



Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

**Modelos de ataxia de Friedreich en *Drosophila*:
identificación de candidatos terapéuticos y
caracterización de un modelo portador de las
repeticiones GAA**

TESIS DOCTORAL

Pablo Calap Quintana

Trabajo dirigido por:

María Dolores Moltó Ruíz y José Vicente Llorens Llorens

Septiembre 2018

Doña **María Dolores Moltó Ruíz**, Profesora titular del Dpto. de Genética de la Universitat de València

Don **José Vicente Llorens Llorens**, Dr. Titulado superior del Dpto. de Genética de la Universitat de València

INFORMAN:

Que **Don Pablo Calap Quintana** ha realizado bajo su dirección el presente trabajo recogido en la memoria titulada “**Modelos de ataxia de Friedreich en *Drosophila*: identificación de candidatos terapéuticos y caracterización de un modelo portador de las repeticiones GAA**”, y consideran que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia dentro del Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 31 de mayo de 2018.

Fdo. Dra. María Dolores Moltó Ruíz

Fdo. Dr. José Vicente Llorens Llorens

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado gracias a la financiación del programa VALi+d de la Generalitat Valenciana.

Los experimentos han sido financiados por los proyectos:

Consorci de Recerca Integrativa de l'Atàxia de Friedreich: Aproximació Fisiopatològica i Terepèutica (FAIR), financiado por Fundació La Marató de TV3, y

European Friedreich's Ataxia Consortium for Translational Studies (EFACTS), financiado por la Comunidad Económica Europea.



AGRADECIMIENTOS

Aun cuando cada hombre es el responsable último de sus decisiones y acciones, uno nunca debe olvidar que nadie recorre solo este camino, y que tenemos mucho que agradecer a todos aquellos que alguna vez nos han aconsejado, apoyado o simplemente acompañado. Ahora que termina esta etapa y nuevas metas se presentan delante, es un buen momento para recordar y dar gracias a tanta gente que ha hecho posible esta tesis.

Por supuesto tendría que empezar por mis padres, que han sido un apoyo constante este tiempo. Además, fue probablemente el consejo de mi padre de colaborar con alguno de los departamentos lo que tuvo un gran peso en el comienzo de esta aventura y me ayudó a encaminar mis pasos.

También fue muy importante para decidir hacia donde dirigir mi trabajo Lluís Pascual. Sin duda sus clases fueron de las que más he disfrutado en la carrera y las que me hicieron decidirme a intentar colaborar en el Departamento de Genética. Ya como colaborador en la línea de Genética Molecular y Humana, siempre me sentí acogido y como uno más en la que durante bastantes años sería mi segunda casa. Mis directores Loli y Josep, María José, Noe, Javi y Sirena siempre estuvieron dispuestos a echarme una mano cuando hiciese falta. También tendría que recordar a muchos que pasaron por el laboratorio como colaboradores, de prácticas y demás. Nunca he tenido buena memoria para los nombres, pero no puedo olvidarme de Carmen, Ana Rosa, Rocio y Lucia, con las que he compartido tantas horas.

También tengo mucho que agradecer a otros compañeros del Departamento como Nuria, Javi, Jose Carlos, Paco...la lista sería muy larga y a todos ellos les debo más de una por las veces que me han facilitado las cosas o solucionado algún problema. Sin que sirva de agravio para los demás, tengo que hacer mención especial a Fede, cuya profesionalidad y atención al detalle es una inspiración para el resto.

A muchos otros tendría que mencionar aquí, pero no soy de los que se extienden mucho. Pero desde luego no olvidaré los momentos compartidos los últimos años con quien ha dejado una imborrable huella que quedará para siempre en mi memoria.

ABREVIATURAS

A continuación, se citan aquellas abreviaturas que son utilizadas más de una vez en diferentes apartados o subapartados del texto:

Ac76E: *Adenylyl cyclase 76E*

actin: *Actin 5C*

AKT: *Protein kinase B, PKB*

AMPK: *AMP-activated protein kinase*

ATP: *adenosine triphosphate*

BCS: *bathocuproine disulfonate*

BDSC: *Bloomington Drosophila Stock Center*

Cat: *Catalase*

cDNA: *complementary DNA*

cnc: *cap-n-collar*

CpG: *citósina-fosfoguanina*

CTCF: *CCCTC-binding factor*

DMSO: *dimetilsulfóxido*

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

DNasa I: *Desoxirribonucleasa I*

DNMT: *DNA methyltransferase*

dsRNAs: *double-strand RNA*

E(z): *Enhancer of zeste*

eGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*

eIF4E1: *eukaryotic translation initiation factor 4E1*

Eno: *Enolase*

FAST1: *frataxin antisense transcript 1*

fh: *frataxin homolog*

foxo: *forkhead box, sub-group O*

FRDA: *ataxia de Friedreich*

FXN: *frataxin*

Gclc: *Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit*

gDNA: *genomic DNA*

GFP: *Green Fluorescent Protein*

GSH: *glutación*

GSK3 β : *glycogen synthase kinase 3b*

GstD1: *Glutathione S transferase D1*

HAE: *hidroxialquenes*

HDAC1: *Histone deacetylase 1*

HP1: *heterocromatin protein 1*

Keap1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*

LC3: *MAP1LC3B (microtubule associated protein 1 light chain 3 beta)*

Luc: *gen codificante de la luciferasa de luciérnaga*

MDA: *malondialdehído*

mLST8: *mammalian lethal with sec13 protein 8*

mRNA: *messenger RNA*

mTOR: *mechanistic target of rapamycin*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NLaz: *Neural Lazarillo*

nos: *nanos*

Nrf1: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 1*

Nrf2: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

p53: *cellular tumor antigen p53*

pb: *pares de bases*

PBS: *Phosphate-Buffered Saline*

PEV: *position effect variegation*

PGC1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*

PIP5K1B: *phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type 1 beta*
PPAR γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
PRAS40: *proline-rich Akt substrate of 40 kDa*
PRKACG: *protein kinase cAMP-activated catalytic subunit gamma*
Prx3: *Peroxiredoxin 3*
Raptor: *regulator-associated protein of the mammalian target of rapamycin*
RFeSP: *Rieske iron-sulfur protein*
Rheb: *Ras homolog enriched in brain*
Rictor: *rapamycin-insensitive companion of mTOR*
RLuc: *gen codificante de la luciferasa de renilla*
RNA: *Ribonucleic acid*
RNAi: *RNA interference*
RNAPII: *RNA polymerase II*
ROS: *reactive oxygen species*
Rp49: *Ribosomal protein 49*
RTKs: *receptor tyrosine kinases*
S6k: *ribosomal protein S6 kinase*

Sesn: *Sestrin*
Sod1: *Superoxide dismutase 1*
Sod2: *Superoxide dismutase 2 (Mn)*
Su(var)2-5: *Suppressor of variegation 205*
Su(var)3-9: *Suppressor of variegation 3-9*
TJP2: *tight junction protein 2*
TORC1: *mTOR complex 1*
TORC2: *mTOR complex 2*
TPEN: *N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine*
TSC1/2: *Tuberous sclerosis 1/2*
TTM: *tetrathiomolybdate*
UAS: *Upstream Activation Sequences*
VPS34: *vacuolar protein sorting 34*
wry: *weary.*
Z. A. dihidrato: *zinc acetato dihidrato*
 α -Tub: *α -Tubulin at 84B*
3-MA: *3-metiladenina*
4E-BP: *eIF4E-binding protein*
5hmC: *5'-hidroximetilcitosina*
5mC: *5'-metilcitosina*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1 La ataxia de Friedreich	3
1.1 Clínica de la enfermedad.....	4
1.2 Estructura y regulación del gen <i>FXN</i>	6
1.3 Tipos de alelos del gen <i>FXN</i> e influencia sobre el fenotipo.....	9
1.4 Mecanismos de inhibición de la expresión de <i>FXN</i>	11
1.4.1 Formación de estructuras de DNA no-B.....	12
1.4.2 Silenciamiento epigenético.....	12
1.5 La proteína frataxina	15
1.5.1 Estructura y procesado de frataxina.....	15
1.5.2 Función de la proteína frataxina	17
1.5.3 Patología molecular.....	19
2 Aproximaciones terapéuticas en la ataxia de Friedreich	22
2.1 Incremento de la función mitocondrial y utilización de antioxidantes	22
2.2 Quelantes de hierro	23
2.3 Aumento de los niveles de frataxina	23
2.4 Modificadores epigenéticos.....	24
2.5 Terapia génica	24
3 Modelos animales en la ataxia de Friedreich	26
3.1 Modelos en ratón.....	26
3.2 Modelos en <i>Drosophila</i>	27
4 Regulación y funciones de la proteína mTOR	31
4.1 Componentes de los complejos TORC.....	31
4.2 Regulación de TORC1	33
4.2.1 Señalización por factores de crecimiento/PI3K.....	33
4.2.2 Aminoácidos.....	34
4.2.3 Energía celular.....	35
4.2.4 Nivel de oxígeno	35
4.2.5 Estrés osmótico	35
4.2.6 Estrés oxidativo	36
4.2.7 Daño en el DNA.....	36
4.3 Procesos regulados por TORC1	37
4.3.1 Síntesis de proteínas	38

4.3.2	Autofagia.....	40
4.3.3	Biogénesis mitocondrial.....	42
4.3.4	Actividad de otros factores de transcripción.....	43
4.4	Regulación y funciones de TORC2.....	45
4.5	Señalización de mTOR en enfermedades neurodegenerativas.....	45
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....		47
MATERIAL Y MÉTODOS.....		51
1	Organismos utilizados.....	53
1.1	Cepas de <i>D. melanogaster</i>	53
1.2	Líneas celulares.....	57
2	Condiciones de cultivo y tratamientos en <i>D. melanogaster</i>.....	57
2.1	Condiciones y medios de cultivo.....	57
2.2	Selección de los compuestos y determinación de las concentraciones utilizadas.....	58
3	Cultivo y tratamiento de las líneas celulares.....	60
3.1	Cultivo y tratamiento en células SH-SY5Y.....	60
3.2	Cultivo de células S2.....	61
4	Ensayo de la capacidad motora.....	61
5	Ensayo de la supervivencia y medición de la duración del desarrollo.....	61
6	Cuantificación de la señal LC3-eGFP.....	62
6.1	Condiciones de cultivo.....	62
6.2	Extracción y fotografía del cuerpo graso.....	62
6.3	Análisis de las imágenes y cuantificación de los puntos LC3-eGFP.....	62
7	Ensayos bioquímicos.....	63
7.1	Medición de la concentración de malondialdehído + hidroxialquenos.....	63
7.2	Medición de la concentración total de glutatión.....	65
7.3	Medición de la actividad aconitasa en hiperoxia.....	66
7.4	Medición del nivel de ATP.....	67
7.5	Ensayo de la actividad luciferasa de luciérnaga/renilla.....	69
7.5.1	Obtención de la muestra en <i>D. melanogaster</i>	69
7.5.2	Ensayo de luciferasa.....	69
7.5.3	Normalización de las medidas de luminiscencia.....	69
7.5.4	Ensayo de luciferasa en células S2.....	70
8	PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR).....	70
8.1	Diseño de primers.....	70

8.2	Extracción de RNA total	72
8.3	Transcripción inversa	72
8.4	Reacción de PCR cuantitativa	72
8.5	Análisis de los resultados	73
9	Análisis de la localización celular de las proteínas Cnc y FOXO.....	74
9.1	Extracción de la fracción total y nuclear	74
9.2	Medición de la fluorescencia y cálculo de la ratio señal nuclear/total.....	75
10	Detección de las proteínas P-S6 y P-AKT mediante <i>western blot</i>.....	75
10.1	Anticuerpos	75
10.2	Extracción de proteína total de cultivos celulares	75
10.3	Electroforesis en gel desnaturalizante de tricina y transferencia	76
10.4	Incubación con anticuerpos y detección	77
11	Ensayo de viabilidad celular	77
12	Medición del radical superóxido.....	78
13	Extracción de DNA genómico	79
14	Reacciones de PCR estándar.....	80
14.1	Primers utilizados.....	80
14.2	Reacciones de PCR y condiciones de amplificación	81
15	Ensayo de accesibilidad de Desoxiribonucleasa I.....	82
15.1	Obtención de la muestra y tratamiento con Desoxiribonucleasa I (DNasa I)	82
15.2	Extracción del DNA tratado	83
15.3	Cuantificación mediante qPCR del gDNA tratado	83
16	Análisis de metilación del DNA.....	84
16.1	Conversión de citosinas no metiladas por bisulfito sódico.....	84
16.2	Amplificación de la región aguas arriba y aguas abajo de las repeticiones GAA.....	85
16.3	Secuenciación y análisis.....	85
17	Análisis estadístico	86
	RESULTADOS	87
1	Identificación de compuestos y nuevas dianas para el tratamiento de la ataxia de Friedreich utilizando un modelo de la enfermedad desarrollado en <i>D. melanogaster</i> .	89
1.1	Rastreo piloto de compuestos.....	89
1.2	Efecto de la modulación por rapamicina de TORC1 en la capacidad motora y la supervivencia de los individuos <i>fhRNAi</i>	92
1.3	Rapamicina protege a los individuos <i>fhRNAi</i> frente al estrés oxidativo.	96

1.4	Rapamicina incrementa el nivel de ATP a través de 4E-BP.....	105
1.5	El efecto de la rapamicina sobre la capacidad motora es mediado por S6K y 4E-BP.	108
1.6	La inducción de autofagia interviene en el aumento de la supervivencia producido por la rapamicina.	110
1.7	Inhibición de la actividad de mTOR en un modelo de FRDA en células SH-SY5Y.....	111
1.8	Efecto de la inhibición de TORC1 y TORC2 en el nivel de ATP y estrés oxidativo en el modelo celular humano de FRDA.....	113
2	Caracterización de un modelo en <i>D. melanogaster</i> portador de la expansión del trinucleótido GAA	116
2.1	Descripción de las construcciones creadas para obtener el modelo.....	116
2.2	Medida de la actividad luciferasa en las líneas originales	117
2.3	Obtención del modelo completo de repeticiones GAA	119
2.4	Expresión de las luciferasas en el modelo	123
2.5	Estudio de la compactación de la construcción portadora de las repeticiones GAA	124
2.6	Análisis de la metilación del DNA en regiones próximas a las repeticiones GAA	129
2.7	Rastreo piloto de modificadores genéticos de la represión transcripcional mediada por las repeticiones GAA.....	131
2.8	Rastreo genético piloto en un modelo celular de repeticiones GAA	135
	DISCUSIÓN.....	139
1	<i>D. melanogaster</i> en la búsqueda de nuevos tratamientos para la ataxia de Friedreich	141
2	Efecto de la modulación por rapamicina de la actividad de mTOR en modelos de deficiencia de frataxina	143
3	<i>D. melanogaster</i> como modelo de estudio de la expansión de repeticiones GAA.....	149
	CONCLUSIONES	157
	MATERIAL SUPLEMENTARIO	161
	BIBLIOGRAFÍA	171

INTRODUCCIÓN

Introducción

1 La ataxia de Friedreich

La ataxia de Friedreich (FRDA) (OMIM, *Online Mendelian Inheritance in Man*, #229300; ORPHA:95) es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria que afecta al sistema nervioso central y al periférico, además de al corazón, el esqueleto o el sistema endocrino ¹. Constituye la ataxia autosómica recesiva más común a nivel mundial. Su prevalencia se sitúa en 2-4:100000, mientras que la frecuencia de portadores asintomáticos está entre 1:60 y 1:100. La enfermedad puede encontrarse principalmente en Europa, Oriente Medio, el sur de Asia (India) y el norte de África; mientras que no se ha documentado en asiáticos del sudeste, africanos subsaharianos o nativos americanos ¹. En la Comunidad Valenciana la prevalencia es de 3-4 casos cada 100000 habitantes ².

En 1988, Chamberlain *et al.* lograron localizar la mutación responsable de la enfermedad en el cromosoma 9 ³. Posteriormente, Campuzano *et al.* identificaron el gen causal *FXN* en la región cromosómica 9q13 ⁴, el cual codifica para la proteína frataxina. A partir de entonces, y junto a otros grupos, comenzó la labor que continúa todavía en nuestros días de caracterización de esta proteína y su papel en la FRDA ⁵. La FRDA está causada por la reducción de los niveles de frataxina, que en la mayoría de los pacientes se debe a la presencia, en homocigosis, de una expansión de las repeticiones del triplete GAA situadas en el intrón 1 del gen *FXN* ⁴.

La FRDA fue descrita, por primera vez, por Nikolaus Friedreich en 1863 a partir de 6 pacientes en dos familias diferentes que presentaban problemas de coordinación, debilidad en las piernas, disartria, nistagmo, pérdida sensorial, escoliosis y deformidades en los pies ⁶. Posteriormente se describieron varios casos adicionales y presentaciones atípicas de la enfermedad. Durante los años 80, en el siglo XX, se desarrolló una descripción sistemática de los fenotipos y unos criterios estandarizados para identificar la enfermedad ⁷. A partir del aislamiento del gen *FXN* en 1996, estuvo disponible el diagnóstico genético y el espectro clínico de la FRDA aumentó notablemente ¹.

Introducción

1.1 Clínica de la enfermedad

La manifestación más común de la FRDA se observa en el 75% de los pacientes, mientras que en el resto se encuentran otros tipos de manifestaciones atípicas de la enfermedad ¹. Las principales características clínicas de la enfermedad y los fenotipos atípicos se encuentran resumidos en la Tabla 1.

La gravedad y progresión de algunos de los síntomas de la enfermedad pueden ser medidos periódicamente mediante instrumentos como las escalas ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*), SARA (*Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*) o FARS (*Friedreich Ataxia Rating Scale*) ^{8,9}.

En la **ataxia de Friedreich típica**, las manifestaciones neurológicas consisten en una ataxia progresiva que puede iniciarse desde la niñez hasta la etapa adulta temprana, comenzando con problemas de equilibrio al andar, seguidos de dificultades en la articulación del habla (disartria) y ataxia de los miembros superiores. La edad media de aparición de los síntomas se sitúa entre los 10 y los 15 años ¹⁰. La ataxia de la marcha es el síntoma más temprano en la inmensa mayoría de los casos, y ésta y otras manifestaciones neurológicas, resultan de la degeneración progresiva de los ganglios de la raíz dorsal, columnas posteriores, tractos corticoespinales, tractos espinocerebelares dorsales de la médula espinal y del cerebelo ¹.

La debilidad muscular es un síntoma frecuente, siendo notable en los extensores y abductores de la cadera y, a medida que progresa la enfermedad, se hace más evidente en los miembros distales. La disfagia es también común en FRDA, con un alto porcentaje de pacientes presentando problemas al tragar ¹¹. Además, pueden darse anomalías esqueléticas como *pes cavus* y escoliosis.

La cardiomiopatía hipertrófica, definida como un incremento en el grosor del septo interventricular, está presente en dos tercios de los pacientes ¹. Los síntomas relacionados con la cardiomiopatía suelen darse en etapas tardías de la enfermedad ¹², pero en ocasiones pueden preceder a la ataxia ¹³⁻¹⁵. Las arritmias y el fallo cardíaco por congestión ocurren en las últimas etapas de la enfermedad y son la causa más común de mortalidad ¹⁶.

Existen también problemas urinarios relacionados con la vejiga ¹ y alteraciones de la respiración y apnea durante el sueño ¹⁷. La aparición de diabetes mellitus se da en un 30% de los pacientes FRDA y un 49% adicional manifiestan intolerancia a la glucosa ¹⁸⁻²⁰.

Otros sentidos también pueden verse afectados. En un 25% de los pacientes se da atrofia del nervio óptico y en un 13% pérdida de audición ²¹. Aunque las capacidades cognitivas no están generalmente afectadas en la FRDA, los tiempos de reacción motora y mental están significativamente afectados ^{22,23}, y también se han demostrado problemas de atención y de la memoria de trabajo ²⁴. Aquellos pacientes con una aparición más temprana de la enfermedad, o un mayor número de repeticiones GAA, tienden a tener mayores dificultades cognitivas ²⁵.

La velocidad a la que avanza la FRDA es variable, siendo unos 10 años el tiempo medio desde la aparición de los síntomas hasta la dependencia de una silla de ruedas ²¹. La edad de fallecimiento media y mediana está en los 36,5 y los 30 años respectivamente ¹⁶, aunque existen casos de supervivencia hasta la sexta y séptima década de vida.

En aproximadamente el 15% de los pacientes de FRDA la aparición de los síntomas es posterior a los 25 años de edad. En los pacientes de **ataxia de Friedreich de aparición tardía** (*LOFA, late-onset FRDA*), la edad de inicio de la enfermedad está entre los 26 y los 39 años; mientras que para la **ataxia de Friedreich de aparición muy tardía** (*VLOFA, very late-onset FRDA*) la edad de inicio se sitúa por encima de los 40 años ^{26,27}. La progresión de los síntomas es normalmente más lenta en estas manifestaciones de la enfermedad que en la FRDA típica, incluyendo una edad más tardía de confinamiento a una silla de ruedas y una menor incidencia de anomalías esqueléticas secundarias ²⁸.

Los casos de **ataxia de Friedreich con retención de los reflejos osteotendinosos** (*FARR, FRDA with retained reflexes*) se dan en aproximadamente el 12% de los pacientes homocigotos para la expansión GAA ²⁹. Los reflejos tendinosos pueden permanecer durante más de 10 años tras el inicio de la enfermedad, que suele ser más tardío en los pacientes con FARR, los cuales también presentan una menor incidencia de anomalías esqueléticas secundarias y de cardiomiopatía ²⁹.

En la **ataxia de Friedreich de inicio temprano** los síntomas aparecen antes de los 5 años de edad y hay una progresión neurológica más rápida ^{7,30}.

Introducción

Finalmente, en la población acadiana (población canadiense de ascendencia francesa), la FRDA muestra también un inicio más tardío de la enfermedad y del confinamiento a una silla de ruedas, así como una incidencia mucho menor de cardiomiopatía ³¹.

Tabla 1. Principales características clínicas de la FRDA y manifestaciones atípicas (adaptado de ⁵)

Características neurológicas de la FRDA típica
Ataxia (Sensorial y cerebelar)
Arreflexia
Pérdida sensorial
Debilidad de los miembros inferiores
Disartria
Disfagia
Reflejo de Babinski bilateral
Movimientos oculares (nistagmo)
Neuropatía óptica
Neuropatía auditiva
Características no neurológicas
Cardiomiopatía
Diabetes mellitus
Anormalidades esqueléticas (<i>pes cavus</i> y escoliosis)
Fenotipos atípicos
FRDA de aparición tardía (<i>LOFA, late-onset FRDA</i>)
FRDA de aparición muy tardía (<i>VLOFA, very late-onset FRDA</i>)
FRDA con retención de los reflejos (<i>FARR, FRDA with retained reflexes</i>)
FRDA de inicio temprano
FRDA en acadianos

1.2 Estructura y regulación del gen *FXN*

El gen *FXN*, situado en la región 9q21.11 (OMIM; NCBI, *National Center for Biotechnology Information*), contiene 7 exones que se extienden alrededor de 80 kb de DNA, y se transcribe desde el centrómero hacia el telómero. El transcrito más abundante incluye los exones 1 a 5a y tiene un tamaño de 1,3 kb. Otros transcritos mucho menos abundantes contienen el exón 5b en lugar del 5a, a veces seguido por el exón 6 no codificante ⁴ (Figura 1).

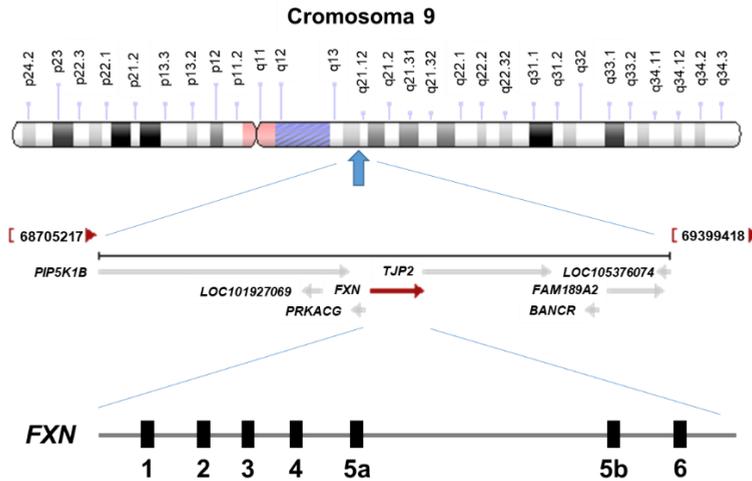


Figura 1. Localización y estructura simplificada del gen *FXN* (adaptado de *Genetics Home Reference*, NCBI y ⁴). El gen *FXN*, formado por los exones 1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6, se localiza en la región citogenética 9q21.11. Flanqueando a *FXN* se encuentran otros genes como *PIP5K1B* (*phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type 1 beta*), *TJP2* (*tight junction protein 2*) y *PRKACG* (*protein kinase cAMP-activated catalytic subunit gamma*).

Respecto del resto de elementos presentes en el gen *FXN* (Figura 2), existen tres islas citosina-fosfoguanina (CpG), situándose la primera de ellas en el primer exón y extendiéndose hasta el intrón 1 ³². En el intrón 1 se encuentra un microsatélite constituido por repeticiones del triplete GAA en el centro de un elemento Alu, de donde se piensa que se originaron ^{4,33-35}. También puede encontrarse un tracto poli(A) polimórfico en la región anterior a las repeticiones GAA, lo que es consistente con la estructura de los elementos Alu ^{33,36,37}.

Se han identificado dos sitios principales de inicio de la transcripción (TSS, *transcription start sites*) en el gen *FXN*. El primero (TSS1) se encuentra situado a 221 pares de bases (pb) aguas arriba del sitio ATG de inicio de la traducción ⁴ y el segundo (TSS2) a 62 pb aguas arriba de dicho sitio ATG ³⁸. A parte de éstos, también se han identificado otros posibles sitios TSS, pero no han sido confirmados ³⁹.

Respecto del promotor de *FXN*, la región situada entre 1034 pb aguas arriba y 100 pb aguas abajo del TSS1 parece jugar el papel principal en la regulación del gen ⁴⁰. Esta región carece de una caja TATA, pero contiene elementos Inr/DPE (*Initiator motif/Downstream Promoter Element*) comenzando 24 pb aguas abajo de TSS1, cuya delección reduce

Introducción

significativamente la expresión de *FXN*⁴⁰. Se han descrito sitios de unión para un factor de transcripción de respuesta a suero (SFR, *serum responsive factor*) y un factor de transcripción AP2 (TFAP2), la delección de los cuales también afecta a la transcripción de construcciones reporteras de *FXN*⁴¹. SRF es importante en el desarrollo neuronal y en el mantenimiento de la actividad y plasticidad sináptica⁴², mientras que TFAP2 está implicado en el desarrollo de la cresta neural⁴³. También se ha hallado un posible sitio de unión para EGR3 (*early growth response protein 3*)⁴¹ y un elemento E-box (*enhancer box*) que resulta esencial para la correcta actividad del promotor de *FXN*⁴⁴. Este último elemento puede probablemente actuar de sitio de unión para una familia de proteínas que incluye los factores específicos de músculo MyoD (*myogenic differentiation 1*) y c-myc (*MYC proto-oncogene*)^{45,46}. Finalmente, se ha identificado un sitio de unión para el factor CTCF (*CCCTC-binding factor*) en una región situada entre 154 y 173 pb aguas abajo del TSS1⁴⁷. Además, existen otros tipos de DNA repetitivo en el locus *FXN*, como elementos LINE L2 (*Long interspersed nuclear elements*), MIRb (*mammalian interspersed repeats*) y MER (*mariner DNA transposon*)⁴⁰.

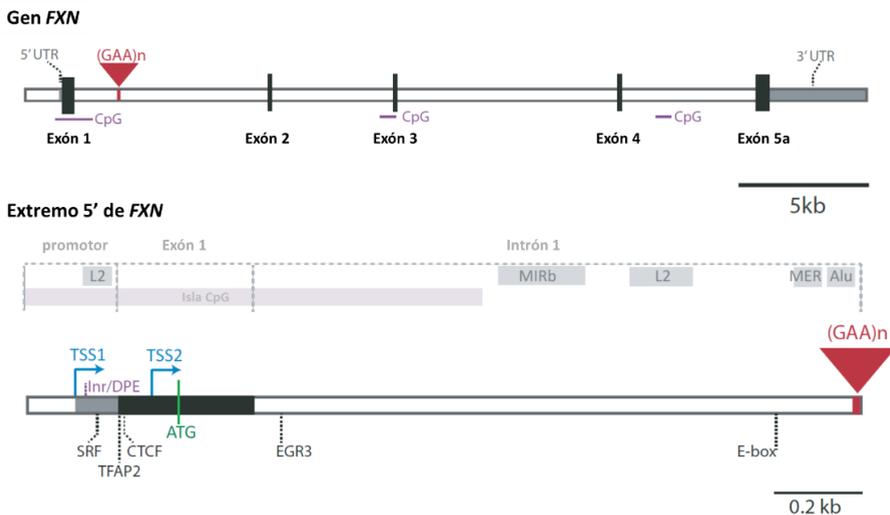


Figura 2. Elementos reguladores del gen *FXN* (adaptado de⁴⁸). En el gen *FXN* se han descrito diferentes tipos de DNA repetitivo como elementos LINE, MIRb, MER y Alu, siendo este último el posible origen de las repeticiones GAA. Existen también sitios de unión para SRF, TFAP2, EGR3 y CTCF, así como elementos Inr/DPE y E-box, al menos dos sitios de inicio de la transcripción (TSS1 y TSS2), y tres islas CpG. LINE: *Long interspersed nuclear elements*, MIRb: *mammalian interspersed repeats*, MER: *mariner DNA transposon*, SRF: *serum responsive factor*, TFAP2: *transcription factor AP2*, EGR3: *early growth response protein 3*, CTCF: *CCCTC-binding factor*, Inr/DPE: *Initiator motif/Downstream Promoter Element*, TSS: *transcription start site*.

La expresión de *FXN* es ligeramente superior en los ganglios de la raíz dorsal y en la capa granular del cerebelo, así como en tejidos con una alta tasa metabólica como el corazón, el tejido graso marrón y el hígado⁴⁹⁻⁵². La sobreexpresión de frataxina, superando cierto nivel, es tóxica para las células, lo que hace suponer que su expresión ha de ser regulada con precisión^{53,54}.

Existe una estrecha relación entre la regulación de *FXN* y la concentración de hierro, lo cual es esperable teniendo en cuenta el papel de frataxina en el metabolismo de dicho metal⁵⁵⁻⁵⁷. Se ha observado que la depleción de hierro inducida experimentalmente reduce la expresión de *FXN* tanto en células normales como en células FRDA, lo que apoya dicha conexión⁵⁷.

También se ha observado, junto con una baja expresión del gen *FXN*, una disminución de PGC1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*), coactivador de PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)^{58,59}. Estos últimos son elementos clave en la regulación de la biogénesis mitocondrial y el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno^{60,61}. Se cree que la ruta de PPAR γ es también crítica en la patogénesis de la diabetes⁶², por lo que la relación entre PPAR γ y *FXN* podría explicar la asociación de la FRDA con la diabetes⁵⁸.

1.3 Tipos de alelos del gen *FXN* e influencia sobre el fenotipo

Algunos alelos del gen *FXN*, responsables de la enfermedad, consisten en deleciones o en diferentes mutaciones que inactivan la proteína frataxina. Sin embargo, en más del 96% de los pacientes de FRDA, la enfermedad se debe a la presencia, en homocigosis, de expansiones patológicas del triplete GAA. El resto de pacientes son heterocigotos para la expansión GAA y los demás tipos de mutaciones.

Respecto de la secuencia de repeticiones GAA del intrón 1, pueden diferenciarse varios tipos de alelos del gen *FXN*^{33,63,64}:

I. Alelos normales: 5-33 repeticiones GAA. El 80-85% de los alelos contienen menos de 12 repeticiones GAA (SN, *short normal*) y aproximadamente el 15% presentan de 12 a 33 repeticiones (LN, *long normal*). Los alelos con más de 27 repeticiones son mucho menos frecuentes.

Introducción

II. Alelos normales mutables (premutación): 34-65 repeticiones. Su frecuencia exacta no está determinada, pero se estima que representan menos del 1% de los alelos de *FXN*.

III. Alelos borderline: 44-66 repeticiones GAA. No se ha determinado con claridad cuál es el menor número de repeticiones asociado con la enfermedad, de modo que no se puede establecer con exactitud el límite entre alelos normales y alelos de penetrancia completa.

IV. Alelos de penetrancia completa: 66 hasta aproximadamente 1700 repeticiones GAA. La mayoría de los alelos expandidos contienen entre 600 y 1200 repeticiones ^{4,21,65,66}.

V. Alelos raros de estructura variable: Los alelos descritos anteriormente consisten en repeticiones perfectas del trinucleótido GAA. En algunos alelos patológicos raros las repeticiones GAA se encuentran interrumpidas por otros nucleótidos. La longitud y el tipo de los nucleótidos que forman la interrupción pueden diferir entre estos alelos, pero generalmente se sitúan cerca del extremo 3' de la secuencia de repeticiones GAA.

A pesar de que se han identificado algunas correlaciones generales, no es posible predecir el desarrollo de la enfermedad en base al genotipo de los pacientes. La gran variabilidad en los síntomas de los pacientes de FRDA puede estar causada por el fondo genético ⁶⁷, la heterogeneidad somática de la expansión GAA ^{31,64,68} o por otros factores aún desconocidos.

En el caso de los pacientes homocigotos para la expansión GAA patológica, la edad de inicio de la enfermedad, la presencia de debilidad muscular en las piernas, el tiempo transcurrido hasta la necesidad de una silla de ruedas y la prevalencia de cardiomiopatía, *pes cavus* y escoliosis muestran una correlación inversa significativa con el tamaño de la expansión ^{21,31,65,69}. El tamaño de la expansión en el alelo con menor número de repeticiones GAA muestra una mejor correlación y es capaz de explicar aproximadamente el 50% de la variación en la edad de inicio de la enfermedad ⁶⁵. En los pacientes con LOFA y VLOFA se ha observado que normalmente, al menos, uno de los alelos presenta menos de 500 o 300 repeticiones GAA respectivamente ^{26,27,70}.

Como se mencionó anteriormente, existen algunos alelos raros en los que la expansión de repeticiones está interrumpida por otros nucleótidos. Considerando el número de repeticiones GAA en la región ininterrumpida, estos alelos tienden a ser más cortos (equivalentes a 100-300 repeticiones GAA) y suelen asociarse con casos de LOFA o VLOFA ⁷¹. La menor

gravedad de los síntomas de estas variantes de FRDA pueden deberse a la menor longitud de las repeticiones, a las propias interrupciones o a ambas.

En el caso de la FRDA en acadianos, no se han hallado diferencias significativas en el tipo de alelos con respecto a los pacientes que presentan la FRDA típica, lo que apoya la existencia de modificadores genéticos de la gravedad de la enfermedad ³¹.

Respecto a otros síntomas relevantes, se ha descrito que la cardiomiopatía es más frecuente en individuos con un alto número de repeticiones GAA ^{21,65,69}, mientras que la diabetes mellitus o la intolerancia a la glucosa no parecen estar correlacionadas con el tamaño de la expansión ²¹. Sin embargo, sí parece existir una correlación entre la incidencia de la diabetes mellitus y una edad de inicio temprana de la enfermedad.

El fenotipo de los pacientes heterocigotos compuestos con un alelo expandido y otro alelo con otro tipo de mutación (delección o mutación puntual) no se distingue del fenotipo mostrado por individuos homocigotos para alelos con la expansión patológica, aunque existen algunas excepciones ⁷²⁻⁷⁵. En el caso de heterocigosis para un alelo de penetrancia completa y un alelo *borderline* mutable, los individuos suelen presentar LOFA/VLOFA ⁶⁴.

Hasta la fecha no se han identificado pacientes homocigotos para mutaciones puntuales u otras mutaciones de pérdida de función diferentes de las expansiones GAA. La presencia de unos niveles mínimos de fraxina es esencial para el desarrollo embrionario, ya que se ha observado que su completa ausencia causa letalidad embrionaria temprana en plantas y en ratón ⁷⁶⁻⁷⁸.

1.4 Mecanismos de inhibición de la expresión de *FXN*

Las repeticiones GAA tienen tendencia a experimentar mutaciones de expansión y contracción facilitadas por mecanismos relacionados con la transcripción, replicación y reparación del DNA. Algunos tejidos críticos afectados por la ataxia de Friedreich muestran inestabilidad somática en el número de repeticiones ^{68,79,80}. Debido a la expansión de tripletes GAA, los niveles del mRNA (*messenger RNA*) del gen *FXN* se reducen en los pacientes de FRDA a un 4-30% de los valores observados en individuos no afectados ⁴⁹, lo cual se correlaciona claramente con la reducción de los niveles de la proteína fraxina ⁸¹.

Generalmente se acepta que los mecanismos que conducen a la reducción de la expresión de *FXN* se dan en la transcripción y que es improbable que tengan lugar a un nivel

Introducción

postranscripcional⁴⁸. La vida media del mRNA de *FXN* no cambia entre pacientes de FRDA y controles⁸² y no hay evidencias de que la expansión GAA afecte al procesado del RNA del gen^{82,83}. En la Figura 3 se muestran, de forma esquemática, los distintos mecanismos propuestos para explicar la inhibición de la expresión de *FXN* mediada por las repeticiones GAA y que se describirán a continuación.

1.4.1 Formación de estructuras de DNA no-B

Una explicación de la reducción de la expresión de *FXN* en la FRDA es la posibilidad de un bloqueo físico en la maquinaria de transcripción de la RNAPII (*RNA polymerase II*), provocada por las repeticiones GAA, debido a su capacidad de adoptar conformaciones inusuales (revisado en⁸⁴). Una de estas posibles conformaciones de DNA no-B es la estructura triplex purina:purina:pirimidina, donde una purina, ya emparejada con una pirimidina mediante un emparejamiento Watson-Crick, también forma un emparejamiento Hoogsten con otra purina⁸⁵⁻⁸⁸. Bajo condiciones de superenrollamiento negativo, este tipo de conformación puede adoptar estructuras secundarias conocidas como “DNA pegajoso”, que provocarían el bloqueo físico de la transcripción al dificultar el desenrollamiento del DNA molde y el avance del complejo de elongación de la RNAPII⁸⁹⁻⁹¹.

Además del “DNA pegajoso”, también es posible que puedan formarse estructuras en horquilla mediante puentes de hidrógeno inusuales entre G-G, G-A o A-A^{84,92-94}. Otra posibilidad es la formación de estructuras dúplex paralelas donde se da una orientación Watson-Crick invertida mediante dos puentes de hidrógeno entre purinas y pirimidinas, opuesta a la conformación normal en la que se forman tres puentes de hidrógeno⁹⁵. Las estructuras triplex formadas por repeticiones GAA también permiten la formación de híbridos estables RNA-DNA (lazos R) durante la transcripción^{86,96,97}, deteniendo la RNAPII al final del DNA repetitivo^{84,98-100}. Aunque las conformaciones inusuales de DNA causadas por las repeticiones GAA podrían explicar la reducción en la expresión de *FXN*, su existencia solo ha podido ser confirmada, de momento, en estudios *in vitro* y en *E. coli*, de modo que se requiere más información para conocer su posible papel en el locus *FXN* nativo⁴⁸.

1.4.2 Silenciamiento epigenético

Existen varias evidencias de que las repeticiones GAA pueden producir efectos de silenciamiento génico mediado por la formación de heterocromatina¹⁰¹. Los diferentes

mecanismos epigenéticos, incluyendo la metilación e hidroximetilación del DNA, las modificaciones postraduccionales de histonas, el remodelado de la cromatina y los efectos de RNAs no codificantes, afectan a la expresión génica sin la necesidad de cambios en la secuencia del DNA. El posible papel de los mecanismos epigenéticos en la FRDA surgió a partir de la observación de que largas repeticiones del triplete GAA eran capaces de suprimir la expresión de un gen reportero mediante mecanismos de variegación por efecto de posición (PEV, *position effect variegation*)¹⁰¹. Diferentes estudios en células deficientes en frataxina y en modelos en ratón han permitido la identificación de cambios epigenéticos que podrían estar relacionados con el silenciamiento de *FXN* en la FRDA.

I. Metilación e hidroximetilación del DNA

La metilación en el DNA es llevada a cabo por las enzimas DNMT (*DNA methyltransferase*), que catalizan la conversión de la citosina en 5'-metilcitosina (5mC), predominantemente en los dinucleótidos CpG. Los perfiles de metilación del DNA de genes transcripcionalmente silenciados muestran una fuerte correlación entre la metilación del DNA del promotor y el silenciamiento, aunque la metilación intragénica también puede contribuir a ello¹⁰². También se ha descrito la modificación 5'-hidroximetilcitosina (5hmC), formada por la oxidación de las 5mC^{103,104}, la cual constituye otra marca epigenética por sí misma¹⁰⁵. Se ha descrito un incremento de la metilación de sitios CpG en regiones aguas arriba de las repeticiones GAA del locus *FXN* en células derivadas de linfoblastos⁴⁴ y en cerebro, corazón y cerebelo de pacientes de FRDA, así como en diferentes tejidos de ratones modelo¹⁰⁶. Además, un estudio en sangre de pacientes mostró que el grado de metilación de dichas regiones está correlacionado con la longitud de las repeticiones y con la edad de inicio de la enfermedad¹⁰⁷. También se ha visto que, para al menos un sitio CpG, la modificación predominante consiste en 5hmC en lugar de 5mC¹⁰⁸ (sitio CpG 12, de acuerdo a la numeración establecida en⁴⁴).

II. Modificaciones postraduccionales de histonas

Las proteínas histonas contienen un dominio C-terminal globular y una cola N-terminal que pueden presentar diferentes tipos de residuos modificados. La acetilación de histonas en los residuos de lisinas (Lys) está regulada por dos familias diferentes de enzimas con acciones opuestas, las histonas acetiltransferasas (HATs) y las histonas desacetilasas (HDACs). La

Introducción

metilación de los residuos de Lys es, a su vez, controlada por las histonas metiltransferasas (HMTasas) y las histonas demetilasas (HDMs).

En mamíferos, la formación de heterocromatina y el silenciamiento génico están asociados con la hipoacetilación de determinados residuos de histonas, como H3K9 (Histona 3, Lys 9), y con un incremento en la metilación de otros residuos como H3K9me2 (dimetilación de la Lys 9 de la histona 3), H3K9me3 (trimetilación de la Lys 9 de la histona 3), H3K27me3 y H4K20me3¹⁰⁹⁻¹¹¹. Tales modificaciones han sido encontradas en células FRDA y en modelos de ratón, principalmente en la región inmediatamente aguas arriba de las repeticiones GAA, indicando un silenciamiento por formación de heterocromatina¹¹².

Otras modificaciones de histonas como H3K4me3, H3K36me3 y H3K79me3 están asociadas con un estado abierto de la cromatina y una expresión génica activa. H3K4me3 se asocia con el inicio de la transcripción, y H3K36me3 y H3K79me3 con la elongación. Se ha observado una disminución en los niveles de H3K36me3 y H3K79me3 en las regiones aguas arriba y aguas abajo de las repeticiones GAA en células FRDA, sugiriendo un problema en la elongación de la transcripción^{38,82,113}. También se ha visto una disminución de los niveles de H3K4me3 en la región aguas arriba de las repeticiones, pero no en el promotor, planteando posibles defectos en la postiniciación y elongación de la expresión de *FXN* en lugar de en las fases tempranas en el inicio de la transcripción^{38,82,113}.

III. Transcripción antisentido y unión de CTCF

Los transcritos de ARN antisentido intervienen en la regulación de la expresión génica, mientras que el factor CTCF impide la expansión de la metilación del DNA¹¹⁴. En fibroblastos de pacientes de FRDA se ha encontrado un incremento en los niveles del transcrito antisentido de frataxina 1 (*FAST1*, *frataxin antisense transcript 1*) asociado con una disminución en la unión del factor CTCF en la región 5' UTR (*5' untranslated region*) del gen *FXN*⁴⁷. Resultados similares se han encontrado en fibroblastos de ratones FRDA¹¹⁵ y en tejido cerebeloso de pacientes¹⁰⁸. La asociación entre la unión de CTCF a la región 5'UTR de *FXN*, los niveles de expresión de *FAST1*, y la expresión del gen, indica que los mecanismos de control por CTCF podrían estar actuando sobre el locus *FXN*.

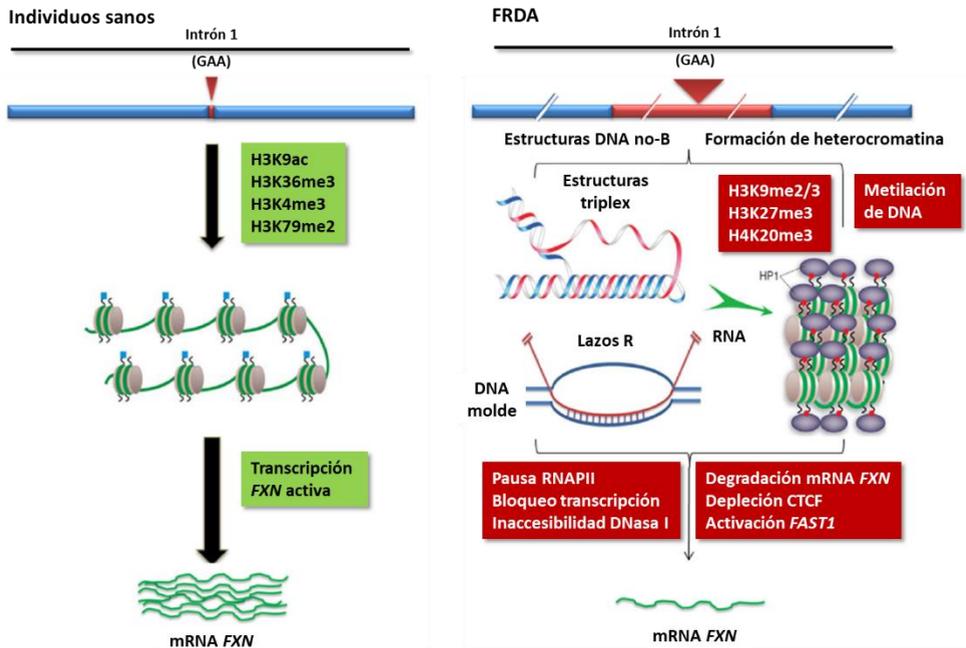


Figura 3. Modelos propuestos para explicar el silenciamiento del gen *FXN* (adaptado de ¹¹⁶). La represión transcripcional mediada por la expansión de repeticiones GAA puede tener su origen en diferentes mecanismos que podrían actuar de forma complementaria. Las repeticiones GAA podrían provocar la formación de estructuras de DNA no-B capaces de bloquear la maquinaria de transcripción. También son capaces de iniciar mecanismos epigenéticos que conducen a la heterocromatinización del locus *FXN*. H3K n : lisina n de la histona 3, H4K n : lisina n de la histona 4, ac: acetilación, me2: dimetilación, me3: trimetilación, RNAPII: *RNA polymerase II*, DNasa I: Desoxirribonucleasa I, CTCF: *CCCTC-binding factor*, *FAST1*: *frataxin antisense transcript 1*.

1.5 La proteína frataxina

1.5.1 Estructura y procesamiento de frataxina

Frataxina es una proteína altamente conservada que puede encontrarse desde bacterias gram negativas hasta eucariotas superiores. Se trata de una pequeña proteína mitocondrial implicada en la biogénesis de centros Fe-S (o ISC, *iron-sulfur clusters*), además de en otras posibles funciones. El plegamiento de frataxina está caracterizado por un motivo de sándwich α - β planar, compuesto por dos α -hélices terminales junto con 5 hojas β antiparalelas que forman dos planos diferentes. También puede detectarse una sexta hoja β , y en el caso de la frataxina humana, una séptima hoja ¹¹⁷ (Figura 4). Una región importante de frataxina es la

Introducción

denominada región ácida, compuesta por un conjunto de residuos ácidos localizados en la primera α -hélice y en el borde de la primera hoja β , los cuales están implicados en la unión de átomos de hierro ¹¹⁸.

La proteína frataxina humana es sintetizada inicialmente como una proteína precursora de 21 kDa (FXN¹⁻²¹⁰) que posteriormente es procesada en dos etapas por la peptidasa de procesado mitocondrial (MPP, *mitochondrial-processing peptidase*). En primer lugar, se produce un intermediario de 19 kDa (FXN⁴²⁻²¹⁰) que, tras un segundo corte, dará lugar a la forma madura de la proteína de 14 kDa (FXN⁸¹⁻²¹⁰) ^{119,120}. En la Figura 5 se muestran los puntos de procesamiento de la proteína y el alineamiento de su secuencia en humanos y varios organismos.

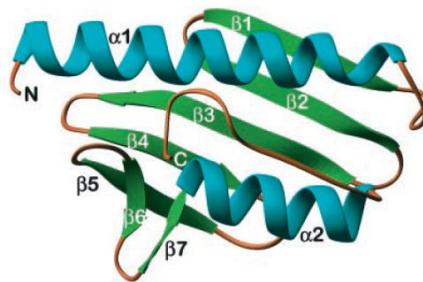


Figura 4. Estructura tridimensional de la frataxina humana. La estructura general de la proteína frataxina consiste en un sándwich planar formado por dos hélices α y 5 hojas β . En el caso de la frataxina humana también existe una sexta y séptima hojas β (extraído de ¹²¹).

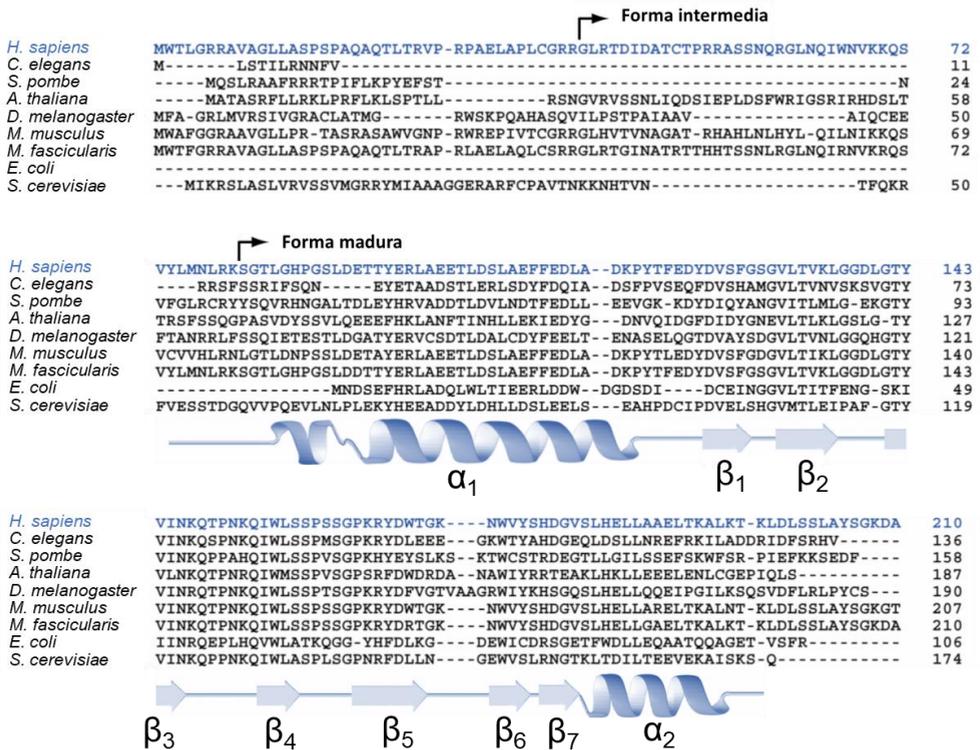


Figura 5. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la proteína frataxina humana y de diferentes organismos. Las flechas indican los sitios de procesado que dan lugar a las formas intermedia y madura de la frataxina humana (adaptado de ^{117,122}). Debajo de los alineamientos se muestra la posición de las hélices α y hojas β de la frataxina humana. *H. sapiens*: *Homo sapiens*, *C. elegans*: *Caenorhabditis elegans*, *S. pombe*: *Schizosaccharomyces pombe*, *A. thaliana*: *Arabidopsis thaliana*, *D. melanogaster*: *Drosophila melanogaster*, *M. musculus*: *Mus musculus*, *M. fascicularis*: *Macaca fascicularis fascicularis*, *E. coli*: *Escherichia coli*, *S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*.

1.5.2 Función de la proteína frataxina

Algunos estudios han mostrado que frataxina (en *E. coli*, levadura y frataxina humana expresada en estos organismos) es capaz de formar estructuras oligoméricas ¹²³⁻¹²⁷. Estos oligómeros pueden capturar átomos de hierro, por lo que originalmente se propuso que la frataxina podría actuar de una forma similar a la ferritina, proveyendo a la mitocondria de hierro biodisponible ^{123,127}. Sin embargo, experimentos posteriores en levadura expresando ferritina mitocondrial humana mostraron que ésta no era capaz de corregir completamente los defectos provocados por la ausencia de frataxina, lo que indicó que la función de ambas proteínas era diferente ¹²⁸. Además, también se ha observado que la frataxina bacteriana solo

Introducción

forma oligómeros ricos en hierro *in vitro*, bajo condiciones aeróbicas y de alta fuerza iónica^{125,129}; que la frataxina de levadura, portadora de mutaciones que impiden la oligomerización de la proteína, es capaz de llevar a cabo su función con normalidad¹³⁰, y que la forma madura de la frataxina humana no tiene tendencia a oligomerizar. Otros estudios en humanos y ratón también confirman que la mayor o menor capacidad de la proteína frataxina de formar oligómeros en mamíferos no es relevante en el cumplimiento de su función¹³¹⁻¹³³.

La capacidad de frataxina de unir hierro, junto con las evidencias de una desregulación del metabolismo de dicho metal en pacientes de FRDA y en modelos de levadura¹³⁴, apoyaron el papel de la proteína en el metabolismo del hierro mitocondrial, sugiriéndose su participación en la síntesis de grupos hemo y centros Fe-S o como chaperona o sensor de hierro¹³⁵. En diferentes estudios se han observado interacciones de frataxina con la aconitasa mitocondrial, la ferroquelatasa, la succinato deshidrogenasa y la maquinaria de síntesis de centros Fe-S mitocondrial¹³⁶⁻¹⁴⁰. No obstante, las interacciones que han sido más extensamente confirmadas y caracterizadas son aquellas que se dan con la maquinaria de biogénesis de centros Fe-S¹²².

Los centros Fe-S son un tipo de cofactores de proteínas presentes en casi todos los organismos vivos. Tienen un papel crítico en varias funciones celulares, desde el transporte de electrones en los complejos respiratorios mitocondriales hasta la reparación del DNA o el metabolismo. La síntesis *de novo* de los centros Fe-S tiene lugar en la mitocondria^{141,142} (Figura 6). En la primera etapa se produce el ensamblaje de un centro Fe-S en la proteína de andamiaje ISCU (*Iron-Sulfur Cluster Assembly Enzyme*) a partir de hierro y azufre inorgánicos. El complejo cisteína desulfurasa NFS1/ISD11 (*mitochondrial cysteine desulfurase/ISD11* o LYRM4, *LYR motif-containing protein 4*) provee el azufre a partir de un persulfito intermediario^{133,143}. Una vez el centro Fe-S está ensamblado en la proteína ISCU, éste se transfiere a las proteínasceptoras con la ayuda de componentes adicionales, como el sistema de chaperonas HSCB/HSPA9 (*HscB Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Cochaperone/Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 9*) o proteínas intermediarias que proveerán el centro Fe-S a sus aceptores finales. Además, por medio de transportadores ABCB7 (*ATP Binding Cassette Subfamily B Member 7*), se exporta un intermediario al citosol para la generación de los centros Fe-S de las proteínas citosólicas y nucleares¹⁴¹. Originalmente se sugirió que el papel de la frataxina en la síntesis de los centros Fe-S podría ser el de donante de hierro para el ensamblaje de los centros^{125,136,138}. Estudios posteriores

propusieron que frataxina podría actuar más bien como regulador en la síntesis de tales centros ¹²⁶. La unión de frataxina al complejo ISCU/NFS1/ISD11 es capaz de estabilizar el mismo y de activar la actividad cisteína desulfurasa y controlar la entrada de hierro al complejo ¹⁴³⁻¹⁴⁵. Sin embargo, aún no ha sido determinado el mecanismo por el que frataxina es capaz de controlar la entrada de Fe. Al igual que frataxina, la maquinaria de síntesis de centros Fe-S esta conservada evolutivamente desde bacterias ¹⁴⁶ hasta mamíferos ¹⁴⁷, pasando por levadura ¹⁴⁸ o *D. melanogaster* ¹⁴⁹.

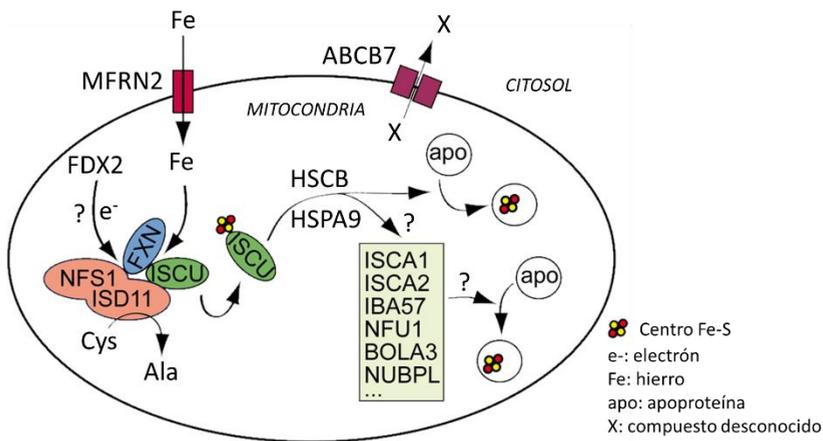


Figura 6. Esquema de la maquinaria de síntesis de centros Fe-S mitocondrial (adaptado de ¹²²). El Fe es importado a la mitocondria por medio de los transportadores MFRN. El proceso de ensamblaje de los centros Fe-S tiene lugar en un complejo formado por NFS1-ISD11, ISCU y frataxina, la cual regula la actividad de NFS1 y la entrada de Fe. Una vez formado, el centro Fe-S es transferido a las proteínas aceptoras con la ayuda de diferentes chaperonas (HSCB/HSPA9) o proteínas accesorias. Un intermediario desconocido (X) se exportaría al citosol por medio de transportadores ABCB7 para el ensamblaje de centros Fe-S de proteínas citosólicas y nucleares. MFRN2: *Mitoferrin 2*, NFS1: *mitochondrial cysteine desulfurase*, ISD11: *LYRM4 (LYR motif-containing protein 4)*, ISCU: *Iron-Sulfur Cluster Assembly Enzyme*, HSCB: *HscB Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Cochaperone*, HSPA9: *Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 9*.

1.5.3 Patología molecular

Una de las consecuencias del déficit de frataxina es una gran acumulación de hierro en la mitocondria, lo cual parece ser un resultado general de la deficiencia en la biogénesis de los centros Fe-S ¹⁵⁰⁻¹⁵⁴. De esta forma se produce una importante reducción en la función de proteínas que requieren de estos centros, como los complejos respiratorios de la mitocondria I, II y III y las aconitasas citosólica y mitocondrial. La deficiencia de frataxina conduce a una

Introducción

alteración de la actividad o expresión de varias proteínas implicadas en el metabolismo del hierro como IRP1 y 2 (*Iron Regulatory Protein 1 and 2*), TFR1 (*Transferrin receptor 1*), FRTL (*Ferritin light chain*), FRTH (*Ferritin heavy chain*) FPN (*ferroportin*) y MFRN2 (*Mitoferrin-2*) dando lugar a un incremento de la importación del hierro a la mitocondria. Estas alteraciones en el metabolismo del hierro, junto con la inhibición de procesos en los que se requiere este metal, culminan en su acumulación, al no poder ser exportado de la mitocondria en forma de otros metabolitos como centros Fe-S y grupos hemo^{122,135}.

El estrés oxidativo es una característica central de la FRDA. Existe una gran cantidad de información de diferentes organismos que apoyan la hipótesis de que la deficiencia de frataxina causa una desregulación de las defensas antioxidantes, lo que provoca estrés oxidativo y la patología resultante¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. Se ha encontrado un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) como peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radical superóxido (O₂⁻) en levadura, *D. melanogaster* y células de pacientes de FRDA¹⁵⁹⁻¹⁶⁵. Además, la deficiencia de frataxina incrementa la sensibilidad celular a una amplia variedad de agentes prooxidantes en levadura^{165,166}, *Caenorhabditis elegans*¹⁶⁷, *D. melanogaster*^{163,168,169}, ratón⁵² y células de pacientes de FRDA^{170,171}.

Las enzimas con centros Fe-S son muy sensibles a los radicales libres, pudiendo formarse ROS como consecuencia de la fuga de electrones en el complejo mitocondrial III, donde la ubiquinona reducida puede directamente reducir el oxígeno para dar O₂⁻¹⁷².

En la respuesta celular al estrés oxidativo participan la inducción de enzimas antioxidantes, como las superóxido dismutasas (SODs) y la glutatión peroxidasa, y un incremento en la síntesis de NADPH (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) y glutatión¹⁷³. La enzima SOD2 (*mitochondrial Superoxide dismutase (Mn)*) actúa sobre el O₂⁻ para catalizar la formación de H₂O₂. A continuación, en presencia de la enzima glutatión peroxidasa, el glutatión reducido (GSH) reacciona con el H₂O₂ para producir glutatión oxidado (GSSG) y H₂O (Figura 7A). La presencia de un exceso de hierro interfiere con las etapas anteriores formando H₂O₂ y OH por medio de reacciones de Fenton (Figura 7B), lo que supondría otro mecanismo de generación de radicales libres en la FRDA. Estos radicales son capaces de causar peroxidación de lípidos y dañar las proteínas y los ácidos nucleicos¹⁷⁴.

