

Generació d'un model de malaltia mitocondrial humana en *Drosophila melanogaster*

Tanit Guitart Rodés

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOMEDICINA, BIENNI 2004-2006
TESI REALITZADA AL LABORATORI DE TRADUCCIÓ GENÈTICA
INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA

GENERACIÓ D'UN MODEL DE MALALTIA MITOCONDRIAL HUMANA EN
DROSOPHILA MELANOGASTER

Memòria presentada per Tanit Guitart Rodés
per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Director:

Tutor:

Doctoranda:

Lluís Ribas de Pouplana

Antonio Zorzano Olarte

Tanit Guitart Rodés

	INDEX
	ABREVIATURES
	1 INTRODUCCIÓ
	2 OBJECTIUS
3	MATERIAL I MÈTODES
	4 RESULTATS
	5 DISCUSSIÓ
6	CONCLUSIONS
	BIBLIOGRAFIA
	APÈNDIX: PUBLICACIÓ

4 RESULTATS

4.1 ESTUDI COMPUTACIONAL DELS COMPONENTS DEL SISTEMA DE SERILACIÓ DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

L'objectiu d'aquest capítol és la recopilació d'informació estructural, evolutiva i funcional dels elements que formen part del sistema de serilació en *D. melanogaster*, com ho són les poblacions d'ARNt distribuïdes en diferents compartiments cel·lulars i les possibles seqüències de seril-ARNt sintetases, per mitjà d'eines bioinformàtiques.

Com ja s'ha comentat al capítol introductori (vegeu la secció 1.1), els organismes eucariotes necessiten sistemes de traducció genètica independents en diferents compartiments cel·lulars. Així doncs, els elements involucrats en la reacció de serilació (ARNt^{Ser} i seril-ARNt sintetasa), no només són presents al citoplasma on els ARNm que provenen del genoma nuclear són traduïts, sinó també als orgànuls que posseeixen genoma propi, com ho és el mitocondri.

4.1.1 *D. melanogaster* posseeix dos grups d'ARNt^{Ser} independents, al citoplasma i al mitocondri

El genoma nuclear de *D. melanogaster* codifica els isoacceptors d'ARNt^{Ser} citoplasmàtics necessaris per descodificar els sis codons d'ARNm corresponents a l'aminoàcid serina, segons el codi genètic estàndard (consulteu el panell superior de la figura 4.1). Els sis codons serina es divideixen en dues famílies segons els dos primers nucleòtids del codó compartits: la família UCN inclou els codons UCU, UCC, UCA i UCG, i la família AGY consta dels codons AGU i AGC. L'ARNt supressor selenocisteïna (ARNt^{Sec}), que també procedeix del genoma nuclear, és el responsable de descodificar el codó de terminació *opal* UGA, com a aminoàcid serina en primer lloc, que serà posteriorment modificat a l'aminoàcid selenocisteïna (Leinfelder et al., 1988).

Existeixen quatre gens idèntics que codifiquen el *DmARNt^{Ser}* (CGA), tres d'ells al cromosoma X (*trna6-SerCGA*, *trna7-SerCGA* i *trna22-SerCGA*) i un al cromosoma 2R (*trna33-SerCGA*). El *DmARNt^{Ser}* (CGA) que descodifica el codó UCG es mostra a la figura 4.1, on s'inclou la seqüència de 85nt, l'estructura secundària i les modificacions posttranscripcionals publicades (Cribbs et al., 1987a).

Existeixen vuit possibles gens per al *DmARNt^{Ser}* (AGA) segons la base de dades tRNAscan-SE (Chan i Lowe, 2009): un al cromosoma 3L (*trna19-SerAGA*), dos al cromosoma 2L (*trna7-SerAGA* i *trna35-SerAGA*) i cinc al cromosoma X (*trna12-SerAGA*, *trna13-SerAGA*, *trna20-SerAGA*, *trna23-SerAGA* i *trna24-SerAGA*). Hi ha petites diferències nucleotídiques entre ells, que donen lloc a tres grups de gens: el primer grup inclou els gens *trna7-SerAGA*, *trna19-SerAGA*, *trna20-SerAGA*, *trna23-SerAGA* i *trna35-SerAGA* que comparteixen la mateixa seqüència donant lloc a l'ARNt

representat a la figura 4.1. El segon grup, format pels gens *trna13-SerAGA* i *trna24-SerAGA*, presenta el canvi A→G en el nucleòtid 68, segons la numeració proposada per Sprinzl et al. (Sprinzl et al., 1998). El tercer grup està format pel gen *trna12-SerAGA* que es diferencia del primer grup pels canvis A→G a la posició 68 i C→U a la posició 16.

Un cop el *DmARNt^{Ser}* (AGA) és transcrit, l'adenosina 5' de l'anticodó AGA és transformada en inosina a través de l'enzim ADAR (*adenosine deaminase acting on RNA*; adenosina desaminasa específica d'ARN) donant lloc al *DmARNt^{Ser}* (IGA), l'anticodó del qual pot aparellar-se amb els codons serina UCU, UCC i UCA. La figura 4.1 mostra la seqüència de 85nt, l'estructura secundària en forma de fulla de trèvol i les modificacions posttranscripcionals d'aquest ARNt (Cribbs et al., 1987a).

Els dos *DmARNt^{Ser}* encarregats de descodificar els codons de la família UCN, que corresponen al primer grup de *DmARNt^{Ser}* (AGA) i el *DmARNt^{Ser}* (CGA), tenen una seqüència nucleotídica idèntica a excepció de tres posicions: la posició 34 que determina l'anticodó (A i C, respectivament), la posició 16 (C i U, respectivament) i la posició 68 (A i G, respectivament), per això els gens del *DmARNt^{Ser}* (AGA) del segon i tercer grup mencionats anteriorment són, en realitat, seqüències intermèdies entre el *DmARNt^{Ser}* (AGA) i el *DmARNt^{Ser}* (CGA). La presència d'aquests ARNt intermediaris indica que existeix recombinació homòloga entre els gens que codifiquen els *DmARNt^{Ser}* (AGA) i *DmARNt^{Ser}* (CGA) (Cribbs et al., 1987b).

El genoma nuclear de *D. melanogaster* conté sis gens al cromosoma 3R que codifiquen el *DmARNt^{Ser}* (GCU), cinc dels quals són idèntics (*trna32-SerGCT*, *trna33-SerGCT*, *trna45-SerGCT*, *trna59-SerGCT* i *trna62-SerGCT*), mentre que el gen restant presenta un canvi A→U a la posició 16 i dona lloc al *DmARNt^{Ser}* (GCU) representat a la figura 4.1 (*trna44-SerGCT*). El *DmARNt^{Ser}* (GCU) descodifica els codons AGU i AGC. La seqüència de 85nt, l'estructura secundària i les modificacions posttranscripcionals d'aquest ARNt que es representen a la figura 4.1 provenen de la publicació de Cribbs et al. (Cribbs et al., 1987a).

El cromosoma 2R conté dos gens per a l'isoacceptor *DmARNt^{Ser}* (UGA): el *trna48-SerUGA* que genera l'ARNt representat a la figura 4.1 i el *trna53-SerUGA* que presenta els canvis U→C a la posició 2, G→A a les posicions 48 i 57 i A→G a la posició 59. El *DmARNt^{Ser}* (UGA) descodificaria, de forma redundat amb el *DmARNt^{Ser}* (IGA) i el *DmARNt^{Ser}* (CGA), els codons UCA i UCG. Fins ara no s'ha aïllat ni seqüenciat aquest isoacceptor, per això la figura 4.1 mostra la seqüència de 85nt i l'estructura secundària predites per la base de dades tRNAdb (Juhling et al., 2009).

Per últim, existeix un gen que codifica el *DmARNt^{Sec}* (UCA) al cromosoma 2R (*trna85-SeC(e)TCA*). La seqüència de 90nt i l'estructura secundària del *DmARNt^{Sec}* (UCA) representades a la figura 4.1 provenen de la base de dades tRNAdb (Juhling et al., 2009) i de la publicació de Lee et al. (Lee et al., 1990).

Les estructures secundàries dels ARNt^{Ser/Sec} citoplasmàtics de *D. melanogaster*, com les de la majoria de procariotes, eucariotes i arqueobacteris, es caracteritzen per un braç variable especialment llarg, que és el principal element d'identitat per a les seril-ARNt sintetases (Lenhard et al., 1999) (vegeu l'apartat 1.2.6).

Nom	<i>Dm</i> ARNt ^{Ser} (CGA)	<i>Dm</i> ARNt ^{Ser} (IGA)	<i>Dm</i> ARNt ^{Ser} (GCU)	<i>Dm</i> ARNt ^{Ser} (UGA)	<i>Dm</i> ARNt ^{Sec} (UCA)
Estructura secundària					
Ref.	Cribbs et al., 1987a	Cribbs et al., 1987a	Cribbs et al., 1987a	Juhling et al., 2009	Lee et al., 1990; Juhling et al., 2009
Codons	UCG	UCU UCC UCA	AGU AGC	UCA UCG	UGA

Nom	<i>Dm</i> ARNt ^{Ser} (GCU) mt	<i>Dm</i> ARNt ^{Ser} (UGA) mt
Estructura secundària		
Ref.	Tomita et al., 1999	Juhling et al., 2009
Codons	AGU AGC AGA	UCU UCC UCA UCG

- ① mcm⁵U 5-metoxicarbonilmetiluridina
- ⑥ t⁶A N⁶-treonilcarbamoiladenosina
- ⓓ dihidouridina
- ⓔ mt⁶A N⁶-metil-N⁶-treonilcarbamoiladenosina
- Ⓤ U_m 2'-O-metiluridina
- Ⓜ ac⁴C N⁴-acetilcitidina
- Ⓡ m²,G N²,N²-dimetilguanosa
- Ⓣ m⁵U ribosiltimina
- Ⓢ pseudouridina
- ⑦ m⁵C 5-metilcitidina
- Ⓢ G_m 2'-O-metilguanosa
- ③ m³C 3-metilcitidina
- Ⓢ m¹A 1-metiladenosina
- Ⓢ i⁶A N⁶-isopenteniladenosina
- Ⓢ inserció GAA i CC

Figura 4.1 *Dm*ARNt^{Ser/Sec} citoplasmàtics i mitocondrials. Es mostren les seqüències, les estructures secundàries conegudes o predites i les modificacions posttranscripcionals descrites dels ARNt^{Ser/Sec} citoplasmàtics (panell superior) i mitocondrials (panell inferior) de *D. melanogaster*. Les diferències nucleotídiques, amb el nombre de gens que les presenten entre parèntesi, estan enquadrades. Les posicions nucleotídiques segueixen la numeració convencional (Sprinzl et al., 1998). Les modificacions posttranscripcionals estan descrites a la part inferior dreta de la figura.

A causa de la baixa proporció de GC al genoma mitocondrial (Wolstenholme i Clary, 1985), els ARNt de l'òrganul tenen un contingut de GC d'entre un 20,3% i un 22,9%, a diferència dels ARNt citoplasmàtics que tenen un contingut de GC d'entre un 54,1% i un 58,9%. Mentre que en el citoplasma s'empren múltiples ARNt per tal de traduir cada família de codons, en el genoma mitocondrial tan sols es codifica un ARNt per a cada família. Així doncs, el genoma mitocondrial codifica dos isoacceptors d'ARNt^{Ser} (*Dm*ARNt^{Ser} mt) que són suficients per reconèixer els set codons serina mitocondrials. Els mitocondris d'organismes invertebrats tenen un codi genètic

que difereix de l'estàndard (consulteu l'apartat 1.1.3 i la figura 1.2 de la introducció): a part dels sis codons serina del codi genètic convencional, els codons arginina AGR (AGA i AGG) són descodificats també com a serina. Cal mencionar però, que als mitocondris de *Drosophila*, el codó AGG és absent (de Bruijn, 1983; Garesse, 1988). Segons la base de dades tRNAdb (Juhling et al., 2009), el genoma mitocondrial de la drosòfila presenta solament un gen per al $DmARnt^{Ser}$ (GCU) mitocondrial ($DmARnt^{Ser}$ (GCU) mt; *tdbD00002754*). La seqüència de 70nt, l'estructura secundària en forma de fulla de trèvol i les modificacions posttranscripcionals representades a la figura 4.1 van ser determinades per Tomita et al. (Tomita et al., 1999).

