2002). En condiciones basales, los animales *gsr-1(m+,z-)* mostraron una expresión GFP significativamente superior a la observada en los individuos control. Sin embargo, el estrés oxidativo provocado por el tratamiento con juglona, supuso un incremento de la expresión de GFP prácticamente similar tanto en mutantes *gsr-1(m+,z-)* como en los animales control (Figura 3.18), indicando que la mutación *gsr-1(m+,z-)* no afecta a la respuesta por parte de este reportero ante estrés oxidativo. Estos resultados sugieren que la inducción del reportero de *sod-3* en los mutantes *gsr-1(m+,z-)* en condiciones basales es más una consecuencia del desbalance redox debido a la mutación *gsr-1* que a un efecto directo sobre la homeostasis proteica, ya que la respuesta del reportero al tratamiento con juglona es similar tanto en mutantes *gsr-1(m+,z-)* como controles, lo que descartaría que el efecto de la mutación *gsr-1(m+,z-)* en la proteostasis celular sea debido a una alteración en el mecanismo de respuesta a estrés oxidativo mediado por la ruta de la insulina.

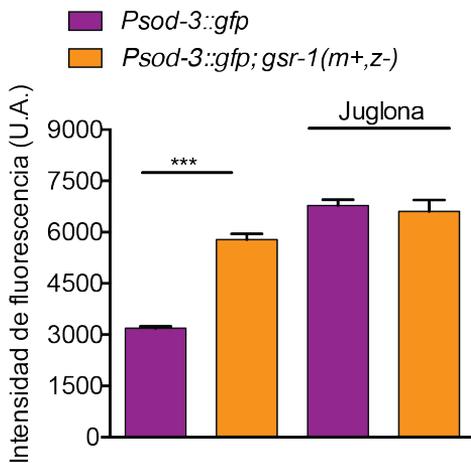


Figura 3.18. Efecto de la mutación *gsr-1* en la inducción del reportero fluorescente de *sod-3*. La mutación *gsr-1(m+,z-)* provoca una inducción del reportero de *sod-3* en condiciones normales de crecimiento. Por el contrario, la falta de GSR-1 no supone una diferencia en los niveles de GFP ante el tratamiento con 50 μ M de juglona. Los datos corresponden con la media de dos experimentos independientes (n=30 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ***p<0.001, usando *t-test* de dos colas.

3.5.1.3. Rutas de estrés de orgánulo

3.5.1.3.1. Ruta de estrés de retículo endoplásmico.

Otro de los mecanismos que regula la proteostasis celular se encuentra relacionado con la activación de la respuesta frente a estrés en el retículo endoplasmático (RE). Un incremento de la demanda de proteínas que deben ser plegadas correctamente en el lumen del RE como, por ejemplo, ante un aumento de la función secretora o la exposición a un compuesto tóxico, provoca la acumulación de proteínas no procesadas en el RE. Esta situación conlleva a un estrés en este orgánulo, el cual activa una respuesta llamada UPR^{RE} (unfolded protein response o respuesta a

proteínas mal plegadas) (Ron & Walter, 2007). La activación de esta respuesta da lugar a la inducción de proteínas reguladoras, entre las cuales se encuentran miembros de la familia de las HSPs (heat shock proteins) de retículo, encargadas de restablecer la homeostasis en el ER (Prahlad & Morimoto, 2009). Para comprobar si en mutantes *gsr-1(m+,z-)* existe una alteración de la respuesta a estrés proteotóxico a nivel de RE, empleamos una estirpe que porta el transgén *zcls4[Phsp-4::gfp]* y que expresa la GFP bajo el control del promotor del gen *hsp-4* (Calfon *et al*, 2002). HSP-4 es el ortólogo en *C. elegans* de la chaperona BiP de mamífero, responsable de la inducción de la UPR^{RE}, ya que detecta y se une a proteínas mal plegadas en el RE, desencadenando la activación de este mecanismo protector. El transgén *zcls4[Phsp-4::gfp]* funciona como un reportero transcripcional, el cual permite la cuantificación mediante fluorescencia debida a la expresión de GFP, una vez que la UPR^{RE} es inducida.

Cuando expresamos el reportero *Phsp-4::gfp* en animales *gsr-1(m+,z-)* observamos que la falta de GSR-1 no causó inducción del marcador en condiciones basales. Por el contrario, cuando provocamos estrés en el RE mediante el tratamiento con tunicamicina, fármaco que inhibe la glicosilación y causa la activación de la UPR^{RE} (Glover-Cutter *et al*, 2013), los animales *gsr-1(m+,z-)* tratados con tunicamicina sí mostraron una ligera menor inducción del reportero HSP-4::GFP (Figura 3.19), indicando un cierto efecto de la mutación *gsr-1* en la respuesta al estrés de RE.

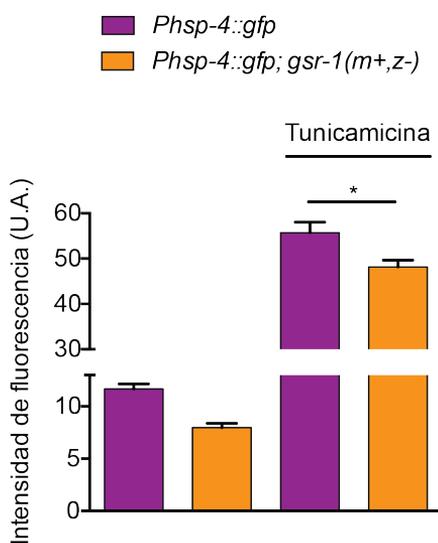


Figura 3.19. Efecto de la mutación *gsr-1* en la inducción del reportero *Phsp-4::gfp*. La mutación *gsr-1(m+,z-)* no causa ningún efecto sobre la inducción de *Phsp-4::gfp* en condiciones normales de crecimiento. La activación de la UPR^{ER} mediante el tratamiento con tunicamicina (30µg/mL) provoca una menor inducción en el reportero en animales *gsr-1(m+,z-)*. Los datos corresponden con la media de dos experimentos independientes (n=30 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). *p<0.1, usando *t-test* de dos colas.

3.5.1.3.2. Ruta de estrés mitocondrial.

Al igual que el RE, la mitocondria posee una respuesta a proteínas mal plegadas (UPR^{mit}). Esta respuesta funciona para mantener la homeostasis proteica mitocondrial frente a una disfunción causada por daño en el ADN mitocondrial, aumento de proteínas mal plegadas o defectos en la fosforilación oxidativa. En *C. elegans*, se han identificado varios componentes de la UPR^{mit}, incluyendo el factor de transcripción ATFS-1, activador crítico de esta respuesta (Nargund *et al*, 2012, 2015). En condiciones basales de crecimiento, ATFS-1 es transportado a la matriz mitocondrial donde es degradado. Sin embargo, ante situaciones de estrés mitocondrial, ATFS-1 es translocado al núcleo donde regula la expresión de una cascada de genes, incluyendo las chaperonas mitocondriales HSP-6 y HSP-60, ortólogas a las chaperonas HSP70 y HSP60 en mamíferos, respectivamente (Yoneda *et al*, 2004). Para comprobar si existe una alteración en la respuesta de la UPR^{mit} en mutantes *gsr-1(m+,z-)*, empleamos el transgén *zcls13[hsp-6::gfp]*, reportero transcripcional de la chaperona mitocondrial HSP-6, el cual permite cuantificar la inducción de la UPR^{mit} mediante fluorescencia debido a la expresión de GFP.

La expresión del reportero *Phsp-6::gfp* muestra que en animales *gsr-1(m+,z-)* se produce una fuerte inducción de la UPR^{mit} (Figura 3.20). Por otro lado, el tratamiento con paraquat, un generador de anión superóxido que interfiere con la actividad de la cadena transportadora de electrones y que induce la UPR^{mit} en *C. elegans* (Runkel *et al*, 2013), causó un incremento de la expresión del reportero *Phsp-6::gfp* tanto en animales control como en mutantes *gsr-1(m+,z-)*. Estos datos indican que, aunque existe un estrés mitocondrial crónico ante la falta de GSR-1, la respuesta por parte de la UPR^{mit} no se encuentra alterada en los animales *gsr-1(m+,z-)*, ya que, tanto en situaciones basales como debida al tratamiento con paraquat, existe una inducción similar de esta respuesta.

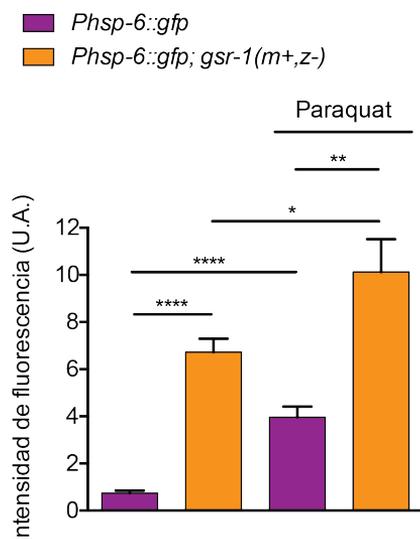


Figura 3.20. Efecto de la mutación *gsr-1* en la inducción del reportero *Phsp-6::gfp*. La mutación *gsr-1(m+,z-)* causa la inducción de *Phsp-6::gfp* en condiciones normales de crecimiento. La activación de la UPR^{mit} mediante el tratamiento con paraquat (0,4mM) provoca la inducción del reportero tanto en animales control como en animales *gsr-1(m+,z-)*. Los datos corresponden con la media de dos experimentos independientes (n=20 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). *p<0.1, **p<0.01, ****p<0.0001 usando *t-test* de dos colas.

3.5.1.4. Ruta de degradación de proteínas

3.5.1.4.1. Proteasoma

Mediante la proteólisis se produce la degradación de proteínas en polipéptidos más pequeños o incluso en sus aminoácidos constituyentes, cumpliendo un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular ya que previene la acumulación de proteínas no funcionales o mal plegadas (Strooper, 2021; Marinko *et al*, 2019). Uno de los sistemas que realizan proteólisis celular es el proteasoma, que a su vez, forma parte de un mecanismo más complejo, llamado UPS (Ubiquitin-Proteasome System), por el cual las células regulan la concentración de determinadas proteínas y degradan aquellas que ya no son funcionales o que no se requieren en ese momento (Papaevgeniou & Chondrogianni, 2014). Así, las proteínas que van a ser degradadas son marcadas con una serie de pequeñas proteínas llamadas ubiquitinas, formándose una cadena de poli-ubiquitinas en las proteínas diana que son reconocidas por el proteasoma, permitiendo su degradación (Papaevgeniou & Chondrogianni, 2014). Para observar la actividad de la UPS, empleamos una estirpe que porta el transgén *hhIs64 [(Psur-5::UbG76V)::gfp]* (Segref *et al*, 2011) y que expresa el reportero Ub^{G76V}::GFP, que consiste en un sustrato fluorescente el cual es poliubiquitinado y degradado mediante el proteasoma. Con esta herramienta, observamos que este reportero se acumulaba de forma similar tanto en animales control y *gsr-1(m+,z-)* cuando son crecidos en condiciones sin estrés, que no inducen la UPS (Figura 3.21). Por otro lado, la fluorescencia del marcador desaparecía casi por completo al inducir la UPS mediante 6 horas de ayuno

tanto en animales control como *gsr-1(m+,z-)*, indicando que a pesar de la mutación *gsr-1*, el UPS continúa siendo funcional.

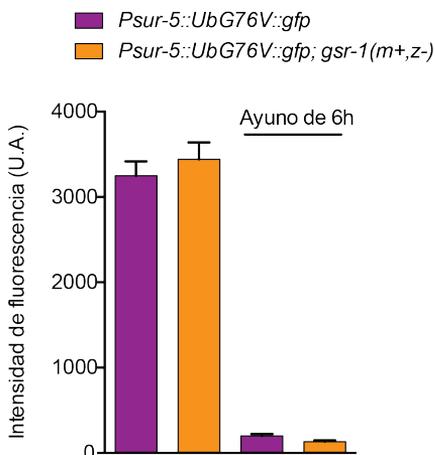


Figura 3.21. Efecto de la mutación *gsr-1* en la inducción del reportero UbG76V::GFP. La mutación *gsr-1(m+,z-)* no varía los niveles de expresión del reportero Ub^{G76V}::GFP tanto en condiciones normales de crecimiento (20°C) como ante ayuno a 6 horas. Los datos corresponden con la media de dos experimentos independientes (n=40 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM).

3.5.1.4.2. Autofagia.

La autofagia es otro mecanismo protector que juega un papel importante en la homeostasis celular, ya que facilita la degradación y reciclaje de componentes citosólicos como orgánulos, proteínas y macromoléculas, en respuesta a diversos estreses tales como el ayuno, hipoxia, estrés térmico, compuestos citotóxicos y patógenos (Kumsta *et al*, 2017; Parzych & Klionsky, 2014). Los agregados de proteínas, formados por proteínas mal plegadas, proteínas relacionadas con enfermedades o aquellas propensas a la agregación, pueden ser selectivamente reconocidas y degradadas por autofagia (Zhang *et al*, 2017; Das *et al*, 2017). Además, la pérdida de la actividad autofágica ha sido detectada en varias enfermedades humanas asociadas con la acumulación de proteínas agregadas (Zhang *et al*, 2017). El factor de transcripción HLH-30 (helix-loop-helix), ortólogo a TFEB y TFE3 humanos, se ha descrito como el principal regulador transcripcional de la autofagia (Lapierre *et al*, 2013). Así, en condiciones basales HLH-30/TFEB está fosforilado e inactivo en el citoplasma celular. Ante situaciones de inducción de la autofagia, HLH-30/TFEB se desfosforila, transloca al núcleo y regula la expresión de genes necesarios para inducir la autofagia y regular la función lisosomal (Martina *et al*, 2012).

Con el objetivo de comprobar si deficiencia de GSR-1, y por tanto una disminución de la disponibilidad de glutatión reducido GSH, modificaba la localización subcelular

de este factor de transcripción, expresamos el reportero HLH-30::GFP desde el transgén *sqIs17[Phlh-30::hlh-30::gfp]* (Lapierre *et al*, 2013) en mutantes *gsr-1*.

En los animales que expresan *sqIs17*, HLH-30::GFP mostró una distribución difusa en el citoplasma en condiciones normales de crecimiento. Sin embargo, ante condiciones de estrés como la exposición a 30°C o la privación del alimento, HLH-30::GFP se localizó rápidamente en el núcleo de las células (Figura 3.22). No obstante, aunque la mutación *gsr-1(m+,z-)* no modificó la localización nuclear de HLH-30::GFP en animales sometidos al estrés de temperatura, sí que impidió dicha translocación nuclear en animales sometidos a ayuno durante una hora, mostrándose el reportero con una localización difusa en el citoplasma. Este resultado sugiere que la falta de GSR-1 podría impactar negativamente en la proteostasis impidiendo la inducción de la autofagia, al menos en una forma dependiente del estrés generado por la falta de alimento.

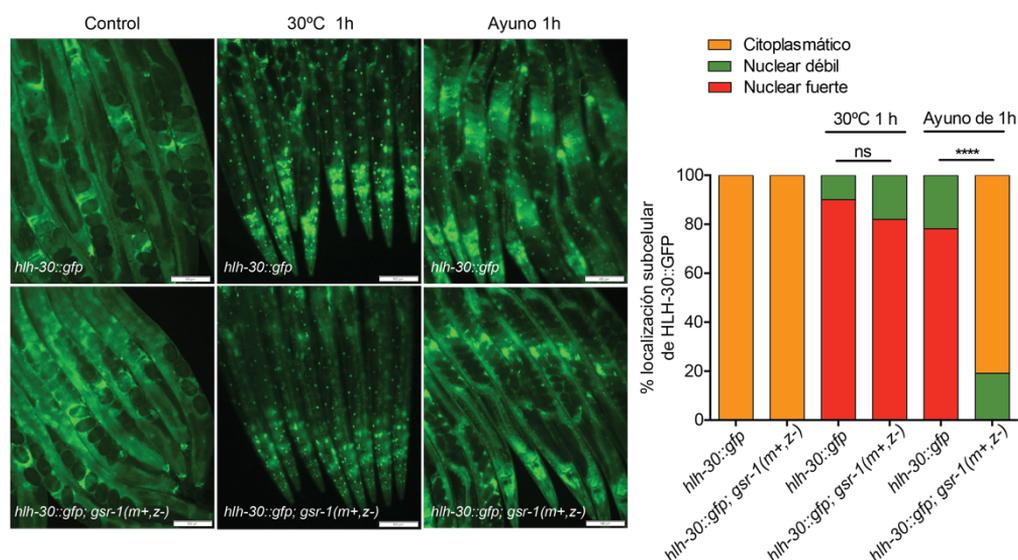


Figura 3.22. Efecto de la mutación *gsr-1* en la translocación nuclear de HLH-30::GFP. Las fotografías de fluorescencia muestran la localización subcelular del reportero HLH-30::GFP. La mutación *gsr-1(m+,z-)* no modificó la localización citoplasmática del reportero HLH-30::GFP en animales bien alimentados, así como su traslocación nuclear ante la exposición a 30°C durante 1 hora. Sin embargo, la mutación *gsr-1(m+,z-)* inhibió la traslocación nuclear de HLH-30::GFP ante la falta de alimento. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n=50 por ensayo y estirpe). ****p<0.0001, usando ANOVA con múltiple comparación de Tukey.

3.5.1.4.3. Mitofagia

Dentro de los muchos factores que afectan a la homeostasis celular se encuentra la desregulación de la función mitocondrial. Como describimos en un trabajo previo de nuestro grupo, los mutantes *gsr-1(m+,z-)* muestran un claro fenotipo de fragmentación mitocondrial en células musculares y menor contenido de ADN mitocondrial, lo que lleva a causar estrés mitocondrial en estos animales (Mora-Lorca *et al*, 2016). Por esta razón, planteamos la hipótesis de que la falta de GSR-1 podría afectar negativamente a la inducción de un proceso de degradación selectiva de mitocondrias por autofagia conocido como mitofagia, causando la pérdida de la homeostasis celular y siendo esto responsable del empeoramiento de los fenotipos relacionados con la agregación de proteínas (Pickles *et al*, 2018).

En *C. elegans*, las mitocondrias se acumulan gradualmente durante el envejecimiento en varios tejidos (neuronas, intestino y músculos). La mitofagia se encarga de la eliminación de mitocondrias disfuncionales o cuando existe un exceso de ellas para mantener la homeostasis (Palikaras *et al*, 2015a). El receptor de membrana mitocondrial DCT-1 juega un papel importante en la inducción de la mitofagia. Además, se ha descrito que la falta de DCT-1 incrementa el contenido mitocondrial en células musculares e intestinales y distorsiona la morfología mitocondrial (Palikaras *et al*, 2015b).

Con la idea de explorar la posible interacción entre la mutación *gsr-1* y la mitofagia, decidimos inhibir este mecanismo mediante la mutación *dct-1(tm376)* en animales que expresaban el péptido A β desde el transgén *dvIs2 [Punc-54::A β ₃₋₄₂::unc-54 3'-UTR]* en células musculares. Como se describió anteriormente, los animales *dvIs2* presentan un fenotipo de parálisis a lo largo del envejecimiento, el cual es potenciado por la mutación *gsr-1(m+,z-)* (Figura 3.9a). Si la mutación *gsr-1(m+,z-)* estuviese alterando la mitofagia, y esto fuese la consecuencia del aumento de la agregación en los modelos ensayados, la mutación *dct-1(tm376)* debería reproducir el fenotipo de parálisis de los animales *dvIs2; gsr-1(m+,z-)*. Sin embargo, la mutación *dct-1(tm376)* no causó una parálisis más temprana en los animales *dvIs2*, ni existió un efecto sinérgico bajo un fondo *gsr-1(m+,z-)* (Figura 3.23a).

Para descartar que la mutación *gsr-1* estuviese afectando la proteostasis celular a través de la alteración del mecanismo de mitofagia, decidimos evaluar esta posibilidad en un modelo adicional de agregación proteica. Para ello, expresamos en mutantes *dct-1(tm376)* la proteína metastable endógena de *C. elegans* UNC-52, que provoca un fenotipo de parálisis, y cuya expresión en animales *gsr-1(m+,z-)* causó una parálisis más temprana en comparación con los animales control (Figura 3.14a). Al igual que en animales *dvls2*, la mutación *dct-1(tm376)* no tuvo ningún efecto sobre la parálisis de los individuos *unc-52(e669su250)*, ni existió ninguna variación de dicho fenotipo en animales *gsr-1(m+,z-)* (Figura 3.23b).

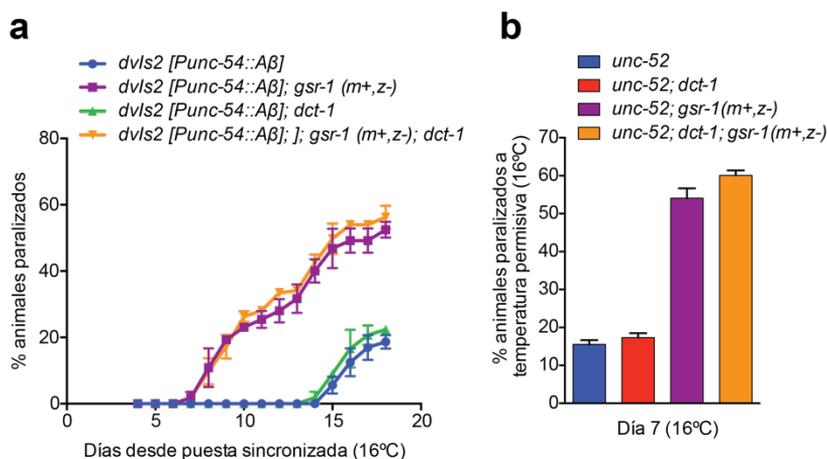


Figura 3.23. Efecto de la mutación *gsr-1* en la inhibición de la mitofagia. La mutación *dct-1(tm376)* no modificó el fenotipo de parálisis en animales *dvls2[Punc-54::Aβ 3-42]* (a) ni *unc-52(e669su250)* (b) así como en sus respectivos derivados *gsr-1(m+,z-)*. Los datos corresponden con la media de dos experimentos independientes ($n=50$ (a) y $n=150$ (b) por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM).

En su conjunto, los datos obtenidos con los mutantes *dct-1* descartan un efecto de la mutación *gsr-1* sobre la mitofagia y su posible implicación en la pérdida de proteostasis celular de animales *gsr-1(m+,z-)*.

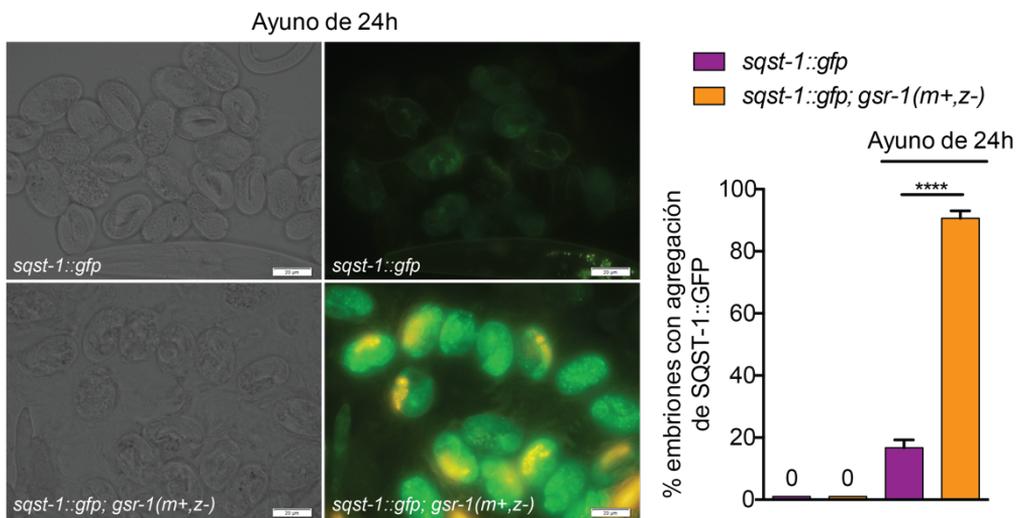
3.5.2. Estudio de la actividad autofágica en mutantes *gsr-1*.

En la búsqueda de la ruta de control de la proteostasis en la que la mutación *gsr-1* podría estar impactando, hemos encontrado que la ausencia de GSR-1 impidió la translocación nuclear del reportero HLH-30::GFP durante el estrés por ayuno (Figura 3.22), sugiriendo la posibilidad de una respuesta deficiente de la autofagia en los animales *gsr-1(m+,z-)*. Es por este hecho que decidimos continuar investigando el papel de la GSH en este mecanismo.

Resultados

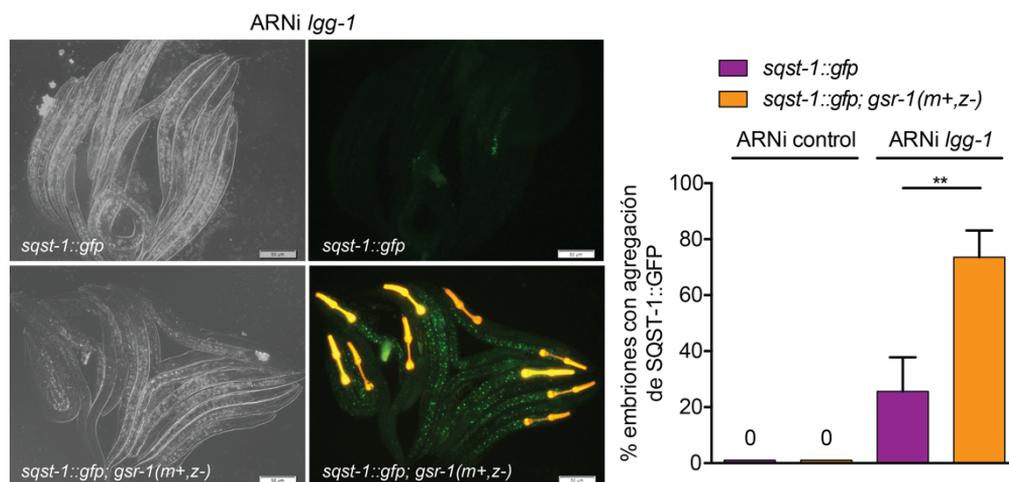
Durante la embriogénesis de *C. elegans*, una variedad de sustratos son degradados por autofagia. Entre estos sustratos se encuentra SQST-1, homólogo de la proteína p62/SQSTM1 en mamíferos, el cual es expresado muy débilmente y con una localización difusa en el citoplasma en embriones y larvas de animales silvestres (Zhang *et al*, 2015) . El bloqueo de la autofagia conlleva la formación de un gran número de agregados de SQST-1 en células intestinales de embriones y larvas, de forma que su cuantificación puede ser utilizada para la monitorización de la función autofágica (Zhang *et al*, 2015).

Así, para respaldar los resultados obtenidos con el reportero HLH-30::GFP, decidimos evaluar la efectividad de la autofagia ante la falta de GSR-1 mediante la utilización del reportero SQST-1::GFP expresado por desde el transgén *bpIs151[Psqst-1::sqst-1::gfp; unc-76(+)]* (Tian *et al*, 2010). Como se muestra en la gráfica de la Figura 3.24, los embriones *gsr-1(m+,z-)* no mostraron acumulación de SQST-1::GFP cuando sus progenitores fueron crecidos en presencia de comida, indicando que la autofagia basal ocurre de forma normal. Por el contrario, los embriones *gsr-1(m+,z-)* que provenían de progenitores que habían sido sometidos a ayuno durante 24 horas, mostraron una gran inducción de SQST-1::GFP, comparados con embriones procedentes de progenitores silvestres igualmente sometidos a ayuno (Figura 3.24), lo que confirma que la inducción de la autofagia frente al estrés por falta de alimento está comprometido en mutantes *gsr-1(m+,z-)*.



◀ **Figura 3.24. Efecto de la mutación *gsr-1(m+,z-)* en la acumulación de SQST-1::GFP en embriones de *C. elegans*.** La mutación *gsr-1(m+,z-)* incrementa la acumulación SQST-1::GFP en embriones cuyos progenitores han estado sometidos a ayuno durante 24 horas. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n=50 embriones por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.0001, usando *t-test* de dos colas. Las imágenes, realizadas en campo claro y fluorescencia, muestran ejemplos representativos de los embriones expresando SQST-1::GFP generados por progenitores expuestos a ayuno por 24 horas (barra de escala 20µm). **Nota:** en la imagen de los embriones *sqst-1::gfp; gsr-1(m+,z-)* aparecen también animales con el balanceador *qC1::rfp* (identificados por fluorescencia anaranjada). Esto es debido a que la población de embriones procede de progenitores balanceados, por lo que la muestra visualizada contiene tanto embriones con el balanceador, como embriones *gsr-1(m+,z-)* sin balanceador. No obstante, la cuantificación se realizó únicamente con aquellos embriones que no portaban el balanceador.

Durante la autofagia, una porción del citoplasma es envuelto por una doble membrana dando lugar al autofagosoma (AP). A continuación, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma, formándose el autolisosoma (AL), y es cuando tiene lugar la degradación de su contenido por las hidrolasas lisosomales (Parzych & Klionsky, 2014). En este proceso, la proteína LC3/LGG-1 facilita el crecimiento del autofagosoma a la vez que es incorporada en su membrana (Chapin *et al*, 2015). En nematodos se ha descrito que el silenciamiento del gen *lgg-1* mediante ARNi causa una reducción en el nivel de la autofagia (Samokhvalov *et al*, 2008; Zhang *et al*, 2009). Para demostrar si GSR-1 también regula la autofagia en ausencia de estrés, decidimos comprobar si existía acumulación de SQST-1::GFP en animales *gsr-1(m+,z-)* ante una disminución de la capacidad autofágica basal debida a la reducción de la expresión de *lgg-1*. Los resultados obtenidos indican que el silenciamiento del gen *lgg-1* causó un fuerte incremento de la acumulación de SQST-1::GFP en las larvas L1 de los animales *gsr-1(m+,z-)*, en comparación con los individuos control (Figura 3.25).



◀ **Figura 3.25. Acumulación del reportero SQST-1::GFP en mutantes *gsr-1(m+,z-)* sometidos a ARNi de *lgg-1*.** La mutación *gsr-1(m+,z-)* incrementa la acumulación de SQST-1::GFP en larvas crecidas en ARNi de *lgg-1*. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n=50 embriones por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). **p<0.01, usando *t-test* de dos colas. Las imágenes, realizadas en DIC y fluorescencia, muestran ejemplos representativos de larvas expresando SQST-1::GFP (barra de escala 50µm). **Nota:** en la imagen de las larvas *sqst-1::gfp; gsr-1(m+,z-)* aparecen también animales con el balanceador *qC1::rfp* (identificados por faringe con fluorescencia anaranjada). Debido a la dificultad técnica de seleccionar únicamente larvas L1 no balanceadas *gsr-1(m+,z-)*, las larvas fueron recogidas al azar para su visualización al microscopio, de forma que se seleccionaron larvas con y sin el balanceador, no obstante, la cuantificación se realizó únicamente con aquellas larvas que no portaban el balanceador.