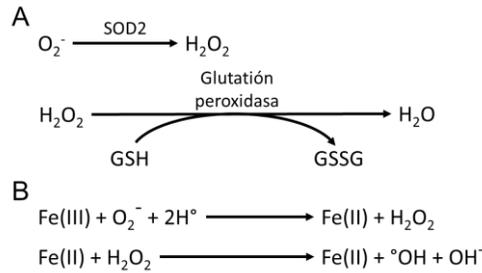


Figura 7. A) Neutralizaci3n del ox3geno reactivo por enzimas antioxidantes y B) reacci3n de Fenton en la que participa el hierro. (adaptado de ¹⁷²)

Se ha observado que en fibroblastos de pacientes de FRDA no se produce el incremento en la expresi3n de las SODs que se da en controles sanos en respuesta a bajas dosis de H_2O_2 , oligomicina o hierro ^{164,175,176}. El glutati3n es un trip3ptido que en eucari3tas es considerado como el antioxidante no enzimático m3s importante y, adem3s de actuar en la eliminaci3n de H_2O_2 , tambi3n interviene en la S-glutacionilaci3n de prote3nas, protegiendo las ciste3nas de una oxidaci3n irreversible ¹⁷⁷. Existen varios estudios que muestran que la deficiencia de frataxina conduce a problemas en la homeostasis del glutati3n ^{158,160,178-181}. En uno de ellos se observ3 la glutacionilaci3n de actina en fibroblastos de pacientes, lo que causa que se desensamblen los filamentos de actina ¹⁸⁰. Esto, junto con el hallazgo de la existencia de defectos en la ruta antioxidante de fase II dependiente de Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), proporcion3 una posible explicaci3n para la reducci3n de las defensas antioxidantes en la FRDA ¹⁶⁴. Nrf2 es un factor de transcripci3n clave en la inducci3n de las defensas antioxidantes y su actividad est3 regulada por la prote3na asociada a actina, la prote3na Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), la cual es una prote3na adaptadora del complejo E3 ubiquitin ligasa dependiente de Cul3. En condiciones normales, Keap1 mantiene a Nrf2 secuestrado en el citoplasma y promueve su r3pida degradaci3n por medio de ubiquitinizaci3n ¹⁸². Bajo condiciones de estr3s oxidativo, las ciste3nas de Keap1 se oxidan y se reduce la actividad del complejo ubiquitin ligasa. Esto permite la estabilizaci3n y la translocaci3n al n3cleo de Nrf2, donde se une, en el DNA, a las secuencias ARE (*Antioxidant Responsive Element*), activando la expresi3n de genes que codifican enzimas antioxidantes como la manganeso super3xido dismutasa, catalasa, glutati3n S-transferasa y NADH quinona oxidoreductasa ¹⁸². En fibroblastos de pacientes de FRDA, Keap1 no se encuentra asociado a la actina y Nrf2 aparece distribuido de forma difusa en la c3lula ¹⁶⁴.

Introducción

Asimismo, en los fibroblastos de pacientes el tratamiento con oligomicina o terbutilhidroquinona no provoca la traslocación de Nrf2 al núcleo, lo que impide la expresión de los genes antioxidantes de fase II ¹⁶⁴.

En los ganglios de la raíz dorsal de ratones YG8R deficientes en frataxina se encontró también una reducción en la expresión de los genes antioxidantes regulados por Nrf2, junto con una reducción en los niveles del propio factor de transcripción ¹⁵⁸. Sin embargo, utilizando diferentes tipos celulares neuronales deficientes en frataxina, no se observaron deficiencias en la traslocación de Nrf2 al núcleo tras la exposición a estrés oxidativo. Es posible que, en el caso de las neuronas, la regulación de las defensas antioxidantes dependa más de los niveles de Nrf2 que de la traslocación al núcleo regulada por medio de los filamentos de actina ¹⁸³.

2 Aproximaciones terapéuticas en la ataxia de Friedreich

De momento no existe un tratamiento que sea realmente eficaz en la FRDA para impedir o ralentizar la progresión de la enfermedad en los pacientes. Sin embargo, existen varios tipos de estrategias terapéuticas actualmente en desarrollo, o exploradas hasta hace relativamente poco tiempo, que intentan aliviar algunos síntomas y/o modificar la historia natural de la enfermedad. Estas estrategias se exponen a continuación.

2.1 Incremento de la función mitocondrial y utilización de antioxidantes

Uno de los primeros compuestos que se investigaron como posible terapia fue la coenzima Q10 (CoQ10), una pequeña molécula lipofílica presente en la membrana mitocondrial que actúa como antioxidante y facilita el transporte electrónico en la mitocondria ¹⁸⁴. La mayoría de los ensayos clínicos con la CoQ10 se hicieron en combinación con la vitamina E. En algunos estudios se observó una mejora en la producción de ATP (*adenosine triphosphate*) en el corazón y músculo esquelético de pacientes de FRDA ¹⁸⁵ o una mejora en la función cardíaca ¹⁸⁶. También se han realizado ensayos con idebenona, un compuesto análogo estructural de la CoQ10 con efectos antioxidantes y protectores ¹⁸⁷. Varios ensayos clínicos han investigado la efectividad de este compuesto, sin embargo, los resultados son inconcluyentes y no parece que muestre un claro beneficio terapéutico ¹⁸⁴. No obstante, algunos estudios han descrito una mejora en la hipertrofia cardíaca en pacientes tratados con idebenona ¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Actualmente continúan los estudios con compuestos similares como EPI-

743, una variante de la idebenona, y OX1, una molécula antioxidante con una función potencialmente protectora en otras enfermedades neurodegenerativas ⁵.

2.2 Quelantes de hierro

Los quelantes de hierro se propusieron como una posible terapia para reducir la sobrecarga de hierro mitocondrial. Entre ellos destaca la deferiprona, capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y de transportar hierro entre diferentes compartimentos celulares ¹⁹¹. Aunque hay datos que demuestran una reducción en la acumulación de hierro en el núcleo dentado, no se han observado mejoras neurológicas ¹⁹².

2.3 Aumento de los niveles de frataxina

Existen toda una serie de estudios dirigidos a identificar compuestos capaces de aumentar los niveles de la proteína frataxina. Esto puede lograrse principalmente mediante el incremento de la expresión del gen *FXN* y la estabilización de su transcrito y/o de la proteína, aunque en algunos casos el mecanismo del incremento de los niveles de frataxina no se conoce. Uno de los compuestos estudiados es la eritropoyetina, una hormona capaz de aumentar la producción de glóbulos rojos. Se ha observado que es capaz de aumentar los niveles de frataxina y de reducir el nivel de ciertos marcadores de estrés oxidativo, como la 8-hidroxidesoxiguanosina en orina y peróxidos en suero ¹⁹³. Sin embargo, debido a los elevados niveles de hematocrito, algunos pacientes requieren flebotomías ¹⁹⁴. Como respuesta a este problema, se ha estudiado el efecto de la eritropoyetina carbamilada, una variante de la hormona que no se une al receptor de eritropoyetina y, por tanto, no es eritropoyética. También es capaz de aumentar los niveles de frataxina ¹⁹⁵, aunque no se han encontrado beneficios clínicos claros ¹⁹⁶. También se ha descrito que el interferón gamma es capaz de aumentar los niveles de frataxina en modelos de FRDA celulares y de ratón ¹⁹⁷, así como de prevenir los cambios patológicos en los ganglios de la raíz dorsal en un modelo en ratón.

Otra estrategia es el reemplazamiento exógeno de la frataxina mediante su fusión a la proteína TAT (*transactivator of transcription*). La inyección de la proteína TAT-frataxina en un modelo FRDA en ratón mejora los cambios ultraestructurales en el corazón ¹⁹⁸. Sin embargo, existen ciertas reservas respecto a esta estrategia debido a la posibilidad de que se puedan desarrollar reacciones inmunes a largo plazo. Otros compuestos bajo estudio debido

Introducción

a su capacidad de aumentar los niveles de frataxina son el resveratrol ¹⁹⁹ y los agonistas de PPAR γ ^{200,201} como la pioglitazona.

2.4 Modificadores epigenéticos

Este tipo de estrategia terapéutica se basa principalmente en el uso de inhibidores de HDACs, compuestos que pueden afectar a la expresión génica mediante el incremento de la acetilación de histonas, modulando la actividad de factores de transcripción y otras proteínas que regulan la transcripción ²⁰². Es por ello que estos compuestos son candidatos prometedores en el tratamiento de la FRDA, actuando en la regulación de la expresión de *FXN* ²⁰³. En un modelo de ratón se observó que un inhibidor de HDACs de clase I con preferencia por la inhibición de HDAC3 ^{204,205} (denominado compuesto 106) era capaz de restaurar los niveles normales de frataxina en corazón y el sistema nervioso central de los ratones afectados ²⁰⁶. La nicotinamida (o vitamina B₃) es un inhibidor de HDACs de clase III que también da lugar a un aumento de la expresión de frataxina en células FRDA y modelos en ratón ²⁰⁷. Un estudio reciente en pacientes de FRDA mostró que la nicotinamida es capaz de producir un aumento dosis-dependiente del transcrito de *FXN* y la proteína frataxina, alcanzando los niveles de portadores asintomáticos ²⁰⁸.

A pesar de lo prometedora que puede ser esta estrategia, el mayor riesgo asociado con las terapias epigenéticas es su falta de especificidad. Aún no es posible silenciar o reactivar genes específicos mediante el uso de inhibidores de HDACs. Debido a los efectos generales de estos compuestos, presentan una tendencia a alterar el estado global de acetilación de las histonas. Los inhibidores de HDACs también tienen efectos *off-target* que pueden ser difíciles de detectar si aparecen tras la terapia inicial. La mayoría de los pacientes de FRDA se diagnostican antes de la edad adulta, y un tratamiento continuo con inhibidores de HDACs desde la niñez podría inducir la formación de tumores. No obstante, hasta la fecha se ha comprobado que los inhibidores de HDACs son razonablemente bien tolerados a corto plazo, aunque tienen algunos efectos tóxicos como efectos cardíacos secundarios, náuseas, vómitos, fatiga y una reducción en el recuento de glóbulos rojos ²⁰⁹.

2.5 Terapia génica

Se han desarrollado diferentes vectores de origen viral para poder expresar la proteína frataxina en células de paciente y en modelos murinos de la enfermedad. Con capacidad para

integrarse en el genoma, los vectores lentivirales derivados del virus HIV (*Human immunodeficiency virus*) son partículas de 80-120 nm que pueden dispersarse una distancia relativamente corta en tejidos densos ²¹⁰. Su utilidad para la terapia génica proviene de su capacidad de empaquetado (\approx 12 kb) y su facilidad de uso. La última generación de vectores lentivirales podría ser un sistema adecuado para el tratamiento de la FRDA, habiéndose observado que la expresión de *FXN*, dependiente de este tipo de vector, incrementa la resistencia al estrés oxidativo en fibroblastos de pacientes de FRDA ²¹¹.

Los virus adenoasociados (AAV, *adeno-associated virus*) son un tipo pequeño de parvovirus, sin envuelta, y de cadena sencilla de DNA ²¹². Su pequeño tamaño (alrededor de 26 nm) permite una mayor dispersión en algunos tejidos en comparación con otros vectores virales. La principal limitación de los AAV es su reducida capacidad de carga (sobre 4,8 kb). Un estudio reciente, empleando este tipo de vector, demostró la corrección y reversión de un fenotipo de cardiomiopatía en un modelo de ratón tras una inyección intravenosa de AAV expresando el gen *FXN* humano ²¹³.

El HSV-1 (*Herpes simplex virus type 1*) es un virus de DNA humano con una gran capacidad de empaquetamiento en comparación con otros vectores virales (sobre 160 kb). Esto supone una mayor versatilidad con respecto al tamaño y número de secuencias reguladoras que pueden introducirse, lo que es una ventaja para reproducir la expresión endógena de los genes de interés. Al ser un virus neurotrópico, los vectores derivados se utilizan principalmente en las enfermedades neurológicas, como la FRDA. En 2007 se observó la corrección de un fenotipo de descoordinación motora en un modelo en ratón de FRDA mediante el empleo de este tipo de vector expresando el cDNA (*complementary DNA*) del gen *FXN* humano ²¹⁴. En estudios posteriores, el mismo grupo demostró el potencial terapéutico del empleo de vectores HSV-1 conteniendo el locus genómico completo del gen *FXN*, lo cual permite un mayor control de la expresión del gen ^{215,216}.

3 Modelos animales en la ataxia de Friedreich

Se han desarrollado modelos animales de FRDA en diferentes organismos. Entre estos destacan en primer lugar el ratón, y a continuación, *Drosophila melanogaster*.

3.1 Modelos en ratón

La delección en homocigosis del gen *FXN* en ratón no es viable, al causar letalidad embrionaria en el día 6,5²¹⁷. Para poder estudiar las consecuencias de la depleción de frataxina después de las etapas embrionarias tempranas, se desarrollaron diferentes modelos *knockout* condicionales para los tejidos más afectados en los pacientes de FRDA, utilizando el sistema *Cre-LoxP*²¹⁸.

Un modelo específico del tejido cardíaco se desarrolló expresando la recombinasa Cre bajo el control del promotor de la creatina quinasa de músculo (MCK, *muscle creatine kinase*). Estos ratones reproducen la cardiomiopatía observada en los pacientes siguiendo un desarrollo cronológico muy similar²¹⁹. Los mutantes MCK presentan también las características bioquímicas de la FRDA, con defectos en la actividad de enzimas con centros Fe-S previos a la disfunción cardíaca y la acumulación de Fe²¹⁹.

Para obtener un primer modelo en tejido nervioso se generaron ratones expresando la recombinasa Cre bajo el control de la enolasa específica de neuronas (NSE, *neuron specific enolase*)²¹⁹. Sin embargo, en esta cepa transgénica NSE-Cre, la delección de *Fxn* se daba no solo en neuronas, sino también en corazón e hígado. Como resultado, este modelo presenta una combinación de fenotipos neurológicos y cardíacos, mostrando una ataxia progresiva con pérdida de la propiocepción y el desarrollo de una cardiomiopatía similar a la observada en el modelo MCK. El modelo NSE tiene como principales problemas la gravedad de los síntomas, provocando la muerte temprana de los ratones e impidiendo un desarrollo más progresivo de la enfermedad, además de la aparición de algunos fenotipos que no son representativos de la enfermedad humana.

Posteriormente se desarrolló un modelo condicional inducible por tamoxifeno y utilizando la recombinasa Cre bajo el control del promotor de la proteína Prp (*prion proteín*) de ratón²²⁰. En este caso, la delección de *Fxn* afecta a los ganglios de las raíces dorsales, médula espinal y cerebelo, reproduciendo muchas de las características neurodegenerativas

de la FRDA. También se han descrito otros modelos condicionales para conseguir la depleción de frataxina en células pancreáticas β^{221} y en hígado ²²².

La generación de modelos de FRDA en ratón basados en la expansión de repeticiones GAA ha sido una estrategia utilizada para reproducir de forma más parecida la situación de los pacientes de FRDA. En primer lugar, se logró la introducción de una expansión de repeticiones (GAA)₂₃₀ en el primer intrón del gen *Fxn* de ratón ²²³. Estos ratones *knockin* homocigotos, denominados KIKI, se cruzaron con ratones *knockout* para obtener los ratones heterocigotos KIKO. Los ratones KIKO presentan unos niveles residuales de frataxina de entre un 25 y un 36%, en comparación con los *wild type*, sin embargo, no muestran fenotipos cardíacos o neurológicos. Posteriormente se generaron los ratones YG8 e YG22, mutantes nulos para el gen *Fxn* murino en los que se introdujo el locus *FXN* completo. ²²⁴. En el caso de los YG8, estos contienen dos inserciones del locus *FXN* con 90 y 190 repeticiones GAA, mientras que los YG22 contienen una única copia con 190 repeticiones. Ambos tipos de ratones fueron cruzados con ratones *knockout* para *Fxn* para obtener los modelos YG8R e YG22R respectivamente, en los que solo se expresa el gen *FXN* humano con las repeticiones GAA ²²⁵. Estos modelos muestran una progresión moderada de los problemas de coordinación y locomotores, junto con algunos signos de estrés oxidativo. Más recientemente se ha obtenido un nuevo modelo, denominado YG8sR en el que el transgen *FXN* contiene una única secuencia de aproximadamente 200 repeticiones GAA ²²⁶. Estos nuevos ratones muestran unos fenotipos más acusados, representando mucho mejor la patología de la FRDA. Por último, se ha obtenido un nuevo modelo que permite reprimir la expresión del gen *Fxn* de forma inducible mediante la administración de doxiciclina ²²⁷. Este nuevo modelo también reproduce muchos de los fenotipos observados en los pacientes y permitirá estudiar la posible reversibilidad de tales fenotipos.

3.2 Modelos en *Drosophila*

El gen ortólogo a *FXN* en *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) fue clonado y caracterizado en nuestro laboratorio ²²⁸ y fue denominado como *fh* (*frataxin*) por la base de datos Flybase (flybase.org). El gen *fh* se localiza en la región 8CD del cromosoma X y su estructura es mucho más sencilla que la de *FXN*, con un tamaño aproximado de 1 kb y compuesto por dos exones con 340 pb y 282 pb respectivamente, separados por un intrón de 69 pb ²²⁸. La proteína frataxina codificada por *fh* (FH) se localiza en la mitocondria ¹⁶⁸ y tiene

Introducción

190 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 21 kDa, que pasa a ser de 15 kDa tras ser procesada^{228,229}. La estructura secundaria de FH coincide con el motivo de sándwich α - β descrito en otros ortólogos de frataxina²²⁸, de forma que comparte la estructura tridimensional característica²³⁰. FH puede unir hierro e interacciona con Iscu en una forma dependiente de este metal²²⁹.

Se han desarrollado varios modelos de FRDA en *D. melanogaster* combinando la metodología RNAi (*RNA interference*) y el sistema de expresión binario GAL4/UAS^{231,232} para regular negativamente la expresión de *fh* a nivel posttranscripcional. El sistema GAL4/UAS ha sido extensamente utilizado en *D. melanogaster* para inducir la expresión de un transgén bajo el control de las secuencias UAS (*Upstream Activation Sequences*) en aquellas células en las que también se expresa la proteína GAL4, responsable de unirse y activar dichas secuencias. Esta estrategia permite obtener unas condiciones similares a las de los pacientes de FRDA, al reducir los niveles de frataxina sin eliminar la proteína por completo. Además, con el sistema GAL4/UAS se consigue inducir la represión de *fh*, no solo de forma generalizada en todo el organismo, sino también en tejidos concretos en función del promotor para GAL4 empleado (Figura 8).

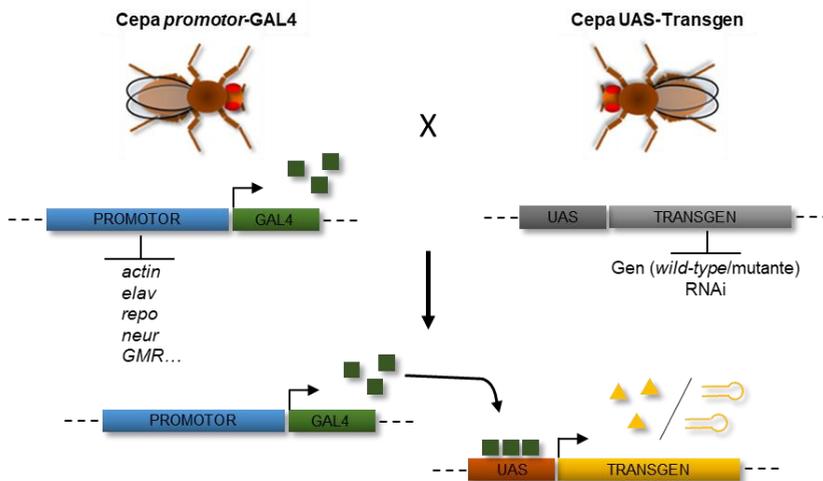


Figura 8. Utilización del sistema de expresión GAL4/UAS en *D. melanogaster*. La expresión de la proteína GAL4 puede controlarse de forma temporal y/o espacial empleando una construcción con el promotor adecuado. En aquellas células en las que se exprese la proteína GAL4, ésta se unirá a las secuencias UAS para activar la expresión de las construcciones que estén bajo su control.

La pérdida de función de *fh* produce, en *D. melanogaster*, muchos fenotipos bioquímicos, celulares y fisiológicos de la FRDA. La depleción casi completa de frataxina de forma ubicua afecta seriamente al desarrollo de las larvas y las pupas, impidiendo a los individuos alcanzar la fase adulta ^{168,233}, tal como ocurre en ratón ²¹⁷. Una reducción drástica de FH en músculos y corazón en desarrollo también es letal en etapas de pupa, mientras que dicha reducción en tejidos neurales permite el desarrollo de adultos viables. No obstante, estos presentan una menor supervivencia y capacidad motora cuando la expresión de *fh* se reduce específicamente en el sistema nervioso periférico ^{168,233}. Estos resultados indican que en *D. melanogaster*, como en humanos y en otros modelos, frataxina es una proteína esencial, y que los distintos tejidos tienen una sensibilidad diferente al déficit de la proteína.

La utilización de un sistema GAL4/UAS inducible por RU486 (mifepristona) en corazón, permitió a Tricoire *et al.* ²³⁴ detectar una disfunción cardíaca en las moscas en las que la deficiencia de frataxina afectaba a dicho órgano. A partir de las imágenes *in vivo* del corazón de tales individuos, los autores identificaron una función sistólica alterada y una considerable dilatación del corazón, similar a los fenotipos observados en pacientes con FRDA. De momento, la neuropatología celular de la deficiencia de frataxina se ha examinado en neuronas motoras de larvas ²³⁵. Tales neuronas muestran pérdida del potencial de membrana mitocondrial en los cuerpos celulares, los axones y la unión neuromuscular, seguido por defectos en el transporte retrógrado mitocondrial en los axones distales dando lugar a una neuropatía de tipo *dying-back*. Este tipo de neuropatía se ha descrito en las neuronas sensitivas y en los tractos motores corticoespinales y espinocerebelosos en pacientes FRDA (revisado en ²³⁶). En el modelo obtenido por Llorens *et al.* ¹⁶⁸, los niveles de frataxina se reducen de forma ubicua a niveles del 30% de los valores normales, situación más similar a lo que ocurre en los pacientes, lo que permite un desarrollo embrionario normal pero afectando a la supervivencia y a la capacidad motora en la fase adulta.

La deficiencia de frataxina en *D. melanogaster* también desencadena la acumulación de hierro ^{237,238}, restringida a la mitocondria ²³⁸. Estos acúmulos se han descrito en pacientes y ratón en diferentes tejidos, como el corazón ^{239,240}, mientras que su presencia en tejido nervioso se ha confirmado más recientemente en *D. melanogaster* y ratón ^{237,241}. El papel potencialmente tóxico del Fe en la FRDA es apoyado por el hecho de que todos los modelos de *D. melanogaster* muestran una gran sensibilidad al aumento del contenido de hierro en el medio de cultivo ^{233,237,242}. Además, es posible que exista un desequilibrio en la homeostasis

Introducción

de otros metales como Cu y Zn que también podría tener un papel relevante en la enfermedad. Se ha observado que diferentes modificadores genéticos implicados en el metabolismo de dichos metales o el empleo de quelantes para éstos es capaz de aliviar los fenotipos causados por la deficiencia de frataxina en *D. melanogaster*²⁴³.

Se ha sugerido que la acumulación de Fe en la FRDA contribuiría a la generación de ROS, que mediarían en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad (revisado en 156,244). No obstante, el papel del estrés oxidativo se ha cuestionado y existen resultados controvertidos también en los modelos de *D. melanogaster* (revisado en 230). Se ha descrito que la sobre-expresión de enzimas que eliminan las ROS, como catalasa, SOD1 (*Superoxide dismutase (Cu-Zn)*) y SOD2 no pudieron rescatar la letalidad de las pupas deficientes de frataxina²³³, ni mejorar la disfunción cardíaca en las moscas con reducción de frataxina restringida al corazón²³⁴. Tampoco se han detectado niveles elevados de ROS en las motoneuronas con déficit de frataxina, aunque estas neuronas respondieron a la acción de la antimicina A (inhibidor del complejo III respiratorio) con mayores niveles de ROS que las neuronas control²³⁵. Sin embargo, frente a estos resultados, hay un mayor número de evidencias que apoyan al estrés oxidativo como un actor importante en la FRDA 77,160,247,248,163,166–168,171,225,245,246. La sobre-expresión de catalasa, mitoCAT (usando un transgén sintético que dirige catalasa a la mitocondria), o mTPx (*mitochondrial peroxiredoxin*) rescata la reducción de la esperanza de vida y la mayor sensibilidad al H₂O₂ en moscas con reducción de frataxina en el SNP²⁴⁹. Estas enzimas también restauran la actividad de la aconitasa en las moscas con reducción sistémica de frataxina²⁴⁹, apoyando el papel del estrés oxidativo en la inactivación de la aconitasa. También se ha descrito que proteínas que actúan sobre los peróxidos lipídicos mejoran los fenotipos causados por la deficiencia de frataxina^{250,251}.

Recientemente, se ha descrito un nuevo mecanismo para la degeneración neuronal en la FRDA en el que la toxicidad del hierro no está asociada con el daño por ROS. Chen *et al.*²³⁷ identificaron el primer alelo mutante de *fh* (*fh1*), consistente en una mutación sin sentido inducida por metanosulfonato de etilo (S136R). Este cambio se localiza en una posición muy conservada (S157 en humanos) que se requiere para la unión de *FXN* al complejo de ensamblaje de centros Fe-S^{237,252}. Esta mutación es letal en fase larva-pupa, por lo que los autores obtuvieron un mosaico de clones mitóticos mutantes de *fh* en neuronas fotorreceptoras adultas²³⁷. Mostraron que la acumulación de hierro induce la síntesis de

esfingolípidos y activa la expresión de las proteínas Pdk1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*), Mef2 (*myocyte enhancer factor-2*) y sus dianas, lo que causa la pérdida de fotorreceptores en los ommatidios de las moscas. Confirmaron estos resultados al ver que la inhibición de la síntesis de esfingolípidos con miriocina, o el silenciamiento de la expresión de Pdk1 o Mef2 tuvo un efecto positivo en el fenotipo neurodegenerativo. Posteriormente, los autores identificaron este mecanismo en un modelo de ratón e incluso en el tejido cardíaco de pacientes ²⁴¹.

D. melanogaster también ha sido un organismo modelo pionero en señalar el papel de frataxina en la homeostasis de los lípidos y de las células gliales ²⁵⁰. La reducción ubicua o en células gliales de frataxina puede desencadenar la acumulación de lípidos. Se ha observado un incremento de ácido mirístico (C14: 0), ácido palmítico (C16: 0), ácido palmitoleico (C16: 1), ácido oleico (C18: 1) y ácido linoleico (C18: 2), lo que sugiere que la pérdida de la función mitocondrial también afectaría a la beta-oxidación de los ácidos grasos y conduciría a la acumulación de las especies más abundantes ²⁵⁰. La presencia de gotas de lípidos ya se había observado en modelos de ratón ²¹⁹, pero se desconocía cuál era su composición. Los resultados en *D. melanogaster* han permitido determinar el contenido de las gotas lipídicas, así como su asociación con la fisiopatología de la FRDA. Desde ese momento, se ha abordado el estudio de la desregulación lipídica en otros modelos ²⁵³ y en muestras de pacientes ²⁵⁴.

4 Regulación y funciones de la proteína mTOR

4.1 Componentes de los complejos TORC

La serina/treonina quinasa mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) ²⁵⁵ pertenece a la familia de las quinasas relacionadas con la fosfatidilinositol 3-quinasa y es el principal activador de procesos biosintéticos requeridos para el crecimiento celular en todos los organismos eucariotas, regulándolos acorde a un gran número de señales intra- y extracelulares ²⁵⁶ (Figura 9).

Introducción

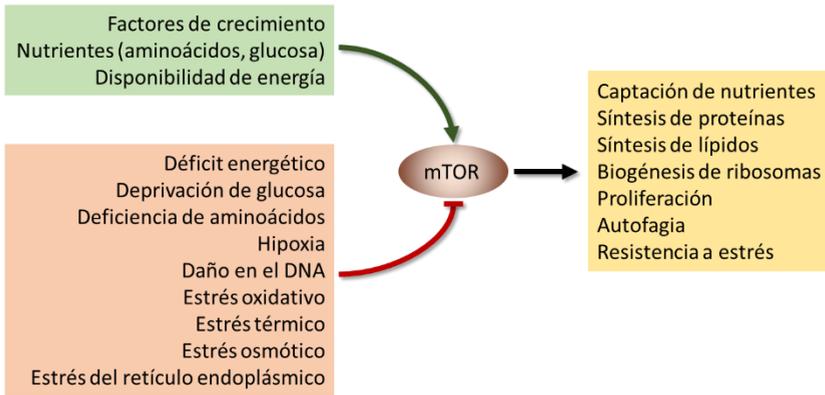


Figura 9. Principales procesos y señales relacionados con la regulación por la proteína mTOR (adaptado de ²⁵⁵). Generalmente, condiciones favorables para el crecimiento celular, como la disponibilidad de nutrientes y energía, favorecen un incremento de la actividad de la proteína mTOR. Condiciones como la deprivación de nutrientes y diferentes tipos de estrés pueden conducir a una reducción de la actividad de la proteína.

La proteína mTOR es un componente común, junto con las proteínas mLST8 (*mammalian lethal with sec13 protein 8*) y DEPTOR (*inhibitory DEP domain containing mTOR-interacting protein*), de dos complejos multiproteicos diferentes, TORC1 (*mTOR complex 1*) y TORC2 (*mTOR complex 2*) ²⁵⁷. Los componentes de cada uno de estos complejos se indican en la Figura 10. Específicas del complejo TORC1 son las proteínas Raptor (*regulator-associated protein of the mammalian target of rapamycin*) y PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) ^{258,259}. Raptor es esencial para la actividad de TORC1. El complejo TORC2 incluye las proteínas Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSIN1 (*mammalian stress-activated MAP kinase-interacting protein 1*) y PROTOR 1 y 2 (*proteins observed with rictor 1 and 2*) ²⁶⁰⁻²⁶². Tanto Rictor como mSIN1 son críticas para la función de mTORC2. Ambos complejos tienen una preferencia por sustratos específicos y modulan por tanto diferentes funciones celulares.

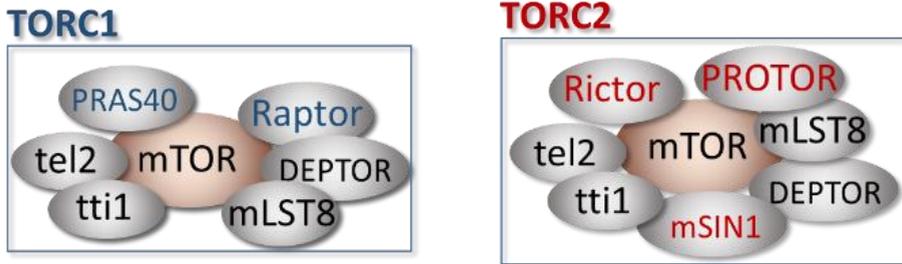


Figura 10. Componentes de los complejos TORC1 y TORC2 (adaptado de ²⁶³). Ambos complejos comparten algunos elementos, mientras que PRAS40 y Raptor son específicos del complejo TORC1, y Rictor, PROTOR y mSIN1 son específicos del complejo TORC2. DEPTOR: *inhibitory DEP domain containing mTOR-interacting protein*, mLST8: *mammalian lethal with sec13 protein 8*, mTOR: *mechanistic target of rapamycin*, mSIN1: *mammalian stress-activated MAP kinase-interacting protein 1*, PRAS40: *proline-rich Akt substrate of 40 kDa*, PROTOR: *proteins observed with rictor*, Raptor: *regulator-associated protein of the mammalian target of rapamycin*, Rictor: *rapamycin-insensitive companion of mTOR*, tel2: *telomere length regulation protein*, tti1: *TEL2-interacting protein 1*.

4.2 Regulación de TORC1

La actividad de mTOR es sensible a una compleja red de señalización, y el número de proteínas capaces de influenciar la función de la quinasa se sitúa probablemente en varios cientos ²⁶⁴. Diversas fuentes de estrés pueden afectar a los complejos TORC actuando sobre diferentes cascadas de señalización, produciendo la inhibición de la actividad de mTOR ^{265–268}. A continuación, se describen los principales mecanismos de regulación del complejo TORC1, esquematizados en la Figura 11.

4.2.1 Señalización por factores de crecimiento/PI3K

Un regulador de TORC1 bien establecido es la ruta de señalización constituida por factores de crecimiento/PI3K/AKT (PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*; AKT: *Protein kinase B*, PKB). La insulina y factores de crecimiento como IGF (*Insulin Like Growth Factor*) activan sus receptores RTKs (*receptor tyrosine kinases*) y el eje PI3K/AKT. La proteína AKT activada fosforila directamente e inhibe el complejo TSC1/2 (*Tuberous sclerosis 1/2*), el cual a su vez tiene como función la inactivación de la GTPasa Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) ^{269–273}.

Introducción

En el complejo TSC1/2, TSC1 actúa estabilizando a TSC2, el cual presenta una actividad GAP (*GTPase-activating protein*)^{274,275}. La actividad GAP de este complejo es asistida por un tercer componente, la proteína TBC1D7 (*Tre2-Bub2-cdc16 (TBC) 1 domain family, member 7*)²⁷⁶ y controlada por medio de fosforilaciones activadoras e inhibidoras. Concretamente, la fosforilación dependiente de AKT resulta en la disociación del complejo TSC1/2 del lisosoma, donde Rheb se encuentra localizado, y promoviendo por tanto la activación de este último²⁷⁷. Rheb unido a GTP es un potente activador de TORC1, por lo que la inhibición de TSC1/2 por AKT resulta en el incremento de la actividad del complejo TORC1^{278,279}. Además, AKT fosforila directamente e inhibe a PRAS40, un componente del complejo TORC1 que regula negativamente la actividad quinasa de éste, conduciendo también a la activación de TORC1 mediante otro mecanismo²⁸⁰⁻²⁸³.

Los receptores RTK además estimulan el eje de señalización Ras/Erk/RSK1, que directamente fosforila TSC2 para inactivar su actividad GAP^{284,285}. La función de TSC1/2 es también regulada por la señalización por Wnt a través de la quinasa GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3b*), conduciendo de nuevo a un incremento de la actividad de TORC1 mediante la supresión de la actividad de TSC2. Por último, la proteína PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) es capaz de inactivar el PIP₃ (*Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*) producido por la PI3K, suprimiendo la señalización hacia TORC1²⁸⁶.

4.2.2 Aminoácidos

Los aminoácidos son reguladores cruciales de TORC1^{287,288}. Las proteínas Rag (RagA/B/C/D), una familia de pequeñas GTPasas de tipo Ras, son mediadores clave de la activación de TORC1 inducida por aminoácidos^{289,290}. RagA o RagB forma un heterodímero junto a RagC o RagD²⁹¹, y este dímero se encuentra asociado al lisosoma e inactivado por el complejo Ragulator²⁹².

En presencia de aminoácidos, las proteínas Rag son activadas de forma secuencial por dos complejos multiprotéicos denominados GATOR1 (*Gap Activity Toward Rags 1*) y GATOR2 (*Gap Activity Toward Rags 2*), los cuales presentan actividad GAP hacia las Rag²⁹³⁻²⁹⁵. Las proteínas Rag activadas reclutan el complejo TORC1 a la superficie del lisosoma, donde es activado por Rheb²⁹². La interacción entre el complejo TORC1 y las proteínas Rag

ocurre mediante la unión de estas últimas a la proteína Raptor, lo que solo ocurre cuando RagA/B y RagC/D están unidas a GTP y GDP respectivamente.

4.2.3 Energía celular

La proteína AMPK (*AMP-activated protein kinase*) actúa como un sensor de los niveles de energía celulares y es activado por una ratio AMP (*adenosine monophosphate*)/ATP elevada. AMPK es capaz de fosforilar TSC2, incrementando la actividad GAP del complejo TSC1/2 ²⁹⁶. Además, AMPK fosforila directamente a Raptor, resultando en la disminución de la actividad de TORC1 ²⁹⁷.

Otro mecanismo capaz de disminuir la actividad de TORC1 bajo una situación de estrés energético es la fosforilación inhibitoria de Rheb por el complejo formado por p38β (*Mitogen-activated protein kinase p38 beta*) y PRAK (*p38-regulated/activated protein kinase*) ²⁹⁸. La proteína MARK4 (*AMPK-related kinase MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4*) también puede inhibir la actividad de TORC1 en condiciones de estrés energético mediante una fosforilación inhibitoria sobre Raptor ²⁹⁹.

4.2.4 Nivel de oxígeno

La privación de oxígeno activa el proceso de autofagia mediante la atenuación de la función mitocondrial o la activación transcripcional de la proteína BNIP3 (*Bcl-2/adenovirus E1B19-kDa interacting protein 3*) por medio de HIF1α (*hypoxia-inducible factor 1α*), puesto que BNIP3 es capaz de inhibir a Rheb ^{300,301}. HIF1α también induce la expresión de REDD1 (*DNA damage response 1*), que puede modular la actividad de TSC2 para disminuir la actividad del complejo TORC1 ^{302,303}.

4.2.5 Estrés osmótico

El estrés osmótico puede inhibir la actividad de los complejos TORC1 y TORC2, aunque el grado de inhibición varía en función de la intensidad y la duración del estrés. Este efecto inhibitorio sobre mTOR se conoce desde hace tiempo ^{265,267}, sin embargo, aún no están claros los mecanismos involucrados. La capacidad de la proteína AMPK de responder a diversos tipos de agentes estresores, incluyendo el estrés osmótico ³⁰⁴, hace que sea un posible candidato como responsable de la inhibición de TORC1 bajo este tipo de estrés. A pesar de

Introducción

ello, existen estudios que no apoyan el papel de AMPK como principal regulador de TORC1 en células expuestas a hipertoncicidad ^{305,306}.

Recientemente se ha observado que el estrés osmótico de corta duración es capaz de activar la actividad quinasa intrínseca de TORC1 mediante la fosforilación de Raptor por la quinasa JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), al mismo tiempo que inhibe la fosforilación de S6K (*ribosomal protein S6 kinase*) y 4E-BP (*eIF4E-binding protein*), ambos aguas abajo de TORC1 ³⁰⁶. Esto parece indicar que un estrés osmótico de alta intensidad podría interferir con la señalización de TORC1 aguas abajo sin inhibir su actividad quinasa.

4.2.6 Estrés oxidativo

La inhibición de TORC1 también se ha visto que juega un papel importante en la inducción de autofagia por ROS ^{307,308}. El complejo TSC1/2 puede localizarse en los peroxisomas a través de la unión a las proteínas PEX (*peroxisomal biogenesis factor*) 19 y 5 y ser activado por las ROS del peroxisoma para inhibir la actividad de TORC1 ³⁰⁷. El complejo TSC1/2 puede activarse también por fosforilaciones mediadas por GSK3 β ³⁰⁹ y AMPK en respuesta a ROS y estrés energético ^{296,308}.

4.2.7 Daño en el DNA

TSC2 es activado por el homólogo de REDD1, REDD2 ^{265,310} y por las sestrinas 1 y 2, inducidos por el factor p53 (*cellular tumor antigen p53*) en respuesta al daño en el DNA ³¹¹. El supresor de tumores p53 es bien conocido por su respuesta a este tipo de daño y por su capacidad de prevenir la transformación celular mediante la inducción de productos génicos que controlan el ciclo celular, la reparación del DNA, la senescencia y la apoptosis ³¹²⁻³¹⁴. Entre otras dianas, p53 induce la expresión de varias proteínas capaces de inhibir la actividad de TORC1 directa o indirectamente (PTEN, AMPK, TSC2, REDD1, REDD2, sestrinas 1 y 2 y TIGAR (*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*)) ³¹⁵. De esta forma, ralentiza el ciclo celular atenuando los procesos biosintéticos que podrían favorecer la expansión de las células alteradas.

Además de estas funciones activadas por el estrés, p53 puede influir en la actividad de TORC1 modulando la utilización de glucosa y la producción de energía mediante la inhibición de varios pasos en la glicolisis e incrementando la respiración mitocondrial ³¹⁶, y

mejorando las defensas antioxidantes mediante la inducción de proteínas como las sestrinas

317.318

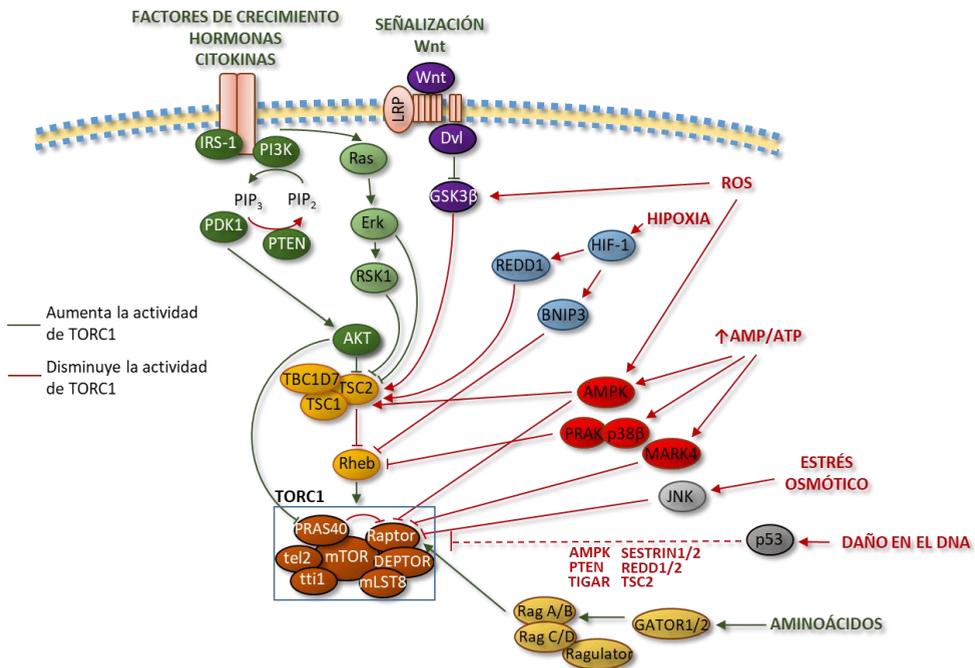


Figura 11. Señales capaces de regular la actividad de TORC1. La actividad del complejo TORC1 puede ser regulada positiva y negativamente por un gran número de señales intracelulares y tipos de estrés.

4.3 Procesos regulados por TORC1

En respuesta a las señales anteriores, TORC1 regula una serie de procesos mediante la fosforilación directa de sus dianas o la modulación de la actividad de diferentes factores de transcripción. En la Figura 12 se muestran varios de los procesos modulados por TORC1, algunos de los cuales se verán con mayor detalle a continuación.

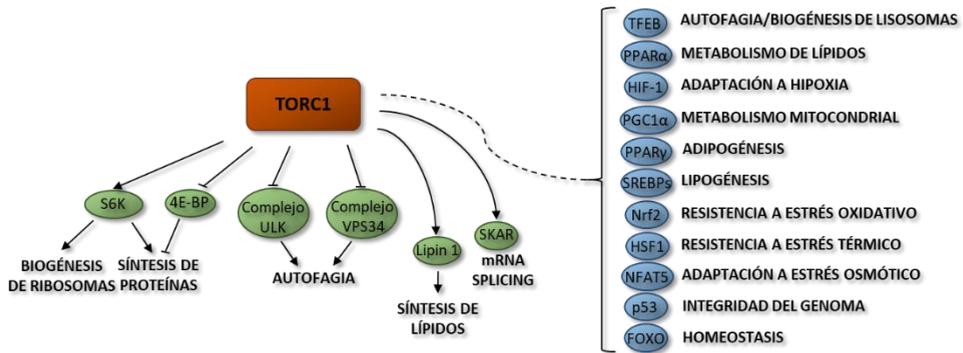


Figura 12. Procesos modulados por TORC1 (adaptado de ^{255,263}). TORC1 es capaz de regular un gran número de procesos biosintéticos y de modular la actividad de diferentes factores de transcripción (en azul). FOXO: *forkhead box, sub-group O*, HIF1 α : *hypoxia-inducible factor 1 α* , HSF1: *Heat shock factor 1*, NFAT5: *Nuclear factor of activated T-cells 5*, Nrf2: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, PGC1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*, PPAR α : *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*, PPAR γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, p53: *cellular tumor antigen p53*, SRBPs: *Sterol regulatory element-binding protein*, SKAR: *S6K1 Aly/REF-like substrate*, S6K: *ribosomal protein S6 kinase*, TFEB: *transcription factor EB*, TORC1: *mTOR Complex 1*, ULK: *autophagy-initiating UNC-5 like autophagy activating kinase complex*, VPS34: *vacuolar protein sorting 34*, 4E-BP: *eIF4E-binding protein*.

4.3.1 Síntesis de proteínas

Bajo condiciones de abundancia de nutrientes, TORC1 promueve el crecimiento mediante la fosforilación de importantes factores involucrados en la biogénesis de ribosomas como S6K ^{319,320}, la traducción de proteínas como 4E-BP ³²¹ y la síntesis de tRNAs (*transfer RNA*) como MAF1 ^{322,323}. TORC1 favorece también la síntesis de proteínas indirectamente mediante el incremento de la actividad de las RNA polimerasas I y III, las cuales transcriben genes que codifican RNAs de transferencia y ribosomales ³²³ (Figura 13).

De entre todos los efectores involucrados, 4E-BP y S6K son los principales reguladores de la síntesis de proteínas bajo el control de TORC1. La mayor parte de los mRNAs eucariotas contienen una repetición de guanosinas metiladas en sus extremos 5' UTR conocida como cap, a la cual se une la proteína eIF4E (*eukaryotic initiation factor 4E*) para iniciar la traducción. 4E-BP regula la actividad de eIF4E, asociándose a éste e impidiendo su unión con la cap del mRNA ³²⁴. La fosforilación de 4E-BP por mTOR resulta en la liberación de eIF4E hacia la estructura cap del mRNA y el posterior reclutamiento de eIF4G (*eukaryotic*

initiation factor 4G) y la helicasa de RNA eIF4A (*eukaryotic initiation factor 4A*), entre otros muchos factores ^{325,326}.

S6K afecta indirectamente a la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de S6 (*ribosomal protein S6*), conduciendo a la expresión de mRNAs implicados en la biogénesis de ribosomas ³²⁷. S6K también fosforila una variedad de otras proteínas directa o indirectamente relacionadas con la regulación de la traducción o el procesado de mRNAs, como eIF4B (*eukaryotic initiation factor 4B*), eEF2K (*eukaryotic elongation factor 2 kinase*), PDCD4 (*programmed cell death 4*), CBP80 (*nuclear cap-binding protein sub-unit 1*) y SKAR (*S6K1 Aly/REF-like substrate*) ³²⁸⁻³³⁴.

Además de su efecto en la traducción global, algunos estudios demuestran que TORC1 afecta de forma importante a la traducción de grupos específicos de mRNAs ³³⁵⁻³³⁸. Sin embargo, la identidad de estos mRNAs varía considerablemente entre los diferentes estudios. Se ha sugerido que la activación de la señalización por TORC1 induce específicamente la traducción de mRNAs que codifican componentes de la maquinaria de traducción, proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular, proteínas mitocondriales y factores de metástasis que promueven el desarrollo del cáncer. Aumentar la traducción de algunos de estos mRNAs resulta en un incremento de la producción mitocondrial de ATP y una elevada síntesis de proteínas, asegurando de esta forma el continuo crecimiento celular. Thoreen y colaboradores ³³⁵ sugieren que secuencias 5' TOP (*5' terminal oligopyrimidine tract*) o 5' TOP-like son las responsables de mediar la regulación de la traducción dependiente de 4E-BP, aunque otros estudios sugieren que la regulación por 4E-BP no se correlaciona con estas secuencias ³³⁹.

También se ha descrito que la señalización por TORC1 regula positivamente la expresión de genes que codifican subunidades del proteasoma de una manera dependiente de Nrf1 (*nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 1*). De esta forma es posible que la señalización por TORC1 coordine los niveles de proteínas regulando tanto la síntesis como la degradación de proteínas (Figura 13).

Introducción

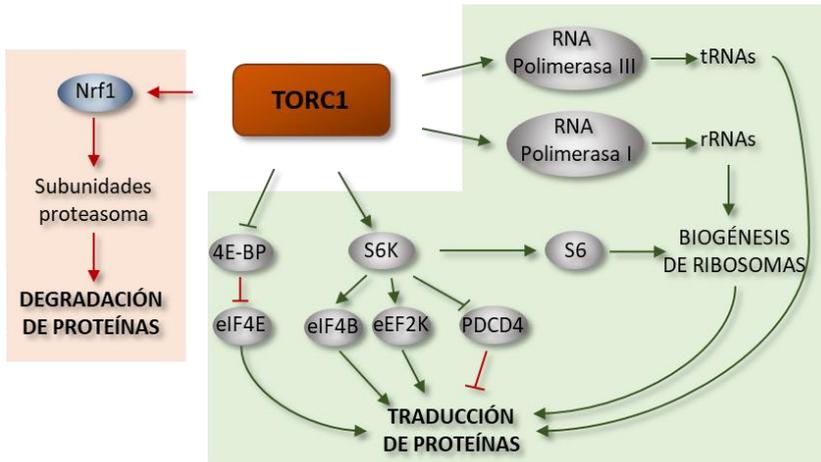


Figura 13. Regulación de la síntesis de proteínas por TORC1. TORC1 es capaz de modular tanto la síntesis como la degradación de proteínas por medio de sus múltiples efectores. eEF2K: *eukaryotic elongation factor 2 kinase*, eIF4B: *eukaryotic initiation factor 4B*, eIF4E: *eukaryotic initiation factor 4E*, Nrf1: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 1*, PDCD4: *programmed cell death 4*, rRNA: *ribosomal RNA*, S6: *ribosomal protein S6*, S6K: *ribosomal protein S6 kinase*, TORC1: *mTOR Complex 1*, tRNA: *transfer RNA*, 4E-BP: *eIF4E-binding protein*.

4.3.2 Autofagia

La mayoría de las condiciones capaces de inducir el proceso de autofagia, como la privación de nutrientes o de factores de crecimiento, o un bajo nivel de energía en la célula, inhiben la actividad de TORC1. Esto sugiere una estrecha relación entre la inducción de autofagia y la actividad de este complejo (Figura 14). TORC1 inhibe el complejo ULK (*autophagy-initiating UNC-5 like autophagy activating kinase complex*) mediante la fosforilación de algunos de sus componentes, como ATG13 (*autophagy related gene 13*) y ULK1/2³⁴⁰⁻³⁴². La inhibición de TORC1 resulta en un incremento de la actividad quinasa de ULK1/2, la cual entonces fosforila ATG13 y RB1CC1, (*RB1 inducible coiled-coil 1*), subunidades críticas del complejo ULK1/2³⁴⁰⁻³⁴².

En células de mamífero, TORC1 fosforila la serina 758 de ULK1, previniendo la interacción y fosforilación de ULK1 por AMPK, esencial para la activación de ULK1³⁴³. De esta forma, la iniciación de la autofagia por ULK es regulada recíprocamente por TORC1 y AMPK en respuesta a cambios en los nutrientes de la célula y los niveles de energía. Además se ha sugerido otra forma de regulación de ULK1 por TORC1 en la que este último inhibe la

estabilidad de ULK1 mediante la fosforilación inhibitoria de AMBRA1 (*autophagy/beclin 1 regulator 1*)³⁴⁴. AMPK y TORC1 también regulan el complejo VPS34 (*vacuolar protein sorting 34*), una PI3K de clase III cuya actividad es crucial para la formación de los autofosomas. VPS34 forma múltiples complejos que tienen otros papeles además del implicado en la autofagia. En respuesta a estrés por nutrientes, AMPK activa el complejo VPS34 proautofágico mediante la fosforilación de Beclin1, mientras que simultáneamente inhibe el complejo VPS34 no autofágico vía fosforilación de Thr163/Ser165 en VPS34³⁴⁵. En contraste, TORC1 fosforila ATG14L (*autophagy related gene 14L*) en el complejo VPS34 e inhibe la actividad quinasa de lípidos de VPS34, proporcionando otro mecanismo de inhibición de autofagia por TORC1³⁴⁶. TORC1 también regula la autofagia a nivel transcripcional modulando la localización de TFEB (*transcription factor EB*), un regulador maestro de la transcripción de genes lisosomales y de autofagia³⁴⁷. Aunque otras quinasas también pueden fosforilar TFEB, se ha visto que TORC1 fosforila directamente a TFEB en las posiciones Ser142 y Ser211, lo que resulta en el secuestro citoplasmático del factor de transcripción^{348,349}. Como transductores clave de la señalización por aminoácidos, las GTPasas Rag pueden unirse y secuestrar TFEB en el lisosoma inhibiendo su actividad³⁵⁰.

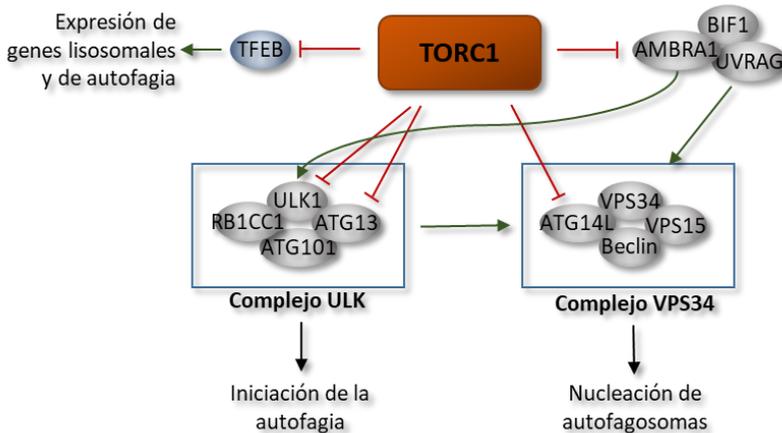


Figura 14. Regulación de la autofagia por TORC1 (adaptado de³⁵¹). TORC1 es capaz de modular el proceso de autofagia por medio de la inhibición de diferentes complejos proteicos y del factor de transcripción TFEB. AMBRA1: *autophagy/beclin 1 regulator 1*, ATG14L: *autophagy related gene 14L*, ATG13: *autophagy related gene 13*, ATG101: *autophagy related gene 13*, TFEB: *transcription factor EB*, TORC1: *mTOR Complex 1*, RB1CC1: *RBI inducible coiled-coil 1*, ULK: *autophagy-initiating UNC-5 like autophagy activating kinase complex*, UVRAG: *UV Radiation Resistance Associated*, VPS15: *vacuolar protein sorting 15*, VPS34: *vacuolar protein sorting 34*.

Introducción

4.3.3 Biogénesis mitocondrial

La generación de nuevas mitocondrias requiere la transcripción de genes del genoma nuclear y del DNA mitocondrial (mtDNA). La transcripción de los genes nucleares está bajo el estrecho control de varios factores de transcripción, incluyendo NRF1 (*Nuclear respiratory factor 1*) y NRF2 (*Nuclear respiratory factor 2*), Sp1 (*stimulatory protein 1*), ERRA (*estrogen-related receptor α*) y YY1 (*Yin-Yang 1 transcription factor*). Estos factores de transcripción están a su vez controlados por el regulador maestro PGC1 α ³⁵². PGC1 α se une a estos factores de transcripción y actúa como un co-activador. La transcripción del mtDNA está en gran medida regulada por el factor TFAM (*transcription factor A in mitochondria*), el cual es también crucial para el mantenimiento del mtDNA ³⁵³. La transcripción del propio TFAM es regulada por PGC1 α y NRF1, sugiriendo un papel central de PGC1 α en la biogénesis mitocondrial. Multitud de estímulos intra- y extracelulares como nutrientes, calcio, ROS, insulina, hipoxia, etc. convergen en PGC1 α para modular la función mitocondrial. Como mediador crítico de muchas de estas señales, mTOR también afecta a la homeostasis de la mitocondria a través de la regulación de su biogénesis ³⁵⁴ (Figura 15).

Se ha visto que la hiperactivación de mTOR en HSCs (*haematopoietic stem cells*) favorece la biogénesis mitocondrial ³⁵⁵. Además, los ratones *knockout* condicionales para TORC1 en el musculo esquelético muestran una reducción de la biogénesis mitocondrial ³⁵⁵. Se ha descrito que TORC1 puede regular la expresión de PGC1 α por medio de YY1 ³⁵⁶. Estos datos sugieren un papel positivo de TORC1 en la biogénesis mitocondrial. Sin embargo, este papel está en conflicto con otras observaciones. Por ejemplo, el ayuno o la restricción calórica, los cuales inhiben la actividad de TORC1, activan PGC1 α y promueven la biogénesis mitocondrial ³⁵⁷. PGC1 α tiene efectos pleiotrópicos en el metabolismo de grasas y de ROS, y estas funciones pueden también influir indirectamente en la biogénesis mitocondrial. De hecho, se ha visto que PGC1 α puede inhibir la generación de ROS ³⁵⁸, mientras que algunas especies reactivas como el H₂O₂ pueden activar la biogénesis de mitocondrias y mejorar la función mitocondrial ³⁵⁹, sugiriendo un mecanismo de regulación de la biogénesis mitocondrial por ROS. La regulación de la biogénesis mitocondrial por parte de mTOR, sea activadora o inhibidora, podría estar modulada por los niveles intracelulares de ROS ³⁵⁴.

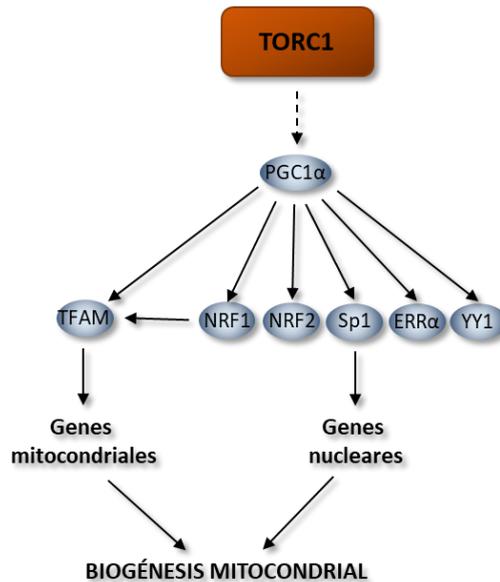


Figura 15. Modulación de la biogénesis mitocondrial por TORC1. El proceso de biogénesis mitocondrial está regulado por diferentes factores de transcripción que controlan la expresión de genes nucleares y mitocondriales. ERRα: *estrogen-related receptor α*, Nrf1: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 1*, Nrf2: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 1*, PGC1α: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*, Sp1: *stimulatory protein 1*, TFAM: *transcription factor A in mitochondria*, TORC1: *mTOR Complex 1*, YY1: *Yin-Yang 1 transcription factor*.

4.3.4 Actividad de otros factores de transcripción

Nrf2

Como se detalló anteriormente, el factor de transcripción Nrf2 responde a incrementos en la concentración de ROS y aumenta la expresión de genes que codifican diversas proteínas implicadas en el mantenimiento del equilibrio redox, tales como las superóxido dismutasas, enzimas para la síntesis de glutatión, tioredoxin reductasas o peroxiredoxinas ³⁶⁰. La abundancia de Nrf2 es controlada por el represor Keap1, que facilita la ubiquitinización y la consecuente degradación por el proteasoma de Nrf2 ^{361–363}. El incremento de las ROS induce la oxidación de varias cisteínas en Keap1, provocando un cambio conformacional que causa la disociación entre Keap1 y Nrf2, el cual pasa a inducir la expresión de genes de respuesta antioxidantes ³⁶⁰.

Introducción

Nrf2 es sensible a la actividad de mTOR, aunque los efectos observados varían en función de los estudios. La activación de Nrf2 mediante su liberación de Keap1 puede incrementarse via TORC1 por medio de autofagia selectiva ³⁶⁴. Sin embargo, un estudio en células HepG2 mostró que, aunque la rapamicina redujo la abundancia basal de Nrf2, no inhibía su acumulación en respuesta a (R)-a-ácido lipoico, un compuesto que induce la expresión de genes dependientes de Nrf2 ³⁶⁵, lo que sugiere que el estrés oxidativo es capaz de incrementar la actividad de Nrf2 de forma independiente de TORC1. Por otra parte, un tratamiento prolongado con rapamicina en fibroblastos humanos reducía la abundancia de Keap1 e incrementaba la acumulación de Nrf2 ³⁶⁶. Por tanto, TORC1 puede tener efectos tanto positivos como negativos sobre Nrf2 dependiendo del tipo celular y de las condiciones experimentales ²⁵⁵.

FOXO

Los factores de transcripción de la familia FOXO (*forkhead box, sub-group O*) son importantes reguladores de la homeostasis celular y juegan un papel protector bajo diferentes tipos de estrés, pero también pueden favorecer mecanismos de muerte celular ³⁶⁷. En diferentes contextos, los factores de transcripción FOXO pueden inducir la expresión de genes que codifican proteínas que bloquean el ciclo celular, activan la apoptosis, mejoran la respuesta antioxidante, promueven la autofagia o modulan la señalización por receptores, incluyendo las rutas de señalización mediadas por mTOR ³⁶⁷.

Hay contextos específicos en los que FOXO puede beneficiarse de la capacidad de TORC1 para atenuar la actividad de TORC2. En linfocitos T, la activación de TORC1 conduce a la reducción de la función de TORC2 junto con una sustancial reducción de las fosforilaciones represoras de FOXO1 y FOXO3 dependientes de TORC2 y AKT en respuesta a la activación de los receptores TCR (*T cell receptor*) ³⁶⁸. Linfocitos T deficientes en TSC1 también muestran mayor inducción de apoptosis tras la activación de los TCR y un incremento en la expresión de varios genes regulados por FOXO como BCL2L11 (*Bcl-2-like protein 11*) y CDKN1A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) ³⁶⁸. Además, el tratamiento con rapamicina en células de cáncer de colon humanas produce tanto una inactivación de FOXO como un incremento en la actividad de AKT ³⁶⁹.

4.4 Regulación y funciones de TORC2

TORC2 es esencial para la función del citoesqueleto de actina^{370,371}, pero también se ha demostrado que es capaz de regular el crecimiento celular, la diferenciación, la proliferación y la homeostasis de lípidos^{372,373}. Parte de la actividad de TORC2 está mediada por la activación y estabilización de la quinasa AKT.

Los mecanismos responsables de la regulación de TORC2 no son todavía conocidos en profundidad. Se ha propuesto que el eje de señalización de factores de crecimiento/PI3K es capaz de activar TORC2 promoviendo la asociación del complejo con ribosomas³⁷⁴. Concretamente, se ha observado que TORC2 es regulado positivamente por TSC2, un efecto independiente de la actividad GAP de TSC1/2 y la inhibición de TORC1³⁷⁵. A su vez TORC2 puede fosforilar un conjunto de proteínas de la familia de quinasas AGC (PKA, PKG y PKC) que median la regulación de la supervivencia celular, el metabolismo y la organización del citoesqueleto³⁷⁶. Como se mencionó previamente, TORC2 es responsable de la fosforilación y activación de AKT³⁷⁷. Dicha proteína media a su vez una interacción positiva hacia TORC1, ya que AKT estimula aguas arriba la actividad de este complejo. Existen varios circuitos de regulación negativa desde TORC1 hacia TORC2 mediados por la disminución de la señalización en la ruta RTK/PI3K. La proteína S6K es capaz de regular negativamente al receptor IRS1 (*insulin receptor substrate 1*), el cual es un mediador positivo de la señalización RTK/PI3K^{378,379}. Además, S6K también puede fosforilar a Rictor, uno de los componentes del complejo TORC2, afectando por tanto a la actividad de éste³⁸⁰. TORC1 también es capaz de inhibir directamente la señalización por RTK/PI3K fosforilando IRS1 y GRB10 (*growth factor-bound protein 10*)³⁸¹⁻³⁸³. Estas interacciones en la señalización de TORC1 y TORC2 permiten que la actividad de ambos complejos esté finamente regulada para responder de forma precisa a las necesidades celulares³⁵¹.

4.5 Señalización de mTOR en enfermedades neurodegenerativas

La ruta de señalización dependiente de mTOR es clave en la regulación de la morfología celular, la migración y la diferenciación durante el desarrollo del cerebro³⁸⁴. También es clave en procesos neurológicos esenciales como la formación de memoria y el establecimiento de ritmos circadianos^{385,386}. En el cerebro, los complejos TORC1 y TORC2 regulan diferentes procesos celulares. TORC1 ejerce funciones relacionadas con la

Introducción

excitabilidad celular, la formación de memoria y el aprendizaje, mientras que el papel de TORC2 está relacionado con la integridad del citoesqueleto y la migración celular (revisado en ³⁸⁷). No obstante, la mayoría de los trastornos neurológicos asociados con la señalización por mTOR han sido relacionados con el complejo TORC1.