Es considera que el $DmARnt^{Ser}$ (GCU) mt descodifica els codons AGY (AGU i AGC), i també el codó arginina AGA a serina. L'estructura de l' $ARnt^{Ser}$ (GCU) mt de *D. melanogaster*, com en la majoria de metazous, difereix substancialment de l'estructura típica dels $ARnt^{Ser}$, caracteritzant-se per l'eliminació del bucle i el braç D i la reducció significativa de la llargada del braç variable (Steinberg et al., 1994).

El genoma mitocondrial de *Drosophila* també conté un gen que codifica el $DmARnt^{Ser}$ (UGA) mitocondrial ($DmARnt^{Ser}$ (UGA) mt; *tdbD00002755*), però la seqüència de l' $ARnt$ no ha estat resolta. L'estructura secundària predita, representada a la figura 4.1, també presenta un braç variable reduït. Aquest $ARnt$ de 69nt descodifica els quatre codons UCU, UCC, UCA i UCG.

En conclusió, *D. melanogaster* presenta dues poblacions d' $ARnt$ ben diferenciades a nivell de seqüència i d'estructura pel compartiment citoplasmàtic i mitocondrial.

4.1.2 *D. melanogaster* té tres possibles seqüències codificadores de seril- $ARnt$ sintetases

Presumptament, *D. melanogaster* necessita una SRS (seril- $ARnt$ sintetasa) citoplasmàtica i una mitocondrial per descodificar els dos genomes de la cèl·lula, mitjançant l'aminoacilació d' $ARnt^{Ser}$ citoplasmàtics o mitocondrials. És necessari fer ús d'eines bioinformàtiques per tal de determinar les possibles seqüències que codifiquen SRS, ja que no existeixen dades experimentals publicades sobre el sistema de serilació de *D. melanogaster*.

A partir de la cerca de seqüències SRS a la base de dades FlyBase (Tweedie et al., 2009), només n'apareix una anotada com a seril- $ARnt$ sintetasa, corresponent al gen CG4938. Efectuant alineaments proteics amb el programa BLAST (Altschul et al., 1990), es troben dues seqüències més homòlogues a CG4938 en *D. melanogaster*: CG17259 amb un 32% d'identitat (valor $E=6 \times 10^{-41}$) i CG31133 amb un 25% d'identitat (valor $E=1 \times 10^{-17}$). Els gens de totes tres proteïnes són de còpia única i cap d'ells no presenta introns.

El gen CG17259 (FBgn0031497) situat al cromosoma 2L, codifica una proteïna de 501aa. Segons la base de dades per detectar dominis proteïcs conservats CDD (Marchler-Bauer et al., 2005), la proteïna presenta una predicció de domini N-terminal SRS d'unió a l'ARNt i de domini catalític SRS, així com dels tres motius (motius 1, 2 i 3) característics de les aminoacil-ARNt sintetases de classe II (Eriani et al., 1990) (consulteu l'apartat 1.2.2). Segons el programa COILS (Lupas et al., 1991), el domini N-terminal presenta l'estructura en *coiled-coil* característica de les SRS (vegeu l'apartat 1.2.6 i la figura 1.5). El model d'estructura 3D (tridimensional) generat a través del servidor Phyre (Kelley i Sternberg, 2009) mostra una estructura general del centre catalític conservada, mentre que l'estructura 3D de la regió N-terminal no es pot predir per la seva baixa identitat amb seqüències de SRS d'estructura 3D coneguda (vegeu el panell superior de la figura 4.2).

El gen CG4938 (FBgn0021750), localitzat al cromosoma 3R, dona lloc a una proteïna més curta, de 417aa, que segons la base de dades CDD presenta conservació del domini catalític SRS amb els tres motius típics d'aaRS de classe II, però no es prediu el domini N-terminal d'unió a l'ARNt ni tampoc una estructura N-terminal en *coiled-coil* pel programa COILS. El model Phyre d'estructura en 3D també mostra un elevat grau de conservació del domini catalític, però, de nou, no permet predir l'estructura del fragment N-terminal (consulteu el panell central de la figura 4.2).

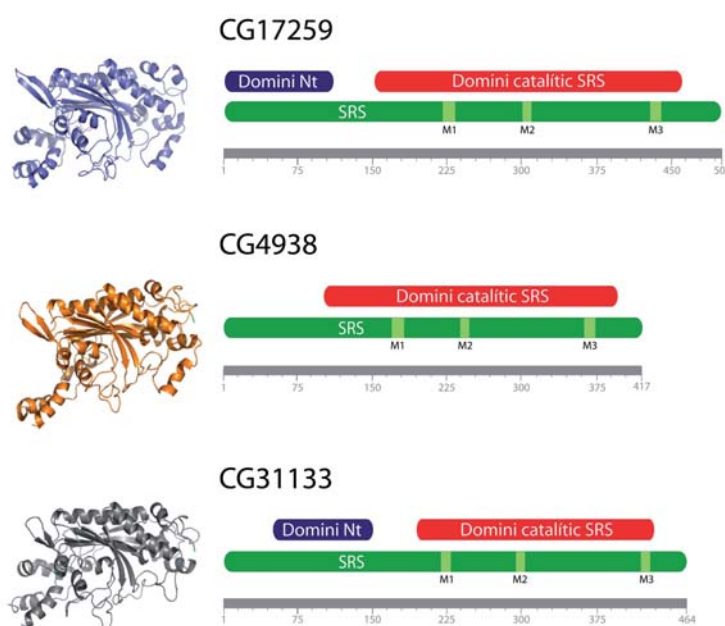


Figura 4.2 Models d'estructura 3D i conservació de dominis de les tres possibles *DmsRS*. El model 3D de cada proteïna es representa a l'esquerra i, de forma esquemàtica, es mostren els dominis N-terminal i catalític conservats de SRS. Els tres motius propis d'aaRS de classe II s'indiquen en verd pàl·lid com a M1, M2 i M3.

El gen CG31133 (FBgn0051133) es localitza al cromosoma 3R i codifica una proteïna de 464aa, que presenta un domini catalític SRS amb els motius d'aaRS de classe II ben conservats segons la base de dades CDD. El domini N-terminal d'unió a l'ARNt també està conservat segons la base de dades CDD i té una predicció d'estructura en *coiled-coil* segons el programa COILS. El model d'estructura tridimensional no permet predir la regió N-terminal, però el domini catalític està prou conservat com per generar el model tridimensional basat en seril-ARNt sintetases, tot i que aquest presenta diferències substancials amb altres SRS (per a més informació consulteu l'apartat 4.1.7).

El conjunt de dades obtingudes de l'estudi bioinformàtic de les tres seqüències semblants a SRS permet concloure que, excepcionalment, *D. melanogaster* presenta tres gens (CG17259, CG4938 i CG31133) que, aparentment, codifiquen tres seril-ARNt sintetases.

4.1.3 Existeixen seqüències homòlogues per a totes tres possibles SRS en insectes

Mitjançant alineaments BLAST (Altschul et al., 1990) amb les tres proteïnes predites com a SRS, es van recuperar seqüències homòlogues a cada una d'elles en totes les espècies d'insectes, el genoma de les quals estava parcial o totalment seqüenciat en el moment que es va realitzar la cerca, i també en l'aràcnid *Ixodes scapularis* (paparra del cérvol) i l'equinoderm *Strongylocentrotus purpuratus* (eriçó de mar).

Les espècies que presenten homòlegs a les tres proteïnes de *Drosophila melanogaster* codificades per CG17259, CG4938 i CG31133 són: *Strongylocentrotus purpuratus* (eriçó de mar; Echinoida), *Ixodes scapularis* (paparra del cérvol; Ixodida), *Drosophila ananassae*, *Drosophila pseudoobscura*, *Drosophila willistoni*, *Drosophila sechellia*, *Drosophila yakuba*, *Drosophila erecta*, *Drosophila persimilis*, *Drosophila mojavensis*, *Drosophila virilis*, *Drosophila grimshawi* (mosques drosòfila; Diptera), *Anopheles gambiae* (mosquit anòfel; Diptera), *Tribolium castaneum* (escarabat de la farina; Coleoptera), *Nasonia vitripennis* (vespa; Hymenoptera), *Apis mellifera* (abella europea; Hymenoptera), *Pediculus humanus* (poll humà; Phthiraptera), i *Acyrtosiphon pisum* (pugó; Hemiptera).

Algunes espècies com *Culex quinquefasciatus* (mosquit domèstic tropical; Diptera) i *Drosophila simulans* (mosca drosòfila; Diptera) presenten homòlegs a les seqüències CG4938 i CG31133, però la seqüència homòloga a CG17259 resta incompleta. En *Aedes aegypti* (mosquit de la febre groga; Diptera) i *Bombyx mori* (cuc de seda; Lepidoptera) trobem les seqüències homòlogues a CG17259 i CG31133, però la seqüència CG4938 està incompleta. Actualment, la limitada informació genòmica existent no permet un estudi detallat de la distribució de les tres proteïnes en altres espècies d'artròpodes i invertebrats.

El nivell d'identitat de les seqüències homòlogues a CG17259 de les diferents espècies és sempre superior al 62%, de les homòlogues a CG4938 és major al 46% i de les seqüències semblants a CG31133 el grau de conservació és menor, essent sempre superior a un 24%.

La situació singular observada en *D. melanogaster* que posseeix tres possibles seril-ARNt sintetases, no és exclusiva d'aquesta espècie, sinó que ocorre en totes les espècies d'insectes analitzades fins al moment, en una espècie d'aràcnid i en l'eriçó de mar.

4.1.4 Les tres possibles SRS tenen localitzacions subcel·lulars diferents

Per tal de predir la localització subcel·lular de les tres proteïnes codificades per CG17259, CG4938 i CG31133 de *D. melanogaster* s'empren diferents programes informàtics en xarxa (consulteu la taula 4.1). MitoProt (Claros i Vincens, 1996) prediu la probabilitat que una proteïna

sigui transportada al mitocondri, si existeix un lloc de tall del pèptid senyal i, si és així, la seqüència del pèptid. Predotar (Small et al., 2004) calcula la probabilitat de localització subcel·lular al mitocondri, al RE (reticle endoplasmàtic) o a qualsevol altre compartiment. PSORT II (Horton i Nakai, 1997) prediu la localització a diferents compartiments subcel·lulars de seqüències d'animals i de llevats. Finalment, iPSORT (Bannai et al., 2002) prediu la presència i la seqüència de pèptids de senyalització mitocondrial N-terminals.

Taula 4.1 Predicció de localització subcel·lular

Seqüència	Programa en xarxa			
	MitoProt	Predotar	PSORT II	iPSORT
CG17259	Probabilitat: 1,39% Lloc de tall: NO	Mitocondri: 0% RE: 1% Altres: 99% Predicció: no mitocondrial	Mitocondri: 8,7% Citoplasma: 78,3% Nucli: 13%	Mitocondrial: NO Pèptid senyal: NO
CG4938	Probabilitat: 64,07% Lloc de tall: SÍ MKLPTNSQLWRPLLLRRQ	Mitocondri: 83% RE: 1% Altres: 16% Predicció: mitocondrial	Mitocondri: 65,2% Citoplasma: 17,4% Nucli: 17,4%	Mitocondrial: SÍ Pèptid senyal: MKLPTNSQLWRPLLL LRRQRSHDAKAVEAP
CG31133	Probabilitat: 93,96% Lloc de tall: SÍ MLSLRSVLKHCLSAKKTCSRNISALYITG	Mitocondri: 47% RE: 1% Altres: 53% Predicció: possiblement mitocondrial	Mitocondri: 47,8% Citoplasma: 26,1% Nucli: 17,4% Membrana: 4,3% RE: 4,3%	Mitocondrial: SÍ Pèptid senyal: MLSLRSVLKHCLSAK KTCSRNISALYITGD

Les prediccions obtingudes dels diferents programes de determinació de localització subcel·lular suggereixen que CG17259 codifica la seril-ARNt sintetasa citoplasmàtica (que d'ara en endavant serà anomenada *DmSRS1*) i que CG4938 i CG31133 donen lloc a dues possibles SRS de localització mitocondrial.

4.1.5 L'anàlisi filogenètica confirma la localització predita per a les tres SRS

Per realitzar l'estudi filogenètic s'utilitzen seqüències proteiques de seril-ARNt sintetases de diferents espècies de bacteris, arqueobacteris i eucariotes que inclouen també seqüències mitocondrials (procediment detallat a l'apartat 3.1.2).