Ambos resultados con el reportero SQST-1::GFP indican que la mutación *gsr-1* no causa un bloqueo total de la autofagia, ya que en los individuos *gsr-1(m+,z-)* no se observa agregación de este reportero cuando son crecidos en condiciones sin estrés o cuando la autofagia basal no está comprometida. Sin embargo, en animales *gsr-1(m+,z-)* la inducción de la autofagia es mucho menos eficiente en condiciones de ayuno o cuando ésta se compromete por silenciamiento de *lgg-1*.

3.5.3. Reproducción del impacto de la mutación *gsr-1* en la agregación de proteínas mediante el bloqueo genético de la autofagia.

Nuestros datos sugieren una deficiencia del mecanismo de autofagia en los mutantes *gsr-1(m+,z-)*, que explicaría por qué en estos animales se potencian los fenotipos deletéreos en los modelos de proteostasis. Esto nos hizo plantearnos si el bloqueo de la autofagia reproduciría el empeoramiento de los fenotipos asociados a la agregación de proteínas en dichos modelos, de igual modo que ocurre en mutantes *gsr-1(m+,z-)*. Aunque ya existen estudios previos que describen el efecto de la inhibición de la autofagia en los fenotipos derivados de la expresión de Aβ, α-SYN y poliQ, estos fueron realizados mediante ensayos con ARNi (Jia *et al*, 2007; Hamamichi *et al*, 2008; Florez-McClure *et al*, 2007) pero no con mutantes de dicha ruta degradativa. Además, no hemos encontrado evidencia del papel de la autofagia sobre los fenotipos de los mutantes *unc-52* y *let-60*.

Decidimos por tanto investigar la implicación de la autofagia en los modelos de proteostasis mediante el bloqueo de la autofagia de forma genética empleando animales con la mutación *atg-3(bp412)*, la cual impide la elongación de los autofagosomas (Tian *et al*, 2010).

En primer lugar, expresamos el péptido A β en células musculares de animales *atg-3(bp412)* mediante el transgén *dvlS2 [Punc-54::A β ₃₋₄₂::unc-54 3'-UTR]*, que como se describió anteriormente, causa un fenotipo de parálisis a 20°C. El bloqueo de la autofagia provocó un incremento de la parálisis a la temperatura permisiva de 16°C en los individuos que expresaron A β (Figura 3.26a).

De forma similar, evaluamos el efecto de la mutación *atg-3(bp412)* en animales que portan el transgén *baln12[Punc-54::a-synuclein::gfp]* y que sufren parálisis a lo largo del envejecimiento por expresión de α -SYN::GFP en células musculares de *C. elegans* (Hamamichi *et al*, 2008). Comprobamos que la mutación *atg-3(bp412)* también causa una parálisis mucho más temprana en los animales *baln12* (Figura 3.26b).

Además, también cuantificamos una mayor agregación de Q40::YFP en células musculares, expresado desde el transgén *rmls133 [Punc-54:Q40::yfp]*, en los mutantes *atg-3(bp412)* (Figura 3.26c).

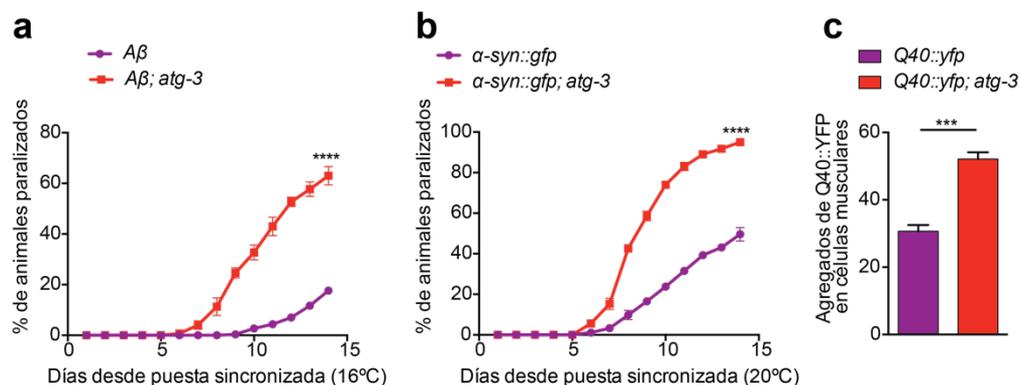


Figura 3.26. Efecto de la mutación *atg-3(bp412)* en *C. elegans* que expresan A β , α -SYN::GFP y Q40::YFP en células musculares. La mutación *atg-3(bp412)* incrementa el fenotipo de parálisis en animales que expresan el péptido A β (**a**) y α -sinucleina::GFP (**b**) en células musculares. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes (n=25 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.0001, mediante el test log-rank (Mantel-Cox). **c**) La mutación *atg-3(bp412)* causa un aumento del número de agregados de Q40::YFP, cuantificados a día 3 tras la puesta sincronizada. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n=18 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ***p<0.001, usando *t-test* de dos colas.

Con todos estos resultados pudimos confirmar la relación de la autofagia con los fenotipos de agregación de proteínas en los modelos humanizados de Alzheimer, Parkinson y enfermedades de poliglutaminas descritas anteriormente. Además, comprobamos como el bloqueo de la autofagia en estos tres modelos reprodujo el

empeoramiento de los fenotipos asociados a la agregación de proteínas de igual forma que hemos visto ante la falta de GSR-1.

Como ya comentamos anteriormente, no se ha descrito que exista implicación de la autofagia sobre los fenotipos de los mutantes termosensibles *unc-52(e669su250)* o *let-60(ga89)*, por lo que decidimos bloquear la autofagia en estos animales mediante la mutación *atg-3(bp412)* y comprobar su efecto a temperatura permisiva. Al igual que en los mutantes *gsr-1(m+,z-)*, la mutación *atg-3(bp412)* incrementó la parálisis de los animales *unc-52(e669su250)* crecidos a temperatura permisiva de 16°C (Figura 3.27a). Además, bloqueando parcialmente la autofagia mediante ARNi de *lgg-1*, obtuvimos resultados similares, con un incremento significativo de la parálisis de los mutantes *unc-52(e669su250)* con respecto al ARNi control (Figura 3.27b).

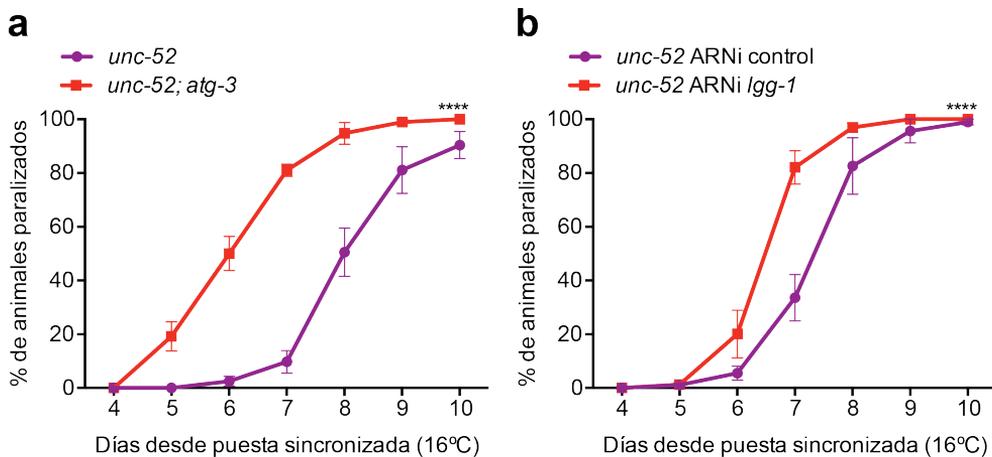


Figura 3.27. Efecto de la mutación *atg-3(bp412)* y el silenciamiento por ARNi de *lgg-1* en *C. elegans* que expresan la proteína mestaestable UNC-52. (a) La mutación *atg-3(bp412)* incrementa el fenotipo de parálisis de animales *unc-52(e669su250)* cuando son crecidos a la temperatura permisiva de 16°C. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n=50 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.0001, mediante el test log-rank (Mantel-Cox). (b) El silenciamiento mediante ARNi de *lgg-1* causa una parálisis más temprana en los animales *unc-52(e669su250)* crecidos a 16°C. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n=50 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.0001, mediante el test log-rank (Mantel-Cox).

Por otro lado, debido a que las mutaciones *atg-3(bp412)* y *let-60(ga89)* se encuentran localizadas muy cerca entre sí en el cromosoma IV, lo que dificulta la obtención de este doble mutante, decidimos emplear ARNi de *atg-3* y *lgg-1* para comprobar el efecto de la deficiencia en la autofagia en el fenotipo de arresto embrionario de los animales *let-60*. Sin embargo, a diferencia que con los mutantes *unc-52*, los ensayos

con ARNi no mostraron un incremento significativo de la letalidad embrionaria de los animales *let-60* (Figura 3.28).

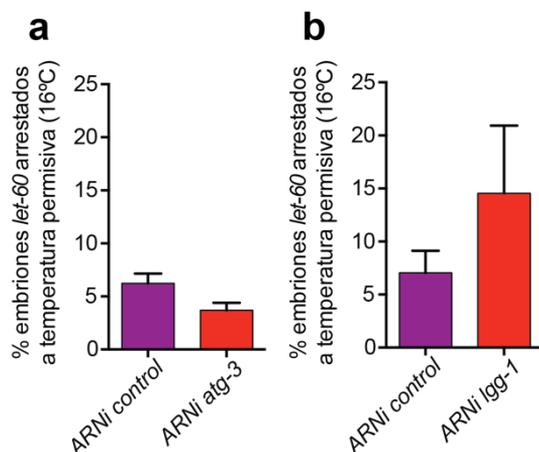


Figura 3.28. Efecto del silenciamiento mediante ARNi de *atg-3* y *lgg-1* en *C. elegans* que expresan la proteína mestaestable LET-60. El ARNi de *atg-3* (a) y *lgg-1* (b) no incrementa el fenotipo de arresto embrionario en los animales *let-60(ga89)* cuando son crecidos a la temperatura permisiva de 16°C. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes ($n \geq 100$ animales/embriones por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM).

En su conjunto, nuestros datos indican que UNC-52, al igual las proteínas A β , α -SYN y poliQ::YFP, también es degradada por autofagia y que el bloqueo de este mecanismo degradativo reproduce el empeoramiento de su fenotipo asociado de parálisis de igual forma que lo hace la mutación *gsr-1(m+,z-)*. En cuanto a los animales que expresan LET-60, es posible que el ARNi no tenga un efecto sobre el fenotipo de letalidad embrionaria de estos animales, de igual modo que el ARNi en los animales que expresan UNC-52 no provoca una parálisis tan severa como la que provoca la mutación *atg-3(bp412)* (Figura 27b). Por lo tanto, con los ensayos de ARNi no podemos descartar que, al igual que en los modelos anteriores, exista una interacción entre el bloqueo de la autofagia mediante la mutación *atg-3(bp412)* y el arresto embrionario de los animales *let-60(ga89)*.

3.5.4. Efecto de la mutación *gsr-1* en la saturación de la autofagia.

Una posible consecuencia de la pérdida de homeostasis redox en los mutantes *gsr-1(m+,z-)* podría ser el incremento de la concentración celular de proteínas oxidadas, las cuales son susceptibles de formar agregados. Este posible incremento de proteínas oxidadas contribuiría por tanto a aumentar la carga de proteínas a ser degradadas por autofagia en todos los modelos de proteostasis ensayados, la cual ya está de por sí comprometida en los animales *gsr-1(m+,z-)*, lo que podría llevar al colapso de este mecanismo degradativo.

Para comprobar esta hipótesis, decidimos introducir la mutación *gsr-1* en animales cuya autofagia estuviese bloqueada mediante la mutación *atg-3(bp412)*. En estos dobles mutantes *atg-3(bp412); gsr-1(m+,z-)* expresamos los diferentes modelos de agregación de proteínas con el objetivo de encontrar un efecto sinérgico de ambas mutaciones sobre los fenotipos relacionados con la pérdida de proteostasis por agregación proteica. Es decir, con estos ensayos aislaríamos el efecto del GSH sobre la autofagia (ya que está inactivada por la mutación *atg-3*) y nos centraríamos exclusivamente en su efecto sobre el incremento en la agregación.

Primero intentamos expresar en los animales *atg-3; gsr-1(m+,z-)* el péptido A β en células musculares a partir de los transgénos *dvIs2* y *dvIs14*. Sin embargo, no fuimos capaces de aislar triples mutantes en ninguno de los dos casos, lo que podría sugerir una fuerte interacción deletérea entre ambas mutaciones en presencia de proteínas agregantes. En consonancia, aunque los animales *atg-3; gsr-1(m+,z-)* que expresaron α -SYN::GFP en células musculares fueron viables, se encontraban muy enfermos y un gran porcentaje de los animales presentaron eclosión interna de los embriones, lo que impidió la cuantificación de la agregación de esta proteína. Por el contrario, los animales *atg-3; gsr-1(m+,z-)* que expresaron Q40::YFP en células musculares mostraron el mismo nivel de agregación de Q40::YFP que los mutantes *gsr-1(m+,z-)* (Figura 3.29a), no observándose un efecto sinérgico entre ambas mutaciones en cuanto a número de agregados. Sin embargo, observamos que los animales *atg-3; gsr-1/qC1::rfp* presentaban un mayor arresto embrionario cuando expresaban Q40::YFP (Figura 3.29b).

Finalmente, los dobles mutantes *atg-3(bp412); gsr-1(m+,z-)* que expresaron la proteína metaestable UNC-52, mostraron una parálisis similar a la observada en los animales *gsr-1(m+,z-)* y *atg-3(bp412)* (Figura 3.29c).

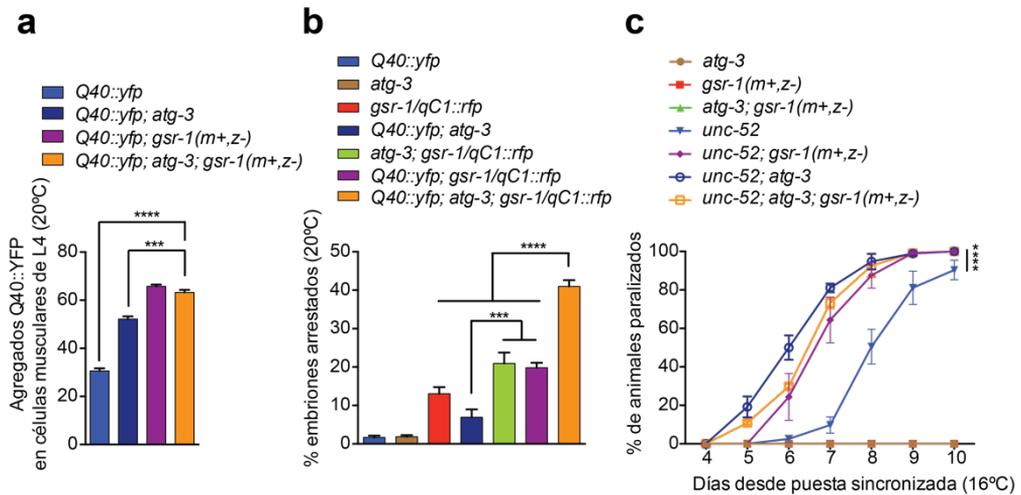


Figura 3.29. Fenotipos de los animales *atg-3*; *gsr-1(m+,z-)* expresando Q40::YFP y UNC-52. a) Las mutaciones *atg-3* y *gsr-1(m+,z-)* aumentan la agregación de Q40::YFP en células musculares pero no hay un efecto sinérgico de ambas mutaciones. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n=18 por ensayo y esterpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.001, ****p<0.0001, usando *t-test* de dos colas. b) Incremento de arresto embrionario en mutantes *atg-3* y *gsr-1(m+,z-)* que expresan Q40::YFP en células musculares. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n≥150 por ensayo y esterpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ***p<0.001, ****p<0.0001, usando *t-test* de dos colas. c) El doble mutante *atg-3*; *gsr-1(m+,z-)* no muestran mayor parálisis que los individuos *atg-3* y *gsr-1(m+,z-)* cuando expresan UNC-52 a la temperatura permisiva de 16°C. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n=50 por ensayo y esterpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.0001, mediante el test log-rank (Mantel-Cox).

Con todos estos ensayos comprobamos que la pérdida de proteostasis celular debida a la mutación *gsr-1* puede llegar a comprometer la viabilidad de animales con la autofagia bloqueada, aunque no afecta de igual manera a todos los modelos de agregación.

Otra estrategia que ideamos para corroborar si la mutación *gsr-1* estaría incrementando la cantidad de proteínas a ser degradadas por autofagia, consistió en expresar de manera conjunta la proteína SQST-1::GFP, sustrato específicamente degradado por autofagia, junto con la proteína metaestable LET-60 o UNC-52 en un fondo *gsr-1(m+,z-)*, con lo que aumentaría la carga de agregados a ser eliminados por autofagia.

Aunque se ha descrito que SQST-1::GFP podría acumularse ante la presencia de otros agregados proteicos (Zhang *et al*, 2015), en nuestros ensayos no se observó agregación de SQST-1, ni ante la expresión de LET-60, ni de UNC-52 (datos no mostrados). Sin embargo, los animales *let-60* que expresaron SQST-1::GFP

presentaron un incremento significativo en la letalidad embrionaria a la temperatura permisiva de 16°C (Figura 3.30a). Además, no fue posible generar animales *let-60* con la mutación *gsr-1/qC1::gfp* y que expresasen SQST-1::GFP, lo que indica una posible interacción letal.

Por otro lado, la expresión conjunta de las proteínas SQST-1::GFP y UNC-52 en un fondo *gsr-1(m+,z-)*, causó una parálisis mucho más temprana en comparación con la de los controles *unc-52; gsr-1(m+ z-)* y *unc-52; sqst-1::gfp*, respectivamente (Figura 3.30b).

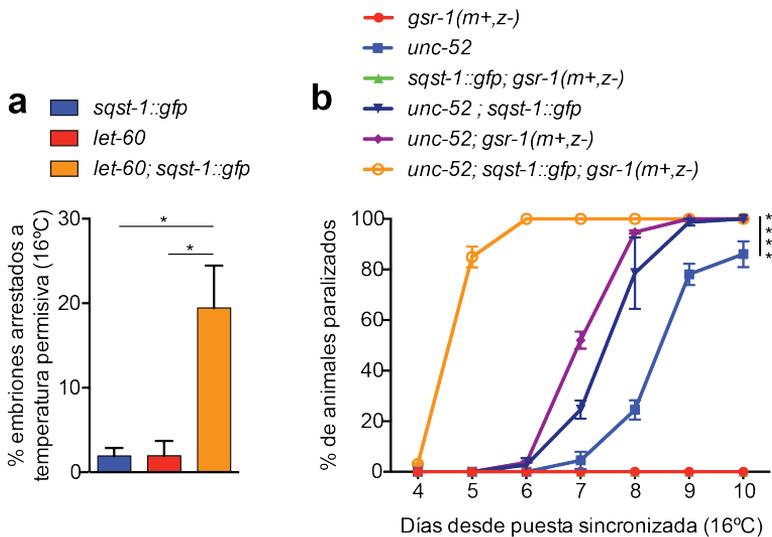


Figura 3.30. Fenotipos de animales que expresan de forma conjunta SQST-1::GFP y proteínas metaestables LET-60 y UNC-52. **a**) La expresión de la proteína SQST-1::GFP incrementa el fenotipo de arresto embrionario de los animales *let-60(ga89)*. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes ($n \geq 100$ por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). * $p < 0.1$, usando *t-test* de dos colas. **b**) La expresión conjunta de las proteínas SQST-1::GFP y UNC-52 provoca una mayor parálisis en animales *gsr-1(m+,z-)* a la temperatura permisiva de 16°C. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes ($n = 50$ por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). **** $p < 0.0001$, mediante el test log-rank (Mantel-Cox).

En su conjunto, estos datos sugieren que existe una priorización por la degradación de SQST-1::GFP mediante autofagia, ya que no observamos agregación de este reportero ante la expresión conjunta las proteínas metaestables LET-60 o UNC-52. Sin embargo, la degradación de estas dos proteínas endógenas sí que se vio alterada por la expresión de SQST-1::GFP en un mutante *gsr-1*, generando un fuerte fenotipo de proteotoxicidad. Todos estos datos en su conjunto confirman que la autofagia en animales *gsr-1(m+,z-)* no es eficiente y que un aumento de la cantidad de proteínas agregantes colapsa la vía de degradación autofágica.

3.5.5. Estudio del flujo autofágico.

Para una mayor comprensión de cómo la falta de GSR-1 impacta en la autofagia, decidimos comprobar si el flujo autofágico en animales *gsr-1(m+,z-)* se encontraba alterado. Como se describió anteriormente, LGG-1 interviene en la expansión de los autofagosomas (APs) y queda incorporado a su membrana. Posteriormente los APs se fusionan con lisosomas dando lugar a la formación de autolisosomas (ALs).

Para monitorizar el flujo autofágico en animales *gsr-1(m+,z-)*, empleamos el reportero *sqli11[Plgg-1::mCherry::gfp::lgg-1; rol-6(su1006)]* (Chang *et al*, 2017). Mediante este reportero es posible cuantificar tanto el número de APs como de ALs. Los APs son visualizados como puntos amarillos por la combinación de la fluorescencia de mCherry (rojo) y GFP (verde). La fusión de los APs con lisosomas crea un ambiente ácido que apaga la fluorescencia verde de la GFP, por lo que los ALs formados emiten sólo fluorescencia roja por parte de mCherry.

Usando este reportero y cuantificando la cantidad de APs y ALs presentes en la faringe de los animales, encontramos que el flujo autofágico fue afectado por la mutación *gsr-1*, ya que se aumentó de forma significativa el número de APs, y se produjo una disminución del número de ALs (Figura 3.31).

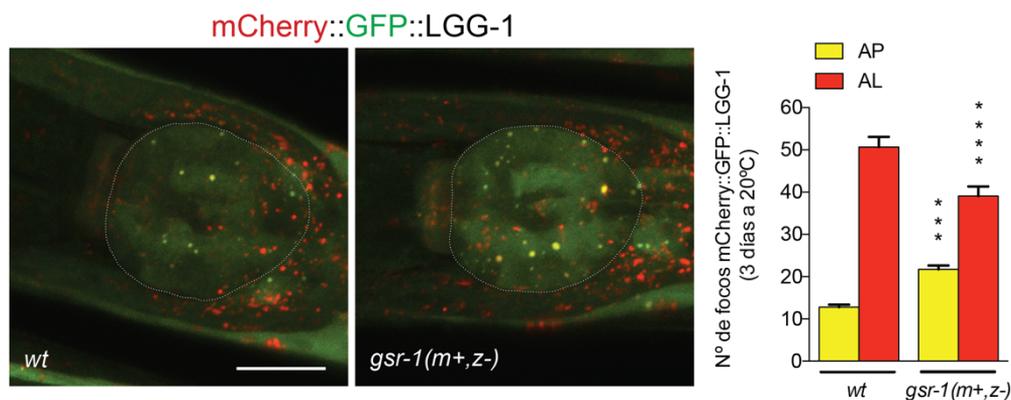


Figura 3.31. Efecto de la mutación *gsr-1* en el flujo autofágico de *C. elegans*. Fotografías de fluorescencia representativas de la faringe expresando el reportero *sqli11[Plgg-1::mCherry::gfp::lgg-1; rol-6(su1006)]*. Las imágenes fueron tomadas en el primer día de adulto (barra de escala 20µm). Los autofagosomas (AP) están marcados en amarillo y los autolisosomas (AL) marcados en rojo. La gráfica muestra la cuantificación de AP y AL, los datos son la media de tres experimentos independientes (n=12 animales por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ***p<0.001, ****p<0.0001 usando ANOVA con múltiple comparación de Tukey con respecto a AP y AL del control.

A continuación, decidimos emplear el reportero *mCherry::GFP::LGG-1* en animales *gsr-1(m+,z-)* que expresasen la proteína termosensible UNC-52, con lo que conseguimos que incrementase la presión de proteínas a degradar por autofagia. Como muestra la figura 3.32, la proteína UNC-52 expresada en individuos *gsr-1(m+,z-)* incrementó el número de APs en las “seam cells” de la hipodermis, lo que sugiere que esta proteína no está siendo degradada eficientemente en los animales *gsr-1(m+,z-)* y, por lo tanto, confirma el defecto del flujo autofágico debido a la falta de GSR-1.

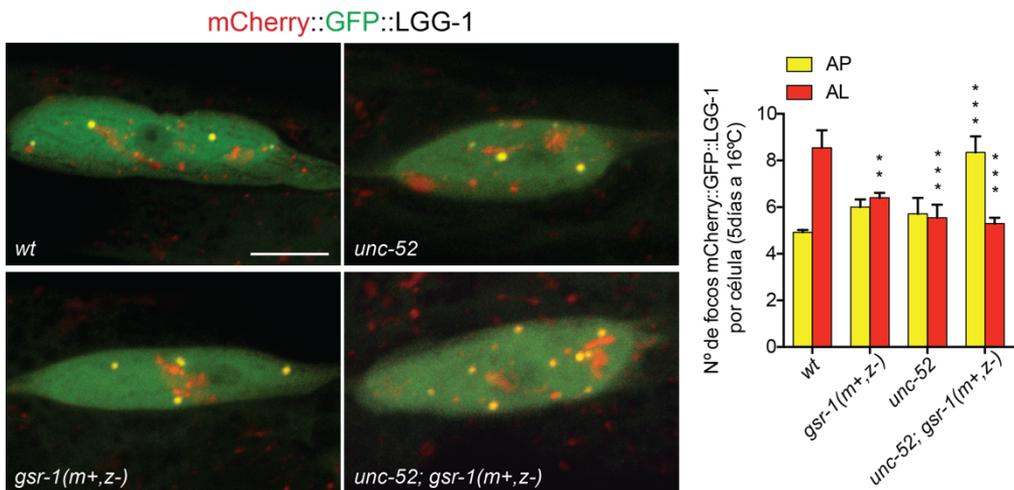


Figura 3.32. Efecto de la mutación *gsr-1* en el flujo autofágico de *C. elegans* que expresan la proteína termosensible UNC-52. Fotografías de fluorescencia representativas de “seam cells” de la hipodermis expresando el reportero *sqs11[Plgg-1::mCherry::gfp::lgg-1; rol-6(su1006)]*. Las imágenes fueron tomadas en el primer día de adulto (barra de escala 10µm). Los autofagosomas (AP) están marcados en amarillo y los autolisosomas (AL) marcados en rojo. La gráfica muestra la cuantificación de AP y AL y los datos son la media de cuatro experimentos independientes (n=12 animales por ensayo y estirpe, con 2 “seam cells” cuantificadas por animal). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). **p<0.01, ***p<0.001, usando ANOVA con múltiple comparación de Tukey con respecto a AP y AL del control.

3.6. Estudio de la regulación redox de TFEB/TFE3/HLH-30.

Como se muestra en la figura 3.22, la mutación *gsr-1* impidió la translocación nuclear ante la inducción por falta de alimento del factor de transcripción HLH-30, importante regulador transcripcional de la autofagia, lo que nos hizo investigar el impacto de la falta de GSH sobre este mecanismo de degradación. Así, como se describe en apartados anteriores, los animales *gsr-1(m+,z-)* muestran fenotipos severos relacionados con la agregación de una serie de proteínas que se han demostrado son degradadas por autofagia (Figuras 3.26 y 3.27). Además, también demostramos que la mutación *gsr-1* provoca un defecto del flujo autofágico (Figuras 3.31 y 3.32).

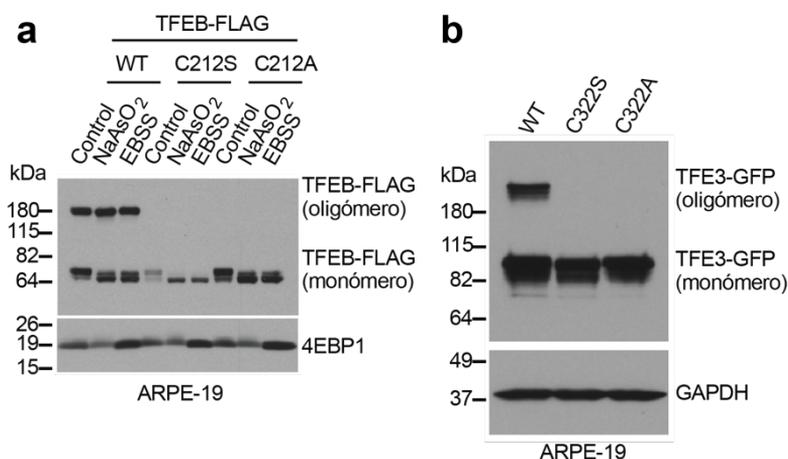
Dado que la mutación *gsr-1* parecía afectar a la dinámica de la localización subcelular de HLH-30, nos planteamos estudiar el posible efecto del GSH sobre este factor de transcripción. Analizando la secuencia de la proteína HLH-30, observamos que este factor de transcripción posee un único residuo de cisteína en la posición 284. Nos preguntamos entonces si pudiese existir alguna regulación redox directa de HLH-30 a través de esta única cisteína, lo que podría conectar el efecto de la mutación *gsr-1* con la autofagia deficiente que presentan los animales *gsr-1(m+,z-)*.

HLH-30 es el ortólogo de *C. elegans* de los factores de transcripción TFEB y TFE3 de mamíferos, cuya activación desencadena la inducción de la autofagia. Analizando las secuencias de estas proteínas humanas, encontramos que también poseen una sola cisteína, que se encuentra en posición 212 (C212) en el caso de TFEB y en posición 322 (C322) en TFE3 (Figura 3.33). En ambas proteínas, la cisteína se encuentra situada inmediatamente por debajo de una serina fundamental para la regulación de la localización subcelular de estos factores, ya que su fosforilación media la interacción de cada uno de ellos con las proteínas 14-3-3 y su retención en el citosol (Roczniak-Ferguson *et al*, 2012). Aunque la C284 de HLH-30 también está precedida de un residuo de serina, el alineamiento de la secuencia de las tres proteínas muestra que la C284 de HLH-30 no se encuentra en el dominio equivalente a las C212 y C322 de TFEB y TFE3, las cuales se localizan dentro del motivo de unión a las proteínas 14-3-3 (Figura 3.33) mientras que la S283 y C284 de HLH-30 están localizadas entre el dominio de unión al ADN y la cremallera de leucina.

3.6.1. Función del residuo de cisteína conservado de TFEB/TFE3

El grupo de Rosa Puertollano encontró que en análisis por Western blot de lisados de células en condiciones no reductoras, además de la fracción de las proteínas TFEB/TFE3 alrededor de 65kDa, la cual corresponde a monómeros de ambas proteínas, también aparecía una fracción de mayor tamaño, por encima de los 180kDa, debida probablemente a la formación de oligómeros. Además, en algunas ocasiones también aparecía una fracción de 130kDa, más débil, que podría corresponder a dímeros. En cuanto a los oligómeros, éstos fueron más abundantes cuando las células fueron sometidas a estreses que inducen la activación de estos factores de transcripción, y se observó su rápida disociación una vez se eliminaba el estrés, indicando que este proceso de oligomerización es dinámico y reversible (Martina *et al*, 2021).