Existen muchos indicios a favor del papel crítico de TORC1 en el proceso de envejecimiento ^{388,389}. Modificaciones en la actividad de esta ruta de señalización podrían tener efectos beneficiosos en la senescencia celular ³⁹⁰, lo que resulta de particular relevancia en los trastornos neurodegenerativos. Una señalización aberrante por parte de TORC1 puede tener efectos diferentes en función del tipo celular en el que ocurra, sin embargo, una consecuencia común es la dificultad para la eliminación de agregados proteicos tóxicos que conducen a la muerte celular. En las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington se produce la acumulación anormal de las proteínas tau, α -synucleína y huntingtina respectivamente, y en las tres enfermedades se han descrito alteraciones en la activación de la señalización por mTOR ³⁹¹⁻⁴⁰⁰. También se ha observado, en diferentes modelos de dichas enfermedades, que la inhibición de la señalización de TORC1 mediante rapamicina es capaz de rescatar diferentes fenotipos como la acumulación anormal de las proteínas citadas, lo cual ha sido asociado generalmente a la inducción de la autofagia ^{392,401-403}. Estos resultados suponen un importante estímulo para considerar la señalización por mTOR como una posible diana terapéutica para una cada vez mayor variedad de trastornos neurodegenerativos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis y Objetivos

Este trabajo de tesis doctoral está enmarcado dentro de una línea de investigación en nuestro laboratorio centrada en el uso de *D. melanogaster* para el estudio de la FRDA. El trabajo realizado forma parte de los objetivos del grupo de avanzar en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad y la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y tratamientos para la FRDA.

Hipótesis:

El modelo en *D. melanogaster* de deficiencia de frataxina presenta unos fenotipos similares a los observados en pacientes y otros modelos de la enfermedad, como son una reducción de la capacidad motora y la supervivencia y un elevado incremento en la sensibilidad al estrés oxidativo. Además, se ha observado que en dicho modelo existe también una desregulación del metabolismo del hierro y otros metales y que antioxidantes como la idebenona son capaces de mejorar los fenotipos de las moscas modelo. Todo ello es indicativo de que los mecanismos patológicos que desencadena la deficiencia de frataxina en *Drosophila* y humanos están suficientemente conservados como para proponer este modelo como una herramienta útil en la búsqueda de nuevos tratamientos y dianas terapéuticas.

Drosophila ha sido tradicionalmente uno de los organismos en el que más se han estudiado los mecanismos que regulan la dinámica de la cromatina. Dado que muchos de los procesos moleculares involucrados están conservados entre *Drosophila* y humanos, es posible que también lo estén los mecanismos de represión transcripcional mediados por repeticiones del triplete GAA. Por tanto, puede obtenerse un modelo en la mosca que permita estudiar la represión transcripcional del gen *FXN* en la FRDA.

Objetivos:

1. Identificación de posibles compuestos y dianas terapéuticas relevantes para la modulación y reducción de los fenotipos causados por la deficiencia de frataxina.
2. Obtención y caracterización de un nuevo modelo en *D. melanogaster* basado en la expansión de repeticiones GAA que permita estudiar los mecanismos por los que dichas repeticiones producen la inhibición transcripcional de *FXN*.

Hipótesis y Objetivos

MATERIAL Y MÉTODOS

Material y Métodos

1 Organismos utilizados

1.1 Cepas de *D. melanogaster*

Las diferentes cepas de *D. melanogaster* que han sido utilizadas en el presente trabajo se detallan en las Tablas 2 y 3, en las que se indica su origen, el genotipo y su aplicación en el trabajo. La Tabla 2 muestra las cepas utilizadas en el punto 1 del apartado de Resultados, y la Tabla 3 las empleadas en el punto 2.

Tabla 2. Cepas de *D. melanogaster* utilizadas para el rastreo piloto de compuestos y el estudio de la modulación de TORC1.

Cepa	Origen	Genotipo	Característica principal
<i>yw</i>	BDSC (6598)	$y^1 w^{1118}$	Cepa control
<i>actin-GAL4</i>	BDSC (3954)	$y^1 w^*$; P{w ^{+mC} =Act5C-GAL4}17bFO1/TM6B, Tb ¹	Expresión de la proteína GAL4 bajo el control del promotor del gen <i>actin</i>
<i>UAS-fhIR^{2nd}</i> ; <i>actin-GAL4</i>	Universidad de Valencia	$y^1 w^*$; P{w ^{+mC} =UAS-fhRNAi}; P{w ^{+mC} =Act5C-GAL4}17bFO1/TM6B GAL80	Expresión bajo el control de la proteína GAL4 del dsRNA contra <i>fh</i>
<i>LC3-eGFP</i> ; <i>nos-GAL4</i>	BDSC (8730)	w^* ; P{w ^{+mC} =UASp-eGFP-huLC3}1; P{w ^{+mC} =GAL4::VP16-nos.UTR}CG6325 ^{MVD1}	Expresión de la proteína GAL4 bajo el control del promotor del gen <i>nos</i> y de la proteína de fusión LC3-eGFP
<i>UAS-fhIR^{2nd}</i>	Universidad de Valencia	w^* ; P{w ^{+mC} =UAS-fhRNAi}; 3	Expresión de dsRNA contra <i>fh</i>
<i>UAS-GFP</i>	BDSC (1521)	w^* ; P{w ^{+mC} =UAS-GFP.S65T}Myo31DF ^{T2}	Expresión de GFP
<i>FOXO-GFP</i>	BDSC (43633)	w^{1118} ; P{w ^{+mC} =UASp-foxo.GFP}3	Expresión de la proteína FOXO fusionada a GFP
<i>Cnc-eGFP</i>	BDSC (38631)	w^{1118} ; PBac{y ^{+mDint2} w ^{+mC} =cnc-EGFP.S}VK00037	Expresión de la proteína Cnc fusionada a eGFP
<i>eIF4E1^{LOF}</i>	BDSC (8648)	$y^1 w^*$; P{w ^{+mC} =lacW}eIF4E1 ^{S058911} /TM3, Sb ¹	Alelo de pérdida de función del gen <i>eIF4E1</i>
<i>4E-BP^{LOF}</i>	BDSC (9559)	$y^1 w^*$; Thor ²	Alelo de pérdida de función del gen <i>Thor</i> (<i>4E-BP</i>)
<i>S6k^{DN}</i>	BDSC (6911)	w^{1118} ; P{w ^{+mC} =UAS-S6k.KQ}2	Expresión de un alelo dominante negativo de la proteína S6K
<i>S6k^{CA}</i>	BDSC (6914)	w^{1118} ; P{w ^{+mC} =UAS-S6k.STDETE}2	Expresión de una variante constitutivamente activa de la proteína S6K

actin: Actin 5C, BDSC: Bloomington Drosophila Stock Center, Cnc: factor de transcripción *cap-n-collar*, dsRNA: double-strand RNA, eGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein, *eIF4E1*: eukaryotic translation initiation factor 4E1, FOXO: factor de transcripción *forkhead box, sub-group O*, GFP: Green Fluorescent Protein, LC3: MAP1LC3B (*microtubule associated protein 1 light chain 3 beta*), *nos*: nanos, *S6k*: ribosomal protein S6 kinase, *4E-BP*: Thor o *4E-BP* (*eIF4E-binding protein*).

Material y Métodos

Tabla 3. Cepas de *D. melanogaster* utilizadas para la generación y caracterización del modelo de expansión de repeticiones GAA.

Cepa	Origen	Genotipo	Característica principal
<i>yw</i>	BDSC (6598)	$y^l w^{1118}$	Cepa control
<i>α-Tub-GAL4</i>	BDSC (42732)	P{ry+t7.2=hsFLP}1, P{w+mC=tubP-GAL4}1, P{w+mC=UAS-GFP.T:Myc.T:nls2}1, $y^l w^*$; RpS174 P{w+t* ry+t*=white-un1}70C P{w+mC=tubP-GAL80}LL9 P{ry+t7.2=neoFRT}80B/TM6B, Tb1	Expresión de la proteína GAL4 bajo el control del promotor del gen <i>α-Tub</i>
b9752	BDSC (9752)	$y^l w^{1118}$; PBac{y ⁺ -attP-3B}VK00037	Cepa para la inserción de las construcciones Luc ^c en el cromosoma 2
b24485	BDSC (24485)	y^l M{vas-int.Dm}ZH-2A w*; M{3xP3-RFP.attP}ZH-68E	Cepa para la inserción de la construcción RLuc* en el cromosoma 3
6GAA	Universidad de Valencia	$y^l w^{1118}$; PBac{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-GAA ₆ -L.luciernaga}VK00037	Cepas obtenidas tras la inserción de las construcciones Luc ^c (con 6 o 220 repeticiones GAA) en la cepa b9752
220GAA(1,4,5)	Universidad de Valencia	$y^l w^{1118}$; PBac{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-GAA ₂₂₀ -L.luciernaga}VK00037	
220GAA(2,3)/CyO	Universidad de Valencia	$y^l w^{1118}$; PBac{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-GAA ₂₂₀ -L.luciernaga}VK00037/CyO	
Luc-Renilla	Universidad de Valencia	y^l M{vas-int.Dm}ZH-2A w*; M{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-L.Renilla}ZH-68E	Cepa obtenida tras la inserción de la construcción RLuc ^c en la cepa b24485
<i>E(z)^{LOF}</i>	BDSC (24470)	w*; E(z) ⁷³¹ P{1xFRT.G}2A/TM6C, Sb ¹ Tb ¹	Alelo de pérdida de función del gen <i>E(z)</i>
<i>HDAC1^{LOF}</i>	BDSC (11633)	P{ry ^{+t7.2} =PZ}HDAC1 ⁰⁴⁵⁵⁶ ry[506]/TM3, ry ^{RK} Sb ¹ Ser ¹	Alelo de pérdida de función del gen <i>HDAC1</i>
<i>Su(var)2-5^{dsRNA}</i>	BDSC (33400)	$y^l sc^* v^1$; P{y ^{+t7.7} v ^{+t1.8} =TRiP.HMS00278}attP2	Expresión de un dsRNA contra <i>Su(var)2-5</i>
<i>Su(var)2-5^{LOF}</i>	BDSC (6234)	In(1)w ^{m4B} ; Su(var)2-5 ⁵ /In(2L)Cy, In(2R)Cy, Duox ^{Cy}	Alelo de pérdida de función del gen <i>Su(var)2-5</i>
<i>Su(var)3-9^{LOF}</i>	BDSC (6209)	In(1)w ^{m4} ; Su(var)3-9 ¹ /TM3, Sb ¹ Ser ¹	Alelo de pérdida de función del gen <i>Su(var)3-9</i>

BDSC: *Bloomington Drosophila Stock Center*, dsRNA: *double-strand RNA*, *E(z)*: *Enhancer of zeste*, *HDAC1*: *Histone deacetylase 1*, *Su(var)2-5*: *Suppressor of variegation 205*, *Su(var)3-9*: *Suppressor of variegation 3-9*, *α -Tub*: *α -Tubulin at 84B*.

*Las construcciones Luc y RLuc se describen en el punto 2.1 del apartado Resultados

En la Tabla 4 se resumen los cruces realizados para obtener los individuos objeto de estudio con el genotipo adecuado, así como los experimentos en los que se utilizaron. Generalmente estos cruces se llevaron a cabo con 80-100 hembras y 40-50 machos de las cepas parentales, en tubos de cultivo de 2,6 cm de diámetro y 9,5 cm de altura.

Tabla 4. Cruces realizados con las cepas de *D. melanogaster* y descendencia utilizada.

Cruce	Denominación de descendencia	Genotipo		Experimentos
♀ <i>actin-GAL4</i> x ♂ <i>yw</i>	control	$y^1 w^*/Y$; $P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$		Rastreo piloto de compuestos, Capacidad motora, Supervivencia, Duración desarrollo larvario, qPCRs, Medición MDA+HAE, Medición GSH total, Actividad aconitasa
♀ <i>actin-GAL4</i> x ♂ <i>UAS-fhIR^{2nd}</i>	<i>fhRNAi</i>	$y^1 w^*/Y$; $P\{w^{+mC}=UAS-fhRNAi\}/2$; $P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$		Rastreo piloto de compuestos, Capacidad motora, Supervivencia, Duración desarrollo larvario, qPCRs, Medición MDA+HAE, Medición GSH total, Actividad aconitasa
♀ <i>actin-GAL4</i> x ♂ <i>UAS-GFP</i>	control/GFP	$y^1 w^*/Y$; $UAS-GFP/2$; $P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$		Interferencia rapamicina-GAL4/UAS
♀ <i>LC3-eGFP</i> ; <i>nos-GAL4</i> x ♂ <i>yw</i>	control/LC3-eGFP	$w^*/y^1 w^{118}$; $P\{w^{+mC}=UASp-eGFP-huLC3\}1/2$; $P\{w^{+mC}=GAL4:VP16-nos.UTR\}CG6325^{MVD1}/3$	w^*/Y ; $P\{w^{+mC}=UASp-eGFP-huLC3\}1/2$; $P\{w^{+mC}=GAL4:VP16-nos.UTR\}CG6325^{MVD1}/3$	Cuantificación señal LC3-eGFP en larvas
♀ <i>LC3-eGFP</i> ; <i>nos-GAL4</i> x ♂ <i>UAS-fhIR^{2nd}</i>	<i>fhRNAi/LC3-eGFP</i>	w^*/w^* ; $P\{w^{+mC}=UASp-eGFP-huLC3\}1/P\{w^{+mC}=UAS-fhRNAi\}$; $P\{w^{+mC}=GAL4:VP16-nos.UTR\}CG6325^{MVD1}/3$	w^*/Y ; $P\{w^{+mC}=UASp-eGFP-huLC3\}1/P\{w^{+mC}=UAS-fhRNAi\}$; $P\{w^{+mC}=GAL4:VP16-nos.UTR\}CG6325^{MVD1}/3$	Cuantificación señal LC3-eGFP en larvas
♀ <i>actin-GAL4</i> x ♂ <i>Cnc-eGFP</i>	control/Cnc-EGFP	$y^1 w^*/Y$; $PBac\{y^{+mDint2} w^{+mC}=cnc-EGFP.S\}VK00037/2$; $P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$		Ratio Cnc Nuclear/Total en adultos
♀ <i>UAS-fhIR^{2nd}</i> ; <i>actin-GAL4</i> x ♂ <i>Cnc-eGFP</i>	<i>fhRNAi/Cnc-EGFP</i>	$y^1 w^*/Y$; $P\{w^{+mC}=UAS-fhRNAi\}/PBac\{y^{+mDint2} w^{+mC}=cnc-EGFP.S\}VK00037$; $P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$		Ratio Cnc Nuclear/Total en adultos
♀ <i>actin-GAL4</i> x ♂ <i>FOXO-GFP</i>	control/FOXO-GFP	$y^1 w^*/w^{118}$; $P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$; $P\{w^{+mC}=UASp-foxo.GFP\}3$	$y^1 w^*/Y$; $P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$; $P\{w^{+mC}=UASp-foxo.GFP\}3$	Ratio FOXO Nuclear/Total en larvas
♀ <i>UAS-fhIR^{2nd}</i> ; <i>actin-GAL4</i> x ♂ <i>FOXO-GFP</i>	<i>fhRNAi/FOXO-GFP</i>	$y^1 w^*/w^{118}$; $P\{w^{+mC}=UAS-fhRNAi\}$; $P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$; $P\{w^{+mC}=UASp-foxo.GFP\}3$	$y^1 w^*/Y$; $P\{w^{+mC}=UAS-fhRNAi\}$; $P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$; $P\{w^{+mC}=UASp-foxo.GFP\}3$	Ratio FOXO Nuclear/Total en larvas

Material y Métodos

♀ <i>UAS-fhIR^{2nd}; actin-GAL4</i> x ♂ <i>yw</i>	<i>fhRNAi</i>	$y^1 w^*/Y; P\{w^{+mC}=UAS-fhRNAi\}/2; P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$	Medición ATP, Capacidad motora
♀ <i>actin-GAL4</i> x ♂ <i>S6k^{CA}</i>	control/ <i>S6k^{CA}</i>	$y^1 w^*/Y; P\{w^{+mC}=UAS-S6k.STDETE\}2/2; P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$	Medición ATP, Capacidad motora
♀ <i>actin-GAL4</i> x ♂ <i>S6k^{DN}</i>	control/ <i>S6k^{DN}</i>	$y^1 w^*/Y; P\{w^{+mC}=UAS-S6k.KQ\}2/2; P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$	Medición ATP, Capacidad motora
♀ <i>actin-GAL4</i> x ♂ <i>eIF4E1^{LOF}</i>	control/ <i>eIF4E1^{LOF}</i>	$y^1 w^*/Y; P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/P\{w^{+mC}=lacW\}eIF-4E^{S058911}$	Medición ATP, Capacidad motora
♀ <i>actin-GAL4</i> x ♂ <i>4E-BP^{LOF}</i>	control/ <i>4E-BP^{LOF}</i>	$y^1 w^*/Y; Thor^2/2; P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$	Medición ATP, Capacidad motora
♀ <i>UAS-fhIR^{2nd}; actin-GAL4</i> x ♂ <i>S6k^{CA}</i>	<i>fhRNAi/S6k^{CA}</i>	$y^1 w^*/Y; P\{w^{+mC}=UAS-fhRNAi\}/P\{w^{+mC}=UAS-S6k.STDETE\}2; P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$	Medición ATP, Capacidad motora
♀ <i>UAS-fhIR^{2nd}; actin-GAL4</i> x ♂ <i>S6k^{DN}</i>	<i>fhRNAi/S6k^{DN}</i>	$y^1 w^*/Y; P\{w^{+mC}=UAS-fhRNAi\}/P\{w^{+mC}=UAS-S6k.KQ\}2; P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$	Medición ATP, Capacidad motora
♀ <i>UAS-fhIR^{2nd}; actin-GAL4</i> x ♂ <i>eIF4E1^{LOF}</i>	<i>fhRNAi/eIF4E1^{LOF}</i>	$y^1 w^*/Y; P\{w^{+mC}=UAS-fhRNAi\}/2; P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/P\{w^{+mC}=lacW\}eIF-4E^{S058911}$	Medición ATP, Capacidad motora
♀ <i>UAS-fhIR^{2nd}; actin-GAL4</i> x ♂ <i>4E-BP^{LOF}</i>	<i>fhRNAi/4E-BP^{LOF}</i>	$y^1 w^*/Y; P\{w^{+mC}=UAS-fhRNAi\}/Thor^2; P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4\}17bFO1/3$	Medición ATP, Capacidad motora
♀ GAA-CONTROL x ♂ Modificador	GAA-CONTROL/ <i>Modificador</i>	Genotipo dependiente del modificador empleado*	Rastreo piloto de modificadores de PEV
♀ GAA-EXP x ♂ Modificador	GAA-EXP/ <i>Modificador</i>	Genotipo dependiente del modificador empleado*	Rastreo piloto de modificadores de PEV

actin: Actin 5C, BDSC: Bloomington Drosophila Stock Center, Cnc: factor de transcripción *cap-n-collar*, eGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein, *eIF4E1*: eukaryotic translation initiation factor 4E1, FOXO: factor de transcripción *forkhead box, sub-group O*, GFP: Green Fluorescent Protein, LC3: MAP1LC3B (*microtubule associated protein 1 light chain 3 beta*), *nos*: *nanos*, PEV: *position effect variegation*, *S6k*: *ribosomal protein S6 kinase*, *4E-BP*: *eIF4E-binding protein*.

*Estos cruces se detallan en la Tabla 16 del apartado Material Suplementario.

1.2 Líneas celulares

Se han utilizado varias líneas celulares derivadas de la línea SH-SY5Y, todas ellas obtenidas por el grupo de investigación de la Dra. González Cabo ⁴⁰⁴. La línea celular SH-SY5Y deriva de la línea de neuroblastoma humano SK-N-SH, que a su vez procede de un tumor embrionario derivado de células precursoras del sistema nervioso periférico. En este trabajo se emplearon la línea SH-SY5Y *wild type* (denominada SH-SY5Y); una línea transfectada con el plásmido pLKO.1-NT, capaz de activar el mecanismo de silenciamiento génico por RNAi, pero sin ninguna diana en humanos (denominada pLKO.1-NT); y una línea transfectada con el vector pLKO.1-FXN (denominada FXN-138.1), la cual expresa un shRNA (*short hairpin RNA*) contra el gen *FXN*.

Para transfectar las construcciones Luc y RLuc se utilizó la línea S2R+ derivada de células S2 (*Schneider 2*) de *D. melanogaster*. Esta línea se obtuvo del DGRC (*Drosophila Genomics Resource Center*) de la Universidad de Indiana (Estados Unidos).

2 Condiciones de cultivo y tratamientos en *D. melanogaster*

2.1 Condiciones y medios de cultivo

Los cruces y el mantenimiento de los individuos de *D. melanogaster* se llevaron a cabo en el medio de cultivo estándar, compuesto de (cantidades para 1L): 985 mL de H₂O, 10,5 g de agar, 60 g de levadura, 10 g de harina de soja, 60 g de harina de maíz, 50 g de azúcar, 5 mL de ácido propiónico, 10 mL de etanol y 3 g de Nipagín.

Cuando se añadieron los diferentes compuestos, el medio se preparó con las mismas proporciones indicadas arriba, con la excepción de que se emplearon 3/4 partes de la cantidad de H₂O necesaria. La cuarta parte de H₂O restante se añadió a la mezcla tras haber disuelto en ella el compuesto a ensayar. Para facilitar la disolución de los compuestos menos hidrosolubles, se utilizó dimetilsulfoxido (DMSO) a una concentración final, en el medio, del 0,1% (v/v). Como medio control se empleó medio estándar suplementado con DMSO al 0,1% (v/v), citado a lo largo del trabajo como medio Vehículo.

En los tratamientos con los compuestos, los cruces se realizaron en el medio que contenía el compuesto correspondiente para cada experimento. De esta forma los tratamientos comenzaban desde las primeras etapas del desarrollo de los descendientes de los cruces. Tras

Material y Métodos

la eclosión de las pupas, los adultos se transferían a nuevos tubos con los compuestos, cambiándose el medio cada tres días. Los tubos con los cruces y con los descendientes adultos se mantuvieron a 25°C con un ciclo luz/oscuridad de 16/8 horas.

2.2 Selección de los compuestos y determinación de las concentraciones utilizadas

En la Tabla 5 se relacionan los compuestos que han sido ensayados en este trabajo, así como las concentraciones utilizadas en cada caso.

Para determinar la concentración óptima de los diferentes compuestos se siguió el siguiente procedimiento:

- I. Se determinó de forma aproximada la concentración a emplear a partir de las dosis utilizadas en humanos. Puesto que las diferencias a nivel de metabolismo, actividad u otros procesos pueden ser considerables entre los diferentes organismos, el interés de esta primera aproximación fue el de conocer los órdenes de magnitud de concentración del compuesto a partir de los que comenzar los ensayos.

A partir de dosis empleadas en humanos de “x” en mg de compuesto/Kg peso individuo/día, suponiendo un individuo de 70 kg y una ingesta de alimento aproximada de 0,5 Kg/día, la concentración calculada para el medio de *D. melanogaster* fue de:

$$[mg \text{ compuesto} / Kg \text{ de medio de cultivo}] = \frac{x \text{ mg/Kg/Día} \cdot 70 \text{ Kg}}{0,5 \text{ Kg/Día}}$$

El valor obtenido permite preparar el medio de cultivo con el compuesto añadiendo éste en una proporción similar a la que representaría el fármaco en el alimento humano.

- II. Cada compuesto se probó, por primera vez, a una concentración un orden de magnitud superior. En caso de que se observasen efectos deletéreos o una reducción de la capacidad motora de los individuos control, se procedía a realizar un nuevo ensayo con el compuesto a una concentración 1/2 de la original. Los resultados mostrados corresponden a aquellas concentraciones ensayadas en las que ya no se observaron efectos negativos en la viabilidad o capacidad motora de los individuos control (Tabla 5).

Tabla 5. Compuestos y concentraciones utilizadas en los diferentes tratamientos.

Medio	Composición
Alopurinol [#] *405	Alopurinol (Sigma-Aldrich) 29 μ M + DMSO (Sigma-Aldrich) 0,1% (v/v)
Alfa-tocoferol [#] *406	α -tocoferol (Sigma-Aldrich) 10 mg/mL + DMSO 0,1% (v/v)
BCS	BCS (Sigma-Aldrich) 300 μ M
Celastrol [#] *407	Celastrol (Sigma-Aldrich) 22 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
Curcumina [#] *408	Curcumina (Sigma-Aldrich) 30 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
Dalfampridina [#] *409	Dalfampridina (Sigma-Aldrich) 1,06 mM + DMSO 0,1 (v/v)
Deferiprona	Deferiprona (Sigma-Aldrich) 163 μ M
Dexpramipexol	Dexpramipexol (Sigma-Aldrich) 176 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
Dexrazoxano [#] *410	Dexrazoxano (Sigma-Aldrich) 6,2 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
Dimebon	Dimebon (Sigma-Aldrich) 153 μ M+ DMSO 0,1% (v/v)
Fenilbutirato de Na [#] *411	Fenilbutirato de Sodio (Sigma-Aldrich) 540 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
Idebenona [#]	Idebenona (Sigma-Aldrich) 15 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
Melatonina [#] *412	Melatonina (Sigma-Aldrich) 215 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
Metformina [#] *413	Metformina (Sigma-Aldrich) 10 mM + DMSO 0,1% (v/v)
Metilcobalamina	Metilcobalamina (Sigma-Aldrich) 140 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
Olesoxime [#]	Olesoxime (Sigma-Aldrich) 25 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
Piracetam	Piracetam (Sigma-Aldrich) 6,25 mM + DMSO 0,1% (v/v)
Pterostilbeno	Pterostilbeno (Pascual y Furió) 176 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
RAP [#] *414 0,5 μ M	Rapamicina (LC Laboratories) 0,5 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
RAP 1 μ M/RAP	Rapamicina (LC Laboratories) 1 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
RAP + 3-MA	Rapamicina (LC Laboratories) 1 μ M + 3-Metiladenina (Sigma-Aldrich) 67 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
Riluzol [#]	Riluzol (Sigma-Aldrich) 107 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
Temsirolimus [#]	Temsirolimus (Sigma-Aldrich) 16 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
TPEN	TPEN (Sigma-Aldrich) 10 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
TTM	TTM (Sigma-Aldrich) 10 μ M + DMSO 0,1% (v/v)
Vehículo	DMSO 0,1% (v/v)
Z. A. dihidrato	Zinc acetato dihidrato (Sigma-Aldrich) 2,85 mM + DMSO 0,1% (v/v)
3-MA	3-Metiladenina (Sigma-Aldrich) 67 μ M + DMSO 0,1% (v/v)

DMSO: Dimetilsulfóxido, BCS: *bathocuproine disulfonate*, RAP: rapamicina, TPEN: *N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine*, TTM: *tetrathiomolybdate*, Z. A. dihidrato: zinc acetato dihidrato, 3-MA: 3-metiladenina.

[#]Compuestos con reducida solubilidad en H₂O, disueltos en primer lugar en DMSO 100%

*Compuestos también ensayados en *D. melanogaster* en otros estudios

Material y Métodos

Para descartar posibles interferencias entre la rapamicina y el sistema de expresión GAL4/UAS, se comprobó el efecto del compuesto en individuos que expresan una construcción UAS-GFP. Para ello se homogeneizaron 30 individuos control/GFP en PBS (*Phosphate-Buffered Saline*; NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4) y se realizó una centrifugación a 3000 g. El sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos para la medición de la fluorescencia en un equipo *VICTOR spectrophotometer* (Perkin-Elmer), empleando una longitud de onda de excitación y emisión de 485 nm y 535 nm, respectivamente. Los valores de fluorescencia se normalizaron por la concentración de proteína del extracto de cada muestra, determinada mediante un ensayo de Bradford. Los resultados se presentan en porcentaje, correspondiendo el 100% a la fluorescencia media observada en el medio Vehículo.

3 Cultivo y tratamiento de las líneas celulares

3.1 Cultivo y tratamiento en células SH-SY5Y

Las células fueron crecidas en medio DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*) suplementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado 10%, L-glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina 100 mg/mL, a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Las células pLKO.1-NT y FXN-138.1 se mantenían además con puromicina 2 µg/mL para favorecer la selección de los clones transfectados de manera estable.

Como inhibidores ATP competitivos de la actividad quinasa de la proteína mTOR se emplearon Torin1 (Selleckchem, No. S2827) y XL388 (MCE, Medchem Express). Ambos compuestos se disolvieron, en primer lugar, en DMSO 100% para producir soluciones stock de 1 mM. Como medio control se utilizó medio suplementado con DMSO al 0,5% (medio Vehículo), siendo ésta la misma concentración de DMSO presente en los medios que contienen Torin1 o XL388. Para realizar los diferentes experimentos, las células se sembraron en el soporte adecuado (placas de 6 cm, placas de 6 pocillos o placas de 96 pocillos) y se dejaron crecer durante 24 h. Tras ese periodo, el medio se cambió por medio nuevo con los compuestos a una concentración final de 1 µM y tras otras 24 h con el tratamiento, se procedió a realizar el procedimiento experimental correspondiente.

3.2 Cultivo de células S2

Las células S2R+ transfectadas con las construcciones pMT-GAL4, Luc y RLuc se crecieron en medio Schneider, a 37°C en atmosfera sin aporte adicional de CO₂. Los dsRNAs (*double-strand RNA*) para la interferencia de los genes *Su(var)2-5*, *Su(var)3-9* y *Pc* se obtuvieron del DRSC/TRiP *Functional Genomics Resources* de la *Harvard Medical School*.

4 Ensayo de la capacidad motora

Para estudiar la capacidad motora de los adultos de *D. melanogaster*, se introdujeron grupos de aproximadamente 15 machos de 1 semana de edad en tubos transparentes de 1,5 cm de diámetro y 25 cm de altura con una escala graduada impresa en la pared posterior del tubo. Los individuos permanecían durante 1 min dentro del tubo, tras lo cual se les hacía descender hasta el fondo agitando el tubo suavemente. A continuación, se grababa el ascenso de los individuos y se registraba la altura alcanzada por cada uno de ellos a los 10 s de comenzar el ascenso. Para cada condición se ensayaron aproximadamente 100 individuos de cada genotipo y los ensayos se realizaron aproximadamente a la misma hora del día. La capacidad motora se midió como la velocidad media de ascenso y se representa en porcentaje, considerando como 100% la velocidad media de los individuos control en el medio Vehículo.

5 Ensayo de la supervivencia y medición de la duración del desarrollo

La supervivencia se determinó a partir de 100 machos adultos por condición registrando el número de individuos muertos cada 3 días.

La supervivencia en hiperoxia se midió empleando tres réplicas de 30 machos adultos. A partir de la eclosión de la pupa, los individuos se sometieron durante 4 días a una atmosfera con un flujo constante de oxígeno al 99,5%. Los resultados indican el porcentaje de individuos muertos tras el cuarto día.

Para determinar el tiempo requerido por los individuos para completar el desarrollo hasta adulto, tras los cruces correspondientes, los parentales se eliminaron de los tubos a los 2 días del cruce. A continuación, se contó el número de días requeridos por la F1 en eclosionar de la pupa. Se determinó como día 0 el día que se estableció el cruce, y se contaron únicamente los machos del genotipo de interés (control o *fhRNAi*). Los resultados indican el tiempo promedio, en días, requerido por la F1 en eclosionar de la pupa.

6 Cuantificación de la señal LC3-eGFP

6.1 Condiciones de cultivo

Las cepas *yw* y *UAS-fhIR*^{2nd} se cruzaron con la cepa LC3-eGFP; *nos*-GAL4, la cual expresa la proteína MAP1LC3B (*Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B*) como una proteína de fusión con eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) bajo el control del promotor del gen *nanos* (*nos*). LC3 puede utilizarse como marcador de autofagia al estar asociada con diferentes estructuras autofagosomales⁴¹⁵. El conteo de puntos fluorescentes (LC3-eGFP) se realizó en el cuerpo graso de larvas de tercer estadio en condiciones de normóxia o hiperoxia. En este último caso, las larvas se mantuvieron en una atmósfera con un flujo constante de oxígeno al 99,5% durante el día anterior a la extracción del cuerpo graso.

6.2 Extracción y fotografía del cuerpo graso

Las larvas se sumergieron en PBS pH 7,4, y con la ayuda de una lupa binocular, pinzas y lanceta, se extrajeron los cuerpos grasos y se transfirieron a un portaobjetos. A continuación, se depositó una gota de PBS sobre el material extraído y se colocó el cubreobjetos sin presionar sobre la muestra. Los puntos LC3-eGFP se visualizaron y fotografiaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM 2500 (Leica Microsystems) y un objetivo de 40 aumentos.

6.3 Análisis de las imágenes y cuantificación de los puntos LC3-eGFP

Con el fin de realizar un conteo automático de puntos, todas las imágenes tomadas se procesaron del siguiente modo (Figura 16). En primer lugar, se eliminaron las diferencias en el nivel de iluminación de diferentes regiones de cada imagen, lo que ocasionaría una incorrecta binarización de la misma, dejando puntos LC3-eGFP sin detectar. La imagen se duplicó y se realizó un desenfoque aplicando unos parámetros suficientemente agresivos como para no percibir los puntos fluorescentes de forma individual. La imagen resultante muestra el posible gradiente de iluminación. A continuación, se obtuvo una nueva imagen resultante de la diferencia de la imagen original y la desenfocada, que muestra todos los puntos LC3-eGFP con una intensidad similar. Posteriormente, con el programa ImageJ, la última imagen se pasó a escala de grises y se binarizó de forma que se pudieran seleccionar

los puntos fluorescentes. Por último, se aplicó el proceso *watershed* para separar puntos en contacto, y se procedió al conteo de objetos, dando como resultado el número de puntos LC3-eGFP de la imagen. Los resultados indican la señal LC3-eGFP en porcentaje, correspondiendo el 100% al número de puntos promedio de los individuos control en medio Vehículo.

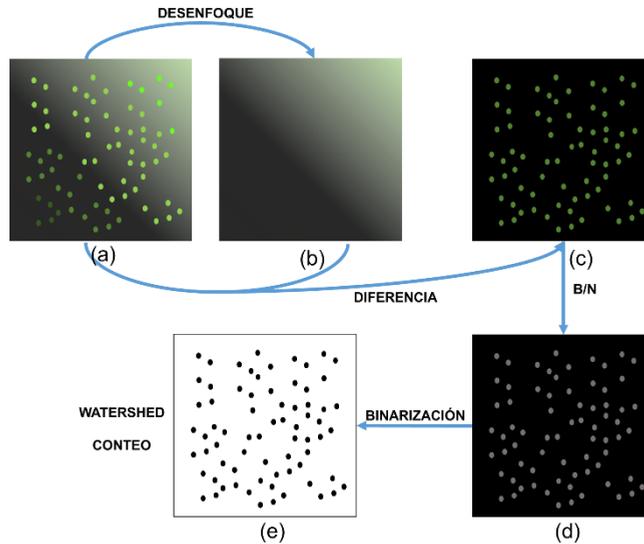


Figura 16. Procesado de imágenes para el conteo de puntos LC3-eGFP. (a): Imagen original de microscopía de fluorescencia. (b): Desenfoque de (a) para obtener el posible gradiente de iluminación. (c): Diferencia entre (a) y (b) para obtener puntos de fluorescencia de intensidad similar en toda la imagen. (d): Imagen (c) en escala de grises para su binarización en puntos fluorescentes y fondo. (e): Aplicación del proceso *watershed* y conteo del número de puntos de la imagen binarizada.

7 Ensayos bioquímicos

Los ensayos bioquímicos se realizaron por triplicado utilizando muestras de 30 machos de 1 semana de edad por condición.

7.1 Medición de la concentración de malondialdehído + hidroxialquenes

Para la medición de los niveles de malondialdehído (MDA) + hidroxialquenes (HAE) se empleó el Kit *BIOXYTECH LPO-586 ASSAY* (Oxis International, Catalog No. 21012) siguiendo el proceso, adaptado al uso en *D. melanogaster*, descrito a continuación:

Material y Métodos

- I. Se homogeneizó la muestra en 550 μ l de tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, butilhidroxitolueno (BHT) 5 mM) empleando el equipo *TissueLyser LT* (Qiagen) 5 min a 50 hz. El BHT impide la oxidación posterior de la muestra y se emplea preparando previamente una solución stock de BHT 0,5 M en acetonitrilo.
- II. Los tubos se centrifugaron a 3000 g durante 10 min a 4°C y se transfirió aproximadamente 400 μ L de sobrenadante a un nuevo tubo, manteniéndolo en hielo.
- III. Se prepararon diferentes diluciones de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMOP) en tampón de extracción para la realización de una curva estándar. El TMOP se hidroliza durante la incubación ácida a 45°C para producir MDA.
- IV. Se transfirieron a tubos de 1,5 mL 100 μ L de los extractos de las muestras o de las diluciones de la curva estándar y se añadió 325 μ L de una mezcla 3:1 de N-metil-2-fenilindol en acetonitrilo y Fe férrico en metanol (Reactivo R1 diluido). Se mezcló con vortex durante 5-10 s. A un tubo de cada muestra, se añadió una mezcla 3:1 de acetonitrilo y Fe férrico en metanol (acetonitrilo/diluyente) en lugar de reactivo R1 diluido. La absorbancia registrada para la reacción de dicho tubo hizo de blanco para el resto de reacciones de la misma muestra.
- V. Se añadió a cada tubo 75 μ L de ácido metanosulfónico (MSA) y se incubó a 45°C durante 1 h. El empleo de MSA permite obtener un valor conjunto de la cantidad de MDA y HAE.
- VI. Los tubos se centrifugaron a 15000 g durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a cubetas de espectrofotómetro y se registró la absorbancia a 586 nm (A_{586}) de cada reacción. Las mediciones de A_{586} se realizaron en un equipo *Spectronic Genesys 5 spectrophotometer* (Milton Roy).
- VII. Con el resto del extracto obtenido en el punto II, se calculó la concentración de proteína mediante un ensayo de Bradford, y con ayuda de la curva estándar se determinó para cada muestra la concentración de MDA + HAE en nmol/ μ g de proteína.

$$[MDA + HAE \text{ (nmol}/\mu\text{g proteína)}] = \frac{\left(\frac{A_{586} - A_{bm}}{m} - b\right) \times fd}{[\text{proteína muestra } (\mu\text{g/L})]}$$

A₅₈₆: Absorbancia de la muestra a 586 nm

A_{bm}: blanco de la muestra

b y *m*: intersección y pendiente de la recta de regresión calculada a partir de las diluciones de TMOP (representando la concentración de MDA + HAE resultante en nmol/L)

fd: factor de dilución

7.2 Medición de la concentración total de glutatión

Para la medición de la concentración de glutatión (GSH) total se empleó el kit *BIOXITECH GSH-420* (Oxis International, Catalog No. 21023) siguiendo el proceso descrito a continuación:

- I. Se homogeneizó la muestra en 500 μl de NaCl 0,9% empleando el equipo TissueLyser LT (Qiagen) 5 min a 50 hz.
- II. Los tubos se centrifugaron a 3000 g durante 5 min a 4°C y se transfirió aproximadamente 400 μL de sobrenadante a un nuevo tubo, manteniéndolo en hielo.
- III. Se añadió a otro tubo 100 μL del sobrenadante de la muestra y 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) y se centrifugó a 3000 g durante 10 min a 4°C.
- IV. Se prepararon tres tubos con H₂O, calibrador *low* (Glutatión disulfuro 75 mM, equivalente a GSH 150 μM , en fosfato potásico 125 mM) y calibrador *high* (Glutatión disulfuro 175 mM, equivalente a GSH 350 μM , en fosfato potásico 125 mM) para obtener las reacciones de calibración.
- V. Se transfirió a tubos de 1,5 mL 100 μL de las extracciones de las muestras precipitadas con TCA o del contenido de los tubos para las reacciones de calibración y se añadió por orden los siguientes componentes:
 - a. 100 μL de tampón (fosfato potásico, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), Lubrol, pH 7,8).
 - b. 100 μL de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en HCl (agente reductor). Agitar brevemente.

Material y Métodos

- c. 100 μL de 1-Metil-4-cloro-7-trifluorometilquinolinio metilsulfato en HCl (cromógeno). Agitar brevemente.
 - d. 100 μL de NaOH en H_2O (desarrollador de color). Agitar brevemente.
- VI. Se incubaron las reacciones durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad y se midió la absorbancia a 420 nm (A_{420}) en cubetas de espectrofotómetro. Las mediciones de A_{420} se realizaron en un equipo *Spectronic Genesys 5 spectrophotometer* (Milton Roy).
- VII. Con el resto del extracto obtenido en el punto II, se calculó la concentración de proteína mediante un ensayo de Bradford, y con ayuda de las reacciones de calibración se determinó para cada muestra la concentración de GSH total en mmol/ μg de proteína.

$$[GSH \text{ total (mmol}/\mu\text{g proteína)}] = \frac{\left(\frac{A_{420} - b}{m}\right) \times fd}{[\text{proteína muestra } (\mu\text{g/L})]}$$

A_{420} : Absorbancia de la muestra a 520 nm

b y m : intersección y pendiente de la recta de regresión calculada a partir de los calibradores (representando la concentración de GSH en mmol/L)

fd : factor de dilución

7.3 Medición de la actividad aconitasa en hiperoxia

Para la medida de la actividad aconitasa en hiperoxia, los individuos se incubaron en normoxia durante 5 días y posteriormente en una atmosfera con un flujo constante de oxígeno al 99,5% durante dos días consecutivos. La actividad aconitasa se determinó empleando el kit *Bioxytech Aconitase-340 Spectrophotometric Assay* (Oxis International, Catalog No. 21041) siguiendo el proceso descrito a continuación:

- I. Se homogeneizó la muestra en 500 μl de tampón de extracción (citrato sódico 0,2 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) empleando el equipo *TissueLyser LT* (Qiagen) 5 min a 50 Hz.
- II. Los tubos se centrifugaron a 800 g durante 10 min a 4°C y se pasaron 200 μL del sobrenadante a tubos nuevos, manteniéndolos en hielo.
- III. Se sonicaron los tubos durante 30 s (UP100H Ultrasonic Processor, Hielscher. Ciclo: 0,5 s, Amplitud: 60%).

- IV. Se diluyeron las muestras a 200 µg/mL en Tris-HCl pH 7,4 y se transfirió 25 µL a una placa de 96 pocillos transparente. Cada muestra se ensayó por triplicado. Se cargaron también tres pocillos con tampón de ensayo (Tris-HCl pH 7,4) para actuar de blanco.
- V. Se añadió a cada pocillo los siguientes componentes por orden:
- 25 µL de citrato trisódico en Tris-HCl pH 7,4 (sustrato)
 - 25 µL de isocitrato Deshidrogenasa en Tris-HCl (enzima)
 - 25 µL NADP⁺ en Tris-HCl
- VI. Se registraron los valores de absorbancia a 340 nm (A_{340}) cada minuto durante 45-60 minutos a 37°C. Las medidas de A_{340} se realizaron en un equipo *Infinite M200 Pro* (TECAN).
- VII. La actividad aconitasa es proporcional al incremento de A_{340} por minuto en la zona lineal de la curva de valores obtenida, por lo que la actividad se calculó de forma relativa como:

$$\text{Actividad aconitasa (unidades relativas)} = \frac{\Delta A_{340} - \Delta A_b}{[\text{proteína}]}$$

ΔA_{340} : Incremento por minuto de A_{340} para cada muestra

ΔA_b : Incremento por minuto del blanco

[proteína]: concentración de proteína de la muestra determinada mediante el método de Bradford.

Los resultados indican la actividad aconitasa en porcentaje, correspondiendo el 100% a los valores obtenidos para los individuos control en el medio Vehículo.

7.4 Medición del nivel de ATP

Para la medición de los niveles de ATP en *D. melanogaster* se empleó el reactivo *ATP Detection Reagent* del kit *Mitochondrial ToxGlo Assay* (Promega, G8000) siguiendo el proceso descrito a continuación:

Material y Métodos

- I. Se homogeneizó la muestra en 500 μ l de tampón de extracción (sacarosa 0,25 M, HEPES-NaOH 10 mM pH 7,4, Triton X-100 0,1%, Na_3VO_4 5 mM) empleando el equipo *TissueLyser LT* (Qiagen) durante 5 min a 50 hz.
- II. Los tubos se centrifugaron a 1000 g durante 10 min a 4°C y se pasó 200 μ L del sobrenadante a un tubo nuevo.
- III. En placa blanca de 96 pocillos, se depositó en un pocillo 50 μ L de cada extracción y se añadió 50 μ L del *ATP detection reagent*. La muestra y el reactivo se mezclaron en un agitador orbital a 200 rpm durante 2 min a temperatura ambiente.
- IV. Se registraron los valores de luminiscencia cada minuto durante 60-90 min. Se utilizó para cada muestra el promedio de los valores en los que la reacción se ha estabilizado. Para cada muestra se dividió dicho promedio por la concentración de proteína calculada en un ensayo BCA (*bicinchoninic acid assay*) y se representaron los valores de ATP como porcentaje, correspondiendo el 100% al valor obtenido por los individuos control en el medio Vehículo. Los valores de luminiscencia se midieron con un equipo *Infinite M200 Pro* (TECAN).

Para cuantificar los niveles de ATP en células SH-SY5Y se empleó el kit *CellTiter-Glo* (Promega, G7570) y se siguieron los siguientes pasos:

- I. Se sembraron las células en placa de 96 (10⁴ células por pocillo), se dejaron crecer durante 24 h y se aplicaron los tratamientos con los compuestos Torin1 y XL388 durante las 24 h siguientes.
- II. Se aspiró el medio y se añadió 50 μ L de medio nuevo sin compuestos.
- III. Se añadió a los pocillos 50 μ L de reactivo *CellTiter-Glo* reconstituido y se mantuvo la placa en agitación orbital durante 10 min a 100 rpm.
- IV. Se midió la luminiscencia producida y se normalizaron los valores obtenidos por la concentración de proteína del lisado calculada mediante un ensayo BCA. Se empleó un equipo *Infinite M200 Pro* (TECAN) para obtener las medidas de luminiscencia.

7.5 Ensayo de la actividad luciferasa de luciérnaga/renilla

7.5.1 Obtención de la muestra en *D. melanogaster*

Para los ensayos de medición de la actividad de las luciferasas se utilizaron 4 réplicas de 10 hembras. El proceso seguido para la obtención de la muestra fue el siguiente:

- I. Se homogeneizó cada muestra en 500 μ L de tampón de lisis pasivo 1X (Promega, E194) empleando el equipo *TissueLyser LT* (Qiagen) 1 min a 50 hz.
- II. Los tubos se mantuvieron en hielo en agitación orbital a 150 rpm durante 15 min.
- III. Se centrifugaron los tubos a 13000 g durante 10 min a 4°C y se transfirió 200 μ L del sobrenadante a un tubo.

7.5.2 Ensayo de luciferasa

- I. En una placa blanca de 96 pocillos se cargó 50 μ L del extracto de cada muestra y se dejó atemperar a temperatura ambiente durante 10 min. En el caso de individuos que portan también la construcción α -*Tub*-GAL4 se utilizó una dilución 1/10 del extracto.
- II. Se añadió a cada pocillo 50 μ L del reactivo *Steady-Glo* (también atemperado) del kit *Steady-Glo Luciferase Assay System* (Promega E2510).
- III. Se registraron los valores de luminiscencia cada minuto durante 30-60 min. Como valor final se empleó el promedio de los valores correspondientes al intervalo en el que las medidas de luminiscencia se estabilizaron. Las medidas se tomaron con un equipo *Infinite M200 Pro* (TECAN).

7.5.3 Normalización de las medidas de luminiscencia

Los valores de luminiscencia se normalizaron por la concentración de proteína del extracto (determinada mediante un ensayo de Bradford) o por los valores de luminiscencia obtenidos al medir la actividad de la luciferasa de renilla, en caso de que los individuos portasen dicha construcción. En el primer caso, se utilizó el reactivo del kit *Steady-Glo Luciferase Assay System* (Promega, E2510), y en el segundo caso, se emplearon los reactivos del kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, E1910). En primer lugar, y mediante el uso de un inyector, se añadía el reactivo *Luciferase Assay Reagent II* y se

Material y Métodos

registraba inmediatamente la señal de luciferasa de luciérnaga producida. A continuación, se añadía el reactivo *Stop & Glo Reagent* y se registraba inmediatamente la señal de luciferasa de renilla.

7.5.4 Ensayo de luciferasa en células S2

Para los ensayos de las actividades luciferasa de luciérnaga y renilla en células S2 se utilizaron los reactivos del kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, E1910). Previamente a los ensayos, se produjo la inducción de la expresión de la proteína GAL4 de la construcción pMT-GAL4 mediante la adición de sulfato de cobre a 1 mM. La actividad luciferasa de luciérnaga se normalizó por la actividad luciferasa de renilla.

8 PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR)

8.1 Diseño de primers

La información y las secuencias requeridas de los genes de interés se obtuvieron de la FlyBase (<http://flybase.org/>) y el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

El diseño de los primers se realizó empleando la herramienta Primer-BLAST del NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). Se intentó que se cumplieran los siguientes criterios siempre que fuera posible:

- No más de 3 Gs o Cs seguidas en la secuencia.
- No más de 2 Gs o Cs seguidas en los 5 últimos nucleótidos de la secuencia.
- Secuencia terminada en G o C.
- Secuencias complementarias a dos exones consecutivos (al menos 4 o 5 pares de bases en cada exón).
- Producto de PCR de 80-200 pb preferentemente.
- Temperatura de fusión (T_m) próxima a 60°C.
- Primers complementarios a la región 3' del gen.
- Amplificación del mayor número posible de los diferentes transcritos del gen, considerando prioritarias las formas mayoritarias.

En la Tabla 6 se muestra la secuencia de los primers para cada gen estudiado, así como su longitud, T_m , contenido en CG y el tamaño del producto amplificado.

Tabla 6. Características de los primers empleados en las RT-qPCRs

Primer	Gen	Secuencia 5'→3'	Longitud primer	T _m (°C)	Contenido CG (%)	Longitud producto (pb)
Ac76E-F	Ac76E	CGATCAAATAGCTCAGGAGAAC	24	60,44	45,83	173
Ac76E-R		CA	20	60,81	55	
Cat-F	Cat	GTTCGAGTGTTCATAAATCTGG	25	58,04	36	140
Cat-R		TT	21	60	52,38	
cnc-F	cnc	CACGTTTTCAAGCTCACCAC	20	57,89	50	126
cnc-R		TCCCTGCAGCACACACAAT	19	59,85	52,63	
Eno-F	Eno	ACCCATTGCTGTCTCTATGCT	22	59,76	45,45	129
Eno-R		GCTCTCGGCAACTGAACGAA	20	60,94	55	
fh-F	fh	ACACCCTGGACGCACTGT	18	61,16	61,11	108/112
fh-R		CCAGGTTCACGGTTAGCAC	19	58,43	57,89	
foxo-F	foxo	CCCACCGGCAAAATCAACAA	20	59,61	50	139
foxo-R		CCTCGCCAGCCAAAAGATA	20	60,11	55	
Gclc-F	Gclc	GAGAGCGAAACAGAGTGACGA	21	60,07	52,38	127
Gclc-R		GAAGTATTGACGCCATGCT	20	58,91	50	
GstD1-F	GstD1	TACATCGCGAGTTTCACAACAG	22	59,27	45,45	139
GstD1-R		CAGGTTGAGCAGCTTCTTGTT	21	59,05	47,62	
halo-F	halo	GCTGCACTACACCCTGTTTG	20	59,41	55	129
halo-R		TGCCGGATGTTCTTGATCGT	20	59,75	50	
LucQ-F	Luc	TCCATCTTGCTCCAACACC	20	59,96	55	144
LucQ-R		GGCGACGTAATCCACGATCT	20	59,97	55	
NLaz-F	NLaz	GAGAGGATGGCTCGATGTG	20	59,97	60	79
NLaz-R		CGGAGCCATTCTCATGCCTT	20	60,47	55	
Prx3-F	Prx3	CCGATTCAAGGGTCTGGCT	20	60,04	55	132
Prx3-R		CAACAATTTCCGGTGGGGCAA	20	59,61	50	
Rp49-F	Rp49	CCAAGCACITTCATCCGCCACC	21	64,16	61,90	152
Rp49-R		GCGGGTGCCTTGTTCGATCC	21	66,97	66,67	
RenQ-F	RLuc	CGGATGATAACTGGTCCGCA	20	59,90	55	187
RenQ-R		TAATACACCGCGCTACTGGC	20	60,25	55	
RFeSP-F	RFeSP	TCCAGCAGCTAAATCCAGC	20	60,11	55	139
RFeSP-R		TCGAAAGAAACTCATGTACTCTCT	25	59,99	40	
Sesn-F	Sesn	CCCCAGTTCACGATCACTT	20	59,68	55	134
Sesn-R		CGTTCACAGATACGGACA	20	59,83	55	
Sod1-F	Sod1	GAACAGGAGAGCAGCGGTA	19	59,11	57,89	140
Sod1-R		TACGGATTGAAGTGCAGTCC	20	60,11	55	
Sod2-F	Sod2	CAGATATGTTCTGGCCCGT	20	60,18	55	115
Sod2-R		CGGCAGATGATAGGCTCCAG	20	60,04	60	
wry-F	wry	CCACCACTGAGCAACCAGAA	20	60,18	55	74
wry-R		CGGGGAAATTGTGGGGGTTA	20	59,96	55	

Ac76E: Adenyl cyclase 76E, Cat: Catalase, cnc: cap-n-collar, Eno: Enolase, fh: frataxin, foxo: forkhead box, sub-group O, Gclc: Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GstD1: Glutathione S transferase D1, Luc: gen codificante de la luciferasa de luciernaga, NLaz: Neural Lazarillo, Prx3: Peroxiredoxin 3, Rp49: Ribosomal protein

Material y Métodos

49, *RLuc*: gen codificante de la luciferasa de renilla, *RFESP*: *Rieske iron-sulfur protein*, *Sesn*: *Sestrin*, *Sod1*: *Superoxide dismutase 1*, *Sod2*: *Superoxide dismutase 2 (Mn)*, *wry*: *weary*.

8.2 Extracción de RNA total

El RNA se extrajo a partir de machos de 1 semana de edad mediante el kit *miRNeasy Mini* (Qiagen, Cat. No. 217004) siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante para tejidos animales. La homogeneización de la muestra se llevó a cabo en 700 μL de *QIAzol Lysis Reagent* con el equipo *TissueLyser LT* (Qiagen) durante 5 min a 50 hz. En los ensayos realizados con el modelo de expansión de tripletes GAA, las extracciones se realizaron a partir de hembras de 1 día de edad.

8.3 Transcripción inversa

Para llevar a cabo la transcripción inversa del mRNA a cDNA se empleó el kit *Expand Reverse Transcriptase* (Roche, Cat. No. 11 785 826 001) siguiendo el siguiente protocolo:

- I. Se añadió por reacción 2 μL de Oligo (dT)₁₅ (10 μM), 1 μg de RNA total y H₂O libre de RNasas hasta 10,5 μL . Se calentó la mezcla a 65°C durante 10 min.
- II. Se mantuvieron los tubos en hielo durante 5 min y posteriormente se añadieron los siguientes componentes (volúmenes por tubo de reacción):
 - a. 4 μL Tampón de reacción 5x
 - b. 2 μL DTT (Dithiothreitol) (100 mM)
 - c. 2 μL dNTPs (10 mM cada uno)
 - d. 0,5 μL Inhibidor de RNasas (40 U/ μL)
 - e. 1 μL *Expand RT* (50 U/ μL)
- III. Se incubaron las reacciones a 43°C durante 1h.

8.4 Reacción de PCR cuantitativa

Cada una de las muestras se ensayó por triplicado. Para cada reacción de qPCR se utilizaron los componentes y condiciones descritos en la Tabla 7. Las reacciones de qPCR se realizaron en un equipo *Step One Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems).

Tabla 7. Componentes y condiciones de reacción en las qPCR.

Componentes reacción qPCR		Programa qPCR		
Componente	Volumen	Temperatura	Duración	Repeticiones
<i>Power SYBR Green PCR Master Mix</i> (Applied Biosystems)	10 µL	95°C	10 min	1
H ₂ O ultrapura	5 µL	95°C	15 s	35
Primer Directo (10 µM)	0,5 µL	60°C	1 min	
Primer Reverso (10 µM)	0,5 µL			
cDNA (diluciones desde 1/5 a 1/50 dependiendo del gen)	4 µL			

8.5 Análisis de los resultados

El análisis de los resultados y la determinación de los niveles de expresión relativos de cada gen estudiado se realizó empleando el método del C_T comparativo (método $\Delta\Delta C_T$)⁴¹⁶. La cantidad del mRNA del gen diana, normalizada a un gen de referencia y relativa a un calibrador, viene dada por la fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_T}$

El cálculo se realizó de la siguiente manera:

- I. En primer lugar, se obtuvo el valor ΔC_T del gen de interés en cada muestra, consistiendo éste en:

$$\Delta C_T = C_{T \text{ Diana}} - C_{T \text{ Referencia}}$$

$C_{T \text{ Diana}}$ = promedio de los valores de C_T obtenidos para el gen de interés entre las tres réplicas técnicas de la muestra.

$C_{T \text{ Referencia}}$ = promedio de los valores de C_T obtenidos para el gen de referencia entre las tres réplicas técnicas de la muestra. En las qPCRs realizadas se utilizó *Rp49* (*Ribosomal protein 49*) como gen de referencia.

- II. A continuación, se calculó el valor $\Delta\Delta C_T$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Muestra}} - \Delta C_{T \text{ Muestra calibrador}}$$

$\Delta C_{T \text{ Muestra}}$ = ΔC_T de la muestra a estudio.

$\Delta C_{T \text{ Muestra calibrador}}$ = ΔC_T de la muestra control. El nivel de expresión de los genes de interés de cada muestra es relativizado al nivel de expresión de la condición control.

Material y Métodos

- III. Por último, se calcula para cada muestra el valor $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Como resultado, el nivel de expresión del gen de interés en la condición control es considerado como 1. Para el resto de condiciones, el valor obtenido indicará proporcionalmente cuantas veces más o menos se está expresando el gen de interés (por ejemplo, un valor de 2 indica el doble de expresión, mientras que un valor de 0,5 indica la mitad de expresión).

9 Análisis de la localización celular de las proteínas Cnc y FOXO

9.1 Extracción de la fracción total y nuclear

Para la extracción de las fracciones citosólica y nuclear de los individuos control/Cnc-eGFP y *fhRNAi/Cnc-eGFP* se utilizaron 3 réplicas de 20 machos de 1 semana de edad. En el caso de los individuos control/FOXO-GFP y *fhRNAi/FOXO-GFP* se emplearon 3 réplicas de 20 larvas de tercer estadio, ya que la expresión de la construcción *UAS-FOXO-GFP* producía letalidad en la pupa. El proceso seguido fue el descrito a continuación:

- I. Se homogeneizaron 20 individuos adultos/larvas en 500 μ L de solución de homogeneización (Sacarosa 1 M, HEPES 10 mM pH 7,9, KCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, inhibidor proteasas) empleando el equipo *TissueLyser LT* (Qiagen) 5 min a 25 hz.
- II. Los tubos con las muestras se centrifugaron a 400 g durante 10 min a 4°C y se transfirió 300 μ L del sobrenadante a un nuevo tubo. Se repitió este paso centrifugando durante 5 min y transfiriendo 220 μ L a un nuevo tubo.
- III. Se separaron 50 μ L del sobrenadante en otro tubo para la medición de fluorescencia de la fracción total de la muestra. Se continuó el proceso con el resto para la obtención de la fracción nuclear.
- IV. Se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante, limpiando cuidadosamente las paredes del tubo.
- V. Se resuspendió el pellet en 80 μ L de solución II (HEPES 10 mM pH 7.9, NaCl 0,4 M, MgCl₂ 3 mM, DTT 0.5 mM, Glicerol 5% (v/v), inhibidor de proteasas) manteniendo el tubo en hielo durante 30 min y agitando ocasionalmente.

- VI. Se centrifugó la suspensión a 16000 g durante 2,5 h a 4°C y se transfirió 50 µL del sobrenadante para la medición de fluorescencia de la fracción nuclear de la muestra.

9.2 Medición de la fluorescencia y cálculo de la ratio señal nuclear/total

El nivel de fluorescencia para cada fracción se midió cargando 50 µL de muestra en placas negras de 96 pocillos. Las medidas se tomaron con un equipo *Infinite M200 Pro* (TECAN), con una longitud de onda de excitación de 488 nm (Cnc-eGFP) o 395 nm (FOXO-GFP) y una longitud de onda de emisión de 509 nm. La ratio de la señal fluorescencia Nuclear/Total obtenida para los individuos control/Cnc-eGFP o control/FOXO-GFP en medio Vehículo se consideró como el valor normal de 1.

10 Detección de las proteínas P-S6 y P-AKT mediante *western blot*

10.1 Anticuerpos

Para la comprobación del efecto de los inhibidores de mTOR (Torin1 y XL388) sobre la actividad de los complejos TORC1 y TORC2 se analizó, mediante *western blot*, el nivel de fosforilación de las proteínas S6 y AKT a partir de cultivos de células SH-SY5Y. Para ello se utilizaron los anticuerpos y condiciones descritos en la Tabla 8

Tabla 8. Anticuerpos empleados para la detección de las formas fosforilada y total de S6 y AKT.

Anticuerpo	Concentración	Bloqueo
P-S6 (S235+S236) (Abcam, ab12864)	1:1000	BSA 5% en TBS-T
S6 (Abcam, ab59261)	1:1000	BSA 5% en TBS-T
P-AKT (S473) (Cell Signalling, 4058)	1:1000	BSA 5% en TBS-T
AKT (Abcam, ab8805)	1:1000	BSA 5% en TBS-T
Actin (Sigma, A2066)	1:4000	BSA 5% en TBS-T

BSA: *bovine serum albumin*, TBS-T: Tris-HCL 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% (v/v)

10.2 Extracción de proteína total de cultivos celulares

- I. Se sembraron las células SH-SY5Y en placas de 6 cm de diámetro y se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 80%. Posteriormente se realizó el tratamiento de 24 h con Torin1 y XL388.

Material y Métodos

- II. Con la placa sobre hielo, se retiró el medio de cultivo completamente por aspiración y se lavó la placa con 1 mL de TBS (*Tris-buffered saline*, Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM) frío.
- III. Se retiró el TBS por aspiración y se añadió 200 μ L de tampón de lisis RIPA (*radioimmunoprecipitation assay*) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se rascaron las células con espátula (durante 1 min) y se transfirieron a un tubo de 1,5 mL.
- IV. Se agitaron los tubos durante 5 min en una noria a 4°C, se dio un vortex y se volvieron a agitar durante 10 min.
- V. Los tubos se centrifugaron a 15000 g durante 10 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.
- VI. Se cuantificó la concentración de proteína de los extractos mediante reactivo de Bradford y se almacenaron a -80°C.