Els arbres filogenètics realitzats mitjançant els mètodes de distància, màxima parsimònia i màxima versemblança, agrupen de forma clara en tres clades diferents les seqüències proteiques homòlogues als productes dels gens CG17259 (*DmSRS1*), CG4938 i CG31133 (consulteu la figura 4.3).

Com ja s'havia predit anteriorment mitjançant programes de determinació de localització subcel·lular (vegeu l'apartat 4.1.4), *DmSRS1* i els seus homòlegs són proteïnes citoplasmàtiques perquè s'agrupen amb d'altres SRS eucariotes citoplasmàtiques i el clade s'ubica proper al grup d'arqueobacteris. Per altra banda, apareixen dos grups separats corresponents als homòlegs dels

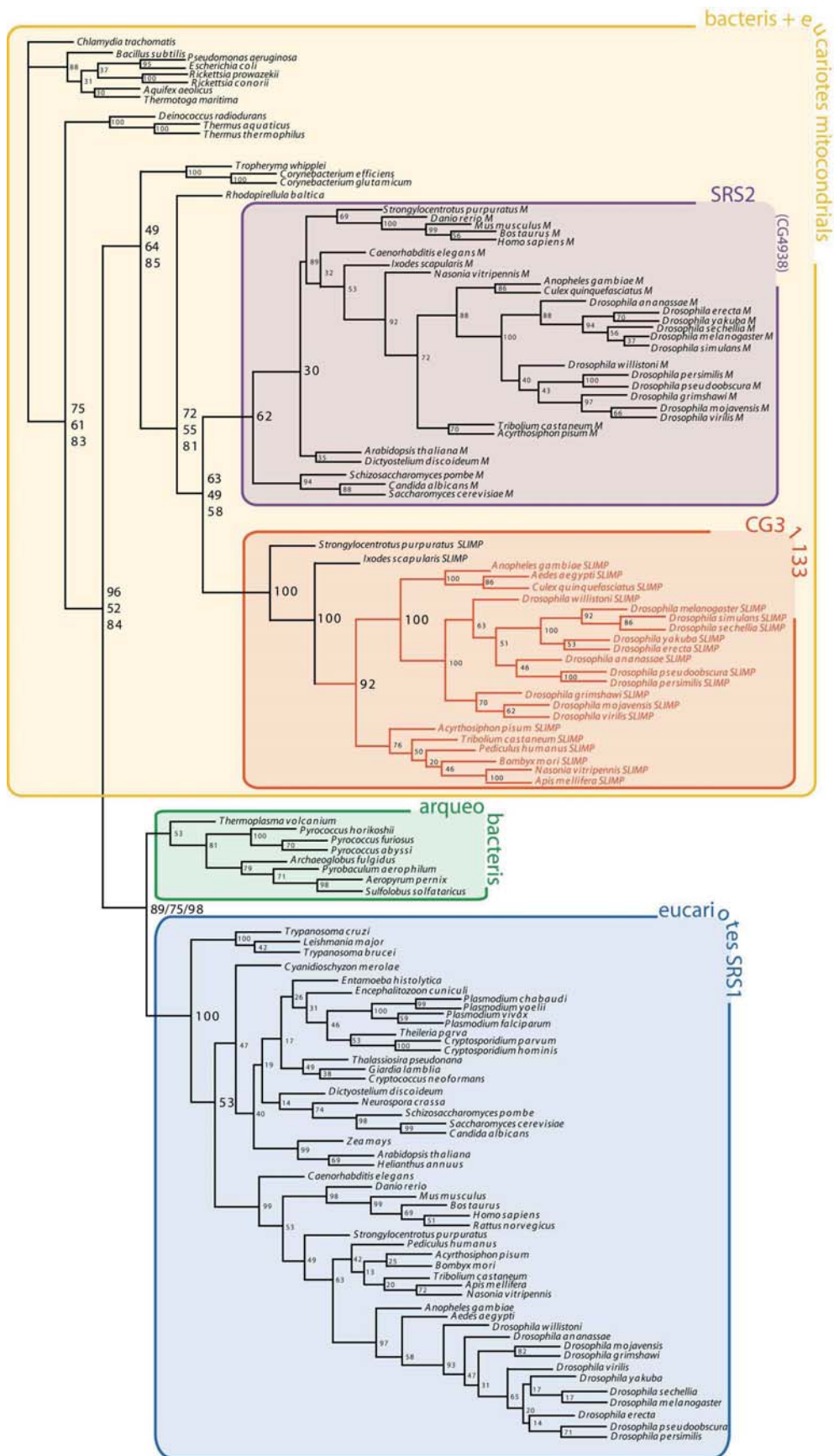


Figura 4.3 Distribució filogenètica de SRS. Arbre construït pel mètode de màxima versemblança, les branques generals del qual són reproduïbles amb els mètodes de màxima parsimònia i distàncies. Els valors de *bootstrap* calculats pel mètode de distàncies, màxima parsimònia i màxima versemblança estan indicats en aquest ordre a les branques generals. La resta de valors corresponen als valors *bootstrap* calculats pel mètode de màxima versemblança. Els diferents grups taxonòmics s'enquadren en diferents colors i en taronja es marquen les espècies d'insectes que posseeixen seqüències homòlogues a CG31133.

productes de CG4938 i CG31133, propers a SRS bacterianes, posició que suggereix un origen mitocondrial de tots dos grups. La proteïna codificada per CG4938 i els seus homòlegs s'agrupen juntament amb altres SRS mitocondrials canòniques, fet que indica que aquest grup correspon, molt probablement, a seril-ARNt sintetases mitocondrials (SRS2). Per tant, d'ara en endavant, el producte del gen CG4938 serà designat com *DmSRS2*. Compartint un mateix ancestre amb el grup de SRS2, se separa el grup d'homòlegs al producte del gen CG31133, tan sols format per espècies d'insectes, la paparra del cérvol i l'eriçó de mar, confirmant, de nou, la localització mitocondrial d'aquestes proteïnes.

L'estudi filogenètic suggereix que *DmSRS1* és una seril-ARNt sintetasa citoplasmàtica, *DmSRS2* correspon a la seril-ARNt sintetasa mitocondrial i el producte del gen CG31133 és possiblement una proteïna mitocondrial homòloga a la *DmSRS2*.

4.1.6 L'arbre filogenètic de distàncies mostra la divergència evolutiva d'una de les possibles SRS mitocondrials

La figura 4.4 mostra un esquema de la filogènia realitzada amb el mètode de distàncies representada com a arbre sense arrel, on s'observa que el conjunt de proteïnes mitocondrials homòlogues al producte de CG31133 forma un clade que comparteix origen amb el grup de SRS2. Sembla que aquest clade prové d'una duplicació del gen ancestral de la SRS2 que aparegué aviat en l'evolució dels Eumetazous i que s'ha mantingut i fixat en el genoma d'insectes, de la paparra del cérvol i de l'eriçó de mar. El grup de proteïnes semblants al producte de CG31133 està caracteritzat per branques llargues i separades, fet que suggereix que ha patit una ràpida evolució tot divergint del grup de seril-ARNt sintetases mitocondrials canòniques (SRS2).

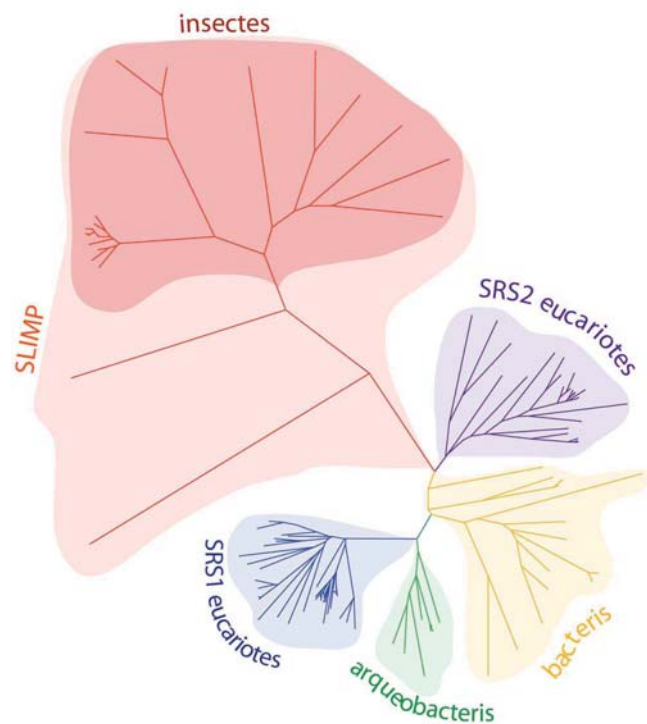


Figura 4.4 Arbre de distàncies de SRS. Arbre sense arrel realitzat pel mètode de distàncies, on es representen esquemàticament els diferents grups taxonòmics marcats amb diferents colors. La llargada de les branques representa la distància evolutiva de les diferents espècies.

Els resultats obtinguts suggereixen dues possibles hipòtesis per a la divergència d'aquest grup evolutiu: el clade pot correspondre a un grup de possibles seril-ARNt sintetases mitocondrials específiques d'insectes, de la paparra del cérvol i de l'eriçó de mar, o bé de proteïnes similars a seril-ARNt sintetases mitocondrials que puguin haver variat la seva funcionalitat en aquestes

espècies. Tenint en compte aquesta informació, d'ara en endavant la proteïna codificada per CG31133 serà anomenada SLIMP (*seryl-tRNA synthetase-like insect mitochondrial protein*; proteïna d'insecte similar a seril-ARNt sintetasa mitocondrial).

4.1.7 SLIMP no presenta conservació en els residus del centre catalític

A través de l'estudi filogenètic realitzat anteriorment, la distància evolutiva detectada entre el grup de proteïnes SLIMP i el grup de seril-ARNt sintetases mitocondrials indueix a plantejar si també existeixen diferències funcionals entre SLIMP i *DmSRS2*. Per això, es realitza una anàlisi del nivell de conservació del domini catalític de totes dues proteïnes, tot comprovant el grau de manteniment dels residus aminoacídics del centre catalític que estarien involucrats en la reacció d'aminoacilació.

Es construeixen models tridimensionals basats en homologia de les proteïnes *DmSRS2* i SLIMP i els centres catalítics d'aquestes es comparen amb el centre catalític de l'estructura cristal·lina resolta de la seril-ARNt sintetasa mitocondrial de *Bos taurus* (*BtSRS2*; PDB ID: 1WLE) (Chimnaronk et al., 2005). Els models tridimensionals de la *DmSRS2* i de SLIMP se superposen a l'estructura de la SRS2 de *B. taurus* per tal de determinar els residus que interaccionarien amb el seril adenilat, alhora que es comproven per alineament múltiple de seqüències proteïques.