Debido a que la interacción entre proteínas puede estar regulada por puentes disulfuros entre cisteínas, nos planteamos si la formación de los oligómeros dependía de la única cisteína presente en TFEB y TFE3. Para ello, se generaron líneas celulares que expresaban las proteínas TFEB o TFE3 con las respectivas cisteínas C212 o C322 sustituidas por residuos de serina (TFEB-C212S y TFE3-C322S) o por alanina (TFEB-C212A y TFE3-C322A). En los extractos celulares de estas líneas, analizados en condiciones no reductoras, no se observó la fracción correspondiente a oligómeros, tanto en situaciones basales como cuando los cultivos fueron sometidos a diferentes estreses como arsenito sódico o ayuno (EBSS) (Figura 3.34), lo que indica que la formación de estos oligómeros es completamente dependiente de la una única cisteína que poseen ambas proteínas.



◀ **Figura 3.34. Análisis por Western blot, en condiciones no reductoras, de lisados de células ARPE-19 expresando las proteínas TFEB-FLAG-WT o mutantes y TFE3-GFP-WT o mutantes.** a) La mutación en la cisteína 212 de TFEB impide la oligomerización. Las células fueron tratadas con 250 μ M de NaAsO₂ o EBSS (condición de ayuno en células) durante 1 hora. 4EBP1 usado como control de carga. b) La mutación en la cisteína 322 de TFE3 impide la oligomerización. GAPDH empleado como control de carga. Modificado de Martina *et al*, 2021.

Seguidamente, mediante análisis de espectrometría de masas, se determinó que en condiciones basales el residuo de cisteína de TFEB y TFE3 monomérico está principalmente reducido. Sin embargo, en condiciones de estrés se detectó que en la fracción monomérica el residuo de cisteína estaba glutacionilado. La glutacionilación es una modificación postraduccional reversible en la que el GSH es transferido al grupo tiol de las cisteínas de proteínas para protegerlas de daño oxidativo (Xiong *et al*, 2011). Por otro lado, la fracción oligomérica no mostró glutacionilación, ni tampoco se pudo identificar ninguna cisteína libre en esta fracción mediante espectrometría de masas, lo que confirmaría que, en los oligómeros, las cisteínas podrían estar formando puentes disulfuro. Además, mediante la mutación de la serina adyacente a la cisteína (que impide la unión de TFEB o TFE3 a las proteínas 14-3-3 y, por tanto, se evita que queden retenidas en el citosol), se observó un incremento en la formación de oligómeros, sugiriendo que la unión de TFEB o TFE3 a las 14-3-3 protege a la cisteína de la oxidación y previene la formación de oligómeros (Martina *et al*, 2021).

Finalmente, para ahondar en la función fisiológica de los oligómeros de TFEB y TFE3, se cuantificó la distribución subcelular de TFEB y TFEB-C212A tanto en situaciones basales como ante diferentes estreses. No se observó ninguna diferencia en la translocación al núcleo de ambas proteínas en ninguna de las condiciones ensayadas, lo que sugiere que el residuo de cisteína conservado no es esencial para la entrada en núcleo de estos factores de transcripción (Figura 3.35).

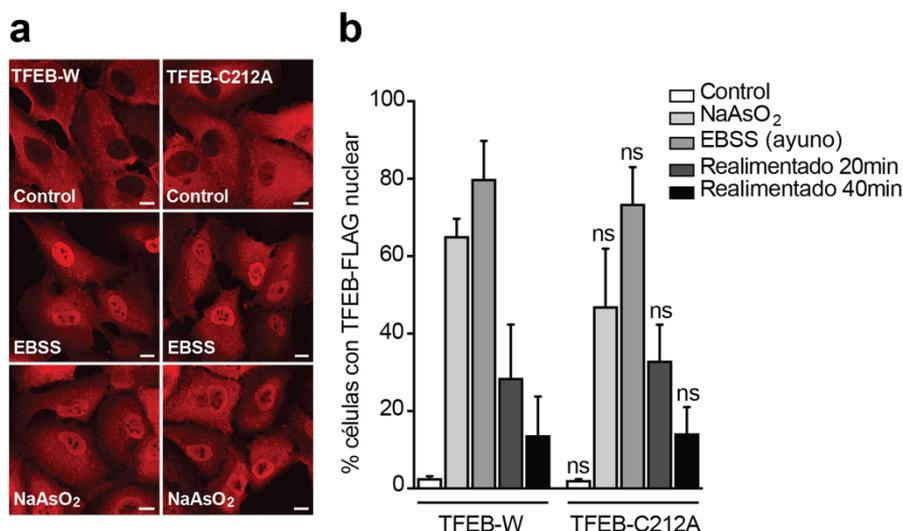


Figura 3.35. Localización subcelular de TFEB-FLAG-WT y TFEB-FLAG-C212A sobreexpresadas en células ARPE-19 en respuesta a diferentes tratamientos. La mutación en la cisteína 212 no afecta a la localización subcelular de TFEB. **a)** Imágenes representativas de microscopía confocal de inmunofluorescencia de células ARPE-19 sobreexpresando TFEB-FLAG-WT y TFEB-FLAG-C212A. Las células fueron tratadas con 250µM de NaAsO₂ o EBSS (condición de ayuno en células) durante 1 hora. Barra de escala 10µm **b)** Cuantificación de la localización subcelular de TFEB-FLAG sobreexpresada en células ARPE-19 tratadas con 250µM de NaAsO₂, EBSS durante 1 hora e incubadas con medio completo (realimentación) durante los tiempos indicados. Modificado de Martina *et al*, 2021.

Por otro lado, ante condiciones de estrés prolongado se identificó una progresiva desaparición de los monómeros TFEB y TFE3, mientras que los niveles de los oligómeros permanecieron constantes o incluso incrementaron (Figura 3.36). Esto sugiere que la formación de oligómeros proporciona una mayor estabilidad que los monómeros frente a su degradación cuando el estrés es mantenido de forma crónica (Martina *et al*, 2021).

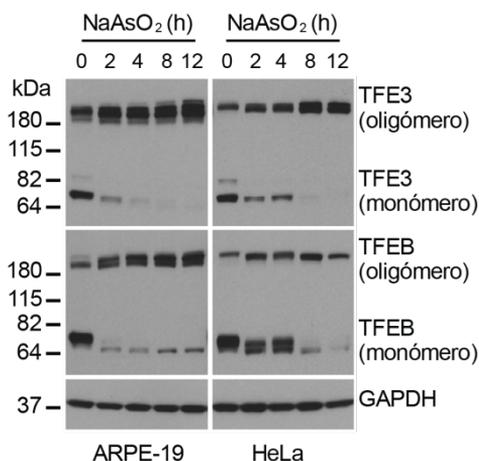


Figura 3.36. Análisis por Western blot, en condiciones no reductoras, de lisados de células ARPE-19 y HeLa expresando las proteínas TFEB o TFE3. El estrés prolongado incrementa la estabilidad de los oligómeros de TFE3 y TFEB. Las células ARPE-19 y HeLa fueron tratadas con 100µM y 50µM de NaAsO₂ respectivamente durante los tiempos indicados. GAPDH empleado como control de carga. Modificado de Martina *et al*, 2021

3.6.2. Función del residuo de cisteína conservado de HLH-30.

A la vista de los resultados *in vitro* con cultivos celulares sobre la importancia de los residuos C212 y C322 de TFEB y TFE3, respectivamente, en la formación de oligómeros y su función como estabilizadores de ambos factores de transcripción ante estreses prolongados, decidimos utilizar *C. elegans* para explorar la función fisiológica de la cisteína en el contexto *in vivo* de un organismo completo.

Para determinar si HLH-30 también forma oligómeros y si éstos son dependientes de la única cisteína que posee esta proteína en posición 284 (C284), primeramente expresamos la proteína silvestre y otra versión con la cisteína mutada a alanina, ambas fusionadas a tres copias del epitopo FLAG [HLH-30(WT)-FLAG y HLH-30(C284A)-FLAG, respectivamente], en células ARPE-19 de mamífero. Como se muestra en la figura 3.37, HLH-30 formó oligómeros, los cuales fueron totalmente dependientes de la C284 de igual forma que ocurre con TFEB y TFE3.

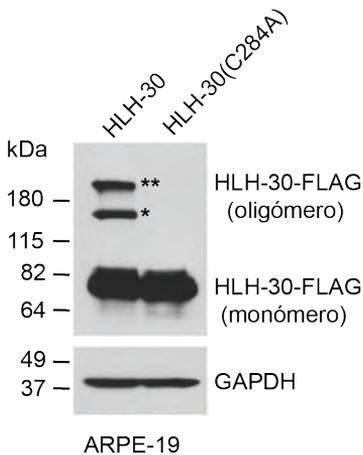


Figura 3.37. Análisis por Western blot en condiciones no reductoras de lisados de células ARPE-19 sobrexpresando las proteínas de *C. elegans* HLH-30 silvestre o HLH-30(C284A) marcadas con el epitopo FLAG. La mutación de la cisteína 284 impide la formación de dímeros y oligómeros de HLH-30. Los asteriscos indican las bandas correspondientes a dímeros (*) y oligómeros (**). GAPDH empleado como control de carga. Martina *et al*, 2021.

Para corroborar la capacidad de HLH-30 para formar oligómeros en el nematodo, generamos por CRISPR animales que expresan la proteína, tanto silvestre como con la cisteína mutada a alanina, desde el locus endógeno *hlh-30* de *C. elegans*, y fusionada a un triple epitopo FLAG y a GFP (HLH-30::FLAG::GFP y HLH-30(C284A)::FLAG::GFP). Estos animales fueron crecidos en condiciones normales o sometidos a ayuno, estrés que induce la translocación nuclear de HLH-30. En condiciones normales de crecimiento, el HLH-30 endógeno permaneció en forma mayormente monomérica, mientras que en los animales sometidos a ayuno,

aparecieron además las formas diméricas y oligoméricas, las cuales requieren del residuo C284 para su formación (Figura 3.38).

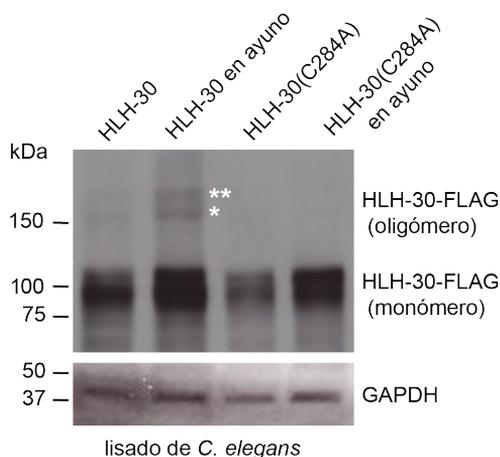


Figura 3.38. Análisis por Western blot en condiciones no reductoras de lisados de *C. elegans* expresando las proteínas HLH-30::FLAG::GFP o HLH-30(C284A)::FLAG::GFP. En los animales sometidos a ayuno se produce oligomerización de HLH-30, la cual es dependiente de la cisteína 284. Los asteriscos indican las bandas correspondientes a dímeros (*) y oligómeros (**). GAPDH empleado como control de carga. (Martina *et al*, 2021).

Estos resultados con HLH-30, junto con los anteriormente descritos en TFEB/TFE3, indican que la formación de oligómeros dependiente del único residuo de cisteína en estos factores de transcripción es un mecanismo conservado a lo largo de la evolución en metazoos.

3.6.3. Evaluación de la translocación nuclear de HLH-30.

A continuación decidimos evaluar si la C284 es necesaria para la activación de HLH-30. Para ello, animales que expresan una sola copia del reportero HLH-30::FLAG::GFP o HLH-30(C284A)::FLAG::GFP fueron sometidos a diferentes estreses que inducen la translocación nuclear de HLH-30. Clasificamos la localización subcelular del reportero dentro de tres categorías diferentes: 1) citoplasmática, con fluorescencia difusa en todo el animal; 2) nuclear débil, donde se observó localización nuclear en algunas células de la parte posterior del animal, pero no en la zona de la cabeza; y 3) nuclear fuerte, con una entrada nuclear robusta desde la zona de la cabeza hasta la parte posterior del animal (Figura 3.39).

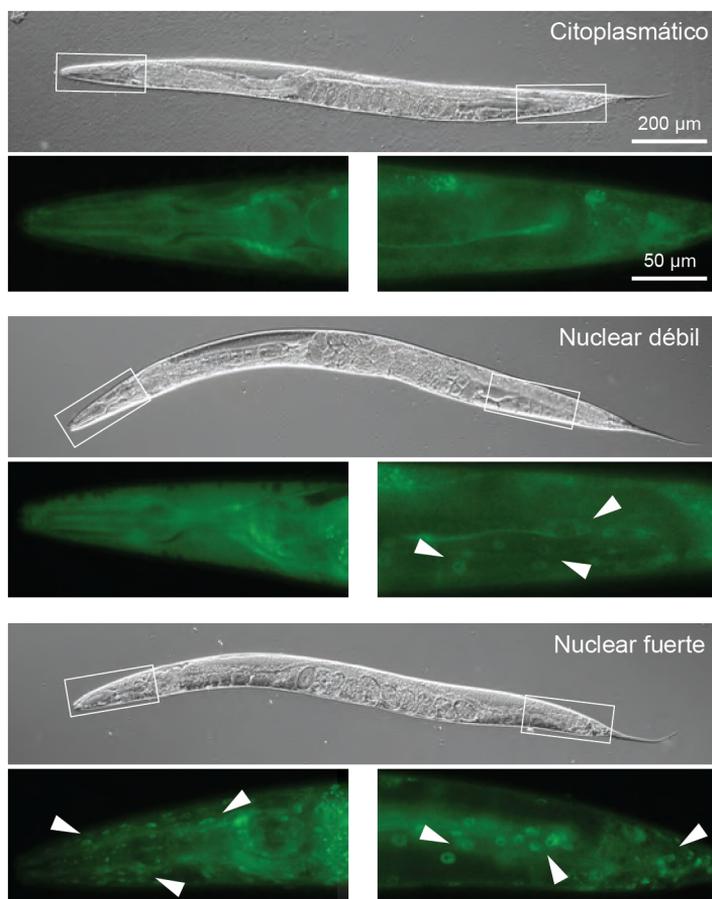


Figura 3.39. Imágenes representativas de microscopía DIC y fluorescencia de la localización subcelular del reportero HLH-30::FLAG::GFP en *C. elegans*. En la distribución citoplasmática el reportero se encuentra difuso a lo largo de todo el cuerpo del animal; Nuclear débil es considerada cuando existe marcaje de GFP en núcleos de algunas células de la parte posterior de los animales pero no en células de la zona de la cabeza; Nuclear fuerte cuando el marcaje de GFP en núcleos celulares aparece a largo de todo el cuerpo del animal, incluyendo la zona de la cabeza. Las puntas de flecha indican la localización nuclear de HLH-30::FLAG::GFP. Las barras de escala son 200μm en las imágenes de DIC y 50μm en las de fluorescencia, amplificadas de los recuadros mostrados en las imágenes de DIC.

Para observar la activación de HLH-30::FLAG::GFP y la posible implicación de la C284 en este proceso, sometimos a los animales a varios estreses como falta de alimento, choque térmico a 30°C, infección por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), estrés oxidativo por exposición a arsenito sódico (NaAsO₂), depleción de GSH por DEM y exposición a levamisol, un agonista del receptor nicotínico de acetilcolina utilizado para paralizar *C. elegans* para su visualización al microscopio. El tratamiento con levamisol causó una localización nuclear instantánea del reportero HLH-30::FLAG::GFP y se usó únicamente en el momento en el que los animales fueron montados para la visualización al microscopio. Para el resto de tratamientos se usó

azida sódica para paralizar a los animales (la cual no causa localización nuclear del reportero) y todos ellos provocaron una robusta entrada de HLH-30::FLAG::GFP en el núcleo tras una hora de incubación, la cual fue mantenida al cabo de 3 horas, a excepción de la exposición a DEM, donde el reportero retornó a una localización mayoritariamente citoplasmática (Figura 3.40). Este dato apoya los resultados previos que muestran que la homeostasis del glutatión es clave para la translocación nuclear de HLH-30 ante determinados estreses (Figura 3.22). Por otro lado, el reportero HLH-30(C284A)::FLAG::GFP muestran un patrón similar de localización nuclear al del reportero silvestre en todos estreses ensayados. Este resultado indica que, al igual que lo observado con TFEB/TFE3 en células de mamífero, la C284 no es requerida para la translocación nuclear de HLH-30 en *C. elegans*.

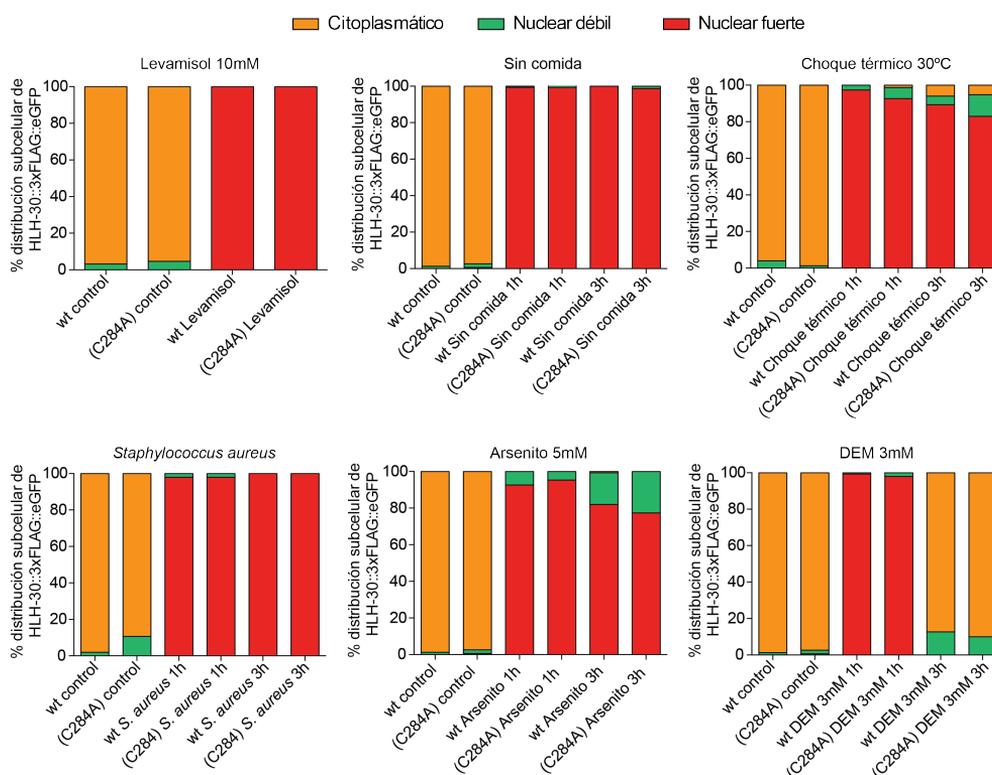


Figura 3.40. Cuantificación de la distribución subcelular de los reporteros HLH-30::FLAG::GFP y HLH-30(C284)::FLAG::GFP tras el tratamiento de *C. elegans* con varios estreses. La translocación al núcleo del reportero HLH-30::FLAG::GFP en presencia de diferentes estreses no varía por la mutación C284A. La localización nuclear es mantenida en todos los tratamientos a excepción de cuando los animales son expuestos a 3 mM DEM, donde la mayor parte del reportero vuelve a presentar una localización citoplasmática a las tres horas de exposición al tratamiento. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n=50 por ensayo y estirpe).

3.6.4. Estudio del papel fisiológico de la cisteína 284 de HLH-30.

HLH-30 interviene en la regulación de varios procesos fisiológicos en *C. elegans* como son la longevidad, formación de dauer o resistencia a estrés oxidativo y patógenos (Lapierre *et al*, 2013; Lin *et al*, 2018; Chen *et al*, 2017b; Visvikis *et al*, 2014). Decidimos entonces investigar si la C284 era esencial para la función de HLH-30 ante situaciones de estrés. Para ello, generamos por CRISPR la estirpe *hlh-30(syb1623 [Cys284Ala])*, que expresa la forma mutada de HLH-30(C284A) desde el locus endógeno. Esta estirpe nos permitía evaluar la funcionalidad de HLH-30(C284A) por comparación con fenotipos que presentan los animales silvestres y aquellos con la delección *hlh-30(tm1978)* que es un alelo nulo de *hlh-30* (Grove *et al*, 2009).

En primer lugar, ya que HLH-30 ha sido descrito como un factor fundamental para la longevidad de *C. elegans* (Lapierre *et al*, 2013), decidimos evaluar si los animales que expresan HLH-30(C284A) presentan alteración de este fenotipo. Sin embargo, la mutación C284 no causó reducción en la longevidad en comparación con los animales silvestres (Figura 3.41a), fenotipo muy patente en el mutante nulo *hlh-30(tm1978)*.

A continuación, ensayamos si la supervivencia a estrés oxidativo era dependiente de la C284, para lo cual tratamos a los animales con NaAsO₂ 7.5 mM. La figura 3.41b muestra que la resistencia a este tratamiento depende de HLH-30 ya que mutantes nulos *hlh-30(tm1978)* mueren aproximadamente a las 16 horas mientras que el silvestre y el animal *hlh-30(C284A)* sobrevivieron de forma similar, lo que nos permite concluir que la C284 no parece ser esencial para la supervivencia a NaAsO₂.

Finalmente, ya que HLH-30 interviene en la resistencia de *C. elegans* a patógenos (Visvikis *et al*, 2014), evaluamos la supervivencia de los animales que expresan HLH-30(C284A) a la infección por *Staphylococcus aureus*. En este caso, al contrario de lo que encontramos en los ensayos de longevidad y tratamiento con NaAsO₂, la C284 si fue necesaria para una resistencia completa de los animales a la infección por este patógeno (Figura 3.41c).

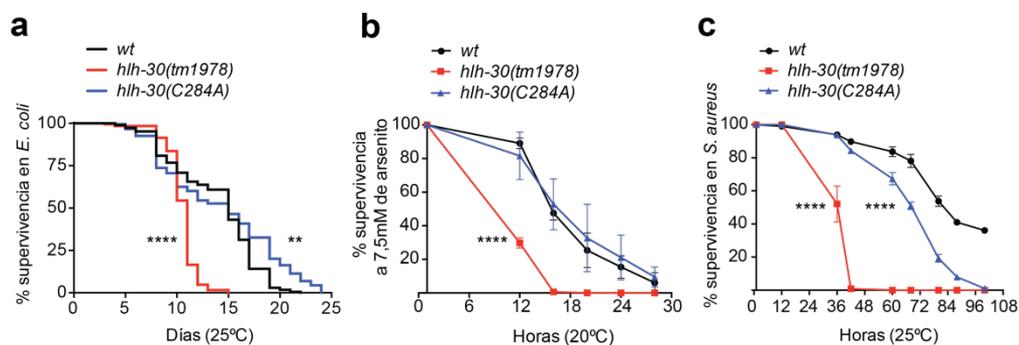


Figura 3.41. Evaluación del papel fisiológico del residuo de cisteína 284 de HLH-30. Ensayos *in vivo* de *C. elegans* expresando HLH-30(C284A). **a)** Los animales mutantes *hlh-30(tm1978)* son menos longevos en comparación con los silvestres y este fenotipo no es dependiente de la C284. El ensayo fue llevado a cabo a 25°C. La gráfica representa una curva de supervivencia Kaplan-Meier de dos experimentos independientes (n=100 por ensayo y estirpe). **p<0.01, y ****p<0.0001 mediante el test log-rank (Mantel-Cox) comparado con la estirpe *wt* como control. **b)** La supervivencia a 7.5mM de NaAsO₂ no es dependiente de la C284. Los datos son la media de tres experimentos independientes (n=120 por ensayo y estirpe). ****p<0.0001, usando ANOVA con múltiple comparación de Tukey con respecto a la estirpe control *wt*. La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). **c)** La supervivencia a la infección por *S. aureus* es parcialmente dependiente de la C284. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes (n=100 por ensayo y estirpe). ****p<0.0001, usando ANOVA con múltiple comparación de Tukey con respecto a la estirpe control *wt*. La barra de error indica el error estándar de la media (SEM).

3.6.5. Papel de la C284 de HLH-30 durante el desarrollo.

Los ensayos de longevidad y supervivencia a NaAsO₂ y *S. aureus* fueron llevados a cabo con animales adultos, es decir, con un desarrollo completo en el que ya han tenido lugar todas las divisiones celulares en la línea somática (individuos post-mitóticos). Para una mejor caracterización de la función de la C284 de HLH-30, decidimos estudiar si este residuo también jugaba un papel importante durante el desarrollo. Se ha descrito que en determinados mutantes que afectan al desarrollo de *C. elegans* a través de rutas de señalización diferentes, se induce la translocación nuclear de HLH-30. Ejemplo de ello son la inhibición de la ruta de la insulina/IGF-1 mediante la mutación del receptor de insulina *daf-2* (Kenyon *et al*, 1993), la restricción calórica provocada por la mutación de *eat-2* (Raizen *et al*, 1995), la inhibición del desarrollo de la línea germinal por la mutación en *glp-1* (Arantes-Oliveira *et al*, 2002) o la disfunción mitocondrial debida a la mutación *clk-1* (Ewbank *et al*, 1997), mutantes que todos ellos inducen una translocación al núcleo de HLH-30 de alrededor del 50% (Lapierre *et al*, 2013). Esto indica que estas mutaciones suponen un estímulo para la activación de HLH-30, lo cual nos proporciona un escenario idóneo para explorar el papel fisiológico de la C284 de HLH-30 durante el desarrollo del animal. Con este objetivo, decidimos estudiar el efecto de la C284 en la translocación nuclear de HLH-

30 durante el desarrollo larvario, y para ello, elegimos los fondos genéticos *eat-2* y *daf-2*, ya que presentan fenotipos más fácilmente evaluables.

Los mutantes *eat-2(ad1116)* se encuentran bajo restricción calórica permanente debido a que presentan una disminución en la frecuencia del bombeo faríngeo, lo que hace que la ingesta de alimento esté ralentizada (Raizen *et al*, 1995). Este estrés provoca la translocación nuclear de HLH-30 (Lapierre *et al*, 2013). Para evaluar si la C284 tiene efecto sobre la activación de este factor en respuesta a restricción calórica durante el desarrollo, primero estudiamos la translocación nuclear del reportero endógeno HLH-30::FLAG::GFP en animales mutantes *eat-2(ad1116)* (Raizen *et al*, 1995). Al igual que lo ya descrito en estudios previos, el reportero mostró una entrada nuclear de alrededor del 50%, la cual fue independiente de la C284 (Figura 3.42a).

Como consecuencia de la menor ingesta de alimento, los mutantes *eat-2* presentan menor tamaño y una apariencia mucho más clara (debido a la menor acumulación de grasa) que los animales silvestres, fenotipos que han sido asociados con una reducción en la señalización de mTOR (Bar *et al*, 2016). Con el objetivo de detectar algún fenotipo asociado a la expresión de HLH-30 en animales *eat-2* que nos sirviese para el estudio del papel de la C284, generamos los dobles mutantes *eat-2(ad1116); hlh-30(tm1978)* y *eat-2(ad1116); hlh-30(C284A)*. En estos animales observamos que la delección del gen *hlh-30* causó una disminución en el tamaño de los mutantes *eat-2(ad1116)*, fenotipo que también fue observado, aunque no de forma tan robusta, cuando la proteína HLH-30(C284A) es expresada en mutantes *eat-2(ad1116)* (Figura 3.42b).

Estos resultados demuestran que la restricción calórica durante el desarrollo larvario activa HLH-30 de forma independiente de la C284, pero este residuo es requerido para una respuesta eficiente a este estrés.

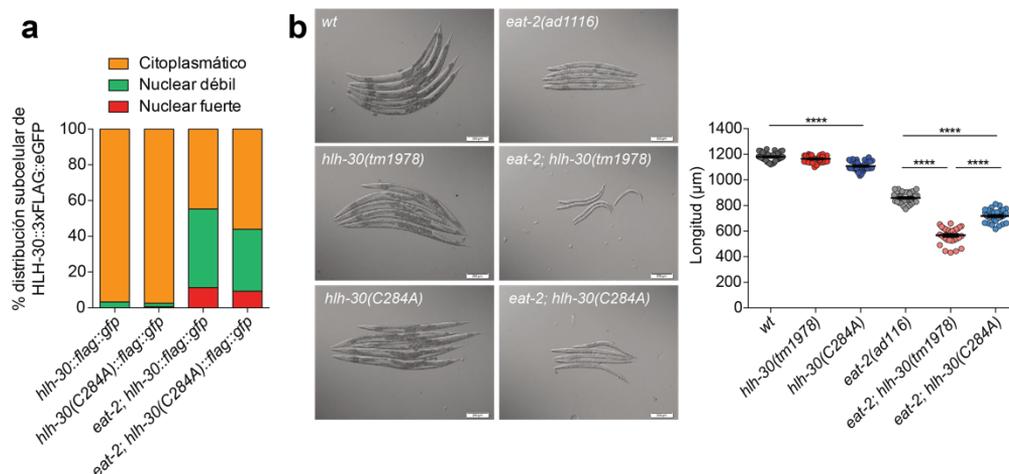


Figura 3.42. Cuantificación de la distribución subcelular de los reporteros HLH-30::FLAG::GFP y HLH-30(C284)::FLAG::GFP y de los fenotipos de retraso en el desarrollo larvario en mutantes *eat-2(ad1116)*. **a** La mutación *eat-2(ad1116)* induce la translocación al núcleo del reportero HLH-30::FLAG::GFP, siendo ésta independiente de la mutación C284A. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n=50 por ensayo y estirpe). **b** El desarrollo de los animales *eat-2(ad1116)* se ve afectado por la mutación *hlh-30* y este fenotipo depende parcialmente de la C284. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes (n=20 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.0001, usando ANOVA con múltiple comparación de Tukey. Las imágenes de DIC muestran ejemplos representativos de cada genotipo. La barra de escala es 200μm.

En respuesta a condiciones ambientales adversas, como son la alta densidad de población, la limitación de alimento o una temperatura elevada, *C. elegans* arresta de forma reversible en un estadio alternativo de resistencia llamado dauer (Cassada & Russell, 1975). Animales con la mutación en el receptor de la insulina *daf-2* forman dauers de forma constitutiva en función de la temperatura, fenotipo que ha sido relacionado la función autofágica (Meléndez *et al*, 2003).

Al igual que en los ensayos con el mutante *eat-2(ad1116)*, confirmamos que en los mutantes *daf-2(e1370)* (Kenyon *et al*, 1993) existe entrada constitutiva del reportero endógeno HLH-30::FLAG::GFP, y observamos que dicha translocación no es dependiente de la C284 (Figura 3.43a).