10.3 Electroforesis en gel desnaturizante de tricina y transferencia

- I. Se resuspendieron los extractos proteicos en tampón de carga de proteínas 5x (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 10% (p/v), Coomassie 250 G 0,025% (p/v), Glicerol 30% (v/v), β -ME 0,1% (v/v)).
- II. Se calentaron las muestras a 95°C durante 5 min y se cargó 50 μ g de proteína por muestra en geles de Tricina con un porcentaje de Acrilamida/Bisacrilamida (19:1) del 10%.
- III. Se realizó la electroforesis en tampón ánodo (Tris-HCl 0,2 M pH 8,8) y tampón cátodo (Tris-HCl 0,1 M, Tricina 0,1 M, SDS 0,1% (p/v) a 50 V (fase de entrada y concentración) y posteriormente a 150 V (fase de separación)).
- IV. Se llevó a cabo la transferencia a membranas de PVDF (*polyvinylidene difluoride*) a 100 V durante 1 h en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, Glicina 192 mM, MetOH 20% (v/v)) a 4°C.

10.4 Incubación con anticuerpos y detección

- I. Tras la transferencia, se lavaron las membranas con TBS-T (Tris-HCL 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% (v/v)) y se incubaron en solución de bloqueo (BSA 5% en TBS-T) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación suave.
- II. Se recortaron las membranas y se introdujeron las porciones con las proteínas de interés en bolsas con los correspondientes anticuerpos primarios. La incubación tuvo lugar durante toda la noche a 4°C en agitación suave.
- III. Se realizaron tres lavados de 5 min con TBS-T a temperatura ambiente en agitación suave y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario conjugado con HRP (*horseradish peroxidase*) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación suave.
- IV. Se llevaron a cabo tres lavados de 5 min con TBS-T a temperatura ambiente en agitación suave y se detectó la señal procedente de la HRP mediante incubación con el reactivo *ECL™ Prime Western Blotting System* (GE Healthcare, RPN2232). La detección se realizó empleando un equipo *ImageQuant LAS4000* (GE Healthcare Life Sciences).

11 Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad de las células SH-SY5Y, tras los tratamientos con los compuestos Torin1 y XL388, se determinó con la utilización de sulforodamina B (ThermoFisher Scientific, S1307). Este compuesto se une a las proteínas en condiciones ligeramente ácidas y puede dar una estimación de la masa celular. El protocolo seguido se detalla a continuación:

- I. Se sembraron las células SH-SY5Y en placas de 96 pocillos (10⁴ células por pocillo) y se dejaron crecer durante 24 h, tras las cuales se añadieron los tratamientos con los compuestos Torin1 y XL388 durante las 24 h siguientes.
- II. Se lavaron las células con 100 µL de PBS a 4°C. Se aspiró el tampón y se añadió a cada pocillo otros 100 µL de PBS a 4°C.
- III. Las células se fijaron con TCA (*trichloroacetic acid*) al 10% frío añadiendo 20 µL de TCA al 50% (p/v) a los pocillos con PBS e incubando durante 1 h a 4°C.

Material y Métodos

- IV. Se lavaron los pocillos 5 veces con agua y se dejaron secar. Posteriormente se añadió a cada pocillo 50 μL de sulforodamina B 0,4% (p/v) en ácido acético 1% (v/v)
- V. Se lavaron los pocillos 5 veces con ácido acético al 1% y se dejaron secar. Posteriormente se solubilizó la sulforodamina B con 100 μL de tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5.
- VI. Se midió la absorbancia a 570 nm (Sulforodamina B) y a 620 nm (fondo) utilizando un equipo *Infinite M200 Pro* (TECAN).

12 Medición del radical superóxido

La medición de los niveles de radical superóxido en células SH-SY5Y se llevó a cabo utilizando la sonda *MitoSOX Red superoxide indicator* (Molecular Probes, Invitrogen, M36008).

- I. Se sembraron las células en placas de 6 pocillos (20^5 células por pocillo), con 3 cubreobjetos circulares por pocillo, y se dejaron crecer durante 24 h. Posteriormente se añadieron los tratamientos con los compuestos Torin1 y XL388 durante las 24 h siguientes.
- II. Se aspiró el medio de los pocillos y se incubaron las células durante 10 min a 37°C con *MitoSox Red* a $3,75 \mu\text{M}$ preparado en medio de cultivo sin compuestos (1 mL por pocillo).
- III. Se lavaron las células con medio de cultivo a 37°C . A continuación, se aspiró el medio y se incubaron las células con formaldehído al 4% en PBS durante 20 min a 37°C .
- IV. Se realizaron dos lavados con PBS (2 mL por pocillo/lavado) y se montaron los cubreobjetos sobre un portaobjetos empleando una gota de *DAPI Fluoromount-G* (Southern Biotech).
- V. Mediante microscopia de fluorescencia y el programa ImageJ se midieron los niveles de fluorescencia producidos por la sonda *MitoSOX Red*, cuantificando la señal producida por células individuales (aproximadamente 100 células por línea celular y condición).

13 Extracción de DNA genómico

Se obtuvo DNA genómico (gDNA) de las cepas *yw*, GAA-CONTROL y GAA-EXP siguiendo el procedimiento experimental que se detalla a continuación:

- I. Se homogeneizaron 10 hembras de 1 día de edad en 400 μ L de Solución I (EDTA 0,1%, Tris-HCl 0,1 M pH 9) mediante el equipo *TissueLyser LT* (Qiagen) 5 min a 50 hz.
- II. Se añadió 400 μ L de Solución II (SDS 2%) precalentada a 65°C y se mezcló suavemente con el homogeneizado. Se realizó una incubación durante 45 min en baño a 65°C (agitando varias veces).
- III. Los tubos se atemperaron 5 min a temperatura ambiente y se añadió 105 μ L de acetato potásico (KOAc) 8 M, mezclando suavemente. Se realizó una incubación durante 30 min en hielo mezclando ocasionalmente.
- IV. Los tubos se centrifugaron a 13000 g durante 15 min a 4°C y se transfirió 800 μ L del sobrenadante a un tubo de 2 mL, descartando precipitado y restos de la superficie.
- V. Se añadió un volumen (800 μ L) de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló brevemente con vortex. Los tubos se centrifugaron a 13000 g durante 5 min a 4°C y se recogió la fase líquida superior (600 μ L) en un tubo de 1,5 mL.
- VI. Se añadió un volumen (600 μ L) de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló brevemente con vortex. Los tubos se centrifugaron a 13000 g durante 5 min a 4°C y se recogió la fase líquida superior (400 μ L).
- VII. Se añadió un volumen (400 μ L) de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló brevemente con vortex. Los tubos se centrifugaron a 13000 g durante 5 min a 4°C y se recogió la fase líquida superior (300 μ L).
- VIII. Se añadieron dos volúmenes (600 μ L) de etanol 100% y 18 μ L de NaCl 5 M (concentración final de NaCl 0,1 M), mezclando brevemente con vortex.
- IX. Se realizó una incubación durante 30 min a -20°C. Los tubos se centrifugaron a 13000 g durante 5 min a 4°C y se eliminó cuidadosamente el sobrenadante.
- X. Se añadió 500 μ L de etanol 70%. Los tubos se centrifugaron a 13000 g durante 2 min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante.

Material y Métodos

- XI. Tras la evaporación del etanol, se resuspendió el DNA en 100 μ L de H₂O y se almacenó a -20°C.

14 Reacciones de PCR estándar

14.1 Primers utilizados

En la Tabla 9 se relacionan los primers utilizados, indicando su secuencia, longitud, T_m, contenido en CG y el tamaño del producto amplificado.

Tabla 9. Primers utilizados en las reacciones de PCR estándar

Primer	Región	Secuencia 5'→3'	Longitud primer	T _m (°C)	Contenido CG (%)	Longitud producto (pb)
Prom-F	Promotor cons. Luc	GATCCAAGCTTGCATGCCT	20	59,90	55	342
Prom-R		GGCAGATTTTCAGTAGTTGC AGT				
UpGAA-F	Aguas arriba cons. Luc	TGAAGATGCCAAGGAAGTG	21	59,57	47,62	386
UpGAA-R		ACCATGTTGGCCAGGTTAG TC				
DownGAA-F	Aguas abajo cons. Luc	GCCTGTAATCCCAGCTACTC	20	60,5	55	324
DownGAA-R		CTGACAACCCATGCTGTCC A				
UpGAA-F	Región GAAs	TGAAGATGCCAAGGAAGTG	21	59,57	47,62	804/1,4
DownGAA-R		CTGACAACCCATGCTGTCC A				
Luc-F	Secuencia gen <i>Luc</i>	CCAGAGATCCTATTTTTGGC	23	59,2	39	363
Luc-R		AATC TGAGCCCATATCCTTGCTG				
attL-F	Extremo 5' cons. Luc y RLuc	GGGCGTGCCTTGAGTTCTC	22	67,9	64	400 600
22A3-R		TC GTTTATTGGTTTATGGGTG				
68E1-R		GG GCCGGAAGTGTGCAATAG ATGCC				
F1G	Aguas arriba cons. Luc	GAGGATTTGTTTGGGTAA	21	57,5	43	360
R1G		AG ATACTAAATTCACCATATT AACC				
F2G	Aguas arriba cons. Luc	GATTTGTTTGGGTAAAGGTT	22	56,4	36	286
R2G		AG CTCCAAAATACTAAAAATT ATAAAC				
NH1F	Aguas abajo cons. Luc	AAGAAGAAGAAGAAAATA	26	56,8	23	279
SLGR2		AAGAAAAG TCCTAAAAAAAATCTAAAA ACCATC				
NH2F	Aguas abajo cons. Luc	AGAAGAAGAAAATAAAGA	26	56,8	23	259
SLGR1		AAAGTTAG AAAACCATCATAACCACAC TTAC				

cons. Luc: construcción Luc, *Luc*: región codificante del gen de la luciferasa de luciérnaga, cons. RLuc: construcción RLuc

14.2 Reacciones de PCR y condiciones de amplificación

En las Tablas 10-12 se especifican los componentes de las reacciones de PCR y las condiciones de amplificación para comprobar la localización de las construcciones Luc y RLuc en las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP (Tabla 10), analizar la integridad de las construcciones (Tabla 11) y comprobar el tamaño de las repeticiones GAA (Tabla 12) en dichas cepas.

Tabla 10. Componentes y condiciones de reacción en la PCR para la localización de las construcciones Luc y RLuc

Componentes reacción PCR		Programa PCR		
Componente	Volumen	Temperatura	Duración	Repeticiones
gDNA	500 ng	94°C	5 min	1
Tampón 10x (MgCl ₂ 2 mM)	5 µL	94°C	1 min	
Primer Directo (10 µM) (attL-F)	1,5 µL	50/60°C*	1 min	35 ciclos
Primer Reverso (10 µM) (22A3-R/68E1-R)	1,5 µL	72°C	1 min	
dNTPs (10 mM cada uno)	1 µL	72°C	10 min	1
<i>Biotools DNA Polymerase</i> (1U/µL)	1 µL	4°C	∞	-
H ₂ O	Hasta 50 µL	*Las PCRs con el primer 22A3-R (T _m = 55°C) se realizaron utilizando una temperatura de anillamiento de 50°C. Para el resto la temperatura fue de 60°C.		

Tabla 11. Componentes y condiciones de reacción en la PCR para la comprobación de la integridad de la construcción Luc.

Componentes reacción PCR		Programa PCR		
Componente	Volumen	Temperatura	Duración	Repeticiones
gDNA	500 ng	94°C	5 min	1
Tampón 10x (MgCl ₂ 2 mM)	5 µL	95°C	1 min	
Primer Directo (10 µM) (Prom-F/UpGAA-F/ DownGAA-F/Luc-F)	1,5 µL	55°C	1 min	35 ciclos
Primer Reverso (10 µM) (Prom-R/UpGAA-R/ DownGAA-R/Luc-R)	1,5 µL	72°C	2 min	
dNTPs (10 mM cada uno)	1 µL	72°C	10 min	1
<i>Biotools DNA Polymerase</i> (1U/µL)	1 µL	4°C	∞	-
H ₂ O	Hasta 50 µL			

Tabla 12. Componentes y condiciones de reacción en la PCR para la comprobación del tamaño de la secuencia de repeticiones GAA

Componentes reacción PCR		Programa PCR		
Componente	Volumen	Temperatura	Duración	Repeticiones
gDNA	100 ng	94°C	5 min	1
Buffer BD 10x	10 µL	95°C	1 min	
MgCl ₂ 25 mM	8 µL	55°C	1 min	35
Primer Directo (10 µM) (UpGAA-F)	3 µL	72°C	2 min 30 s	
Primer Reverso (10 µM) (DownGAA-R)	3 µL	72°C	10 min	1
dNTPs (10 mM cada uno)	2 µL	4°C	∞	-
<i>FIREPol DNA Polymerase</i> (5U/µL)	1 µL			
H ₂ O	Hasta 100 µL			

15 Ensayo de accesibilidad de Desoxiribonucleasa I

Este ensayo se utilizó con las cepas GAA-control y GAA-EXP con el objetivo de determinar el grado de compactación de la cromatina en la construcción Luc.

15.1 Obtención de la muestra y tratamiento con Desoxiribonucleasa I (DNasa I)

- I. Se homogeneizaron 10 individuos en 500 µl de tampón Tris-HCl 40 mM pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, CaCl₂ 10 mM, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,1% (v/v) e inhibidor de proteasas utilizando el equipo *TissueLyser LT* (Qiagen) 5 min a 25 hz.
- II. Los tubos se centrifugaron a 400 g durante 5 min a 4°C y se transfirió 400 µL del sobrenadante a un tubo nuevo. Este paso volvió a repetirse, pero transfiriendo esta vez 300 µL a otro tubo.
- III. Se dividió el sobrenadante en 3 alícuotas de 90 µl. Una de las alícuotas se dejó sin digerir y las otras dos se trataron con 5 U (1,83 µL) de DNasa I (*RNase-Free DNase set*, Qiagen) durante 5 min o durante 20 min a 37°C. Las reacciones se detuvieron con 9,4 µL de EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) 0,25 M (concentración final 25 mM) en todos los casos.
- IV. A cada tubo se añadió 20 µL de SDS (*sodium dodecyl sulfate*) 6x y 6 µL de proteinasa K 10 mg/mL (concentración final 0,5 mg/ml) y se incubaron 1 hora a 65°C.

15.2 Extracción del DNA tratado

- I. Se añadió a los tubos tratados en el paso anterior 162,2 μL (volumen final 290 μL) de solución I (EDTA 0,1%, Tris-HCl 0,1 M pH 9).
- II. Posteriormente, se añadió 40 μL de KOAc 8M, mezclando suavemente. Los tubos se incubaron 30 min en hielo mezclando ocasionalmente. A partir de este punto se siguieron los pasos IV a XI del punto 13 de este apartado (extracción de gDNA), ajustando los volúmenes de forma adecuada.

15.3 Cuantificación mediante qPCR del gDNA tratado

La abundancia del gDNA de las regiones analizadas tras el tratamiento con DNasa I, se determinó mediante qPCR. El proceso seguido fue el descrito en los puntos 8.4 y 8.5 de este apartado, con las siguientes modificaciones:

- I. El material genético de partida para realizar las cuantificaciones fue el gDNA tratado con DNasa I, en lugar de cDNA.
- II. En la reacción de PCR se emplearon primers para amplificar las regiones genómicas de interés y como referencia se tomó una secuencia de gDNA (región H23) resistente a DNasa I. Los valores de C_T obtenidos en la amplificación de la región H23 son los que se consideraron como $C_{T \text{ Referencia}}$.
- III. Para cada región y tratamiento, la muestra calibradora ha sido una muestra obtenida de la cepa GAA-CONTROL.
- IV. Los resultados indican, de forma relativa, el número de copias de la región de interés que han resistido al tratamiento con la DNasa I.

En la Tabla 13 se relacionan los primers utilizados, indicando su secuencia, longitud, T_m , contenido en CG y el tamaño del producto amplificado.

Tabla 13. Primers empleados en las qPCR del ensayo de accesibilidad de DNasa I.

Primer	Región	Secuencia 5'→3'	Longitud primer	T _m (°C)	Contenido CG (%)	Longitud producto (pb)
ProD-F	Promotor cons. Luc	ACTGCAACTACTGAAATCT	22	58,92	45,45	101
ProD-R		GCC CGCCCCGAGAGTCCACATAT TTA				
UpD-F	Aguas arriba cons. Luc	AATCTCAGCACTTTGGGAG	21	60,62	52,38	77
UpD-R		GC ACCATGTTGGCCAGGTTAGT C				
DownD-F	Aguas abajo cons. Luc	CGCCTGTAATCCCAGCTACT	20	59,25	55	73
DownD-R		TAATGCAACCTCTGCTCCC				
LucD-F	Gen <i>Luc</i>	TCCATCTTGCTCCAACACCC	20	59,96	55	144
LucD-R		GGCGACGTAATCCACGATC T				
Rp49 (DNA)-F	Gen <i>Rp49</i>	TGCTAAGCTGTCGGTGAGT	20	60,04	55	109
Rp49 (DNA)-R		G TGTTGTCGATACCCTTGGGC				
H23-F	Región genómica H23	TCGATTCCAAGTTGGCCAG	21	60,20	47,62	173
H23-R		T AGTTCAAGCCCGGTATTCT				
RFeSP-F	Gen <i>RFeSP</i>	TCCAGCAGCCTAAATCCAG	20	60,11	55	139
RFeSP-R		C TCGAAAGAAACTCATGTAC ACTCCT				

cons. Luc: Construcción Luc, *Luc*: gen codificante de la luciferasa de luciernaga, *Rp49*: Ribosomal protein 49, *RFeSP*: Rieske iron-sulfur protein

16 Análisis de metilación del DNA

Para comprobar el estado de metilación de las citosinas en los sitios CpG de las regiones de interés en la construcción Luc, se llevó a cabo una secuenciación por bisulfito sódico. El protocolo a seguir consta de diferentes pasos detallados a continuación: (a) Extracción de gDNA y conversión a uracilo de las citosinas no metiladas mediante bisulfito sódico; (b) Amplificación por PCR de la región de interés mediante PCR anidada; (c) Secuenciación y análisis de los productos de PCR.

16.1 Conversión de citosinas no metiladas por bisulfito sódico

El gDNA de los individuos de las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP se obtuvo tal y como se ha descrito anteriormente en el punto 13. Para la conversión de las citosinas no metiladas se empleó el *EpiTect Bisulfite Kit* (Quiagen, Cat. 59104) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

16.2 Amplificación de la región aguas arriba y aguas abajo de las repeticiones GAA

A partir del gDNA tratado en el paso anterior, se realizaron PCRs anidadas para amplificar dos regiones, una situada aguas arriba y otra aguas abajo de las repeticiones GAA para su posterior secuenciación. Para ello se emplearon los primers F1G, F2G, R1G, R2G, NH1F, NH2F, SLGR1 y SLGR2 descritos en ¹⁰⁶. Las condiciones y componentes de las reacciones se especifican en la Tabla 14.

Tabla 14. Componentes y condiciones de reacción en la PCR anidada para el análisis de la metilación.

Componentes reacción PCR		Programa primera PCR		
Componente	Volumen	Temperatura	Duración	Repeticiones
gDNA tratado	250 ng	94°C	5 min	1
Tampón 10x	5 µL	95°C	1 min	
Primer Directo (10 µM) (F2G/NH2F)	1,5 µL	50°C	1 min	35
Primer Reverso (10 µM) (R2G/SLGR1)	1,5 µL	72°C	2 min	
dNTPs (10 mM cada uno)	4 µL	72°C	10 min	1
<i>Biotools DNA Polymerase</i> (1U/µL)	1 µL	4°C	∞	-
H ₂ O	Hasta 50 µL			
		Programa segunda PCR		
		Temperatura	Duración	Repeticiones
		94°C	5 min	1
		95°C	1 min	
		51/48°C*	1 min	35
		72°C	2 min	
		72°C	10 min	1
		4°C	∞	-

*Las PCRs con los primers F2G + R2G se realizaron a una temperatura de anillamiento de 51°C. Para los primers NH2F + SLGR1, la temperatura fue de 48°C.

Tras cada PCR se realizó la purificación del producto obtenido empleando el *E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit* (OMEGA bio-tek, D2500). El protocolo seguido para la purificación de los productos de PCR fue el descrito por el fabricante.

16.3 Secuenciación y análisis

Los productos de PCR se secuenciaron por el método de Sanger, empleando el primer directo. La secuenciación se llevó a cabo por la compañía Stab Vida (Portugal).

Material y Métodos

En la secuenciación por bisulfito, el DNA es tratado de forma que se mantienen las citosinas metiladas, mientras que las no metiladas son convertidas a uracilo. Durante las amplificaciones en la reacción de PCR, el uracilo es sustituido por timina en los productos amplificados. Una vez secuenciados estos productos, se determina el porcentaje de metilación de las citosinas en los sitios CpG en función de la altura de los picos de timina y citosina que se solapan en la posición de la citosina original en el cromatograma. El cálculo del porcentaje de metilación se detalla en el ejemplo de la Figura 17.

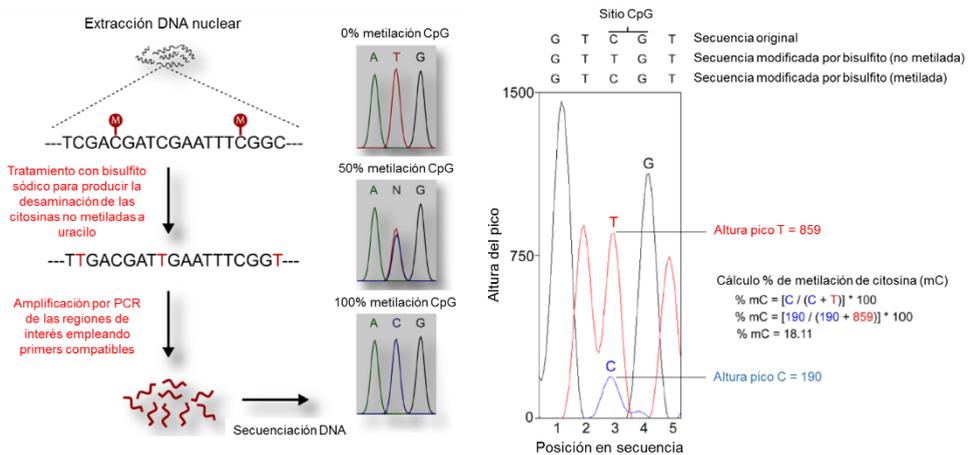


Figura 17. Esquema del proceso y análisis de la secuenciación por bisulfito (adaptado de ⁴¹⁷)

17 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se ha realizado utilizando el test *t* de student para las comparaciones entre dos tipos de muestras. Para las comparaciones entre varias muestras se realizó un test ANOVA de una vía aplicando el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. En el análisis estadístico de la supervivencia se empleó un test Log-rank (Mantel-Cox). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 6.01 (GraphPad Software).

RESULTADOS

Resultados

1 Identificación de compuestos y nuevas dianas para el tratamiento de la ataxia de Friedreich utilizando un modelo de la enfermedad desarrollado en *D. melanogaster*

1.1 Rastreo piloto de compuestos

En la primera parte del presente trabajo de tesis doctoral se ha utilizado un modelo de FRDA en *D. melanogaster* en el cual los niveles de la proteína frataxina de *Drosophila* muestran una reducción sistémica, entorno al 70%, de los niveles fisiológicos de la proteína¹⁶⁸. Esta reducción se ha conseguido mediante un dsRNA cuya diana es el gen *fh* y cuya expresión se encuentra bajo el control de las secuencias reguladoras UAS (construcción *UAS-fhRNAi*). Mediante el sistema binario GAL4/UAS²³², se ha dirigido de forma generalizada la expresión del dsRNA en la mosca, utilizando la construcción *actin-GAL4*. Los individuos en los que se produce esta reducción de los niveles de frataxina en todo el organismo son denominados en el texto de forma abreviada como *fhRNAi*. Como control se han utilizado individuos con el mismo fondo genético que los anteriores, a excepción de que carecen de la construcción *UAS-fhRNAi*. Tales individuos se han obtenido en la F1 del cruce entre la cepa *yw* y la línea *actin-GAL4*.

Los individuos *fhRNAi* manifiestan varios de los principales fenotipos de la FRDA, como una reducción de la capacidad motora y de la supervivencia, y un incremento en la sensibilidad frente al estrés oxidativo¹⁶⁸. Estos fenotipos son susceptibles de mejora tras el tratamiento con quelantes de hierro (deferiprona) y antioxidantes (idebenona)²³⁸, indicando que las consecuencias, a nivel bioquímico, de la deficiencia de frataxina en *D. melanogaster*, son muy similares a las que se dan en humanos y modelos de la enfermedad en otros organismos. Es por ello que se decidió que nuestro modelo de FRDA en *D. melanogaster* podía ser una herramienta útil para la búsqueda de nuevos compuestos terapéuticos. En este trabajo se ha llevado a cabo un rastreo piloto en el que se han ensayado compuestos químicos con diferentes tipos de actividades (Figura 18).

La práctica totalidad de los compuestos estudiados se seleccionaron entre fármacos ya probados en seres humanos, cuya función o actividad pudiese ser razonablemente beneficiosa en un contexto de deficiencia de frataxina. Se seleccionaron quelantes de metales, antioxidantes, compuestos capaces de mejorar la función mitocondrial y otros fármacos con

Resultados

diferentes propiedades neuroprotectoras. Para cada uno de los compuestos se determinó la concentración óptima de uso (Tabla 5, Material y Métodos), considerándose ésta como aquella que proporcionaba el máximo beneficio a los individuos *fhRNAi* sin afectar la viabilidad y la capacidad motora de los individuos control. Entre los compuestos ensayados se encuentra la rapamicina, cuyo estudio se desarrolla en el presente trabajo, como se indica a continuación. También se han incluido en el análisis varios compuestos previamente testados en la cepa *fhRNAi*, como son el antioxidante idebenona y los quelantes de metales deferiprona, BCS (*bathocuproine disulfonate*), TTM (*tetrathiomolybdate*) y TPEN (*N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine*), con el fin de comparar su efecto con el de otros compuestos con similar actividad. Algunos de los compuestos utilizados tienen una baja solubilidad en agua y fueron disueltos en primer lugar en DMSO 100% (ver Material y Métodos). Posteriormente se disolvieron en el medio de cultivo, manteniendo en éste una concentración máxima de DMSO del 0,1%. El resto de compuestos ensayados en este trabajo también se disolvieron en el medio de cultivo añadiendo DMSO al 0,1% para no variar la composición del medio entre compuestos. Como medio control (denominado medio Vehículo) se utilizó, por tanto, medio de cultivo con DMSO al 0,1%. Al tratarse de un fenotipo cuantificable que podía ser medido con precisión, el efecto de cada uno de los compuestos se analizó sobre la capacidad motora de machos adultos de una semana de edad, los cuales fueron tratados con los diferentes compuestos desde las primeras etapas del desarrollo larvario.

La Figura 18 y la Tabla 15 (Material Suplementario) muestran los resultados del rastreo farmacológico. Se puede observar que, en los individuos control, solamente los compuestos olesoxime, fenilbutirato de sodio, rapamicina y su derivado temsirolimus afectaron significativamente a la capacidad de escalada, produciendo un aumento de la misma. En el caso de los individuos *fhRNAi*, encontramos que varios compuestos con diferentes propiedades son capaces de mejorar de forma notable su capacidad motora. En trabajos anteriores ya se observó el efecto beneficioso del antioxidante idebenona y de los quelantes de metales BCS (quelante de Cu), deferiprona (quelante de Fe), TPEN (quelante de Zn) y TTM (quelante de Cu)^{238,243}. Entre los que se ensayaron específicamente en el presente trabajo, aumentaron significativamente la capacidad motora de las moscas con deficiencia de frataxina los compuestos curcumina, dexpramipexol, fenilbutirato de sodio, melatonina, piracetam, riluzol, rapamicina y temsirolimus. De todos ellos, los antioxidantes y/o

neuroprotectores curcumina, dexpramipexol, fenilbutirato de sodio y melatonina, y los inhibidores del complejo TORC1 temsirolimus y rapamicina, permiten recuperar la capacidad locomotora de los individuos *fhRNAi* a niveles similares a los de los individuos control en medio Vehículo (al menos 95% de la capacidad motora de éstos últimos), siendo el efecto del piracetam y el riluzol menos significativo.

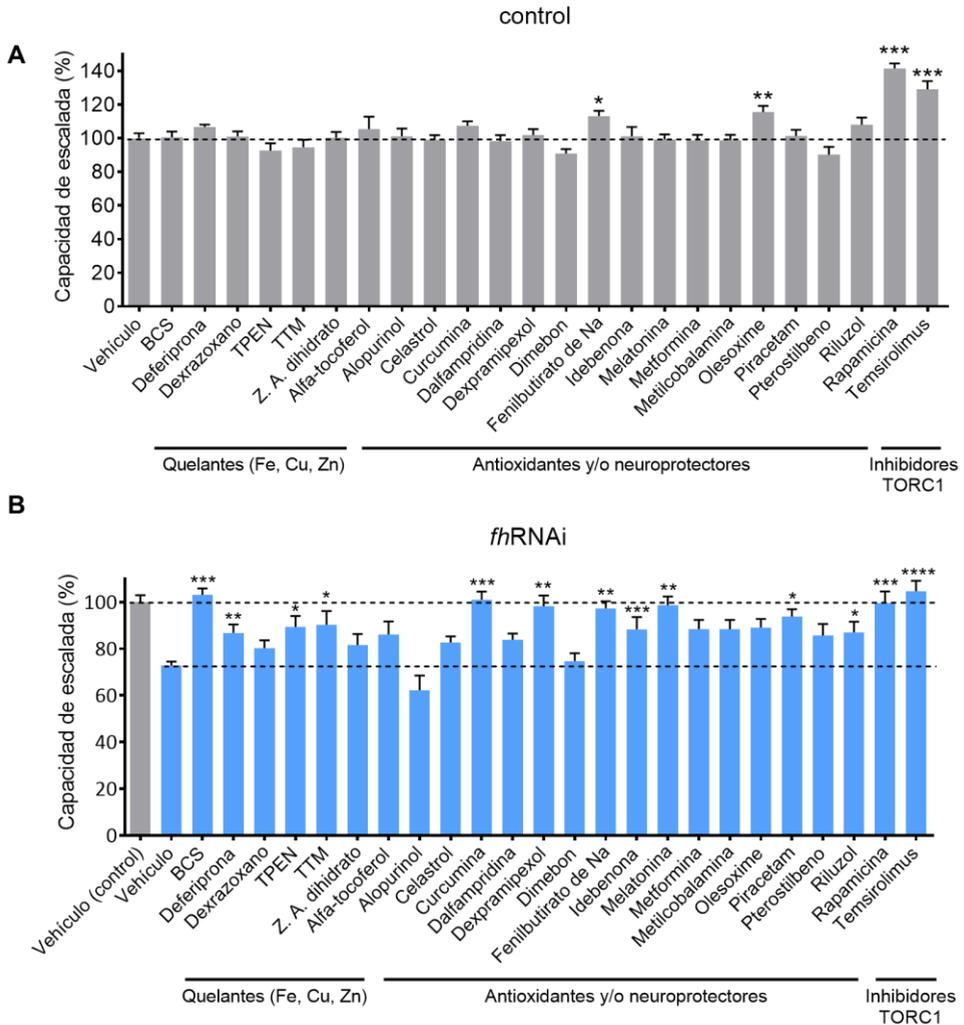


Figura 18. Efecto de los compuestos ensayados sobre la capacidad motora de los individuos control y *fhRNAi* (machos de 1 semana). **A)** Los compuestos fenilbutirato de sodio (Na), olesoxime, rapamicina y temsirolimus aumentan de forma significativa la capacidad motora de los individuos control. **B)** Los individuos *fhRNAi* muestran una reducción del 25-30% de la capacidad motora respecto a los individuos control en el medio Vehículo, la cual es mejorada significativamente por compuestos

Resultados

con diferentes tipos de actividades. Los compuestos BCS, curcumina, dexpramipexol, fenilbutirato de sodio, melatonina, rapamicina y temsirolimus recuperan esta capacidad a niveles similares a los del control. Los compuestos BCS, deferiprona, dexrazoxano, TPEN, TTM, y Z.A. dihidrato tienen actividad quelante de metales; rapamicina y temsirolimus son inhibidores del complejo TORC1, y el resto de compuestos presentan actividades antioxidantes y/o neuroprotectoras. **control:** $y^l w^*/Y$; *actin-GAL4*. ***fhRNAi*:** $y^l w^*/Y$; *UAS-fhRNAi*; *actin-GAL4*. BCS: *bathocuproine disulfonate*, TPEN: *N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine*, TTM: *tetrathiomolybdate*, Z. A. dihidrato: zinc acetato dihidrato. Las diferencias en la capacidad motora se analizaron mediante un test ANOVA de una vía aplicando el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. Los asteriscos representan la significación estadística de la comparación entre el medio con el compuesto y el medio Vehículo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

1.2 Efecto de la modulación por rapamicina de TORC1 en la capacidad motora y la supervivencia de los individuos *fhRNAi*

Paralelamente al ensayo de compuestos potencialmente terapéuticos llevado a cabo en este trabajo, nuestro grupo también abordó un rastreo de genes candidatos en busca de modificadores de los fenotipos inducidos por la deficiencia de frataxina en *D. melanogaster*⁴¹⁸. Como resultado, se identificaron varios componentes de la ruta de señalización de TORC1 capaces de modificar la capacidad motora de los individuos *fhRNAi*. En concreto, se observó que una reducción genética de la señalización por TORC1 era capaz de mejorar este fenotipo. Acorde con lo anterior, la activación genética de la señalización de TORC1 produce un efecto negativo en combinación con la deficiencia de frataxina, induciendo semiletalidad (Figura 45, Material suplementario).

Tales resultados apoyaban los obtenidos con los compuestos rapamicina y temsirolimus en el rastreo piloto de compuestos (Figura 18B). Tanto la rapamicina como su derivado temsirolimus tienen la capacidad de inhibir el complejo TORC1⁴¹⁹. Estos compuestos destacaron por ser capaces de recuperar completamente la capacidad motora de los individuos *fhRNAi*, además de tener un notable efecto positivo en los individuos control. Debido a todos estos resultados, se decidió realizar un estudio en mayor profundidad del efecto de la inhibición de TORC1, empleando para ello el compuesto rapamicina a causa de que mostró un efecto similar al producido por el temsirolimus, requiriendo una concentración de uso notablemente menor (1 μM en el caso de la rapamicina frente a 16 μM para el temsirolimus).

Además del fenotipo locomotor, se analizó el efecto de la rapamicina en la supervivencia de los individuos *fhRNAi*, por ser éste otro importante fenotipo afectado en las moscas con deficiencia de frataxina¹⁶⁸. Para el estudio de ambos fenotipos se emplearon machos (1 semana de edad en el caso del fenotipo locomotor). Se ensayaron dos concentraciones diferentes de rapamicina, 0,5 y 1 μM , para determinar si su efecto era dependiente de dosis (tratamientos RAP 0,5 μM y RAP 1 μM). De nuevo observamos que la rapamicina era capaz de revertir los problemas motores de los individuos *fhRNAi*, tratándose de un efecto dosis-dependiente (Figura 19A). A una concentración de 1 μM el tratamiento con rapamicina incrementaba la capacidad motora de los individuos *fhRNAi* hasta alcanzar los valores observados para los individuos control en el medio Vehículo. También vemos este efecto beneficioso del tratamiento en la supervivencia. En el caso de los individuos control, los tratamientos con rapamicina a 0,5 y 1 μM incrementaron la supervivencia media hasta 53,8 y 56,1 días respectivamente, en comparación con la supervivencia media de 47,3 días de los individuos en el medio Vehículo (Figura 19B). En el caso de los individuos *fhRNAi*, solo fue estadísticamente significativo el incremento de la supervivencia en los individuos tras el tratamiento con rapamicina a 1 μM (Figura 19B), pasando la supervivencia media de 35,4 a 38,9 días. Con estos resultados se decidió que el resto de experimentos se llevarían a cabo utilizando rapamicina a la concentración de 1 μM (tratamiento denominado abreviadamente RAP a partir de este punto).

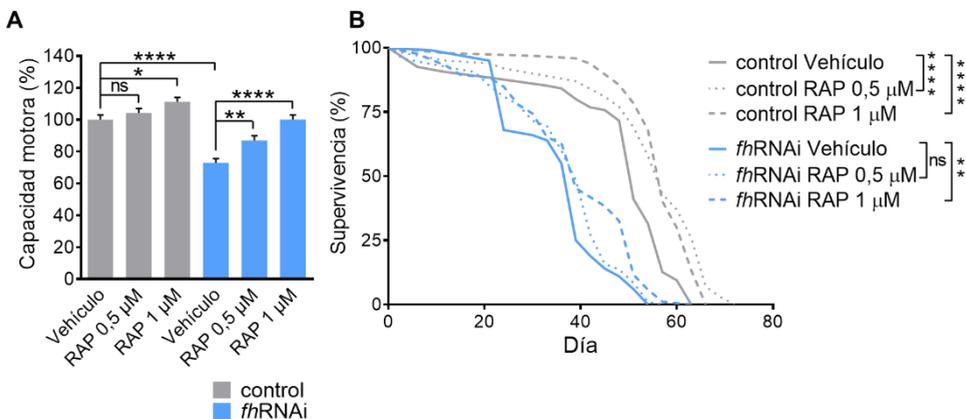


Figura 19. Efecto de la rapamicina a 0,5 y 1 μM sobre la capacidad motora y la supervivencia. A) El tratamiento con rapamicina a 0,5 y 1 μM aumenta de manera dosis-dependiente la capacidad motora de machos control y *fhRNAi* de una semana. B) Los tratamientos también producen un aumento en la supervivencia en machos, siendo significativo para los individuos *fhRNAi* el producido por la

Resultados

rapamicina a 1 μ M. **control:** $y^l w^*/Y$; *actin-GAL4*. ***fhRNAi*:** $y^l w^*/Y$; *UAS-fhRNAi*; *actin-GAL4*. **Vehículo:** medio de cultivo con DMSO 0,1%, **RAP 0,5 μ M:** medio de cultivo suplementado con rapamicina 0,5 μ M, **RAP 1 μ M:** medio de cultivo suplementado con rapamicina 1 μ M. Las diferencias en la capacidad motora se analizaron mediante un test ANOVA de una vía aplicando el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. La supervivencia se analizó mediante un test Log-rank (Mantel-Cox). ns: no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Para confirmar que la rapamicina estaba inhibiendo la actividad de TORC1 a las dosis empleadas, se midió el tiempo de desarrollo requerido por las moscas para alcanzar el estado adulto. Se ha comprobado que, en conjunción con la ruta de señalización de la insulina/IGF, TORC1 controla el desarrollo larvario en *D. melanogaster*, ajustando la velocidad de crecimiento a la disponibilidad de nutrientes⁴²⁰. Una reducción en la disponibilidad de alimento, reduce la señalización de TORC1 en el cuerpo graso y en la glándula protorácica, incrementando el tiempo requerido por los individuos para alcanzar el estado de pupa⁴²⁰. Observamos que el tratamiento con rapamicina aumentaba aproximadamente en un día el tiempo que tardaban los individuos control y *fhRNAi* en alcanzar el estado adulto (Figura 20). Este resultado indicaba que la rapamicina producía un efecto similar al de la restricción en la disponibilidad de nutrientes sobre la actividad de TORC1. De estos resultados también podemos deducir que la reducción de los niveles de frataxina, en nuestro modelo, no parece afectar al tiempo de desarrollo requerido para alcanzar el estado adulto.

También comprobamos si la mejora de los fenotipos motores y de supervivencia de los individuos *fhRNAi* podía deberse a un artefacto causado por un posible efecto de la rapamicina en el funcionamiento del sistema de expresión GAL4/UAS, en el cual se basa el modelo. Para ello, se utilizaron machos de 1 semana obtenidos en la F1 del cruce entre las líneas *UAS-GFP* y *actin-GAL4* (individuos control/GFP), los cuales expresan la proteína GFP de forma ubicua bajo el control del sistema GAL4/UAS. A partir de extractos de los individuos control/GFP, comprobamos que el tratamiento con rapamicina no afectaba a la expresión de la proteína GFP, puesto que los valores de fluorescencia obtenidos eran similares a los observados en el medio Vehículo (Figura 21A). Como control negativo, se utilizaron individuos control sin la construcción *UAS-GFP*, cultivados en medio estándar para *Drosophila*. Se verificó también que el tratamiento con rapamicina no tenía efecto en los niveles del transcrito del gen *fh* en los individuos control o *fhRNAi* (Figura 21B).

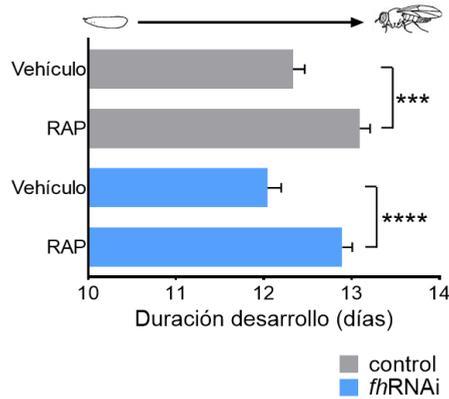


Figura 20. Efecto de la rapamicina en la duración del desarrollo hasta adulto. El tratamiento con rapamicina incrementa en aproximadamente un día el tiempo requerido por los machos control y *fhRNAi* para alcanzar el estado adulto. **control:** *y^l w^{*}/Y; actin-GAL4*. **fhRNAi:** *y^l w^{*}/Y; UAS-fhRNAi; actin-GAL4*. **Vehículo:** medio de cultivo con DMSO 0,1%, **RAP:** medio de cultivo suplementado con rapamicina 1 μ M. Se aplicaron un test ANOVA de una vía y el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

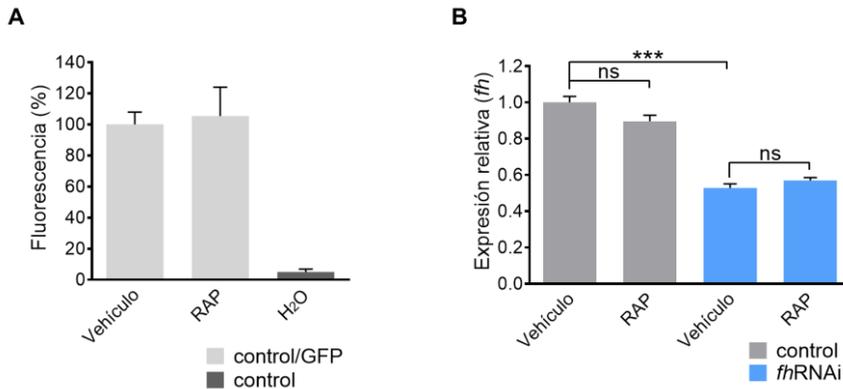


Figura 21. Efecto de la rapamicina en el sistema de expresión GAL4/UAS y en la expresión de *fh* (machos de 1 semana). **A)** El tratamiento con rapamicina no afecta al sistema de expresión GAL4/UAS. **B)** Rapamicina tampoco afecta la expresión del gen *fh* en controles o en individuos *fhRNAi*. **control:** *y^l w^{*}/Y; actin-GAL4*. **control/GFP:** *y^l w^{*}/Y; UAS-GFP; actin-GAL4*. **fhRNAi:** *y^l w^{*}/Y; UAS-fhRNAi; actin-GAL4*. **Vehículo:** medio de cultivo con DMSO 0,1%, **RAP:** medio de cultivo suplementado con rapamicina 1 μ M, **H₂O:** medio de cultivo estándar. Se aplicaron un test ANOVA de una vía y el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. ns: no significativo, *** $p < 0.01$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Resultados

1.3 Rapamicina protege a los individuos *fhRNAi* frente al estrés oxidativo.

El estrés oxidativo ejerce un papel central en la fisiopatología de la FRDA, como se ha descrito en pacientes y en modelos celulares y animales de la enfermedad, incluyendo nuestro modelo en *D. melanogaster*^{160,161,163,221,421,422}. En este contexto, la reducción de la capacidad motora y de la supervivencia de los individuos *fhRNAi* puede ser, en parte, contrarrestada por el tratamiento con el antioxidante idebenona, como se observó en un estudio previo de nuestro grupo²³⁸. Los individuos *fhRNAi* también muestran un incremento en la sensibilidad a fuentes externas de estrés oxidativo, produciéndose una más drástica reducción de la capacidad motora y de la supervivencia en comparación con el efecto sufrido por los individuos control¹⁶⁸.

Teniendo estos datos en cuenta, comprobamos si además del efecto supresor de la rapamicina sobre los fenotipos causados por la deficiencia de frataxina, el tratamiento también podía producir una reducción del estrés oxidativo. Para ello se midieron y compararon los niveles de dos marcadores de estrés oxidativo, MDA + HAE (malondialdehído + hidroxialquenos) y glutatión total en machos de 1 semana tratados con rapamicina respecto de los no tratados con dicho fármaco. MDA y HAE son compuestos que se producen a partir de peróxidos de ácidos grasos poliinsaturados inestables, mientras que el glutatión es una molécula con un papel antioxidante que reduce las cisteínas oxidadas, los grupos -SH oxidados, y actúa como cofactor en enzimas como la glutatión peroxidasa 1 y la glutatión peroxidasa 4 y la glutaredoxina 2. Observamos que, en el caso de los controles, los niveles de MDA + HAE y glutatión total no presentaron ningún cambio tras el tratamiento con rapamicina. Los individuos *fhRNAi*, en cambio, presentaban un mayor nivel de MDA + HAE que los controles, y en ellos el tratamiento con rapamicina fue capaz de revertir este incremento (Figura 22A). Los individuos *fhRNAi* también mostraron una alteración en el nivel de glutatión total, que fue parcialmente corregida por el tratamiento, si bien no hasta alcanzar los valores de los individuos control (Figura 22B). Estos resultados indican que la inhibición de TORC1 mediante rapamicina podría reducir los daños producidos por el estrés oxidativo en las moscas con deficiencia de frataxina.

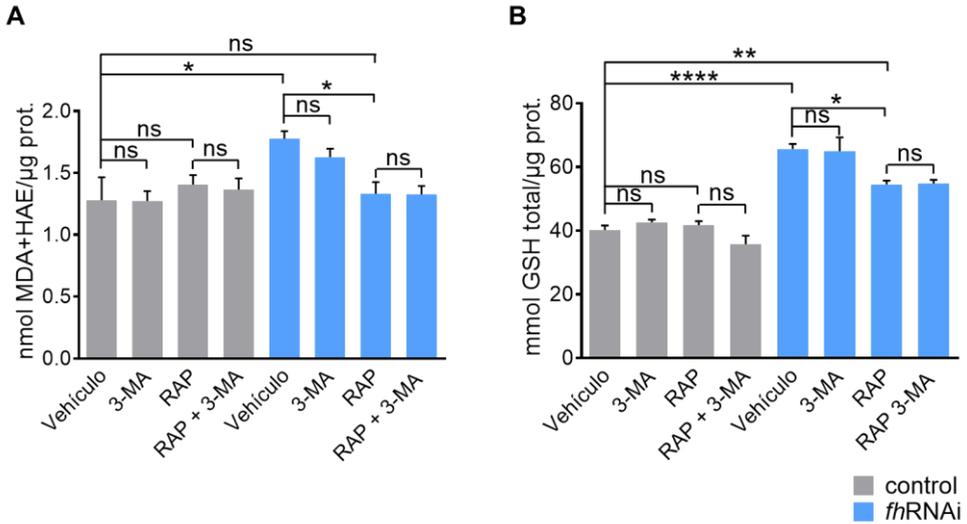


Figura 22. Efecto de la rapamicina sobre los niveles de MDA + HAE y glutatión total (machos de 1 semana). El tratamiento con rapamicina reduce los niveles alterados de MDA + HAE (A) y glutatión total (B) de los individuos *fhRNAi*. Este efecto no requiere de la inducción de autofagia, puesto que la adición de 3-metiladenina (3-MA) no afecta a los resultados. **control:** *y^l w^{*}/Y; actin-GAL4*. ***fhRNAi*:** *y^l w^{*}/Y; UAS-*fhRNAi*; actin-GAL4*. **Vehículo:** medio de cultivo con DMSO 0,1%, **3-MA:** medio de cultivo suplementado con 3-metiladenina 67 μ M, **RAP:** medio de cultivo suplementado con rapamicina 1 μ M, **RAP + 3-MA:** medio de cultivo con rapamicina 1 μ M + 3-metiladenina 67 μ M. Se aplicaron un test ANOVA de una vía y el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. ns: no significativo, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

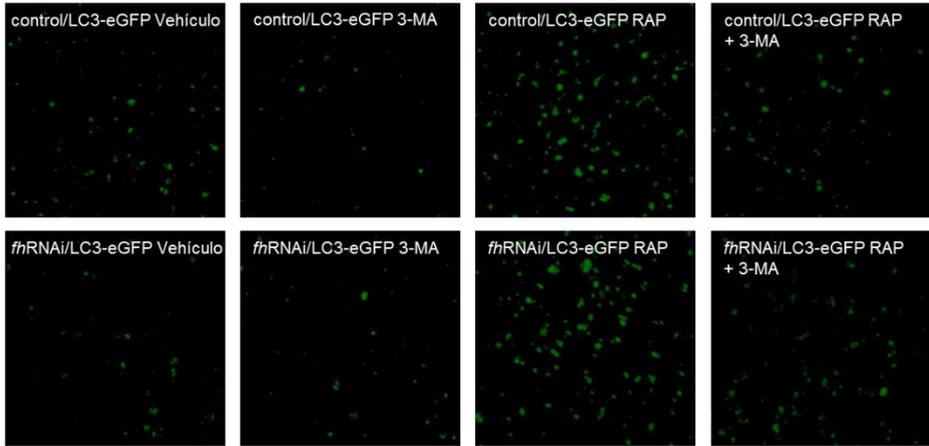
Está comprobado que el tratamiento con rapamicina es capaz de inducir el proceso de autofagia a través de la inhibición de TORC1⁴²³. Por tanto, nos planteamos si la autofagia podría ejercer un papel relevante en la protección de la rapamicina frente al estrés oxidativo en los individuos *fhRNAi*. Para este propósito se utilizó el compuesto 3-metiladenina (3-MA), el cual inhibe la proteína VPS34, una fosfatidilinositol 3-quinasa de clase III esencial para la biogénesis de los autofagosomas⁴²⁴. En primer lugar, se comprobó que las concentraciones empleadas de rapamicina y 3-MA producían, respectivamente, la inducción y la inhibición del proceso de autofagia. Para ello se utilizó una cepa que contenía las construcciones *UAS-LC3-eGFP* y *nos-GAL4* (permitiendo la expresión de la proteína de fusión LC3-eGFP en los tejidos larvarios). Dicha cepa se cruzó por las cepas *yw* y *UAS-*fhIR*^{2nd}* para generar los individuos control/LC3-eGFP y *fhRNAi*/LC3-eGFP respectivamente. Los individuos anteriores se sometieron durante su desarrollo larvario a

Resultados

diferentes tratamientos: medio Vehículo, medio suplementado con 3-MA a 67 μM (medio 3-MA), medio RAP y medio suplementado tanto con rapamicina a 1 μM como con 3-MA a 67 μM (medio RAP + 3-MA). Cuando las larvas alcanzaron el estadio L3 se extrajo el tejido graso. La proteína LC3 (MAP1LC3B, *microtubule associated protein 1 light chain 3 beta*) forma parte de estructuras autofagosomales, por lo que la cuantificación del número de puntos fluorescentes eGFP en las preparaciones de tejido graso es indicativa de la abundancia de autofagosomas y de la intensidad del proceso de autofagia (siempre que no haya otros procesos que interfieran en este mecanismo). En la Figura 23A y Figura 24A puede observarse como el número de puntos LC3-eGFP (representados en porcentaje de señal LC3-eGFP en la Figura 24A) se incrementa en el cuerpo graso de larvas crecidas en medio RAP, tanto en individuos control como en individuos con la interferencia de fraxina. También se puede observar que la adición de 3-MA al medio revierte de forma notable el incremento de la señal LC3-eGFP producido por la rapamicina.

A

NORMOXIA



B

HIPEROXIA

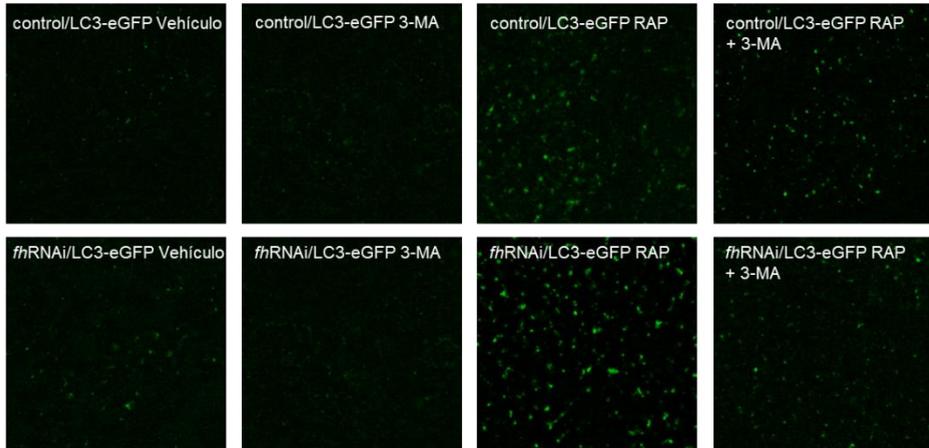


Figura 23. Efecto de la rapamicina y el 3-MA sobre la densidad de puntos LC3-eGFP en tejido graso de larva. En normoxia (A) e hiperoxia (B), el tratamiento con rapamicina induce el proceso de autofagia, aumentando la formación de autofagosomas y el número de puntos LC3-eGFP en larvas de individuos control y con deficiencia de frataxina portadores de una construcción *UAS-LC3-eGFP*. La adición de 3-MA inhibe la formación de autofagosomas disminuyendo el número de puntos. **control/LC3-eGFP:** *w*/y^l w¹¹¹⁸*; *UAS-LC3-eGFP*; *nos-GAL4*. **fhRNAi/LC3-eGFP:** *w*/w**; *UAS-LC3-eGFP/UAS-fhRNAi*; *nos-GAL4*. **Vehículo:** medio de cultivo con DMSO 0,1%, **3-MA:** medio de cultivo suplementado con 3-metiladenina 67 μ M, **RAP:** medio de cultivo suplementado con rapamicina 1 μ M, **RAP + 3-MA:** medio de cultivo con rapamicina 1 μ M + 3-metiladenina 67 μ M. eGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*, LC3: *MAP1LC3B (microtubule associated protein 1 light chain 3 beta)*.

Resultados

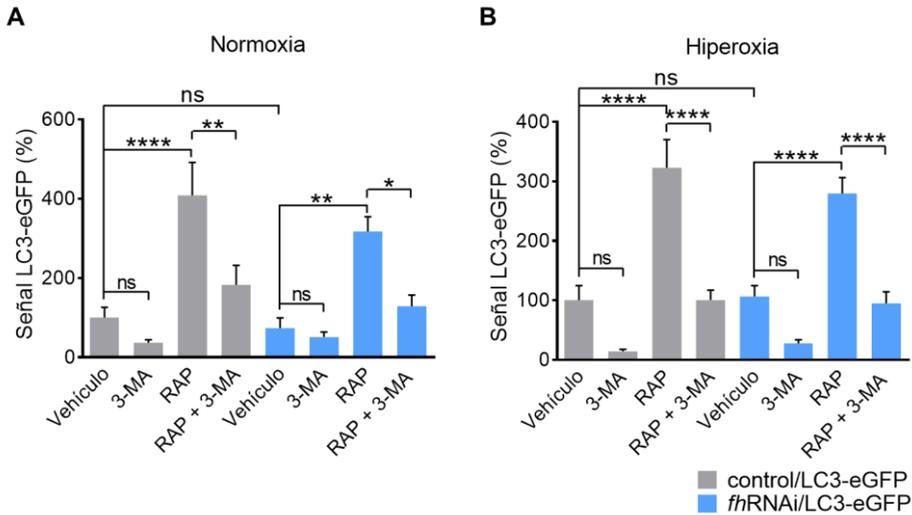


Figura 24. Cuantificación de la señal LC3-eGFP en individuos tratados con rapamicina y 3-MA.

El conteo de puntos LC3-eGFP en las imágenes de tejido graso revela que los tratamientos con rapamicina y 3-MA tienen un efecto similar en normoxia e hiperoxia. Rapamicina induce eficazmente el proceso de autofagia incrementando notablemente la señal LC3-eGFP en individuos control y *fhRNAi*. Por su parte, el 3-MA también resulta eficaz como inhibidor de la biogénesis de autofagosomas. **control/LC3-eGFP:** *w^{*}/y^l w¹¹¹⁸*; *UAS-LC3-GFP*; *nos-GAL4*. ***fhRNAi/LC3-eGFP:*** *w^{*}/w^{*}*; *UAS-LC3-GFP/UAS-fhRNAi*; *nos-GAL4*. **Vehículo:** medio de cultivo con DMSO 0,1%, **3-MA:** medio de cultivo suplementado con 3-metiladenina 67 μ M, **RAP:** medio de cultivo suplementado con rapamicina 1 μ M, **RAP + 3-MA:** medio de cultivo con rapamicina 1 μ M + 3-metiladenina 67 μ M. eGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*, LC3: *MAP1LC3B (microtubule associated protein 1 light chain 3 beta)*. Se aplicó un test ANOVA de una vía y el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. ns: no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

El siguiente paso fue analizar el efecto del compuesto 3-MA en los niveles de MDA + HAE (Figura 22A) y glutatión total (Figura 22B). No se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos RAP y RAP + 3-MA en los individuos *fhRNAi*, indicando que, en este caso, el efecto de la rapamicina sobre el estrés oxidativo debía ser independiente de su acción sobre la autofagia. Estos datos mostraron que, aunque la autofagia es inducida por la rapamicina, no ejerce un efecto protector relevante frente al estrés oxidativo endógeno en las condiciones ensayadas.

Dado que el déficit de frataxina aumenta la sensibilidad de las células a una gran variedad de agentes prooxidantes^{52,163,165-171}, se comprobó posteriormente si la inducción de autofagia

por rapamicina proporcionaba algún beneficio bajo la aplicación de un estrés oxidativo externo. Con ese fin se observó el efecto del compuesto en la supervivencia de individuos *fhRNAi* sometidos a hiperoxia durante 4 días (Figura 25A). En el medio Vehículo se produjo una mortalidad significativamente superior en los individuos *fhRNAi* con respecto a los controles. El tratamiento con rapamicina redujo la mortalidad de los individuos con deficiencia de frataxina, mientras que la adición al medio de 3-MA anuló dicho efecto beneficioso. Los resultados sugieren que, bajo condiciones de alto estrés oxidativo, como la aplicación de una atmósfera hiperóxica, la inducción de autofagia sí que puede ser requerida para que la rapamicina ejerza un efecto protector sobre los individuos con deficiencia de frataxina. Previamente a este análisis, se comprobó que bajo las condiciones de hiperoxia utilizadas la rapamicina y el 3-MA también son efectivos como inductor e inhibidor de la autofagia respectivamente (Figura 23B y Figura 24B). Para confirmar el requerimiento de la autofagia para la protección frente al estrés oxidativo externo, se midió la actividad del enzima aconitasa en machos de 1 semana sometidos a hiperoxia durante los 2 últimos días (Figura 25B). Previamente conocemos que bajo estas condiciones experimentales la actividad aconitasa se reduce en los individuos control y *fhRNAi*, aunque esta reducción es significativamente mayor en los individuos con déficit de frataxina¹⁶⁸. Observamos que tras el tratamiento con rapamicina se recuperó parcialmente la actividad aconitasa de las moscas *fhRNAi*. Sin embargo, esta recuperación no se dio cuando al medio de cultivo se añadió además 3-MA (Figura 25B).

Estos datos sugieren que la inducción de autofagia, mediante el tratamiento con rapamicina, es necesaria para el efecto protector del compuesto frente a condiciones altamente oxidantes como las aplicadas en este trabajo. No obstante, deben ser otros los mecanismos principales, desencadenados por la inhibición de TORC1, los que sean responsables de la protección frente a la producción endógena de ROS en las moscas con deficiencia de frataxina.

Resultados

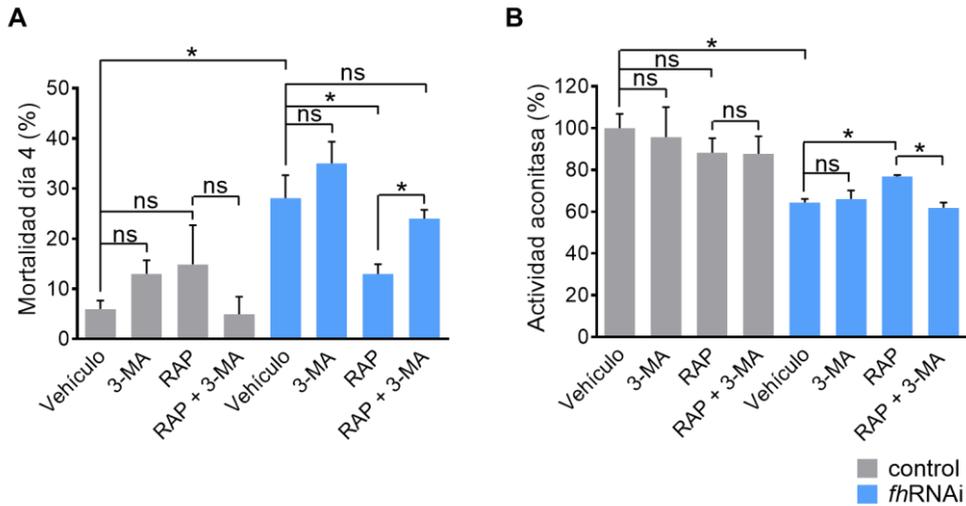


Figura 25. Efecto de la rapamicina sobre la supervivencia y la actividad aconitasa en hiperoxia.

En condiciones de cultivo en un ambiente con un 99,5% de O₂, el tratamiento con rapamicina reduce la mortalidad de los machos *fhRNAi* causada por este ambiente (A) y aumenta en ellos la actividad aconitasa (B). La adición de 3-MA anula el efecto beneficioso de la rapamicina, resaltando el papel crítico de la inducción de autofagia en los fenotipos analizados. **control:** *y^l w**; *actin-GAL4*. ***fhRNAi*:** *y^l w**; *UAS-fhRNAi*; *actin-GAL4*. **Vehículo:** medio de cultivo con DMSO 0,1%, **3-MA:** medio de cultivo suplementado con 3-metiladenina 67 μM, **RAP:** medio de cultivo suplementado con rapamicina 1 μM, **RAP + 3-MA:** medio de cultivo con rapamicina 1 μM + 3-metiladenina 67 μM. Se aplicó un test ANOVA de una vía y el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. ns: no significativo, *p<0.05. Las barras de error representan el error estándar de la media.