Com s'observa a la figura 4.5, l'estructura general del domini catalític de la proteïna *BtSRS2* presenta onze aminoàcids, les cadenes laterals dels quals estan implicades en la interacció directa amb el seril adenilat. Tan sols existeix un canvi aminoacídic en el centre catalític de la

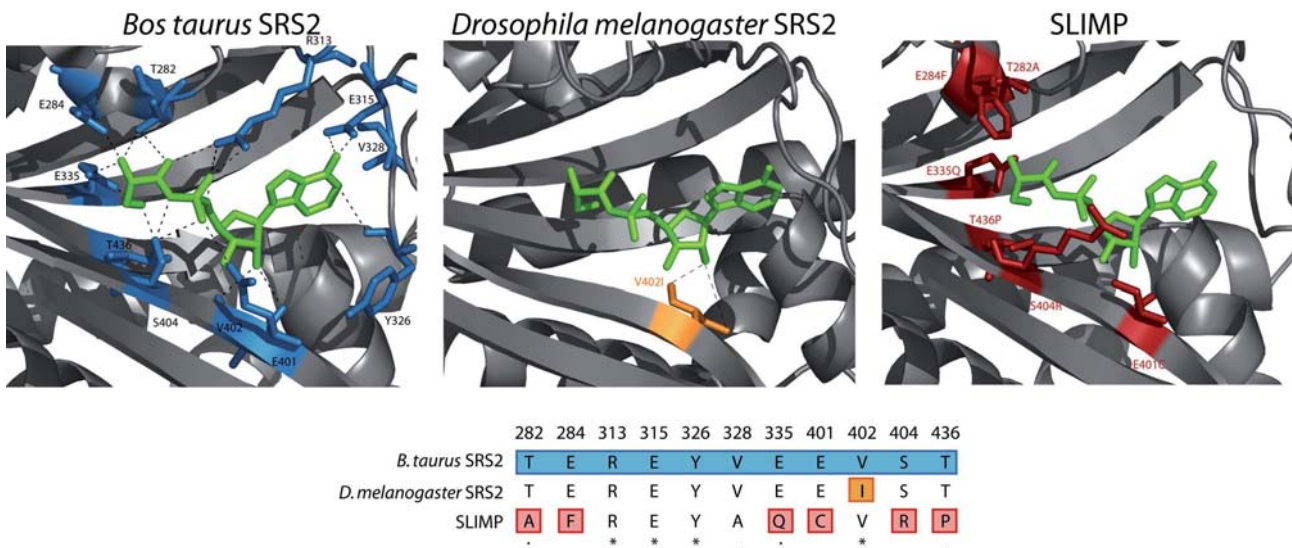


Figura 4.5 Estructura del centre catalític de *BtSRS2*, *DmSRS2* i SLIMP. Al panell esquerre es mostra l'estructura 3D de la SRS2 de *B. taurus* amb els 11 residus implicats en la interacció amb el seril adenilat marcats en blau. El panell central conté el model 3D del centre catalític de la *DmSRS2*, on, marcat en taronja, s'indica el canvi V402I que no afecta la interacció amb l'intermediari. Al panell dret es mostra el model 3D del domini catalític de SLIMP amb els 6 canvis aminoacídics que impedeixen la interacció amb el seril adenilat marcats en vermell. Al panell inferior es pot observar l'alineament parcial de les tres seqüències *BtSRS2*, *DmSRS2* i SLIMP. Els residus implicats en la interacció de la *BtSRS2* amb l'adenilat estan enquadrats en blau, els residus que no afecten la unió amb l'intermediari es mostren en taronja i els aminoàcids que impedeixen la interacció amb l'adenilat es mostren en vermell.

DmSRS2, que correspon a la substitució V402I. Aquest canvi permet mantenir les dues interaccions de l'aminoàcid amb el seril adenilat, i la resta de residus es troben totalment conservats. En canvi, *SLIMP* presenta sis dels onze residus d'interacció no conservats (T282A, E284F, E335Q, E401C, S404R i T436P). Els residus mutats són físicament incompatibles amb els enllaços establerts entre les SRS2 i els seus substrats, especialment amb la part que inclou la porció serina.

El baix nivell de conservació del domini catalític de *SLIMP* posa de manifest que la proteïna no posseeix un centre catalític típic de SRS i suggereix que aquesta ha perdut la seva funció com a seril-ARNt sintetasa.

En conclusió, en *D. melanogaster* existeixen dues poblacions d'ARNt, una al citoplasma i una altra al mitocondri, que són substrats de dues maquinàries de traducció independents per a cada compartiment. Per tant, la situació esperada seria la presència d'una seril-ARNt sintetasa mitocondrial i una altra citoplasmàtica, però *D. melanogaster* posseeix tres proteïnes semblants a SRS amb localitzacions subcel·lulars diferents.

La proteïna *DmSRS1* correspondria a la seril-ARNt sintetasa citoplasmàtica, per la predicció de localització subcel·lular en aquest compartiment i per la seva distribució evolutiva propera a SRS citoplasmàtiques d'altres espècies.

DmSRS2 i *SLIMP* serien proteïnes de localització mitocondrial, a causa de la presència de pèptids de senyalització mitocondrial, com prediuen diversos programes bioinformàtics, i per la distribució d'aquestes als arbres filogenètics properes a espècies bacterianes. Tot i que totes dues proteïnes comparteixen un mateix ancestre, *DmSRS2* i *SLIMP* han divergit a nivell evolutiu i funcional.

Per una banda, com suggereix l'estudi filogenètic de distàncies, *SLIMP* pateix una taxa d'evolució ràpida separant-se del grup de SRS2 canòniques i, alhora, perd la major part de les interaccions entre els aminoàcids del seu centre catalític i el seril adenilat, indicant així una possible pèrdua de la funció seril-ARNt sintetasa. Aquestes observacions obren interrogants pel que fa a la funció de *SLIMP*, possiblement independent de la serilació mitocondrial. A la secció 4.3 d'aquest capítol s'analitzaran diversos aspectes bioquímics i funcionals d'aquesta nova proteïna.

Per altra banda, la *DmSRS2* correspondria a la seril-ARNt sintetasa mitocondrial canònica, ja que s'agrupa evolutivament amb SRS2 d'altres espècies i manté intactes les interaccions entre els residus del seu domini catalític i l'intermediari de la reacció d'aminoacilació. Un cop hem establert a través de mètodes computacionals que aquesta proteïna es probablement la SRS mitocondrial canònica de *D. melanogaster*, podem procedir, a la secció següent 4.2, amb la generació d'un model de malaltia humana de traducció mitocondrial mitjançant la manipulació de l'esmentada proteïna.

4.2 GENERACIÓ DE MOSQUES AMB UN TRASTORN EN LA SERILACIÓ MITOCONDRIAL

Com ja s'ha explicat al capítol introductori (vegeu l'apartat 1.3.4), les malalties mitocondrials humanes són un ampli grup d'afeccions generalment poc conegudes. Pel que fa a la maquinària de traducció genètica, s'han descrit mutacions en els ARNt i ARNr mitocondrials humans que estan vinculades a greus miopaties i encefalopaties, i certes mutacions en gens nuclears que codifiquen proteïnes de traducció genètica a l'òrgànul s'han relacionat amb malalties humanes, entre les quals consten algunes mutacions en aminoacil-ARNt sintetases mitocondrials (Edvardson et al., 2007; Scheper et al., 2007a; Riley et al., 2010). L'escassa informació disponible sobre les malalties de traducció genètica mitocondrial i, en concret, d'aquelles relacionades amb defectes del sistema d'aminoacilació d'ARNt mitocondrials, fa necessària la generació d'animals model per a la seva caracterització i per a la recerca de tractaments pal·liatius.

L'objectiu d'aquest capítol és la creació d'un model de malaltia mitocondrial humana en *Drosophila melanogaster*, tot pertorbant la maquinària de traducció genètica mitocondrial per mitjà de la manipulació del sistema de serilació en aquest òrgànul. Per tal d'afectar la serilació mitocondrial, es pretén generar mosques en què el grau d'expressió de la seril-ARNt sintetasa mitocondrial pateixi una davallada, tot fent ús de la tècnica de l'ARNi (ARN d'interferència). La caracterització del fenotip a nivell funcional, cel·lular i tissular associat al silenciament de la SRS mitocondrial de *D. melanogaster* pot aportar informació útil per al coneixement de malalties de traducció mitocondrial en humans.

4.2.1 La *DmSRS2* és una proteïna de localització mitocondrial

Com ja s'ha comentat a la secció anterior (vegeu la secció 4.1), l'anàlisi estructural i filogenètica indica que la proteïna *DmSRS2* correspon a la seril-ARNt sintetasa mitocondrial canònica de *D. melanogaster*. L'estudi bioinformàtic, a més, revela que la *DmSRS2* és una proteïna mitocondrial amb una predicció de pèptid N-terminal de senyalització a aquest òrgànul. Per corroborar els resultats de localització subcel·lular obtinguts *in silico*, es realitzen fraccionaments cel·lulars de cultius S2 (vegeu l'apartat 3.8.3) que permeten l'obtenció de la fracció citoplasmàtica i mitocondrial, seguits d'immunodetecció (consulteu l'apartat 3.6.8) de la proteïna *DmSRS2* amb anticossos específics.

El *western blot* realitzat amb un anticòs dissenyat per detectar la proteïna *DmSRS2* (vegeu el panell superior de la figura 4.6) mostra dos senyals de pes molecular diferent que, per la seva mobilitat electroforètica i la distribució a les diferents fraccions cel·lulars, permeten deduir que es tracta de dues versions de la proteïna *DmSRS2*: la versió sencera que inclou el pèptid de senyalització mitocondrial (*DmSRS2*, de mida predita ~47,9KDa) i la versió madura sense el pèptid senyal Nt (N-terminal) (Δ Nt-*DmSRS2*, de pes molecular predit ~45,6KDa). La fracció cel·lular total (T) presenta els senyals corresponents a les dues versions de la *DmSRS2*, a la fracció citoplasmàtica (C), tan sols es detecta la proteïna sencera *DmSRS2*, i a la fracció

mitocondrial (M) el senyal principal correspon a la proteïna Δ Nt-*DmSRS2*, tot i que la *DmSRS2* sencera també hi és present de forma minoritària. Aquest senyal minoritari, probablement, és degut a contaminació de contingut citoplasmàtic en aquesta fracció.

Per assegurar el correcte aïllament de la fracció mitocondrial, es realitza una immunodetecció amb un anticòs anti- β -ATPasa, que reconeix la subunitat β de l'ATP sintasa mitocondrial F_1 - F_0 -ATPasa, que sense la preseqüència de senyalització mitocondrial proposada per Peña i Garesse (Peña i Garesse, 1993) té un pes molecular aproximat de ~50,8KDa. El panell central de la figura 4.6 mostra que la tècnica de fraccionament cel·lular emprada permet l'aïllament d'una fracció citoplasmàtica (C) sense contaminació mitocondrial i l'obtenció d'una fracció enriquida en proteïnes mitocondrials (M).

Per últim, el tercer panell ensenya la tinció de proteïnes amb blau de Coomassie de les fraccions cel·lulars, de manera que es garanteix la presència i la integritat de les proteïnes sotmeses a la immunodetecció.

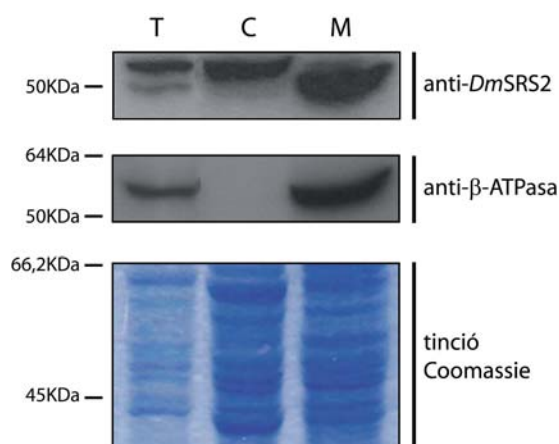


Figura 4.6 Localització subcel·lular de la *DmSRS2*. Immunodeteccions i tinció amb blau de Coomassie de la fracció total (T), citoplasmàtica (C) i mitocondrial (M) de cultius S2. Com a marcador mitocondrial s'utilitza un anticòs contra la subunitat β -ATPasa, que garanteix la correcta separació de la fracció mitocondrial.

Com ja s'ha mencionat a la introducció (vegeu l'apartat 1.3.2), les proteïnes mitocondrials codificades al genoma nuclear poden ser transportades al mitocondri de forma cotraduccional o posttraduccional. Per exemple, la subunitat β de l'ATPasa, utilitzada en aquest experiment com a marcador mitocondrial, mostra un sol senyal a les immunodeteccions, fet que suggereix l'import cotraduccional d'aquesta subunitat. Aquesta observació estaria en consonància amb diversos estudis publicats que determinen la localització de l'ARNm de la β -ATPasa proper als mitocondris (Egea et al., 1997; Ricart et al., 1997; Margeot et al., 2002), que en facilita la síntesi, la internalització i el processament del polipèptid naixent de manera simultània. En canvi, per a la *DmSRS2* coexisteixen dues versions de la mateixa proteïna dins la cèl·lula (sencera i truncada), fet que suggereix que aquesta proteïna és transportada de forma posttraduccional al mitocondri. És a dir, *DmSRS2* seria traduïda sencera al citoplasma on, unida a xaperones, seria posteriorment transportada fins al mitocondri. Durant la síntesi i el transport de la *DmSRS2*, la proteïna podria ser detectada al citoplasma per immunodetecció (carril C del panell superior). Un cop la proteïna fos transportada al mitocondri, tindria lloc l'escissió de la preseqüència N-terminal que donaria lloc a la proteïna madura, detectable a la fracció mitocondrial (carril M del panell superior).