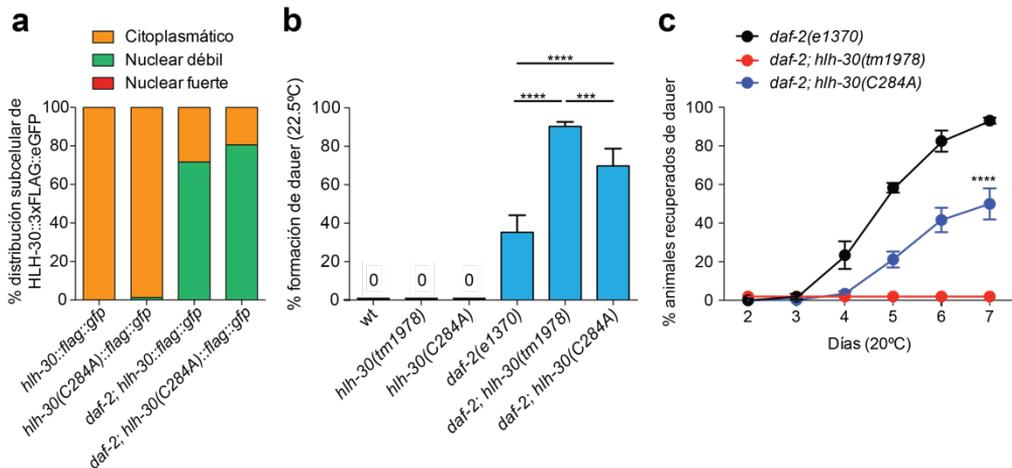
Se ha descrito que la mutación *hlh-30(tm1978)* incrementa la formación de dauer en animales mutantes *daf-2(e1370)* cuando son crecidos a 22.5°C (Lin *et al*, 2018). Este fenotipo nos pareció útil para evaluar si la mutación en la C284 de HLH-30 tenía algún efecto en la formación de dauer en mutantes *daf-2(e1370)*, por lo que, para explorar esta posibilidad, generamos los dobles mutantes *daf-2(e1370); hlh-30(tm1978)* y *daf-*

Resultados

2(e1370); hlh-30(C284A). Como se observa en la Figura 3.43b, la formación de dauer de los mutantes *daf-2(e1370)* fue potenciada no solo por la delección de *hlh-30*, sino también por la expresión de la proteína HLH-30(C284A).

De forma adicional, decidimos investigar si HLH-30 es también requerido para la recuperación del estadio de dauer una vez que las condiciones ambientales vuelven a ser óptimas. Sorprendentemente, encontramos que HLH-30 es completamente esencial para la salida de dauer en animales *daf-2(e1370)*, ya que las dauer *daf-2(e1370); hlh-30(tm1978)* fueron incapaces de recuperarse tras 7 días de incubación a 20°C en presencia de alimento (Figura 3.41c). Además, el residuo C284 también parece ser importante en este fenotipo, ya que las dauer *daf-2(e1370)* que expresaron la proteína HLH-30(C284A) tuvieron una recuperación considerablemente más lenta que las dauer *daf-2(e1370)* control (Figura 3.43c).

Con todos estos resultados en su conjunto podemos concluir que, al igual que ante el estrés que supone la restricción calórica, la C284 no es esencial para la translocación nuclear de HLH-30 durante el desarrollo de los animales *daf-2*. Sin embargo, sí hemos demostrado que este residuo es requerido para una respuesta eficiente en la formación y recuperación del estadio de resistencia dauer.



◀ **Figura 3.43. Cuantificación de la distribución subcelular de los reporteros HLH-30::FLAG::GFP y HLH-30(C284)::FLAG::GFP y de los fenotipos relacionados con la formación y recuperación de dauer en animales mutantes *daf-2(e1370)*.** **a)** La mutación *daf-2(e1370)* induce la translocación al núcleo del reportero HLH-30::FLAG::GFP, siendo ésta independiente de la mutación C284A. Los datos corresponden con la media de tres experimentos independientes (n=50 por ensayo y estirpe). **b)** La mutación *daf-2(e1370)* provoca entrada en dauer a 22.5°C, fenotipo potenciado por la mutación *hlh-30(tm1978)* y *hlh-30(C284A)*. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes (n=20 por ensayo y estirpe). La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.0001 y ***p<0.001 usando ANOVA con múltiple comparación de Tukey. **c)** La mutación *hlh-30(1978)* impide la recuperación de dauer de los mutantes *daf-2(e1370)*, mientras que la mutación de la C284 retrasa dicha recuperación. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes (n=20 por ensayo y estirpe) La barra de error indica el error estándar de la media (SEM). ****p<0.0001 usando ANOVA con múltiple comparación de Tukey con respecto al control *daf-2(e1370)*.

Capítulo IV. Discusión

El hecho de que la pérdida de proteostasis, a través de un incremento de la agregación de proteínas, afectase al estado redox celular (Kirstein *et al*, 2015), hizo que nos planteásemos si pudiese ocurrir el efecto inverso, es decir, si la falta de regulación en la homeostasis redox podría provocar un aumento de la agregación de proteínas. Con esta idea, y a través de un ensayo de ARNi de genes relacionados con el mantenimiento de la homeostasis redox sobre modelos de proteotoxicidad en *C. elegans*, nuestro grupo identificó que el gen *gsr-1*, que codifica para la única glutatión reductasa en el nematodo y perteneciente al sistema antioxidante glutatión, ejerce un papel protector frente a la agregación de proteínas (Tabla 3.1).

Este trabajo se ha enfocado, por tanto, en el estudio del efecto de la pérdida de homeostasis redox, debida a la mutación en el gen *gsr-1*, sobre la proteostasis celular mediante el empleo de modelos de agregación de proteínas en *C. elegans*, así como en la identificación de los mecanismos moleculares que relacionan la homeostasis redox con la proteostasis. Es importante destacar que nuestro objetivo ha sido comprender la relación entre la homeostasis redox y el estrés proteotóxico, y no la relación de la homeostasis redox en la enfermedad en sí, utilizando los modelos de agregación de proteínas humanas solo como vía para cuantificar la pérdida de proteostasis.

Los animales *gsr-1(m+,z-)* constituyen un modelo idóneo de desregulación redox, como indican resultados previos del grupo, en los que se caracterizó su mayor sensibilidad a compuestos generadores de EROs como son la juglona y el paraquat (Mora-Lorca *et al*, 2016). En este fondo genético, hemos sobreexpresado en diferentes tejidos de *C. elegans*, proteínas de origen humano con tendencia a la agregación relacionadas con enfermedades neurodegenerativas (Morley *et al*, 2002; Link, 1995; Teixeira-Castro *et al*, 2011; Parker *et al*, 2001; Moronetti Mazzeo *et al*, 2012; Fong *et al*, 2016; Van Ham *et al*, 2008; Sulston *et al*, 1975). Además, hemos empleado modelos de agregación de proteínas endógenas de *C. elegans* para descartar que los resultados obtenidos se deban al efecto de la sobreexpresión de proteínas humanas (Gidalevitz *et al*, 2006). En todos los modelos estudiados, la falta de GSR-1 provoca un incremento de la agregación proteica, poniéndose de manifiesto tanto de forma visible mediante el incremento de agregados fluorescentes de fácil cuantificación, como de forma indirecta, debido al empeoramiento de los

fenotipos asociados a la agregación, como son la parálisis, defectos en el desarrollo o letalidad embrionaria. Los resultados demuestran que este efecto del GSH sobre la proteostasis es independientemente del tipo de proteína, su origen (endógeno o exógeno) o el tejido de expresión, lo que indica que el sistema glutatión ejerce un papel protector general frente al estrés proteotóxico.

Como se describió en el apartado de introducción, el gen *gsr-1* da lugar a dos isoformas, una citosólica (GSR-1b) y otra mitocondrial (GSR-1a), de la enzima glutatión reductasa. Todos los modelos de proteostasis empleados en este trabajo generan agregados proteicos en el citoplasma, sugiriendo que la isoforma GSR-1b es la responsable del efecto sobre los fenotipos asociados a estos modelos. Sin embargo, no podíamos descartar que la falta de la isoforma mitocondrial tuviera también un efecto sobre la agregación de proteínas. Por ello, y una vez finalizados todos los ensayos que se incluyen en esta tesis, continuamos investigando esta posibilidad. Así, hemos comprobado como la falta de la isoforma mitocondrial GSR-1a, por si sola, no incrementa la agregación ni la parálisis en animales que expresan las proteínas Q40::YFP o UNC-52, respectivamente, lo que descartaría un posible efecto de la GSR-1 mitocondrial sobre la proteostasis en el citoplasma. No obstante, no podemos descartar un posible efecto regulador de esta isoforma mitocondrial en el mantenimiento de la homeostasis redox en mitocondria.

4.1. La inhibición farmacológica de la disponibilidad de GSH fenocopia el efecto de la falta de GSR-1 en modelos de agregación.

Los tratamientos con BSO, BCNU o DEM reducen los niveles celulares de GSH, lo que nos sirvió como otra forma de evaluar el efecto de la mutación *gsr-1* sobre la proteostasis. Dado que el tratamiento con DEM provocó un fenotipo severo de arresto embrionario en comparación con los otros dos químicos en los ensayos iniciales, realizados con el modelo de poliQ muscular Q40::YFP (Figura 3.4), decidimos que éste sería el tratamiento empleado para el resto de modelos a ensayar.

Nos ha resultado sorprendente que el tratamiento con DEM en animales que expresan Q40::YFP, A β y UNC-52 en células musculares causa un arresto completo del desarrollo larvario de los animales en los estadios L1-L2 (Figuras 3.4c, 3.9b y 3.14b). No obstante, este efecto del DEM en modelos de agregación en células

musculares no es general, ya que la expresión de α -SYN::YFP no afecta al desarrollo de los animales tratados con DEM (Figura 3.12b). La posible explicación de la falta de sensibilidad de este último modelo podría ser debida al hecho de que la expresión de la proteína α -SYN, a diferencia de las anteriores, no causa problemas de motilidad al ser expresada en células musculares (Van Ham *et al*, 2010), lo que sugiere que este modelo no sufre una toxicidad severa debida a la agregación de esta proteína como para afectar al desarrollo.

Por otro lado, en los modelos no musculares hemos comprobado como el efecto del tratamiento con DEM es variable. Mientras que en los animales con expresión de poliQ en células intestinales (Figura 3.8), A β en neuronas (Figura 3.11) o en los mutantes *let60(ga89)* (Figura 3.15) el fenotipo de arresto larvario ha sido parcial, la expresión de poliQ en neuronas mecanosensoriales (Figura 3.7) y α -SYN en neuronas (Figura 3.13) no se han visto alterados por este tratamiento. Posiblemente el impacto del DEM dependa del tipo de proteínas o su grado de expresión, este último siendo difícil de controlar ya que en todos estos modelos, las respectivas proteínas se expresan a partir de transgenes multicopia integrados de forma aleatoria en el genoma.

Llamativo es el caso de los animales que expresan proteína ATXN3::130::YFP en neuronas, los cuales son altamente resistentes a DEM, a pesar de que la expresión de la proteína ATXN3::75::YFP, utilizada como control al no provocar agregación, hace que los animales sean más sensibles a DEM. Se ha propuesto que son los oligómeros solubles de poliQ, A β y α -SYN los responsables de la proteotoxicidad celular (Kirkitaдзе *et al*, 2002; Treusch *et al*, 2009), siendo los agregados más grandes una forma de protección al acumular las formas más pequeñas y tóxicas. En todos los modelos que hemos ensayados de poliQ, en los que existe un umbral de patogenicidad en humanos dependiente de la longitud de la proteína, los fenotipos más severos han ocurrido en los animales que expresaban la proteína poliQ de mayor tamaño. Esto nos hace pensar que la sensibilidad a DEM de los animales que expresan la proteína ATXN::75::YFP pueda ser debida más al sitio de integración del transgen que la expresa, el cual es desconocido, que a la propia expresión de dicha proteína.

El impacto sobre el desarrollo provocado por el DEM difiere del efecto que provoca la mutación *gsr-1* en los modelos de agregación ensayados. Mientras que en los animales *gsr-1(m+,z-)* se potencian los fenotipos relacionados con la agregación de las proteínas expresadas (número de agregados, parálisis o letalidad embrionaria), el tratamiento con DEM afecta al desarrollo larvario. El DEM es un agente alquilante que ha sido tradicionalmente usado como depletor de GSH pero que recientes estudios han mostrado que también oxida grupos tiol de proteínas (Urban *et al*, 2017). Por tanto, es posible que el DEM cause una sobrecarga de proteínas endógenas oxidadas que añadirían estrés proteotóxico al ya de por sí provocado por la expresión de proteínas en los modelos de agregación empleados, llegando a impedir el desarrollo del animal. Otra posible explicación radica en las características propias de los mutantes *gsr-1(m+,z-)* usados en los ensayos, ya que el aporte materno podría enmascarar o disminuir el efecto deletéreo de la mutación en comparación con el tratamiento más potente del DEM.

4.2. La falta de GSR-1 tiene efecto sobre los mecanismos de regulación de la proteostasis.

El mantenimiento de la proteostasis está regulado por diferentes mecanismos moleculares. Algunos de estos mecanismos interaccionan directamente con las proteínas para regular su síntesis, plegamiento, tráfico o degradación, mientras que otros actúan como reguladores de la proteostasis respondiendo a diferentes estreses proteotóxicos (Powers & Balch, 2013; Hoppe & Cohen, 2020; Balchin *et al*, 2016; Lindquist & Kelly, 2011).

En este trabajo hemos querido investigar si el impacto de la pérdida de regulación redox del glutatión sobre la agregación de proteínas está relacionado con una deficiencia en la respuesta de alguno de los mecanismos de control de la proteostasis. Para ello, hemos utilizado diferentes reporteros involucrados en la regulación de la proteostasis, y así comprobar si la falta de GSR-1 (y por tanto de un aporte adecuado de GSH) causa una respuesta inadecuada o la deficiencia en la inducción ante un determinado estímulo.

Hemos encontrado que el reportero de *sod-3* se encuentra inducido ante la falta de GSR-1 en animales crecidos en condiciones normales (Figura 3.18). Este dato es

indicativo de que los animales *gsr-1(m+,z-)* se encuentran bajo estrés oxidativo crónico, ambiente que favorece la formación de agregados proteicos. Sin embargo, la inducción de este reportero no se ve alterada por el tratamiento con juglona, por lo que la mutación *gsr-1* no parece mediar la respuesta a estrés oxidativo agudo (Figura 3.18).

Por otro lado, la mutación *gsr-1* sí afecta a la UPR^{RE}. En situaciones basales, el RE se encuentra más oxidado que el citosol para dar lugar al plegamiento oxidativo de las proteínas, llevado a cabo por oxidorreductasas como las PDI (Perri *et al*, 2016). Ante estreses como el proteotóxico o el oxidativo, el RE se vuelve más reducido para favorecer la reducción e isomerización de enlaces aberrantes que se forman en las proteínas dentro de este orgánulo. Se ha demostrado que en células de mamífero, el GSH mantiene a las oxidorreductasas en su forma reducida para poder reparar la oxidación inadecuada de las proteínas (Jessop & Bulleid, 2004), lo que sugeriría que la falta de GSR-1 limitaría la capacidad de reparación de proteínas mal plegadas por parte de estas oxidorreductasas en el RE. En nuestros ensayos, el estrés oxidativo crónico en el que se encuentran los animales *gsr-1(m+,z-)* no parece desencadenar una respuesta de la UPR^{RE} (Figura 3.19), por lo que, al menos en este orgánulo, la mutación *gsr-1* no se encuentra provocando un estrés proteotóxico. Sin embargo, al inducir estrés proteotóxico en el RE mediante el tratamiento con tunicamicina, la respuesta de este mecanismo parece ser más deficiente en los animales *gsr-1(m+,z-)* (Figura 3.19). El hecho de que ésta menor inducción de la UPR^{RE}, aunque significativa, no sea muy dramática, nos ha llevado a descartar la idea de que el RE esté jugando un papel crucial en la agregación de proteínas ante la falta de GSR-1.

Los animales *gsr-1(m+,z-)* también han mostrado tener la UPR^{mit} inducida en condiciones basales. Como se ha comentado, en *C. elegans*, *gsr-1* es un gen esencial que codifica dos isoformas diferentes de GSR-1, una localizada en el citosplasma y otra en la mitocondria. Mientras que la actividad de la GSR-1 citoplásmica es absolutamente requerida para el desarrollo embrionario, la proteína mitocondrial es dispensable bajo condiciones basales de crecimiento (Mora-Lorca *et al*, 2016). Sin embargo, los animales *gsr-1(m+,z-)* presentan fenotipos asociados a disfunción mitocondrial como fragmentación mitocondrial, inducción de la UPR^{mit} y disminución de contenido de ADN mitocondrial (Mora-Lorca *et al*, 2016). En este

trabajo hemos confirmado cómo la mutación *gsr-1* induce la UPR^{mit} en condiciones basales. No obstante, la respuesta de este mecanismo protector no parece requerir la función de GSR-1 frente al estrés oxidativo provocado por el tratamiento con paraquat (Figura 3.20).

Esta inducción de la UPR^{mit} en animales *gsr-1(m+,z-)* en condiciones normales de crecimiento indica que, a diferencia que el RE, en la mitocondria sí se genera un estrés proteotóxico ante la no disponibilidad de GSH, pero que la respuesta en este orgánulo por parte de la UPR ante condiciones estresantes, al igual que en el RE, no es deficiente. El GSH es generado en el citoplasma y transportado al interior de la mitocondria, donde protege frente a ROS, compuestos xenobióticos y la oxidación de grupos tiol de las proteínas (Murphy, 2012). Es posible que sólo la falta de la isoforma de la GSR-1 mitocondrial, y consecuente pérdida de reciclaje de la forma GSSG en este orgánulo, sea la responsable de generar estrés mitocondrial. Para resolver esta cuestión y, tras concluir los ensayos incluidos en esta tesis doctoral, hemos comprobado cómo la mutación sólo de la isoforma mitocondrial GSR-1a, no induce la UPR^{mit}. Estos datos, junto con los descritos anteriormente, que muestran que la falta de la isoforma mitocondrial GSR-1a no incrementa la agregación de los modelos Q40::YFP y UNC-52, descartarían que la no disponibilidad de GSH únicamente en la mitocondria, sea la responsable de la alteración de la proteostasis en el citoplasma de los animales *gsr-1(m+,z-)*.

4.3. La pérdida de regulación redox debida a la mutación *gsr-1* impacta principalmente sobre la autofagia.

Sin duda, el fenotipo más interesante que hemos encontrado en la búsqueda de un mecanismo protector de la proteostasis alterado, ha sido comprobar cómo la activación del reportero HLH-30::GFP se ve afectada en los animales *gsr-1(m+,z-)*. El factor de transcripción HLH-30, ortólogo a los factores de transcripción TFEB y TFE3 de mamíferos, es un regulador de la autofagia que se encuentra fosforilado e inactivo en el citoplasma en condiciones basales. En presencia de distintos tipos de estreses, HLH-30/TFEB transloca al núcleo para inducir una serie de genes relacionados con la autofagia y la función lisosomal (O'Rourke & Ruvkun, 2013; Martina *et al*, 2012; Lapierre *et al*, 2013).

El estrés oxidativo es uno de los estreses que desencadenan la respuesta autofágica a través de la activación de TFEB/HLH-30 (Martina & Puertollano, 2018; Lin *et al*, 2018). El hecho de que la inducción del reportero de *sod-3* en animales *gsr-1(m+,z-)* (Figura 3.18) y por tanto, el indicio de que estos mutantes presentan estrés oxidativo crónico, haría suponer que en estos animales, el reportero HLH-30::GFP se acumulara en el núcleo como consecuencia de la respuesta autofágica a dicho estrés. Sin embargo, HLH-30::GFP se encuentra inactivo y con una distribución difusa en el citoplasma en mutantes *gsr-1(m+,z-)* (Figura 3.22), por lo que la falta de GSH (al menos la generada por la falta de GSR-1) no supone un estrés suficiente para inducir una respuesta autofágica.

En mamíferos, los factores de transcripción TFEB y TFE3 se encuentran regulados por la quinasa mTOR (Roczniak-Ferguson *et al*, 2012). En ausencia de nutrientes, mTOR se inactiva y deja de fosforilar a TFEB y TFE3 que son activados, translocando al núcleo donde inducen la transcripción de genes necesarios para el proceso autofágico. Estos factores también son activados por otros estreses de forma independiente a la inactivación de mTOR (Martina & Puertollano, 2018). En nuestros ensayos, cuando los animales se enfrentan a un estrés térmico, el reportero HLH-30::GFP transloca al núcleo tanto en animales silvestres como mutantes *gsr-1(m+,z-)* (Figura 3.22). Sin embargo, la mutación *gsr-1* impide la translocación nuclear de HLH-30::GFP cuando los animales son sometidos a estrés por ayuno (Figura 3.22). Dado que la falta de nutrientes conlleva a la inactivación de la quinasa TOR y consecuente acumulación nuclear de TFEB, nuestros datos sugieren que la falta de GSH en los animales *gsr-1(m+,z-)* podría estar impidiendo la translocación nuclear de HLH-30::GFP, debido a una deficiente regulación vía LET-363 (el homólogo en *C. elegans* de mTOR). Si al igual que ocurre en mamíferos, en *C. elegans* la inducción de este factor puede ocurrir de forma independiente a la inactivación de mTOR, esto podría explicar el hecho de que en animales *gsr-1(m+,z-)* sometidos a estrés térmico ocurra la translocación nuclear de HLH-30::GFP.

El reportero SQST-1::GFP, proteína homóloga de p62/SQSM1 en mamíferos, ha sido ampliamente empleada para la monitorización de la autofagia en *C. elegans*, acumulándose en embriones y larvas cuando la autofagia es bloqueada (Zhang *et al*, 2015). En mamífero, p62/SQSM1 media la degradación de proteínas

poliubiquitinadas sirviendo como enlace entre éstas y la proteína LC3, ortólogo de LGG-1 en *C. elegans*, la cual se encuentra enriquecida en la membrana de los autofagosomas, interviniendo en su expansión y terminación (Bjørkøy *et al*, 2005; Tian *et al*, 2010; Palmisano & Meléndez, 2016; Zhang *et al*, 2009).

Se ha descrito que la acumulación del reportero SQST-1::GFP en mutantes hipomórficos de autofagia puede ser revertida por la inducción de la autofagia mediante el ayuno o la inactivación de LET-363 (Guo *et al*, 2014; Lin *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2015; Tian *et al*, 2010). En los animales *gsr-1(m+,z-)* crecidos en ausencia de estrés, no se observa agregación de SQST-1::GFP, lo que indica que la mutación *gsr-1* no se encuentra bloqueando la autofagia en condiciones basales. Al someter a estos animales a ayuno, observamos cómo los embriones *gsr-1(m+,z-)* acumulan gran cantidad de agregados de esta proteína (Figura 3.24). Este resultado hace llamativo el hecho de que sea la falta de alimento la condición que provoque una fuerte agregación de SQST-1::GFP en los embriones *gsr-1(m+,z-)*, cuando es precisamente la inducción de la autofagia por ayuno el estímulo que revierte su acumulación. La inducción de la autofagia por ayuno viene dada por la necesidad a aporte de nutrientes a las células (Yorimitsu & Klionsky, 2005; Parzych & Klionsky, 2014). En esta situación, la quinasa LET-363/TOR queda inactivada permitiendo la translocación nuclear de HLH-30 (Lapierre *et al*, 2013). Sin embargo, en los animales *gsr-1(m+,z-)* no observamos entrada en núcleo del reportero HLH-30::GFP por ayuno (Figura 3.22), lo que sugeriría, como se comentó anteriormente, que la falta de GSH está alterando la respuesta autofágica vía señalización LET-363/mTOR. Este escenario podría ser la explicación a la acumulación de SQST-1::GFP en embriones *gsr-1(m+,z-)*, en los cuales, una falta de respuesta autofágica ante el estímulo del ayuno, conllevaría su acumulación.

Reduciendo la actividad de la autofagia mediante ARNi de *lgg-1*, la mutación *gsr-1* potencia la acumulación de SQST-1::GFP en larvas (Figura 3.25). Este efecto sinérgico entre la mutación *gsr-1* y la autofagia nos deja dos posibilidades no excluyentes. Una de ellas es que, como sugieren los ensayos anteriores, la falta de GSR-1 esté impactando directamente sobre la autofagia. En situaciones basales, este efecto inhibitorio de la mutación *gsr-1(m+,z-)* sobre la autofagia no es suficiente para que estos animales muestren acumulación de SQST-1::GFP. Sin embargo, el

efecto conjunto con el ARNi de *lgg-1*, pondría de manifiesto una autofagia alterada y como consecuencia la acumulación de agregados SQST-1::GFP. Otra posibilidad puede ser que la acumulación de SQST-1::GFP sea potenciada por la pérdida de regulación redox provocada por la mutación *gsr-1*, la cual genera la oxidación de proteínas celulares, incrementando así la formación de agregados. De hecho, se ha descrito que la acumulación del reportero SQST-1::GFP puede incrementar debido a su unión a orgánulos dañados o agregados proteicos (Zhang *et al*, 2015). De este modo, al reducir la capacidad de degradación vía autofagia mediante ARNi de *lgg-1*, se incrementaría la concentración de proteínas oxidadas por la falta de GSH y la consecuente la acumulación de SQST-1::GFP.

4.3.1. La mutación *gsr-1* podría incrementar la agregación de proteínas por supersaturación.

Los datos generados en este trabajo apuntan a que la la mutación *gsr-1* altera la función autofágica. Por otro lado, los animales *gsr-1(m+,z-)* presentan estrés oxidativo crónico, caracterizado por una mayor inducción del reportero de *sod-3* (Figura 3.18) además de, como indican resultados previos del grupo, una mayor sensibilidad a compuestos generadores de EROs como son la juglona y el paraquat (Mora-Lorca *et al*, 2016). Este ambiente oxidante podría estar alterando la proteostasis celular de los animales *gsr-1(m+,z-)*, por lo que no podríamos asignar los fenotipos potenciados que se muestran en los modelos de agregación únicamente al impacto de la mutación *gsr-1* sobre la autofagia.

El bloqueo de la autofagia mediante la mutación *atg-3* en diversos modelos de agregación de proteínas nos ha confirmado que las proteínas Q40::YFP, A β , α -SYN y UNC-52, son degradadas vía autofagia, ya que los fenotipos asociados a la expresión de estas proteínas ha sido potenciado en los animales *atg-3* (Figura 3.26). Esto podría añadir un argumento adicional por el que la mutación *gsr-1* esté afectando a la autofagia, ya que en estos modelos el efecto del bloqueo de la autofagia mediante la mutación *atg-3* es similar al que ocurre por la mutación *gsr-1*. No obstante, nuestros resultados empleando el reportero SQST-1::GFP (Figuras 3.24 y 3.25) nos indican que la falta de GSR-1 está haciendo menos eficiente la autofagia, pero no provocando su bloqueo completamente.

La generación de dobles mutantes *atg-3; gsr-1(m+,z-)* nos ha permitido aislar el posible efecto de la mutación *gsr-1* sobre la autofagia y así evaluar únicamente su efecto sobre la agregación de proteínas. La sobreexpresión de las proteínas poliQ, A β y α -SYN en animales *atg-3; gsr-1(m+,z-)* provoca efectos deletéreos graves, demostrando que la pérdida de homeostasis redox debida a la mutación *gsr-1* conlleva un claro aumento de estrés proteotóxico. En este escenario, al bloqueo de la autofagia se le sumaría el ambiente oxidante que impactaría negativamente sobre las proteínas tanto sobreexpresadas como endógenas, lo cual incrementaría la carga de proteínas mal plegadas, creando un nivel de proteotoxicidad superior con respecto al generado cuando únicamente se inactiva la autofagia.

El fenotipo que presentan los animales *atg-3; gsr-1(m+,z-)* que sobreexpresan las proteínas poliQ, A β y α -SYN puede ser explicado por un efecto conocido como supersaturación (Hofrichter *et al*, 1976), en el que proteínas pueden convertirse en metaestables cuando su concentración en la célula excede un valor crítico, llegando a perder su solubilidad (Ciryam *et al*, 2015). Este fenómeno ha sido descrito que ocurre, entre otras, con las proteínas poliQ, A β y α -SYN, y conlleva a la agregación y coagregación de diferentes proteínas, siendo potenciado durante el estrés y el envejecimiento, cuando los mecanismos de control de la homeostasis proteica son menos eficientes (Kundra *et al*, 2017; Baldwin *et al*, 2011; Ciryam *et al*, 2013, 2015). Por lo tanto, el efecto de la mutación *atg-3* sobre los modelos de poliQ, A β y α -SYN, donde se potencian los fenotipos relacionados con su agregación (Figura 3.26), podría explicarse por una supersaturación de estas proteínas. En esta situación, el bloqueo de la autofagia por la mutación *atg-3* permitiría la acumulación de estas proteínas sobreexpresadas, llegando a la supersaturación y, por consiguiente, la pérdida de su solubilidad y agregación. Esto podría explicar también que la mutación *gsr-1* provocase un efecto similar a la mutación *atg-3*. No obstante, hay que destacar que las proteínas poliQ, A β y α -SYN no presentan ninguna cisteína en su secuencia, por lo que su agregación no puede estar mediada directamente por la formación de puentes disulfuro. La función autofágica deficiente en los animales *gsr-1(m+,z-)* causaría la acumulación de estas proteínas, reproduciendo los fenotipos debidos al bloqueo de la autofagia mediante *atg-3*, pero también, el ambiente oxidante debido a la mutación *gsr-1* llevaría a la oxidación de proteínas endógenas, que causaría una

casca que culminaría con la agregación de otras proteínas (Dobson, 2003; Gidalevitz *et al*, 2006; Balch *et al*, 2008).

Por otro lado, los animales *atg-3; gsr-1(m+,z-)* con la mutación *unc-52* no presentan un fenotipo deletéreo sumatorio a diferencia de los modelos anteriores (Figura 3.29c). Esto puede ser debido a que la proteína metaestable UNC-52 se expresa de forma endógena desde el propio locus del gen *unc-52*, a diferencia de las proteínas poliQ, A β y α -SYN, que son sobreexpresadas mediante transgenes. Este hecho no provocaría una saturación tan elevada de la proteína UNC-52, mostrando estos animales un fenotipo de parálisis similar al de los animales dobles mutantes controles *unc-52; atg-3* y *unc-52; gsr-1(m+,z-)*. Con esta idea hemos generado animales *unc-52* que expresan el sustrato de autofagia SQST-1::GFP, y así comprobar el efecto de la supersaturación en una proteína no sobreexpresada y endógena de *C. elegans*. Debido a que no hemos observado acumulación de SQST-1::GFP en ninguno de los estadios del desarrollo del animal, asumimos que la autofagia prioriza la degradación de esta proteína, lo que favorecería la acumulación de la proteína UNC-52 y la consecuente parálisis en los animales *unc-52; sqst-1::gfp* (Figura 3.30c). La aparición de esta parálisis es mucho más temprana en un triple mutante *unc-52; sqst-1::gfp; gsr-1(m+,z-)*, indicando que en estos animales la agregación de UNC-52 es mucho más rápida y severa. Este fenotipo podría deberse, al igual que lo discutido en resultados anteriores, a una mayor agregación de esta proteína gracias al ambiente oxidante de los animales *gsr-1(m+,z-)*, además de a la saturación del proceso autofágico, debida a la degradación constante de SQST-1::GFP en una autofagia poco eficiente por la mutación *gsr-1*, lo que impediría la eliminación de UNC-52. De hecho, el estudio del flujo autofágico de los animales *unc-52; gsr-1(m+,z-)* muestra que éste es deficiente (Figura 3.32), indicando que la degradación vía autofagia de los animales *gsr-1(m+,z-)* se encuentra alterada.