El complejo TORC1 es capaz de modular la función de varios factores de transcripción que, a su vez, controlan la expresión de importantes genes antioxidantes^{425,426}. Para determinar si la rapamicina puede incrementar las defensas antioxidantes, y de esta manera explicar su protección frente al estrés oxidativo asociado a la deficiencia de frataxina, se analizó en machos de 1 semana la expresión de dos factores de transcripción clave en la protección frente al estrés oxidativo, Cnc (ortólogo del Nrf2 humano) y FOXO (Figura 26A y B). En condiciones basales se detectaron mayores niveles de expresión de los genes codificantes de ambos factores de transcripción, *cnc* (*cap-n-collar*) y *foxo* (*forkhead box, subgroup O*), en los individuos con deficiencia de frataxina con respecto a los controles. No obstante, la expresión de dichos genes no experimentó cambios significativos tras el tratamiento con rapamicina, ni en los individuos control ni en los *fhRNAi*. También se estudió la expresión de cuatro genes diana bien conocidos de estos factores de transcripción, *Gclc*

(*Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit*) y *GstD1* (*Glutathione S transferase D1*) para Cnc (Figura 26A) y *Sesn* (*Sestrin*) y *Ac76E* (*Adenylyl cyclase 76E*) para FOXO (Figura 26B). La expresión de *Sesn* y *Ac76E* fue similar en las moscas control y *fhRNAi* y no mostró cambios tras la adición de rapamicina al medio. Por su parte, la expresión de los genes diana de Cnc, *Gclc* y *GstD1*, fue significativamente mayor en las moscas deficientes de frataxina respecto de las moscas control y en ambos casos dicha expresión aumentó en los individuos tratados con el compuesto. Tras el tratamiento con rapamicina también se observó un aumento en la expresión de los genes antioxidantes *Cat* (*Catalase*), *Prx3* (*Peroxiredoxin 3*), *Sod1* (*Superoxide dismutase 1*) y *Sod2* (*Superoxide dismutase 2 (Mn)*) (Figura 26C). Para *Sod2* se vio que en ausencia de rapamicina su expresión ya se encontraba aumentada en los individuos *fhRNAi* con respecto a los controles.

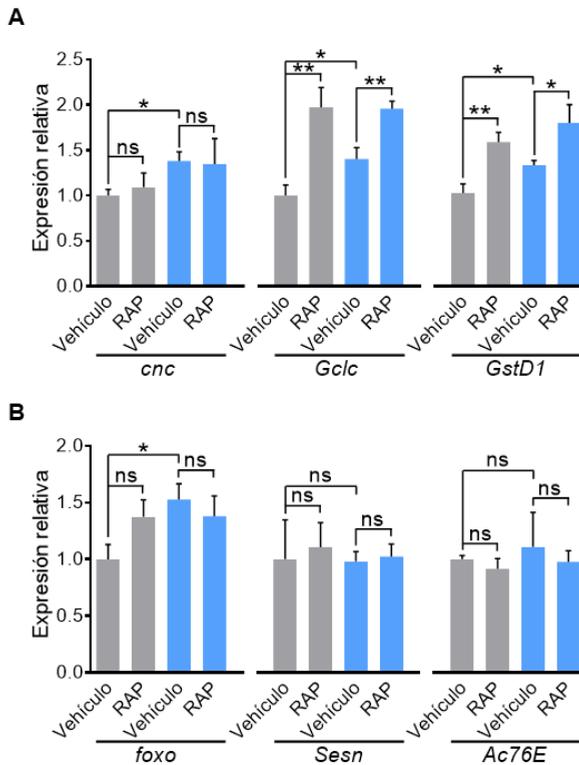


Figura 26. Efecto de la rapamicina sobre la expresión de *cnc* y *foxo* y diferentes genes diana (machos de 1 semana) (Continuación figura y pie en pag. 104).

A) La expresión de *cnc* no se ve afectada por el tratamiento con rapamicina, no obstante, la expresión de dos de sus dianas, *Gclc* y *GstD1*, es mayor en los individuos tratados con el compuesto. **B)** El tratamiento no afecta a la expresión de *foxo* ni a las dianas de este factor de transcripción, *Sesn* y *Ac76E*.

Resultados

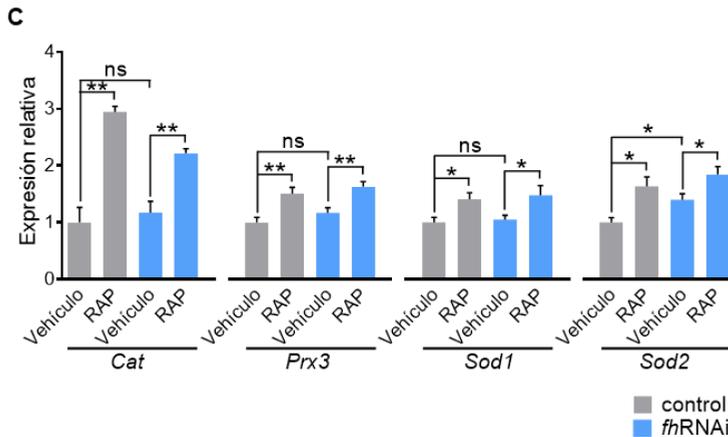


Figura 26. Efecto de la rapamicina sobre la expresión de *cnc* y *foxo* y diferentes genes diana (machos de 1 semana) (Continuación).

C) Rapamicina aumenta la expresión de los genes antioxidantes *Cat*, *Prx3*, *Sod1* y *Sod2*. **control:** *y^l w^{*}*; *actin-GAL4*. ***fhRNAi*:** *y^l w^{*}*; *UAS-fhRNAi*; *actin-GAL4*. **Vehículo:** medio de cultivo con DMSO 0,1%, **RAP:** medio de cultivo suplementado con rapamicina 1 μ M. *Ac76E:* *Adenylyl cyclase 76E*, *Cat:* *Catalase*, *cnc:* *cap-n-collar*, *foxo:* *forkhead box, sub-group O*, *Gclc:* *Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit*, *GstD1:* *Glutathione S transferase D1*, *Prx3:* *Peroxisredoxin 3*, *Sesn:* *Sestrin*, *Sod1:* *Superoxide dismutase 1*, *Sod2:* *Superoxide dismutase 2 (Mn)*. Se aplicó un test ANOVA de una vía y el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. ns: no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Para comprobar si el aumento de la expresión de las defensas antioxidantes por el tratamiento con rapamicina era efectivamente causado por un incremento en la actividad de Cnc, se estudió su localización celular utilizando un alelo de *cnc* marcado con eGFP. Mediante cruces se generaron individuos control y *fhRNAi* portadores de la construcción *cnc-eGFP* (individuos control/Cnc-eGFP y *fhRNAi*/Cnc-eGFP, respectivamente). Se midió la fluorescencia producida por la proteína eGFP en extractos de fracciones nucleares y citosólicas obtenidas de machos de 1 semana con los genotipos adecuados. Se observó que la ratio Cnc-eGFP nuclear/Cnc-eGFP total era mayor en los individuos tratados con rapamicina (Figura 27A). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas en la ratio FOXO nuclear/FOXO total (Figura 27B) cuando se realizó el mismo experimento a partir de larvas que expresaban una proteína de fusión FOXO-GFP (individuos control/FOXO-GFP y *fhRNAi*/FOXO-GFP). En este caso se utilizaron larvas debido a que la expresión de la construcción FOXO-GFP producía letalidad en pupa. Estos resultados indican que la

rapamicina puede incrementar la protección frente al estrés oxidativo mediante la inducción de defensas antioxidantes, y que este efecto podía ser mediado, al menos en parte, por un incremento de la translocación al núcleo del factor de transcripción Cnc.

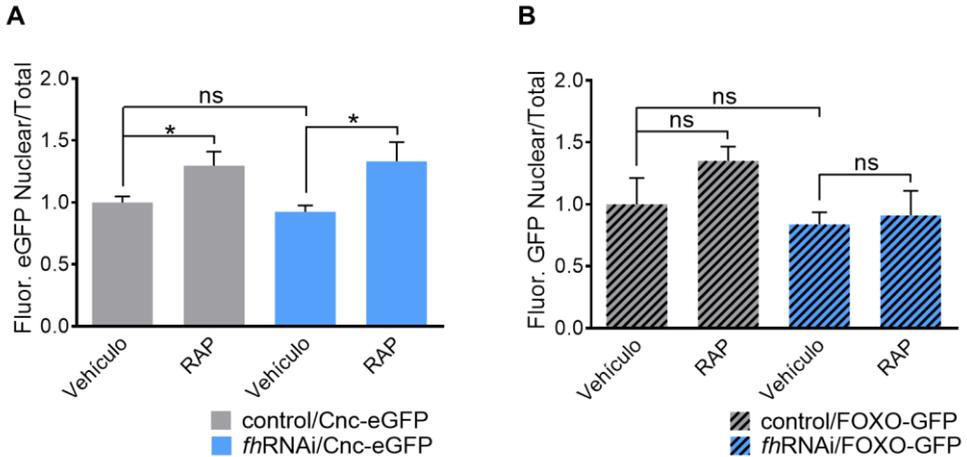


Figura 27. Efecto de la rapamicina sobre la localización celular de Cnc y FOXO. **A)** El tratamiento con rapamicina incrementa la fracción del factor de transcripción Cnc localizada en el núcleo en machos de 1 semana. **B)** El tratamiento no afecta significativamente a la localización de FOXO en larvas. **control/Cnc-eGFP:** $y^l w^*/Y$; *cnc-eGFP*; *actin-GAL4*. **fhRNAi/Cnc-eGFP:** $y^l w^*/Y$; *UAS-fhRNAi/cnc-eGFP*; *actin-GAL4*. **control/FOXO-GFP:** $y^l w^*/w^{1118}$; *UAS-foxo-GFP/actin-GAL4*. **fhRNAi/FOXO-GFP:** $y^l w^*/w^{1118}$; *UAS-fhRNAi*; *UAS-foxo-GFP/actin-GAL4*. **Vehículo:** medio de cultivo con DMSO 0,1%, **RAP:** medio de cultivo suplementado con rapamicina 1 μ M. Cnc: factor de transcripción *cap-n-collar*, eGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*, FOXO: factor de transcripción *forkhead box, sub-group O*, GFP: *Green Fluorescent Protein*. Se aplicó un test ANOVA de una vía y el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. ns: no significativo, * $p < 0.05$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

1.4 Rapamicina incrementa el nivel de ATP a través de 4E-BP

La reducción de los niveles de frataxina va acompañada de una reducción en la síntesis de ATP en tejidos de los pacientes de FRDA, como se ha observado en músculo cardíaco y esquelético^{185,427}. Para determinar si la síntesis de ATP también estaba afectada en las moscas *fhRNAi*, se midió el nivel de esta molécula a partir de machos de 1 semana. No se hallaron diferencias significativas en el nivel de ATP entre los individuos control y los *fhRNAi* (Figura 28A). Debido a que cada tejido presenta una sensibilidad distinta a la deficiencia de frataxina¹⁶⁸, es posible que la reducción en los niveles de ATP esté restringida a aquellos tipos celulares más afectados, lo que resulta indetectable al medir el ATP en el conjunto del

Resultados

individuo. No obstante, observamos que el tratamiento con rapamicina era capaz de producir un aumento de aproximadamente el 40% en el nivel de ATP, tanto en los individuos control como en los *fhRNAi* (Figura 28A). Esto podría contribuir al efecto beneficioso del compuesto sobre los fenotipos de los individuos con deficiencia de frataxina.

Con el fin de identificar cuál de las rutas controladas por TORC1 podría estar involucrada en el incremento de ATP producido por la rapamicina, se combinó el tratamiento de rapamicina con el compuesto 3-MA, un alelo de una forma constitutivamente activa de S6K (*S6k^{CA}*) y un alelo de pérdida de función de 4E-BP (*4E-BP^{LOF}*). La inhibición farmacológica de TORC1 conlleva una reducción de la actividad de S6K y un incremento en la actividad de 4E-BP, por lo que los alelos utilizados limitarían el efecto de la inhibición del complejo sobre sus dianas S6K y 4E-BP. Al medir los niveles de ATP en cada una de las condiciones indicadas, observamos que el alelo de pérdida de función de 4E-BP limitaba el incremento de ATP producido por la rapamicina, tanto en individuos control como en los *fhRNAi*, mientras que la forma constitutivamente activa de S6K o la inhibición de la autofagia por acción del compuesto 3-MA no produjeron cambios significativos (Figura 28A). Estos resultados nos indican que la proteína 4E-BP es el efector por el que la rapamicina es capaz de incrementar los niveles de ATP mediante la inhibición de TORC1^{428,429}. Por sí mismos, la forma constitutivamente activa de S6K o la pérdida de función de 4E-BP no afectaron a los niveles de ATP (Figura 28B). Se comprobó también, en ausencia de rapamicina, el posible efecto sobre el nivel de ATP de mutaciones que tuvieran el efecto contrario a los alelos anteriores. Se utilizó para ello un alelo de una forma dominante negativa de S6K (*S6k^{DN}*) y un alelo de pérdida de función de eIF4E1 (*eIF4E1^{LOF}*). La proteína 4E-BP actúa inhibiendo la función de eIF4E1, de forma que su actividad disminuye cuando aumenta la de 4E-BP como consecuencia de la inhibición de TORC1. Observamos que el alelo dominante negativo de *S6k* es capaz de incrementar los niveles de ATP en individuos control y *fhRNAi* (Figura 28C), mientras que no se detecta ningún cambio debido al alelo *eIF4E1^{LOF}*. Este último resultado indica, que en ausencia del tratamiento con rapamicina, la modulación de los procesos controlados por S6K también podría afectar a los niveles de ATP.

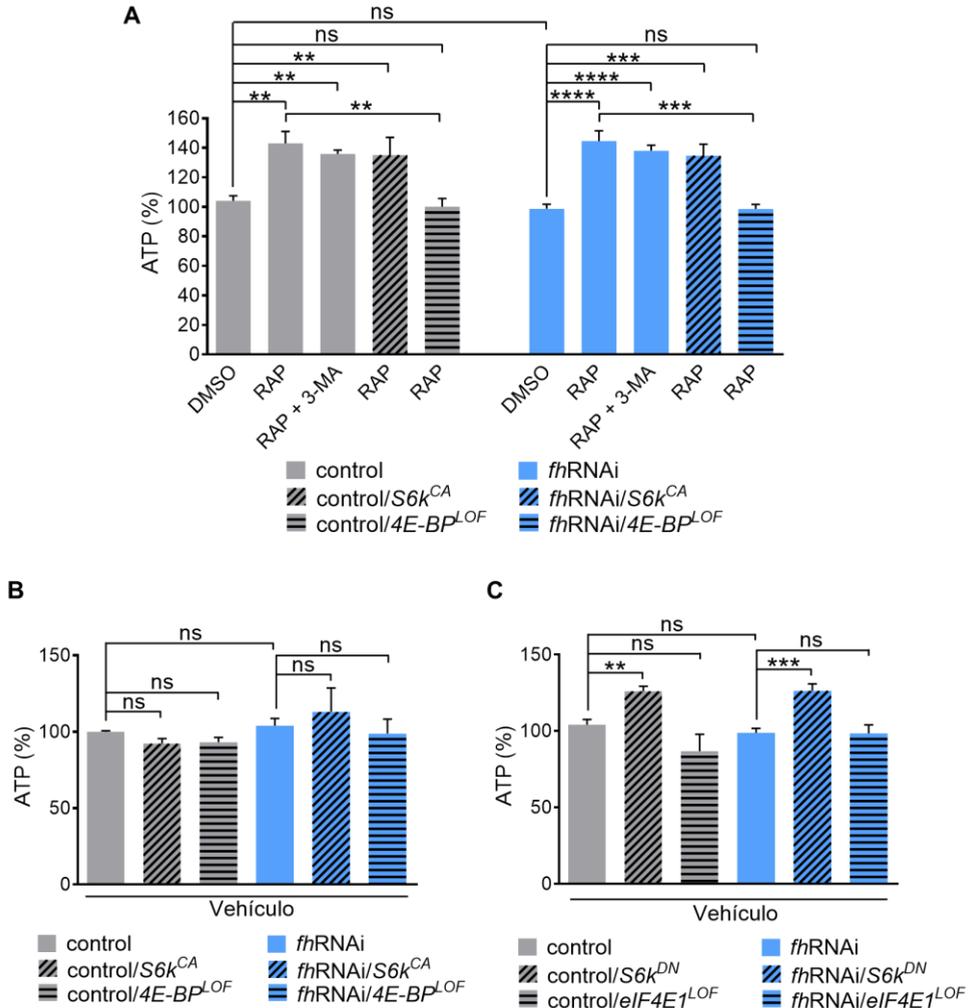


Figura 28. Efecto de los diferentes tratamientos y modificadores genéticos en el nivel de ATP (machos de 1 semana).

A) El tratamiento con rapamicina aumenta los niveles de ATP en extractos de moscas tanto en individuos control como en individuos *fhRNAi*. El tratamiento combinado con el inhibidor autofágico 3-MA o la expresión de un alelo constitutivamente activo de la proteína S6K (*S6k^{CA}*) no revierten el incremento del nivel de ATP. Dicho efecto se observa con la presencia de un alelo de pérdida de función de la proteína 4E-BP (*4E-BP^{LOF}*). **B)** Los alelos *S6k^{CA}* y *4E-BP^{LOF}* no producen por si mismos alteraciones en los niveles de ATP en individuos control o *fhRNAi* tratados únicamente con el vehículo. **C)** La pérdida de función de *eIF4E1* (*eIF4E1^{LOF}*) tampoco afecta a los niveles de ATP; sin embargo, la expresión de una forma dominante negativa de S6K (*S6k^{DN}*) aumenta estos niveles tanto en individuos control como en individuos *fhRNAi*. **control:** *y^l w^{*}; actin-GAL4*. **fhRNAi:** *y^l w^{*}; UAS-fhRNAi; actin-GAL4*. **control/(*S6k^{CA}/S6k^{DN}/4E-BP^{LOF}/eIF4E1^{LOF}*):** individuos control portando los diferentes

Resultados

modificadores genéticos. *fhRNAi*(*S6k^{CA}/S6k^{DN}/4E-BP^{LOF}/eIF4E1^{LOF}*): individuos *fhRNAi* portando los diferentes modificadores genéticos. **Vehículo**: medio de cultivo con DMSO 0,1%, **RAP**: medio de cultivo suplementado con rapamicina 1 μ M, **RAP + 3-MA**: medio de cultivo con rapamicina 1 μ M + 3-metiladenina 67 μ M. *eIF4E1*: *eukaryotic translation initiation factor 4E1*, *S6k*: *ribosomal protein S6 kinase*, *4E-BP*: *eIF4E-binding protein*. Se aplicó un test ANOVA de una vía y el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. ns: no significativo, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

1.5 El efecto de la rapamicina sobre la capacidad motora es mediado por S6K y 4E-BP.

Posteriormente, se comprobó cuáles de los efectores de TORC1 podrían estar implicados en la recuperación de la capacidad motora producida por el tratamiento con rapamicina en los individuos *fhRNAi*. Analizamos este fenotipo en machos de 1 semana combinando el tratamiento de rapamicina con el compuesto 3-MA, la presencia del alelo *S6k^{CA}* y la del alelo *4E-BP^{LOF}*. Se observó que la adición al medio del inhibidor autofágico 3-MA no afectaba al incremento en la capacidad motora producida por la rapamicina (Figura 29A), por lo que la inducción del proceso de autofagia no parecía ser crítica. Sin embargo, tanto la expresión de la forma constitutivamente activa de S6K como la del alelo *4E-BP^{LOF}*, limitaron de forma notable el incremento en la capacidad motora observado tras el tratamiento con rapamicina (Figura 29A). Dicho resultado sugiere que los procesos modulados por ambas proteínas ejercen un papel relevante en la mejora del fenotipo motor que otorga la inhibición de TORC1 mediante el tratamiento con el compuesto. Por otro lado, se observó que, en ausencia de rapamicina, la modulación de la actividad de S6K afecta de forma diferente a los individuos control y a los *fhRNAi*. La expresión de la forma constitutivamente activa de S6K no afecta a los individuos control, mientras que en los *fhRNAi* provoca una reducción aún mayor de la capacidad motora (Figura 29B). En contraste con este resultado, la expresión del alelo dominante negativo de *S6k* empeora la capacidad motora de los individuos control sin afectar a los *fhRNAi* (Figura 29C). En el rastreo genético llevado a cabo por nuestro grupo mencionado anteriormente (Figura 45, Material suplementario), dicho alelo era beneficioso para los individuos *fhRNAi*, sin embargo, la edad y el sexo de las moscas fue diferente en cada caso, lo que podría explicar esta discrepancia en los resultados.

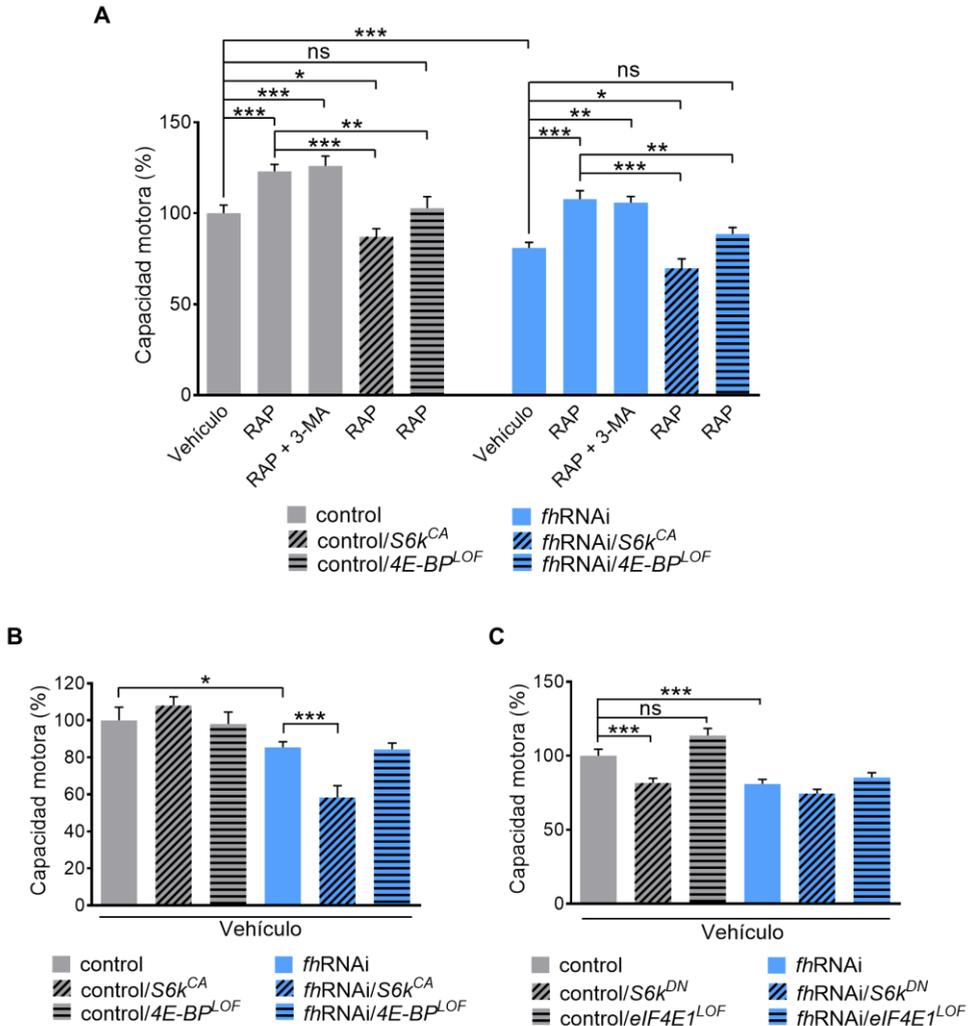


Figura 29. Efecto de los diferentes tratamientos y modificadores genéticos en la capacidad motora (machos de 1 semana). **A)** La adición de 3-MA (inhibidor autofágico) no afecta al incremento de la capacidad motora producido por la rapamicina. Sin embargo, la combinación de rapamicina con una forma constitutivamente activa de S6K (*S6k^{CA}*) o un alelo de pérdida de función de 4E-BP (*4E-BP^{LOF}*) limita el efecto beneficioso del compuesto, señalando que ambas proteínas son relevantes para mediar los efectos sobre la capacidad motora. **B)** La expresión de *S6k^{CA}* produce por sí sola una reducción significativa de la capacidad de escalada de los individuos *fhRNAi*, sin afectar a los individuos control; mientras que el alelo *4E-BP^{LOF}* no produce ningún efecto significativo. **C)** La expresión de un alelo dominante negativo de S6K (*S6k^{DN}*) produce una reducción en la capacidad motora de los controles sin afectar a los *fhRNAi*. La presencia de un alelo de pérdida de función de *eIF4E1* (*eIF4E1^{LOF}*) tampoco tiene un efecto significativo. **control:** *y^l w^{*}*; *actin-GAL4*. ***fhRNAi:*** *y^l w^{*}*; *UAS-fhRNAi*; *actin-GAL4*. **control/(*S6k^{CA}*/*S6k^{DN}*/*4E-BP^{LOF}*/*eIF4E1^{LOF}*):** individuos control portando los diferentes

Resultados

modificadores genéticos. *fhRNAi*(*S6k^{CA}/S6k^{DN}/4E-BP^{LOF}/eIF4E1^{LOF}*): individuos *fhRNAi* portando los diferentes modificadores genéticos. **Vehículo**: medio de cultivo con DMSO 0,1%, **RAP**: medio de cultivo suplementando con rapamicina 1 μ M, **RAP + 3-MA**: medio de cultivo con rapamicina 1 μ M + 3-metiladenina 67 μ M. *eIF4E1*: eukaryotic translation initiation factor 4E1, *S6k*: ribosomal protein S6 kinase, *4E-BP*: eIF4E-binding protein. Se aplicó un test ANOVA de una vía y el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. ns: no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

1.6 La inducción de autofagia interviene en el aumento de la supervivencia producido por la rapamicina.

Dado que la autofagia no parecía tener un papel relevante en la mejora de la capacidad motora de los individuos *fhRNAi*, nos planteamos analizar si este proceso podría participar en el incremento de la supervivencia en machos observado tras el tratamiento con rapamicina. Para ello se estudió el efecto del tratamiento RAP + 3-MA sobre este fenotipo. La adición de 3-MA al medio con rapamicina eliminó el efecto beneficioso de la rapamicina sobre la supervivencia en los individuos control y agravó este fenotipo en los individuos *fhRNAi* (Figura 30).

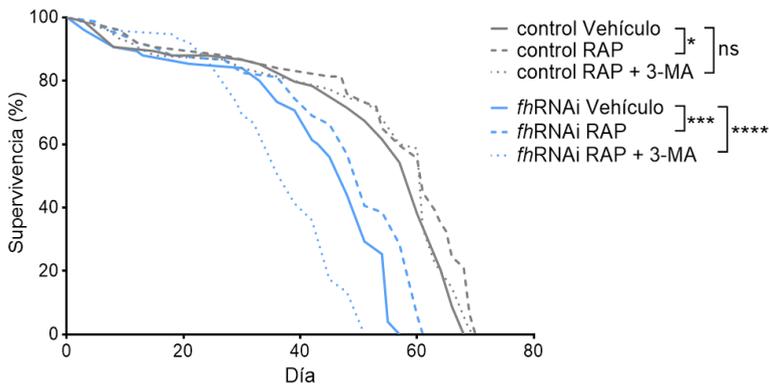


Figura 30. Efecto sobre la supervivencia de 3-MA en combinación con el tratamiento con rapamicina en machos. La adición del inhibidor autofágico 3-MA impide el incremento de la supervivencia producido por el tratamiento con rapamicina (RAP) en la cepa *fhRNAi*. **control**: $y^l w^*$; *actin-GAL4*. **fhRNAi**: $y^l w^*$; *UAS-fhRNAi*; *actin-GAL4*. **Vehículo**: medio de cultivo con DMSO 0,1%, **RAP**: medio de cultivo suplementado con rapamicina 1 μ M, **RAP + 3-MA**: medio de cultivo con rapamicina 1 μ M + 3-metiladenina 67 μ M. Para comparar la supervivencia entre las distintas condiciones experimentales se utilizó un test Log-rank (Mantel-Cox).

1.7 Inhibición de la actividad de mTOR en un modelo de FRDA en células SH-SY5Y

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en el modelo de FRDA en *D. melanogaster*, se decidió estudiar los efectos de la inhibición de la proteína mTOR en un modelo de la enfermedad generado en una línea celular humana. En concreto, se partió de un modelo obtenido por la Dra. Gonzalez Cabo, basado en la interferencia del gen *FXN* en células derivadas de neuroblastoma SH-SY5Y⁴⁰⁴. Se utilizaron para los diferentes experimentos tres líneas celulares distintas: (I) una línea de células SH-SY5Y *wild type*; (II) una línea, que actúa como control, en la que las células fueron transfectadas con el plásmido pLKO.1-NT, capaz de activar el mecanismo de silenciamiento génico por RNAi pero sin ninguna diana en humanos; y (III) una línea de células transfectadas con el vector pLKO.1-FXN (denominada FXN-138.1), la cual expresa un shRNA contra el gen *FXN* y en la que se produce una reducción en los niveles de frataxina del 82%⁴⁰⁴.

La proteína mTOR realiza su función a través de dos complejos, TORC1 y TORC2, de los que forma parte²⁶³. A pesar de que la rapamicina se considera un inhibidor del complejo TORC1, existen indicios de que los tratamientos a largo plazo podrían ser capaces de inhibir también la actividad del complejo TORC2⁴³⁰. Con el objetivo de determinar en qué medida contribuía cada complejo a algunos de los efectos beneficiosos observados en las moscas *fhRNAi* tras los tratamientos con rapamicina, se utilizaron dos inhibidores ATP competitivos de la actividad quinasa de la proteína mTOR con diferentes afinidades por TORC1 y TORC2. El primero de ellos, el compuesto Torin1, presenta una afinidad similar por ambos complejos, mientras que el compuesto XL388 tiene una mayor especificidad hacia TORC1 (Figura 31A). Como determinación de la actividad de los dos complejos y para establecer las condiciones óptimas de tratamiento, se detectó el nivel de fosforilación de las proteínas S6 y AKT. La proteína S6 es fosforilada por la proteína S6K, cuya actividad es inducida por el complejo TORC1. La proteína AKT, por su parte, es fosforilada por el complejo TORC2. Mediante *western blot*, y utilizando anticuerpos contra la proteína S6 fosforilada (S235+S236) y AKT (S473) fosforilada, se determinó el nivel de fosforilación de ambas proteínas, indicativo del grado de actividad de TORC1 y TORC2 respectivamente.

Resultados

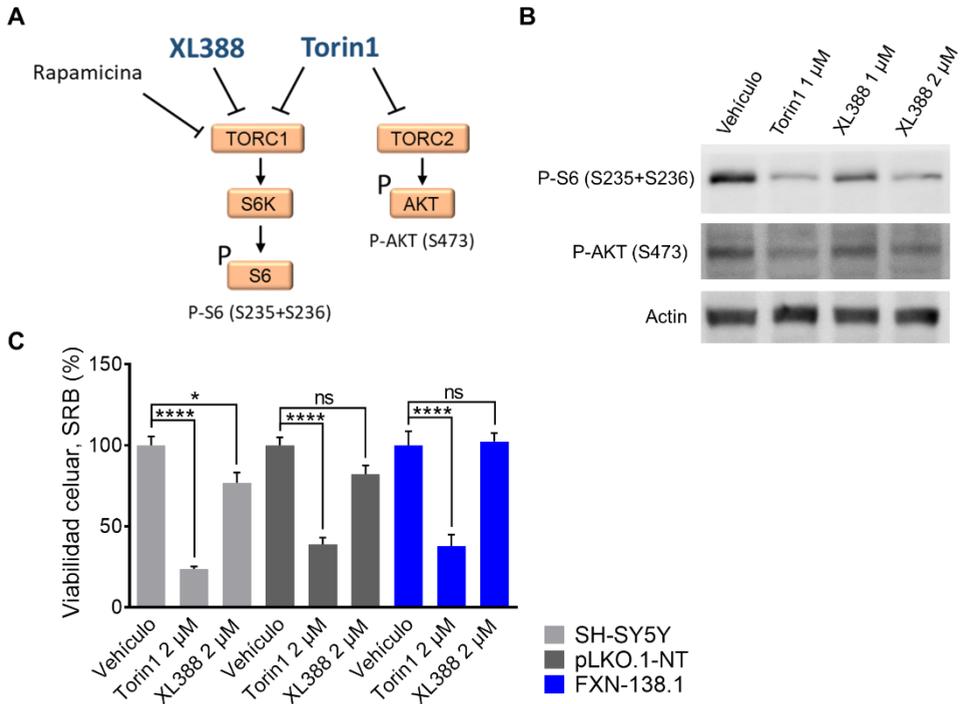


Figura 31. Inhibición de TORC1 y TORC2 mediante inhibidores ATP competitivos de mTOR.

A) En el caso del modelo celular de FRDA en células SH-SY5Y, se utilizaron los inhibidores ATP competitivos Torin1 y XL388. Torin1 presenta una afinidad similar por los complejos TORC1 y TORC2, mientras que XL388 tiene una afinidad mayor por TORC1. El objetivo del uso de ambos inhibidores es conseguir la inhibición de ambos complejos TORC mediante Torin1, y afectar solo a la actividad de TORC1 con XL388. La actividad de ambos complejos es evaluada detectando, mediante *western blot*, el nivel de fosforilación de las proteínas S6 y AKT. **B)** Nivel de fosforilación de las proteínas S6 y AKT tras el tratamiento de la línea SH-SY5Y *wild type* con Torin1 y XL388. El tratamiento durante 24 h con Torin1 1 μM reduce la fosforilación de S6 y AKT, indicativo de una reducción en la actividad de TORC1 y TORC2. El tratamiento con XL388 1 μM reduce, aunque de forma menos intensa, la fosforilación de S6 sin afectar a la fosforilación de AKT, lo que indica una reducción en la actividad de TORC1. **C)** Efecto de Torin1 y XL388 sobre la viabilidad celular a una concentración 2 μM . Torin1 afecta seriamente la viabilidad celular. Para XL388 la reducción de la viabilidad es significativa en la línea SH-SY5Y *wild type*. La viabilidad celular se midió mediante ensayo con sulforodamina B (SRB), estableciéndose como valor máximo de viabilidad el obtenido para cada línea en el medio Vehículo. **Vehículo:** medio de cultivo celular con DMSO 0,5%, **Torin1 1/2 μM :** medio de cultivo celular suplementado con Torin1 1 o 2 μM , **XL388 1/2 μM :** medio de cultivo celular suplementado con XL388 1 o 2 μM . Se aplicó un test ANOVA de una vía y el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. ns: no significativo, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Se aplicó un régimen de tratamiento de 24 h con los compuestos antes de proceder a realizar los experimentos. Se probaron diferentes concentraciones de Torin1 y XL388 (de 10 nM a 2 μ M) con el fin de lograr las condiciones adecuadas que permitieran la inhibición de los complejos TORC1 y TORC2 con Torin1 y únicamente de TORC1 con XL388. Como medio control se utilizó DMSO al 0,5%, al tratarse del vehículo en el que se disuelven previamente ambos inhibidores. Las tres líneas celulares respondieron de forma muy similar al tratamiento con los compuestos y se decidió utilizar la concentración de 1 μ M para los dos inhibidores. Como ejemplo de los resultados obtenidos, se muestra el *western blot* para la línea SH-SY5Y *wild type* (Figura 31B). A dicha concentración, Torin1 es capaz de reducir de forma evidente el nivel de fosforilación de S6 y AKT, indicativo por tanto de una reducción de la actividad de los complejos TORC1 y TORC2 (Figura 31B) sin afectar a la viabilidad celular. A una concentración mayor de Torin1 (2 μ M) la viabilidad de las tres líneas celulares se vio seriamente afectada (Figura 31C). En el caso del compuesto XL388, una concentración de 1 μ M conseguía reducir el nivel de fosforilación de S6 sin afectar a AKT (Figura 31B). Aunque la reducción en la fosforilación de S6 no era tan intensa como en el caso de Torin1, no se utilizó una concentración mayor de XL388. A partir de una concentración de 2 μ M de este compuesto, la fosforilación de AKT también comenzaba a verse afectada, indicativo de una inhibición de TORC2. Por tanto, a dichas concentraciones XL388 ya no estaría actuando como inhibidor específico de TORC1. En el caso de este compuesto, un aumento de la concentración a 2 μ M ejercía un efecto más limitado sobre la viabilidad celular, viéndose ligeramente reducida únicamente en la línea SH-SY5Y *wild type* (Figura 31C).

1.8 Efecto de la inhibición de TORC1 y TORC2 en el nivel de ATP y estrés oxidativo en el modelo celular humano de FRDA

Tras determinar las condiciones experimentales para el uso de Torin 1 y XL388, se procedió a analizar el efecto de ambos inhibidores de la actividad mTOR sobre el nivel de ATP celular. Sorprendentemente, ninguno de los compuestos produjo alteraciones en dicho nivel (Figura 32A). Se ha descrito en diferentes modelos celulares y animales que las variaciones en la actividad de la proteína mTOR pueden afectar al nivel de ATP, como hemos

Resultados

observado en este trabajo en el modelo de FRDA en *D. melanogaster* (Figura 28). Sin embargo, el tipo de cambios observados (tanto aumento como disminución de la producción de ATP) es muy diferente en función del estudio, el modelo y las condiciones experimentales utilizadas, por lo que es posible que nuestro modelo celular, en nuestras condiciones de estudio, sea especialmente resistente a variaciones en el ATP celular.

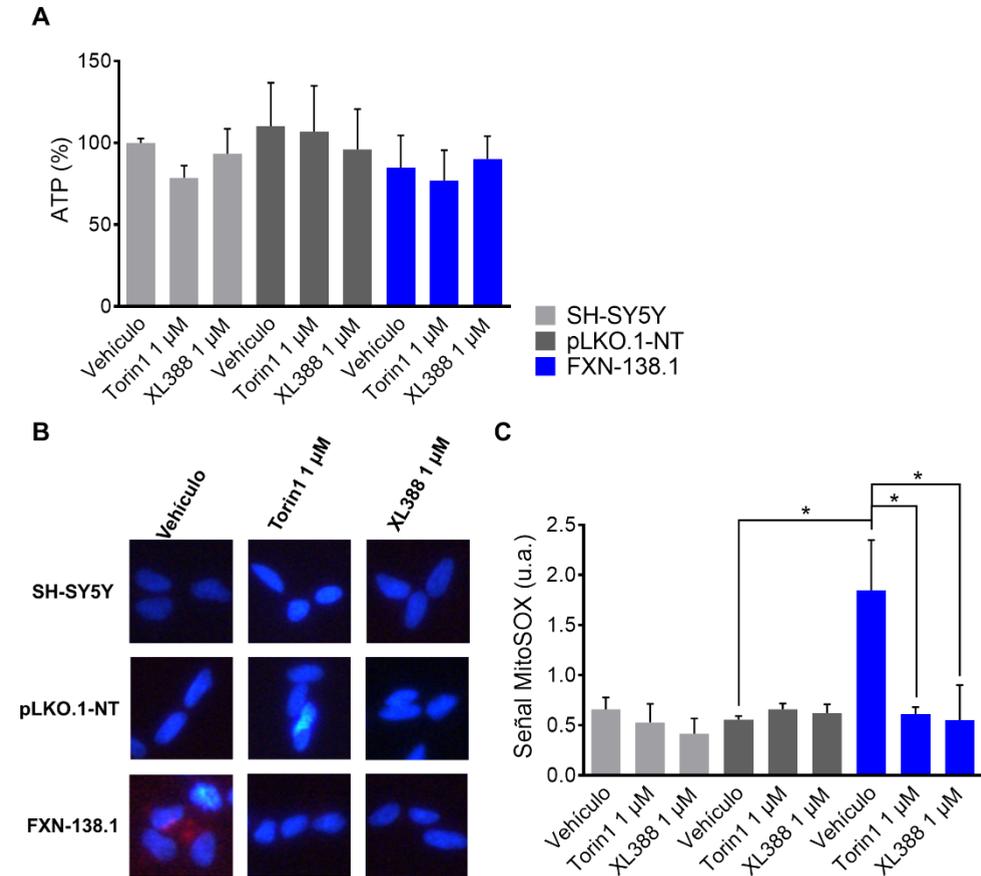


Figura 32. Efecto de Torin1 y XL388 sobre el nivel de ATP y radical superóxido. **A)** No se observaron cambios significativos en el nivel de ATP en las tres líneas celulares analizadas tras el tratamiento con Torin1 o XL388 a 1 μ M. El nivel de ATP de cada condición y línea celular se referenció a los valores observados para la línea SH-SY5Y *wild type*, a la que se dio el valor 100%. **B)** Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul) y el nivel de radical superóxido se detectó con la sonda *MitoSOX Red* (rojo). Se puede observar que únicamente se detectan niveles más elevados de esta especie reactiva en el caso de la línea FXN-138.1 en medio Vehículo. Tras el tratamiento con Torin1 1 μ M o XL388 1 μ M el nivel del radical superóxido se reduce a valores comparables a los de las líneas SH-SY5Y y

pLKO.1-NT. C) Cuantificación de los niveles de fluorescencia debida a la sonda *MitoSOX Red*. **Vehículo:** medio de cultivo celular con DMSO 0,5%, **Torin1 1/2 μ M:** medio de cultivo celular suplementado con Torin1 1 o 2 μ M, **XL388 1/2 μ M:** medio de cultivo celular suplementado con XL388 1 o 2 μ M, u.a.: unidades arbitrarias. Se aplicó un test ANOVA de una vía y el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. * $p < 0.05$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Otro de los resultados que hemos obtenido en el modelo de FRDA en *D. melanogaster* ha sido la reducción del nivel de estrés oxidativo tras el tratamiento con rapamicina (Figura 22). En el modelo en células SH-SY5Y hemos analizado el nivel del radical superóxido utilizando la sonda *MitoSOX Red*. Dicho reactivo se introduce en las células vivas y se dirige a las mitocondrias, donde se oxida rápidamente por superóxidos, generando un compuesto fluorescente. Este análisis se llevó a cabo en las tres líneas celulares, tras 24 h con cada tratamiento (Figura 32B,C). En el caso de las líneas SH-SY5Y y pLKO.1-NT no se detectó más que una señal muy tenue de la sonda *MitoSOX Red* y no se observaron diferencias entre las células en medio Vehículo y las tratadas con Torin1 1 μ M y XL388 1 μ M. En la línea FXN-138.1 sí observamos un nivel basal más elevado de producción del radical superóxido, que fue revertido tanto por Torin1 como por XL388. Ambos compuestos tienen en común la inhibición de la actividad del complejo TORC1, lo cual refuerza los resultados obtenidos en el modelo de *D. melanogaster* tras el tratamiento con rapamicina, apoyando la observación de que la inhibición de TORC1 es beneficiosa para contrarrestar el incremento del estrés oxidativo en un contexto de reducción de frataxina.

2 Caracterización de un modelo en *D. melanogaster* portador de la expansión del trinucleótido GAA

2.1 Descripción de las construcciones creadas para obtener el modelo

Con el objetivo de identificar factores genéticos que puedan estar implicados en la represión transcripcional del gen *FXN* mediada por la expansión patológica del triplete GAA, se empezó en nuestro laboratorio el desarrollo de un nuevo modelo de FRDA en *D. melanogaster*. Este modelo se basa en la expresión de un gen reportero (luciferasa de luciérnaga), bajo el efecto de un número de repeticiones GAA dentro del rango patológico, y cuyo control depende del sistema GAL4/UAS²³². Las construcciones necesarias para el desarrollo de este nuevo modelo fueron obtenidas por el doctor José Vicente Llorens (Figura 33) y se describen brevemente a continuación. Dos de estas construcciones (construcciones Luc) contienen la secuencia codificante del gen de la luciferasa de luciérnaga (*Luc*; *Photynus pyralis*) precedida de las secuencias activadoras de la transcripción UAS y de un fragmento del gen *FXN*, que incluye el exón 1, el intrón 1 con un número determinado de repeticiones del triplete GAA (6 o aproximadamente 220 tripletes GAA) y el exón 2 (Figura 33A, B). La tercera construcción (construcción RLuc) presenta la secuencia codificante del gen de la luciferasa de renilla (*Rluc*; *Renilla reniformis*) precedida de las secuencias activadoras de la transcripción UAS (Figura 33C). Las tres construcciones tienen, además, secuencias *attB* que permiten la inserción de la construcción, por recombinación, en sitios específicos del genoma de cepas de *D. melanogaster* que portan secuencias *attP*. Concretamente estas construcciones se microinyectaron en embriones de *D. melanogaster* de las cepas b9752 y b24485. Como resultado se obtuvieron diferentes líneas: una línea con la construcción de la luciferasa de renilla insertada en la región 68E del cromosoma 3 (línea Luc-Renilla); otra con la construcción luciferasa de luciérnaga con un número normal de repeticiones GAA (6 repeticiones), denominada línea 6GAA, y cinco líneas, generadas independientemente, con la construcción luciferasa de luciérnaga con un número patológico de repeticiones GAA (aproximadamente 220 repeticiones), denominadas líneas 220GAA(1) a línea 220GAA(5). Cada una de las construcciones con el reportero luciferasa de luciérnaga se insertó en la región 22A3 del cromosoma 2. En las líneas 220GAA(2) y 220GAA(3), la construcción era letal en homocigosis, por lo que se mantuvieron en heterocigosis utilizando el cromosoma equilibrador CyO para el cromosoma 2 de *D. melanogaster*.

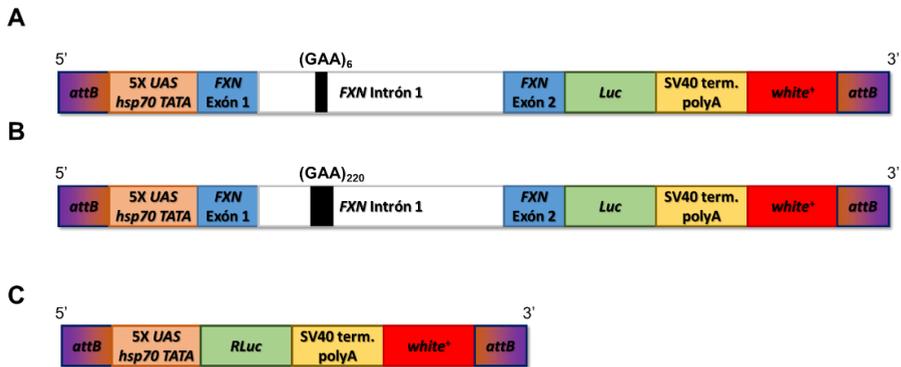


Figura 33. Composición de las construcciones creadas para la obtención del modelo. A) y B) Estructura de las construcciones con el gen de la luciferasa de luciérnaga (*Luc*) precedida de 6 tripletes GAA (A) o 220 tripletes (B) contenidas en un vector pACMAN. Estas construcciones se microinyectaron en embriones de la cepa comercial del b9752. La recombinación de las secuencias *attB* del vector con la *attP* del genoma de la cepa b9752 permitió la inserción de cada construcción en una región conocida (región 22A3 del cromosoma 2). **C)** Estructura de la construcción con el gen de la luciferasa de renilla (*RLuc*) que se insertó en la región 68E del cromosoma 3 en la cepa b24485.

En el presente trabajo, se ha partido de estas líneas para ultimar la obtención del modelo, examinar si presenta características semejantes a las descritas para el gen *FXN* de pacientes FRDA respecto a su represión, y comprobar su utilidad en la identificación de genes modificadores de dicha represión transcripcional. Se esperaba que la expansión con los 220 tripletes GAA provocase una disminución de la expresión del gen *Luc* con respecto a la construcción con 6 repeticiones. La expresión de la luciferasa de renilla serviría de control interno para normalizar los valores de la luciferasa de luciérnaga (sistema reportero dual). De esta forma, las variaciones en la expresión de la luciferasa de luciérnaga permitirán identificar aquellos genes, que al reducir o aumentar su expresión en el modelo de *D. melanogaster*, modifiquen la represión transcripcional provocada por la expansión GAA.

2.2 Medida de la actividad luciferasa en las líneas originales

En primer lugar, examinamos si las construcciones con el reportero de luciferasa de luciérnaga se expresaban a un nivel basal, sin la necesidad de la participación de la proteína GAL4. Se midió la actividad luciferasa de luciérnaga de las diferentes líneas 220GAA en hembras de 1 día de edad. Observamos que, para la línea 220GAA(1), no había diferencias con respecto a la línea 6GAA. En el caso de las líneas equilibradas 220GAA(2)/CyO y

Resultados

220GAA(3)/CyO, el nivel de actividad luciferasa fue prácticamente la mitad que el observado en la línea 6GAA, y puesto que son portadoras de la construcción en heterocigosis, concluimos que en dichas líneas las repeticiones GAA no ejercían efecto alguno. En cambio, en las líneas 220GAA(4) y 220GAA(5) sí que se observó una reducción significativa de la actividad luciferasa de luciérnaga, siendo en la última en la que se dio la reducción más importante (Figura 34A). En estos ensayos de actividad luciferasa, la normalización de los valores se realizó empleando la concentración de proteína de los extractos, puesto que en las líneas analizadas todavía no está presente la construcción luciferasa de renilla.

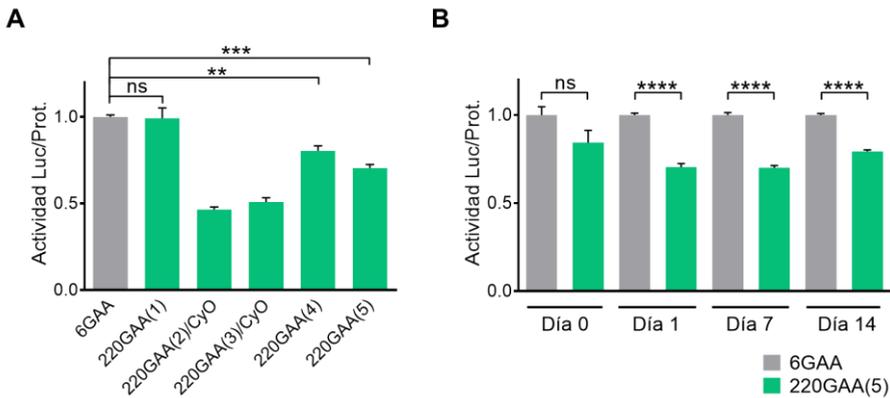


Figura 34. Actividad luciferasa de luciérnaga en las cepas generadas por microinyección. **A)** La construcción con la luciferasa de luciérnaga se expresa en hembras de 1 día a un nivel basal a pesar de la ausencia de la proteína GAL4 en las líneas originales. De las cinco líneas portadoras de la expansión patológica GAA, las líneas 220GAA(4) y 220GAA(5) muestran una reducción significativa de la actividad luciferasa de luciérnaga respecto de la línea 6GAA. **B)** La actividad luciferasa de luciérnaga de hembras de la cepa 220GAA(5) se mantiene reducida de forma significativa durante el periodo analizado de 2 semanas a partir del día 1. Los valores de actividad luciferasa se normalizaron por la concentración de proteína de los extractos. Luc: luciferasa de luciérnaga, Prot.: concentración de proteína del extracto. En el análisis mostrado en el punto (A) se empleó un test ANOVA de una vía aplicando el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. En el punto (B) se empleó el test *t* de student. ns: no significativo, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.001$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

La línea 220GAA(5) fue elegida para el resto de los experimentos y analizamos si las diferencias en la actividad luciferasa respecto a la línea 6GAA se mantenían en el tiempo. Al medir dicha actividad en hembras de 0, 1, 7 y 14 días después de la eclosión de la pupa, observamos que las diferencias comenzaban a ser significativas a partir de las 24 h, manteniéndose durante todo el tiempo analizado (Figura 34B).

2.3 Obtención del modelo completo de repeticiones GAA

El modelo completo para el estudio del silenciamiento de *FXN* causado por repeticiones GAA, combina las construcciones con ambas luciferasas (de luciérnaga y renilla) junto con una construcción portadora de la secuencia codificante de la proteína activadora de la transcripción GAL4. Esto permite una expresión mucho mayor de las luciferasas (puesto que están bajo el control de las secuencias UAS) en comparación con su expresión basal, de forma que los cambios en dicha expresión sean más fáciles de identificar y medir con mayor precisión. Además, la expresión de la proteína GAL4 es necesaria para la expresión de algunos de los genes modificadores (modificadores de sobreexpresión y represión por RNAi bajo el control de secuencias UAS).

En concreto utilizamos el driver *α -Tub-GAL4*, en el que la proteína GAL4 se expresa de forma ubicua bajo el control del promotor del gen de la tubulina de *Drosophila*, *α -Tub*, y con ello se posibilita la expresión de ambas luciferasas en todo el organismo. Mediante una extensa serie de cruces (Figura 46, Material suplementario) entre una cepa con la construcción *α -Tub-GAL4* en el cromosoma 1, la línea 6GAA (con la construcción Luc en el cromosoma 2) y la línea Luc-Renilla (con la construcción RLuc en el cromosoma 3) se generó la que desde ahora se denominará cepa GAA-CONTROL (Figura 35). De forma similar (Figura 46, Material suplementario), mediante cruces entre la cepa con la construcción *α -Tub-GAL4*, la línea 220GAA(5) y la línea Luc-Renilla, se obtuvo la que desde ahora se denominará cepa GAA-EXP (EXP abreviatura de expansión), cuya composición es idéntica a la de la cepa GAA-CONTROL, con la salvedad de que el cromosoma 2 contiene la construcción Luc con 220 repeticiones GAA en lugar de la que presenta 6 repeticiones GAA. La construcción *α -Tub-GAL4*, debido a su letalidad en homocigosis en presencia del resto de construcciones, se mantuvo en heterocigosis con el cromosoma equilibrador *FM7* en las hembras de ambas cepas finales.

Resultados

GAA-CONTROL

$$\frac{\alpha - Tub - GAL4}{FM7} ; \frac{UAS - GAA_6 - Luc}{UAS - GAA_6 - Luc} ; \frac{UAS - RLuc}{UAS - RLuc}$$

GAA-EXP

$$\frac{\alpha - Tub - GAL4}{FM7} ; \frac{UAS - GAA_{220} - Luc}{UAS - GAA_{220} - Luc} ; \frac{UAS - RLuc}{UAS - RLuc}$$

Figura 35. Composición de las cepas finales GAA-CONTROL y GAA-EXP. Ambas cepas contienen la construcción α -Tub-GAL4 en el cromosoma 1 (o cromosoma X), la construcción con la luciferasa de luciérnaga en el cromosoma 2 y la construcción con la luciferasa de renilla en el cromosoma 3. La diferencia entre ambas cepas se encuentra en el número de repeticiones que precede al gen de la luciferasa de luciérnaga, 6 en la cepa GAA-CONTROL y aproximadamente 220 en la cepa GAA-EXP. *D. melanogaster* presenta 4 parejas de cromosomas: cromosomas 1 (o X), 2, 3 y 4. Éste último es un cromosoma de tamaño muy reducido conocido comúnmente como *dot*.

El siguiente paso fue comprobar la localización e integridad de las construcciones en las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP para descartar posibles alteraciones que hubiesen tenido lugar durante la extensa serie de cruces llevada a cabo. La comprobación de la localización de las construcciones Luc y RLuc se analizó mediante PCR amplificando una banda de un tamaño esperado de 0,4 kb en el caso de la construcción Luc y de 0,6 kb en el caso de la construcción RLuc. Estas bandas contienen parte de la secuencia del sitio *attL* (generado a partir de la recombinación de los sitios *attB* de las construcciones y *attP* del genoma de las líneas b9752 y b24485) y del locus genómico donde se insertó cada construcción (22A3-R en el caso de la construcción Luc y 68E1-R para la construcción RLuc). En hembras de 1 día de ambas cepas, GAA-CONTROL y GAA-EXP, se observaron las bandas de 0,4 kb y 0,6 kb (Figura 36), confirmando la presencia de las construcciones en las regiones genómicas esperadas.

Para examinar la integridad de la construcción Luc, se amplificaron varias secuencias internas de dicha construcción correspondientes a: (i) la secuencia *UAS-hsp70*, esperando una banda de 342 pb; (ii) regiones aguas arriba y abajo de las repeticiones GAA en el intrón 1, bandas de 386 y 324 pb respectivamente y (iii) la secuencia del gen *Luc*, banda de 363 pb. En ambas cepas no se observaron alteraciones en ninguno de los tamaños de las bandas esperadas. En la Figura 36 se muestra la localización de los primers empleados, las regiones amplificadas y el resultado de las PCRs realizadas.

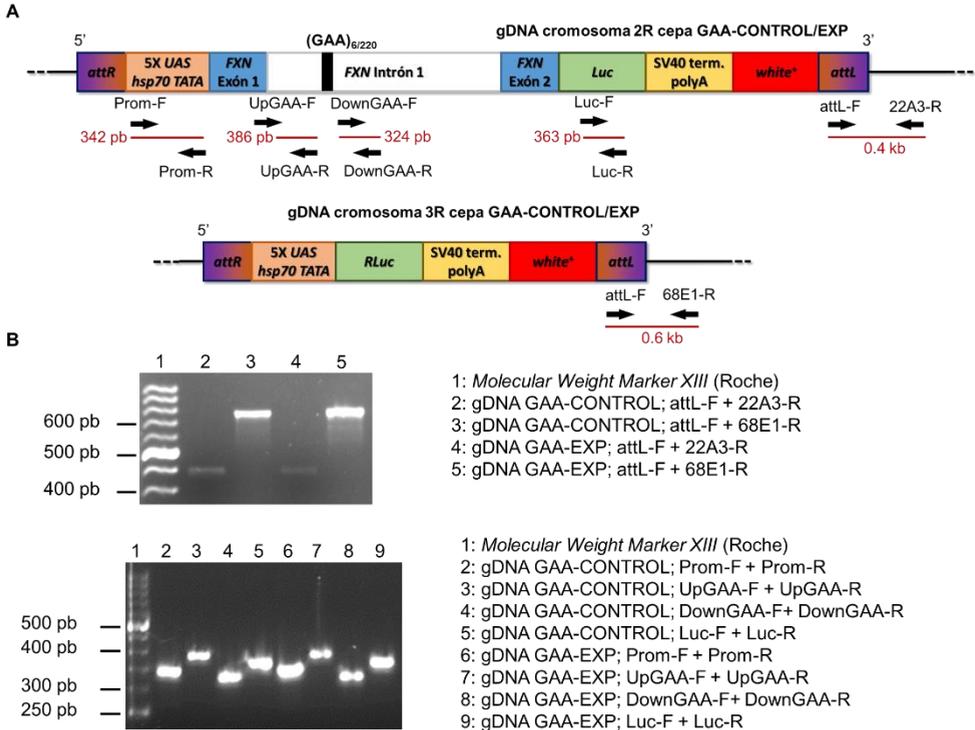


Figura 36. Análisis de la localización e integridad de las construcciones en las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP (hembras de 1 día). **A)** Se indica la posición de las diferentes parejas de primers diseñados para amplificar secuencias internas de la construcción Luc (Prom-F/R, UpGAA-F/R, DownGAA-F/R, Luc-F/R) o secuencias solo existentes en caso de que las construcciones Luc y RLuc estuviesen presentes en la localización esperada (attL-F + 22A3-R y attL-F + 68E1-R). La recombinación entre las secuencias *attB*, presentes en las construcciones, y las secuencias *attP*, situadas en el genoma de cepas b9752 y b24485, da lugar a las secuencias *attR* y *attL* que flanquean a la construcción en el sitio de inserción en el cromosoma. **B)** Los resultados de las PCRs confirmaron la localización correcta e integridad de las construcciones para las secuencias analizadas.

La expansión de repeticiones GAA es un tipo de secuencia que puede presentar cierta inestabilidad, siendo posible que ocurran expansiones y contracciones en el número de repeticiones. La pérdida de tripletes GAA en la cepa GAA-EXP invalidaría el modelo obtenido. Con el fin de determinar si la secuencia de repeticiones GAA en la cepa GAA-EXP se mantenía estable en el tiempo, amplificamos esta secuencia tras la obtención de las cepas finales GAA-CONTROL y GAA-EXP, así como tras 2, 6 y 12 generaciones en hembras de 1 día de edad. La cepa GAA-CONTROL mostró una banda correspondiente al producto esperado para una secuencia con las 6 repeticiones GAA (804 pb). Tanto la cepa GAA-EXP,

Resultados

como la línea original 220GAA(5) a partir de la que se originó, y el resto de líneas con la expansión, 220GAA(1)-220GAA(4) presentaron una banda, de aproximadamente 1,4 kb, correspondiente a un producto con un número aproximado de 220 repeticiones GAA (Figura 37A,B). Tras el transcurso de 12 generaciones, no hubo cambios apreciables en el tamaño de la expansión GAA en la cepa GAA-EXP, indicando que este número de repeticiones GAA se mantiene estable en el modelo (Figura 37A,C).

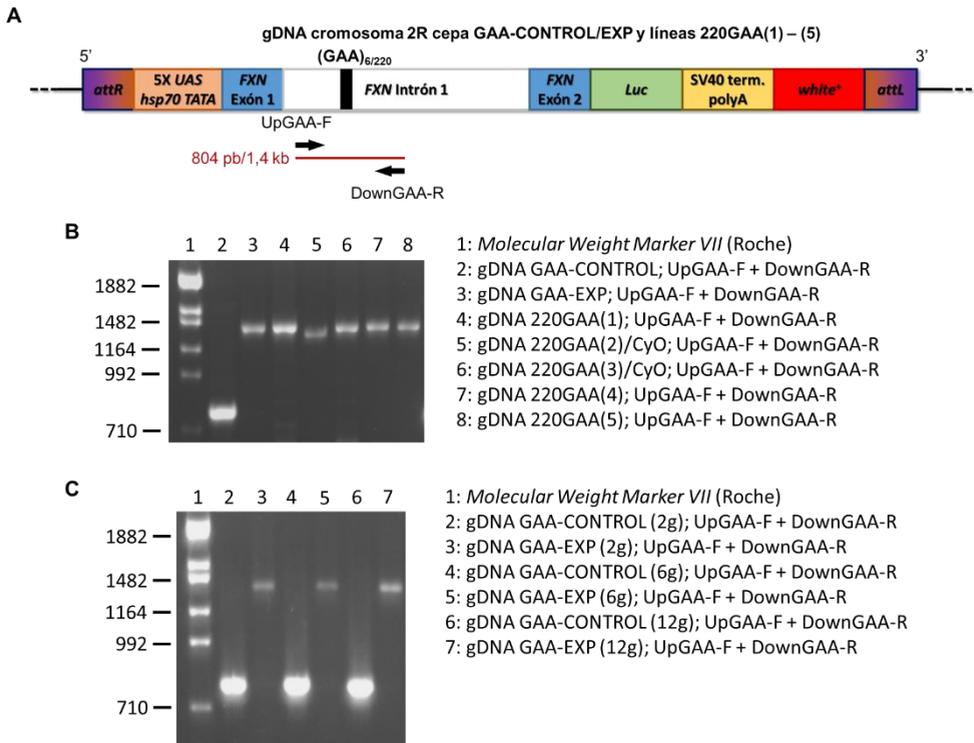


Figura 37. Determinación del tamaño de la secuencia de repeticiones GAA en las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP (hembras de 1 día). **A)** Los primers utilizados para amplificar esta secuencia son complementarios a las regiones adyacentes a las repeticiones GAA. **B)** El producto obtenido en la cepa GAA-CONTROL fue el esperado para una secuencia con 6 repeticiones GAA. Para la cepa GAA-EXP y las líneas 220GAA(1) - (5) se observó una banda correspondiente a una secuencia con aproximadamente 220 repeticiones. **C)** Tras 2, 6 y 12 generaciones (g) no se apreciaron cambios en el tamaño de la expansión de repeticiones GAA en la cepa GAA-EXP.