En definitiva, mitjançant el fraccionament cel·lular de cultius S2 s'ha confirmat la localització mitocondrial de la seril-ARNt sintetasa 2 de *D. melanogaster* i s'han presentat indicis d'un possible mecanisme de transport posttraduccional de la proteïna al mitocondri.

4.2.2 Els transgens ARNi emprats per reduir l'expressió de la *DmSRS2* causen una davallada en els nivells d'ARNm que codifica la proteïna

Per tal de generar mosques *D. melanogaster* amb nivells reduïts de SRS2 per mitjà d'ARN d'interferència, s'empren diferents soques transgèniques ARNi que permeten l'expressió d'ARN de cadena doble capaços de degradar l'ARNm que codifica la proteïna *DmSRS2* (consulteu el subapartat 3.3.4.2). Els transgens ARNi utilitzats en aquest treball estan formats per dos fragments idèntics de l'ADNc de *DmSRS2*, disposats en orientació oposada al voltant d'un intró funcional (vegeu el subapartat 3.2.2.4).

S'utilitzen dos transgens ARNi diferents, dissenyats per tal que reconeixin regions diferents de l'ARNm de *DmSRS2*: un d'ells, de construcció pròpia, reconeix una regió de 543nt (de la posició 673 a la 1215) de l'ARNm de *DmSRS2* i està integrat dins les soques ARNi_{*DmSRS2* estoc 1} i ARNi_{*DmSRS2* estoc 1-dcr2}; l'altre té com a diana un fragment de 342nt (de la posició 216 a la 557) de l'ARNm de *DmSRS2* i es troba integrat dins la soca ARNi_{*DmSRS2* estoc 23003}, obtinguda a través del *Vienna Drosophila RNAi Center* (VDRC).

Amb l'objectiu de validar l'eficiència dels dos transgens que s'utilitzen per silenciar la *DmSRS2*, es mesura el nivell d'ARNm que codifica la *DmSRS2* a la descendència dels encreuaments de les soques ARNi_{*DmSRS2* estoc 1-dcr2} i ARNi_{*DmSRS2* estoc 23003} amb la soca actina 5C-GAL4 a 29°C i 25°C, respectivament (consulteu el subapartat 3.9.3.1). S'aïllen larves de tercer estadi que emergeixen dels esmentats encreuaments que no presenten el marcador *Tubby* (Tb) i que, per tant, contenen el transgèn actina 5C-GAL4. En aquestes larves, el factor de transcripció GAL4, que és expressat sota el control del promotor d'actina 5C, s'uneix a les seqüències UAS que precedeixen el transgèn ARNi, induint així la transcripció de forma constitutiva i ubiqua de l'ARN de cadena doble que té com a diana l'ARNm de *DmSRS2* (consulteu la figura 1.12). S'extreu l'ARN total de les larves, es realitza la transcripció inversa dels ARNm a ADNc i es quantifica l'abundància relativa de l'ADNc de *DmSRS2* normalitzada respecte a l'abundància d'un ADNc de referència (Rp49), mitjançant PCR quantitativa (qPCR) en temps real (consulteu els apartats 3.9.7 i 3.5.6).

Per tal de detectar els ADNc de *DmSRS2* i Rp49, s'empren dos parells d'oligonucleòtids (consulteu la taula 3.13) que, prèviament, són optimitzats (com s'explica al subapartat 3.5.6.1). Els experiments de qPCR en temps real es realitzen amb mostres de larves control (*w¹¹¹⁸*) i ARNi i, paral·lelament, s'amplifiquen reaccions on no s'ha dut a terme el procés de transcripció inversa, per tal de descartar contaminació per ADN genòmic. Per a tots els experiments realitzats, no s'ha detectat senyal fluorescent en les mostres sense ADNc, o bé els nivells

d'amplificació són tan baixos respecte a l'amplificació a les mostres que contenen ADNc, que poden ser negligits. D'aquesta manera es garanteix que l'amplificació obtinguda sigui deguda a la presència de l'ADNc d'interès.

Els resultats es representen a la figura 4.7 com a percentatges mitjans (de tres experiments independents) d'ARNm de *DmSRS2*, normalitzats per l'ARNm de referència (Rp49) i relatius a l'abundància en la mostra control.

En les larves que apareixen de l'encreuament entre les soques actina 5C-GAL4 i ARNi_{*DmSRS2* estoc 1-dcr2}, tot i presentar una còpia extra del gen *dicer-2* que s'expressa juntament amb l'ARN de cadena doble i ser mantingudes a 29°C per tal d'amplificar l'efecte de l'ARNi, els nivells d'ARNm de *DmSRS2* són d'un $79,65 \pm 4\%$. Malgrat la limitada eficiència d'aquest ARNi, la parcial davallada en els nivells d'ARNm en el tercer estadi de larva és suficient per causar efectes fenotípics en aquests individus (resultats que es detallen als apartats següents). No es pot descartar que, en estadis posteriors del cycle vital de *D. melanogaster*, la reducció en l'abundància d'ARNm no sigui més acusada, ja que la viabilitat

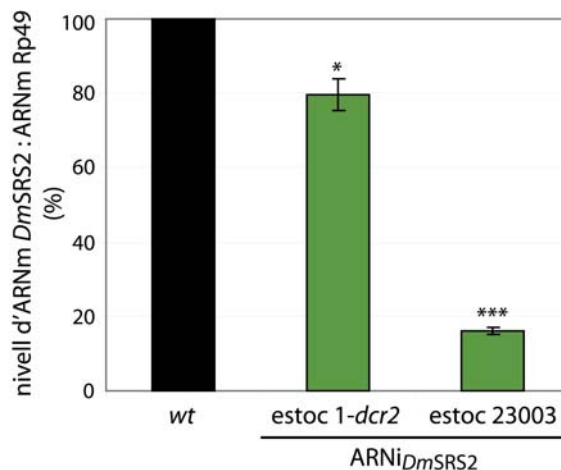


Figura 4.7 Reducció dels nivells d'ARNm de *DmSRS2*. Es mostra el percentatge mitjà \pm l'error estàndard d'ARNm de *DmSRS2* normalitzat per l'abundància d'un ARNm de referència (Rp49). Els valors obtinguts se sotmeten al test *t* de Student (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

en els estadis de pupa i d'adult es veu greument compromesa.

En canvi, les larves de tercer estadi que emergeixen de l'encreuament entre la soca actina 5C-GAL4 i la soca ARNi_{*DmSRS2* estoc 23003} presenten una abundància d'ARNm de *DmSRS2* d'un $16,27 \pm 0,99\%$, valor que representa una davallada molt significativa, tenint en compte que aquestes larves no contenen una còpia extra de *dicer-2* i que s'han mantingut a 25°C. Efectivament, l'ARN de cadena doble produït per la soca ARNi_{*DmSRS2* estoc 23003} té una eficiència molt superior a l'hora de degradar l'ARNm de *DmSRS2*.

El fet de disposar de dues soques ARNi amb eficiències molt diferents a l'hora de silenciar l'expressió de la *DmSRS2* suposa un avantatge per al nostre estudi, ja que ens permet investigar els efectes fenotípics produïts per diferents graus de depleció de la *DmSRS2*, com ocorre en moltes malalties mitocondrials humanes, que presenten diferents nivells de severitat i una elevada variabilitat en els símptomes associats a elles. A part, l'ús de dos transgens ARNi, de seqüència i procedència diferents, que proporcionin resultats reproduïbles avalen l'especificitat dels ARN de cadena doble per silenciar l'expressió de la *DmSRS2*.

En conclusió, els dos transgens ARNi escollits per silenciar la seril-ARNt sintetasa mitocondrial de *D. melanogaster* produeixen una davallada en els nivells d'ARNm que codifica la proteïna, amb diferents graus d'eficiència segons la soca i la seqüència utilitzada en cada experiment.

4.2.3 La manca de *DmSRS2* produeix una disminució en el nivell de serilació dels ARNt^{Ser} mitocondrials

Com s'ha explicat a l'apartat anterior, els dos transgens ARNi emprats per silenciar l'expressió de la proteïna *DmSRS2* són capaços de reduir-ne els nivells d'ARNm. Tot i així, és necessari comprovar si la davallada d'ARNm es tradueix en una reducció dels nivells de proteïna i, per tant, en una pèrdua de funció, és a dir, si els individus en què s'indueix l'ARNi pateixen una limitació en la capacitat de serilació.

Una de les tècniques que permeten detectar i quantificar el nivell d'ARNt aminoacilat és l'electroforesi d'ARN en gel de poliacrilamida àcid d'alta resolució seguida de *northern blot* d'ARNt (consulteu els apartats 3.5.3 i 3.5.4). Les condicions àcides en les quals es realitza l'electroforesi i les propietats d'alta resolució del gel de poliacrilamida permeten mantenir la unió entre els aminoàcids i els ARNt i, alhora, separar els ARNt aminoacilats dels desacilats. Posteriorment, mitjançant *northern blot* per incubació amb sondes específiques marcades radioactivament, es detecten els ARNt d'interès, es trobin aminoacilats o desacilats.

En primer lloc, es dissenyen sondes per tal de detectar els dos ARNt^{Ser} mitocondrials de *D. melanogaster* (*DmARNt^{Ser}* (GCU) i (UGA) mt) i es comprova l'especificitat d'aquestes pels ARNt d'interès en mostres d'ARN total o de fraccions cel·lulars de larves *w¹¹¹⁸* (consulteu l'apartat 3.9.6) per mitjà d'electroforesi d'ARN en gel de poliacrilamida estàndard (vegeu l'apartat 3.5.2) i *northern blot*. La figura 4.8 mostra els *northern blot* realitzats sobre una mateixa membrana de niló de forma successiva amb quatre sondes diferents sobre ARN total (T) i de fraccions mitocondrial (M) i citoplasmàtica (C). Com a control del correcte fraccionament cel·lular s'utilitzen sondes per reconèixer un ARNt citoplasmàtic (*DmARNt^{Sec}* (UCA)) (Lee et al., 1990) i un ARNt mitocondrial conegut (*DmARNt^{Lys}* (CUU) mt) (Tomita et al., 1999). També s'inclouen a l'experiment ARNt transcrits *in vitro* (vegeu l'apartat 3.5.1) per tal de testar la sensibilitat de les sondes contra els *DmARNt^{Sec}* (UCA), *DmARNt^{Ser}* (GCU) mt i *DmARNt^{Ser}* (UGA) mt, i com a referència de pes molecular.

El primer panell de la figura 4.8 correspon al *northern blot* realitzat amb la sonda contra el *DmARNt^{Sec}* (UCA), que demostra l'elevada especificitat d'aquesta per l'ARNt transcrit *in vitro* i, alhora, genera un senyal de la mida esperada (90nt) a les fraccions T, C i M, aquest últim, probablement, degut a contaminació de contingut citoplasmàtic a la fracció M.

El segon panell mostra el senyal obtingut amb la sonda que detecta el *DmARNt^{Lys}* (CUU) mt de ~74nt. El senyal es concentra majoritàriament a la fracció M, confirmant, així, l'enriquiment en mitocondris d'aquesta fracció.

El tercer panell mostra el *northern blot* dut a terme amb la sonda específica per al *DmARNt^{Ser}* (GCU) mt, on es detecten tant l'ARNt transcrit *in vitro* com l'ARNt natiu de la mida esperada (70nt) a la fracció M. Aquesta sonda també és capaç de reconèixer minoritàriament el *DmARNt^{Sec}* (UCA) transcrit *in vitro* de forma inespecífica, però no ho fa en les mostres d'ARN natiu.