La cuantificación de los autofagosomas y autolisomas nos ha permitido confirmar que el flujo autofágico se encuentra alterado en los animales *gsr-1(m+,z-)*, los cuales presentan una disminución significativa de la cantidad de autolisomas (Figura 3.31 y 3.32). Este efecto sobre el flujo autofágico podría ser debido a una alteración de la regulación de HLH-30 provocada por la mutación *gsr-1*. HLH-30/TFEB regula positivamente la expresión de genes relacionados con la autofagia, en concreto,

induce la biogénesis de autofagosomas y lisosomas, además de regular la fusión de ambos y el flujo autofágico (Palmieri *et al*, 2011; Settembre *et al*, 2011; Lapierre *et al*, 2013). La pérdida de homeostasis redox en los animales *gsr-1(m+,z-)*, la cual afecta a la inducción de HLH-30, al menos ante ayuno, podría conllevar una menor expresión de los genes regulados por este factor de transcripción, afectando a varios niveles del mecanismo de autofagia. En concreto, debido a la disminución en el número de autolisosomas y acumulación de autofagosomas, la mutación *gsr-1* parece estar afectando a la biogénesis de lisosomas y/o a la fusión de éstos con los autofagosomas. En este sentido, sería interesante y muy informativo realizar estudios de la expresión de los genes regulados por HLH-30 en un fondo *gsr-1*.

4.4. La regulación redox de la cisteína 284 de HLH-30 no afecta a la inducción de la autofagia.

El impacto de la mutación *gsr-1* sobre la autofagia parece recaer en la regulación redox del factor de transcripción HLH-30, cuya translocación nuclear ante la inducción por ayuno fue impedida por la falta de GSR-1 (Figura 3.22).

La existencia de una sola cisteína en la secuencia de esta proteína en posición 284 (C284), y dado que modificaciones postraduccionales en residuos de cisteína afectan de forma directa a la regulación de una amplia variedad de factores de transcripción (Holmström & Finkel, 2014), nos ha llevado a investigar el papel de la cisteína 284 en la función de HLH-30.

Primero hemos comprobado como la activación del reportero endógeno HLH-30::GFP es independiente de la C284 (Figura 3.38), al igual que en sus ortólogos de mamíferos TFEB/TFE3, cuya translocación nuclear es independiente de las C212 y C322, respectivamente. Sin embargo, la única cisteína presente en su secuencia es fundamental para la oligomerización de estos factores (Figuras 3.34 y 3.35), lo que parece que les confiere una mayor estabilidad y resistencia a la degradación ante estreses prolongados.

La supervivencia a *S. aureus* de *C. elegans* es dependiente del único residuo C284 de HLH-30 (Figura 3.39c). Aunque la mutación en este residuo no conlleva la muerte tan prematura de los mutantes nulos *hlh-30(tm1978)*, sí existe una menor resistencia

a la infección (Figura 3.39c), quizás debida a que la falta de oligomerización de HLH-30 hace menos eficiente el mecanismo de inducción de la autofagia.

La oligomerización de HLH-30 no parece ser necesaria durante el envejecimiento, ya que la mutación del residuo C284 por alanina no modifica la longevidad (Figura 3.39a). Por otro lado, la C284 tampoco es esencial para la resistencia a NaAsO_2 (Figura 3.39b). Ambos ensayos, longevidad y resistencia a arsenito, se han realizado en individuos adultos, por tanto, post-mitóticos, por lo que es posible que la regulación de HLH-30 vía la C284 tuviese mayor impacto durante el desarrollo.

Para valorar esta idea empleamos mutantes que muestran fenotipos de desarrollo como mutantes *eat-2*, los cuales presentan un menor tamaño debido a que se encuentran sometidos a restricción calórica crónica y mutantes *daf-2*, que forman dauer cuando son crecidos a temperaturas no permisivas. Encontramos que la inactivación de *hlh-30* en los mutantes *eat-2* afecta al desarrollo larvario, dando lugar a animales con la mitad del tamaño que los individuos silvestres, fenotipo parcialmente dependiente de la C284 de HLH-30 (Figura 3.40b). De forma similar, eliminando HLH-30 en animales *daf-2* crecidos a 22,5°C se induce la formación de dauer y la mutación *hlh-30(C284A)* reproduce este fenotipo (Figura 3.41b). El papel de HLH-30 en la transcripción génica ha sido descrito mediante una respuesta coordinada con el factor de transcripción DAF-16/FOXO, importante regulador de la respuesta a estrés en *C. elegans* (Lin *et al*, 2018). Ante un estímulo dañino o ante una baja señalización por insulina como en los mutantes *daf-2*, ambos factores de transcripción interactúan y translocan al núcleo formando un complejo de alto peso molecular. Sin embargo, mientras DAF-16 induce la transcripción de genes que potencian la formación de dauer, HLH-30 lo hace de genes que previenen dauer (Lin *et al*, 2018). De este modo, suprimiendo la actividad de HLH-30 se potencia la formación de dauer en mutantes *daf-2*. Este mismo razonamiento es aplicable a la salida del estadio de dauer una vez los animales son expuestos a temperatura permisiva, donde la falta de actividad de HLH-30 impide que los mutantes *daf-2* continúen con el desarrollo, efecto que parece ser parcialmente dependiente de la C284 (Figura 3.41c). Es posible que la mutación en este residuo conservado de cisteína y, por tanto, la falta de oligomerización, conlleve a una menor eficiencia en la regulación transcripcional por parte de HLH-30.

Por otro lado, sería interesante evaluar si el residuo C284, el cual hemos comprobado que no altera la longevidad de animales silvestres (Figura 39a), es importante durante el envejecimiento de estos modelos longevos *daf-2* o *eat-2*, los cuales, como hemos confirmado, muestran una cierta translocación de HLH-30 en el núcleo (Figuras 40a y 41a).

En conjunto, nuestros datos sugieren que el residuo C284 de HLH-30 es esencial durante el desarrollo de *C. elegans* y la resistencia a *S. aureus*. La falta de oligomerización de la proteína HLH-30(C284A), el hecho de que la C284 no sea necesaria para la translocación nuclear y la comparación con los fenotipos que presentan los animales mutantes *hlh-30(tm1978)*, los cuales siempre son más severos, hace suponer que el papel de la C284 esté más relacionado con la estabilización de HLH-30, permitiendo una respuesta más eficaz ante el estrés.

Es interesante el hecho de que todos los estreses ensayados provocan una robusta translocación nuclear de HLH-30::GFP, la cual es mantenida mientras los animales han sido expuestos a dichos estreses. No obstante, el tratamiento con DEM causa la acumulación de HLH-30::GFP en el núcleo al cabo de una hora, pero regresa al citosol a las tres horas tras la exposición a DEM (Figura 3.38). Este comportamiento es independiente de la C284, sugiriendo que el desbalance redox provocado por el DEM, no afecta directamente a HLH-30, sino a otro nivel.

En su conjunto, todos estos datos nos permiten descartar la hipótesis inicial de que fuese la pérdida de regulación redox de la única cisteína presente en HLH-30 la responsable de una autofagia menos eficiente en los animales *gsr-1(m+,z-)*. De hecho, el ambiente oxidante celular crónico provocado por la mutación *gsr-1* debería incrementar la oxidación de HLH-30 y, por tanto, su oligomerización y consecuente estabilización. Sin embargo, es la translocación nuclear de este factor de transcripción la que está impedida en los animales *gsr-1(m+,z-)* ante la inducción por ayuno, por lo que, aunque la oxidación de HLH-30 conlleve una mayor estabilización, no supondría una mayor protección frente a estrés si está impedida su entrada en el núcleo.

Los datos generados en este trabajo apuntan a que la inducción de la autofagia vía LET-363/TOR en los animales *gsr-1(m+,z-)* es deficiente y sería, en parte, responsable del empeoramiento de los fenotipos de agregación en todos los modelos ensayados. En mamíferos, la regulación de la autofagia en respuesta a la privación de nutrientes se encuentra regulada principalmente por el complejo TORC1, compuesto por la quinasa mTOR y la proteína Raptor (Regulatory Associated Protein of mTOR) (Hara *et al*, 2002). La inactivación de TORC1 defosforila a los factores de transcripción TFEB y TFE3, los cuales se disocian de las proteínas 14-3-3 y se acumulan en el núcleo, promoviendo la inducción de la autofagia (Martina *et al*, 2016). A su vez, TORC1 se encuentra regulada por diferentes proteínas, como las GTPasas RAGA-1 y RAGC-1, que activan TORC1 cuando existe disponibilidad de aminoácidos (Jewell *et al*, 2013), o la quinasa AMPK (AMP-activated kinase) que regula negativamente TORC1 en respuesta al ratio energético de AMP:ATP (Gwinn *et al*, 2008).

Recientemente, un estudio sobre el cisteinoma de *C. elegans* ha mostrado que muchos de los homólogos de estas proteínas de mamífero presentan cisteínas sensibles a regulación redox (Meng *et al*, 2021). De hecho, se ha sugerido que las proteínas 14-3-3 de mamíferos son reguladas via redox a través de la selenoproteína W, que utiliza GSH para su reciclaje (Musiani *et al*, 2011; Jeon *et al*, 2016). Por lo tanto, sería interesante estudiar si la falta de GSH debida a la mutación *gsr-1* podría estar afectando a la función de cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente y que intervienen en la regulación de la localización subcelular de TFEB/HLH-30.

4.5. Implicación del GSH en neurodegeneración.

El GSH es considerado como el principal antioxidante celular, con una especial función protectora frente a cualquier daño causado por la exposición a EROs, especialmente en el cerebro (Moustapha, 2020). Debido a su actividad, el cerebro consume gran cantidad de oxígeno, lo que convierte a este órgano en uno de los principales productores de EROs (Wang & Michaelis, 2010). Parte de este oxígeno consumido es convertido en superóxido, particularmente reactivo. Su detoxificación es llevada a cabo por la superóxido dismutasa (SOD), que lo convierte en peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual es detoxificado por catalasas o glutatión peroxidasas

(GPxs), que lo convierten en agua y oxígeno molecular. Debido a que las catalasas se encuentran principalmente en peroxisomas y no están presentes en las mitocondrias de todos los tejidos, la detoxificación del H_2O_2 depende predominantemente de las GPxs, las cuales utilizan GSH como cofactor (Przedborski *et al*, 1996; Perrin *et al*, 1990; Bains & Shaw, 1997).

El estrés oxidativo puede inducir muerte neuronal, siendo el factor común en una amplia variedad de enfermedades neurológicas crónicas (Bains & Shaw, 1997). Tanto el GSH como aquellas enzimas cuya actividad depende del GSH, son considerados determinantes claves de la protección antioxidante frente a la neurodegeneración. La desregulación de estos antioxidantes basados en GSH, de alguna manera contribuyen a la iniciación y progresión de las enfermedades neurodegenerativas (Johnson *et al*, 2012). En esta dirección han ido encaminados varios estudios, en los que se ha detectado un menor contenido de GSH en eritrocitos de pacientes de Alzheimer (Cristalli *et al*, 2012) y esclerosis lateral amiotrófica (Babu *et al*, 2008), un descenso en los niveles de GSH en plasma en enfermos de Huntington (Klepac *et al*, 2007) y en la sustancia nigra de pacientes de Parkinson (Riederer *et al*, 1989; Sofic *et al*, 1992).

En este trabajo hemos relacionado la desregulación de homeostasis redox debida a la falta de disponibilidad de GSH, no sólo con un incremento en el estrés oxidativo, sino también con la pérdida de la proteostasis celular. A su vez, nuestros resultados muestran que el incremento de la agregación es debido a un posible aumento de la concentración de proteínas oxidadas, así como a la deficiencia en la degradación de dichos agregados vía autofagia. Todo ello, aporta mayor significancia al papel del GSH como protector frente al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

Es importante tener en cuenta que las proteínas no son las únicas macromoléculas susceptibles de daño oxidativo, sino que también los lípidos pueden sufrir modificaciones oxidativas perjudiciales. Las membranas celulares de las células del cerebro son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son susceptibles de peroxidación lipídica por EROs. Los lípidos son protegidos del daño oxidativo por la vitamina E, que bloquea los EROs quedando en una forma oxidada, cuyo reciclaje a la forma reducida es llevado a cabo por el GSH (Packer *et al*, 2001). Por otro lado, si

ocurre la peroxidación lipídica, esta puede ser revertida por las GPxs, en concreto la GPx4, evitando así el daño en las membranas celulares (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013). La acumulación de lípidos peroxidados induce un mecanismo de muerte celular, dependiente de hierro, distinto a la apoptosis o necrosis denominado ferroptosis (Proneth & Conrad, 2019). En condiciones fisiológicas, la GPx4 impide que se desencadene la ferroptosis debido su acción reductora de los lípidos oxidados. Se ha sugerido que la depleción de GSH mediante DEM podría estar induciendo la ferroptosis en *C. elegans* (Jenkins *et al*, 2019). En nuestros ensayos con este compuesto, este mecanismo de ferroptosis podría ser el responsable del arresto larvario que sufren los nematodos que expresan proteínas con tendencia a la agregación, en especial, aquellos que las expresan en células musculares (Q40::YFP, A β y UNC-52). Dado que el arresto larvario en presencia de DEM es dependiente de la expresión de estas proteínas, podría existir una conexión entre la ferroptosis y la agregación de proteínas en modelos de neurodegeneración que sería interesante estudiar ya que no hay referencias a esta conexión en la literatura científica.

Capítulo V. Conclusiones.

1. El ARN de interferencia de *gsr-1* provoca un aumento de la parálisis en el modelo de *C. elegans* que expresa el péptido β -amiloide y un aumento de la agregación en los modelos que expresan las proteínas α -sinucleína::YFP y Q40::YFP en células musculares. No obstante, solo se ha evidenciado un efecto deletéreo en el desarrollo en el modelo que expresa la proteína Q40::YFP.
2. La inhibición farmacológica de la síntesis, reducción o disponibilidad de glutatión reducido afecta negativamente al desarrollo de los animales que expresan la proteína Q40::YFP en células musculares, siendo el efecto del dietil maleato el más nocivo provocando un arresto completo en los estadios larvarios L1-L2.
3. La mutación *gsr-1* potencia los fenotipos asociados a la agregación de proteínas en los modelos de *C. elegans* que expresan las proteínas exógenas β -amiloide, α -sinucleína::YFP y Q40::YFP. Este efecto es independiente del tejido o tipo celular donde se expresan estas proteínas.
4. La mutación *gsr-1* también potencia los fenotipos asociados a la agregación de proteínas metastables endógenas de *C. elegans*, aumentando la parálisis de los mutantes *unc-52(e669su250)* y el arresto embrionario de mutantes *let-60(ga89)*.
5. Las células musculares parecen ser más sensibles que las neuronas a los efectos deletéreos de la ausencia de GSR-1 en los modelos de agregación. Esto queda ilustrado por el efecto del tratamiento con dietil maleato, el cual causa un completo arresto larvario en tres de los modelos de agregación en músculo: A β , Q40::YFP y UNC-52.
6. La mutación *gsr-1* provoca estrés oxidativo crónico en *C. elegans*, pero no afecta a la inducción de la respuesta protectora de los mutantes frente a este estrés. De forma similar, existe una mayor inducción de la UPR mitocondrial en mutantes *gsr-1* en condiciones basales, aunque la respuesta de estos mutantes a tratamientos que provocan un estrés proteotóxico mitocondrial no está comprometida.

7. La falta de GSR-1 no afecta a la respuesta de *C. elegans* a estrés citoplásmico o de retículo endoplásmico, a la inducción de la proteólisis mediada por el proteasoma ni a la mitofagia.
8. La mutación *gsr-1* impide la translocación nuclear del factor de transcripción HLH-30 en condiciones de ayuno pero no ante un estrés por choque térmico.
9. El bloqueo de la autofagia mediante la mutación *atg-3(bp412)* reproduce, de modo similar a la mutación *gsr-1*, los fenotipos asociados a la agregación en los modelos de *C. elegans* que expresan el péptido β -amiloide y las proteínas α -sinucleína::YFP, Q40::YFP y UNC-52.
10. El incremento adicional de la cantidad de proteínas destinadas a ser degradadas vía autofagia en mutantes *gsr-1* provoca un fuerte aumento de los fenotipos deletéreos en los modelos de agregación, indicando que la falta de GSR-1 potencia el efecto de supersaturación de estas proteínas.
11. El flujo autofágico está disminuido en mutantes *gsr-1* de forma que en estos animales hay un mayor número de autofagosomas mientras que el número de autolisosomas está disminuido.
12. El factor de transcripción HLH-30 posee una única cisteína en posición 284. Esta cisteína no es esencial para la translocación nuclear de dicho factor en condiciones de estrés, pero sí lo es para la resistencia de *C. elegans* a la infección por *Staphylococcus aureus* así como para el desarrollo de los mutantes *eat-2* y para la entrada y salida del estadio de *dauer* en mutantes *daf-2*.

Capítulo VI. Materiales y Métodos

6.1. Estirpes.

6.1.1. Estirpes de *Caenorhabditis elegans*.

Estirpe	Genotipo	Origen/construcción
---------	----------	---------------------

Estirpes básicas

N2	<i>Wild type, DR subclone of CB original (Tc1 pattern I)</i>	CGC ^a
JK2533	<i>eT1 (III, V)/qC1 [dpy-19(e1259) glp-1(q339) qIs26 [Plag-2::gfp; rol-6(su1006)]] III</i>	Blelloch <i>et al.</i> (1999)
VZ64	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::gfp III</i>	Mora-Lorca <i>et al.</i> (2016)
MT20108	<i>dpy-17(e164) unc-32(e189)/qC1 [dpy-19(e1259) glp-1(q339) nIs281 [Pmyo-2::rfp]] III</i>	CGC ^a
VZ454	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III</i>	Mora-Lorca <i>et al.</i> (2016)

^a CGC: *Caenorhabditis* Genetics Center.

Estirpes que sobreexpresan proteínas con repeticiones del aminoácido glutamina (poliQ)

AM140	<i>rmls132 [Punc-54::Q35::yfp] I</i>	Morley <i>et al.</i> (2002)
VZ324	<i>rmls132 [Punc-54::Q35::yfp] I; gsr-1(tm3574)/qC1::gfp III</i>	Este estudio, AM140 x VZ64
AM141	<i>rmls133 [Punc-54::Q40::yfp] X</i>	Morley <i>et al.</i> (2002)
VZ325	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::gfp III; rmls133 [Punc-54::Q40::yfp] X</i>	Este estudio, AM141 x VZ64
AM519	<i>rmls237 [Prgef-1::AT3v1-1::Q75::yfp]</i>	Teixeira-Castro <i>et al.</i> (2011)
VZ369	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::gfp III; rmls237 [Prgef-1::AT3v1-1::Q75::yfp]</i>	Este estudio, AM519 x VZ64
AM685	<i>rmls263 [Prgef-1::AT3v1-1::Q130::yfp]</i>	Teixeira-Castro <i>et al.</i> (2011)

VZ370	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::gfp III; rmls263 [Prgef-1::AT3v1-1::Q130::yfp]</i>	Este estudio, AM685 x VZ64
ID245	<i>igls245 [Pmec-3::htt57-19Q::cfp; lin-15(+); Pmec-7::yfp]</i>	Parker <i>et al.</i> (2001)
VZ398	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::gfp III; igls245 [Pmec-3::htt57-19Q::cfp; lin-15(+); Pmec-7::yfp]</i>	Este estudio, ID245 x VZ64
ID1	<i>igls1 [Pmec-3::htt57-128Q::cfp; lin-15(+); Pmec-7::yfp]</i>	Parker <i>et al.</i> (2001)
VZ399	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::gfp III; igls1 [Pmec-3::htt57-128Q::cfp; lin-15(+); Pmec-7::yfp]</i>	Este estudio, ID1 x VZ64
OG412	<i>drls20 [Pvha-6::Q44::yfp; rol-6(su1006); pBlueScript II]</i>	Moronetti Mazzeo <i>et al.</i> (2012)
VZ555	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; drls20 [Pvha-6::Q44::yfp; rol-6(su1006); pBlueScript II]</i>	Este estudio, OG412 x VZ454

Estirpes que sobreexpresan el péptido A β

CL2006	<i>dvls2 [Punc-54::human Aβ; rol-6(su1006)] II</i>	Link (1995)
VZ543	<i>dvls2 [Punc-54::human Aβ; rol-6(su1006)] II; gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III</i>	Este estudio, CL2006 x VZ454
CL2099	<i>dvls22 [rol-6(su1006)]</i>	Link (1995)
CL2120	<i>dvls14 [Punc-54::human Aβ; Pmtl-2::gfp]</i>	Fay <i>et al.</i> (1998)
VZ654	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; dvls14 [Punc-54::human Aβ; Pmtl-2::gfp]</i>	Este estudio, CL2120 x VZ454
GRU101	<i>gnals1 [Pmyo-2::yfp]</i>	Fong <i>et al.</i> (2016)
VZ712	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; gnals1 [Pmyo-2::yfp]</i>	Este estudio, GRU101 x VZ454
GRU102	<i>gnals2 [Punc-119::human Aβ; Pmyo-2::yfp]</i>	Fong <i>et al.</i> (2016)
VZ716	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; gnals2 [Punc-119::human Aβ; Pmyo-2::yfp]</i>	Este estudio, GRU102 x VZ454

Estirpes que sobreexpresan α -sinucleína

AM134	<i>unc-119(ed3) III; rmls126 [Punc-54::yfp; unc-119(+)]</i>	Morley <i>et al.</i> (2002)
VZ621	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::gfp III; rmls126 [Punc-54::yfp; unc-119(+)]</i>	Este estudio, AM134 x VZ64
NL5901	<i>unc-119(ed3) III; pkls2386 [Punc-54::α-synuclein::yfp; unc-119(+)] IV</i>	van Ham <i>et al.</i> (2008)
VZ323	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::gfp III; pkls2386 [Punc-54::α-synuclein::yfp; unc-119(+)] IV</i>	Este estudio, NL5901 x VZ64
UA44	<i>baln11 [Pdat-1:: α-synuclein; Pdat-1::gfp]</i>	Cooper <i>et al.</i> (2006)
VZ487	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::gfp III; baln11 [Pdat-1:: α-synuclein; Pdat-1::gfp]</i>	Este estudio, UA44 x VZ64
BY250	<i>vtls7 [Pdat-1::gfp]</i>	Nass <i>et al.</i> (2002)

Estirpes que expresan proteínas metaestables

HE250	<i>unc-52(e669su250) II</i>	Mackenzie <i>et al.</i> (1978)
VZ561	<i>unc-52(e669su250) II; gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III</i>	Este estudio, HE250 x VZ454
SD551	<i>let-60(ga89) IV</i>	Eisenmann <i>et al.</i> (1997)
	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; let-60(ga89) IV</i>	Esta estirpe fue creada pero no mantenida debido a una letalidad embrionaria del 100%
VZ611	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::gfp III; let-60(ga89) IV</i>	Este estudio, SD551 x VZ64

Estirpes reporteras de proteostasis

TJ356	<i>zls356 [Pdaf-16::daf-16::gfp; rol-6 (su1006)] IV</i>	Henderson <i>et al.</i> (2001)
VZ451	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; zls356 [Pdaf-16::daf-16::gfp; rol-6 (su1006)] IV</i>	Este estudio, TJ356 x VZ454

CF1553	<i>muls84 [Psod-3::gfp; rol-6(su1006)]</i>	Libina <i>et al.</i> (2003)
VZ597	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; muls84 [Psod-3::gfp; rol-6(su1006)]</i>	Este estudio, CF1553 x VZ454
SJ4005	<i>zcls4 [Phsp-4::gfp] V</i>	Calfon <i>et al.</i> (2002)
VZ496	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; zcls4 [Phsp-4::gfp] V</i>	Este estudio, SJ4005 x VZ454
OG497	<i>drSi13 [Phsf-1::hsf-1::gfp::unc-54 3'-UTR; Cbr unc-119 (+)] II; unc-119 (ed9) III</i>	Morton <i>et al.</i> (2013)
VZ590	<i>drSi13 [Phsf-1::hsf-1::gfp::unc-54 3'-UTR; Cbr unc-119 (+)] II; gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III</i>	Este estudio, OG497 x VZ454
AM446	<i>rmls223 [Phsp-70::gfp; rol-6(su1006)]</i>	Morley <i>et al.</i> (2004)
VZ588	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; rmls223 [Phsp-70::gfp; rol-6(su1006)]</i>	Este estudio, AM446 x VZ454
PP563	<i>unc-119 (ed4) hhls64 [(Psur-5::UbG76V::gfp); unc-119(+)] III</i>	Segref <i>et al.</i> (2011)
VZ624	<i>gsr-1(tm3574) hhls64 [(Psur-5::UbG76V::gfp)/qC1::rfp III</i>	Este estudio, PP563 x VZ454
FX0376	<i>dct-1(tm376) X</i>	NBRP ^e
VZ680	<i>dvls2 [Punc-54::human Aβ; rol-6(su1006)] II; dct-1(tm376) X</i>	Este estudio, CL2006 x FX0376
VZ681	<i>dvls2 [Punc-54::human Aβ; rol-6(su1006)] II; gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; dct-1(tm376) X</i>	Este estudio, VZ543 x FX0376
VZ678	<i>unc-52(e669su250) II; dct-1(tm376) X</i>	Este estudio, HE250 x FX0376
VZ671	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; dct-1(tm376) X</i>	Este estudio, VZ454 x FX0376
VZ679	<i>unc-52(e669su250) II; gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; dct-1(tm376) X</i>	Este estudio, HE250 x VZ671
MAH240	<i>sqls17 [Phlh-30::hlh-30::gfp; rol-6(su1006)]</i>	Lapierre <i>et al.</i> (2013)

VZ706	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; sqIs17 [Phlh-30::hlh-30::gfp; rol-6(su1006)]</i>	Este estudio, MAH240 x VZ454
-------	---	------------------------------

Estirpes para el estudio de la autofagia

HZ589	<i>bpls151 [Psqst-1::sqst-1::gfp; unc-76(+)] IV; him-5(e1490) V</i>	Tian <i>et al.</i> (2010)
VZ575	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; bpls151[Psqst-1::sqst-1::gfp; unc-76(+)] IV</i>	Este estudio, HZ589 x VZ454
HZ1684	<i>atg-3(bp412) IV; him-5(e1490) V</i>	Tian <i>et al.</i> (2010)
VZ814	<i>atg-3(bp412) IV</i>	Este estudio, HZ1684 x N2
VZ767	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; atg-3(bp412) IV</i>	Este estudio, HZ1684 x VZ454
VZ765	<i>unc-52(e669su250) II; atg-3(bp412) IV</i>	Este estudio, HE250 x HZ1684
VZ768	<i>unc-52(e669su250) II; gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; atg-3(bp412) IV</i>	Este estudio, VZ765 x VZ767
VZ703	<i>unc-52(e669su250) II; bpls151[Psqst-1::sqst-1::gfp; unc-76(+)] IV</i>	Este estudio, HE250 x HZ589
VZ718	<i>unc-52(e669su250) II; gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; bpls151[Psqst-1::sqst-1::gfp; unc-76(+)] IV</i>	Este estudio, VZ575 x VZ703
MAH215	<i>sqIs11 [Plgg-1::mCherry::gfp::lgg-1; rol-6(su1006)]</i>	Chang <i>et al.</i> (2017)
VZ847	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; sqIs11 [Plgg-1::mCherry::gfp::lgg-1; rol-6(su1006)]</i>	Este estudio, MAH215 x VZ454
VZ848	<i>unc-52(e669su250) II; sqIs11 [Plgg-1::mCherry::gfp::lgg-1; rol-6(su1006)]</i>	Este estudio, MAH215 x HE250
VZ849	<i>unc-52(e669su250) II; gsr-1(tm3574)/qC1::rfp III; sqIs11 [Plgg-1::mCherry::gfp::lgg-1; rol-6(su1006)]</i>	Este estudio VZ847 x VZ848
VZ771	<i>dvIs2 [Punc-54::human Aβ; rol-6(su1006)] II; atg-3(bp412) IV</i>	Este estudio, HZ1684 x CL2006

UA49	<i>baln12 [Punc-54::α-synuclein::<i>gfp</i>; <i>rol-6(su1006)</i>]</i>	Hamamichi <i>et al.</i> (2008)
VZ776	<i>atg-3(bp412) IV; baln12 [Punc-54::α-synuclein::<i>gfp</i>; <i>rol-6(su1006)</i>]</i>	Este estudio, HZ1684 x UA49
VZ769	<i>atg-3(bp412) IV; rmls133 [Punc-54::Q40::<i>yfp</i>] X</i>	Este estudio, AM141 x HZ1684
VZ800	<i>gsr-1(tm3574)/qC1::<i>rfp III</i>; atg-3(bp412) IV; rmls133 [Punc-54::Q40::<i>yfp</i>] X</i>	Este estudio, VZ767 x VZ769

Estirpes para el estudio de HLH-30

VZ892	<i>hlh-30(syb1452 [hlh-30::<i>3xFLAG::egfp</i>] IV</i>	Este estudio, edición con CRISPR-Cas9 en N2, retrocruzada 2x con N2
VZ906	<i>hlh-30(syb1731 [hlh-30(Cys284Ala)::i>3xFLAG::egfp] IV</i>	Este estudio, edición con CRISPR-Cas9 en N2, retrocruzada 2x con N2
VT1584	<i>hlh-30(tm1978) IV</i>	Grove <i>et al.</i> (2009)
VZ902	<i>hlh-30(syb1623 [Cys284Ala]) IV</i>	Este estudio, edición con CRISPR-Cas9 en N2, retrocruzada 2x con N2
OE4353	<i>eat-2(ad1116) II</i>	Sanzo-Machuca <i>et al.</i> (2019)
VZ904	<i>eat-2(ad1116) II; hlh-30(syb1452 [hlh-30::<i>3xFLAG::egfp</i>] IV</i>	Este estudio, OE4353 x VZ892
VZ915	<i>eat-2(ad1116) II; hlh-30(syb1731 [hlh-30(Cys284Ala)::i>3xFLAG::egfp] IV</i>	Este estudio, OE4353 x VZ906
VZ907	<i>eat-2(ad1116) II; hlh-30(tm1978) IV</i>	Este estudio, OE4353 x VT1584
VZ917	<i>eat-2(ad1116) II; hlh-30(syb1623 [Cys284Ala]) IV</i>	Este estudio, OE4353 x VZ902
CB1370	<i>daf-2(e1370) III</i>	^a CGC

VZ911	<i>daf-2(e1370) III; hlh-30(syb1452 [hlh-30::3xFLAG::egfp] IV</i>	Este estudio, CB1370 x VZ892
VZ931	<i>daf-2(e1370) III; hlh-30(syb1731 [hlh-30(Cys284Ala)::3xFLAG::egfp] IV</i>	Este estudio, CB1370 x VZ906
VZ910	<i>daf-2(e1370) III; hlh-30(tm1978) IV</i>	Este estudio, CB1370 x VT1584
VZ923	<i>daf-2(e1370) III; hlh-30(syb1623 [Cys284Ala] IV</i>	Este estudio, CB1370 x VZ902

6.1.2. Estirpes de *Escherichia coli*.

OP50	Auxótrofo a uracilo	Brenner (1974)
HT115	F-, <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> , <i>IN(rrnD-rrnE)1</i> , <i>mnc14::Tn10</i> (DE lysogen: <i>lacUV5</i> promoter-T7 polymerase)	Sijen et al. (2001)

6.1.3. Estirpes de *Staphylococcus aureus*.

ATCC29213	β -lactamasa positivo, <i>mecA</i> negativo	NCTC 12973
NCTC 8325		Suzuki et al. (2009)

6.2. Medios de cultivo, tampones y soluciones.**6.2.1. Mantenimiento de *C. elegans*.**

Medio/Tampón	Composición	Uso
Placas de NGM (Nematode Growth Medium)	3g/L NaCl 2,5g/L peptone 17g/L agar 5g/L cholesterol 1mM MgSO ₄ 1mM CaCl ₂ 0,025M tampón fosfato	Mantenimiento de <i>C. elegans</i> en medio sólido
Placas de NGM para ARNi	A la receta anterior se le añade: 25µg/mL carbenicilina 1mM IPTG	Ensayos de ARN interferencia
Tampón M9	3g/L KH ₂ PO ₄ 6g/L Na ₂ HPO ₄ 5g/L NaCl 1mM MgSO ₄	Lavados de <i>C. elegans</i>
Solución de congelación	5,85g/L NaCl 1g/L K ₂ HPO ₄ 6g/L KH ₂ PO ₄ 15% glicerol	Congelación de stocks de <i>C. elegans</i>
Solución de descontaminación 1	5mL H ₂ O 2mL NaOH (5M) 3mL lejía comercial	Eliminación de contaminación
Solución de descontaminación 2	7mL H ₂ O 1mL NaOH (5M) 2mL lejía comercial	Eliminación de contaminación
Solución de lisado	10mM Tris/HCl 1M pH 8,3 50mM KCl 1M 2,5mM MgCl ₂ 1M 0,45% NP-40 10% 0,45% Tween-20 10% 0,01% Gelatina 1%	Obtención de ADN genómico de <i>C. elegans</i>

6.2.2. Medios de cultivo para *E. coli*.

Medio/Tampón	Composición
Luria-Bertani (LB)	5g/L NaCl 5g/L extracto de levadura 10g/L Triptona Para medio sólido se añade 20g/L agar

6.2.3. Medios de cultivo para *S. aureus*.

Medio/Tampón	Composición
Luria-Bertani (LB)	5g/L NaCl 5g/L extracto de levadura 10g/L Triptona Para medio sólido se añade 20g/L agar
Tryptic Soy Broth (TSB)	30g/L TSB (Digerido pancreático de caseína 17g/L, digerido papaico de soja 3g/L, dextrosa 2,5g/L, NaCl 5g/L, K ₂ HPO ₄ 2,5g/L)
Tryptic Soy Agar (TSA)	40g/L TSA (Digerido pancreático de caseína 15g/L, digerido papaico de soja 5g/L, NaCl 5g/L, Agar 15g/L)

6.3. Crecimiento y mantenimiento de organismos.

6.3.1. Estirpes bacterianas.

6.3.1.1. Cultivo de *E. coli*.

Las estirpes de *E. coli* OP50 y HT115 utilizadas fueron crecidas en medio LB. En medio líquido, las bacterias se crecieron en agitación (180 r.p.m.) a 37°C durante toda la noche. En medio sólido se crecieron a 37°C durante 24 horas.