2.4 Expresión de las luciferasas en el modelo

En el nuevo modelo, el gen de la luciferasa de luciérnaga permitirá cuantificar el efecto de la expansión de 220 repeticiones GAA en el nivel de transcripción de dicho gen y, por consiguiente, en la actividad de la proteína luciferasa. La luciferasa de renilla actuará como control interno para la normalización de los valores de la actividad de la luciferasa de luciérnaga. Determinamos el nivel de expresión de los dos genes luciferasa mediante RT-qPCR en hembras de 1 día, confirmando la reducción del nivel de mRNA del gen *Luc* en la cepa GAA-EXP con respecto de la cepa GAA-CONTROL (Figura 38A). Igualmente, se observó que la expresión del gen de la luciferasa de renilla no mostraba diferencias entre ambas cepas (Figura 38B). Estos resultados nos han permitido medir la actividad de la luciferasa de luciérnaga en el modelo como la ratio entre esta actividad y la de la luciferasa de renilla. De esta forma, observamos en la cepa GAA-EXP la esperada reducción en la ratio entre ambas actividades luciferasa (Figura 38C).

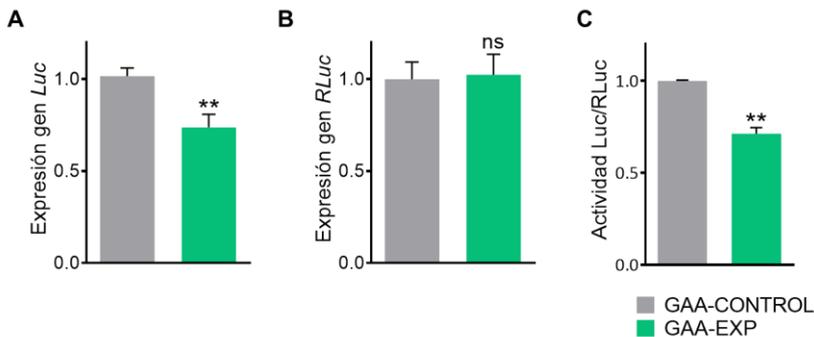


Figura 38. Expresión de las luciferasas de luciérnaga y renilla en las cepas del modelo (hembras de 1 día). **A)** La expresión del gen *Luc* es significativamente más baja en la cepa GAA-EXP que en la cepa GAA-CONTROL. **B)** En cambio, la expresión del gen *RLuc* es similar en ambas cepas. Como control interno para la cuantificación de la expresión de los genes de las luciferasas se utilizó el nivel de expresión relativa del gen de expresión constitutiva *Rp49*. **C)** La ratio entre la actividad luciferasa de luciérnaga y la actividad luciferasa de renilla es menor en la cepa GAA-EXP respecto de la cepa GAA-CONTROL, mostrando el efecto negativo que ejerce la expansión de repeticiones GAA en la expresión del gen reportero. *Luc*: gen de la luciferasa de luciérnaga, *Luc*: luciferasa de luciérnaga, *RLuc*: gen de la luciferasa de renilla, *RLuc*: luciferasa de renilla. Para la comparación de las muestras se empleó un test *t* de student. ns: no significativo, ** $p < 0.01$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Resultados

2.5 Estudio de la compactación de la construcción portadora de las repeticiones GAA

La causa principal para explicar el silenciamiento del gen *FXN* en humanos se atribuye a mecanismos epigenéticos provocados por la expansión patológica de repeticiones GAA, los cuales provocan un cambio en el estado de la cromatina, que pasa a estar más compactada impidiendo la correcta transcripción del gen. Para comprobar si la reducción en la expresión del gen reportero *Luc* en la cepa GAA-EXP también se asociaba a una mayor compactación de la cromatina, se realizó un ensayo de accesibilidad de DNasa I. El fundamento de este ensayo reside en que las regiones de cromatina relajada son más accesibles a la acción de la DNasa I y, por tanto, son más sensibles a la digestión de la enzima. En cambio, las regiones de cromatina compactada son más resistentes a la digestión. Posteriormente, la cantidad de DNA que permanece sin digerir en las regiones que son analizadas se cuantifica mediante qPCR. Se espera que el número de copias amplificadas sea mayor en las regiones heterocromáticas que en las regiones con cromatina relajada.

Previamente a la realización de este ensayo, se determinaron las condiciones óptimas que permitieran discernir entre el estado de compactación de un gen eucromático como el gen *Rp49* (cromatina relajada), y el de una región de heterocromatina constitutiva y resistente a la digestión por DNasa I (una secuencia de la región H23 del genoma de *D. melanogaster*). Para ello, el gDNA de individuos de la cepa *yw* se trató con 5 unidades de la enzima durante 5 y 20 min (condiciones 5U 5 min y 5U 20 min) o se dejó sin digerir (condición 0U). Posteriormente, se extrajo el DNA y se cuantificó, por qPCR, la cantidad relativa de copias de DNA de una región del gen *Rp49* y de la secuencia H23. Los resultados nos mostraron que, en comparación con la amplificación en la condición 0U, la condición 5U 5 min da lugar a una digestión importante de *Rp49* (Figura 39A), sin tener un gran efecto sobre la región H23 (Figura 39B). Sin embargo, en el tratamiento prolongado de 5U 20 min, ya observamos de forma evidente la digestión de ambas regiones del genoma (Figura 39A y B). Por tanto, la condición 5U 5 min resulta la más adecuada para poder identificar las diferencias en el estado de compactación de la construcción luciferasa de luciérnaga entre las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP.

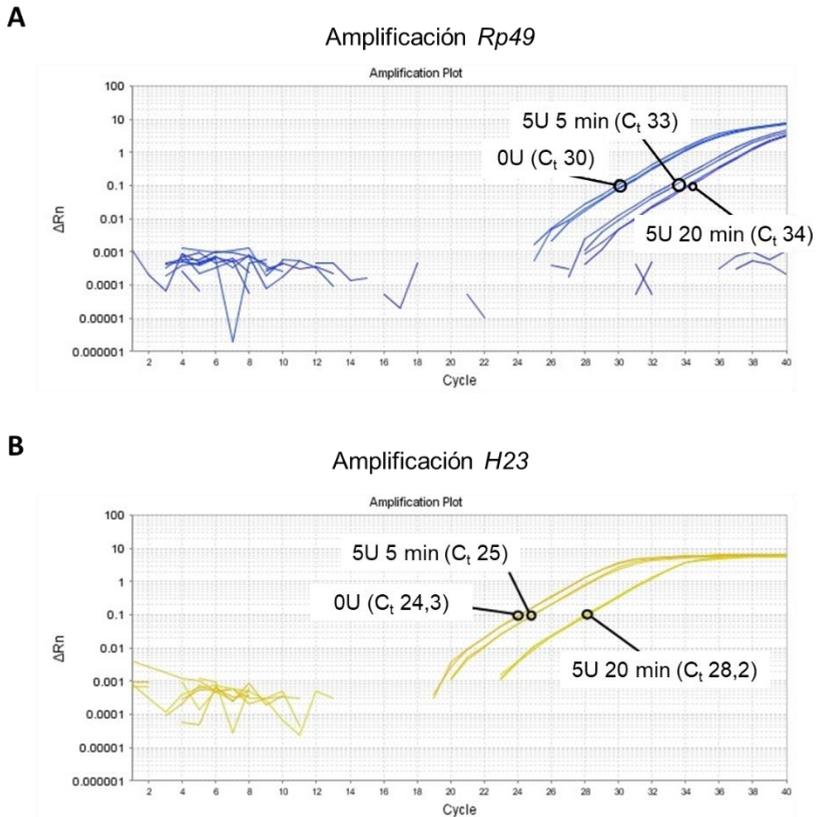


Figura 39. Amplificación de *Rp49* y de la región *H23* tras el tratamiento con DNasa I en la cepa *yw* en diferentes condiciones experimentales. El tratamiento con 5 unidades de la enzima DNasa I durante 5 min (5U 5 min) digirió de forma notable la cantidad de copias del gen de expresión constitutiva *Rp49* (A), afectando en mucho menor medida a la región heterocromática *H23* (B). 5U 20 min: digestión con 5 unidades de DNasa I durante 20 min, 0U: gDNA no digerido.

Seguidamente se digirió el gDNA de hembras de 1 día de las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP con DNasa I y se analizaron, mediante qPCR, 4 regiones diferentes de las construcciones Luc: la secuencia *UAS-hsp70*, una región aguas arriba y otra aguas abajo de las repeticiones GAA, y la secuencia del gen *Luc*. Requeríamos también de un control interno que no se viera afectado por la digestión y que nos permitiera normalizar los resultados de las cuantificaciones. Se utilizó la propia secuencia *H23* para establecer la cantidad relativa de copias de DNA, puesto que dicha secuencia mostró resistencia a la DNasa I en la condición de 5U 5 min. En la Figura 40A se presenta un esquema del ensayo, de las regiones analizadas y de los primers empleados. En ausencia de digestión (condición 0U) no se encontraron

Resultados

diferencias, entre las dos cepas, en la cuantificación de copias de DNA en ninguna de las regiones analizadas (Figura 40B). El tratamiento 5U 5 min sí que dio lugar a un mayor número de copias sin digerir en las cuatro regiones analizadas en la cepa GAA-EXP con respecto de la cepa GAA-CONTROL (Figura 40C). Este resultado indica que existe un mayor nivel de compactación de la cromatina en la construcción portadora de la expansión patológica de repeticiones GAA, que en la que tiene un número normal de tales repeticiones. Por tanto, la menor expresión del gen *Luc* en la cepa GAA-EXP podría deberse a la heterocromatinización de la región, de forma similar a lo que sucede en el gen *FXN* en los pacientes de FRDA. Finalmente, comprobamos que tras el tratamiento 5U 20 min no se observaron diferencias significativas entre las dos cepas, puesto que, como se ha visto previamente, tras 20 min de tratamiento la heterocromatina también se ve afectada por la digestión del enzima (Figura 40D).

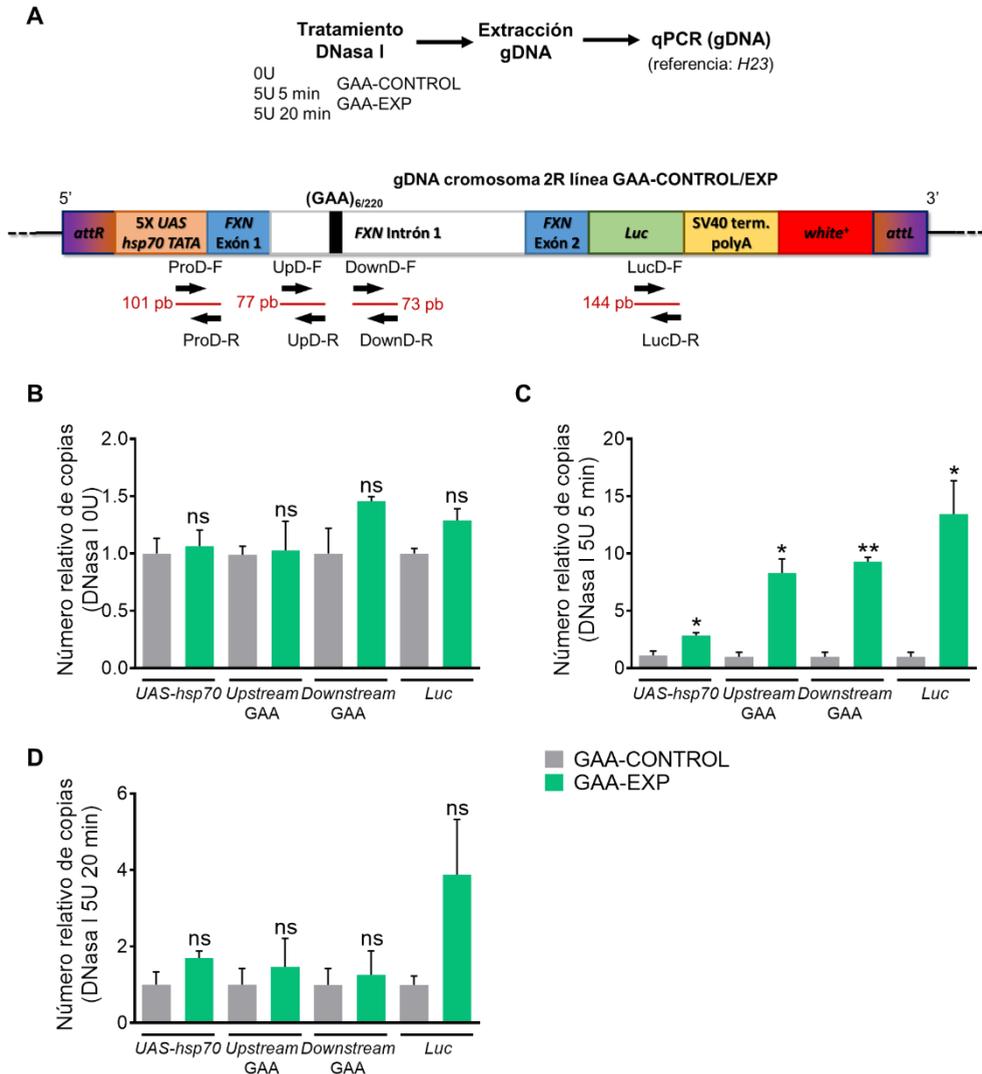


Figura 40. Ensayo de accesibilidad de DNasa I en las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP (hembras de 1 día). **A)** Esquema del ensayo. El gDNA de las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP se digirió con la enzima DNasa I, bajo diferentes condiciones experimentales, se extrajo y se cuantificó mediante qPCR para comprobar el nivel de compactación de la cromatina de 4 regiones diferentes de la construcción Luc **B)** Las cepas GAA CONTROL y GAA EXP contienen en su genoma el mismo número de copias de la construcción con la luciferasa de luciérnaga, por lo que en ausencia de digestión por DNasa I (0U), muestran el mismo número de copias de cada una de las regiones analizadas al normalizar su abundancia mediante la región heterocromática H23. **(C)** Tras el tratamiento con 5 unidades de DNasa I durante 5 min (5U 5 min) se observa, en las cuatro regiones analizadas, un mayor número relativo de copias en la cepa GAA EXP con respecto de la cepa GAA CONTROL, lo que indica que en la primera cepa la cromatina de estas regiones está en un estado más compactado y, por tanto,

Resultados

más resistente a la acción de la enzima. **(D)** Tras un tratamiento de 20 min con 5 unidades de DNasa I (5U 20 min⁻¹) las regiones heterocromáticas, más compactadas, ya han comenzado a verse afectadas por la digestión, incluyendo la región H23. Puesto que la relativización del número de copias de las regiones analizadas depende de la abundancia de esta última región, en este régimen de tratamiento las diferencias entre las cepas GAA CONTROL y GAA EXP comienzan a reducirse hasta no ser significativas. *Upstream* GAA: región aguas arriba de las repeticiones GAA, *Downstream* GAA: región aguas abajo de las repeticiones GAA, *Luc*: gen de la luciferasa de luciérnaga. Para la comparación del número de copias de cada región entre ambas cepas se empleó un test *t* de student. ns: no significativo, **p*<0.05, ***p*<0.01. Las barras de error representan el error estándar de la media.

La naturaleza expansiva de la heterocromatina puede dar lugar al silenciamiento transcripcional de los genes contiguos. Se ha discutido sobre si las expansiones patológicas de las repeticiones GAA pueden afectar a genes cercanos al gen *FXN*^{431,432}. En este sentido, nos planteamos si podría ocurrir algo similar en el modelo de *D. melanogaster*. Para ello se cuantificó y comparó la expresión de los genes situados en un rango de 250 kb aguas arriba y abajo de las repeticiones GAA. Estos genes fueron *NLaz* (*Neural Lazarillo*) y *halo*, situados aguas arriba, y los genes *RFeSP* (*Rieske iron-sulfur protein*), *Eno* (*Enolase*) y *wry* (*weary*), aguas abajo del tramo GAA (Figura 41A). Para todos ellos, a excepción de *RFeSP*, el nivel de mRNA era similar en ambas cepas. El gen *RFeSP*, el más cercano a la inserción de la construcción, presentó una reducción significativa en su nivel de expresión en la cepa GAA-EXP con respecto de la GAA-CONTROL (Figura 41B). Comprobamos, mediante ensayo de accesibilidad de DNasa I, que esta reducción en la expresión de *RFeSP* también se debía a un incremento en la compactación de la cromatina (Figura 41C), lo cual apoya la hipótesis de que la expansión patológica de repeticiones GAA podría afectar a la expresión de genes próximos a *FXN* en los pacientes de FRDA.

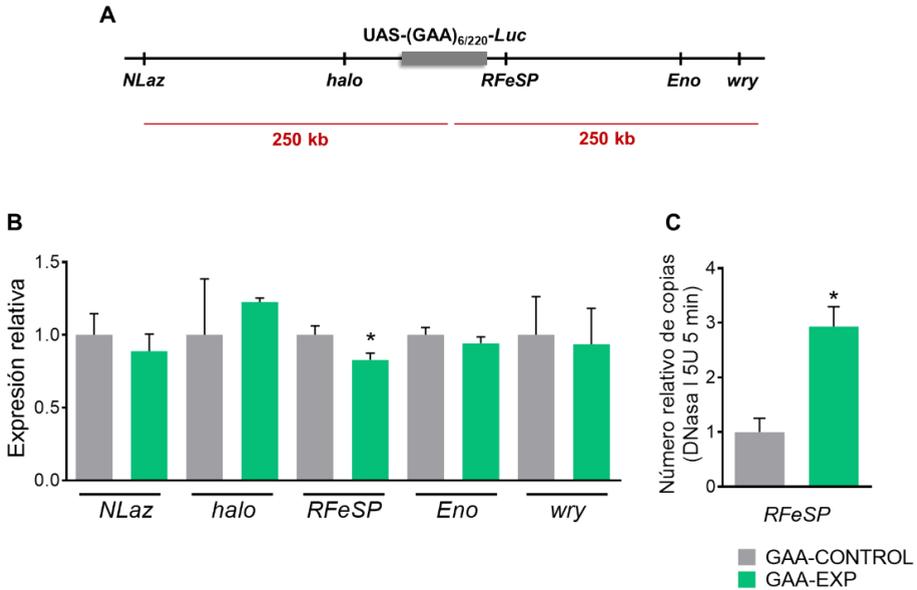


Figura 41. Análisis de la expresión de genes contiguos a la secuencia de repeticiones GAA (hembras de 1 día). **A)** Se estudió la expresión de 5 genes próximos al tramo de repeticiones GAA, incluyendo a *NLaz*, *halo*, *RFeSP*, *Eno* y *wry*. **B)** El gen *RFeSP* mostró una reducción del 17% en el nivel de mRNA en la cepa GAA-EXP respecto de la cepa GAA-CONTROL. **C)** Mediante ensayo de accesibilidad de DNasa I se verificó un estado de la cromatina más compactado en el gen *RFeSP* en la cepa GAA-EXP. *Eno*: Enolase, *NLaz*: Neural Lazarillo, *RFeSP*: Rieske iron-sulfur protein, *wry*: weary. Para las comparaciones entre ambas cepas se utilizó un test *t* de student. * $p < 0.05$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

2.6 Análisis de la metilación del DNA en regiones próximas a las repeticiones GAA

Entre las diferentes marcas epigenéticas que regulan el estado de compactación de la cromatina, se encuentra la metilación del carbono C5 de la citosina para dar lugar a 5-metilcitosina (5mC)⁴³³. Se ha observado un incremento en la metilación de los sitios CpG próximos a las repeticiones GAA, en diferentes tipos celulares de pacientes y de modelos de FRDA. En algunos invertebrados como *D. melanogaster*, la metilación del DNA es muy reducida y puede tener funciones diferentes a las observadas en vertebrados (más información en el apartado de Discusión). No obstante, analizamos si la expansión de repeticiones GAA generaba algún cambio en la metilación de sitios CpG próximos en la construcción Luc en hembras de 1 día. Para ello se llevó a cabo una secuenciación por bisulfito de 7 sitios CpG

Resultados

aguas arriba y 7 sitios CpG aguas abajo de las repeticiones GAA. La Figura 42A muestra un esquema del análisis y los primers utilizados para amplificar las regiones de interés. Los resultados mostraron la ausencia de metilación en las citosinas de todos los sitios CpG analizados, tanto en la cepa GAA-CONTROL como en la cepa GAA-EXP (Figura 42B,C). Dado que la escasa metilación en *D. melanogaster* no está restringida a los dinucleótidos CpG, sino que parece afectar también a dominios ricos en CC y CA, revisamos la posible metilación del resto de citosinas de las regiones estudiadas. De nuevo, no se observó metilación en ninguna de las dos cepas. Estas observaciones indican que el proceso que desencadena la compactación de la cromatina, y la reducción de la expresión del gen *Luc* en la cepa GAA-EXP, no depende del estado de metilación del DNA sino de otros mecanismos epigenéticos diferentes.

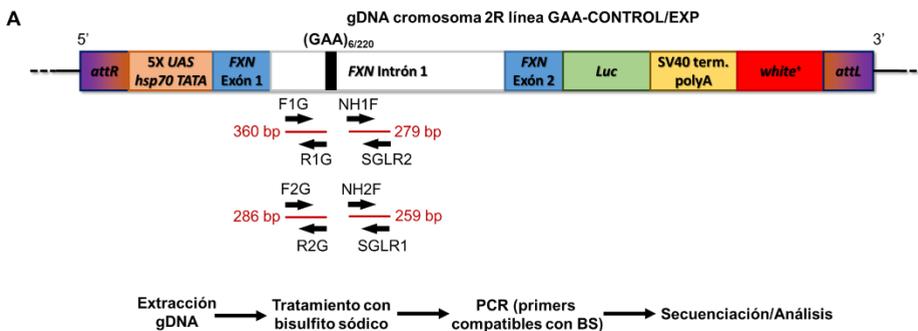
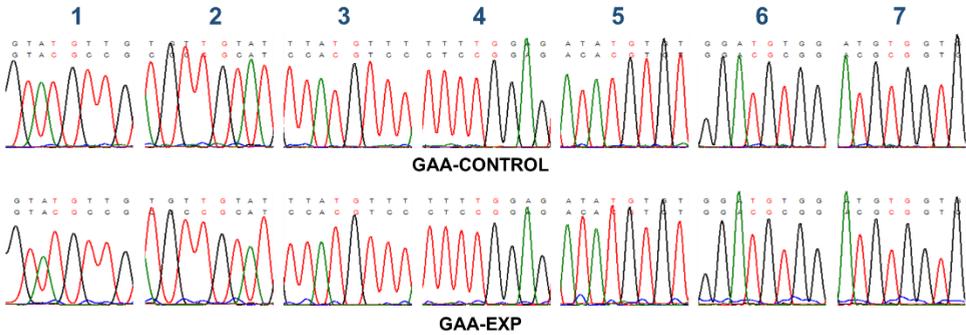


Figura 42. Secuenciación por bisulfito de sitios CpGs adyacentes a la repetición del triplete GAA (hembras de 1 día) (Continuación figura y pie en pag. 131). **A)** Los primers empleados amplifican mediante PCR anidada una región aguas arriba y abajo de las repeticiones GAA. Para llevar a cabo la secuenciación por bisulfito, el gDNA de los individuos de las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP es tratado con bisulfito sódico y posteriormente se amplifican las regiones de interés, que son secuenciadas. En la secuencia permanece como citosinas aquellos nucleótidos que en el gDNA estaban originalmente metilados (la metilación otorga protección frente al bisulfito), y cambian a timinas aquellas citosinas no metiladas originalmente.

B

CTGGTACG(1)CG(2)CATGTATTAGGGGAGATGAAAGAGGCAGGCCACG(3)TCCAAGCCATATTTGTGTTGCTCTCG(4)GAGTT
 TGTACTTTAGGCTTGAACCTCCACACG(5)TGTTATTTGGCCACATTGTGTTGAAGAAACTTTGGGATTGTTGCCAGTGCTTA
 AAAGTTAGGACTTAGAAAATGGATTCTCTGGCAGGACG(6)CG(7)GTGGCTCAT



C

GCTGCG(1)GCAGGAGAATCG(2)CTTGAGCCCG(3)GGAGGCAGAGGTTGCATTAGCCAAGATCG(4)CCCAATGCACTCCG(5)GC
 CTGGCG(6)ACAGAGCAAGACTCCG(7)TCTC

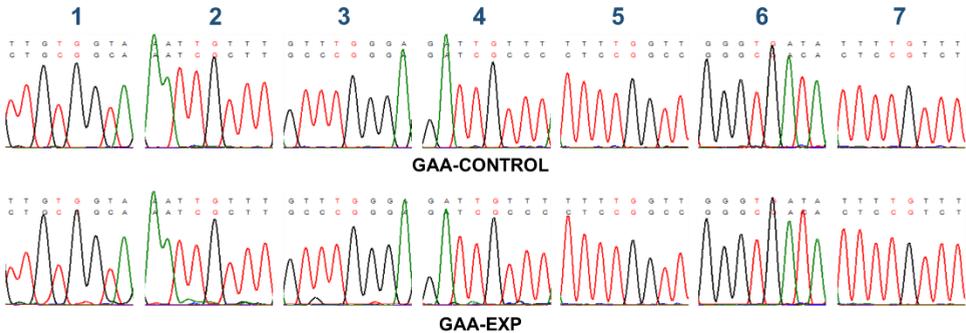


Figura 42. Secuenciación por bisulfito de sitios CpGs adyacentes a la repetición del triplete GAA (hembras de 1 día) (Continuación). La secuenciación por bisulfito de la región aguas arriba (B) y aguas abajo (C) de las repeticiones GAA mostró total ausencia de metilación en los sitios CpG estudiados, tanto en la cepa GAA-CONTROL como en la GAA-EXP. En la parte superior se presenta la secuencia original del gDNA de las regiones analizadas con los sitios CpG numerados en azul. Sobre cada porción del electroferograma se muestra en la parte superior la secuencia registrada y en la inferior la secuencia original.

2.7 Rastreo piloto de modificadores genéticos de la represión transcripcional mediada por las repeticiones GAA

Al principio de esta segunda parte del apartado de Resultados, se ha indicado que uno de los objetivos principales en la obtención del presente modelo, es su utilización como

Resultados

herramienta para la identificación de genes implicados en el mecanismo de represión transcripcional causado por la expansión de repeticiones GAA. Una metodología muy potente, en *D. melanogaster*, que nos permite abordar este objetivo es la realización de un rastreo genético. Se han generado en *Drosophila* un gran número de líneas portadoras de mutaciones para la práctica totalidad de sus genes, desde líneas que permiten la sobreexpresión de un gen, a líneas en las que se reduce de forma específica dicha expresión mediante la metodología RNAi. En algunas de estas líneas, la sobreexpresión e interferencia de los genes está bajo el control de las secuencias reguladoras UAS, pudiendo emplearse en nuestro modelo debido a la presencia de la construcción α -Tub-GAL4. En este contexto, el principio básico del rastreo consiste en obtener individuos en los que se expresen simultáneamente la construcción Luc y una de estas mutaciones, y analizar si dicha mutación modifica la expresión del gen reportero, afectada por la expansión de repeticiones GAA. Para ello se llevan a cabo cruces entre las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP con cada una de las líneas portadoras de un gen mutado, y con una cepa estándar de laboratorio sin modificadores génicos, como la cepa *yw*. Posteriormente se analiza qué mutaciones son capaces de modificar la ratio actividad luciferasa de luciérnaga/actividad luciferasa de renilla en los descendientes del cruce GAA-EXP con la línea portadora de una mutación (individuos GAA-EXP/*Modificador*), con respecto de los descendientes del cruce GAA-EXP con la cepa *yw* (individuos GAA-EXP/*yw*). En el caso de que los modificadores identificados no cambien la ratio en los descendientes de la cepa GAA-CONTROL (individuos GAA-CONTROL/*Modificador*), podremos proponer que tales genes ejercen algún tipo de papel en el mecanismo de represión transcripcional mediado por la expansión de las repeticiones GAA. En la Figura 43A se esquematizan los cruces de un rastreo genético con estas características.

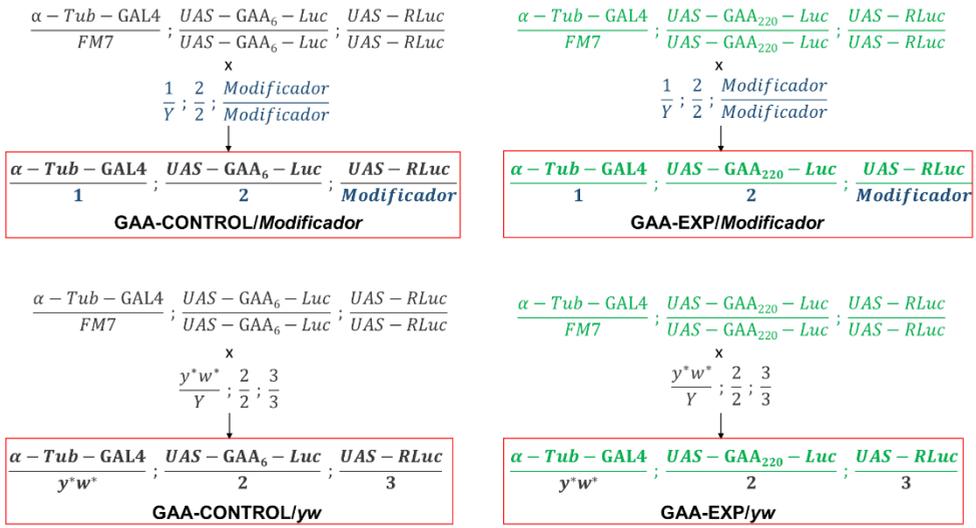
En este trabajo se ha examinado la utilidad del modelo obtenido para el rastreo genético. Para ello se ha llevado a cabo un rastreo piloto analizando genes con un papel clave y conocido en el control de la compactación de la cromatina, utilizando líneas portadoras de alelos de pérdida de función de los genes *HDAC1* (*Histone deacetylase 1*), *Su(var)3-9* (*Suppressor of variegation 3-9*), *E(z)* (*Enhancer of zeste*) y *Su(var)2-5* (*Suppressor of variegation 2-5*), además de una línea portadora de un dsRNA contra el gen *Su(var)2-5*. *HDAC1* codifica una histona desacetilasa ortóloga de la misma enzima humana⁴³⁴, *Su(var)3-9* codifica la histona metiltransferasa responsable de la trimetilación H3K9me3⁴³⁵, *E(z)* es

un componente clave para la trimetilación H3K27me3⁴³⁵ y *Su(var)2-5* codifica la proteína HP1 (*heterocromatin protein 1*)⁴³⁵. Todos los genes seleccionados codifican productos que, mediante diferentes mecanismos, favorecen un estado de la cromatina más compactado. Es importante señalar que las modificaciones de las histonas H3K9me3 y H3K27me3 se encuentran aumentadas en las proximidades de la expansión GAA en pacientes FRDA¹¹².

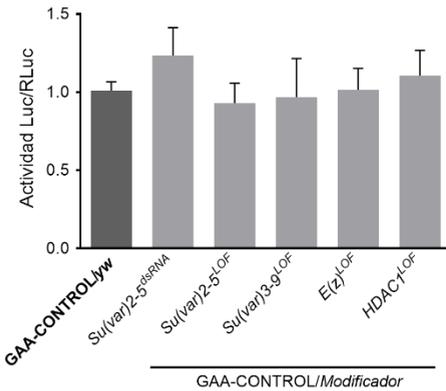
Tras la realización de los cruces correspondientes (Tabla 16, Material suplementario), se llevaron a cabo los ensayos de actividad luciferasa en los descendientes con el genotipo correcto. Como era de esperar, se observó una reducción de la ratio luciferasa de luciérnaga/luciferasa de renilla en los individuos GAA-EXP/*yw* con respecto de los individuos GAA-CONTROL/*yw* (Figura 43C), en ausencia de un modificador. También se observó que los modificadores no cambiaron de forma significativa la ratio de luciferasas en los individuos GAA-CONTROL/*Modificador* (Figura 43B), lo que permite proponer que cualquier cambio en la expresión de dicha ratio en los individuos GAA-EXP/*Modificador* puede atribuirse al efecto del gen modificador en el proceso de represión transcripcional producido por la expansión de repeticiones GAA. En concreto, observamos que los alelos de pérdida de función de cada uno de los genes mostraron una tendencia, no significativa, a incrementar la ratio entre las luciferasas en individuos GAA-EXP/*Modificador*. Es posible que este efecto no fuera mayor debido a la presencia de la mutación en heterocigosis, existiendo una copia intacta de cada uno de estos genes, así como al solapamiento de diferentes mecanismos que puedan estar causando la represión transcripcional. En el caso del dsRNA contra el gen *Su(var)2-5* sí que pudo observarse un aumento significativo de la actividad de la luciferasa de luciérnaga (Figura 43C), destacando la importancia de la proteína HP1 en la formación de un estado de la cromatina más compactado.

Resultados

A



B



C

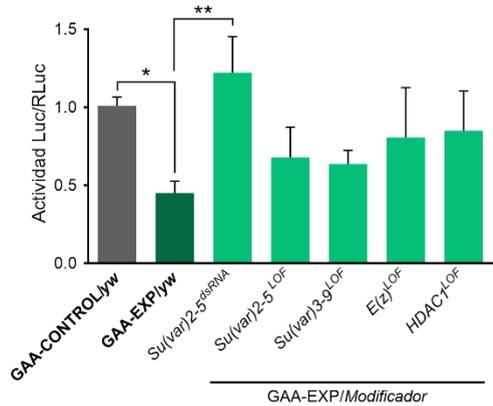


Figura 43. Rastreo piloto de modificadores genéticos. A) Las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP se cruzan con cepas portadoras de mutaciones en un único gen (gen modificador) o con la cepa *yw*. La descendencia de dichos cruces, con el genotipo adecuado, es empleada para realizar los ensayos de actividad luciferasa que determinarán el posible efecto de las mutaciones en la represión transcripcional mediada por las repeticiones GAA. Los modificadores genéticos pueden encontrarse en cualquiera de los cromosomas de *D. melanogaster*. Se ha situado el modificador en el cromosoma 3 a modo de ejemplo. B) Ninguno de los modificadores analizados afectó significativamente a la ratio luciferasa de luciérnaga/luciferasa de renilla en los individuos GAA-CONTROL/Modificador en comparación con los GAA-CONTROL/*yw*. C) Solo el dsRNA contra *Su(var)2-5* produjo un aumento en la expresión de la luciferasa de luciérnaga en los individuos GAA-EXP/Modificador en comparación con los individuos

GAA-EXP/*yw*. El resto de modificadores (alelos de pérdida de función) mostraron una tendencia a incrementar la actividad luciferasa sin llegar a ser significativa. Para las comparaciones de los resultados entre los individuos GAA-CONTROL/*yw*, GAA-CONTROL/*Modificador*, GAA-EXP/*yw* y GAA-EXP/*Modificador*, los valores de las ratios obtenidas se referenciaron por la de los individuos GAA-CONTROL/*yw*, a la que se le dio el valor de 1. Luc: luciferasa de luciérnaga, RLuc: luciferasa de renilla. *E(z)*: *Enhancer of zeste*, *HDAC1*: *Histone deacetylase 1*, *Su(var)2-5*: *Suppressor of variegation 2-5*, *Su(var)3-9*: *Suppressor of variegation 3-9*. Se utilizó un test ANOVA de una vía aplicando el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

2.8 Rastreo genético piloto en un modelo celular de repeticiones GAA

El rastreo genético a gran escala permite abordar el análisis de prácticamente todo el genoma de *D. melanogaster* en busca de modificadores. Tales rastreos se realizan utilizando sistemas automatizados aplicados a cultivo celular. Con el objetivo de explorar esta vía, hemos generado un modelo celular portador de las mismas construcciones con el gen de la luciferasa de luciérnaga y el gen de la luciferasa de renilla que el modelo de *D. melanogaster*. No obstante, en este modelo, el sistema GAL4/UAS está controlado por el promotor del gen *metalotioneína (mt)*, que se activa en presencia de metales pesados (en nuestro caso mediante adición al medio de sulfato de cobre, CuSO_4).

Hemos partido de células S2R+ de *D. melanogaster*, las cuales fueron primero transfectadas con la construcción pMT-GAL4, que permite la expresión de la proteína GAL4 bajo el control del promotor del gen *mt*. Mediante selección con el antibiótico puromicina, se aislaron clones individuales de células S2R+ con la construcción pMT-GAL4 (células S2R+/pMT-GAL4). Los clones positivos se expandieron durante 3 semanas y se utilizaron para transfectar las construcciones Luc, con las 6 o las 220 repeticiones GAA, y la construcción RLuc, obteniéndose dos líneas celulares iguales salvo por la presencia de un número de repeticiones GAA diferente. La línea portadora de la construcción Luc con 6 repeticiones GAA se denominó S2-GAA-CONTROL, y la portadora de la construcción con 220 repeticiones se denominó S2-GAA-EXP.

El ensayo de la actividad luciferasa se llevó a cabo añadiendo al medio de cultivo CuSO_4 para inducir la expresión de la proteína GAL4. Previamente determinamos la concentración óptima de este compuesto en la línea S2-GAA-CONTROL, de forma que no afectara a la viabilidad de las células, pero permitiera una alta expresión de las construcciones. Se probaron varias concentraciones de CuSO_4 de 0.1 mM a 5 mM. Se estableció la

Resultados

concentración de 1 mM como concentración de trabajo, debido a que producía una actividad de luciferasa 40 veces mayor que la observada en condiciones basales (Figura 44A), y a que es una concentración 5 veces menor que la que produjo toxicidad celular. Para esta concentración de CuSO₄, la ratio actividad luciferasa de luciérnaga/luciferasa de renilla fue 2,5 menor en la línea S2-GAA-EXP que en la línea S2-GAA-CONTROL (Figura 44B).

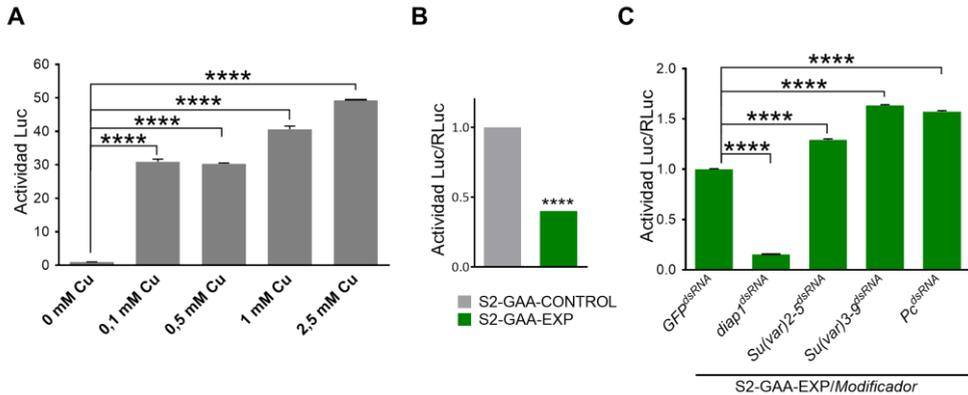


Figura 44. Resultados del rastreo piloto en células S2. A) La construcción pMT-GAL4 es responsable de la expresión de la proteína GAL4 necesaria para la correcta activación de la expresión de las luciferasas. La expresión de dicha construcción se activa mediante la adición de CuSO₄ al medio de cultivo y es dosis dependiente. B) La línea S2-GAA-EXP muestra una disminución significativa de la ratio de la actividad luciferasa de luciérnaga/luciferasa de renilla (Luc/RLuc) respecto de los valores obtenidos en la línea S2-GAA-CONTROL. C) Efecto de la interferencia en la expresión de los genes *Su(var)2-5*, *Su(var)3-9* y *Pc* en la línea S2-GAA-EXP. La transfección de dsRNAs contra estos genes tuvo por efecto un incremento en la expresión de la luciferasa de luciérnaga. Luc: luciferasa de luciérnaga, RLuc: luciferasa de renilla, *diap1*: *Death-associated inhibitor of apoptosis 1*, *Pc*: *Polycomb*, *Su(var)2-5*: *Suppressor of variegation 2-5*, *Su(var)3-9*: *Suppressor of variegation 3-9*. En los puntos (A) y (C) se aplicó un test ANOVA de una vía y el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. En el punto (B) se utilizó un test *t* de student. *****p*<0.0001. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Finalmente, comprobamos si la disminución de la expresión de algunos genes implicados en el control de la compactación de la cromatina, producía un resultado similar al del modelo animal. Las células de la línea S2-GAA-EXP fueron transfectadas con dsRNAs dirigidos contra en gen codificante de la GFP (control negativo), *diap1* (*Death-associated inhibitor of apoptosis 1*, control positivo) y los genes *Su(var)2-5*, *Su(var)3-9* y *Pc* (*Polycomb*). La interferencia contra *diap1* actúa de control positivo al provocar la muerte de las células (con la consiguiente reducción drástica de la actividad luciferasa), confirmando que la maquinaria

de interferencia funciona correctamente. Polycomb es una proteína de unión a cromatina que interactúa con la modificación de la histona H3K27me3. Los tres dsRNAs contra los genes *Su(var)2-5*, *Su(var)3-9* y *Pc* aumentaron de forma significativa la expresión de la luciferasa de luciérnaga (Figura 44C), confirmando los resultados observados con la cepa GAA-EXP y destacando la implicación de la proteína HP1 y las modificaciones de histonas H3K9me3 y H3K27me3 en el mecanismo de represión transcripcional mediado por la expansión de repeticiones GAA.

Resultados

DISCUSIÓN

Discusión

1 *D. melanogaster* en la búsqueda de nuevos tratamientos para la ataxia de Friedreich

Como herramienta para el estudio de la FRDA, nuestro laboratorio desarrolló un primer modelo en *D. melanogaster* en el cual la expresión del gen *fh* y los niveles de frataxina son reducidos en todo el organismo, utilizando una construcción *fhRNAi* y el sistema de expresión GAL4/UAS²³². Dicho modelo manifiesta varios de los fenotipos característicos de la FRDA como son, la afectación de la capacidad motora, la reducción de la supervivencia y la sensibilidad al estrés oxidativo¹⁶⁸. En trabajos posteriores, comprobamos que el metabolismo del hierro y el estrés oxidativo también tienen un papel clave en el desarrollo de los fenotipos asociados a la deficiencia de frataxina en *D. melanogaster*, habiéndose observado efectos beneficiosos tras los tratamientos con el quelante de hierro deferiprona y el antioxidante idebenona²³⁸. Más adelante confirmamos que existe un desequilibrio en el metabolismo de otros metales, y que quelantes de cobre y zinc como BCS, TTM y TPEN eran capaces de mejorar algunos fenotipos de los individuos *fhRNAi*²⁴³. Estos resultados indican que *D. melanogaster* puede ser un organismo útil en la búsqueda de otros compuestos potencialmente terapéuticos y posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de la FRDA. Por ello decidimos realizar un ensayo con una selección de compuestos cuya actividad o mecanismo de acción pudiera ser potencialmente beneficioso para aliviar las consecuencias de la deficiencia de frataxina. Se eligieron principalmente compuestos con actividades antioxidantes y/o neuroprotectoras cuyo uso en humanos ya hubiese sido aprobado o, al menos, hubiesen formado parte de ensayos clínicos. De esta forma se podría facilitar de forma mucho más rápida y efectiva una posible reposición en el uso de estos compuestos. Además de los inhibidores de TORC1, rapamicina y temsirolimus, que serán tratados más adelante, los compuestos que mostraron mejoras más significativas de entre todos los ensayados en este trabajo fueron los antioxidantes y/o neuroprotectores curcumina, dexpramipexol, fenilbutirato de sodio y melatonina.

La curcumina es un compuesto natural extraído de las raíces de la planta *Curcuma longa*. Una gran cantidad de estudios han demostrado que la curcumina es capaz de combatir la inflamación, la diabetes, la espasticidad, la alergia, el reumatismo y el cáncer⁴³⁶⁻⁴³⁸. Además, la curcumina tiene propiedades antioxidantes, pudiendo actuar directamente como un antioxidante químico o indirectamente como un modulador de las defensas celulares⁴³⁹⁻⁴⁴¹.

Discusión

La curcumina ha mostrado efectos beneficiosos en modelos de la enfermedad de Parkinson ^{442,443}.

El dexpramipexol es un medicamento que fue investigado como posible tratamiento para la esclerosis lateral amiotrófica. Este compuesto es el isómero R del fármaco antiparkinsoniano pramipexol, pero con una muy reducida afinidad por los receptores de dopamina. El dexpramipexol tiene la capacidad de unirse a la ATP sintasa y de mejorar la eficiencia mitocondrial, aumentando la producción de ATP y reduciendo el consumo de O₂ ^{444,445}. Existen evidencias recientes de que la ATP sintasa participa en la organización del complejo del poro de transición mitocondrial ^{446,447}, y se ha observado que el dexpramipexol inhibe las corrientes de membrana despolarizantes en mitocondrias disfuncionales y previene la hinchazón de los orgánulos en condiciones que predisponen a la apertura de los poros ^{448,449}. El compuesto también es capaz de detoxificar las especies reactivas de oxígeno en la mitocondria y reducir la muerte celular en modelos *in vitro* de neurotoxicidad ^{448,450,451}.

El fenilbutirato de sodio es una sal del ácido graso aromático 4-fenilbutirato. Este compuesto se usa para tratar trastornos del ciclo de la urea, ya que sus metabolitos ofrecen una ruta alternativa a este ciclo para permitir la excreción del exceso de nitrógeno ^{452,453}. El fenilbutirato actúa además como inhibidor de las histona desacetilasas y ha mostrado propiedades neuroprotectoras en varios modelos animales de enfermedades neurodegenerativas ^{454,455}. Una parte de los efectos beneficiosos del fenilbutirato se asocian a su capacidad de incrementar la expresión de la proteína DJ-1, capaz de atenuar el estrés oxidativo y mantener la función mitocondrial ⁴⁵⁶.

Finalmente, la melatonina, sintetizada y secretada por la glándula pineal, es una neurohormona derivada de la serotonina y su función es dependiente de receptores beta-adrenérgicos. La melatonina está involucrada en numerosas funciones biológicas que incluyen el ritmo circadiano, el sueño, la respuesta al estrés, el envejecimiento y la inmunidad. Se trata de una molécula con propiedades antioxidantes que ha mostrado un papel neuroprotector en las enfermedades de Alzheimer ⁴⁵⁷, de Parkinson ⁴⁵⁸ o en la asfixia perinatal ⁴⁵⁹. También es de especial relevancia su posible papel como protector mitocondrial, lo que puede ayudar a prevenir el desarrollo y la progresión de la neurodegeneración ⁴⁶⁰.

2 Efecto de la modulación por rapamicina de la actividad de mTOR en modelos de deficiencia de frataxina

Entre los diferentes compuestos ensayados en el modelo de FRDA de deficiencia de frataxina en *D. melanogaster*, la rapamicina fue uno de los candidatos terapéuticos más prometedores. A concentraciones más bajas que el temsirolimus, este inhibidor de la actividad de la proteína mTOR, es capaz de mejorar notablemente la capacidad motora de las moscas modelo. mTOR es una proteína conservada evolutivamente que integra un gran número de señales ambientales e intracelulares para regular el crecimiento y la homeostasis en todas las células eucariotas. Su función depende de la formación de dos complejos multiproteicos estructural y funcionalmente diferentes, TORC1 y TORC2. De ambos complejos, TORC1 ha sido descrito en mayor profundidad y se sabe que regula muchos de los procesos principales de la célula, incluyendo la síntesis de proteínas, la biogénesis de lípidos o la autofagia ²⁶³.

Con el fin de identificar modificadores genéticos que pudiesen modular los fenotipos causados por la deficiencia de frataxina en *D. melanogaster*, en nuestro grupo se llevó a cabo un rastreo genético de rutas bioquímicas implicadas en la fisiopatología de la FRDA. El rastreo fue realizado por Sirena Soriano, componente del grupo, como parte de su trabajo de tesis doctoral ⁴¹⁸. Concretamente, se examinó el efecto de alelos *knockdown* y de pérdida y ganancia de función correspondientes a genes que participan en la homeostasis de metales, respuesta al estrés oxidativo, apoptosis y autofagia. Se determinó si los alelos estudiados eran capaces de suprimir el fenotipo locomotor en los individuos *fhRNAi*. El rastreo reveló cuatro modificadores de la ruta de señalización de TORC1: *Tsc1*, *S6k*, *eIF4E1* y *Lrrk* (*Leucine-rich repeat kinase*) (Figura 45A, Material suplementario).

Uno de los reguladores más importantes de la actividad de TORC1 es el complejo TSC1/2, un heterodímero compuesto por las proteínas TSC1 y TSC2. TSC1/2 regula negativamente la señalización de TORC1 mediante la inactivación de la GTPasa Rheb. En *D. melanogaster*, la deficiencia simultánea de *Tsc1* y frataxina provocaba semiletalidad en los individuos, mientras que la expresión del dsRNA contra *Tsc1* (*Tsc^{dsRNA}*) no tenía efectos negativos en la viabilidad de las moscas control. La expresión de una forma dominante negativa de la proteína S6K (*S6k^{DN}*) ⁴⁶¹ mejoraba la capacidad motora de los individuos *fhRNAi* (Figura 45B, Material suplementario), mientras que la expresión de una forma

Discusión

constitutivamente activa de S6K (*S6k^{CA}*)⁴⁶¹ también inducía semiletalidad en los individuos con deficiencia de frataxina. Por otro lado, una mutación de pérdida de función de *eIF4E1* (*eIF4E1^{LOF}*) era capaz también de revertir los problemas motores de los individuos *fhRNAi* (Figura 45C, Material suplementario). En todos los casos, los alelos de *S6k* y *eIF4E1* no tuvieron efectos en la viabilidad o capacidad motora de los individuos control. Por último, se observó que la interferencia de *Lrrk* suprimía el fenotipo de deficiencia de frataxina (Figura 45D, Material suplementario). *Lrrk* es el ortólogo en *D. melanogaster* del gen humano *LRRK2*, cuyas mutaciones pueden causar las formas familiares más comunes y algunos casos esporádicos de la enfermedad de Parkinson⁴⁶². Estudios *in vitro* han mostrado que 4E-BP es sustrato de *Lrrk*⁴⁶³. Debido a estos resultados obtenidos por el grupo, de entre los compuestos ensayados en el rastreo farmacológico, decidimos centrarnos en este trabajo en el estudio del efecto de la rapamicina en el modelo de FRDA en *D. melanogaster*.

En este trabajo hemos observado que la rapamicina reestablece la capacidad motora de los individuos con deficiencia de frataxina, en consonancia a lo obtenido con la reducción genética de *S6k* y *eIF4E1*, factores cuya actividad se ve reducida cuando la actividad de TORC1 disminuye. El tratamiento con rapamicina también incrementó la supervivencia de los individuos *fhRNAi*, así como del control. Ya era conocido que la inhibición de TORC1 puede prolongar la supervivencia en diferentes especies^{464,465}, y dicho efecto también lo hemos observado en condiciones de deficiencia de frataxina en los individuos de nuestro modelo de FRDA.

Por otra parte, diferentes estudios han demostrado que la expresión de formas dominantes negativas de mTOR y S6K y la inhibición de mTOR mediante rapamicina producen, en *D. melanogaster*, resistencia al estrés oxidativo, mientras que el incremento en la señalización del eje Rheb-TORC1-S6K sensibiliza a los individuos frente a este tipo de estrés y promueve la senescencia temprana de la actividad locomotora^{465,466}. También se ha descrito, en esta especie, que la proteína 4E-BP es importante para la supervivencia bajo diferentes tipos de estrés, incluyendo el estrés oxidativo⁴⁶⁷.

En muestras de pacientes de FRDA y en varios modelos de la enfermedad se han encontrado altos niveles de marcadores de estrés oxidativo^{160,170,179,180}. En concordancia con estos resultados, los individuos *fhRNAi* tienen aumentados los niveles de MDA y HAE, compuestos que se producen a partir de peróxidos de ácidos grasos poliinsaturados inestables.

Las moscas con deficiencia de frataxina también mostraron un aumento en el nivel de GSH total, un tripeptido con un papel antioxidante que reduce las cysteinas y grupos -SH oxidados y actúa como cofactor en enzimas como la glutatión peroxidasa 1 y la glutatión peroxidasa 4 y la glutaredoxina 2. El tratamiento con rapamicina redujo, de forma significativa, los niveles de MDA + HAE y glutatión total en los individuos *fhRNAi*, restableciendo en cierta medida la situación normal observada en los individuos control. Se ha obtenido un resultado similar en un modelo de deficiencia de frataxina en levadura, en el que la rapamicina también reduce la producción de especies reactivas de oxígeno ⁴⁶⁸.

En varios modelos celulares y animales de enfermedades neurodegenerativas la inhibición de TORC1 mediante rapamicina ha mostrado tener un papel protector frente a diferentes formas de toxicidad. La inhibición de TORC1 produce una inducción del proceso de autofagia, lo que puede ser particularmente beneficioso para la eliminación de diferentes tipos de proteínas mutantes con tendencia a formar agregados en algunas enfermedades neurodegenerativas (enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y otras) ⁴⁶⁹. Sin embargo, nuestros resultados indican que en condiciones de normoxia, la inducción de autofagia no es el mecanismo principal por el que la rapamicina protege a los individuos *fhRNAi* frente al estrés oxidativo causado por la deficiencia de frataxina. Nuestros datos muestran que, ni el rescate de la capacidad motora, ni la protección frente a ROS en normoxia producidas por el tratamiento con rapamicina se vieron afectados por la adición del inhibidor autofágico 3-MA.

Se ha documentado que la inhibición de TORC1 mediante rapamicina incrementa el nivel de los transcritos de diferentes genes con un papel antioxidante en células madre adultas de ratón ⁴²⁵ y en el nemátodo *C. elegans* ⁴²⁶. Por tanto, decidimos estudiar el efecto de la rapamicina sobre la actividad de los factores de transcripción FOXO y Cnc (ortólogo en *D. melanogaster* del factor de transcripción humano Nrf2), los cuales controlan la expresión de un gran número de genes implicados en la resistencia a diferentes tipos de estrés ^{426,470}. Nuestros resultados mostraron que tras el tratamiento con rapamicina aumentaba la expresión de genes controlados por Cnc, y que este efecto podía estar mediado por un incremento en la translocación nuclear de dicho factor de transcripción. Éste podría ser, en parte, el origen del efecto protector de la rapamicina frente al estrés oxidativo causado por la deficiencia de frataxina en los individuos *fhRNAi* en condiciones de normoxia.

Discusión

Todavía existen aspectos de la regulación del factor de transcripción Nrf2 que son desconocidos. No obstante, ya se han descrito varios mecanismos de regulación dependientes e independientes de la proteína Keap1 (revisados recientemente en ³⁶³). Algunos de estos mecanismos podrían explicar un incremento de la actividad de Nrf2 (o Cnc en *D. melanogaster*) mediado por la rapamicina. La Proteína quinasa C es capaz de deshacer la asociación entre Nrf2 y Keap1, promoviendo la translocación de Nrf2 al núcleo. Por otro lado, la proteína GSK3 β promueve la exportación desde el núcleo y la ubiquitinización y degradación de Nrf2 a través del proteasoma, por lo que la inhibición de GSK3 β también puede contribuir a una mejor actividad de Nrf2. Tanto la activación de la Proteína quinasa C como la inhibición de GSK3 β pueden desencadenarse por un incremento en la señalización por PI3K. El tratamiento con rapamicina podría ser capaz de producir este efecto mediante un bucle de retroalimentación negativa en la regulación de TORC1 mediado por S6K ^{471,472} (Figura 47, Material suplementario). Aunque aún se requiere de un estudio en mayor profundidad para conocer cuál es el mecanismo por el que la rapamicina es capaz de incrementar la actividad de Cnc en los individuos *fhRNAi* y control, los mecanismos de regulación mencionados podrían ser de importancia en la FRDA. Recientemente, se ha estudiado la función de Nrf2 en corazón de un modelo de ratón *knockout* condicional de frataxina en músculo esquelético y corazón (ratón MCK) ⁴⁷³. En dicho estudio se observó que en el tejido cardíaco de estos ratones existe una disminución de los niveles total y nuclear de Nrf2, junto con un incremento en la actividad de GSK3 β . Es por ello que la posible reducción de la actividad de GSK3 β , a través de la reducción de la actividad de TORC1 mediante la ruta de señalización propuesta, podría ser de especial relevancia en algunos de los tejidos afectados en la FRDA. El papel terapéutico de la activación de Nrf2 también ha sido puesto de manifiesto recientemente en cultivos de motoneuronas de ratón deficientes en frataxina. Mediante el tratamiento con el compuesto sulforafano, un potente activador de Nrf2 ya probado en ensayos clínicos para otras patologías, se han conseguido corregir varios fenotipos morfológicos y bioquímicos de las motoneuronas con déficit de frataxina de ratón ⁴⁷⁴.

Entre los resultados del presente estudio, hemos encontrado que la autofagia actúa como un importante mecanismo protector en los individuos *fhRNAi* sometidos a un fuerte estrés oxidativo externo, como es la hiperoxia, unas condiciones en las que la reducción de la capacidad motora y la supervivencia en comparación con individuos control es aún más

acusada ¹⁶⁸. En tales condiciones, los tratamientos con rapamicina incrementan la supervivencia y la actividad aconitasa en los individuos *fhRNAi*. Este efecto beneficioso del tratamiento es contrarrestado al añadir el inhibidor autofágico 3-MA al medio. Estos resultados concuerdan con los de otros estudios ^{465,475,476} en los que la inducción de autofagia mediante rapamicina, o mediante la sobreexpresión o interferencia de genes *Atg* (*autophagy related genes*) o componentes de la ruta de señalización de TORC1 puede proteger a los individuos frente a un fuerte estrés oxidativo externo. Sin embargo, en las condiciones de producción endógena crónica de ROS de los individuos *fhRNAi*, los efectos protectores de la rapamicina son debidos más probablemente al aumento de la expresión de genes antioxidantes que a la inducción de autofagia.

Como confirmación de estos resultados, también quisimos comprobar si la modulación de la actividad de la proteína mTOR era beneficiosa en un contexto de deficiencia de frataxina en un modelo celular humano. Para ello se emplearon células derivadas de neuroblastoma humano (línea SH-SY5Y) en las que la expresión del gen *FXN* se mantenía reducida mediante la expresión de un shRNA. Con el fin de modular la actividad de la proteína mTOR, en esta ocasión se emplearon los inhibidores ATP competitivos Torin1 y XL388, los cuales, utilizados en las condiciones y concentraciones adecuadas, pueden actuar como inhibidores de ambos complejos TORC (Torin1) o mayoritariamente del complejo TORC1 (XL388). Se observó que en las células con deficiencia de frataxina existía un aumento significativo de la producción del radical superóxido en condiciones basales y que el tratamiento con ambos compuestos fue capaz de revertir dicho incremento. Este resultado apoya las observaciones realizadas en el modelo en *D. melanogaster*, que indican que una determinada reducción de la actividad de TORC1 es beneficiosa para contrarrestar el incremento en el estrés oxidativo producido como consecuencia de la deficiencia de frataxina.

La falta de frataxina también produce varias deficiencias en la cadena de transporte electrónico mitocondrial, que dan lugar a una disminución de la producción de ATP ^{185,427}. La modulación de la actividad de TORC1 puede ser beneficiosa para el estado energético de las células deficientes en frataxina, debido a que esta ruta de señalización activa mecanismos reguladores que pueden incrementar la eficiencia mitocondrial. Bonawitz y colaboradores ⁴²⁸ mostraron que un mutante nulo de *tor1* en levadura exhibía un incremento de la tasa de traducción mitocondrial y una mayor abundancia de componentes OXPHOS codificados por la mitocondria. En *D. melanogaster*, la restricción calórica, cuyos efectos están mediados en

Discusión

gran medida por TORC1, es capaz de incrementar la traducción de genes involucrados en la fosforilación oxidativa para asegurar la continua producción de ATP, y este efecto se ha atribuido a una de las dianas de TORC1, la proteína 4E-BP ⁴²⁹. En consonancia con estos resultados, observamos que la inhibición de TORC1 mediante rapamicina incrementa el nivel de ATP, tanto en los controles como en los individuos *fhRNAi*, lo que podría contribuir a la recuperación de la capacidad motora y al ligero incremento en la supervivencia. Hemos visto que 4E-BP podría también ser el mediador clave en el incremento de ATP tras la inhibición de TORC1 mediante rapamicina, puesto que la presencia de un alelo de pérdida de función para dicho gen limita en gran medida dicho incremento.

Finalmente, aunque se ha realizado un gran progreso en la comprensión de la función de TORC1, no se puede excluir la posibilidad de que otros mecanismos regulados por este importante complejo de señalización puedan estar contribuyendo a la recuperación de los fenotipos de los individuos deficientes en frataxina. Es destacable la observación de que varios de los efectos beneficiosos producidos por el tratamiento con rapamicina se daban tanto en individuos control como en individuos con deficiencia de frataxina. Sin embargo, no por ello la ruta de señalización de TORC1 deja de ser una posible diana terapéutica para la FRDA debido al hecho de que el incremento del estrés oxidativo en los individuos *fhRNAi* y su resistencia frente a agentes oxidantes externos sí es combatido de forma específica por la rapamicina.

La rapamicina es, desde hace tiempo, un compuesto conocido y aprobado para su uso en humanos. Este compuesto y sus análogos (rapálogos) tienen importantes aplicaciones clínicas en oncología y en trasplantes ⁴⁷⁷. Los distintos ensayos clínicos utilizando rapálogos para tratar diferentes trastornos proporcionan un extenso cuerpo de conocimientos acerca de la seguridad, tolerabilidad y efectos secundarios de estos compuestos ⁴⁷⁸, lo cual es de gran importancia para facilitar la reposición del fármaco. Entre los efectos secundarios de los rapálogos, es importante tener presente la inducción de diabetes e hiperglucemia por tales compuestos ⁴⁷⁹, ya que los pacientes de FRDA tienen un mayor riesgo de desarrollar diabetes e intolerancia a la glucosa ¹. Además, la administración a largo plazo de rapamicina puede no ser favorable en enfermedades crónicas debido a sus efectos inmunosupresores. Es posible que, en el contexto de la FRDA, bajas dosis de rapamicina u otros inhibidores de TORC1 aplicadas de forma controlada puedan ser beneficiosas en combinación con otros fármacos, como antioxidantes y quelantes de hierro. Esto podría mejorar las ventajas de cada compuesto

actuando aisladamente, ya que ninguno de los antioxidantes o quelantes ensayados ha mostrado ser lo suficientemente efectivo sobre los síntomas neurológicos de la enfermedad ⁴⁸⁰.

En resumen, nuestros resultados muestran que una reducción de la señalización de TORC1 en el modelo de FRDA en *D. melanogaster* es capaz de rescatar varios fenotipos causados por la deficiencia de frataxina, similares a algunas de las características clínicas de la enfermedad. Estos resultados señalan a la ruta de TORC1 como una nueva y prometedora diana terapéutica en el tratamiento de la FRDA.