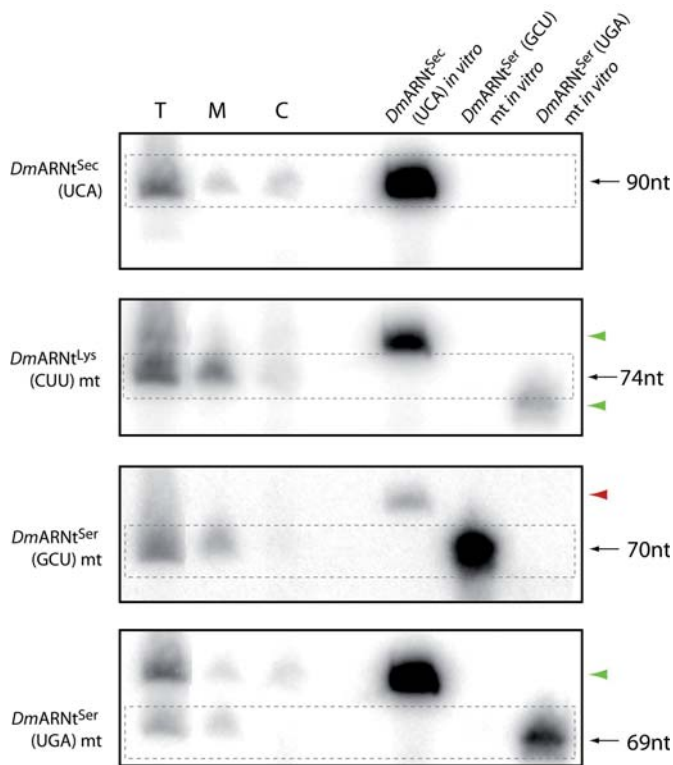


Figura 4.8 Anàlisi per *northern blot* de l'especificitat i la sensibilitat de les sondes emprades i distribució subcel·lular dels *DmARNt^{Ser} mt*. Els quatre panells corresponen a *northern blot* realitzats amb les sondes indicades a l'esquerra. En tots els casos, prèviament s'han sotmès a electroforesi en gel de poliacrilamida 30µg d'ARN total (T) i 8,2µg d'ARN de la fracció mitocondrial (M) i de la citoplasmàtica (C) provinents de larves *w¹¹¹⁸* i 10ng del *DmARNt^{Sec}* (UCA) o 20ng dels *DmARNt^{Ser}* (GCU) i (UGA) mt transcrits *in vitro*. Les fletxes negres amb el nombre de nucleòtids per a cada ARNt i els rectangles de línia discontinua marquen la posició dels ARNt d'interès en cada cas. La punta de fletxa vermella marca un senyal inespecífic i les puntes de fletxa verdes indiquen senyals romanents d'incubacions prèvies de la membrana amb altres sondes.

La capacitat de les dues sondes dissenyades contra els *DmARNt^{Ser}* (GCU) i (UGA) mt per detectar-los específicament permet dur a terme les electroforesis d'ARN en gel de poliacrilamida àcid d'alta resolució seguides de *northern blot* d'ARNt. La finalitat d'aquest experiment és determinar si les larves que pateixen el silenciament de la proteïna *DmSRS2* presenten una disminució específica dels nivells d'aminoacilació en els *DmARNt^{Ser}* (GCU) i (UGA) mt.

S'utilitza l'ARN total de larves de tercer estadi que apareixen dels encreuaments de les soques *ARNi_{DmSRS2} estoc 1-dcr2* i *ARNi_{DmSRS2} estoc 23003* amb la soca actina 5C-GAL4 a 29°C i 25°C, respectivament (consulteu el subapartat 3.9.3.1). Es mesuren els nivells d'ARNt aminoacilat i desacilat per al *DmARNt^{Ser}* (GCU) mt, *DmARNt^{Ser}* (UGA) mt i *DmARNt^{Lys}* (CUU) mt (com a control), en larves que no presenten el marcador *Tubby* (Tb) i, per tant, on l'ARNi està en funcionament (ON), i es comparen amb els nivells d'ARNt aminoacilat i desacilat d'aquelles larves on l'ARNi no està en funcionament (OFF) i que exhibeixen el marcador Tb.

En primer lloc, com s'observa al panell superior de la figura 4.9, mentre que el *DmARNt^{Lys}* (CUU) mt en larves Tb (OFF), utilitzades com a control, està aminoacilat gairebé en la seva totalitat, els dos *DmARNt^{Ser}* mt estan parcialment aminoacilats. El nivell d'aminoacilació basal per al *DmARNt^{Ser}* (GCU) mt està entorn del 65% i per al *DmARNt^{Ser}* (UGA) mt entorn del 55%. Per descartar que aquests nivells de serilació basal no són deguts al fons genètic del cromosoma

El quart panell ensenya com la sonda dissenyada per reconèixer el *DmARNt^{Ser}* (UGA) mt s'uneix específicament a l'ARNt transcrit *in vitro* i evidencia la presència de l'ARNt natiu de ~69nt a la fracció M.

L'anàlisi per *northern blot*, per una banda, garanteix el correcte funcionament de les sondes dissenyades tant amb els ARNt transcrits *in vitro* com amb els ARNt nadius que provenen d'extractes d'ARN de larves, pel que fa a la sensibilitat i l'especificitat i, per altra banda, permet corroborar que la localització dels *DmARNt^{Ser}* (GCU) i (UGA) mt és mitocondrial.

balancejador TM6B que posseeixen les larves control amb el marcador Tb, es quantifica el nivell d'aminoacilació també en larves *wt* w^{1118} , essent molt semblants al nivell obtingut en larves Tb (entorn del 51% per al *DmARNt^{Ser}* (GCU) mt i del 49,5% per al *DmARNt^{Ser}* (UGA) mt).

Quan l'ARNi està en funcionament (ON), s'observa una reducció de la intensitat de la banda corresponent al *DmARNt^{Ser}* mt aminoacilat i, alhora, un augment de la intensitat del senyal del

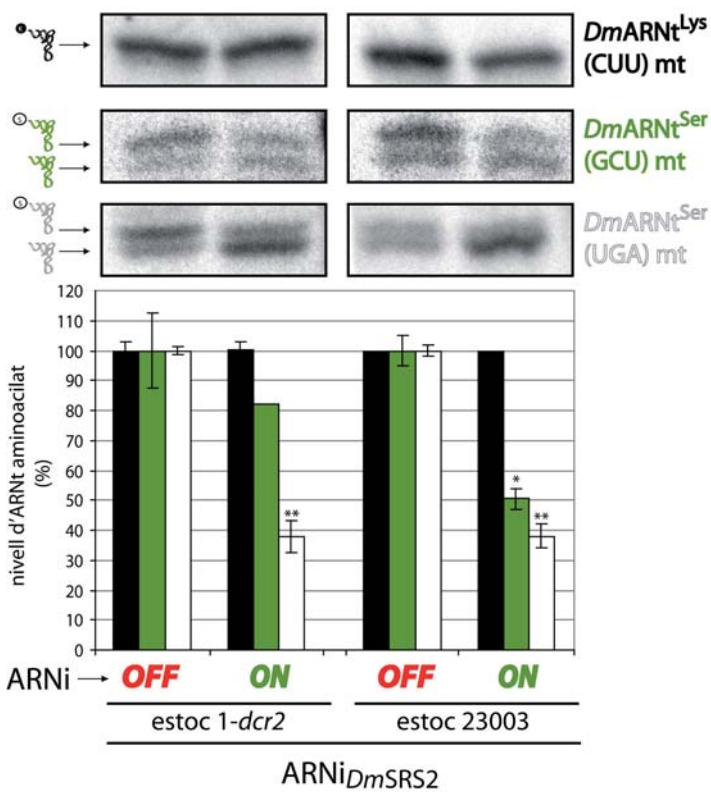


Figura 4.9 Determinació del nivell d'aminoacilació dels *DmARNt^{Ser}* (GCU) i (UGA) mt de larves ARNi per la *DmSRS2*. Es compara el grau d'aminoacilació de diferents ARNt a partir de mostres de 30µg d'ARN total de larves ARNi ON i OFF que provenen dels encreuaments de les soques ARNi_{*DmSRS2*} estoc 1-dcr2 i ARNi_{*DmSRS2*} estoc 23003 amb la soca actina 5C-GAL4 a 29°C i 25°C, respectivament. El panell superior presenta els *northern blot* realitzats amb sondes contra els *DmARNt^{Lys}* (CUU) mt (control), *DmARNt^{Ser}* (GCU) i (UGA) mt. Les bandes superiors corresponen a ARNt aminoacilats i les inferiors a ARNt desacilats. El gràfic inferior mostra la quantificació relativa del grau d'aminoacilació dels ARNt de larves ARNi ON, respecte al grau d'aminoacilació de larves ARNi OFF, que es considera el 100%. Les columnes representen el percentatge mitjà ± l'error estàndard de dos experiments independents, en negre es mostren els nivells de *DmARNt^{Lys}* (CUU) mt, en verd els de *DmARNt^{Ser}* (GCU) mt i en blanc els de *DmARNt^{Ser}* (UGA) mt. Els valors s'analitzen estadísticament amb el test *t* de Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

DmARNt^{Ser} desacilat per a tots dos isoacceptors, mentre que el *DmARNt^{Lys}* (CUU) mt no pateix variacions.

Els senyals corresponents als ARNt aminoacilats i desacilats es quantifiquen, i es representa el nivell d'ARNt aminoacilat relatiu al màxim, establert com el nivell d'aminoacilació en larves Tb (OFF), tal com es mostra al gràfic inferior de la figura 4.9. Les larves ARNi que procedeixen de l'encreuament entre les soques ARNi_{*DmSRS2*} estoc 1-dcr2 i actina 5C-GAL4 a 29°C mostren una disminució moderada de *DmARNt^{Ser}* (GCU) mt aminoacilat fins a un 82,1 ± 0,01%. En canvi, el nivell de *DmARNt^{Ser}* (UGA) mt aminoacilat es redueix fins a un 37,88 ± 5,3%. Les larves amb l'ARNi en funcionament que procedeixen de l'encreuament de la soca ARNi_{*DmSRS2*} estoc 23003 amb la soca actina 5C-GAL4 a 25°C pateixen una reducció significativa dels *DmARNt^{Ser}* (GCU) i (UGA) mt a nivells d'un 50,4 ± 3,31% i 38 ± 4,14%, respectivament.

Els resultats obtinguts, en primer lloc, indiquen que la proteïna *DmSRS2* és, efectivament, la seril-ARNt sintetasa mitocondrial de *D. melanogaster*, com ja s'havia predit mitjançant l'anàlisi bioinformàtica i filogenètica a la secció 4.1, ja que els seu silenciament mitjançant ARNi causa una reducció del grau d'aminoacilació dels ARNt^{Ser} mitocondrials de *D. melanogaster*. La davallada de la proteïna *DmSRS2*, probablement, es tradueix en una pèrdua de funció que afecta específicament els nivells d'aminoacilació dels dos isoacceptors *DmARNt^{Ser}* mt, especialment els nivells del *DmARNt^{Ser}* (UGA) mt en més d'un 60% per a les dues soques ARNi emprades. És

necessari esmentar que l'efecte observat en els nivells d'aminoacilació varia segons la soca ARNi utilitzada, i concorda amb el grau d'eficiència dels dos transgens ARNi utilitzats, que s'ha determinat a l'apartat 4.2.2.

4.2.4 La reducció constitutiva i ubiqua de la *DmSRS2* compromet la viabilitat en adults

Per tal d'estudiar els efectes del silenciament de la *DmSRS2* de manera generalitzada en la mosca del vinagre, s'indueix l'expressió dels ARN de cadena doble de forma constitutiva i ubiqua (consulteu el subapartat 3.9.3.1).

S'encreuen les soques ARNi_{*DmSRS2* estoc 1}, ARNi_{*DmSRS2* estoc 1-dcr2} i ARNi_{*DmSRS2* estoc 23003} amb la soca actina 5C-GAL4, tant a 25°C com a 29°C. Els individus que emergeixen dels encreuaments (vegeu la figura 3.1) poden contenir o no l'activador actina 5C-GAL4, així doncs, sorgeixen dos tipus de descendència: individus on l'ARNi està desactivat (*OFF*), que se seleccionen per la presència del marcador *Tubby* (Tb) en l'estadi larvari i *Humeral* (Hu) en l'estadi adult, i individus on l'ARNi està activat (*ON*) que no presenten marcadors. Es comptabilitza la progènie i es representa el percentatge de viabilitat dels individus que posseeixen la combinació del transgèn ARNi amb l'activador GAL4.

Com evidencia la figura 4.10, la viabilitat adulta de la descendència que prové de les tres soques ARNi encreuades amb la soca actina 5C-GAL4 es veu afectada a 25°C. De nou, s'observa una gradació de la intensitat de l'efecte fenotípic segons l'estoc utilitzat, de manera que utilitzant la soca ARNi_{*DmSRS2* estoc 1} la viabilitat adulta és del 26,4%, emprant la soca ARNi_{*DmSRS2* estoc 1-dcr2} la viabilitat adulta és del 21,8% i fent ús de la soca ARNi_{*DmSRS2* estoc 23003} és de l'1,4%. A 29°C, temperatura a la qual l'activitat de GAL4 és màxima (Duffy, 2002) i, en conseqüència, també ho és la producció dels ARN de cadena doble, l'efecte del silenciament de *DmSRS2* és total, amb un 0% de viabilitat adulta per a tots tres estocs.