La conservación de las bacterias por largos periodos de tiempo se realizó tras un cultivo en líquido, añadiendo posteriormente glicerol al 15% y manteniéndolo a -80°C.

6.3.1.2. Cultivo de *Staphylococcus aureus*.

S. aureus ATCC29213 ha sido cultivada en medio sólido LB agar a 37°C durante 24 horas. En medio líquido fueron crecidas en agitación (180 r.p.m.) a 37°C durante toda la noche.

S. aureus NCTC8325 fue cultivada en medio sólido TSA (tryptic soy agar) suplementado con 10 µg/mL de ácido nalidíxico (Nal) como antibiótico e incubada a 37°C durante toda la noche. En medio líquido fue crecida a 37°C y 180 r.p.m. durante toda la noche en medio TBS (tryptic soy broth), suplementado con 10 µg/mL de Nal.

6.3.2. *C. elegans*.

6.3.2.1. Crecimiento de *C. elegans*.

Los nematodos fueron crecidos en placas de NGM (nematode growth medium) sembradas previamente con un césped bacteriano de *E. coli* OP50 e incubadas durante 24 horas a 37°C (Brenner, 1974). La temperatura de crecimiento fue de 16°C o 20°C.

6.3.2.2. Conservación de estirpes.

C. elegans puede ser conservado durante largos periodos de tiempo a -80°C, siendo el estadio de L1 es el que sobrevive más eficientemente a la congelación. Para obtener una mayor eficiencia, la congelación parte de placas saturadas de animales donde el alimento ha sido consumido y las larvas L1 han quedado arrestadas. Los nematodos fueron recogidos con la solución de congelación y transferidos a varios

criotubos donde fueron congelados a -80°C de forma gradual, utilizando para ello un bloque de poliestireno expandido. Al día siguiente, uno de los criotubos fue descongelado para comprobar la eficiencia de la congelación y el resto de los criotubos fueron guardados en las correspondientes cajas de stock, donde se mantuvieron a -80°C hasta su utilización.

La descongelación se realizó a temperatura ambiente, colocando los criotubos en posición vertical en un baño de agua a temperatura ambiente. Una vez descongelado, los nematodos precipitaron al fondo del criotubo, se descartó parte del sobrenadante y el resto se vertió sobre una placa de NGM.

6.3.2.3. Limpieza de contaminación

C. elegans puede ser tratado con una solución de hipoclorito e hidróxido de sodio llamada solución de descontaminación, con la que se elimina cualquier tipo de contaminación (bacterias u hongos) y degrada a los nematodos en cualquier estadio larvario, excepto los embriones, los cuales son resistentes gracias a la protección de su cubierta y serán los únicos que sobrevivan al tratamiento. La descontaminación de placas se realizó disponiendo una gota de unos $30\ \mu\text{L}$ de solución de descontaminación 1 fuera del césped de bacteria de una placa nueva y esta gota se le añadieron alrededor de 10 hermafroditas grávidas. De esta forma, la contaminación queda eliminada y los huevos de las hermafroditas eclosionan en una nueva placa limpia.

Otra forma de limpiar a los animales de la contaminación y obtener gran número de nematodos fue mediante bleaching en líquido en lugar de añadiendo la solución a la placa de NGM. Para este proceso, se utilizó la solución de descontaminación 2 que contiene menor concentración de hipoclorito e hidróxido de sodio. Se partió de una o varias placas saturada de hermafroditas grávidas y embriones, los cuales fueron recogidos con agua milliQ y transferidas a tubos de polipropileno de 15 mL. Tras centrifugar durante 1 minuto a 2000 r.p.m., el sobrenadante fue eliminado y se añadieron 2 mL de solución de bleaching. La mezcla fue agitada vigorosamente durante alrededor de 5 minutos, vigilando a través de la lupa el momento en el que todas las hermafroditas fueron degradadas. Posteriormente, se centrifugó la muestra y, tras la eliminación del sobrenadante, se añadieron 14 mL de M9. Para eliminar

cualquier resto de solución de bleaching, se realizaron 3 lavados con M9 antes de finalizar.

6.3.2.4. Sincronización de animales.

Para obtener una población sincronizada de animales, alrededor de 20 hermafroditas grávidas fueron pasadas a placas nuevas de NGM durante 2-3 horas. Tras este tiempo, las hermafroditas fueron eliminadas quedando en la placa solamente los embriones, los cuales fueron incubados a la temperatura deseada.

6.3.2.5. Extracción de ADN genómico de *C. elegans*.

Para la extracción de ADN genómico, se partió de 15 μ L de la solución de lisis suplementada con el 1% de proteinasa K (Sigma P6556, 20 mg/mL) en un vial de PCR. A esta solución se añadieron 15 hermafroditas grávidos y se incubó a -80°C durante al menos 45 minutos, lo que favorece la rotura de los animales. Posteriormente, la muestra se incubó a 65°C durante una hora, permitiendo que la proteinasa K lisase los animales y el ADN genómico se liberase. Finalmente, la proteinasa K fue inactivada a 95°C durante 15 minutos.

Este protocolo permitió obtener el ADN genómico de los animales, el cual pudo ser utilizado como molde para el genotipado por PCR.

6.4. Inhibición de la ruta del glutati3n.

Para la preparaci3n de placas con inhibidores de la s3ntesis, reducci3n o disponibilidad de GSH, se partió de soluciones stock de BSO (Sigma B2515, 200 mM en H_2O), BCNU (Sigma C0400, 20 mg/ml EtOH) y DEM (Sigma D97703, diluido en un volumen final de 0,5% de DMSO en placa). Volúmenes apropiados de las soluciones se añadieron al medio NGM una vez autoclavado y antes de que fuera repartido en las placas. Las placas fueron secadas en la campana de flujo laminar durante 30 minutos antes de sembrar el césped de *E. coli*. Finalmente, las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas y usadas en ese momento para minimizar la degradaci3n de los compuestos con el tiempo.

Para determinar el efecto en el desarrollo de la inhibici3n de la ruta del glutati3n mediante estos tres compuestos en animales Q35::YFP y Q40::YFP, se partió de una

puesta sincronizada y los embriones fueron contados e incubados durante 4 días a 20°C. Transcurrido este tiempo, se contaron el número de animales que habían alcanzado cada uno de los estadios de desarrollo.

Debido a que los ensayos con DEM mostraron un mayor efecto en el desarrollo de los animales Q40::YFP, para el resto de estirpes empleadas en el este trabajo, sólo se utilizó el DEM para evaluar el efecto de la inhibición química del GSH sobre el desarrollo. Para ello se procedió de la misma forma, partiendo de una puesta sincronizada de huevos, se contaron los huevos por placa y se incubaron a las temperaturas de 16 o 20°C durante 3 o 5 días en función de la estirpe, para finalmente cuantificar los estadios que alcanzaron los animales.

6.5. Ensayos de ARN de interferencia.

Los genes de interés para realizar ARNi (genes completos, incompletos pero conteniendo exones o ADNc) han sido clonados en el plásmido PL4440, que contiene dos promotores para la polimerasa de ARN del fago T7 flanqueando a la zona de inserción. El plásmido ha sido transformado en la cepa de *E. coli* HT115, la cual posee una ARN polimerasa T7 inducible por IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) y mutante para la enzima ARNasa III, lo que aumenta la estabilidad de cualquier ARN. La inducción de la ARN polimerasa T7 por IPTG en la cepa HT115 sintetiza una doble cadena de ARN específica al gen que se pretende interferir, clonado entre ambos promotores. Cuando *C. elegans* es alimentado con en placas que inducen el ARN de doble cadena, se silencia la expresión del gen en cuestión.

Los clones de *E. coli* HT115 fueron crecidos a 37°C en LB con 50 μ g/mL de ampicilina en agitación durante toda la noche. El cultivo fue sembrado en placas de NGM con IPTG e incubadas a 37°C durante 24 horas. Como control negativo se utilizaron placas con bacterias que contienen el vector PL4440 vacío y como control positivo bacterias con el plásmido PL4440 con ARN del gen *dpy-11*, que produce un fenotipo de animales más pequeños y anchos denominados dumpy (rechoncho).

Los animales fueron transferidos desde placas con OP50 a las placas con HT115 colocando una gota de solución de descontaminación 1 y añadiendo animales grávidos, con los que se consigue evitar el paso de bacteria OP50 a las placas de

ensayo de ARNi. La cuantificación de fenotipos se realizó con animales crecidos durante dos o tres generaciones en ARNi.

6.6. Microscopía.

La observación al microscopio se realizó colocando a los animales sobre un portaobjeto con una gota de agarosa. Para la preparación de este soporte, agarosa al 3% disuelta en agua destilada se fundió y una gota se depositó sobre un portaobjetos para después ser cubierta con otro portaobjetos y así conseguir una fina capa. Posteriormente, se quitó el portaobjetos superior y se dejó secar la gota de agarosa durante 24 horas a temperatura ambiente antes de su uso.

Los animales fueron paralizados con levamisol 10mM (Sigma L9756) de forma general, excepto en los ensayos de evaluación de la localización subcelular de reporteros, en los que el levamisol induce la translocación nuclear de algunos de estos reporteros, por lo que en estos ensayos se utilizó ázida sódica al 1% como paralizante. Una gota del agente paralizante se colocó sobre la agarosa del portaobjetos y en ella se añadieron los animales. Mediante una pestaña fijada a un palillo de dientes, la gota se extendió y los animales fueron alineados. Una vez la gota de estuvo casi seca, se colocó el cubreobjetos sobre la muestra y se añadió M9 por un lateral para que difundiera por capilaridad e hidratase la muestra.

Los estudios de expresión, tamaño, localización subcelular y cuantificación de agregación se realizaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 equipado con una cámara digital DP72. La adquisición y análisis de imágenes fueron realizados con el programa CellSens.

La cuantificación de los focos mCherry::GFP::LGG-1 se realizó en un microscopio confocal Nikon A1R.

6.7. Cuantificación de los fenotipos en estirpes poliQ.

6.7.1. Cuantificación de agregados poliQ::YFP.

Los transgenes *rmls132* [*Punc-54::Q35::yfp*] y *rmls133* [*Punc-54::Q40::yfp*] expresan proteínas poliQ::YFP con 35 y 40 repeticiones de glutamina respectivamente, en células musculares, las cuales agregan de forma progresiva dependiente de la edad.

La cuantificación de la agregación de poliQ::YFP en estas estirpes se realizó en todo el animal completo a partir del estadio L4, que el caso de estos modelos, se alcanza a día 3 tras una puesta sincronizada crecida a 20°C. Para ello, los animales fueron observados al microscopio de fluorescencia a 40x.

Los animales que expresan los transgenes *rmls237 [Prgef-1::AT3v1-1::Q75::yfp]* y *rmls263 [Prgef-1::AT3v1-1::Q130::yfp]* presentan agregación de proteínas ATXN3::poliQ::YFP en neuronas. La cuantificación de estos agregados se realizó en un segmento del cordón nervioso ventral, desde la vulva hasta el segundo bulbo de la faringe en animales sincronizados y crecidos a 20°C. La cuantificación de los agregados se realizó al microscopio de fluorescencia a 100x.

Mediante el transgen *drls20 [Pvha-6::Q44::yfp]* se induce la expresión de agregados Q44::YFP en células intestinales. Para representar la agregación en esta estirpe, se realizó la cuantificación del porcentaje de animales con más de 10 agregados en el total de células intestinales a lo largo del envejecimiento. Para ello, tras una puesta sincronizada, los animales fueron crecidos a 16 o 20°C y se observaron diariamente para cuantificar y eliminar de la placa, aquellos con más de 10 agregados en el intestino. La cuantificación se realizó en una lupa de fluorescencia Leica M165 FC a máximo aumento.

6.7.2. Determinación de la respuesta mecanosensorial.

La evaluación de la respuesta mecanosensorial de los nematodos que expresan los transgenes *igls245 [Pmec-3::htt57-19Q::cfp]* y *igls1 [Pmec-3::htt57-128Q::cfp]*, fue realizada mediante toques suaves con una pestaña fijada en un palillo de dientes. Por cada animal, se evaluó 10 veces su respuesta, de modo que si el animal se alejaba tras el toque con la pestaña, la respuesta era positiva, mientras que si no se alteraba ante el estímulo, la respuesta fue evaluada como negativa. Los datos fueron normalizados en porcentaje de respuesta sensorial con respecto a los 10 estímulos.

6.7.3. Arresto embrionario.

Para la cuantificación del arresto embrionario de los animales que expresan la proteína Q40::YFP, se realizó una puesta sincronizada durante 2-3 horas. Los progenitores fueron eliminados y se contaron todos los embriones de la placa. Tras 24 horas de incubación a 20°C, los embriones presentes en la placa fueron contados

y restados del total de embriones contados anteriormente, lo que permitió determinar la ratio de embriones arrestados.

6.8. Cuantificación de los fenotipos en estirpes A β .

6.8.1. Parálisis.

La expresión del transgen *dvls2* [*Punc-54::human A β*] o *dvls14* [*Punc-54::human A β*] provoca en los animales un fenotipo de parálisis progresiva a lo largo del envejecimiento, el cual es dependiente de la temperatura. La cuantificación de la parálisis fue realizada a la temperatura de 16°C, iniciada al cuarto día tras la puesta sincronizada y registrada diariamente. Los animales fueron considerados como paralizados cuando no mostraban bombeo faríngeo ni respondían a la estimulación suave con hilo de platino, siendo estos animales retirados de la placa. Los animales que morían por matricidio o por desecación en las paredes de las placas de Petri no fueron contabilizados.

6.8.2. Evaluación del defecto en la expulsión de embriones.

Los animales que expresan el transgen *dvls14* [*Punc-54::human A β*] fueron crecidos a la temperatura de 16°C. La incapacidad de expulsar embriones fue determinada al no observarse embriones en torno a los animales (los cuales se encontraban paralizados), y la presencia de larvas en su interior. Las imágenes fueron tomadas con una cámara SONY CCD (modelo DMK 31AU03) y el programa ImagingSource.

6.8.3. Evaluación del retraso en el desarrollo.

Los animales que expresan los transgenes *gnals1* [*Pmyo-2::yfp*] y *gnals2* [*Punc-119::human A β ; Pmyo-2::yfp*] fueron sincronizados y crecidos a 16°C durante 96 horas. Se tomaron imágenes de animales a una amplificación de 10x y su tamaño fue determinado mediante el programa ImageJ (Schneider *et al*, 2012).

6.9. Cuantificación de los fenotipos en estirpes α -sinucleína.

6.9.1. Cuantificación de agregados de α -sinucleína.

La cuantificación de la agregación de los animales que expresan los transgenes *rmls126* [*Punc-54::yfp*] y *pkls2386* [*Punc-54:: α -synuclein::yfp*] se realizó en las células musculares de la cabeza localizadas entre los dos bulbos faríngeos, en

animales sincronizados y crecidos a 20°C. Los animales fueron observados al microscopio de fluorescencia a 100x.

6.9.2. Neurodegeneración dopaminérgica.

La expresión de la proteína GFP bajo el control del promotor del transportador de dopamina *dat-1*, permite la observación de las seis neuronas dopaminérgicas de la cabeza de *C. elegans* (4 CEP y 2 ADE). La cuantificación de la neurodegeneración causada por la expresión de la proteína α -SYN en animales con el transgén *baln11* [*Pdat-1:: α -synuclein*; *Pdat-1::gfp*], fue realizada en una población de animales sincronizados y mantenidos a 20°C, de la que diariamente, 30 animales fueron observados en el microscopio de fluorescencia a 40x. Los animales fueron cuantificados como silvestres cuando se observó fluorescencia en las seis neuronas dopaminérgicas incluyendo soma, axones y dendritas, mientras que la neurodegeneración se consideró cuando en alguna de estas neuronas no se detectó GFP en las dendritas y axones y la señal en el soma estaba claramente reducida o ausente.

6.9.3. Parálisis.

Los animales que expresan el transgén *baln12*[*Punc-54::a-synuclein::gfp*] presentan una parálisis progresiva durante el envejecimiento. La cuantificación de este fenotipo se inició al cuarto día tras la puesta sincronizada a 20°C y registrada diariamente. Los animales fueron considerados como paralizados cuando no mostraron bombeo faríngeo ni respuesta a la estimulación suave con un hilo de platino, tras lo cual, fueron retirados de la placa. Los animales que morían por matricidio o por desecación en las paredes de las placas de Petri no fueron contabilizados.

6.10. Cuantificación de fenotipos de estirpes que expresan proteínas metaestables.

6.10.1. Parálisis de los animales *unc-52(ts)*.

Los animales mutantes *unc-52(e669su250)* presentan un fenotipo de parálisis progresiva a lo largo del envejecimiento dependiente de la temperatura, de modo que a 25°C, la parálisis es mucho más temprana que cuando los animales son crecidos a 16°C. Para la cuantificación de la parálisis, los animales fueron mantenidos a 16°C desde la puesta sincronizada de huevos y el conteo fue iniciado a partir del día cuatro.

Para ello, los animales fueron colocados diariamente en grupos de cinco en la zona de la placa sin bacteria y, si tras 3 minutos no se desplazaban, eran considerados como paralizados y eliminados de la placa.

6.10.2. Arresto embrionario de animales *let-60(ts)*.

Los animales mutantes *let-60(ga89)* muestran letalidad embrionaria cuando son mantenidos a 25°C. Para la cuantificación de este fenotipo, se partió de una puesta sincronizada a 16°C durante 2-3 horas. Posteriormente, los progenitores fueron quitados y se contaron todos embriones de la placa. Tras 24 horas de incubación a 16°C, los embriones presentes en la placa fueron contados y restados del total de embriones de la puesta sincronizada, lo que permitió determinar la ratio de embriones arrestados.

6.11. Reporteros de proteostasis.

La evaluación de todos los reporteros fluorescentes se realizó, como se indicó anteriormente, en un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 equipado con una cámara digital DP72. La adquisición y análisis de imágenes fueron realizados con el programa CellSens. La cuantificación los niveles de fluorescencia fue realizada mediante el programa ImageJ (Schneider *et al*, 2012).

6.11.1. Reporteros de la ruta de la insulina: DAF-16 y SOD-3.

La localización subcelular del reportero DAF-16::GFP fue realizada en animales L4 que expresan el transgen *zIs356[Pdaf-16::daf-16::gfp]* crecido en condiciones basales (20°C, *ad libitum*), de choque térmico (35°C durante 1 hora) o ayuno de 1 hora.

Los niveles del reportero SOD-3 fueron determinados en animales L4 que expresan el transgen *muls84 [Psod-3::gfp]* crecidos a 20°C en placas control de NGM o suplementadas con 50µM de juglona (Sigma H4703).

6.11.2. Reportero de UPR^{RE}: HSP-4.

Los niveles de fluorescencia del reportero HSP-4 fueron determinados en animales L4 que expresan el reportero *zcls4[Phsp-4::gfp]* crecidos a 20°C desde una puesta

sincronizada, en placas control de NGM o tratada con 30µg/mL de tunicamicina (Sigma T7765).

6.11.3. Reportero de UPR^{mit}: HSP-6.

La intensidad de fluorescencia del reportero HSP-6 en animales que expresan el transgen *zcls13 [hsp-6::gfp]* fue realizada en animales jóvenes adultos crecidos a 20°C durante 3 días, desde una puesta sincronizada, en placas control de NGM o crecidos desde el estadio anterior (L4) durante 24 horas en placas tratadas con 0,4mM de paraquat (Sigma 856177).

6.11.4. Reporteros de HSR: HSF-1 y HSP-70.

Para el reportero HSF-1::GFP, se contaron el número de focos de GFP en los núcleos de células intestinales (10 células/ animal) en animales jóvenes adultos que expresan el transgen *drSi13[Phsf-1::hsf-1::gfp]*. Los animales fueron crecidos durante 3 días desde una puesta sincronizada a 20°C. Para la inducción del reportero, se sometieron los animales a estrés térmico de 1 hora a 35°C.

Para los animales que expresan el transgen *rmls223[Phsp-70::gfp]*, los niveles de GFP fueron determinados en animales L4 crecidos a 20°C en placas control de NGM. Para la inducción del reportero, se sometieron los animales a estrés térmico de 1 hora a 35°C.

6.11.5. Reportero de proteasoma: UbG76V.

Los niveles de fluorescencia de GFP en los animales que expresan el transgen *hhls64 [(Psur-5::UbG76V::gfp)]* se determinó en animales jóvenes adultos (3 días a 20°C tras una puesta sincronizada) en condiciones normales de crecimiento (OP50 *ad libitum*). Para la inducción de la UPS, los animales fueron sometidos a ayuno durante 6 horas antes de la cuantificación.

6.11.6. Mitofagia.

Los animales con la mutación *unc-52(e669su250)* y aquellos que expresan el transgén *dvls2 [Punc-54::human Aβ]* fueron combinados con la mutación *dct-1(tm376)* y crecidos a 16°C tras una puesta sincronizada.

Para los animales *dvIs2*, la cuantificación de la parálisis fue iniciada a día 4 y determinada diariamente. Los animales que no mostraron bombeo faríngeo y respuesta a la estimulación suave con el hilo de platino fueron considerados como paralizados y retirados de la placa. Los animales que morían por matricidio o por desecación en las paredes de las placas de Petri no fueron contabilizados.

La parálisis de los animales *unc-52(e669su250)* fue realizada a día 7 desde la puesta sincronizada. Para ello, grupos de 5 animales fueron dispuestos en la zona sin bacteria de la placa y, si tras 3 minutos no se desplazaban, eran considerados como paralizados.

6.11.7. Localización subcelular de HLH-30::GFP.

En este trabajo se utilizaron dos reporteros diferentes de HLH-30: uno de ellos expresado en multicopia a través del transgen *sqIs17 [Phlh-30::hlh-30::GFP]*, y otro expresando, desde el locus endógeno *hlh-30*, una sola copia del gen, tanto silvestre como con una mutación que cambia el único residuo de cisteína de HLH-30 por alanina, fusionado a un triple FLAG y a GFP (HLH-30::FLAG::GFP y HLH-30(C284A)::FLAG::GFP, respectivamente).

La cuantificación de la localización subcelular de los reporteros se realizó al primer día de adultos en animales crecidos a 20°C tras la puesta sincronizada. Todos los animales fueron montados en portaobjetos con agarosa y paralizados con azida sódica, excepto en el ensayo con levamisol. La evaluación de la localización citoplasmática, nuclear débil o nuclear fuerte, se realizó en el microscopio de fluorescencia a un aumento de 40x.

La localización subcelular del reportero HLH-30::GFP en los animales que expresan el transgen *sqIs17 [Phlh-30::hlh-30::GFP]* fue evaluada ante estrés térmico y falta de alimento, mientras que para los reporteros HLH-30::FLAG::GFP y HLH-30(C284A)::FLAG::GFP se ensayaron, además, la exposición a levamisol, *S. aureus*, arsenito sódico (Sigma 71287) y DEM.

Para el ensayo de levamisol, los animales fueron paralizados con 10mM de levamisol y cuantificados inmediatamente. Para el ensayo de estrés térmico, los animales

fueron incubados a 30°C durante 1 y 3 horas. Para el ensayo sin comida, los animales fueron incubados a 20°C en placas sin *E. coli* OP50. En el ensayo de *S. aureus*, 100µL de la cepa ATCC29213 fue sembrada en placas NGM y crecida a 37°C durante 24 horas. Los animales fueron incubados en presencia de *S. aureus* durante 1 y 3 horas a 20°C. Para los ensayos de arsenito sódico y DEM, los animales fueron incubados en placas de NGM con 5mM y 3mM respectivamente a 20°C durante 1 y 3 horas.

Los reporteros HLH-30::FLAG::GFP y HLH-30(C284A)::FLAG::GFP también fueron expresados en animales mutantes *eat-2(ad1116)* y *daf-2(e1370)*. Para la cuantificación de la localización subcelular en estos mutantes, los animales fueron incubados a 20°C y 22,5°C respectivamente. La cuantificación se realizó a los días 4 para *eat-2(ad1116)* y 5 para *daf-2(e1370)* tras la puesta sincronizada. Un porcentaje de los animales *daf-2(e1370)* crecidos a 22,5°C entra en el estadio dauer, los cuales no fueron utilizados para la cuantificación.

6.12. Cuantificación de la acumulación de SQST-1::GFP.

La expresión del transgen *bpls151[Psqst-1::sqst-1::gfp]* permite la observación de agregados de la proteína SQST-1 mediante su fusión con GFP cuando la autofagia está bloqueada o no es eficiente. La cuantificación de estos agregados en embriones se inició con una puesta sincronizada de 2-3 horas, la cual fue incubada a 20°C durante 6 horas. Posteriormente, los embriones con fluorescencia GFP fueron cuantificados al microscopio de fluorescencia a 100x. Para el ensayo de ayuno, hermafroditas grávidas fueron incubadas en tubos de 15mL con 2mL de M9 a 20°C con una agitación de 120 r.p.m. durante 24 horas. Los embriones acumulados en el útero fueron liberados mediante la disección de los progenitores con una aguja. Finalmente, los embriones fueron observados al microscopio de fluorescencia para cuantificar aquellos que presentaban fluorescencia GFP.

Para la cuantificación de la agregación de SQST-1::GFP en ARNi de *lgg-1*, los animales fueron crecidos durante tres generaciones a 20°C en placas sembradas con bacterias expresando el vector vacío como control o el ARNi de *lgg-1*. Tras una puesta sincronizada, los embriones fueron incubados durante 8-10 horas hasta su

eclosión y las larvas L1 con más de 20 agregados de GFP en el intestino fueron cuantificadas en el microscopio de fluorescencia a un aumento de 100x.

6.13. Cuantificación de los focos mCherry::GFP::LGG-1.

El transgen *sqIs11[Plgg-1::mCherry::gfp::lgg-1; rol-6(su1006)]* permite la evaluación del flujo autofágico mediante la cuantificación de las vesículas autofágicas: autofagosomas (AP) con fluorescencia amarilla y autolisosomas (AL) con fluorescencia roja.

Los animales fueron crecidos a 16°C durante 5 días tras la puesta sincronizada para la cuantificación de las vesículas en las “seam cells” de la hipodermis. La cuantificación de los focos mCherry::GFP::LGG-1 en la faringe se realizó en los animales crecidos a 20°C durante 3 días debido a que a esta temperatura muchas de las “seam cells” aparecían fusionadas entre sí.

Las imágenes de las vesículas autofágicas fueron realizadas en un microscopio confocal Nikon A1R. Se obtuvieron imágenes en z de 0,3µm a una amplificación de 63x. La excitación/emisión fue realizada a 488/525 nm para la GFP y 561/595 nm para mCherry. La cuantificación se realizó utilizando el programa NIS Elements Viewer.

6.14. Ensayo de longevidad.

Para los ensayos de longevidad, se parte de animales que han sido sometidos a descontaminación, para ello, una placa con hermafroditas grávidas fue utilizada para realizar el tratamiento con la solución de descontaminación 2 en líquido, obteniendo así embriones libres de cualquier contaminación. Estos embriones fueron incubados en un tubo de 15mL con 2mL de M9 a 16°C con una agitación de 120 r.p.m. hasta el día siguiente, obteniéndose así una población de animales sincronizados en el estadio L1. Para evitar interferencias debido a estreses fisiológicos provocados por el tratamiento de bleaching y la posterior sincronización en L1, los ensayos de longevidad se realizaron en la siguiente generación. Por lo tanto, los animales sincronizados en el estadio L1 que fueron transferidos a placas de NGM con OP50 e incubados a 20°C hasta que llegaron a la edad adulta. Con estos animales se realizó una puesta sincronizada durante 2 horas que se incubó a 20°C hasta que los

animales alcanzaron el estadio L4. A continuación, 100 L4 fueron repartidos en 5 placas (20 animales/placa) e incubados a 25°C, siendo este considerado como día 0. La cuantificación de la longevidad fue iniciada cuando los animales alcanzaron el estadio adulto (día 1). Los animales fueron transferidos diariamente a placas de NGM nuevas hasta el fin del periodo de puesta de huevos, a partir del cual fueron transferidos cada dos días. Los animales fueron considerados como muertos cuando no se observó bombeo faríngeo y no respondían a la estimulación con el hilo de platino. Los animales que murieron por causas no naturales, como desecación en las paredes de la placa o eclosión interna de los embriones, fueron censurados.