3 *D. melanogaster* como modelo de estudio de la expansión de repeticiones GAA

En las células eucariotas, el DNA se encuentra enrollado alrededor de proteínas histonas para formar los denominados nucleosomas, los cuales a su vez son la unidad básica de la cromatina. Ésta puede encontrarse en un estado más compactado e inaccesible en forma de heterocromatina, o en un estado más laxo, la denominada eucromatina, que permita la interacción con el DNA de diferentes factores, como son los que forman parte de la maquinaria de transcripción. Además de una importante función en la regulación de la expresión génica, el estado de compactación de la cromatina tiene otros papeles como la protección frente a la transcripción aberrante de secuencias repetitivas del DNA ⁴⁸¹, el mantenimiento de la arquitectura nuclear o la formación de las estructuras cromosómicas necesarias para el correcto reparto de los cromosomas en la división celular. El estado de metilación del DNA, los mecanismos basados en el RNA de interferencia y, muy especialmente, todas las interacciones proteicas mediadas por las diferentes modificaciones bioquímicas de las histonas, son responsables de las variaciones en el estado de compactación de la cromatina, constituyendo los llamados mecanismos epigenéticos.

D. melanogaster ha sido uno de los organismos que más ha contribuido al desarrollo de la epigenética y a la comprensión de las propiedades de la heterocromatina. Mediante exposición a radiación, Muller obtuvo un mutante de *Drosophila* en el que el gen *white* (causante del color de ojo rojo de la mosca) se traslocó desde una región eucromática a una región próxima a heterocromatina pericentromérica ⁴⁸². El resultado fue la expresión estocástica de este gen en unas células y no en otras, dando lugar a un fenotipo de color de

Discusión

ojo en mosaico, un fenómeno que fue denominado variegación por efecto de posición (PEV, *position effect variegation*), y que es debido a la propiedad invasiva de la heterocromatina y su capacidad de reprimir la expresión de genes cercanos. Los estudios del PEV en *Drosophila* han permitido, en los últimos años, identificar muchos de los factores capaces de modificar el estado de compactación de la cromatina ⁴⁸³.

En la FRDA, la principal causa de la reducción de la expresión del gen *FXN* se atribuye precisamente al hecho de que las repeticiones GAA, cuando alcanzan cierto número, son capaces de inducir la formación de heterocromatina ^{101,484,485}, impidiendo la transcripción del gen, posiblemente mediante el silenciamiento del promotor y bloqueando el inicio de la transcripción ⁴⁸⁶. Dada la utilidad de *D. melanogaster* en el estudio de los mecanismos epigenéticos, con la salvedad de ciertas diferencias respecto a vertebrados, la utilización de este organismo, como modelo de estudio de los mecanismos de represión del gen *FXN*, puede aportar nuevas claves e ideas para una mejor comprensión de la enfermedad.

En este trabajo de tesis doctoral, se ha completado la generación de un nuevo modelo, en *D. melanogaster*, que permite estudiar el papel de la expansión de repeticiones GAA en la inhibición transcripcional de *FXN* en la FRDA. Este nuevo modelo se ha basado en el empleo de una construcción en la que el gen reportero que codifica la luciferasa de luciérnaga se encuentra precedido de un número de repeticiones GAA, normal (6) o patológico (aproximadamente 220), manteniendo el contexto genómico del gen *FXN*. Hemos observado que la expansión patológica de repeticiones GAA es capaz de reprimir la expresión de la luciferasa de luciérnaga, de forma similar a lo que sucede en humanos con el gen *FXN*. Además, se pudo determinar que esta reducción en la expresión del gen reportero estaba asociada a un incremento en el nivel de compactación de la cromatina, tal como se ha descrito en células de paciente ²⁰⁷.

La modificación del carbono C5 de la citosina para dar lugar a 5mC es un tipo de marca del DNA muy extendida entre los eucariotas ⁴³³, que puede ser reconocida por determinadas proteínas. La 5mC actúa como uno de los componentes clave en los sistemas de regulación epigenética capaces de controlar la transcripción génica ⁴⁸⁷. Donde más se ha estudiado la 5mC ha sido en vertebrados, en los que típicamente se da como una modificación simétrica del dinucleótido CpG en las denominadas islas CpG, regiones con una alta densidad de este dinucleótido. En humanos se han identificado tres enzimas DNA metiltransferasas

responsables del establecimiento (DNMT3a/3b) y mantenimiento (DNMT1) de la 5mC en el genoma. Además, existe otra enzima, denominada DNMT2, para la que se postula su implicación en la metilación de citosina en el RNA ⁴⁸⁸. Otras tres proteínas (TET1/2/3), pertenecientes a la familia TET (*ten-eleven translocation*), son responsables de la progresiva oxidación de 5mC a 5-hidroximetilcitosina, 5-formilcitosina y 5-carboxilcitosina ⁴⁸⁹.

Como ya se ha mencionado previamente, en el gen *FXN* existen tres islas CpG, la primera de las cuales incluye el exón 1 y se extiende hacia el primer intrón, por lo que varios estudios se han centrado en esta región, así como en otros sitios CpG que flanquean las repeticiones GAA. Mediante secuenciación por bisulfito, Green *et al.* ⁴⁹⁰ observaron el estado de metilación en una región adyacente en 5' a las repeticiones GAA en el gen *FXN*, tanto en linfocitos de pacientes de FRDA como en controles. Comprobaron que tres de los sitios CpG estudiados estaban prácticamente siempre metilados en contraposición a la casi total ausencia de metilación en los controles para dichos sitios. Posteriormente, Almahdawi *et al.* ⁴⁹¹ confirmaron en corazón, cerebro y cerebelo de pacientes, la existencia de esta alteración en el patrón de metilación de las regiones próximas a las repeticiones, siendo una constante el incremento en el nivel de metilación de los sitios CpG aguas arriba de las repeticiones GAA. Dichos cambios en el estado de metilación eran similares a los observados, en los mismos tejidos, en los ratones modelo YG8 e YG22 en comparación con los ratones control ⁴⁹¹. Es importante destacar la correlación directa que se ha descrito entre el nivel de metilación en sangre en pacientes FRDA con la longitud de las repeticiones, e inversa con la edad de inicio de la enfermedad ⁴⁹².

El papel de la 5mC en la expresión génica en vertebrados es bien conocido, no obstante, existen grandes diferencias en cuanto a su posible función en el resto de especies. Por ejemplo, en el nemátodo *C. elegans* no hay evidencias de la presencia de 5mC. Ciertos insectos como la abeja (*Apis mellifera*) sí que presentan ortólogos para los genes codificantes de las enzimas DNMT1 y DNMT3 implicados en la formación de diferentes patrones genómicos de 5mC ⁴⁹³. Sin embargo, la presencia y función de la 5mC en *D. melanogaster* ha generado cierta controversia en los últimos años. *D. melanogaster* parece contener solamente un ortólogo para el gen codificante de la enzima DNMT2 (metilación de RNA), por lo que, aparentemente, no dispondría de los medios necesarios para generar la modificación 5mC en su genoma. Sin embargo, sí que posee un ortólogo de los genes codificantes de la familia de proteínas TET, las cuales reconocen 5mC como sustrato, lo cual

Discusión

sugiere la presencia de esta modificación química en *D. melanogaster*. Inicialmente no se pudo detectar la presencia de 5mC en el genoma de esta especie ^{494,495}, pero tras la aplicación de técnicas más sensibles se han podido identificar cantidades muy reducidas de 5mC, principalmente en embriones de estadios tempranos ^{496,497}. Los estudios más recientes también apoyan la existencia de 5mC en *D. melanogaster* ⁴⁹⁸. En embriones de estadio 5, la metilación del genoma parece darse de forma asimétrica (en una sola de las cadenas), en regiones cortas de menos de 75 pb, en motivos ricos en CC o CA y ocupando menos de un 1% del genoma ⁴⁹⁹. Además, las regiones metiladas son más comunes en el cromosoma X, lo que parece indicar un papel en el mecanismo de compensación de dosis génica. También se ha propuesto la posible existencia de un patrón de metilación de dinucleótidos CpG fuera de las regiones que aparecen más metiladas ⁴⁹⁹.

Decidimos comprobar en nuestro modelo en *D. melanogaster* el estado de metilación de diferentes dinucleótidos CpG, aguas arriba y abajo de las repeticiones GAA, en individuos de las cepas GAA-EXP y GAA-CONTROL, para analizar si la expansión de tripletes GAA incrementaba el nivel de metilación de la región, como ocurre en pacientes y en modelos de FRDA en ratón. Para los sitios CpG estudiados, no se encontraron citosinas metiladas en ningún caso, ni tampoco en el resto de citosinas de las regiones estudiadas. Es posible que la escasa metilación encontrada en *D. melanogaster* se dé casi exclusivamente en embriones, donde su función podría ser diferente a la observada en vertebrados. Por lo tanto, la expansión patológica de repeticiones GAA no está asociada, en nuestro modelo, a un incremento en la metilación del DNA. Las causas de la disminución de la expresión del gen de la luciferasa de luciérnaga debido a la expansión GAA han de deberse a otros mecanismos que sí estén conservados entre *Drosophila* y humanos.

Es conocido que la heterocromatina y, como resultado el silenciamiento transcripcional, pueden extenderse a las proximidades de regiones del genoma altamente repetitivas como son los centrómeros y telómeros ⁵⁰⁰⁻⁵⁰². Se ha observado que las repeticiones GAA pueden provocar defectos en el inicio de la transcripción de *FXN* por medio del silenciamiento del promotor, así como también defectos en la fase de elongación del transcrito ^{490,503-505}. Una cuestión de gran relevancia en el tratamiento de la FRDA, especialmente si se aplican técnicas como la terapia génica, es la determinación del alcance del silenciamiento transcripcional provocado por las repeticiones GAA. Esto implicaría que, además de *FXN*, otros genes también se verían afectados. Un trabajo reciente de Li *et al.* ⁴³¹ abordó esta

cuestión mediante la técnica de secuenciación masiva de RNA, analizando líneas celulares de fibroblastos derivados de pacientes de FRDA e individuos sanos. Los autores midieron la expresión de diferentes genes localizados en las proximidades de *FXN*: *PIP5K1B* (*Phosphatidylinositol-4-Phosphate 5-Kinase Type 1 Beta*), *FAM122A* (*family with sequence similarity 122A*, pseudogen situado en un intrón del gen anterior), *PRKACG* (*protein kinase cAMP-activated catalytic subunit gamma*) y *TJP2* (*tight junction protein 2*). En el caso de *FAM122A* y *TJP2*, no se hallaron diferencias en su expresión entre pacientes e individuos sanos. Sin embargo, la expresión de *PIP5K1B* y *PRKACG* no pudo determinarse debido a que se encontraba por debajo de los niveles de detección de la técnica empleada. Tampoco se hallaron diferencias para los diferentes genes al estudiar, mediante inmunoprecipitación de cromatina, la presencia de marcas de histonas como H3K4me2 H3K9ac (asociadas a transcripción activa) y H3K9me3 (asociada al silenciamiento transcripcional).

Un trabajo anterior⁴³² también había estudiado el posible efecto de las repeticiones GAA sobre la expresión de genes próximos a *FXN*. En dicho trabajo se centraron especialmente en el gen *PIP5K1B*. En fibroblastos de pacientes de FRDA, pudieron observar una producción normal de centros hierro-azufre, sin embargo, detectaron varios defectos en el citoesqueleto^{164,506}, una situación similar a la descrita en las neuronas de la médula espinal de pacientes de FRDA⁵⁰⁷. Los autores del estudio sugirieron que estas anomalías podían ser atribuidas al gen *PIP5K1B*, ya que dicho gen está relacionado funcionalmente con la dinámica del citoesqueleto de actina⁵⁰⁸. La proteína codificada, pip5k1 β , pertenece a la familia de enzimas PIP5K1, responsables de la generación de fosfatidilinositol(4,5)bisfosfato (PI(4,5)P2)⁵⁰⁸, el cual es un fosfolípido de señalización esencial para la remodelación de la red de actina^{509,510}. Al cuantificar en fibroblastos de pacientes e individuos sanos el nivel de mRNA de *PIP5K1*, *PRKACG* y *TJP2*, el transcrito de *PRKACG* resultó indetectable, al igual que en el estudio de Li *et al.*⁴³¹, y tampoco se hallaron diferencias en la expresión de *TJP2*. No obstante, sí pudieron observar una reducción del transcrito del gen *PIP5K1B* en los pacientes, que fue corroborado comprobando la abundancia de la proteína pip5k1 β . Dicha reducción en la cantidad de proteína fue confirmada en linfocitos mediante inmunofluorescencia por citometría de flujo. Los resultados obtenidos al sobreexpresar e interferir la expresión de *PIP5K1B*, permitieron concluir a los autores que la desestabilización de la red de actina en los fibroblastos FRDA, se debía al silenciamiento de dicho gen y no a la reducción del contenido celular de frataxina.⁴³² Existe, por tanto, la posibilidad de que el silenciamiento

Discusión

de *PIP5K1B* tenga un papel relevante en la patología de la FRDA. La proteína pip5k1 β actúa en diferentes rutas de señalización y las consecuencias de su depleción pueden ser variadas. Dado que la red de actina tiene un importante papel en el control de la actividad del factor de transcripción Nrf2⁵¹¹, el anormal remodelado de esta red puede contribuir a la hipersensibilidad al estrés oxidativo observada en la FRDA. Sin embargo, para apoyar esta hipótesis, aun es necesaria la confirmación del silenciamiento de *PIP5K1B* en alguno de los principales tejidos afectados en la FRDA.

Dados estos resultados, nos preguntamos si la expansión GAA podría también afectar a otros genes en nuestro modelo en *D. melanogaster*. Examinamos, mediante RT-qPCR, la expresión de 5 genes situados en las regiones vecinas al lugar de inserción de la construcción Luc en la cepa GAA-EXP. Para uno de ellos, el gen *RFeSP*, se observó una reducción significativa del nivel de mRNA en comparación con su expresión en la cepa GAA-CONTROL. Este gen es el más cercano a la construcción con la expansión patológica GAA y comprobamos que mostraba un estado de la cromatina más compactado. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el silenciamiento transcripcional mediado por la expansión de repeticiones GAA podría ser capaz de afectar a genes cercanos. Sin embargo, el alcance de la expansión de la heterocromatina a partir de las repeticiones GAA podría estar afectado por múltiples factores, como la presencia de elementos aisladores como CTCF, y ser variable tanto entre pacientes como entre diferentes organismos modelo.

El estado conformacional de la cromatina depende de una gran variedad de factores y componentes. Las propias histonas son proteínas básicas cargadas positivamente con una gran afinidad por el DNA cargado negativamente. Las diferentes modificaciones bioquímicas a las que están sometidas las histonas pueden, tanto variar su afinidad hacia el DNA por cambios electrostáticos o conformacionales, como controlar la interacción con otros conjuntos de proteínas⁵¹². Entre las modificaciones mejor estudiadas de las histonas se encuentran la acetilación de los residuos de lisina y la metilación de los residuos de lisina y arginina. La adición de grupos acetilo reduce la carga positiva de las histonas y su afinidad hacia el DNA, lo que supone una de las razones por las que la acetilación suele asociarse con un estado transcripcional activo. La metilación, en cambio, no afecta a la carga de las histonas y su efecto es la introducción de cambios conformacionales que afectarán al estado de la cromatina en función del residuo metilado.

En pacientes FRDA, se ha observado que en las regiones próximas a las repeticiones GAA expandidas hay un incremento en modificaciones de histonas propias de la heterocromatina: la dimetilación y trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me2 y H3K9me3), y la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) ¹¹². La modificación H3K9me2 está enriquecida en promotores silenciados de genes eucromáticos ⁵¹³, mientras que H3K9me3 está presente en la heterocromatina constitutiva como la hallada en las repeticiones teloméricas o satélite. En *D. melanogaster*, la histona metiltransferasa Su(var)3-9 (SUV39H en humanos) es la responsable de catalizar la trimetilación H3K9me3, modificación que a su vez es reconocida por la proteína HP1 ⁵¹⁴. HP1 tiene un papel crucial en la formación de heterocromatina, ya que es capaz de dimerizar y mantener unidos los nucleosomas adyacentes en una estructura compacta. Por otra parte, H3K27me3 se encuentra asociada a la heterocromatina facultativa y al cromosoma X inactivado, y a la actividad del sistema Polycomb, capaz también de compactar la cromatina y mantener silenciados genes implicados en el desarrollo ⁵¹⁵. Es de suponer que la pérdida de función de los genes implicados en la formación de la heterocromatina podría reducir la represión transcripcional mediada por las expansiones GAA. Tales genes serían, por tanto, buenos candidatos para comprobar la utilidad del modelo obtenido en la identificación de modificadores del silenciamiento de *FXN* mediante un rastreo genético. En este sentido, analizamos el efecto de mutaciones de pérdida de función y/o *knockdowns* de 4 genes en el modelo animal y tres en el modelo celular, que codifican para la histona desacetilasa HDAC1, la histona metiltransferasa Su(var)3-9, la proteína HP1, la proteína E(z) (componente clave para la trimetilación H3K27me3, EZH1 y EZH2 en humanos) y Polycomb (proteína de unión a cromatina que interactúa con la modificación de H3K27me3). En todos los casos, la pérdida de función de cada uno de los genes mostró una tendencia clara a aumentar el nivel de la actividad luciferasa en la cepa GAA-EXP y ningún efecto apreciable en la cepa GAA-CONTROL. Es cierto que los cambios observados en la cepa GAA-EXP no fueron significativos, y ello podría explicarse a que en el silenciamiento transcripcional provocado por las expansiones GAA estarían participando diferentes mecanismos. Las modificaciones H3K9me3 y H3K27me3 están asociadas a dos mecanismos de formación de heterocromatina diferentes y no suelen estar solapadas en el genoma de mamíferos ⁵¹⁶. En cambio, ambas modificaciones se han observado en el gen *FXN* en pacientes de FRDA ⁵¹⁷. Es posible, por tanto, que reducir la eficacia de uno de los mecanismos que participan en la

Discusión

heterocromatización, no sea suficiente para reestablecer en mayor medida un estado de la cromatina más relajado.

Otro factor importante a tener en cuenta es la dosis del modificador empleado. El análisis del efecto del potencial modificador se llevó a cabo en los descendientes del cruce entre la cepa GAA-EXP y la cepa portadora de la mutación de pérdida de función del gen modificador. Esto supone que en dicha descendencia la mutación del modificador está en heterocigosis y, por lo tanto, el otro alelo puede expresarse con normalidad. Es posible que la reducción de un 50% de los productos de los genes analizados no haya sido suficiente para identificar un incremento significativo de la actividad luciferasa. En línea con esta propuesta, encontramos que la utilización de dsRNAs contra los genes modificadores da resultados significativos, tanto en el modelo animal como en el modelo celular. En este caso, una mayor reducción de los niveles de expresión de los genes *Su(var)2-5*, *Su(var)2-9* y *Pc* sí tuvo como efecto un aumento significativo de la expresión de la luciferasa.

Ambos modelos con la expansión de repeticiones GAA, el basado en adultos de *Drosophila* y el basado en células S2, podrán ser utilizados de forma conjunta para realizar un rastreo genético, a gran escala, de modificadores de la represión mediada por la expansión patológica del triplete. Con las células S2 se iniciará un rastreo empleando dsRNAs contra prácticamente todos los genes de *D. melanogaster*. Aquellos genes cuya interferencia sea capaz de modificar la actividad del gen reportero *Luc* serán confirmados posteriormente en el modelo de adultos, teniendo la posibilidad de utilizar una mayor variedad de mutantes para cada posible modificador. Los resultados obtenidos en esta tesis hacen posible llevar a cabo este rastreo, ya que se ha completado la obtención del modelo en adultos, se ha generado un modelo celular y se ha validado la utilidad de ambos modelos para dicho rastreo.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. El déficit de frataxina en el modelo de interferencia en *Drosophila* provoca una reducción significativa de la capacidad motora. Este fenotipo es restaurado a niveles similares a las moscas control, tras el tratamiento con compuestos con propiedades antioxidantes y/o neuroprotectoras como curcumina, dexpropamipexol, fenilbutirato y melatonina, así como con los inhibidores del complejo TORC1 rapamicina y temsirolimus.
2. En las moscas del modelo de interferencia de *fh*, el tratamiento con rapamicina incrementa la protección frente al estrés oxidativo endógeno asociado al déficit de frataxina. Esta protección se basa en la inducción de enzimas antioxidantes; al menos en parte controlada por un aumento de la traslocación al núcleo del factor de transcripción Cnc.
3. Bajo la aplicación de un elevado estrés oxidativo externo (hiperoxia), rapamicina disminuye la mortalidad de las moscas modelo e incrementa su actividad aconitasa. Este efecto beneficioso de la rapamicina es mediado por la inducción de autofagia.
4. El aumento de los niveles de ATP tras el tratamiento con rapamicina depende de uno de los efectores del complejo TORC1, la proteína 4E-BP.
5. Las proteínas 4E-BP y S6K, efectores de TORC1, participan en el efecto beneficioso de rapamicina sobre la capacidad motora de las moscas.
6. En *D. melanogaster*, la construcción con el intrón 1 del gen *FXN* portadora de 220 repeticiones GAA, reduce la expresión del gen reportero, luciferasa de luciérnaga, respecto de la misma construcción con 6 repeticiones GAA. Dicha reducción está asociada a una mayor compactación de la cromatina en el promotor, en las regiones adyacentes a las repeticiones y en el gen reportero.
7. La presencia de 220 repeticiones GAA aumenta el grado de compactación de la cromatina del locus contiguo a la construcción, el locus *RFeSP*, disminuyendo la expresión de dicho gen. Estos resultados apoyan la naturaleza expansiva de la represión transcripcional mediada por la expansión de repeticiones de este trinucleótido.

Conclusiones

8. La reducción genética de factores involucrados en las modificaciones de las histonas H3K9me3 y H3K27me3, y en la compactación de la cromatina es capaz de aumentar la expresión del gen reportero precedido de las 220 repeticiones GAA.
9. Los modelos, animal y celular de *D. melanogaster*, obtenidos en esta tesis, constituyen herramientas de trabajo que permiten abordar un rastreo a gran escala de genes modificadores de la represión transcripcional provocada por expansiones GAA y poder avanzar en el conocimiento de los mecanismos implicados.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Material suplementario

Tabla 15. Efecto de los compuestos ensayados sobre la capacidad motora. Los valores representan el efecto de los compuestos en la capacidad motora relativa de los individuos, correspondiendo el 100% a los individuos control en el medio Vehículo. Las diferencias en la capacidad motora se analizaron mediante un test ANOVA de una vía aplicando el test Sidak para comparaciones múltiples a posteriori. Los asteriscos representan la significación estadística de la comparación entre el medio con el compuesto y el medio Vehículo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

	Compuesto	Capacidad motora individuos control (%)	Capacidad motora individuos <i>fhRNAi</i> (%)
Quelantes (Fe, Cu, Zn)	Vehículo	100	73
	BCS	101	103***
	Deferiprona	107	87**
	Dexrazoxano	101	80
	TPEN	93	89*
	TTM	95	90*
	Z. A. dihidrato	100	82
Antioxidantes y/o neuroprotectores	Alfa-tocoferol	106	86
	Alopurinol	101	62
	Celastrol	99	83
	Curcumina	107	101***
	Dalfampridina	98	83
	Dexpramipexol	102	98**
	Dimebon	91	75
	Fenilbutirato de Na	113*	97**
	Idebenona	101	88***
	Melatonina	99	99**
	Metformina	99	88
	Metilcobalamina	99	88
	Olesoxime	116**	89
	Piracetam	101	93*
	Pterostilbeno	90	86
Riluzol	108	87*	
Inhibidores TORC1	Rapamicina	142 ***	100***
	Temsirolimus	129***	106****

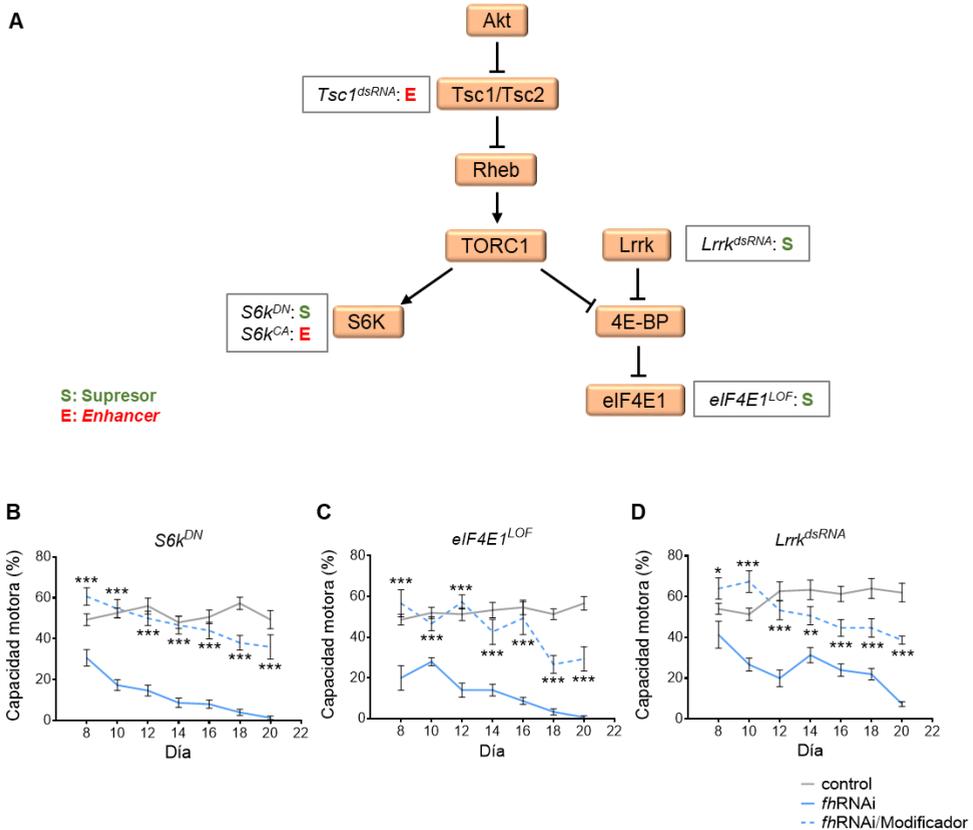


Figura 45. La reducción genética de la señalización de TORC1 mejora la capacidad motora de las moscas deficientes en frataxina. A) Modificadores genéticos de la deficiencia de frataxina identificados en *D. melanogaster* y su posición en la ruta de señalización de TORC1. **B-D)** Mejora de la capacidad motora de los individuos *fhRNAi* por el efecto de un alelo dominante negativo de *S6k* (B), un alelo de pérdida de función de *eIF4E1* (C) y un dsRNA contra *Lrrk* (D). La capacidad motora expresa el porcentaje de individuos que escalaron una altura de 11,5 cm en un tiempo de 16 s. **control:** *w¹¹¹⁸*; *actin-GAL4*. **fhRNAi:** *UAS-fhRNAi*; *actin-GAL4*. **fhRNAi/Modificador:** individuos *fhRNAi* portando el alelo correspondiente del modificador. *eIF4E1^{LOF}*: Alelo de pérdida de función de *eIF4E1*, *Lrrk^{dsRNA}*: dsRNA contra el gen *Lrrk*. *S6k^{DN}*: Alelo de forma dominante negativa de la proteína S6K, *S6k^{CA}*: Alelo de forma constitutivamente activa de la proteína S6K, *Tsc1^{dsRNA}*: dsRNA contra el gen *Tsc1*. Los asteriscos representan la significación estadística de la diferencia en la capacidad motora entre los individuos *fhRNAi* y *fhRNAi/Modificador* para cada día. En B)-D) se empleó un test t de student. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Cepas de partida para la generación del modelo:

Cepa 6GAA o 220GAA(5)	A	$\frac{1}{1}; \frac{UAS - GAA_{6/220} - Luc}{UAS - GAA_{6/220} - Luc}; \frac{3}{3}$
Cepa Luc-Renilla	B	$\frac{1}{1}; \frac{2}{2}; \frac{UAS - RLuc}{UAS - RLuc}$
Cepa α -Tub-GAL4	C	$\frac{\alpha - Tub - GAL4}{\alpha - Tub - GAL4}; \frac{2}{2}; \frac{\alpha - Tub - GAL80}{TM6}$
Cepa equilibradora múltiple (cromosomas 2 y 3)	D	$\frac{1}{1}; \frac{Scu}{CyO}; \frac{MKRS}{TM6}$
Cepa equilibradora cromosoma 1	E	$\frac{FM7}{Y}; \frac{2}{2}; \frac{3}{3}$

Cruces realizados:

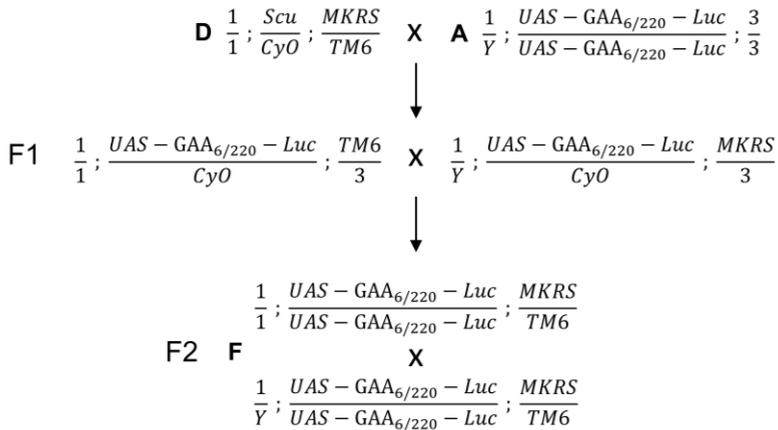


Figura 46. Cruces realizados para la obtención de las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP. Los cruces realizados en el proceso seguido para la obtención de ambas cepas del modelo de repeticiones GAA en *D. melanogaster* fueron idénticos, con la excepción de que en el caso de la cepa GAA-CONTROL se utilizó de partida la cepa 6GAA, y en el caso de la cepa GAA-EXP se utilizó la cepa 220GAA(5). Las cepas de partida para los cruces y los individuos intermedios obtenidos son nombrados con las letras A a K.

Material suplementario

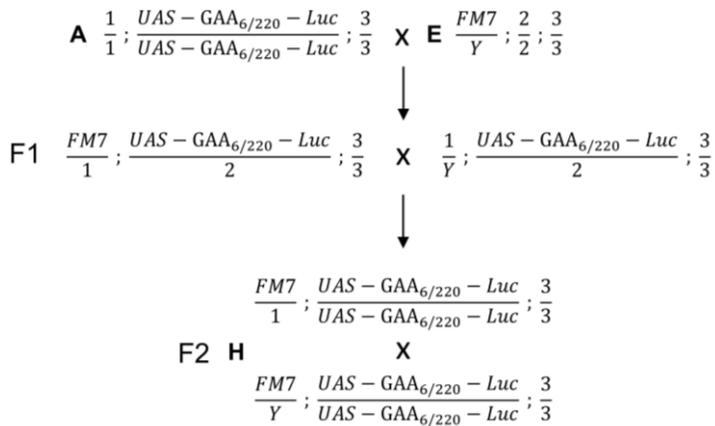
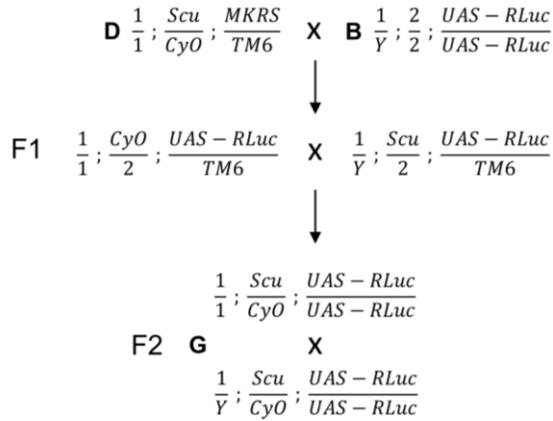


Figura 46. Cruces realizados para la obtención de las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP (Continuación).

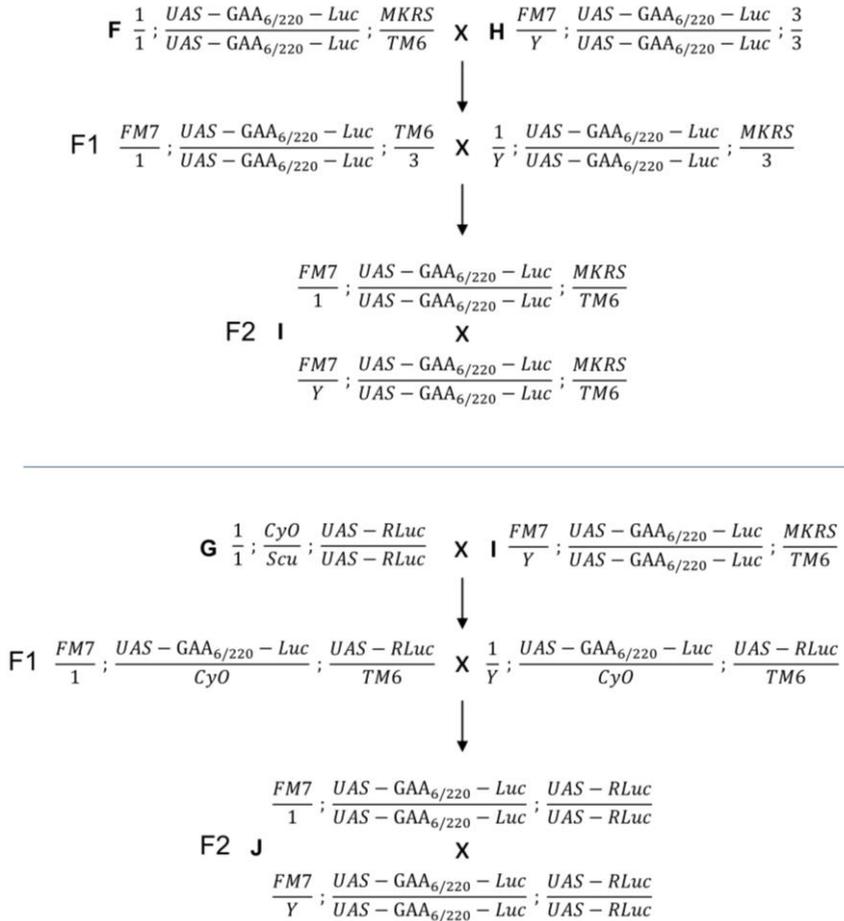


Figura 46. Cruces realizados para la obtención de las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP (Continuación).

Material suplementario

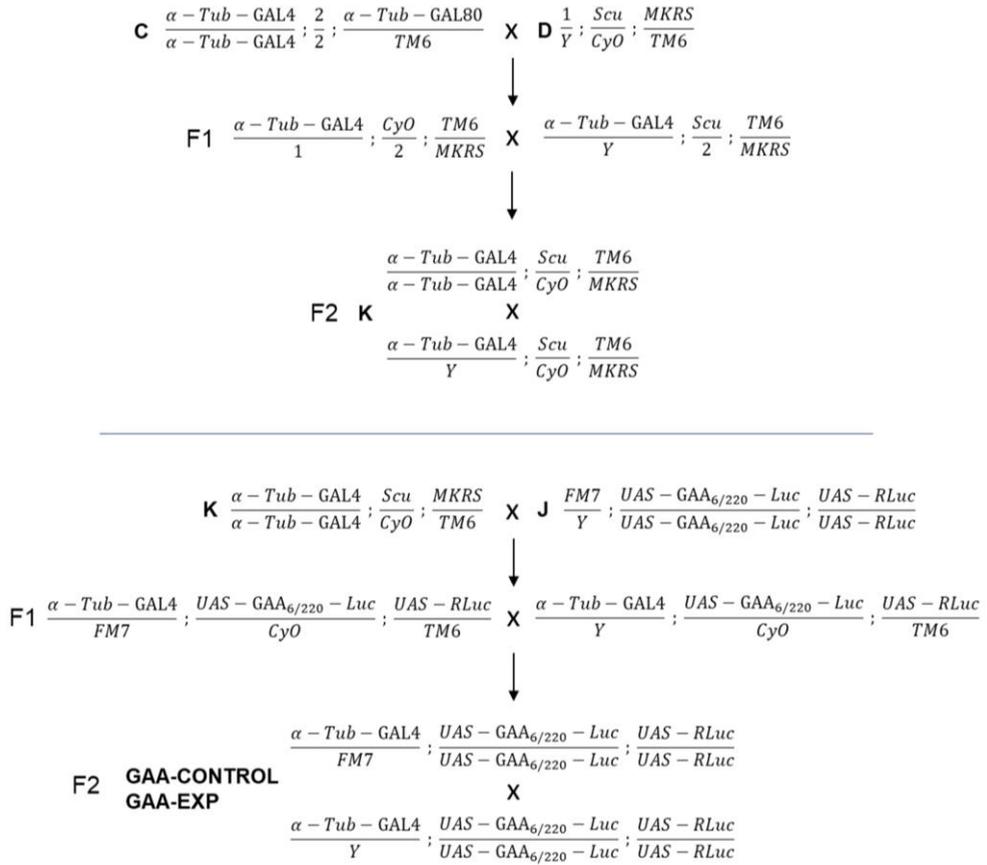


Figura 46. Cruces realizados para la obtención de las cepas GAA-CONTROL y GAA-EXP (Continuación).

Tabla 16. Cruces realizados con las cepas de *D. melanogaster* y descendencia utilizada en el rastreo genético con el modelo de repeticiones GAA

Cruce	Denominación de descendencia	Genotipo
♀ GAA-CONTROL x ♂ <i>yw</i>	GAA-CONTROL/ <i>yw</i>	P{ry+t7.2=hsFLP}1, P{w+mC=tubP-GAL4}1, P{w+mC=UAS-GFP.T:Myc.T:nls2}1, y1 w*/y ¹ w ¹¹¹⁸ ; PBac{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-GAA ₆ -L.luciernaga}VK00037/2; M{ y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-L.Renilla}ZH-68E/3
♀ GAA-CONTROL x ♂ <i>E(z)^{LOF}</i>	GAA-CONTROL/ <i>Modificador (E(z)^{LOF})</i>	P{ry+t7.2=hsFLP}1, P{w+mC=tubP-GAL4}1, P{w+mC=UAS-GFP.T:Myc.T:nls2}1, y1 w*/y*; PBac{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-GAA ₆ -L.luciernaga}VK00037/2; M{ y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-L.Renilla}ZH-68E/E(z) ⁷³¹ P{1xFRT.G}2A
♀ GAA-CONTROL x ♂ <i>HDAC1^{LOF}</i>	GAA-CONTROL/ <i>Modificador (HDAC1^{LOF})</i>	P{ry+t7.2=hsFLP}1, P{w+mC=tubP-GAL4}1, P{w+mC=UAS-GFP.T:Myc.T:nls2}1, y1 w*/1; PBac{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-GAA ₆ -L.luciernaga}VK00037/2; M{ y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-L.Renilla}ZH-68E/P{ry ^{+7.2} =PZ}HDAC1 ⁰⁴⁵⁵⁶ ry[506]
♀ GAA-CONTROL x ♂ <i>Su(var)2-5^{dsRNA}</i>	GAA-CONTROL/ <i>Modificador (Su(var)2-5^{dsRNA})</i>	P{ry+t7.2=hsFLP}1, P{w+mC=tubP-GAL4}1, P{w+mC=UAS-GFP.T:Myc.T:nls2}1, y1 w*/y ¹ sc* v ¹ ; PBac{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-GAA ₆ -L.luciernaga}VK00037/2; M{ y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-L.Renilla}ZH-68E/P{y ^{+7.7} v ^{+1.8} =TRiP.HMS00278}attP2
♀ GAA-CONTROL x ♂ <i>Su(var)2-5^{LOF}</i>	GAA-CONTROL/ <i>Modificador (Su(var)2-5^{LOF})</i>	P{ry+t7.2=hsFLP}1, P{w+mC=tubP-GAL4}1, P{w+mC=UAS-GFP.T:Myc.T:nls2}1, y1 w*/In(1)w ^{m4h} ; PBac{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-GAA ₆ -L.luciernaga}VK00037/Su(var)2-5 ⁵ ; M{ y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-L.Renilla}ZH-68E/3
♀ GAA-CONTROL x ♂ <i>Su(var)3-9^{LOF}</i>	GAA-CONTROL/ <i>Modificador (Su(var)3-9^{LOF})</i>	P{ry+t7.2=hsFLP}1, P{w+mC=tubP-GAL4}1, P{w+mC=UAS-GFP.T:Myc.T:nls2}1, y1 w*/In(1)w ^{m4h} ; PBac{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-GAA ₆ -L.luciernaga}VK00037/2; M{ y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-L.Renilla}ZH-68E/Su(var)3-9 ¹
♀ GAA-EXP x ♂ <i>yw</i>	GAA-EXP/ <i>yw</i>	P{ry+t7.2=hsFLP}1, P{w+mC=tubP-GAL4}1, P{w+mC=UAS-GFP.T:Myc.T:nls2}1, y1 w*/y ¹ w ¹¹¹⁸ ; PBac{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-GAA ₂₂₀ -L.luciernaga}VK00037/2; M{ y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-L.Renilla}ZH-68E/3
♀ GAA-EXP x ♂ <i>E(z)^{LOF}</i>	GAA-EXP/ <i>Modificador (E(z)^{LOF})</i>	P{ry+t7.2=hsFLP}1, P{w+mC=tubP-GAL4}1, P{w+mC=UAS-GFP.T:Myc.T:nls2}1, y1 w*/w*; PBac{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-GAA ₂₂₀ -L.luciernaga}VK00037/2; M{ y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-L.Renilla}ZH-68E/E(z) ⁷³¹ P{1xFRT.G}2A
♀ GAA-EXP x ♂ <i>HDAC1^{LOF}</i>	GAA-EXP/ <i>Modificador (HDAC1^{LOF})</i>	P{ry+t7.2=hsFLP}1, P{w+mC=tubP-GAL4}1, P{w+mC=UAS-GFP.T:Myc.T:nls2}1, y1 w*/1; PBac{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-GAA ₂₂₀ -L.luciernaga}VK00037/2; M{ y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-L.Renilla}ZH-68E/P{ry ^{+7.2} =PZ}HDAC1 ⁰⁴⁵⁵⁶ ry[506]
♀ GAA-EXP x ♂ <i>Su(var)2-5^{dsRNA}</i>	GAA-EXP/ <i>Modificador (Su(var)2-5^{dsRNA})</i>	P{ry+t7.2=hsFLP}1, P{w+mC=tubP-GAL4}1, P{w+mC=UAS-GFP.T:Myc.T:nls2}1, y1 w*/y ¹ sc* v ¹ ; PBac{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-GAA ₂₂₀ -L.luciernaga}VK00037/2; M{ y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-L.Renilla}ZH-68E/P{y ^{+7.7} v ^{+1.8} =TRiP.HMS00278}attP2
♀ GAA-EXP x ♂ <i>Su(var)2-5^{LOF}</i>	GAA-EXP/ <i>Modificador (Su(var)2-5^{LOF})</i>	P{ry+t7.2=hsFLP}1, P{w+mC=tubP-GAL4}1, P{w+mC=UAS-GFP.T:Myc.T:nls2}1, y1 w*/In(1)w ^{m4h} ; PBac{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-GAA ₂₂₀ -L.luciernaga}VK00037/Su(var)2-5 ⁵ ; M{ y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-L.Renilla}ZH-68E/3
♀ GAA-EXP x ♂ <i>Su(var)3-9^{LOF}</i>	GAA-EXP/ <i>Modificador (Su(var)3-9^{LOF})</i>	P{ry+t7.2=hsFLP}1, P{w+mC=tubP-GAL4}1, P{w+mC=UAS-GFP.T:Myc.T:nls2}1, y1 w*/In(1)w ^{m4h} ; PBac{y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-GAA ₂₂₀ -L.luciernaga}VK00037/2; M{ y ⁺ w ^{+mC} =UAS-hsp70-L.Renilla}ZH-68E/Su(var)3-9 ¹

dsRNA: double-strand RNA, *E(z)*: Enhancer of zeste, *HDAC1*: Histone deacetylase 1, *Su(var)2-5*: Suppressor of variegation 205, *Su(var)3-9*: Suppressor of variegation 3-9.

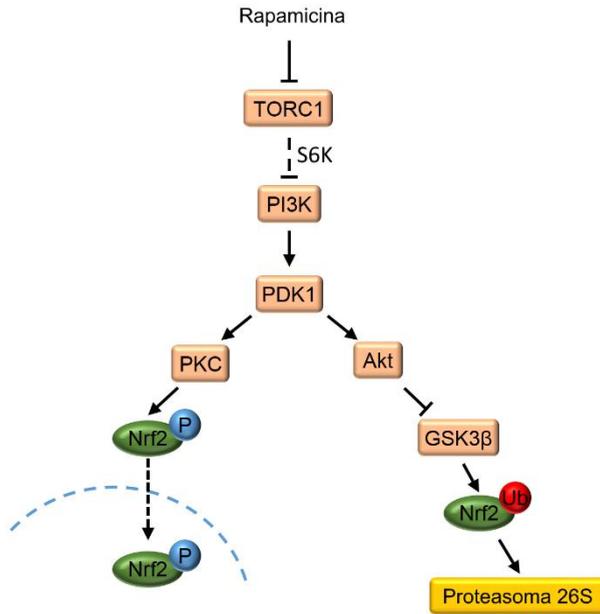


Figura 47. Mecanismos propuestos para el incremento de la actividad de Nrf2 mediante rapamicina. La activación de la PKC y la inhibición de GSK3 β favorecen el incremento de la actividad de Nrf2. Ambos procesos podrían tener lugar por medio de un incremento en la señalización mediada por PI3K, la cual a su vez estaría causada por un bucle de retroalimentación negativa en la señalización de TORC1 en el que participa S6K.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Bidichandani, S. I. & Delatycki, M. B. *Friedreich Ataxia*. GeneReviews® (1993). doi:NBK1281
2. López-Arlandis, J. M., Vílchez, J. J., Palau, F. & Sevilla, T. Friedreich's ataxia: an epidemiological study in Valencia, Spain, based on consanguinity analysis. *Neuroepidemiology* **14**, 14–9 (1995).
3. Chamberlain, S. *et al.* Mapping of mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. *Nature* **334**, 248–50 (1988).
4. Campuzano, V. *et al.* Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* **271**, 1423–7 (1996).
5. Abrahão, A. *et al.* Milestones in Friedreich ataxia: more than a century and still learning. *Neurogenetics* **16**, 151–160 (2015).
6. Schulz, J. B. & Pandolfo, M. 150 years of Friedreich Ataxia: From its discovery to therapy. *J. Neurochem.* **126**, 1–3 (2013).
7. Harding, A. E. Early onset cerebellar ataxia with retained tendon reflexes: a clinical and genetic study of a disorder distinct from Friedreich's ataxia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **44**, 503–8 (1981).
8. Fahey, M. C., Corben, L., Collins, V., Churchyard, a J. & Delatycki, M. B. How is disease progress in Friedreich's ataxia best measured? A study of four rating scales. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **78**, 411–3 (2007).
9. Bürk, K., Schulz, S. R. & Schulz, J. B. Monitoring progression in Friedreich ataxia (FRDA): The use of clinical scales. *J. Neurochem.* **126**, 118–124 (2013).
10. Delatycki, M. B. *et al.* Clinical and genetic study of Friedreich ataxia in an Australian population. *Am. J. Med. Genet.* **87**, 168–174 (1999).
11. Vogel, A. P., Brown, S. E., Folker, J. E., Corben, L. A. & Delatycki, M. B. Dysphagia and swallowing-related quality of life in Friedreich ataxia. *J. Neurol.* **261**, 392–399 (2014).
12. Dutka, D. P., Donnelly, J. E., Nihoyannopoulos, P., Oakley, C. M. & Nunez, D. J. Marked variation in the cardiomyopathy associated with Friedreich's ataxia. *Heart* **81**, 141–147 (1999).
13. Alikashioglu, M. *et al.* Clinical and genetic correlate in childhood onset Friedreich ataxia. *Neuropediatrics* **30**, 72–6 (1999).
14. Leonard, H. Short report: Friedreich's ataxia presenting after cardiac transplantation. *Arch. Dis. Child.* **84**, 167–168 (2001).
15. Quercia, N. *et al.* Friedreich ataxia presenting as sudden cardiac death in childhood: Clinical, genetic and pathological correlation, with implications for genetic testing and counselling. *Neuromuscul. Disord.* **20**, 340–342 (2010).
16. Tsou, A. Y. *et al.* Mortality in Friedreich Ataxia. *J. Neurol. Sci.* **307**, 46–49 (2011).
17. Corben, L. A., Ho, M., Copland, J., Tai, G. & Delatycki, M. B. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in Friedreich ataxia. *Neurology* **81**, 46–51 (2013).
18. Cnop, M., Mulder, H. & Igoillo-Esteve, M. Diabetes in Friedreich ataxia. *J. Neurochem.* **126**, 94–102 (2013).
19. Ristow, M. Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus. *J. Mol. Med. (Berl)*. **82**, 510–529 (2004).
20. Cnop, M. *et al.* Central role and mechanisms of β -cell dysfunction and death in friedreich ataxia-associated diabetes. *Ann. Neurol.* **72**, 971–82 (2012).
21. Dürr, A. *et al.* Clinical and Genetic Abnormalities in Patients with Friedreich's Ataxia. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1169–1175 (1996).
22. Wollmann, T., Barroso, J., Monton, F. & Nieto, A. Neuropsychological test performance of patients with Friedreich's ataxia. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* **24**, 677–686 (2002).
23. Corben, L. A. *et al.* Towards an understanding of cognitive function in Friedreich ataxia. *Brain Res. Bull.* **70**, 197–202 (2006).
24. Klopfer, F. *et al.* The test of everyday attention reveals significant sustained volitional attention and working memory deficits in Friedreich ataxia. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* **17**, 196–200 (2011).
25. Nachbauer, W. *et al.* Friedreich ataxia: executive control is related to disease onset and GAA repeat length. *Cerebellum* **13**, 9–16 (2014).
26. Bidichandani, S. I., Garcia, C. a, Patel, P. I. & Dimachkie, M. M. Very late-onset Friedreich ataxia despite large GAA triplet repeat expansions. *Arch. Neurol.* **57**, 246–251 (2000).
27. Bhidayasiri, R., Perlman, S. L., Pulst, S.-M. & Geschwind, D. H. Late-Onset Friedreich Ataxia. *Arch. Neurol.* **62**, 1865 (2005).
28. Lynch, D. R. *et al.* Measuring Friedreich ataxia performance measures. *Neurology* 1711–1716 (2006).
29. Coppola, G. *et al.* Why do some Friedreich's ataxia patients retain tendon reflexes? A clinical, neurophysiological and molecular study. *J. Neurol.* **246**, 353–357 (1999).
30. Schöls, L. *et al.* Friedreich's ataxia. Revision of

Bibliografía

- the phenotype according to molecular genetics. *Brain* **120** (Pt 1, 2131–40) (1997).
31. Montermini, L. *et al.* Phenotypic variability in friedreich ataxia: Role of the associated GAA triplet repeat expansion. *Ann. Neurol.* **41**, 675–682 (1997).
32. Takai, D. & Jones, P. a. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3740–5 (2002).
33. Cossée, M. *et al.* Evolution of the Friedreich's ataxia trinucleotide repeat expansion: Founder effect and premutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 7452–7457 (1997).
34. Clark, R. M. *et al.* Expansion of GAA triplet repeats in the human genome: Unique origin of the FRDA mutation at the center of an Alu. *Genomics* **83**, 373–383 (2004).
35. González-Cabo, P. *et al.* Incipient GAA repeats in the primate Friedreich ataxia homologous genes. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 880–3 (1999).
36. Justice, C. M. *et al.* Phylogenetic analysis of the Friedreich ataxia GAA trinucleotide repeat. *J. Mol. Evol.* **52**, 232–238 (2001).
37. Monticelli, A. *et al.* New clues on the origin of the Friedreich ataxia expanded alleles from the analysis of new polymorphisms closely linked to the mutation. *Hum. Genet.* **114**, 458–463 (2004).
38. Kumari, D., Biacsi, R. E. & Usdin, K. Repeat expansion affects both transcription initiation and elongation in Friedreich ataxia cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 4209–4215 (2011).
39. Strausberg, R. L. *et al.* Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 16899–903 (2002).
40. Greene, E., Entezam, A., Kumari, D. & Usdin, K. Ancient repeated DNA elements and the regulation of the human frataxin promoter. *Genomics* **85**, 221–230 (2005).
41. Li, K. *et al.* Expression of human frataxin is regulated by transcription factors SRF and TFAP2. *PLoS One* **5**, 1–8 (2010).
42. Knöll, B. & Nordheim, A. Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm. *Trends Neurosci.* **32**, 432–442 (2009).
43. Eckert, D., Buhl, S., Weber, S., Jäger, R. & Schorle, H. The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol.* **6**, 246 (2005).
44. Greene, E., Mahishi, L., Entezam, A., Kumari, D. & Usdin, K. Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res.* **35**, 3383–3390 (2007).
45. Murre, C. *et al.* Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**, 537–44 (1989).
46. Walhout, A. J. M., Gubbels, J. M., Bernards, R., Van Der Vliet, P. C. & Timmers, H. T. M. C-Myc/Max heterodimers bind cooperatively to the E-box sequences located in the first intron of the rat ornithine decarboxylase (ODC) gene. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1493–1501 (1997).
47. De Biase, I., Chutake, Y. K., Rindler, P. M. & Bidichandani, S. I. Epigenetic silencing in Friedreich ataxia is associated with depletion of CTCF (CCCTC-binding factor) and antisense transcription. *PLoS One* **4**, (2009).
48. Yandim, C., Natisvili, T. & Festenstein, R. Gene regulation and epigenetics in Friedreich's ataxia. *J. Neurochem.* **126**, 21–42 (2013).
49. Campuzano, V. *et al.* Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1771–80 (1997).
50. Koutnikova, H. *et al.* Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin. *Nat. Genet.* **16**, 345–351 (1997).
51. Rötig, A. *et al.* Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat. Genet.* **17**, 215–217 (1997).
52. Al-Mahdawi, S. *et al.* GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* **88**, 580–590 (2006).
53. Fleming, J. *et al.* Partial correction of sensitivity to oxidant stress in Friedreich ataxia patient fibroblasts by frataxin-encoding adeno-associated virus and lentivirus vectors. *Hum. Gene Ther.* **16**, 947–956 (2005).
54. Navarro, J. A. *et al.* Overexpression of human and fly frataxins in drosophila provokes deleterious effects at biochemical, physiological and developmental levels. *PLoS One* **6**, 1–10 (2011).
55. Pastore, A. & Puccio, H. Frataxin: A protein in search for a function. *J. Neurochem.* **126**, 43–52 (2013).
56. Rouault, T. a & Tong, W.-H. Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 345–351 (2005).
57. Li, K., Besse, E. K., Ha, D., Kovtunovych, G. & Rouault, T. A. Iron-dependent regulation of frataxin expression: Implications for treatment of Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 2265–2273 (2008).
58. Coppola, G. *et al.* Functional genomic analysis of frataxin deficiency reveals tissue-specific alterations and identifies the PPAR γ pathway as a therapeutic target in Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2452–2461 (2009).

59. Marmolino, D. *et al.* PPAR- γ Agonist Azelaoyl PAF Increases Frataxin Protein and mRNA Expression. New Implications for the Friedreich's Ataxia Therapy. *The Cerebellum* **8**, 98–103 (2009).
60. Wu, Z. *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115–124 (1999).
61. Kelly, D. P. & Scarpulla, R. C. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* **18**, 357–68 (2004).
62. Sugden, M. C., Caton, P. W. & Holness, M. J. PPAR control: it's SIRTainly as easy as PGC. *J. Endocrinol.* **204**, 93–104 (2010).
63. Montermini, L. *et al.* The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: Premutation and normal alleles. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1261–1266 (1997).
64. Sharma, R. *et al.* Friedreich ataxia in carriers of unstable borderline GAA triplet-repeat alleles. *Ann. Neurol.* **56**, 898–901 (2004).
65. Filla, A. *et al.* The Relationship between Trinucleotide (GAA) Repeat Length and Clinical Features in Friedreich Ataxia. *Am. J. Hum. Genet* **59**, 554–560 (1996).
66. Epplen, C. *et al.* Differential stability of the (GAA) $_n$ tract in the Friedreich ataxia (STM7) gene. *Hum. Genet.* **99**, 834–836 (1997).
67. Delatycki, M. B. *et al.* HFE p.C282Y heterozygosity is associated with earlier disease onset in Friedreich ataxia. *Mov. Disord.* **29**, 940–943 (2014).
68. De Biase, I. *et al.* Progressive GAA expansions in dorsal root ganglia of Friedreich's ataxia patients. *Ann. Neurol.* **61**, 55–60 (2007).
69. Monrós, E. *et al.* Phenotype correlation and intergenerational dynamics of the Friedreich ataxia GAA trinucleotide repeat. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 101–110 (1997).
70. Berciano, J. *et al.* Very late-onset Friedreich's ataxia with minimal GAA1 expansion mimicking multiple system atrophy of cerebellar type. *Mov. Disord.* **20**, 1643–1645 (2005).
71. Stolle, C. A. *et al.* Novel, complex interruptions of the GAA repeat in small, expanded alleles of two affected siblings with late-onset Friedreich ataxia. *Mov. Disord.* **23**, 1303–1306 (2008).
72. Bidichandani, S. I., Ashizawa, T. & Patel, P. I. Atypical Friedreich ataxia caused by compound heterozygosity for a novel missense mutation and the GAA triplet-repeat expansion. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 1251–1256 (1997).
73. Cossee, M. *et al.* Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann Neurol* **45**, 200–206 (1999).
74. Zhu, D., Burke, C., Leslie, A. & Nicholson, G. A. Friedreich's ataxia with chorea and myoclonus caused by a compound heterozygosity for a novel deletion and the trinucleotide GAA expansion. *Mov. Disord.* **17**, 585–589 (2002).
75. Spacey, S. D. *et al.* Malaysian siblings with friedreich ataxia and chorea: a novel deletion in the frataxin gene. *Can. J. Neurol. Sci.* **31**, 383–6 (2004).
76. Cossée, M. *et al.* Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1219–1226 (2000).
77. Busi, M. V. *et al.* Deficiency of Arabidopsis thaliana frataxin alters activity of mitochondrial Fe-S proteins and induces oxidative stress. *Plant J.* **48**, 873–882 (2006).
78. Puccio, H. Multicellular models of Friedreich ataxia. *J. Neurol.* **256**, 18–24 (2009).
79. Al-Mahdawi, S. *et al.* GAA repeat instability in Friedreich ataxia YAC transgenic mice. *Genomics* **84**, 301–310 (2004).
80. Clark, R. M. *et al.* The GAA triplet-repeat is unstable in the context of the human FXN locus and displays age-dependent expansions in cerebellum and DRG in a transgenic mouse model. *Hum. Genet.* **120**, 633–640 (2007).
81. Saccà, F. *et al.* A combined nucleic acid and protein analysis in Friedreich ataxia: Implications for diagnosis, pathogenesis and clinical trial design. *PLoS One* **6**, (2011).
82. Punga, T. & Bühler, M. Long intronic GAA repeats causing Friedreich ataxia impede transcription elongation. *EMBO Mol. Med.* **2**, 120–129 (2010).
83. Bidichandani, S. I., Ashizawa, T. & Patel, P. I. The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 111–21 (1998).
84. Kumari, D. & Usdin, K. Is Friedreich ataxia an epigenetic disorder? *Clin. Epigenetics* **4**, 2 (2012).
85. Mariappan, S. V., Catasti, P., Silks, L. a, Bradbury, E. M. & Gupta, G. The high-resolution structure of the triplex formed by the GAA/TTC triplet repeat associated with Friedreich's ataxia. *J. Mol. Biol.* **285**, 2035–52 (1999).
86. Grabczyk, E. & Usdin, K. Alleviating transcript insufficiency caused by Friedreich's ataxia triplet repeats. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4930–4937 (2000).
87. Jain, A., Rajeswari, M. R. & Ahmed, F. Formation and thermodynamic stability of intermolecular (R*R*Y) DNA triplex in GAA/TTC repeats associated with Friedreich's ataxia. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **19**, 691–699 (2002).