El fet que es detecti una reducció de la viabilitat adulta en relació amb un increment de la temperatura, per a totes les soques, evidencia que el fenotip observat és conseqüència de l'efecte de l'ARNi sota el control del sistema UAS-GAL4, l'eficiència del qual depèn de la temperatura, i no

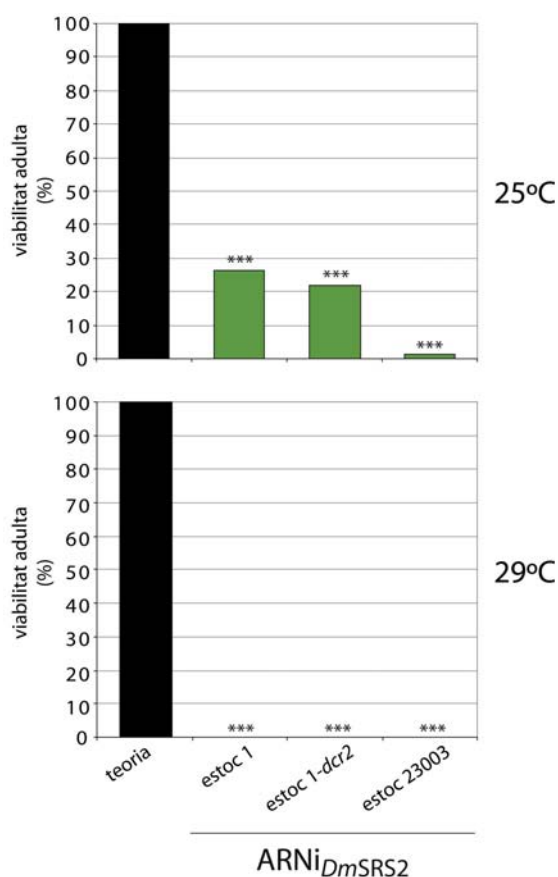


Figura 4.10 Viabilitat d'individus adults subjectes a la depleció ubiqua i constitutiva de la *DmSRS2*. Els gràfics representen el percentatge de viabilitat adulta de la progènie dels encreuaments de les soques ARNi_{*DmSRS2* estoc 1}, ARNi_{*DmSRS2* estoc 1-dcr2} i ARNi_{*DmSRS2* estoc 23003} amb la soca actina 5C-GAL4, respecte al nivell màxim teòric. El panell superior correspon als resultats a 25°C i l'inferior a 29°C. Es comptabilitzen >150 individus adults i els resultats se sotmeten al test estadístic χ^2 (***) $p < 0,001$.

és degut a un fenomen de mortalitat sintètica causada per la combinació de determinats transgens que, per la seva integració en punts crucials del genoma de *D. melanogaster*, comprometen la viabilitat adulta (Tucker i Fields, 2003).

La majoria dels individus amb el sistema ARNi funcional de forma ubiqua i constitutiva no superen l'estadi de pupa, a excepció dels individus que provenen de l'encreuament de la soca ARNi_{DmSRS2 estoc 23003} amb la soca actina 5C-GAL4 a 29°C, que no sobrepassen el segon estadi de larva.

Com es podia preveure, el silenciament de la proteïna *DmSRS2*, essencial com ho són totes les aminoacil-ARNt sintetases, produeix un efecte devastador en la viabilitat de l'organisme. Aquest efecte està vinculat al nivell de proteïna silenciada, que es tradueix en un determinat nivell d'ARNt^{Ser} aminoacilats disponibles per a la síntesi de proteïnes mitocondrials.

La tècnica d'ARN d'interferència combinada amb el sistema UAS-GAL4 permet controlar el nivell de silenciament de la proteïna d'interès, mitjançant l'ús de seqüències ARNi amb eficiències diferents i de condicions d'inducció de l'ARNi a través de promotors i temperatures de major o menor astringència. Atès que el silenciament generalitzat de la *DmSRS2* causa, en la major part dels casos, mortalitat en l'estadi de pupa, en els successius experiments és necessari utilitzar individus en l'estadi larvari, que tenen una reducció de la *DmSRS2* que encara permet la viabilitat, per tal d'estudiar els efectes del silenciament de la *DmSRS2*, o bé, induir l'ARNi de forma restringida en certs teixits de l'organisme que no comprometen la viabilitat.

4.2.5 La disminució de la *DmSRS2* a l'ala produeix conseqüències greus en el desenvolupament de l'òrgan

La inducció restringida de l'ARNi en òrgans i teixits concrets permet investigar els efectes fenotípics de la depleció de la *DmSRS2* sense afectar, en general, la viabilitat de la mosca adulta. Per tal d'activar el silenciament en el teixit d'ala, s'utilitzen dues soques que expressen el factor de transcripció GAL4 sota els promotors/estimuladors dels gens *nubbin* i *patched* (consulteu el subapartat 3.9.3.2).

El gen *nubbin* (*nub* o *pdm-1*) codifica una proteïna involucrada, des del segon estadi larvari, en el desenvolupament de l'ala de *D. melanogaster*, i és expressada de forma localitzada al primordi del disc imaginal d'ala (*wing pouch*) en larves i a la fulla i frontissa de l'ala adulta (Ng et al., 1995).

Quan s'encreuen les soques ARNi_{DmSRS2 estoc 1} i ARNi_{DmSRS2 estoc 23003} amb la soca *nubbin-GAL4-UAS-dcr2* es produeixen dos tipus de descendència (consulteu la figura 3.2): un tipus que no conté els transgens *nubbin-GAL4* i *UAS-dcr2*, que es caracteritza per la presència dels marcadors adults CyO i Hu, on l'ARNi està desactivat (*OFF*), i l'altre tipus que conté l'activador *nubbin-GAL4*, que cosegrega amb *UAS-dcr2* sense cap marcador associat, on l'ARNi està en funcionament (*ON*). Es

quantifica la progènie dels encreuaments a 25°C i 29°C i es determina la proporció d'adults amb l'ARNi actiu que presenten efectes fenotípics al teixit. Al panell esquerre de la figura 4.11 es mostren fotografies de mosques adultes i detalls d'ales afectades pel silenciament de la *DmSRS2*, on s'evidencia que, tot i que l'estructura general de l'òrgan està formada, falla el correcte desplegament de la fulla de l'ala.

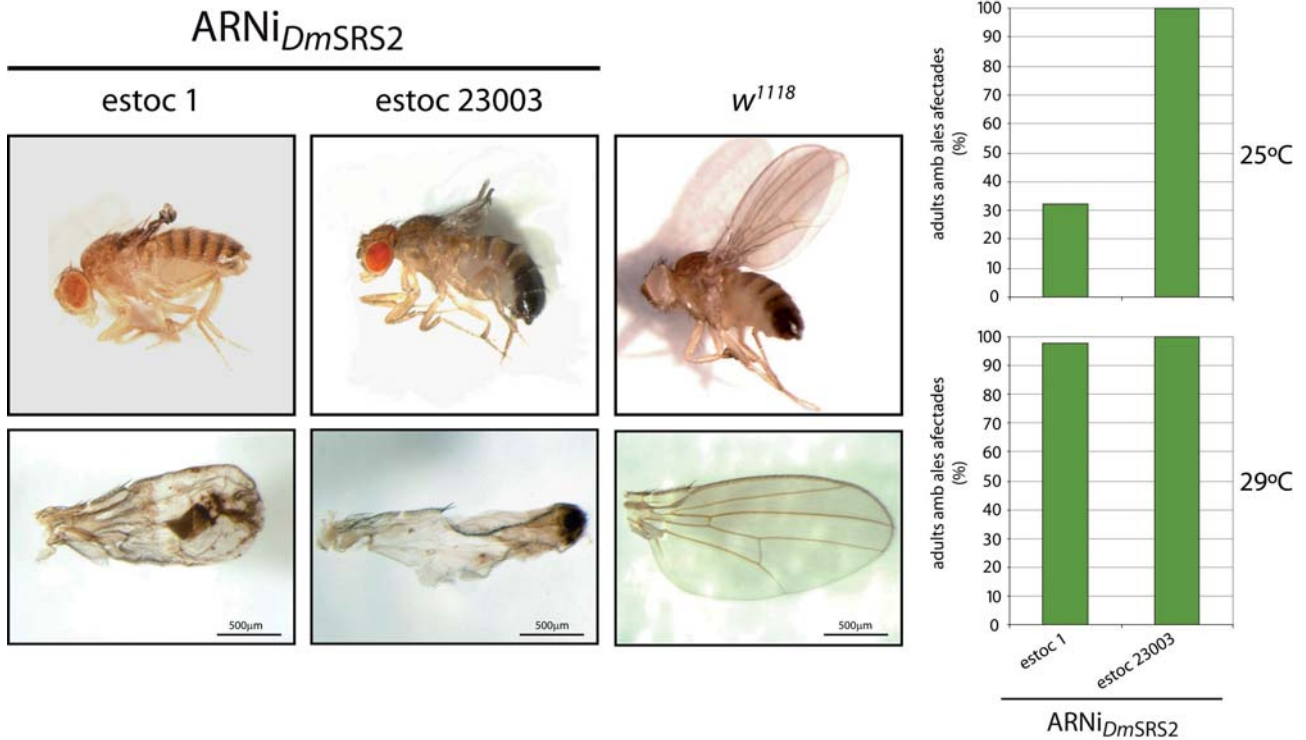


Figura 4.11 Efectes de la depleció de la *DmSRS2* a l'ala. El panell esquerre mostra imatges d'individus adults i detalls d'ales dels descendents dels encreuaments entre les soques ARNi_{DmSRS2} estoc 1 i ARNi_{DmSRS2} estoc 23003 amb la soca nubbin-GAL4-UAS-*dcr2* a 29°C i 25°C, respectivament, i de mosques *wt* (*w¹¹¹⁸*). Les barres d'escala representen 500µm. Els gràfics del panell dret mostren la proporció d'individus amb defectes a l'ala respecte al total d'individus que tenen actiu l'ARNi, a 25°C (gràfic superior) i a 29°C (gràfic inferior), per als encreuaments amb els dos estocs esmentats.

Els gràfics del panell dret de la figura 4.11 representen el percentatge d'adults que manifesten defectes a l'ala, relatiu al total d'individus que tenen el sistema ARNi en funcionament, a 25°C en el gràfic superior i a 29°C en el gràfic inferior, per a tots dos estocs ARNi testats. A 25°C, un 32,3% dels descendents amb l'ARNi funcional que procedeixen de les soques ARNi_{DmSRS2} estoc 1 i nubbin-GAL4-UAS-*dcr2* presenten fenotip a l'ala, mentre que en unes condicions més astringents, a 29°C, aquesta proporció augmenta fins a un 97,7%. Tota la progènie que prové de les soques ARNi_{DmSRS2} estoc 23003 i nubbin-GAL4-UAS-*dcr2* amb l'ARNi induït mostra defectes a l'ala, tant a 25°C com a 29°C.