6.15. Supervivencia a arsenito sódico.

Para evaluar la supervivencia al estrés oxidativo provocado por NaAsO₂, embriones sincronizados fueron incubados a 20°C durante 52 horas. A continuación, 120 animales (40 por placa) fueron transferidos a placas de NGM con 7,5mM de NaAsO₂ e incubados a 20°C para ser cuantificados como vivos o muertos a diferentes tiempos. Debido a que la bacteria *E. coli* OP50 no crece a la concentración de 7,5mM de NaAsO₂, esta fue transferida manualmente con un asa de siembra desde una placa de NGM no tratada, evitando así que la falta de alimento interfiriera en la supervivencia. Los animales fueron cuantificados como muertos cuando no se observó movimiento de la faringe y no respondieron a la estimulación con hilo de platino.

6.16. Supervivencia a la infección por *Staphylococcus aureus*.

Una colonia de *S. aureus* NCTC8325 fue crecida a 37°C y 180 r.p.m. durante toda la noche en medio líquido TBS (tryptic soy broth), suplementado con 10 µg/mL de ácido nalidíxico (Nal, Sigma N8878) como antibiótico. El cultivo fue diluido 1:10 en TBS suplementado con 10 µg/mL de Nal. 10 µL del cultivo diluido fue sembrado en placas de 3,5 cm de TSA (tryptic soy agar) suplementadas con 10 µg/mL de Nal e incubadas durante 4 horas a 37°C. Las placas fueron secadas posteriormente en campana de flujo laminar estéril hasta que la temperatura fue equilibrada a temperatura ambiente.

Para el ensayo de supervivencia, 90 L4 crecidos en placas de NGM con *E. coli* OP50 fueron transferidos en placas de *S. aureus* (30 animales por placa) e incubados a 25°C. A diferentes tiempos los animales fueron cuantificados como muertos cuando

no se observó bombeo faríngeo ni respondieron a la estimulación mediante hilo de platino.

6.17. Cuantificación de la longitud de los mutantes *eat-2*.

Los mutantes *eat-2(ad1116)* presentan un menor tamaño que los animales silvestres. Para cuantificar este fenotipo, se realizó una puesta sincronizada de los animales *eat-2(ad1116)* y sus derivados durante 1 hora e incubados a 20°C durante 72 horas. Posteriormente, se tomaron imágenes de los animales y el tamaño fue medido mediante el programa ImageJ (Schneider *et al*, 2012).

6.18. Formación y recuperación de dauer.

La mutación *daf-2(e1370)* provoca la formación constitutiva de dauer en función de la temperatura. Se partió de una puesta de huevos sincronizada a 20°C y crecida a 22,5°C y la cuantificación de la formación de dauer fue realizada a día 3 en animales controles con el fondo genético *daf-2(+)* y a día 6 para los animales con el fondo genético *daf-2(e1370)*. En este último caso, los animales que no formaron dauer fueron eliminados para evitar el crecimiento de la descendencia.

Para el ensayo de recuperación de dauer, embriones sincronizados fueron incubados a 25°C durante 4 días para la inducción de dauer en el total de la población. A continuación, estos animales fueron incubados a 20°C y la recuperación de dauer fue cuantificada diariamente.

Capítulo VII. Bibliografía.

- Abada A & Elazar Z (2014) Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis. *EMBO Rep* 15: 839–852
- Adegbuyiro A, Sedighi F, Pilkington AW, Groover S & Legleiter J (2017) Proteins Containing Expanded Polyglutamine Tracts and Neurodegenerative Disease. *Biochemistry* 56: 1199–1217
- Ahn SG & Thiele DJ (2003) Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev* 17: 516–528
- Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin MA & Avadhani NG (2003) Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol* 161: 41–54
- Anderson RM, Hadjichrysanthou C, Evans S & Wong MM (2017) Why do so many clinical trials of therapies for Alzheimer's disease fail? *Lancet* 390: 2327–2329
- Andres-Mateos E, Perier C, Zhang L, Blanchard-Fillion B, Greco TM, Thomas B, Han SK, Sasaki M, Ischiropoulos H, Przedborski S, *et al* (2007) DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14807–14812
- Anfinsen CB (1973) Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science* (80-) 181: 223 LP – 230
- Anfinsen CB, Haber E, Sela & White FH (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci* 47: 1309–1314
- Antononkov VD, Grunau S, Ohlmeier S & Hiltunen JK (2010) Peroxisomes are oxidative organelles. *Antioxidants Redox Signal* 13: 525–537
- Aquilano K, Baldelli S & Ciriolo MR (2014) Glutathione: New roles in redox signalling for an old antioxidant. *Front Pharmacol* 5 AUG: 1–12
- Arantes-Oliveira N, Apfeld J, Dillin A & Kenyon C (2002) Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science* (80-) 295: 502–505
- Arnér ESJ (2009) Focus on mammalian thioredoxin reductases - Important selenoproteins with versatile functions. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1790: 495–526
- Artiga JI, Bullido J, Sastre I, Garc MA & Valdivieso F (1998) Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. 421: 105–108
- Babu GN, Kumar A, Chandra R, Puri SK, Singh RL, Kalita J & Misra UK (2008) Oxidant-antioxidant imbalance in the erythrocytes of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients correlates with the progression of disease. *Neurochem Int* 52: 1284–1289
- Bachmann A, Wildemann D, Praetorius F, Fischer G & Kiefhaber T (2011) Mapping backbone and side-chain interactions in the transition state of a coupled protein folding and binding reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 3952–3957
- Bains JS & Shaw CA (1997) Neurodegenerative disorders in humans: The role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Rev* 25: 335–358
- Balch WE, Morimoto RI, Dillin A & Kelly JW (2008) Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* (80-) 319: 916–919
- Balchin D, Hayer-Hartl M & Hartl FU (2016) In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* (80-) 353
- Baldwin AJ, Knowles TPJ, Tartaglia GG, Fitzpatrick AW, Devlin GL, Shamma SL, Waudby CA, Mossuto MF, Meehan S, Gras SL, *et al* (2011) Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *J Am Chem Soc*

- 133: 14160–14163
- Baldwin RL (1995) The nature of protein folding pathways: The classical versus the new view. *J Biomol NMR* 5: 103–109
- Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K & Hammond CL (2009) Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 390: 191–214
- Bar DZ, Charar C, Dorfman J, Yadid T, Tafforeau L, Lafontaine DLJ & Gruenbaum Y (2016) Cell size and fat content of dietary-restricted *Caenorhabditis elegans* are regulated by *atx-2*, an mtor repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E4620–E4629
- Bates EA, Victor M, Jones AK, Shi Y & Hart AC (2006) Differential contributions of *Caenorhabditis elegans* histone deacetylases to Huntingtin polyglutamine toxicity. *J Neurosci* 26: 2830–2838
- Berggren MI, Husbeck B, Samulitis B, Baker AF, Gallegos A & Powis G (2001) Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin. *Arch Biochem Biophys* 392: 103–109
- Berndt C, Hudemann C, Hanschmann E, Axelsson R, Holmgren A & Lillig CH (2007) How Does Iron – Sulfur Cluster Coordination Regulate the. 9
- Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Øvervatn A, Stenmark H & Johansen T (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171: 603–614
- Boulin T, Etchberger JF & Hobert O (2006) Reporter gene fusions. *WormBook*: 1–23
- Bouziane H & Chouarfia A (2020) Sequence- and structure-based prediction of amyloidogenic regions in proteins. *Soft Comput* 24: 3285–3308
- Boyland E & Chasseaud LF (1967) Enzyme-catalysed conjugations of glutathione with unsaturated compounds. *Biochem J* 104: 95–102
- Brenner S (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71–94
- Brigelius-Flohé R & Maiorino M (2013) Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1830: 3289–3303
- Brignull HR, Moore FE, Tang SJ & Morimoto RI (2006a) Polyglutamine proteins at the pathogenic threshold display neuron-specific aggregation in a pan-neuronal *Caenorhabditis elegans* model. *J Neurosci* 26: 7597–7606
- Brignull HR, Morley JF, Garcia SM & Morimoto RI (2006b) Modeling Polyglutamine Pathogenesis in *C. elegans*. *Methods Enzymol* 412: 256–282
- Brockwell DJ & Radford SE (2007) Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes? *Curr Opin Struct Biol* 17: 30–37
- Budenholzer L, Cheng CL, Li Y & Hochstrasser M (2017) Proteasome Structure and Assembly. *J Mol Biol* 429: 3500–3524
- Burré J (2015) The synaptic function of α -synuclein. *J Parkinsons Dis* 5: 699–713
- Cacho-Valadez B, Muñoz-Lobato F, Pedrajas JR, Cabello J, Fierro-González JC, Navas P, Swoboda P, Link CD & Miranda-Vizueté A (2012) The Characterization of the *Caenorhabditis elegans* Mitochondrial Thioredoxin System Uncovers an Unexpected Protective Role of Thioredoxin Reductase 2 in β -Amyloid Peptide Toxicity. *Antioxid Redox Signal* 16: 1384–1400
- Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG & Ron D (2002) Erratum: IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA (Nature (2002) 415 (92-96)). *Nature* 420: 202

- Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA & Cookson MR (2004) The Parkinson's disease DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9103–9108
- Cassada RC & Russell RL (1975) The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 46: 326–342
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW & Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (80-)* 263: 802 LP – 805
- Chang JT, Kumsta C, Hellman AB, Adams LM & Hansen M (2017) Spatiotemporal regulation of autophagy during *Caenorhabditis elegans* aging. *Elife* 6
- Chapin HC, Okada M, Merz AJ & Miller DL (2015) Tissue-specific autophagy responses to aging and stress in *C. elegans*. *Aging (Albany NY)* 7: 419–434
- Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K & Xu HE (2017a) Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin* 38: 1205–1235
- Chen H Da, Kao CY, Liu BY, Huang SW, Kuo CJ, Ruan JW, Lin YH, Huang CR, Chen YH, Wang HD, *et al* (2017b) HLH-30/TFEB-mediated autophagy functions in a cell-autonomous manner for epithelium intrinsic cellular defense against bacterial pore-forming toxin in *C. elegans*. *Autophagy* 13: 371–385
- Chiti F, Stefani M, Taddei N, Ramponi G & Dobson CM (2003) Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature* 424: 805–808
- Chuang E, Hori AM, Hesketh CD & Shorter J (2018) Amyloid assembly and disassembly. *J Cell Sci* 131: 1–18
- Ciryam P, Kundra R, Morimoto RI, Dobson CM & Vendruscolo M (2015) Supersaturation is a major driving force for protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol Sci* 36: 72–77
- Ciryam P, Tartaglia GG, Morimoto RI, Dobson CM & Vendruscolo M (2013) Widespread Aggregation and Neurodegenerative Diseases Are Associated with Supersaturated Proteins. *Cell Rep* 5: 781–790
- Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, Yoo SJ, Hay BA & Guo M (2006) *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 441: 1162–1166
- Cohen E, Du D, Joyce D, Kapernick EA, Volovik Y, Kelly JW & Dillin A (2010) Temporal requirements of insulin/IGF-1 signaling for proteotoxicity protection. *Aging Cell* 9: 126–134
- Cohen E, Paulsson JF, Blinder P, Burstyn-Cohen T, Du D, Estepa G, Adame A, Pham HM, Holzenberger M, Kelly JW, *et al* (2009) Reduced IGF-1 Signaling Delays Age-Associated Proteotoxicity in Mice. *Cell* 139: 1157–1169
- Collet JF & Messens J (2010) Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxidants Redox Signal* 13: 1205–1216
- Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Lippl S, Banjac A, Schneider M, Beck H, Hatzopoulos AK, Just U, Sinowatz F, *et al* (2004) Essential Role for Mitochondrial Thioredoxin Reductase in Hematopoiesis, Heart Development, and Heart Function. *Mol Cell Biol* 24: 9414–9423
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE & Lansbury PT (2000) Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both α -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 571–576
- Cookson MR (2010) The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 11: 791–797

- Cooper JF & Van Raamsdonk JM (2018) Modeling Parkinson's disease in *C. elegans*. *J Parkinsons Dis* 8: 17–32
- Corsi AK, Wightman B & Chalfie M (2015) A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*: 1–31
- Costa V, Giacomello M, Hudec R, Lopreiato R, Ermak G, Lim D, Malorni W, Davies KJA, Carafoli E & Scorrano L (2010) Mitochondrial fission and cristae disruption increase the response of cell models of Huntington's disease to apoptotic stimuli. *EMBO Mol Med* 2: 490–503
- Cristalli DO, Arnal N, Marra FA, de Alaniz MJT & Marra CA (2012) Peripheral markers in neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *J Neurol Sci* 314: 48–56
- Culetto E & Sattelle DB (2000) A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum Mol Genet* 9: 869–877
- Cummings JL, Morstorf T & Zhong K (2014) Alzheimer's disease drug-development pipeline: Few candidates, frequent failures. *Alzheimer's Res Ther* 6: 1–7
- Daigle I & Li C (1993) *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human β -amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 12045–12049
- Das R, Melo JA, Thondamal M, Morton EA, Cornwell AB, Crick B, Kim JH, Swartz EW, Lamitina T, Douglas PM, *et al* (2017) The homeodomain-interacting protein kinase HPK-1 preserves protein homeostasis and longevity through master regulatory control of the HSF-1 chaperone network and TORC1-restricted autophagy in *Caenorhabditis elegans*
- Deibel MA, Ehmann WD & Markesbery WR (1996) Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: Possible relation to oxidative stress. *J Neurol Sci* 143: 137–142
- Deponte M (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1830: 3217–3266
- Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG & Anandatheerthavarada HK (2008) Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem* 283: 9089–9100
- Dice JF (1990) Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* 15: 305–309
- Dickinson DJ & Goldstein B (2016) CRISPR-Based Methods for *Caenorhabditis elegans* Genome Engineering. *Genetics* 202: 885–901
- Dikic I & Elazar Z (2018) Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 349–364
- Dill KA & Chan HS (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol* 4: 10–19
- Dimachkie MM & Barohn RJ (2013) Inclusion body myositis topical collection on nerve and muscle. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13
- Dinner AR, Šalib A, Smitha LJ, Dobsona CM & Karplus M (2000) Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem Sci* 25: 331–339
- Dobson CM (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* 426: 884–890
- Drake J, Link CD & Butterfield DA (2003) Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid β -peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiol Aging* 24: 415–420

- Dubnikov T, Ben-Gedalya T & Cohen E (2017) Protein quality control in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9
- Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, Bakardjian H, Benali H, Bertram L, Blennow K, *et al* (2019) Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-Tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, *et al* (1996) Increased amyloid- β 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383: 710–713
- E.-M. H, J.R. G, C. B, C. H & C.H. L (2013) Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: From cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxidants Redox Signal* 19: 1539–1605
- Edgley ML, Baillie DL, Riddle DL & Rose AM (2006) Genetic balancers. *WormBook*: 1–32
- Englander SW & Mayne L (2014) The nature of protein folding pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 15873–15880
- Enoksson M, Fernandes AP, Prast S, Lillig CH, Holmgren A & Orrenius S (2005) Overexpression of glutaredoxin 2 attenuates apoptosis by preventing cytochrome c release. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 774–779
- Eriksson S, Prigge JR, Talago EA, Arnér ESJ & Schmidt EE (2015) Dietary methionine can sustain cytosolic redox homeostasis in the mouse liver. *Nat Commun* 6: 1–9
- Ewbank JJ, Barnes TM, Lakowski B, Lussier M, Bussey H & Hekimi S (1997) Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1*. *Science* 275: 980–983
- Faber PW, Alter JR, Macdonald ME & Hart AC (1999) Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 179–184
- Faber PW, Voisine C, King DC, Bates EA & Hart AC (2002) Glutamine/proline-rich PQE-1 proteins protect *Caenorhabditis elegans* neurons from huntingtin polyglutamine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 17131–17136
- Fang EF, Hou Y, Palikaras K, Adriaanse BA, Kerr JS, Yang B, Lautrup S, Hasan-Olive MM, Caponio D, Dan X, *et al* (2019) Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 22: 401–412
- Feinberg EH, Vanhoven MK, Bendesky A, Wang G, Fetter RD, Shen K & Bargmann CI (2008) GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. *Neuron* 57: 353–363
- Feliciano DR, Arnsburg K & Kirstein J (2016) Interplay between redox and protein homeostasis. *Worm* 5: e1170273
- Fernando MR, Sumimoto H, Nanri H, Kawabata S, Iwanaga S, Minakami S, Fukumaki Y & Takeshige K (1994) Cloning and sequencing of the cDNA encoding human glutaredoxin. *Biochim Biophys Acta* 1218: 229–231
- Ferrari DM & Söling HD (1999) The protein disulphide-isomerase family: Unravelling a string of folds. *Biochem J* 339: 1–10
- Fivenson EM, Lautrup S, Sun N, Scheibye-Knudsen M, Stevnsner T, Nilsen H, Bohr VA & Fang EF (2017) Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Neurochem Int* 109: 202–209
- Florez-McClure ML, Hohsfield LA, Fonte G, Bealor MT & Link CD (2007) Decreased insulin-receptor signaling promotes the autophagic degradation of β -amyloid peptide in *C. elegans*. *Autophagy* 3: 569–580
- Fong S, Teo E, Ng LF, Chen CB, Lakshmanan LN, Tsoi SY, Moore PK, Inoue T,

- Halliwell B & Gruber J (2016) Energy crisis precedes global metabolic failure in a novel *Caenorhabditis elegans* Alzheimer Disease model. *Sci Rep* 6: 1–9
- Ford AM, Bennett CA, Healy LE, Towatari M, Greaves MF & Enver T (1996) Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP α , - β , and - δ during granulocyte-lineage specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10838–10843
- Forman HJ, Zhang H & Rinna A (2009) Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 30: 1–12
- Friedland AE, Tzur YB, Esvelt KM, Colaiácovo MP, Church GM & Calarco JA (2013) Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods* 10: 741–743
- Friedman JR & Nunnari J (2014) Mitochondrial form and function. *Nature* 505: 335–343
- Frischer H & Ahmad T (1977) Severe generalized glutathione reductase deficiency after antitumor chemotherapy with BCNU" [1,3-bis(chloroethyl)-1-nitrosourea]. *J Lab Clin Med* 89: 1080–1091
- Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I & Mori N (2000) Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J* 349: 629–634
- Gallrein C, Iburg M, Michelberger T, Koçak A, Puchkov D, Liu F, Ayala Mariscal SM, Nayak T, Kaminski Schierle GS & Kirstein J (2021) Novel amyloid-beta pathology *C. elegans* model reveals distinct neurons as seeds of pathogenicity. *Prog Neurobiol* 198
- Gan L, Cookson MR, Petrucelli L & La Spada AR (2018) Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms. *Nat Neurosci* 21: 1300–1309
- Garza-Lombó C, Pappa A, Panayiotidis MI & Franco R (2020) Redox homeostasis, oxidative stress and mitophagy
- Gasdaska PY, Gasdaska JR, Cochran S & Powis G (1995) Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase. *FEBS Lett* 373: 5–9
- Georgescu RE, Li JH, Goldberg ME, Tasayco ML & Chaffotte AF (1998) Proline isomerization-independent accumulation of an early intermediate and heterogeneity of the folding pathways of a mixed alpha/beta protein, *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* 37: 10286–10297
- Ghemrawi R & Khair M (2021) Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol*
- Gidalevitz T, Ben-Zvi A, Ho KH, Brignull HR & Morimoto RI (2006) Progressive disruption of cellular protein folding in models of polyglutamine diseases. *Science (80-)* 311: 1471–1474
- Glover-Cutter KM, Lin S & Blackwell TK (2013) Integration of the Unfolded Protein and Oxidative Stress Responses through SKN-1/Nrf. *PLoS Genet* 9
- Go YM & Jones DP (2008) Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1780: 1273–1290
- Golden JW & Riddle DL (1984) The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Dev Biol* 102: 368–378
- Grove CA, De Masi F, Barrasa MI, Newburger DE, Alkema MJ, Bulyk ML & Walhout AJM (2009) A Multiparameter Network Reveals Extensive Divergence between *C. elegans* bHLH Transcription Factors. *Cell* 138: 314–327
- Grune T, Catalgol B, Licht A, Ermak G, Pickering AM, Ngo JK & Davies KJA (2011) HSP70 mediates dissociation and reassociation of the 26S proteasome during

- adaptation to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 51: 1355–1364
- Guisbert E, Czyz DM, Richter K, McMullen PD & Morimoto RI (2013) Identification of a Tissue-Selective Heat Shock Response Regulatory Network. *PLoS Genet* 9: 1–12
- Guo B, Huang X, Zhang P, Qi L, Liang Q, Zhang X, Huang J, Fang B, Hou W, Han J, *et al* (2014) Genome-wide screen identifies signaling pathways that regulate autophagy during *Caenorhabditis elegans* development. *EMBO Rep* 15: 705–713
- Guzman JN, Sanchez-padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT & Surmeier DJ (2010) dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 468: 696–700
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE & Shaw RJ (2008) AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol Cell* 30: 214–226
- Van Ham TJ, Holmberg MA, van der Goot AT, Teuling E, Garcia-Arencibia M, Kim H eui, Du D, Thijssen KL, Wiersma M, Burggraaff R, *et al* (2010) Identification of MOAG-4/SERF as a regulator of age-related proteotoxicity. *Cell* 142: 601–612
- Van Ham TJ, Thijssen KL, Breitling R, Hofstra RMW, Plasterk RHA & Nollen EAA (2008) *C. elegans* model identifies genetic modifiers of α -synuclein inclusion formation during aging. *PLoS Genet* 4
- Hamamichi S, Rivas RN, Knight AL, Cao S, Caldwell KA & Caldwell GA (2008) Hypothesis-based RNAi screening identifies neuroprotective genes in a Parkinson's disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 728–733
- Hanschmann EM, Godoy JR, Berndt C, Hudemann C & Lillig CH (2013) Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: From cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxidants Redox Signal* 19: 1539–1605
- Hansen M, Rubinsztein DC & Walker DW (2018) Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 579–593
- Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J & Yonezawa K (2002) Raptor, a Binding Partner of Target of Rapamycin (TOR), Mediates TOR Action. *Cell* 110: 177–189
- Haynes CM & Ron D (2010) The mitochondrial UPR - Protecting organelle protein homeostasis. *J Cell Sci* 123: 3849–3855
- Heemels M-T (2016) Neurodegenerative diseases. *Nature* 539: 179
- Henderson ST & Johnson TE (2001) *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 11: 1975–1980
- Hildreth KL, Van Pelt RE & Schwartz RS (2012) Obesity, Insulin Resistance, and Alzheimer's Disease. *Obesity* 20: 1549–1557
- Hinault M-P, Ben-Zvi A & Goloubinoff P (2006) Chaperones and proteases: cellular fold-controlling factors of proteins in neurodegenerative diseases and aging. *J Mol Neurosci* 30: 249–265
- Hofmann B, Hecht H-J & Flohé L (2002) Peroxiredoxins. *Biol Chem* 383: 347–364
- Hofrichter J, Ross PD & Eaton WA (1976) Supersaturation in sickle cell hemoglobin solutions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 3035–3039
- Holmgren A (1976) Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 2275–2279
- Holmström KM & Finkel T (2014) Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 411–

- Honda Y & Honda S (1999) The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J* 13: 1385–1393
- Hoppe T & Cohen E (2020) Organismal protein homeostasis mechanisms. *Genetics* 215: 889–901
- Houtkooper RH, Mouchiroud L, Ryu D, Moullan N, Katsyuba E, Knott G, Williams RW & Auwerx J (2013) Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature* 497: 451–457
- Huang MLH, Chiang S, Kalinowski DS, Bae DH, Sahni S & Richardson DR (2019) The role of the antioxidant response in mitochondrial dysfunction in degenerative diseases: Cross-talk between antioxidant defense, autophagy, and apoptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2019
- Hudemann C, Lönn ME, Godoy JR, Zahedi Avval F, Capani F, Holmgren A & Lillig CH (2009) Identification, expression pattern, and characterization of mouse glutaredoxin 2 isoforms. *Antioxidants Redox Signal* 11: 1–14
- Hudson DA, Gannon SA & Thorpe C (2015) Oxidative protein folding: from thiol-disulfide exchange reactions to the redox poise of the endoplasmic reticulum. *Free Radic Biol Med* 80: 171–182
- Hwang C, Sinskey AJ & Lodish HF (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science (80-)* 257: 1496–1502
- Iqbal K, Liu F, Gong C-X & Grundke-Iqbal I (2010) Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 7: 656–664
- Islam MT (2017) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res* 39: 73–82
- Jakupoglu C, Przemack GKH, Schneider M, Moreno SG, Mayr N, Hatzopoulos AK, de Angelis MH, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M, *et al* (2005) Cytoplasmic Thioredoxin Reductase Is Essential for Embryogenesis but Dispensable for Cardiac Development. *Mol Cell Biol* 25: 1980–1988
- Jamin M & Baldwin RL (1996) Refolding and unfolding kinetics of the equilibrium folding intermediate of apomyoglobin. *Nat Struct Biol* 3: 613–618
- Jayanthi LD, Apparsundaram S, Malone MD, Ward E, Miller DM, Eppler M & Blakely RD (1998) The *Caenorhabditis elegans* gene T23G5.5 encodes an antidepressant- and cocaine-sensitive dopamine transporter. *Mol Pharmacol* 54: 601–609
- Jellinger KA (2010) Basic mechanisms of neurodegeneration: A critical update. *J Cell Mol Med* 14: 457–487
- Jenkins NL, James SA, Salim A, Sumardy F, Speed TP, Conrad M, Richardson DR, Bush AI & McColl G (2019) Ferrous-glutathione coupling mediates ferroptosis and frailty in *Caenorhabditis elegans*. *bioRxiv*
- Jennings PA & Wright PE (1993) Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. *Science* 262: 892–896
- Jeon YH, Ko KY, Lee JH, Park KJ, Jang JK & Kim IY (2016) Identification of a redox-modulatory interaction between selenoprotein W and 14-3-3 protein. *Biochim Biophys Acta* 1863: 10–18
- Jessop CE & Bulleid NJ (2004) Glutathione directly reduces an oxidoreductase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem* 279: 55341–55347
- Jewell JL, Russell RC & Guan KL (2013) Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 133–139
- Jia K, Hart AC & Levine B (2007) Autophagy genes protect against disease caused by polyglutamine expansion proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* 3:

21–25

- Jimenez-Sanchez M, Licitra F, Underwood BR & Rubinsztein DC (2017) Huntington's disease: Mechanisms of pathogenesis and therapeutic strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7: 1–22
- Johansson C, Roos AK, Montano SJ, Sengupta R, Filippakopoulos P, Guo K, Von Delft F, Holmgren A, Oppermann U & Kavanagh KL (2011) The crystal structure of human GLRX5: Iron-sulfur cluster co-ordination, tetrameric assembly and monomer activity. *Biochem J* 433: 303–311
- Johansson L, Gafvelin G & Arnér ESJ (2005) Selenocysteine in proteins - Properties and biotechnological use. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1726: 1–13
- Johnson WM, Wilson-Delfosse AL & Mielay JJ (2012) Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. *Nutrients* 4: 1399–1440
- Johnston AD & Ebert PR (2012) The redox system in *C. elegans*, a phylogenetic approach. *J Toxicol* 2012
- Kaletta T & Hengartner MO (2006) Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov* 5: 387–398 doi:10.1038/nrd2031 [PREPRINT]
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K & Müller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733–736
- Karpinar DP, Balija MBG, Kügler S, Opazo F, Rezaei-Ghaleh N, Wender N, Kim HY, Taschenberger G, Falkenburger BH, Heise H, *et al* (2009) Pre-fibrillar α -synuclein variants with impaired B-structure increase neurotoxicity in parkinson's disease models. *EMBO J* 28: 3256–3268
- Kemp M, Go YM & Jones DP (2008) Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: A perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med* 44: 921–937
- Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A & Tabtiang R (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461–464
- Kenyon CJ (2010) The genetics of ageing. *Nature* 464: 504–512
- Khalil B, El Fissi N, Aouane A, Cabirol-Pol MJ, Rival T & Liévens JC (2015) PINK1-induced mitophagy promotes neuroprotection in Huntington's disease. *Cell Death Dis* 6: 1–12
- Khorasanizadeh S, Peters ID & Roder H (1996) Evidence for a three-state model of protein folding from kinetic analysis of ubiquitin variants with altered core residues. *Nat Struct Biol* 3: 193–205
- Kirkitadze MD, Bitan G & Teplow DB (2002) Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies. *J Neurosci Res* 69: 567–577
- Kirstein J, Morito D, Kakhana T, Sugihara M, Minnen A, Hipp MS, Nussbaum-Krammer C, Kasturi P, Hartl FU, Nagata K, *et al* (2015) Proteotoxic stress and ageing triggers the loss of redox homeostasis across cellular compartments. *EMBO J* 34: 2334–2349
- Klepac N, Relja M, Klepac R, Hećimović S, Babić T & Trkulja V (2007) Oxidative stress parameters in plasma of Huntington's disease patients, asymptomatic Huntington's disease gene carriers and healthy subjects : a cross-sectional study. *J Neurol* 254: 1676–1683
- Kojo S (2005) Vitamin C: Basic Metabolism and Its Function as an Index of Oxidative Stress. *Curr Med Chem* 11: 1041–1064
- Kondo J, Honda T, Mori H, Hamada Y, Miura R, Ogawara M & Ihara Y (1988) The

- carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron* 1: 827–834
- Kosuri P, Alegre-Cebollada J, Feng J, Kaplan A, Inglés-Prieto A, Badilla CL, Stockwell BR, Sanchez-Ruiz JM, Holmgren A & Fernández JM (2012) Protein folding drives disulfide formation. *Cell* 151: 794–806
- Krauth-Siegel RL, Saleh M, Untucht-Grau R, Schirmer RH, Blatterspiel R & Schiltz E (1982) Glutathione Reductase from Human Erythrocytes. *Eur J Biochem* 121: 259–267
- Kumsta C, Chang JT, Schmalz J & Hansen M (2017) Hormetic heat stress and HSF-1 induce autophagy to improve survival and proteostasis in *C. Elegans*. *Nat Commun* 8: 1–12
- Kundra R, Ciryam P, Morimoto RI, Dobson CM & Vendruscolo M (2017) Protein homeostasis of a metastable subproteome associated with Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E5703–E5711
- Kupsco A & Schlenk D (2015) Chapter One - Oxidative Stress, Unfolded Protein Response, and Apoptosis in Developmental Toxicity. In, Jeon KWBT-IR of C and MB (ed) pp 1–66. Academic Press
- Kutscher LM & Shaham S (2014) Forward and reverse mutagenesis in *C. elegans*. *WormBook*: 1–26
- Kuwahara T, Koyama A, Koyama S, Yoshina S, Ren CH, Kato T, Mitani S & Iwatsubo T (2008) A systematic RNAi screen reveals involvement of endocytic pathway in neuronal dysfunction in α -synuclein transgenic *C. elegans*. *Hum Mol Genet* 17: 2997–3009
- Kuwahara T, Tonegawa R, Ito G, Mitani S & Iwatsubo T (2012) Phosphorylation of α -synuclein protein at ser-129 reduces neuronal dysfunction by lowering its membrane binding property in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 287: 7098–7109
- Kuwajima K (1989) The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 6: 87–103
- Lakso M, Vartiainen S, Moilanen AM, Sirviö J, Thomas JH, Nass R, Blakely RD & Wong G (2003) Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human α -synuclein. *J Neurochem* 86: 165–172
- Lapierre LR, De Magalhaes Filho CD, McQuary PR, Chu CC, Visvikis O, Chang JT, Gelino S, Ong B, Davis AE, Irazoqui JE, *et al* (2013) The TFEB orthologue HLH-30 regulates autophagy and modulates longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* 4: 1–8
- Lazarou M, Jin SM, Kane LA & Youle RJ (2012) Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev Cell* 22: 320–333
- Lee AL, Ung HM, Sands LP & Kikis EA (2017) A new *Caenorhabditis elegans* model of human huntingtin 513 aggregation and toxicity in body wall muscles. *PLoS One* 12: 1–19
- Lees AJ, Hardy J & Revesz T (2009) Parkinson's disease. *Lancet* 373: 2055–2066
- Lefaki M, Papaevgeniou N & Chondrogianni N (2017) Redox regulation of proteasome function. *Redox Biol* 13: 452–458
- Lemasters JJ (2005) Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res* 8: 3–5
- Levinthal C (1968) Are there pathways for protein folding? *J Chim Phys* 65: 44–45

- Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, *et al* (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* (80-) 269: 973–977
- Lewis PA & Manzoni C (2012) LRRK2 and human disease: A complicated question or a question of complexes? *Sci Signal* 5: 6–10
- Libina N, Berman JR & Kenyon C (2003) Tissue-Specific Activities of C. elegans DAF-16 in the Regulation of Lifespan. *Cell* 115: 489–502
- Lieberman AP, Shakkottai VG & Albin RL (2019) Polyglutamine Repeats in Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 14: 1–27
- Lillig CH, Berndt C & Holmgren A (2008) Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1780: 1304–1317
- Lillig CH & Holmgren A (2007) Thioredoxin and related molecules - From biology to health and disease. *Antioxidants Redox Signal* 9: 25–47
- Lin L, Yang P, Huang X, Zhang H, Lu Q & Zhang H (2013) The scaffold protein EPG-7 links cargo-receptor complexes with the autophagic assembly machinery. *J Cell Biol* 201: 113–129
- Lin MT & Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443: 787–795
- Lin XX, Sen I, Janssens GE, Zhou X, Fonslow BR, Edgar D, Stroustrup N, Swoboda P, Yates JR, Ruvkun G, *et al* (2018) DAF-16/FOXO and HLH-30/TFEB function as combinatorial transcription factors to promote stress resistance and longevity. *Nat Commun* 9
- Lindquist SL & Kelly JW (2011) Chemical and biological approaches for adapting proteostasis to ameliorate protein misfolding and aggregation diseases-progress and prognosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: 1–34
- Link CD (1995) Expression of human β -amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9368–9372
- Link CD (2006) C. elegans models of age-associated neurodegenerative diseases: Lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 41: 1007–1013
- Link CD & Johnson CJ (2002) Reporter transgenes for study of oxidant stress in *Caenorhabditis elegans* Elsevier Masson SAS
- Linke K & Jakob U (2003) Not every disulfide lasts forever: Disulfide bond formation as a redox switch. *Antioxidants Redox Signal* 5: 425–434
- Lisa Timmons & Andrew Fire (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395: 854
- Liu JP & Zeitlin SO (2017) Is huntingtin dispensable in the adult brain? *J Huntingtons Dis* 6: 1–17
- Liu Z, Hamamichi S, Lee BD, Yang D, Ray A, Caldwell GA, Caldwell KA, Dawson TM, Smith WW & Dawson VL (2011) Inhibitors of LRRK2 kinase attenuate neurodegeneration and Parkinson-like phenotypes in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* Parkinson's disease models. *Hum Mol Genet* 20: 3933–3942
- Long JM & Holtzman DM (2019) Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* 179: 312–339
- Lu SC (2013) Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1830: 3143–3153
- Lüersen K, Stegehake D, Daniel J, Drescher M, Ajonina I, Ajonina C, Hertel P, Woltersdorf C & Liebau E (2013) The Glutathione Reductase GSR-1 Determines Stress Tolerance and Longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 8: 1–16
- Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, Caspersen C, Chen X,

- Pollak S, Chaney M, *et al* (2004) Aβ Directly Links Aβ to Mitochondrial Toxicity in Alzheimer's Disease. *Science* (80-) 304: 448–452
- MacDonald ME (2003) Huntingtin: alive and well and working in middle management. *Sci STKE* 2003: 14–17
- Malik I, Kelley CP, Wang ET & Todd PK (2021) Molecular mechanisms underlying nucleotide repeat expansion disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22
- Mamipour M, Yousefi M & Hasanzadeh M (2017) An overview on molecular chaperones enhancing solubility of expressed recombinant proteins with correct folding. *Int J Biol Macromol* 102: 367–375
- Mandal PK, Schneider M, Kölle P, Kuhlencordt P, Förster H, Beck H, Bornkamm GW & Conrad M (2010) Loss of thioredoxin reductase 1 renders tumors highly susceptible to pharmacologic glutathione deprivation. *Cancer Res* 70: 9505–9514
- Marinko JT, Huang H, Penn WD, Capra JA, Schleich JP & Sanders CR (2019) Folding and Misfolding of Human Membrane Proteins in Health and Disease : From Single Molecules to Cellular Proteostasis.
- Martina JA, Chen Y, Gucek M & Puertollano R (2012) MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* 8: 903–914
- Martina JA, Diab HI, Brady OA & Puertollano R (2016) TFEB and TFE 3 are novel components of the integrated stress response . *EMBO J* 35: 479–495
- Martina JA, Guerrero-Gómez D, Gómez-Orte E, Antonio Bárcena J, Cabello J, Miranda-Vizuet A & Puertollano R (2021) A conserved cysteine-based redox mechanism sustains TFEB/HLH-30 activity under persistent stress. *EMBO J* 40: 1–23
- Martina JA & Puertollano R (2018) Protein phosphatase 2A stimulates activation of TFEB and TFE3 transcription factors in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 293: 12525–12534
- Marzella L, Ahlberg J & Glaumann H (1981) Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 36: 219–234
- Matsui M, Oshima M, Oshima H, Takaku K, Maruyama T, Yodoi J & Taketo MM (1996) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol* 178: 179–185
- Matthews JR, Wakasugi N, Virelizier J louis, Yodoi J & Hay RT (1992) Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF- κ B by reduction of a disulphid bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res* 20: 3821–3830
- McCull G, Roberts BR, Gunn AP, Perez KA, Tew DJ, Masters CL, Barnham KJ, Cherny RA & Bush AI (2009) The Caenorhabditis elegans Aβ1-42 model of Alzheimer disease predominantly Expresses Aβ 3-42. *J Biol Chem* 284: 22697–22702
- Mccoll G, Roberts BR, Pukala TL, Kenche VB, Roberts CM, Link CD, Ryan TM, Masters CL, Barnham KJ, Bush AI, *et al* (2012) Utility of an improved model of amyloid-beta (Aβ1-42) toxicity in Caenorhabditis elegans for drug screening for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 7: 1–9
- Melber A & Haynes CM (2018) UPR mt regulation and output: A stress response mediated by mitochondrial-nuclear communication. *Cell Res* 28: 281–295
- Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, Eskelinen EL, Hall DH & Levine B (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in C. elegans. *Science* (80-) 301: 1387–1391
- Meng J, Fu L, Liu K, Tian C, Wu Z, Jung Y, Ferreira RB, Carroll KS, Blackwell TK &

- Yang J (2021) Global profiling of distinct cysteine redox forms reveals wide-ranging redox regulation in *C. elegans*. *Nat Commun* 12: 1–13
- Milakovic T & Johnson GVW (2005) Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *J Biol Chem* 280: 30773–30782
- Miranda-Vizueté A, Dandimopoulos AE, Pedrajas JR, Gustafsson JÅ & Spyrou G (1999) Human mitochondrial thioredoxin reductase. cDNA cloning, expression and genomic organization. *Eur J Biochem* 261: 405–412
- Miranda-Vizueté A, Sadek CM, Jiménez A, Krause WJ, Sutovsky P & Oko R (2004) The mammalian testis-specific thioredoxin system. *Antioxid Redox Signal* 6: 25–40
- Miseta A & Csutora P (2000) Relationship between the occurrence of cysteine in proteins and the complexity of organisms. *Mol Biol Evol* 17: 1232–1239
- Moldogazieva NT, Mokhosoev IM, Feldman NB & Lutsenko S V. (2018) ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. *Free Radic Res* 52: 507–543
- Mora-Lorca JA, Sáenz-Narciso B, Gaffney CJ, Naranjo-Galindo FJ, Pedrajas JR, Guerrero-Gómez D, Dobrzynska A, Askjaer P, Szewczyk NJ, Cabello J, *et al* (2016) Glutathione reductase *gsr-1* is an essential gene required for *Caenorhabditis elegans* early embryonic development. *Free Radic Biol Med* 96: 446–461
- Morimoto RI (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: Cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12: 3788–3796
- Morley JF, Brignull HR, Weyers JJ & Morimoto RI (2002) The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10417–10422
- Morley JF & Morimoto RI (2004) Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell* 15: 657–664
- Moronetti Mazzeo LE, Dersh D, Boccitto M, Kalb RG & Lamitina T (2012) Stress and aging induce distinct polyQ protein aggregation states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 10587–10592
- Morton EA & Lamitina T (2013) *Caenorhabditis elegans* HSF-1 is an essential nuclear protein that forms stress granule-like structures following heat shock. *Aging Cell* 12: 112–120
- Moustapha A (2020) Neurodegenerative Diseases: Potential Effect of Glutathione. *Glutathione Syst Oxidative Stress Heal Dis*
- Muñoz-Lobato F, Rodríguez-Palero MJ, Naranjo-Galindo FJ, Shephard F, Gaffney CJ, Szewczyk NJ, Hamamichi S, Caldwell KA, Caldwell GA, Link CD, *et al* (2014) Protective Role of DNJ-27/ERdj5 in *Caenorhabditis elegans* models of human neurodegenerative diseases. *Antioxidants Redox Signal* 20: 217–235
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417: 1–13
- Murphy MP (2012) Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: Distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. *Antioxidants Redox Signal* 16: 476–495
- Musiani F, Ciurli S & Dikiy A (2011) Interaction of selenoprotein W with 14-3-3 proteins: a computational approach. *J Proteome Res* 10: 968–976
- Nandi A, Yan LJ, Jana CK & Das N (2019) Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2019

- Nargund AM, Fiorese CJ, Pellegrino MW, Deng P & Haynes CM (2015) Mitochondrial and nuclear accumulation of the transcription factor ATFS-1 promotes OXPHOS recovery during the UPR(mt). *Mol Cell* 58: 123–133
- Nargund AM, Pellegrino MW, Fiorese CJ, Baker BM & Haynes CM (2012) Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation. *Science* 337: 587–590
- Naruse S, Thinakaran G, Luo JJ, Kusiak JW, Tomita T, Iwatsubo T, Qian X, Ginty DD, Price DL, Borchelt DR, *et al* (1998) Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* 21: 1213–1221
- Nonn L, Williams RR, Erickson RP & Powis G (2003) The Absence of Mitochondrial Thioredoxin 2 Causes Massive Apoptosis, Exencephaly, and Early Embryonic Lethality in Homozygous Mice. *Mol Cell Biol* 23: 916–922
- Nunan J & Small DH (2000) Regulation of APP cleavage by α -, β - and γ -secretases. *FEBS Lett* 483: 6–10
- Nuytemans K, Theuns J, Cruts M & Van Broeckhoven C (2010) Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: A mutation update. *Hum Mutat* 31: 763–780
- O'Rourke EJ & Ruvkun G (2013) MXL-3 and HLH-30 transcriptionally link lipolysis and autophagy to nutrient availability. *Nat Cell Biol* 15: 668–676
- Ochaba J, Lukacsovich T, Csikos G, Zheng S, Margulis J, Salazar L, Mao K, Lau AL, Yeung SY, Humbert S, *et al* (2014) Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 16889–16894
- Olanow CW, Kiebertz K & Schapira AHV (2008) Why have we failed to achieve neuroprotection in Parkinson's disease? *Ann Neurol* 64: 101–110
- Oliveras-Salvá M, Macchi F, Coessens V, Deleersnijder A, Gérard M, Van der Perren A, Van den Haute C & Baekelandt V (2014) Alpha-synuclein-induced neurodegeneration is exacerbated in PINK1 knockout mice. *Neurobiol Aging* 35: 2625–2636
- Olsson F, Schmidt S, Althoff V, Munter LM, Jin S, Rosqvist S, Lendahl U, Multhaup G & Lundkvist J (2014) Characterization of intermediate steps in amyloid beta (A β) production under near-native conditions. *J Biol Chem* 289: 1540–1550
- Orr HT & Zoghbi HY (2007) Trinucleotide repeat disorders. *Annu Rev Neurosci* 30: 575–621
- Ouyang W, Liao W, Luo CT, Yin N, Huse M, Kim M V, Peng M, Chan P, Ma Q, Mo Y, *et al* (2012) Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function. *Nature* 491: 554–559
- Packer L, Weber SU & Rimbach G (2001) Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J Nutr* 131: 369S–73S
- Paik J, Ding Z, Narurkar R, Ramkissoon S, Muller F, Kamoun WS, Chae S-S, Zheng H, Ying H, Mahoney J, *et al* (2009) FoxOs cooperatively regulate diverse pathways governing neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell* 5: 540–553
- Pajares M, Jiménez-Moreno N, Dias IHK, Debelec B, Vucetic M, Fladmark KE, Basaga H, Ribaric S, Milisav I & Cuadrado A (2015) Redox control of protein degradation. *Redox Biol* 6: 409–420
- Palikaras K, Lionaki E & Tavernarakis N (2015a) Coupling mitogenesis and mitophagy for longevity. *Autophagy* 11: 1428–1430
- Palikaras K, Lionaki E & Tavernarakis N (2015b) Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature* 521: 525–528
- Palmieri M, Impey S, Kang H, di Ronza A, Pelz C, Sardiello M & Ballabio A (2011) Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular

- clearance pathways. *Hum Mol Genet* 20: 3852–3866
- Palmisano NJ & Meléndez A (2016) Detecting autophagy in *Caenorhabditis elegans* embryos using markers of P granule degradation. *Cold Spring Harb Protoc* 2016: 75–80
- Papaevgeniou N & Chondrogianni N (2014) The ubiquitin proteasome system in *Caenorhabditis elegans* and its regulation. *Redox Biol* 2: 333–347
- Parker JA, Connolly JB, Wellington C, Hayden M, Dausset J & Neri C (2001) Expanded polyglutamines in *Caenorhabditis elegans* cause axonal abnormalities and severe dysfunction of PLM mechanosensory neurons without cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13318–13323
- Parzych KR & Klionsky DJ (2014) An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants Redox Signal* 20: 460–473
- Passer BJ, Pellegrini L, Vito P, Ganjei JK & D'Adamio L (1999) Interaction of Alzheimer's presenilin-1 and presenilin-2 with Bcl-X(L). A potential role in modulating the threshold of cell death. *J Biol Chem* 274: 24007–24013
- Paulson HL (1999) Human genetics '99: Trinucleotide repeats. Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: Polyglutamine diseases join the (Mis)fold. *Am J Hum Genet* 64: 339–345
- Van Pelt KM & Truttmann MC (2020) *Caenorhabditis elegans* as a model system for studying aging-associated neurodegenerative diseases. *Transl Med Aging* 4: 60–72
- Penney Jr JB, Vonsattel J-P, Macdonald ME, Gusella JF & Myers RH (1997) CAG repeat number governs the development rate of pathology in Huntington's disease. *Ann Neurol* 41: 689–692
- Pérez VI, Buffenstein R, Masamsetti V, Leonard S, Salmon AB, Mele J, Andziak B, Yang T, Edrey Y, Friguet B, *et al* (2009) Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3059–3064
- Perri ER, Thomas CJ, Parakh S, Spencer DM & Atkin JD (2016) The unfolded protein response and the role of protein disulfide isomerase in neurodegeneration. *Front Cell Dev Biol* 3: 1–17
- Perrin R, Briançon S, Jeandel C, Artur Y, Minn A, Penin F & Siest G (1990) Blood activity of Cu/Zn superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in Alzheimer's disease: a case-control study. *Gerontology* 36: 306–313
- Peters J-M, Cejka Z, Harris JR, Kleinschmidt JA & Baumeister W (1993) Structural Features of the 26 S Proteasome Complex. [PREPRINT]
- Pickles S, Vigié P & Youle RJ (2018) Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol* 28: R170–R185
- Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, Schrag AE & Lang AE (2017) Parkinson disease. *Nat Rev Dis Prim* 3: 1–21
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, *et al* (1997) Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science (80-)* 276: 2045–2047
- Powers ET & Balch WE (2013) Diversity in the origins of proteostasis networks--a driver for protein function in evolution. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 237–248
- Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW & Balch WE (2009) Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem* 78: 959–991
- Prahlad V & Morimoto RI (2009) Integrating the stress response: lessons for neurodegenerative diseases from *C. elegans*. *Trends Cell Biol* 19: 52–61
- Proneth B & Conrad M (2019) Ferroptosis and necroinflammation, a yet poorly

- explored link. *Cell Death Differ* 26: 14–24
- Przedborski S, Donaldson DM, Murphy PL, Hirsch O, Lange D, Naini AB, McKenna-Yasek D & Brown RHJ (1996) Blood superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener a J Neurodegener Disord neuroprotection, neuroregeneration* 5: 57–64
- Raizen DM, Lee RY & Avery L (1995) Interacting genes required for pharyngeal excitation by motor neuron MC in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 141: 1365–82
- Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J, *et al* (2006) Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 38: 1184–1191
- Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K & Youdim MB (1989) Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J Neurochem* 52: 515–520
- Roczniak-Ferguson A, Petit CS, Froehlich F, Qian S, Ky J, Angarola B, Walther TC & Ferguson SM (2012) The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci Signal* 5: ra42
- Roder H (1995) Watching protein folding unfold. *Nat Struct Biol* 2: 817–820
- Roder H, Elöve GA & Englander SW (1988) Structural characterization of folding intermediates in cytochrome c by H-exchange labelling and proton NMR. *Nature* 335: 700–704
- Rogalski TM, Gilchrist EJ, Mullen GP & Moerman DG (1995) *W a l l*. 169: 159–169
- Rogers LK, Tamura T, Rogers BJ, Welty SE, Hansen TN & Smith C V. (2004) Analyses of glutathione reductase hypomorphic mice indicate a genetic knockout. *Toxicol Sci* 82: 367–373
- Ron D & Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519–529
- Ross CA & Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10: S10
- Roy S, Zhang B, Lee VMY & Trojanowski JQ (2005) Axonal transport defects: A common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol* 109: 5–13
- Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, Wollman E & Sitia R (1992) Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *J Biol Chem* 267: 24161–24164
- Runkel ED, Liu S, Baumeister R & Schulze E (2013) Surveillance-activated defenses block the ROS-induced mitochondrial unfolded protein response. *PLoS Genet* 9: e1003346
- Saido TC, Iwatsubo T, Mann DMA, Shimada H, Ihara Y & Kawashima S (1995) Dominant and differential deposition of distinct β -amyloid peptide species, A β N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 14: 457–466
- Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K & Ichijo H (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 17: 2596–2606
- Samokhvalov V, Scott BA & Crowder CM (2008) Autophagy protects against hypoxic injury in *C. elegans*. *Autophagy* 4: 1034–1041
- Sanyal S, Wintle RF, Kindt KS, Nuttley WM, Arvan R, Fitzmaurice P, Bigras E, Merzs DC, Hébert TE, Van Der Kooy D, *et al* (2004) Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 23: 473–482

- Satyal SH, Schmidt E, Kitagawa K, Sondheimer N, Lindquist S, Kramer JM & Morimoto RI (2000) Polyglutamine aggregates alter protein folding homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5750–5755
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Alberts MJ, Crain B, Goldgaber D & Roses AD (1993) Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. 09463: 426–430
- Sbodio JI, Snyder SH & Paul BD (2019) Redox Mechanisms in Neurodegeneration: From Disease Outcomes to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants Redox Signal* 30: 1450–1499
- Schenk H, Vogt M, Dröge W & Schulze-Osthoff K (1996) Thioredoxin as a potent costimulus of cytokine expression. *J Immunol* 156: 765–771
- Schneider CA, Rasband WS & Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671–675
- Schneider LS, Mangialasche F, Andreassen N, Feldman H, Giacobini E, Jones R, Mantua V, Mecocci P, Pani L, Winblad B, *et al* (2014) Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: An appraisal from 1984 to 2014. *J Intern Med* 275: 251–283
- Segref A, Torres S & Hoppe T (2011) A screenable in vivo assay to study proteostasis networks in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 187: 1235–1240
- Senchuk MM, Dues DJ, Schaar CE, Johnson BK, Madaj ZB, Bowman MJ, Winn ME & Van Raamsdonk JM (2018) Activation of DAF-16/FOXO by reactive oxygen species contributes to longevity in long-lived mitochondrial mutants in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 14: 1–27
- Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, *et al* (2011) TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* 332: 1429–1433
- Shefa U, Jeong NY, Song IO, Chung HJ, Kim D, Jung J & Huh Y (2019) Mitophagy links oxidative stress conditions and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 14: 749–756
- Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller AF, Teixeira M & Valentine JS (2014) Superoxide dismutases and superoxide reductases. *Chem Rev* 114: 3854–3918
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, *et al* (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754–760
- Shi ZZ, Osei-Frimpong J, Kala G, Kala S V., Barrios RJ, Habib GM, Lukin DJ, Danney CM, Matzuk MM & Lieberman MW (2000) Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5101–5106
- Shiels A & Hejtmancik JF (2019) Biology of Inherited Cataracts and Opportunities for Treatment. *Annu Rev Vis Sci* 5: 123–149
- Shimura H, Hattori N, Kubo SI, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, *et al* (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25: 302–305
- Shpilka T & Haynes CM (2018) The mitochondrial UPR: Mechanisms, physiological functions and implications in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 109–120
- Singh A, Kukreti R, Saso L & Kukreti S (2019) Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules* 24: 1–20
- Singh U, Devaraj S & Jialal I (2005) Vitamin E, oxidative stress, and inflammation.

- Annu Rev Nutr* 25: 151–174
- Singleton A, Myers A & Hardy J (2004) The law of mass action applied to neurodegenerative disease: A hypothesis concerning the etiology and pathogenesis of complex diseases. *Hum Mol Genet* 13: 123–126
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, *et al* (2003) α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science* (80-) 302: 841
- Sirangelo I & Iannuzzi C (2017) The role of metal binding in the amyotrophic lateral sclerosis-related aggregation of copper-zinc superoxide dismutase. *Molecules* 22: 1–13
- Smith HL & Mallucci GR (2016) The unfolded protein response: Mechanisms and therapy of neurodegeneration. *Brain* 139: 2113–2121
- Snell RG, Macmillan JC, Cheadle JP, Fenton I, Lazarou LP, Davies P, Macdonald ME, Gusella JF, Harper PS & Shaw DJ (1993) Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet* 4: 393–397
- Sofic E, Lange KW, Jellinger K & Riederer P (1992) Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 142: 128–130
- Stenvall J, Fierro-González JC, Swoboda P, Saamarthy K, Cheng Q, Cacho-Valadez B, Arnér ESJ, Persson OP, Miranda-Vizuete A & Tuck S (2011) Selenoprotein TRXR-1 and GSR-1 are essential for removal of old cuticle during molting in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 1064–1069
- Stewart R (1998) Cardiovascular factors in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg & Psychiatry* 65: 143 LP – 147
- Strooper BDE (2021) Proteases and Proteolysis in Alzheimer Disease : A Multifactorial View on the Disease Process. 465–494
- Sulston J, Dew M & Brenner S (1975) Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Neurol* 163: 215–226
- Sulston JE & Horvitz HR (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56: 110–156
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG & Thomson JN (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100: 64–119
- Suvorova ES, Lucas O, Weisend CM, Rollins MCF, Merrill GF, Capecchi MR & Schmidt EE (2009) Cytoprotective Nrf2 pathway is induced in chronically Txnrd 1-deficient hepatocytes. *PLoS One* 4
- Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Hayakawa Y & Minagawa H (2009) Identification of the clonal complexes of *Staphylococcus aureus* strains by determination of the conservation patterns of small genomic islets. *J Appl Microbiol* 107: 1367–1374
- Sweeney MD, Kisler K, Montagne A, Toga AW & Zlokovic B V. (2018) The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci* 21: 1318–1331
- Tatum MC, Ooi FK, Chikka MR, Chauve L, Martinez-Velazquez LA, Steinbusch HWM, Morimoto RI & Prahlad V (2015) Neuronal serotonin release triggers the heat shock response in *C. elegans* in the absence of temperature increase. *Curr Biol* 25: 163–174
- Teixeira-Castro A, Ailion M, Jalles A, Brignull HR, Vilacã JL, Dias N, Rodrigues P, Oliveira JF, Neves-Carvalho A, Morimoto RI, *et al* (2011) Neuron-specific proteotoxicity of mutant ataxin-3 in *C. elegans*: Rescue by the DAF-16 and HSF-1 pathways. *Hum Mol Genet* 20: 2996–3009

- Tian Y, Li Z, Hu W, Ren H, Tian E, Zhao Y, Lu Q, Huang X, Yang P, Li X, *et al* (2010) *C. elegans* Screen Identifies Autophagy Genes Specific to Multicellular Organisms. *Cell* 141: 1042–1055
- Todd TW & Lim J (2013) Aggregation formation in the polyglutamine diseases: Protection at a cost? *Mol Cells* 36: 185–194
- Torvard C, Laurent, Moore EC & Reichard P (1964) Synthesis of Deoxyribonucleotides. *October* 239: 3436–3444
- Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, McDowell EP, Lazo-Kallanian S, Williams IR, Sears C, *et al* (2007) FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. *Cell* 128: 325–339
- Townsend DM, Tew KD & Tapiero H (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 57: 145–155
- Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJJ, DiStefano PS, Chiang LW & Greenberg ME (2002) DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* 296: 530–534
- Treusch S, Cyr DM & Lindquist S (2009) Amyloid deposits: protection against toxic protein species? *Cell Cycle* 8: 1668–1674
- Treusch S, Hamamichi S, Goodman JL, Matlack KES, Chung CY, Baru V, Shulman JM, Parrado A, Bevis BJ, Valastyan JS, *et al* (2011) Functional links between A β toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science* (80-) 334: 1241–1245
- Tu BP & Weissman JS (2004) Oxidative protein folding in eukaryotes: Mechanisms and consequences. *J Cell Biol* 164: 341–346
- Turano C, Coppari S, Altieri F & Ferraro A (2002) Proteins of the PDI family: Unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol* 193: 154–163
- Udgaonkar JB & Baldwin RL (1988) NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A. *Nature* 335: 694–699
- Urban N, Tsitsipatis D, Hausig F, Kreuzer K, Erler K, Stein V, Ristow M, Steinbrenner H & Klotz LO (2017) Non-linear impact of glutathione depletion on *C. elegans* life span and stress resistance. *Redox Biol* 11: 502–515
- Visvikis O, Ihuegbu N, Labeled SA, Luhachack LG, Alves AMF, Wollenberg AC, Stuart LM, Stormo GD & Irazoqui JE (2014) Innate host defense requires TFEB-mediated transcription of cytoprotective and antimicrobial genes. *Immunity* 40: 896–909
- Wang X & Michaelis EK (2010) Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci* 2: 1–13
- Wang X, Su B, Siedlak SL, Moreira PI, Fujioka H, Wang Y, Casadesus G & Zhu X (2008) Amyloid- β overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19318–19323
- Wang Y, Liu N & Lu B (2019) Mechanisms and roles of mitophagy in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci Ther* 25: 859–875
- Wani R, Nagata A & Murray BW (2014) Protein redox chemistry: Post-translational cysteine modifications that regulate signal transduction and drug pharmacology. *Front Pharmacol* 5: 1–8
- Webb AE, Kundaje A & Brunet A (2016) Characterization of the direct targets of FOXO transcription factors throughout evolution. *Aging Cell* 15: 673–685
- Weber JJ, Sowa AS, Binder T & Hübener J (2014) From pathways to targets: Understanding the mechanisms behind polyglutamine disease. *Biomed Res Int*

2014

- Wells WW, Xu DP, Yang Y & Rocque PA (1990) Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J Biol Chem* 265: 15361–15364
- Wilkinson B & Gilbert HF (2004) Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1699: 35–44
- Wisniewski KE, Wisniewski HM & Wen GY (1985) Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol* 17: 278–282
- Witte S, Villalba M, Bi K, Liu Y, Isakov N & Altman A (2000) Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF- κ B pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain. *J Biol Chem* 275: 1902–1909
- Wong YC & Holzbaur ELF (2014) The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation. *J Neurosci* 34: 1293–1305
- Wood ZA, Schröder E, Harris JR & Poole LB (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28: 32–40
- Wu Y, Wu Z, Butko P, Christen Y, Lambert MP, Klein WL, Link CD & Luo Y (2006) Amyloid- β -induced pathological behaviors are suppressed by Ginkgo biloba extract EGB 761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 26: 13102–13113
- Xiong Y, Uys JD, Tew KD & Townsend DM (2011) S-Glutathionylation: From molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxidants Redox Signal* 15: 233–270
- Yang Z & Klionsky DJ (2009) An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 335: 1–32
- Yatin SM, Varadarajan S, Link CD & Butterfield DA (1999) In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1–42). *Neurobiol Aging* 20: 325–342
- Yoneda T, Benedetti C, Urano F, Clark SG, Harding HP & Ron D (2004) Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *J Cell Sci* 117: 4055–4066
- Yorimitsu T & Klionsky DJ (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12: 1542–1552
- Zarkower D (2006) Somatic sex determination. *WormBook*: 1–12
- Zhang G, Lin L, Qi D & Zhang H (2017) The composition of a protein aggregate modulates the specificity and efficiency of its autophagic degradation. *Autophagy* 13: 1487–1495
- Zhang H, Chang JT, Guo B, Hansen M, Jia K, Ková AL, Kumsta C, Lapierre LR, Legouis R, Lin L, *et al* (2015) Guidelines for monitoring autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* 11: 9–27
- Zhang Y, Yan L, Zhou Z, Yang P, Tian E, Zhang K, Zhao Y, Li Z, Song B, Han J, *et al* (2009) SEPA-1 Mediates the Specific Recognition and Degradation of P Granule Components by Autophagy in *C. elegans*. *Cell* 136: 308–321
- Zhang Z, Zhang L, Zhou L, Lei Y, Zhang Y & Huang C (2019) Redox signaling and unfolded protein response coordinate cell fate decisions under ER stress. *Redox Biol* 25
- Zhao Q, Wang J, Levichkin I V., Stasinopoulos S, Ryan MT & Hoogenraad NJ (2002) A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J* 21: 4411–4419

Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF & Voellmy R (1998) Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94: 471–480