Bibliografía

88. Potaman, V. N. *et al.* Length-dependent structure formation in Friedreich ataxia (GAA)_n?(TTC)_n repeats at neutral pH. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1224–1231 (2004).
89. Gacy, A. M. *et al.* GAA instability in Friedreich's Ataxia shares a common, DNA-directed and intraallelic mechanism with other trinucleotide diseases. *Mol. Cell* **1**, 583–93 (1998).
90. Sakamoto, N. *et al.* Sticky DNA: Self-Association Properties of Long GAA•TTC Repeats in R•R•Y Triplex Structures from Friedreich's Ataxia. *Mol. Cell* **3**, 465–475 (1999).
91. Sakamoto, N., Ohshima, K., Montermini, L., Pandolfo, M. & Wells, R. D. Sticky DNA, a Self-associated Complex Formed at Long GAA•TTC Repeats in Intron 1 of the Frataxin Gene, Inhibits Transcription. *J. Biol. Chem.* **276**, 27171–27177 (2001).
92. Suen, I. S. *et al.* Structural properties of Friedreich's ataxia d(GAA) repeats. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1444**, 14–24 (1999).
93. Chou, S. H., Chin, K. H. & Wang, A. H. J. Unusual DNA duplex and hairpin motifs. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2461–2474 (2003).
94. Heidenfelder, B. L., Makhov, A. M. & Topal, M. D. Hairpin formation in Friedreich's ataxia triplet repeat expansion. *J. Biol. Chem.* **278**, 2425–2431 (2003).
95. LeProust, E. M., Pearson, C. E., Sinden, R. R. & Gao, X. Unexpected formation of parallel duplex in GAA and TTC trinucleotide repeats of Friedreich's ataxia. *J Mol Biol* **302**, 1063–1080 (2000).
96. Grabczyk, E. & Usdin, K. The GAA•TTC triplet repeat expanded in Friedreich's ataxia impedes transcription elongation by T7 RNA polymerase in a length and supercoil dependent manner. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2815–2822 (2000).
97. Grabczyk, E., Mancuso, M. & Sammarco, M. C. A persistent RNA•DNA hybrid formed by transcription of the Friedreich ataxia triplet repeat in live bacteria, and by T7 RNAP in vitro. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5351–5359 (2007).
98. Bentin, T., Cherny, D., Larsen, H. J. & Nielsen, P. E. Transcription arrest caused by long nascent RNA chains. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1727**, 97–105 (2005).
99. Tous, C. & Aguilera, A. Impairment of transcription elongation by R-loops in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 428–432 (2007).
100. McIvor, E. I., Polak, U. & Napierala, M. New insights into repeat instability: role of RNA•DNA hybrids. *RNA Biol.* **7**, 551–558 (2010).
101. Saveliev, A., Everett, C., Sharpe, T., Webster, Z. & Festenstein, R. DNA triplet repeats mediate heterochromatin-protein-1-sensitive variegated gene silencing. *Nature* **422**, 909–913 (2003).
102. Lorincz, M. C., Dickerson, D. R., Schmitt, M. & Groudine, M. Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1068–1075 (2004).
103. Kriaucionis, S. & Heintz, N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* **324**, 929–30 (2009).
104. Tahiliani, M. *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science (80-.)*. **324**, 930–5 (2009).
105. Szulwach, K. E. *et al.* 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci* **14**, 1607–1616 (2011).
106. Al-Mahdawi, S. *et al.* The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 735–746 (2008).
107. Castaldo, I. *et al.* DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich ataxia patients. *J. Med. Genet.* **45**, 808–12 (2008).
108. Al-Mahdawi, S., Sandi, C., Mouro Pinto, R. & Pook, M. A. Friedreich Ataxia Patient Tissues Exhibit Increased 5-Hydroxymethylcytosine Modification and Decreased CTCF Binding at the FXN Locus. *PLoS One* **8**, 1–8 (2013).
109. Kourmouli, N. *et al.* Heterochromatin and trimethylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J. Cell Sci.* **117**, 2491–501 (2004).
110. Martin, C. & Zhang, Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 838–849 (2005).
111. Jenuwein, T. The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS J.* **273**, 3121–3135 (2006).
112. Sandi, C., Al-Mahdawi, S. & Pook, M. a. Epigenetics in Friedreich's Ataxia: Challenges and Opportunities for Therapy. *Genet. Res. Int.* **2013**, 852080 (2013).
113. Kim, E., Napierala, M. & Dent, S. Y. R. Hyperexpansion of GAA repeats affects post-initiation steps of FXN transcription in Friedreich's ataxia. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8366–8377 (2011).
114. Holwerda, S. J. B. & de Laat, W. CTCF: the protein, the binding partners, the binding sites and their chromatin loops. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120369 (2013).
115. Sandi, C. *et al.* Generation and characterisation

- of Friedreich ataxia YG8R mouse fibroblast and neural stem cell models. *PLoS One* **9**, e89488 (2014).
116. Sandi, C., Sandi, M., Virmouni, S. A., Al-Mahdawi, S. & Pook, M. A. Epigenetic-based therapies for Friedreich ataxia. *Front. Genet.* **5**, 1–12 (2014).
117. Bencze, K. Z. *et al.* The Structure and Function of Frataxin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 269–291 (2006).
118. Foury, F., Pastore, A. & Trincal, M. Acidic residues of yeast frataxin have an essential role in Fe-S cluster assembly. *EMBO Rep.* **8**, 194–9 (2007).
119. Condò, I. *et al.* In vivo maturation of human frataxin. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 1534–40 (2007).
120. Schmucker, S., Argentini, M., Carelle-Calmels, N., Martelli, A. & Puccio, H. The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3521–31 (2008).
121. Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y. I., Ristow, M. & Shoelson, S. E. Crystal structure of human frataxin. *J. Biol. Chem.* **275**, 30753–6 (2000).
122. Martelli, A. & Puccio, H. Dysregulation of cellular iron metabolism in Friedreich ataxia: from primary iron-sulfur cluster deficit to mitochondrial iron accumulation. *Front. Pharmacol.* **5**, 130 (2014).
123. Adamec, J. *et al.* Iron-dependent self-assembly of recombinant yeast frataxin: implications for Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 549–62 (2000).
124. Gakh, O. *et al.* Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein. *Biochemistry* **41**, 6798–804 (2002).
125. Layer, G., Ollagnier-de Choudens, S., Sanakis, Y. & Fontecave, M. Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of *Escherichia coli* CYaY as an iron donor for the assembly of [2Fe-2S] clusters in the scaffold IscU. *J. Biol. Chem.* **281**, 16256–63 (2006).
126. Adinolfi, S. *et al.* Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 390–6 (2009).
127. Cavadini, P., O'Neill, H. A., Benada, O. & Isaya, G. Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 217–27 (2002).
128. Satak, R. *et al.* Human mitochondrial ferritin improves respiratory function in yeast mutants deficient in iron-sulfur cluster biogenesis, but is not a functional homologue of yeast frataxin. *Microbiologyopen* **1**, 95–104 (2012).
129. Adinolfi, S., Trifuoggi, M., Politou, A. S., Martin, S. & Pastore, A. A structural approach to understanding the iron-binding properties of phylogenetically different frataxins. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1865–77 (2002).
130. Aloria, K., Schilke, B., Andrew, A. & Craig, E. A. Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo. *EMBO Rep.* **5**, 1096–101 (2004).
131. O'Neill, H. A., Gakh, O. & Isaya, G. Supramolecular assemblies of human frataxin are formed via subunit-subunit interactions mediated by a non-conserved amino-terminal region. *J. Mol. Biol.* **345**, 433–9 (2005).
132. Prisci, F., Giannini, C., Adinolfi, S. & Pastore, A. The N-terminus of mature human frataxin is intrinsically unfolded. *FEBS J.* **276**, 6669–76 (2009).
133. Schmucker, S. *et al.* Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISC/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. *PLoS One* **6**, e16199 (2011).
134. Babcock, M. *et al.* Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* **276**, 1709–12 (1997).
135. Chiang, S. *et al.* Frataxin and the molecular mechanism of mitochondrial iron-loading in Friedreich's ataxia. *Clin. Sci. (Lond)*. **130**, 853–70 (2016).
136. Gerber, J., Mühlenhoff, U. & Lill, R. An interaction between frataxin and Isu1/Nfs1 that is crucial for Fe/S cluster synthesis on Isu1. *EMBO Rep.* **4**, 906–11 (2003).
137. Bulteau, A.-L. *et al.* Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* **305**, 242–5 (2004).
138. Yoon, T. & Cowan, J. A. Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6078–84 (2003).
139. Bencze, K. Z. *et al.* Human frataxin: iron and ferrocyclase binding surface. *Chem. Commun. (Camb)*. 1798–800 (2007). doi:10.1039/b703195e
140. González-Cabo, P., Vázquez-Manrique, R. P., García-Gimeno, M. A., Sanz, P. & Palau, F. Frataxin interacts functionally with mitochondrial electron transport chain proteins. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2091–8 (2005).
141. Lill, R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**, 831–8 (2009).
142. Beilschmidt, L. K. & Puccio, H. M. Mammalian Fe-S cluster biogenesis and its implication in disease. *Biochimie* **100**, 48–60 (2014).
143. Colin, F. *et al.* Mammalian frataxin controls sulfur production and iron entry during de novo Fe4S4 cluster assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 733–40 (2013).

Bibliografía

144. Tsai, C.-L. & Barondeau, D. P. Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* **49**, 9132–9 (2010).
145. Pandey, A. *et al.* Frataxin directly stimulates mitochondrial cysteine desulfurase by exposing substrate-binding sites, and a mutant Fe-S cluster scaffold protein with frataxin-bypassing ability acts similarly. *J. Biol. Chem.* **288**, 36773–86 (2013).
146. Blanc, B., Gerez, C. & Ollagnier de Choudens, S. Assembly of Fe/S proteins in bacterial systems: Biochemistry of the bacterial ISC system. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**, 1436–47 (2015).
147. Rouault, T. A. & Maio, N. Biogenesis and functions of mammalian iron-sulfur proteins in the regulation of iron homeostasis and pivotal metabolic pathways. *J. Biol. Chem.* **292**, 12744–12753 (2017).
148. Martínez-Pastor, M. T., Perea-García, A. & Puig, S. Mechanisms of iron sensing and regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 75 (2017).
149. Marelja, Z., Leimkühler, S. & Missirlis, F. Iron Sulfur and Molybdenum Cofactor Enzymes Regulate the *Drosophila* Life Cycle by Controlling Cell Metabolism. *Front. Physiol.* **9**, 50 (2018).
150. Kispal, G., Csere, P., Guiard, B. & Lill, R. The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett.* **418**, 346–50 (1997).
151. Garland, S. A., Hoff, K., Vickery, L. E. & Culotta, V. C. *Saccharomyces cerevisiae* ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *J. Mol. Biol.* **294**, 897–907 (1999).
152. Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H. & Craig, E. Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10206–11 (1999).
153. Lange, H., Kaut, A., Kispal, G. & Lill, R. A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1050–5 (2000).
154. Voisine, C. *et al.* Jac1, a mitochondrial J-type chaperone, is involved in the biogenesis of Fe/S clusters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1483–8 (2001).
155. Santos, R. *et al.* Friedreich ataxia: molecular mechanisms, redox considerations, and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 651–90 (2010).
156. Armstrong, J. S., Khmour, O. & Hecht, S. M. Does oxidative stress contribute to the pathology of Friedreich's ataxia? A radical question. *FASEB J.* **24**, 2152–63 (2010).
157. Lefevre, S. *et al.* Apn1 AP-endonuclease is essential for the repair of oxidatively damaged DNA bases in yeast frataxin-deficient cells. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 4060–72 (2012).
158. Shan, Y. *et al.* Frataxin deficiency leads to defects in expression of antioxidants and Nrf2 expression in dorsal root ganglia of the Friedreich's ataxia YG8R mouse model. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 1481–93 (2013).
159. Seguin, A. *et al.* Overexpression of the yeast frataxin homolog (Yfh1): contrasting effects on iron-sulfur cluster assembly, heme synthesis and resistance to oxidative stress. *Mitochondrion* **9**, 130–8 (2009).
160. Napoli, E., Taroni, F. & Cortopassi, G. A. Frataxin, iron-sulfur clusters, heme, ROS, and aging. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 506–16 (2006).
161. Irazusta, V., Cabisco, E., Reverter-Branchat, G., Ros, J. & Tamarit, J. Manganese is the link between frataxin and iron-sulfur deficiency in the yeast model of Friedreich ataxia. *J. Biol. Chem.* **281**, 12227–12232 (2006).
162. Santos, M. M., Ohshima, K. & Pandolfo, M. Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1935–44 (2001).
163. Anderson, P. R., Kirby, K., Orr, W. C., Hilliker, A. J. & Phillips, J. P. Hydrogen peroxide scavenging rescues frataxin deficiency in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 611–6 (2008).
164. Paupé, V. *et al.* Impaired nuclear Nrf2 translocation undermines the oxidative stress response in Friedreich ataxia. *PLoS One* **4**, e4253 (2009).
165. Lefevre, S. *et al.* The yeast metacaspase is implicated in oxidative stress response in frataxin-deficient cells. *FEBS Lett.* **586**, 143–8 (2012).
166. Santos, R. *et al.* *Candida albicans* lacking the frataxin homologue: a relevant yeast model for studying the role of frataxin. *Mol. Microbiol.* **54**, 507–19 (2004).
167. Vázquez-Manrique, R. P. *et al.* Reduction of *Caenorhabditis elegans* frataxin increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan, and causes lethality in a mitochondrial complex II mutant. *FASEB J.* **20**, 172–4 (2006).
168. Llorens, J. V. *et al.* Causative role of oxidative stress in a *Drosophila* model of Friedreich ataxia. *FASEB J.* **21**, 333–344 (2007).
169. Runko, A. P., Griswold, A. J. & Min, K.-T. Overexpression of frataxin in the mitochondria increases resistance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *FEBS Lett.* **582**, 715–9 (2008).

170. Tozzi, G. Antioxidant enzymes in blood of patients with Friedreich's ataxia. *Arch. Dis. Child.* **86**, 376–379 (2002).
171. Wong, A. *et al.* The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 425–30 (1999).
172. Muthuswamy, S. & Agarwal, S. Friedreich Ataxia: From the Eye of a Molecular Biologist. *Neurologist* **20**, 51–5 (2015).
173. Calabrese, V. *et al.* Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J. Neurol. Sci.* **233**, 145–62 (2005).
174. Linseman, K. L., Larson, P., Braugher, J. M. & McCall, J. M. Iron-initiated tissue oxidation: lipid peroxidation, vitamin E destruction and protein thiol oxidation. Inhibition by a novel antioxidant, U-78517F. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 1477–82 (1993).
175. Jiralerspong, S., Ge, B., Hudson, T. J. & Pandolfo, M. Manganese superoxide dismutase induction by iron is impaired in Friedreich ataxia cells. *FEBS Lett.* **509**, 101–5 (2001).
176. Chantrel-Groussard, K. *et al.* Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2061–7 (2001).
177. Pandolfo, M. Friedreich ataxia: The clinical picture. *J. Neurol.* **256**, 3–8 (2009).
178. Piemonte, F. *et al.* Glutathione in blood of patients with Friedreich's ataxia. *Eur. J. Clin. Invest.* **31**, 1007–11 (2001).
179. Auchère, F., Santos, R., Planamente, S., Lesuisse, E. & Camadro, J. M. Glutathione-dependent redox status of frataxin-deficient cells in a yeast model of Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 2790–2802 (2008).
180. Pastore, A. *et al.* Actin Glutathionylation Increases in Fibroblasts of Patients with Friedreich's Ataxia: A potential role in the pathogenesis of the disease. *J. Biol. Chem.* **278**, 42588–42595 (2003).
181. Bulteau, A. L. *et al.* Changes in mitochondrial glutathione levels and protein thiol oxidation in $\Delta yfh1$ yeast cells and the lymphoblasts of patients with Friedreich's ataxia. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 212–25 (2012).
182. Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C. B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **284**, 13291–5 (2009).
183. Gomes, C. M. & Santos, R. Neurodegeneration in Friedreich's Ataxia: From Defective Frataxin to Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 1–10 (2013).
184. Parkinson, M. H., Schulz, J. B. & Giunti, P. Co-enzyme Q 10 and idebenone use in Friedreich's ataxia. *J. Neurochem.* **126**, 125–141 (2013).
185. Lodi, R. *et al.* Antioxidant treatment improves in vivo cardiac and skeletal muscle bioenergetics in patients with Friedreich's ataxia. *Ann. Neurol.* **49**, 590–596 (2001).
186. Hart, P. E. *et al.* Antioxidant treatment of patients with Friedreich ataxia: four-year follow-up. *Arch. Neurol.* **62**, 621–6 (2005).
187. Suno, M. & Nagaoka, A. Inhibition of lipid peroxidation by a novel compound, idebenone (CV-2619). *Jpn. J. Pharmacol.* **35**, 196–8 (1984).
188. Hausse, A. O. *et al.* Idebenone and reduced cardiac hypertrophy in Friedreich's ataxia. *Heart* **87**, 346–9 (2002).
189. Buysse, G. *et al.* Idebenone treatment in Friedreich's ataxia: neurological, cardiac, and biochemical monitoring. *Neurology* **60**, 1679–81 (2003).
190. Giovanni, D. S., Valeria, P., Bahaa, F. & Majid, A. F. Monitoring cardiac function during idebenone therapy in Friedreich's ataxia. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 479–83 (2015).
191. Pandolfo, M. & Hausmann, L. Deferiprone for the treatment of Friedreich's ataxia. *J. Neurochem.* **126 Suppl**, 142–6 (2013).
192. Boddaert, N. *et al.* Selective iron chelation in Friedreich ataxia: biologic and clinical implications. *Blood* **110**, 401–8 (2007).
193. Boesch, S. *et al.* Friedreich's ataxia: clinical pilot trial with recombinant human erythropoietin. *Ann. Neurol.* **62**, 521–4 (2007).
194. Boesch, S. *et al.* Neurological effects of recombinant human erythropoietin in Friedreich's ataxia: a clinical pilot trial. *Mov. Disord.* **23**, 1940–4 (2008).
195. Sturm, B. *et al.* Carbamylated erythropoietin increases frataxin independent from the erythropoietin receptor. *Eur. J. Clin. Invest.* **40**, 561–5 (2010).
196. Boesch, S. *et al.* Safety and tolerability of carbamylated erythropoietin in Friedreich's ataxia. *Mov. Disord.* **29**, 935–9 (2014).
197. Tomassini, B. *et al.* Interferon gamma upregulates frataxin and corrects the functional deficits in a Friedreich ataxia model. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 2855–61 (2012).
198. Vyas, P. M. *et al.* A TAT-frataxin fusion protein increases lifespan and cardiac function in a conditional Friedreich's ataxia mouse model. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1230–47 (2012).
199. Li, L. *et al.* Pharmacological screening using an FXN-EGFP cellular genomic reporter assay for the therapy of Friedreich ataxia. *PLoS One* **8**, e55940 (2013).
200. Marmolino, D. *et al.* PPAR-gamma agonist

Bibliografía

- Azelaoyl PAF increases frataxin protein and mRNA expression: new implications for the Friedreich's ataxia therapy. *Cerebellum* **8**, 98–103 (2009).
201. Marmolino, D. *et al.* PGC-1 α down-regulation affects the antioxidant response in Friedreich's ataxia. *PLoS One* **5**, e10025 (2010).
202. Butler, R. & Bates, G. P. Histone deacetylase inhibitors as therapeutics for polyglutamine disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 784–96 (2006).
203. Herman, D. *et al.* Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 551–8 (2006).
204. Chou, C. J., Herman, D. & Gottesfeld, J. M. Pimelic diphenylamide 106 is a slow, tight-binding inhibitor of class I histone deacetylases. *J. Biol. Chem.* **283**, 35402–9 (2008).
205. Xu, C. *et al.* Chemical probes identify a role for histone deacetylase 3 in Friedreich's ataxia gene silencing. *Chem. Biol.* **16**, 980–9 (2009).
206. Rai, M. *et al.* HDAC inhibitors correct frataxin deficiency in a Friedreich ataxia mouse model. *PLoS One* **3**, e1958 (2008).
207. Chan, P. K. *et al.* Heterochromatinization induced by GAA-repeat hyperexpansion in Friedreich's ataxia can be reduced upon HDAC inhibition by vitamin B3. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 2662–75 (2013).
208. Libri, V. *et al.* Epigenetic and neurological effects and safety of high-dose nicotinamide in patients with Friedreich's ataxia: an exploratory, open-label, dose-escalation study. *Lancet (London, England)* **384**, 504–13 (2014).
209. Subramanian, S., Bates, S. E., Wright, J. J., Espinoza-Delgado, I. & Piekarz, R. L. Clinical Toxicities of Histone Deacetylase Inhibitors. *Pharmaceuticals (Basel)*. **3**, 2751–2767 (2010).
210. Segura, M. M., Mangion, M., Gaillet, B. & Garnier, A. New developments in lentiviral vector design, production and purification. *Expert Opin. Biol. Ther.* **13**, 987–1011 (2013).
211. Fleming, J. *et al.* Partial correction of sensitivity to oxidant stress in Friedreich ataxia patient fibroblasts by frataxin-encoding adeno-associated virus and lentivirus vectors. *Hum. Gene Ther.* **16**, 947–56 (2005).
212. Choi, V. W., McCarty, D. M. & Samulski, R. J. AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr. Gene Ther.* **5**, 299–310 (2005).
213. Perdomini, M. *et al.* Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich's ataxia. *Nat. Med.* **20**, 542–7 (2014).
214. Lim, F. *et al.* Functional recovery in a Friedreich's ataxia mouse model by frataxin gene transfer using an HSV-1 amplicon vector. *Mol. Ther.* **15**, 1072–8 (2007).
215. Gimenez-Cassina, A. *et al.* Infectious delivery and long-term persistence of transgene expression in the brain by a 135-kb iBAC-FXN genomic DNA expression vector. *Gene Ther.* **18**, 1015–9 (2011).
216. Pérez-Luz, S., Gimenez-Cassina, A., Fernández-Frías, I., Wade-Martins, R. & Díaz-Nido, J. Delivery of the 135 kb human frataxin genomic DNA locus gives rise to different frataxin isoforms. *Genomics* **106**, 76–82 (2015).
217. Cossée, M. *et al.* Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1219–26 (2000).
218. McLellan, M. A., Rosenthal, N. A. & Pinto, A. R. Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **7**, 1–12 (2017).
219. Puccio, H. *et al.* Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat. Genet.* **27**, 181–6 (2001).
220. Simon, D. *et al.* Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* **24**, 1987–95 (2004).
221. Ristow, M. *et al.* Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of beta cell mass. *J. Clin. Invest.* **112**, 527–34 (2003).
222. Thierbach, R. *et al.* Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3857–64 (2005).
223. Miranda, C. J. *et al.* Frataxin knockin mouse. *FEBS Lett.* **512**, 291–7 (2002).
224. Al-Mahdawi, S. *et al.* GAA repeat instability in Friedreich ataxia YAC transgenic mice. *Genomics* **84**, 301–10 (2004).
225. Al-Mahdawi, S. *et al.* GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics* **88**, 580–90 (2006).
226. Anjomani Virmouni, S. *et al.* A novel GAA-repeat-expansion-based mouse model of Friedreich's ataxia. *Dis. Model. Mech.* **8**, 225–35 (2015).
227. Chandran, V. *et al.* Inducible and reversible phenotypes in a novel mouse model of Friedreich's Ataxia. *Elife* **6**, (2017).
228. Cañizares, J. *et al.* *dfh* is a Drosophila homolog of the Friedreich's ataxia disease gene. *Gene*

- 256, 35–42 (2000).
229. Kondapalli, K. C., Kok, N. M., Dancis, A. & Stemmler, T. L. Drosophila frataxin: an iron chaperone during cellular Fe-S cluster bioassembly. *Biochemistry* **47**, 6917–27 (2008).
230. Calap-Quintana, P. *et al.* Drosophila melanogaster Models of Friedreich's Ataxia. *Biomed Res. Int.* **2018**, 1–20 (2018).
231. Kennerdell, J. R. & Carthew, R. W. Heritable gene silencing in Drosophila using double-stranded RNA. *Nat. Biotechnol.* **18**, 896–8 (2000).
232. Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–15 (1993).
233. Anderson, P. R., Kirby, K., Hilliker, A. J. & Phillips, J. P. RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in Drosophila. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 3397–405 (2005).
234. Tricoire, H., Palandri, A., Bourdais, A., Camadro, J.-M. & Monnier, V. Methylene blue rescues heart defects in a Drosophila model of Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 968–79 (2014).
235. Shidara, Y. & Hollenbeck, P. J. Defects in mitochondrial axonal transport and membrane potential without increased reactive oxygen species production in a Drosophila model of Friedreich ataxia. *J. Neurosci.* **30**, 11369–78 (2010).
236. González-Cabo, P. & Palau, F. Mitochondrial pathophysiology in Friedreich's ataxia. *J. Neurochem.* **126 Suppl.**, 53–64 (2013).
237. Chen, K. *et al.* Loss of Frataxin induces iron toxicity, sphingolipid synthesis, and Pdk1/Mef2 activation, leading to neurodegeneration. *Elife* **5**, (2016).
238. Soriano, S. *et al.* Deferiprone and idebenone rescue frataxin depletion phenotypes in a Drosophila model of Friedreich's ataxia. *Gene* **521**, 274–81 (2013).
239. Bradley, J. L. *et al.* Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 275–82 (2000).
240. Whitnall, M. *et al.* Identification of nonferritin mitochondrial iron deposits in a mouse model of Friedreich ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 20590–5 (2012).
241. Chen, K. *et al.* Loss of Frataxin activates the iron/sphingolipid/PDK1/Mef2 pathway in mammals. *Elife* **5**, (2016).
242. Navarro, J. A., Botella, J. A., Metzendorf, C., Lind, M. I. & Schneuwly, S. Mitoferrin modulates iron toxicity in a Drosophila model of Friedreich's ataxia. *Free Radic. Biol. Med.* **85**, 71–82 (2015).
243. Soriano, S. *et al.* Metal Homeostasis Regulators Suppress FRDA Phenotypes in a Drosophila Model of the Disease. *PLoS One* **11**, e0159209 (2016).
244. Vaubel, R. A. & Isaya, G. Iron-sulfur cluster synthesis, iron homeostasis and oxidative stress in Friedreich ataxia. *Mol. Cell. Neurosci.* **55**, 50–61 (2013).
245. Bulteau, A.-L. *et al.* Oxidative stress and protease dysfunction in the yeast model of Friedreich ataxia. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1561–70 (2007).
246. Condò, I., Ventura, N., Malisan, F., Tomassini, B. & Testi, R. A pool of extramitochondrial frataxin that promotes cell survival. *J. Biol. Chem.* **281**, 16750–6 (2006).
247. Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., Cabiscol, E., Ros, J. & Tamarit, J. Major targets of iron-induced protein oxidative damage in frataxin-deficient yeasts are magnesium-binding proteins. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1712–23 (2008).
248. Rustin, P. *et al.* Effect of idebenone on cardiomyopathy in Friedreich's ataxia: a preliminary study. *Lancet (London, England)* **354**, 477–9 (1999).
249. Anderson, P. R., Kirby, K., Orr, W. C., Hilliker, A. J. & Phillips, J. P. Hydrogen peroxide scavenging rescues frataxin deficiency in a Drosophila model of Friedreich's ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 611–6 (2008).
250. Navarro, J. A. *et al.* Altered lipid metabolism in a Drosophila model of Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2828–40 (2010).
251. Abeti, R. *et al.* Targeting lipid peroxidation and mitochondrial imbalance in Friedreich's ataxia. *Pharmacol. Res.* **99**, 344–50 (2015).
252. Bridwell-Rabb, J., Fox, N. G., Tsai, C.-L., Winn, A. M. & Barondeau, D. P. Human frataxin activates Fe-S cluster biosynthesis by facilitating sulfur transfer chemistry. *Biochemistry* **53**, 4904–13 (2014).
253. Martelli, A. *et al.* Clinical data and characterization of the liver conditional mouse model exclude neoplasia as a non-neurological manifestation associated with Friedreich's ataxia. *Dis. Model. Mech.* **5**, 860–9 (2012).
254. Worth, A. J. *et al.* Stable isotopes and LC-MS for monitoring metabolic disturbances in Friedreich's ataxia platelets. *Bioanalysis* **7**, 1843–55 (2015).
255. Aramburu, J., Ortells, M. C., Tejedor, S., Buxadé, M. & López-Rodríguez, C. Transcriptional regulation of the stress response by mTOR. *Sci. Signal.* **7**, re2 (2014).
256. Fingar, D. C. *et al.* mTOR Controls Cell Cycle Progression through Its Cell Growth Effectors S6K1 and 4E-BP1 / Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E mTOR Controls Cell Cycle

Bibliografía

- Progression through Its Cell Growth Effectors S6K1 and 4E-BP1 / Eukaryotic Translation Initiation. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 200–216 (2004).
257. Dibble, C. C. & Manning, B. D. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat. Cell Biol.* **15**, 555–64 (2013).
258. Kim, D. H. *et al.* mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**, 163–175 (2002).
259. Laplante, M. & Sabatini, D. M. MTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274–293 (2012).
260. Jacinto, E. *et al.* Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1122–1128 (2004).
261. Jacinto, E. *et al.* SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell* **127**, 125–137 (2006).
262. Pearce, L. R. *et al.* Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem. J.* **405**, 513–22 (2007).
263. Lipton, J. O. & Sahin, M. The Neurology of mTOR. *Neuron* **84**, 275–291 (2014).
264. Caron, E. *et al.* A comprehensive map of the mTOR signaling network. *Mol. Syst. Biol.* **6**, 453 (2010).
265. Corradetti, M. N. & Guan, K.-L. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene* **25**, 6347–6360 (2006).
266. Reiling, J. H. & Sabatini, D. M. Stress and mTOR signaling. *Oncogene* **25**, 6373–83 (2006).
267. Sengupta, S., Peterson, T. R. & Sabatini, D. M. Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. *Mol. Cell* **40**, 310–322 (2010).
268. Hung, C. M., Garcia-Haro, L., Sparks, C. A. & Guertin, D. A. mTOR-dependent cell survival mechanisms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, 1–18 (2012).
269. Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. & Guan, K.-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* **4**, 648–57 (2002).
270. Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J. & Cantley, L. C. Identification of the Tuberous Sclerosis Complex-2 Tumor Suppressor Gene Product Tuberin as a Target of the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathway. *Mol. Cell* **10**, 151–162 (2002).
271. Potter, C. J., Pedraza, L. G. & Xu, T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat. Cell Biol.* **4**, 658–65 (2002).
272. Inoki, K., Li, Y., Xu, T. & Guan, K. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* **17**, 1829–1834 (2003).
273. Tee, A. R., Manning, B. D., Roux, P. P., Cantley, L. C. & Blenis, J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr. Biol.* **13**, 1259–68 (2003).
274. Benvenuto, G. *et al.* The tuberous sclerosis-1 (TSC1) gene product hamartin suppresses cell growth and augments the expression of the TSC2 product tuberin by inhibiting its ubiquitination. *Oncogene* **19**, 6306–6316 (2000).
275. Chong-Kopera, H. *et al.* TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* **281**, 8313–8316 (2006).
276. Dibble, C. C. *et al.* TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1. *Mol. Cell* **47**, 535–546 (2012).
277. Menon, S. *et al.* Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mtorc1 at the lysosome. *Cell* **156**, 1771–1785 (2014).
278. Saucedo, L. J. *et al.* Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat. Cell Biol.* **5**, 566–571 (2003).
279. Stocker, H. *et al.* Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* **5**, 559–65 (2003).
280. Sancak, Y. *et al.* PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Mol. Cell* **25**, 903–915 (2007).
281. Vander Haar, E., Lee, S.-I., Bandhakavi, S., Griffin, T. J. & Kim, D.-H. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol.* **9**, 316–23 (2007).
282. Thedieck, K. *et al.* PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS One* **2**, (2007).
283. Wang, L., Harris, T. E., Roth, R. A. & Lawrence, J. C. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J. Biol. Chem.* **282**, 20036–20044 (2007).
284. Roux, P. P., Ballif, B. A., Anjum, R., Gygi, S. P. & Blenis, J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13489–94 (2004).
285. Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Pandolfi, P. P. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk: Implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* **121**, 179–193 (2005).

286. Lipton, J. O. & Sahin, M. The Neurology of mTOR. *Neuron* **84**, 275–291 (2014).
287. Jewell, J. L., Russell, R. C. & Guan, K.-L. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 133–9 (2013).
288. Bar-Peled, L. & Sabatini, D. M. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol.* **24**, 400–406 (2014).
289. Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P. & Guan, K.-L. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* **10**, 935–45 (2008).
290. Sancak, Y. *et al.* The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* **320**, 1496–501 (2008).
291. Sekiguchi, T., Hirose, E., Nakashima, N., Ii, M. & Nishimoto, T. Novel G Proteins, Rag C and Rag D, Interact with GTP-binding Proteins, Rag A and Rag B. *J. Biol. Chem.* **276**, 7246–7257 (2001).
292. Sancak, Y. *et al.* Ragulator-rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141**, 290–303 (2010).
293. Bar-Peled, L., Schweitzer, L. D., Zoncu, R. & Sabatini, D. M. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* **150**, 1196–1208 (2012).
294. Efeyan, A. *et al.* Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival. *Nature* **493**, 679–83 (2013).
295. Zoncu, R., Efeyan, A. & Sabatini, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 21–35 (2011).
296. Inoki, K., Zhu, T. & Guan, K.-L. TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell* **115**, 577–590 (2003).
297. Gwinn, D. M. *et al.* AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol. Cell* **30**, 214–226 (2008).
298. Zheng, M. *et al.* Inactivation of Rheb by PRAK-mediated phosphorylation is essential for energy-depletion-induced suppression of mTORC1. *Nat. Cell Biol.* **13**, 263–272 (2011).
299. Li, L. & Guan, K. L. Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase 4 (MARK4) is a negative regulator of the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1). *J. Biol. Chem.* **288**, 703–708 (2013).
300. Semenza, G. L. Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease. *N. Engl. J. Med.* **365**, 537–547 (2011).
301. Li, Y. *et al.* Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. *J. Biol. Chem.* **282**, 35803–35813 (2007).
302. Brugarolas, J. *et al.* Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1 / TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* **18**, 1–12 (2004).
303. Deyoung, M. P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D. & Ellisen, L. W. Hypoxia regulates TSC1 / 2 – mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14 – 3 – 3 shuttling. *Genes (Basel)*. 239–251 (2008). doi:10.1101/gad.1617608.The
304. Hardie, D. G. The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *J. Cell Sci.* **117**, 5479–5487 (2004).
305. Ortells, M. C. *et al.* Transcriptional regulation of gene expression during osmotic stress responses by the mammalian target of rapamycin. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4368–4384 (2012).
306. Kwak, D. *et al.* Osmotic stress regulates mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 1 via c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated raptor protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **287**, 18398–18407 (2012).
307. Zhang, J. *et al.* A tuberous sclerosis complex signalling node at the peroxisome regulates mTORC1 and autophagy in response to ROS. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1186–96 (2013).
308. Cai, S. *et al.* ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4153–4158 (2010).
309. Inoki, K. *et al.* TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth. *Cell* **126**, 955–968 (2006).
310. Corradetti, M. N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R. A. & Guan, K. L. Regulation of the TSC pathway by LKB1: Evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev.* **18**, 1533–1538 (2004).
311. Budanov, A. V. & Karin, M. p53 Target Genes Sestrin1 and Sestrin2 Connect Genotoxic Stress and mTOR Signaling. *Cell* **134**, 451–460 (2008).
312. Freed-pastor, W. a & Prives, C. Mutant p53 : one name , many proteins Mutant p53 : one name , many proteins. *Genes Dev.* **26**, 1268–1286 (2012).
313. Marcel, V. *et al.* Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell Death Differ.* **18**, 1815–24 (2011).
314. Gudkov, A. V. & Komarova, E. A. Pathologies associated with the p53 response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 1–27 (2010).

Bibliografía

315. Feng, Z. & Levine, A. J. The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. *Trends Cell Biol.* **20**, 427–434 (2010).
316. Higuchi, H. *et al.* (30, 31) for basalts analogous to the gabbroic melt of experiment Z10 and combine D. *Handb. Chem. Phys.* **312**, 1650–1653 (2006).
317. Sablina, A. A. *et al.* The antioxidant function of the p53 tumor suppressor Anna. *Nat Med* **11**, 1306–1313 (2005).
318. Olovnikov, I. A., Kravchenko, J. E. & Chumakov, P. M. Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: Regulation of energy metabolism and antioxidant defense. *Semin. Cancer Biol.* **19**, 32–41 (2009).
319. Brown, E. J. *et al.* Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature* **377**, 441–446 (1995).
320. Urban, J. *et al.* Sch9 Is a Major Target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* **26**, 663–674 (2007).
321. Brunn, G. J. *et al.* Phosphorylation of the Translational Repressor PHAS-I by the Mammalian Target of Rapamycin. *Science* (80-. .) **99**, 10–13 (2012).
322. Wei, Y., Tsang, C. K. & Zheng, X. F. S. Mechanisms of regulation of RNA polymerase III-dependent transcription by TORC1. *EMBO J.* **28**, 2220–2230 (2009).
323. Michels, A. a *et al.* mTORC1 directly phosphorylates and regulates human MAF1. *Mol. Cell Biol.* **30**, 3749–3757 (2010).
324. Richter, J. D. & Sonenberg, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**, 477–480 (2005).
325. Ma, X. M. & Blenis, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 307–318 (2009).
326. Sonenberg, N. & Hinnebusch, A. G. New Modes of Translational Control in Development, Behavior, and Disease. *Mol. Cell* **28**, 721–729 (2007).
327. Chauvin, C. *et al.* Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene* **33**, 474–83 (2014).
328. Raught, B. *et al.* Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J.* **23**, 1761–1769 (2004).
329. Shahbazian, D. *et al.* The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J.* **25**, 2781–2791 (2006).
330. Peschiaroli, A. *et al.* SCFbetaTrCP-Mediated Degradation of Claspin Regulates Recovery from the DNA Replication Checkpoint Response. *Mol. Cell* **23**, 319–329 (2006).
331. Wang, X. *et al.* Regulation of elongation factor 2 kinase by p90 RSK1 and p70 S6 kinase. *EMBO J.* **20**, (2001).
332. Wilson, K. F., Wu, W. J. & Cerione, R. A. Cdc42 stimulates RNA splicing via the S6 kinase and a novel S6 kinase target, the nuclear cap-binding complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 37307–37310 (2000).
333. Richardson, C. J. *et al.* SKAR Is a Specific Target of S6 Kinase 1 in Cell Growth Control. *Curr. Biol.* **14**, 1540–1549 (2004).
334. Ma, X. M., Yoon, S. O., Richardson, C. J., Jillich, K. & Blenis, J. SKAR Links Pre-mRNA Splicing to mTOR/S6K1-Mediated Enhanced Translation Efficiency of Spliced mRNAs. *Cell* **133**, 303–313 (2008).
335. Thoreen, C. C. *et al.* A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* **486**, 109–113 (2015).
336. Hsieh, A. C. *et al.* The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* **485**, 55–61 (2012).
337. Larsson, O. *et al.* Distinct perturbation of the translome by the antidiabetic drug metformin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 8977–8982 (2012).
338. Morita, M. *et al.* Mtorc1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab.* **18**, 698–711 (2013).
339. Meyuhos, O. & Kahan, T. The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs. *Biochim. Biophys. Acta* **1849**, 801–811 (2014).
340. Ganley, I. G. *et al.* ULK1-ATG13-FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* **284**, 12297–12305 (2009).
341. Hosokawa, N. *et al.* Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1-Atg13-FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1981–1991 (2009).
342. Jung, C. H. *et al.* ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1992–2003 (2009).
343. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **13**, 132–41 (2011).
344. Nazio, F. *et al.* mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat. Cell Biol.* **15**, 406–16 (2013).
345. Kim, J. *et al.* Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* **152**, 290–303 (2013).

346. Yuan, H. X., Russell, R. C. & Guan, K. L. Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy* **9**, 1983–1995 (2013).
347. Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L. & Ballabio, A. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 283–296 (2013).
348. Settembre, C. *et al.* A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* **31**, 1095–1108 (2012).
349. Martina, J. A., Chen, Y., Gucek, M. & Puertollano, R. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* **8**, 903–914 (2012).
350. Martina, J. A. & Puertollano, R. Rag GTPases mediate amino acid-dependent recruitment of TFEB and MITF to lysosomes. *J. Cell Biol.* **200**, 475–491 (2013).
351. Kim, Y. C. & Guan, K.-L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J. Clin. Invest.* **125**, 25–32 (2015).
352. Lin, J., Handschin, C. & Spiegelman, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* **1**, 361–370 (2005).
353. Kang, D. & Hamasaki, N. Mitochondrial transcription factor A in the maintenance of mitochondrial DNA: Overview of its multiple roles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1042**, 101–108 (2005).
354. Wei, Y., Zhang, Y.-J., Cai, Y. & Xu, M.-H. The role of mitochondria in mTOR-regulated longevity. *Biol. Rev.* **90**, 167–181 (2015).
355. Bentzinger, C. F. *et al.* Skeletal Muscle-Specific Ablation of raptor, but Not of rictor, Causes Metabolic Changes and Results in Muscle Dystrophy. *Cell Metab.* **8**, 411–424 (2008).
356. Cunningham, J. T. *et al.* mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature* **450**, 736–740 (2007).
357. Guarente, L. Mitochondria-A Nexus for Aging, Calorie Restriction, and Sirtuins? *Cell* **132**, 171–176 (2008).
358. St-Pierre, J. *et al.* Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell* **127**, 397–408 (2006).
359. Yoboue, E. D. & Devin, A. Reactive oxygen species-mediated control of mitochondrial biogenesis. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, (2012).
360. Taguchi, K., Motohashi, H. & Yamamoto, M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells* **16**, 123–140 (2011).
361. Itoh, K. *et al.* Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* **13**, 76–86 (1999).
362. Sekhar, K. R., Yan, X. X. & Freeman, M. L. Nrf2 degradation by the ubiquitin proteasome pathway is inhibited by KIAA0132, the human homolog to INrf2. *Oncogene* **21**, 6829–34 (2002).
363. Bryan, H. K., Olayanju, A., Goldring, C. E. & Park, B. K. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 705–717 (2013).
364. Ichimura, Y. *et al.* Phosphorylation of p62 Activates the Keap1-Nrf2 Pathway during Selective Autophagy. *Mol. Cell* **51**, 618–631 (2013).
365. Shay, K. P., Michels, A. J., Li, W., Kong, A. N. T. & Hagen, T. M. Cap-independent Nrf2 translation is part of a lipooic acid-stimulated detoxification stress response. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1823**, 1102–1109 (2012).
366. Lerner, C. *et al.* Reduced mammalian target of rapamycin activity facilitates mitochondrial retrograde signaling and increases life span in normal human fibroblasts. *Aging Cell* **12**, 966–977 (2013).
367. Eijkelenboom, A. & Burgering, B. M. T. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 83–97 (2013).
368. Yang, K., Neale, G., Green, D. R., He, W. & Chi, H. The tumor suppressor Tsc1 enforces quiescence of naive T cells to promote immune homeostasis and function. *Nat. Immunol.* **12**, 888–97 (2011).
369. Abdelnour-Berchtold, E. *et al.* Rapamycin-mediated FOXO1 inactivation reduces the anticancer efficacy of rapamycin. *Anticancer Res.* **30**, 799–804 (2010).
370. Sarbassov, D. D. *et al.* Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* **14**, 1296–302 (2004).
371. Jacinto, E. *et al.* Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* **6**, 1122–8 (2004).
372. Powell, J. D. & Delgoffe, G. M. The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. *Immunity* **33**, 301–11 (2010).
373. Lamming, D. W. & Sabatini, D. M. A Central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell Metab.* **18**, 465–9 (2013).

Bibliografía

374. Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W. & Hall, M. N. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* **144**, 757–68 (2011).
375. Huang, J., Dibble, C. C., Matsuzaki, M. & Manning, B. D. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4104–15 (2008).
376. Cybulski, N., Polak, P., Auwerx, J., Ruegg, M. A. & Hall, M. N. mTOR complex 2 in adipose tissue negatively controls whole-body growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 9902–7 (2009).
377. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098–101 (2005).
378. Harrington, L. S. *et al.* The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol.* **166**, 213–23 (2004).
379. Um, S. H. *et al.* Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* **431**, 200–5 (2004).
380. Julien, L.-A., Carriere, A., Moreau, J. & Roux, P. P. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 908–21 (2010).
381. Tzatsos, A. & Kandror, K. V. Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 63–76 (2006).
382. Hsu, P. P. *et al.* The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science* **332**, 1317–22 (2011).
383. Yu, Y. *et al.* Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science* **332**, 1322–6 (2011).
384. Crino, P. B. mTOR: A pathogenic signaling pathway in developmental brain malformations. *Trends Mol. Med.* **17**, 734–42 (2011).
385. Lasarge, C. L. & Danzer, S. C. Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation. *Front. Mol. Neurosci.* **7**, 18 (2014).
386. Tang, S. J. *et al.* A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 467–72 (2002).
387. Crino, P. B. The mTOR signalling cascade: paving new roads to cure neurological disease. *Nat. Rev. Neurol.* **12**, 379–92 (2016).
388. Kaerberlein, M. *et al.* Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* **310**, 1193–6 (2005).
389. Vellai, T. *et al.* Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* **426**, 620 (2003).
390. Richardson, A., Galvan, V., Lin, A.-L. & Oddo, S. How longevity research can lead to therapies for Alzheimer's disease: The rapamycin story. *Exp. Gerontol.* **68**, 51–8 (2015).
391. An, W.-L. *et al.* Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6 kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **163**, 591–607 (2003).
392. Morita, T. & Sobue, K. Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway. *J. Biol. Chem.* **284**, 27734–45 (2009).
393. Griffin, R. J. *et al.* Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J. Neurochem.* **93**, 105–17 (2005).
394. Li, X., Alafuzoff, I., Soininen, H., Winblad, B. & Pei, J.-J. Levels of mTOR and its downstream targets 4E-BP1, eEF2, and eEF2 kinase in relationships with tau in Alzheimer's disease brain. *FEBS J.* **272**, 4211–20 (2005).
395. Anglade, P. *et al.* Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol. Histopathol.* **12**, 25–31 (1997).
396. Ries, V. *et al.* Oncoprotein Akt/PKB induces trophic effects in murine models of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18757–62 (2006).
397. Cheng, H.-C. *et al.* Akt suppresses retrograde degeneration of dopaminergic axons by inhibition of macroautophagy. *J. Neurosci.* **31**, 2125–35 (2011).
398. Ravikumar, B., Duden, R. & Rubinsztein, D. C. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1107–17 (2002).
399. Ravikumar, B. *et al.* Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* **36**, 585–95 (2004).
400. Lee, J. H. *et al.* Reinstating aberrant mTORC1 activity in Huntington's disease mice improves disease phenotypes. *Neuron* **85**, 303–15 (2015).
401. Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N. & Rubinsztein, D. C. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J. Biol. Chem.* **278**, 25009–13 (2003).

402. Spencer, B. *et al.* Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J. Neurosci.* **29**, 13578–88 (2009).
403. Davies, J., Zachariades, E., Rogers-Broadway, K.-R. & Karteris, E. Elucidating the role of DEPTOR in Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Med.* **34**, 1195–200 (2014).
404. Bolinches-Amorós, A., Mollá, B., Pla-Martín, D., Palau, F. & González-Cabo, P. Mitochondrial dysfunction induced by frataxin deficiency is associated with cellular senescence and abnormal calcium metabolism. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 124 (2014).
405. Bratty, M. Al, Hobani, Y., Dow, J. A. T. & Watson, D. G. Metabolomic profiling of the effects of allopurinol on *Drosophila melanogaster*. *Metabolomics* **7**, 542–548 (2011).
406. Bahadorani, S., Bahadorani, P., Phillips, J. P. & Hilliker, A. J. The effects of vitamin supplementation on *Drosophila* life span under normoxia and under oxidative stress. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **63**, 35–42 (2008).
407. Zhang, D. *et al.* Celastrol regulates multiple nuclear transcription factors belonging to HSP90's clients in a dose- and cell type-dependent way. *Cell Stress Chaperones* **15**, 939–46 (2010).
408. Chongtham, A. & Agrawal, N. Curcumin modulates cell death and is protective in Huntington's disease model. *Sci. Rep.* **6**, 18736 (2016).
409. Soares, D. C. S. *et al.* Treatment with pentylentetrazole (PTZ) and 4-aminopyridine (4-AP) differently affects survival, locomotor activity, and biochemical markers in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biochem.* **442**, 129–142 (2018).
410. Levine, B. D. & Cagan, R. L. *Drosophila* Lung Cancer Models Identify Trametinib plus Statin as Candidate Therapeutic. *Cell Rep.* **14**, 1477–1487 (2016).
411. Kang, H.-L., Benzer, S. & Min, K.-T. Life extension in *Drosophila* by feeding a drug. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 838–43 (2002).
412. Terán, R. *et al.* The life span of *Drosophila melanogaster* is affected by melatonin and thioctic acid. *Invest. Clin.* **53**, 250–61 (2012).
413. Shirazi, F. *et al.* Diet modification and metformin have a beneficial effect in a fly model of obesity and mucormycosis. *PLoS One* **9**, e108635 (2014).
414. Harrison, B., Tran, T. T., Taylor, D., Lee, S.-D. & Min, K.-J. Effect of rapamycin on lifespan in *Drosophila*. *Geriatr. Gerontol. Int.* **10**, 110–2 (2010).
415. Rusten, T. E. *et al.* Programmed autophagy in the *Drosophila* fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev. Cell* **7**, 179–92 (2004).
416. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–8 (2001).
417. Parrish, R. R., Day, J. J. & Lubin, F. D. in *Current Protocols in Neuroscience* 1–14 (John Wiley & Sons, Inc., 2012). doi:10.1002/0471142301.ns0724s60
418. Rodríguez, S. S. Estudio del déficit de frataxina en *Drosophila*. (Universidad de Valencia, España, 2015).
419. Geoerger, B. *et al.* Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy. *Cancer Res.* **61**, 1527–32 (2001).
420. Layalle, S., Arquier, N. & Léopold, P. The TOR Pathway Couples Nutrition and Developmental Timing in *Drosophila*. *Dev. Cell* **15**, 568–577 (2008).
421. Emond, M., Lepage, G., Vanasse, M. & Pandolfo, M. Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology* **55**, 1752–1753 (2000).
422. Navarro, J. A. *et al.* Altered lipid metabolism in a *Drosophila* model of Friedreich's ataxia. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2828–2840 (2010).
423. Loewith, R. & Hall, M. N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* **189**, 1177–1201 (2011).
424. Petiot, A. *et al.* Distinct Classes of Phosphatidylinositol 3'-Kinases Are Involved in Signaling Pathways That Control Macroautophagy in Distinct Classes of Phosphatidylinositol 3'-Kinases Are Involved in Signaling Pathways That Control Macroautophagy in HT-29 Cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 992–998 (2000).
425. Kofman, A. E., McGraw, M. R. & Payne, C. J. Rapamycin increases oxidative stress response gene expression in adult stem cells. *Aging (Albany, NY)* **4**, 279–289 (2012).
426. Robida-Stubbs, S. *et al.* TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell Metab.* **15**, 713–724 (2012).
427. Lynch Gwen Lech, D. R. *et al.* Near infrared muscle spectroscopy in patients with Friedreich's ataxia. *Muscle and Nerve* **25**, 664–673 (2002).
428. Bonawitz, N. D., Chatenay-Lapointe, M., Pan, Y. & Shadel, G. S. Reduced TOR Signaling Extends Chronological Life Span via Increased

Bibliografía

- Respiration and Upregulation of Mitochondrial Gene Expression. *Cell Metab.* **5**, 265–277 (2007).
429. Zid, B. M. *et al.* 4E-BP Extends Lifespan upon Dietary Restriction by Enhancing Mitochondrial Activity in *Drosophila*. *Cell* **139**, 149–160 (2009).
430. Schreiber, K. H. *et al.* Rapamycin-mediated mTORC2 inhibition is determined by the relative expression of FK506-binding proteins. *Aging Cell* **14**, 265–73 (2015).
431. Li, Y. *et al.* Expanded GAA repeats impede transcription elongation through the FXN gene and induce transcriptional silencing that is restricted to the FXN locus. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 6932–43 (2015).
432. Bayot, A. *et al.* Cis-silencing of PIP5K1B evidenced in Friedreich's ataxia patient cells results in cytoskeleton anomalies. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 2894–904 (2013).
433. Suzuki, M. M. & Bird, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 465–76 (2008).
434. De Rubertis, F. *et al.* The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and yeast. *Nature* **384**, 589–91 (1996).
435. Schotta, G. *et al.* Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.* **21**, 1121–31 (2002).
436. Sharma, D., Sethi, P., Hussain, E. & Singh, R. Curcumin counteracts the aluminium-induced ageing-related alterations in oxidative stress, Na⁺, K⁺ ATPase and protein kinase C in adult and old rat brain regions. *Biogerontology* **10**, 489–502 (2009).
437. Shen, L.-R. *et al.* Curcumin-supplemented diets increase superoxide dismutase activity and mean lifespan in *Drosophila*. *Age (Dordr.)* **35**, 1133–42 (2013).
438. Xiang, L. *et al.* Tetrahydrocurcumin extends life span and inhibits the oxidative stress response by regulating the FOXO forkhead transcription factor. *Aging (Albany, NY)* **3**, 1098–109 (2011).
439. Sharma, R. A., Gescher, A. J. & Steward, W. P. Curcumin: the story so far. *Eur. J. Cancer* **41**, 1955–68 (2005).
440. Dai, W. *et al.* Curcumin provides neuroprotection in model of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE signaling pathway. *Brain Res. Bull.* **140**, 65–71 (2018).
441. Shen, L.-R., Parnell, L. D., Ordovas, J. M. & Lai, C.-Q. Curcumin and aging. *BioFactors* **39**, 133–140 (2013).
442. Khatri, D. K. & Juvekar, A. R. Neuroprotective effect of curcumin as evinced by abrogation of rotenone-induced motor deficits, oxidative and mitochondrial dysfunctions in mouse model of Parkinson's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **150–151**, 39–47 (2016).
443. Wang, X.-S. *et al.* Neuroprotective properties of curcumin in toxin-base animal models of Parkinson's disease: a systematic experiment literatures review. *BMC Complement. Altern. Med.* **17**, 412 (2017).
444. Alavian, K. N. *et al.* Effects of dextramipexole on brain mitochondrial conductances and cellular bioenergetic efficiency. *Brain Res.* **1446**, 1–11 (2012).
445. Alavian, K. N. *et al.* The mitochondrial complex V-associated large-conductance inner membrane current is regulated by cyclosporine and dextramipexole. *Mol. Pharmacol.* **87**, 1–8 (2015).
446. Bonora, M. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene* **34**, 1608 (2015).
447. Jonas, E. A., Porter, G. A., Beutner, G., Mnatsakanyan, N. & Alavian, K. N. Cell death disguised: The mitochondrial permeability transition pore as the c-subunit of the F(1)F(O) ATP synthase. *Pharmacol. Res.* **99**, 382–92 (2015).
448. Cassarino, D. S., Fall, C. P., Smith, T. S. & Bennett, J. P. Pramipexole reduces reactive oxygen species production in vivo and in vitro and inhibits the mitochondrial permeability transition produced by the parkinsonian neurotoxin methylpyridinium ion. *J. Neurochem.* **71**, 295–301 (1998).
449. Sayeed, I. *et al.* Patch clamp reveals powerful blockade of the mitochondrial permeability transition pore by the D2-receptor agonist pramipexole. *FASEB J.* **20**, 556–8 (2006).
450. Danzeisen, R. *et al.* Targeted antioxidative and neuroprotective properties of the dopamine agonist pramipexole and its nondopaminergic enantiomer SND919CL2x [(+)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-Lpropylamino-benzothiazole dihydrochloride]. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**, 189–99 (2006).
451. Ferrari-Toninelli, G., Maccarinelli, G., Uberti, D., Buerger, E. & Memo, M. Mitochondria-targeted antioxidant effects of S(-) and R(+) pramipexole. *BMC Pharmacol.* **10**, 2 (2010).
452. Batshaw, M. L., MacArthur, R. B. & Tuchman, M. Alternative pathway therapy for urea cycle disorders: twenty years later. *J. Pediatr.* **138**, S46–54; discussion S54–5 (2001).
453. Walker, V. Ammonia toxicity and its prevention in inherited defects of the urea cycle. *Diabetes. Obes. Metab.* **11**, 823–35 (2009).
454. Gardian, G. *et al.* Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic

- mouse model of Huntington's disease. *J. Biol. Chem.* **280**, 556–63 (2005).
455. Gardian, G. *et al.* Neuroprotective effects of phenylbutyrate against MPTP neurotoxicity. *Neuromolecular Med.* **5**, 235–41 (2004).
456. Zhou, W. *et al.* Phenylbutyrate up-regulates the DJ-1 protein and protects neurons in cell culture and in animal models of Parkinson disease. *J. Biol. Chem.* **286**, 14941–51 (2011).
457. Balmik, A. A. & Chinnathambi, S. Multi-Faceted Role of Melatonin in Neuroprotection and Amelioration of Tau Aggregates in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers. Dis.* **62**, 1481–1493 (2018).
458. Paul, R. *et al.* Melatonin protects against behavioral deficits, dopamine loss and oxidative stress in homocysteine model of Parkinson's disease. *Life Sci.* **192**, 238–245 (2018).
459. Aridas, J. D. S. *et al.* Systemic and transdermal melatonin administration prevents neuropathology in response to perinatal asphyxia in newborn lambs. *J. Pineal Res.* **64**, e12479 (2018).
460. Wongprayoon, P. & Govitrapong, P. Melatonin as a mitochondrial protector in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 3999–4014 (2017).
461. Barcelo, H. & Stewart, M. J. Altering *Drosophila* S6 kinase activity is consistent with a role for S6 kinase in growth. *Genesis* **34**, 83–85 (2002).
462. Healy, D. G. *et al.* Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol.* **7**, 583–590 (2008).
463. Imai, Y. *et al.* Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in *Drosophila*. *EMBO J.* **27**, 2432–43 (2008).
464. Kapahi, P. *et al.* With TOR, less is more: A key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. *Cell Metab.* **11**, 453–465 (2010).
465. Bjedov, I. *et al.* Mechanisms of Life Span Extension by Rapamycin in the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab.* **11**, 35–46 (2010).
466. Patel, P. H. & Tamanoi, F. Increased Rheb-TOR signaling enhances sensitivity of the whole organism to oxidative stress. *J. Cell Sci.* **119**, 4285–92 (2006).
467. Tettweiler, G., Miron, M., Jenkins, M., Sonenberg, N. & Lasko, P. F. Starvation and oxidative stress resistance in. *Genes Dev.* 1840–1843 (2005). doi:10.1101/gad.1311805.1840
468. Marobbio, C. M. T., Pisano, I., Porcelli, V., Lasorsa, F. M. & Palmieri, L. Rapamycin reduces oxidative stress in frataxin-deficient yeast cells. *Mitochondrion* **12**, 156–161 (2012).
469. Sarkar, S. Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 1103–30 (2013).
470. Turpaev, K. T. Keap1-Nrf2 signaling pathway: mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. *Biochem. Biokhimiia* **78**, 111–26 (2013).
471. Carracedo, A. & Pandolfi, P. P. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* **27**, 5527–41 (2008).
472. O'Reilly, K. E. *et al.* mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* **66**, 1500–1508 (2006).
473. Anzovino, A. *et al.* Molecular Alterations in a Mouse Cardiac Model of Friedreich Ataxia: An Impaired Nrf2 Response Mediated via Upregulation of Keap1 and Activation of the Gsk3 β Axis. *Am. J. Pathol.* **187**, 2858–2875 (2017).
474. Petrillo, S. *et al.* Nrf2-Inducers Counteract Neurodegeneration in Frataxin-Silenced Motor Neurons: Disclosing New Therapeutic Targets for Friedreich's Ataxia. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
475. Ravikumar, B., Berger, Z., Vacher, C., O'Kane, C. J. & Rubinsztein, D. C. Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1209–1216 (2006).
476. Simonsen, A. *et al.* Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy* **4**, 176–184 (2008).
477. Li, J., Kim, S. G. & Blenis, J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab.* **19**, 373–9 (2014).
478. Kaplan, B., Qazi, Y. & Wellen, J. R. Strategies for the management of adverse events associated with mTOR inhibitors. *Transplant. Rev.* **28**, 126–133 (2014).
479. Lamming, D. W. *et al.* Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science* **335**, 1638–43 (2012).
480. Kearney, M., Orrell, R. W., Fahey, M., Brassington, R. & Pandolfo, M. in *Cochrane Database of Systematic Reviews* (ed. Kearney, M.) CD007791 (John Wiley & Sons, Ltd, 2013). doi:10.1002/14651858.CD007791
481. Bashkirov, V. N. [The origin of heterochromatin in eukaryotes]. *Genetika* **38**, 789–92 (2002).
482. Muller, H. J. Types of visible variations

Bibliografía

- induced by X-rays in *Drosophila*. *J. Genet.* **22**, 299–334 (1930).
483. Dillon, N. & Festenstein, R. Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet.* **18**, 252–8 (2002).
484. Ohno, M., Fukagawa, T., Lee, J. S. & Ikemura, T. Triplex-forming DNAs in the human interphase nucleus visualized in situ by polypurine/polypyrimidine DNA probes and antitriplex antibodies. *Chromosoma* **111**, 201–13 (2002).
485. Festenstein, R. *et al.* Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation. *Science* **271**, 1123–5 (1996).
486. Chutake, Y. K. *et al.* FXN Promoter Silencing in the Humanized Mouse Model of Friedreich Ataxia. *PLoS One* **10**, e0138437 (2015).
487. Smith, Z. D. & Meissner, A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 204–20 (2013).
488. Yoder, J. A. & Bestor, T. H. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 279–84 (1998).
489. Pastor, W. A., Aravind, L. & Rao, A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 341–56 (2013).
490. Greene, E., Mahishi, L., Entezam, A., Kumari, D. & Usdin, K. Repeat-induced epigenetic changes in intron 1 of the frataxin gene and its consequences in Friedreich ataxia. *Nucleic Acids Res.* **35**, 3383–90 (2007).
491. Al-Mahdawi, S. *et al.* The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 735–46 (2008).
492. Castaldo, I. *et al.* DNA methylation in intron 1 of the frataxin gene is related to GAA repeat length and age of onset in Friedreich ataxia patients. *J. Med. Genet.* **45**, 808–12 (2008).
493. Elango, N., Hunt, B. G., Goodisman, M. A. D. & Yi, S. V. DNA methylation is widespread and associated with differential gene expression in castes of the honeybee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 11206–11 (2009).
494. Tweedie, S., Charlton, J., Clark, V. & Bird, A. Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1469–75 (1997).
495. Urieli-Shoval, S., Gruenbaum, Y., Sedat, J. & Razin, A. The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. *FEBS Lett.* **146**, 148–52 (1982).
496. Lyko, F., Ramsahoye, B. H. & Jaenisch, R. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **408**, 538–40 (2000).
497. Gowher, H., Leismann, O. & Jeltsch, A. DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. *EMBO J.* **19**, 6918–23 (2000).
498. Capuano, F., Müllender, M., Kok, R., Blom, H. J. & Ralser, M. Cytosine DNA methylation is found in *Drosophila melanogaster* but absent in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and other yeast species. *Anal. Chem.* **86**, 3697–702 (2014).
499. Takayama, S. *et al.* Genome methylation in *D. melanogaster* is found at specific short motifs and is independent of DNMT2 activity. *Genome Res.* **24**, 821–30 (2014).
500. Talbert, P. B. & Henikoff, S. Spreading of silent chromatin: inaction at a distance. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 793–803 (2006).
501. Wijchers, P. J. *et al.* Characterization and dynamics of pericentromere-associated domains in mice. *Genome Res.* **25**, 958–69 (2015).
502. Wang, J., Lawry, S. T., Cohen, A. L. & Jia, S. Chromosome boundary elements and regulation of heterochromatin spreading. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 4841–52 (2014).
503. Chutake, Y. K., Costello, W. N., Lam, C. & Bidichandani, S. I. Altered nucleosome positioning at the transcription start site and deficient transcriptional initiation in Friedreich ataxia. *J. Biol. Chem.* **289**, 15194–202 (2014).
504. Punga, T. & Bühler, M. Long intronic GAA repeats causing Friedreich ataxia impede transcription elongation. *EMBO Mol. Med.* **2**, 120–9 (2010).
505. Kim, E., Napierala, M. & Dent, S. Y. R. Hyperexpansion of GAA repeats affects post-initiation steps of FXN transcription in Friedreich's ataxia. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8366–77 (2011).
506. Pastore, A. *et al.* Actin glutathionylation increases in fibroblasts of patients with Friedreich's ataxia: a potential role in the pathogenesis of the disease. *J. Biol. Chem.* **278**, 42588–95 (2003).
507. Sparaco, M. *et al.* Friedreich's ataxia: oxidative stress and cytoskeletal abnormalities. *J. Neurol. Sci.* **287**, 111–8 (2009).
508. van den Bout, I. & Divecha, N. PIP5K-driven PtdIns(4,5)P₂ synthesis: regulation and cellular functions. *J. Cell Sci.* **122**, 3837–50 (2009).
509. Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–7 (2006).
510. Saarikangas, J., Zhao, H. & Lappalainen, P. Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol. Rev.* **90**, 259–89 (2010).
511. Papaiahgari, S. *et al.* EGFR-activated signaling and actin remodeling regulate cyclic stretch-

- induced NRF2-ARE activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36**, 304–12 (2007).
512. Lawrence, M., Daujat, S. & Schneider, R. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet.* **32**, 42–56 (2016).
513. Barski, A. *et al.* High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**, 823–37 (2007).
514. Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. & Jenuwein, T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**, 116–20 (2001).
515. Grau, D. J. *et al.* Compaction of chromatin by diverse Polycomb group proteins requires localized regions of high charge. *Genes Dev.* **25**, 2210–21 (2011).
516. Wang, Z. *et al.* Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat. Genet.* **40**, 897–903 (2008).
517. Yandim, C., Natisvili, T. & Festenstein, R. Gene regulation and epigenetics in Friedreich's ataxia. *J. Neurochem.* **126 Suppl**, 21–42 (2013).