Als apartats anteriors ja s'ha fet palès que la soca ARNi_{DmSRS2} estoc 23003 és la més eficient a l'hora de reduir els nivells d'ARNm de *DmSRS2*, tot afectant la funció de la proteïna i compromentent la viabilitat, no només adulta (a 25°C) sinó també larvària (a 29°C), quan s'indueix l'ARNi amb el promotor de l'actina 5C. En encreuar la soca ARNi_{DmSRS2} estoc 23003 amb la soca nubbin-GAL4-UAS-*dcr2* els descendents amb l'ARNi funcional contenen, a més, una còpia extra del gen *dicer-2* que

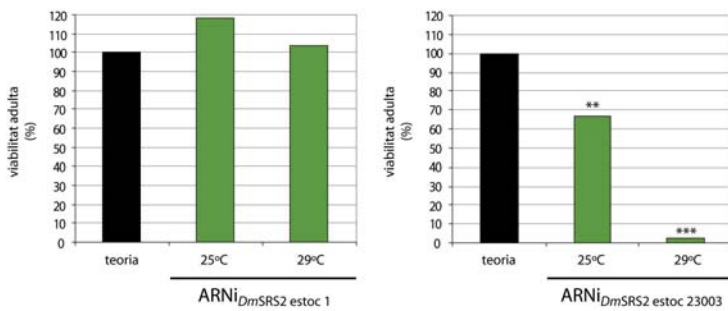


Figura 4.12 Efecte de l'ARNi de *DmSRS2* restringit en l'ala en la viabilitat adulta. El gràfics presenten el percentatge de supervivència d'adults amb l'ARNi actiu contra la *DmSRS2* a 25°C i a 29°C (columnes verdes), en comparació amb la viabilitat màxima teòrica (columnes negres). D'esquerra a dreta es mostren els resultats de la progènie de la soca nubbin-GAL4-UAS-*dcr2* encreuada amb les soques ARNi_{DmSRS2 estoc 1} i ARNi_{DmSRS2 estoc 23003}. Es compten >150 adults i els resultats se sotmeten al test estadístic χ^2 (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

(gràfic esquerre). Com s'ha mencionat anteriorment, la proteïna codificada pel gen *nubbin* està involucrada en el desenvolupament de l'ala, però s'han determinat també altres funcions i localitzacions de *nubbin*, entre elles, el seu rol en el desenvolupament neuronal en estadis embrionaris (Isshiki et al., 2001; Brody i Odenwald, 2002). L'ús d'una soca ARNi d'elevada eficiència combinada amb condicions extremament astringents (temperatura elevada i presència de *dicer-2*) podria estar produint la degradació de l'ARNm de *DmSRS2* en neuroblasts d'embrió. Aquesta hipòtesi explicaria l'elevada mortalitat obtinguda en la descendència de l'encreuament entre les soques ARNi_{DmSRS2 estoc 23003} i nubbin-GAL4-UAS-*dcr2*, ja que la manca d'un element implicat en la traducció genètica mitocondrial, com és la *DmSRS2*, pot alterar el desenvolupament de les cèl·lules del sistema nerviós central de *D. melanogaster* afectant la viabilitat de l'individu.

Un cop s'ha analitzat l'efecte del silenciament de la *DmSRS2* seguint el patró del gen *nubbin*, es procedeix amb la soca patched-GAL4, que presenta un perfil d'expressió més restringit, que permet millorar la definició de la zona afectada per l'ARNi i dur a terme estudis més detallats dels efectes de la deficiència de la *DmSRS2* a nivell cel·lular. El gen *patched* (*ptc*) és necessari per al desenvolupament dels segments de *D. melanogaster* des de l'estadi embrionari (Hooper i Scott, 1989). A partir d'estadis larvaris, *patched* és expressat a la línia anteroposterior de tots els discs imaginals, entre ells, el d'ala (Phillips et al., 1990). Quan s'encreua a 29°C la soca homocigota patched-GAL4 amb les soques ARNi_{DmSRS2 estoc 1}, ARNi_{DmSRS2 estoc 1-dcr2} i ARNi_{DmSRS2 estoc 23003} (consulteu la figura 3.3) tota la progènie que apareix té l'ARNi contra la *DmSRS2* activat a la línia anteroposterior del disc imaginal d'ala, que dóna lloc a la zona limitada per les venes longitudinals L3 i L4 de l'ala adulta.

Com s'exposa al panell superior de la figura 4.13, per a tots tres estocs s'observa una reducció de l'àrea afectada per l'ARNi, especialment a la part més distal de l'ala, i una pèrdua total o parcial de l'acv (*anterior cross vein*; vena anterior creuada) en una proporció del 0% quan s'utilitza la soca parental ARNi_{DmSRS2 estoc 1}, entorn del 4% quan s'usa la soca ARNi_{DmSRS2 estoc 1-dcr2}, i

al voltant del 15% si s'empra la soca $ARNi_{DmSRS2}^{estoc\ 23003}$. Es prenen imatges de 12-15 ales d'adults mascles i femelles per separat, ja que la grandària de l'ala varia segons el gènere, i es mesuren les àrees limitades per les venes L3 i L4 per tal de quantificar l'estrenyiment de la zona afectada per l'ARNi. Com es veu representat al gràfic inferior de la figura 4.13, la regió afectada pel silenciament de la *DmSRS2* pateix una reducció de l'àrea, amb valors del $98,20 \pm 2,18\%$ per a la soca $ARNi_{DmSRS2}^{estoc\ 1}$, del $88,58 \pm 2,13\%$ per a la soca $ARNi_{DmSRS2}^{estoc\ 1-dcr2}$ i del $80,83 \pm 2,54\%$ per a la soca $ARNi_{DmSRS2}^{estoc\ 23003}$, comparant-les amb les àrees L3-L4 d'ales de mosques control patched-GAL4.

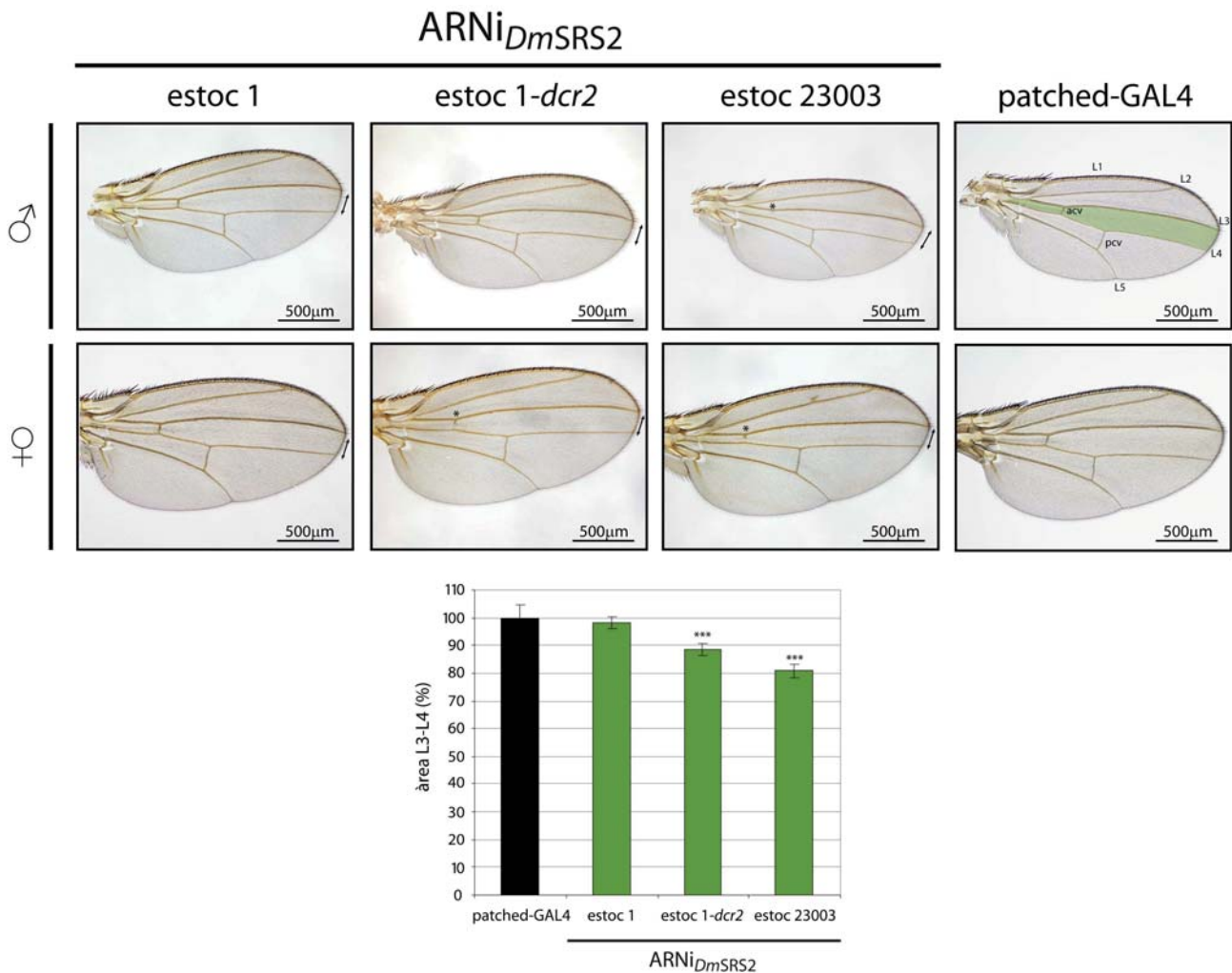


Figura 4.13 Efecte del silenciament de la *DmSRS2* restringit a la zona limitada per les venes longitudinals d'ala L3 i L4. El panell superior presenta fotografies d'ales de mascles i femelles descendents dels encreuaments entre la soca patched-GAL4 i les soques $ARNi_{DmSRS2}^{estoc\ 1}$, $ARNi_{DmSRS2}^{1-dcr2}$ i $ARNi_{DmSRS2}^{23003}$ a 29°C, i de mosques control (patched-GAL4). A la imatge superior dreta s'indiquen les venes longitudinals L1, L2, L3, L4 i L5, les venes anterior (acv) i posterior (pcv) creuades i en color verd, la regió d'actuació de l'ARNi. Les barres d'escala representen 500µm, les fletxes negres senyalen la reducció de l'àrea L3-L4 i els asteriscs marquen la pèrdua total o parcial de l'acv. El gràfic del panell inferior mostra els resultats de les mesures de les àrees L3-L4 de la progènie afectada per l'ARNi (columnes verdes) respecte a les àrees control (columna negra) d'encreuaments a 29°C. Les columnes representen la mitjana en percentatge ± l'error estàndard. Els resultats se sotmeten al test estadístic *two-way ANOVA* (***) $p < 0,001$.

Amb l'objectiu de determinar si l'efecte del silenciament de la *DmSRS2* influencia regions contigües a la zona L3-L4, es mesuren també les àrees flanquejades per les venes longitudinals L2-L3 per a tots tres estocs utilitzats anteriorment, i es comparen de nou amb les àrees control

d'ales patched-GAL4. L'àrea mesurada, calculada en percentatge, és del $103 \pm 2,4\%$ per a la soca $ARNi_{DmSRS2 \text{ estoc } 1}$, del $97,39 \pm 2,5\%$ per a la soca $ARNi_{DmSRS2 \text{ estoc } 1-dcr2}$ i del $94,29 \pm 3,15\%$ per a la soca $ARNi_{DmSRS2 \text{ estoc } 23003}$, valors no significativament diferents respecte a l'àrea control. Aquestes dades permeten concloure que l'ARNi contra la *DmSRS2* té un efecte autònom cel·lular.

Per tal d'esbrinar l'origen de la reducció de l'àrea entre les venes L3 i L4, es fa una mesura representativa de la densitat cel·lular d'aquesta regió a 24-26 ales d'adults que apareixen de l'encreuament de la soca patched-GAL4 amb la soca $ARNi_{DmSRS2 \text{ estoc } 23003}$, i es compara amb la densitat cel·lular de les ales control patched-GAL4. La densitat cel·lular en ales ARNi és de $10,76 \pm 0,15$ cèl·lules/100 μm i no presenta diferències significatives amb la densitat de $10,95 \pm 0,15$ cèl·lules/100 μm en ales control patched-GAL4, per tant, es pot deduir que hi ha una reducció en el nombre de cèl·lules de la regió i no una disminució de la superfície cel·lular.

En definitiva, l'expressió restringida de l'ARN de cadena doble dirigit contra l'ARNm de *DmSRS2* a l'òrgan d'ala de *D. melanogaster* produeix greus defectes en el desenvolupament del teixit tot causant una reducció en el nombre de cèl·lules.

4.2.6 El descens en els nivells de *DmSRS2* afecta la morfologia mitocondrial

Un cop estudiats els efectes tissulars com a conseqüència de la interferència de la *DmSRS2* i després d'haver determinat que la *DmSRS2* és una proteïna essencial de localització mitocondrial, es pretén investigar els efectes del silenciament a nivell subcel·lular analitzant la morfologia mitocondrial per mitjà de MET (microscòpia electrònica de transmissió).

Les mostres utilitzades corresponen a cossos adiposos extrets de larves de tercer estadi *wt* (w^{1118}) i de larves amb una inducció constitutiva i ubiqua de l'ARNi que procedeixen de l'encreuament de la soca actina 5C amb la soca $ARNi_{DmSRS2 \text{ estoc } 1-dcr2}$ a 29°C.

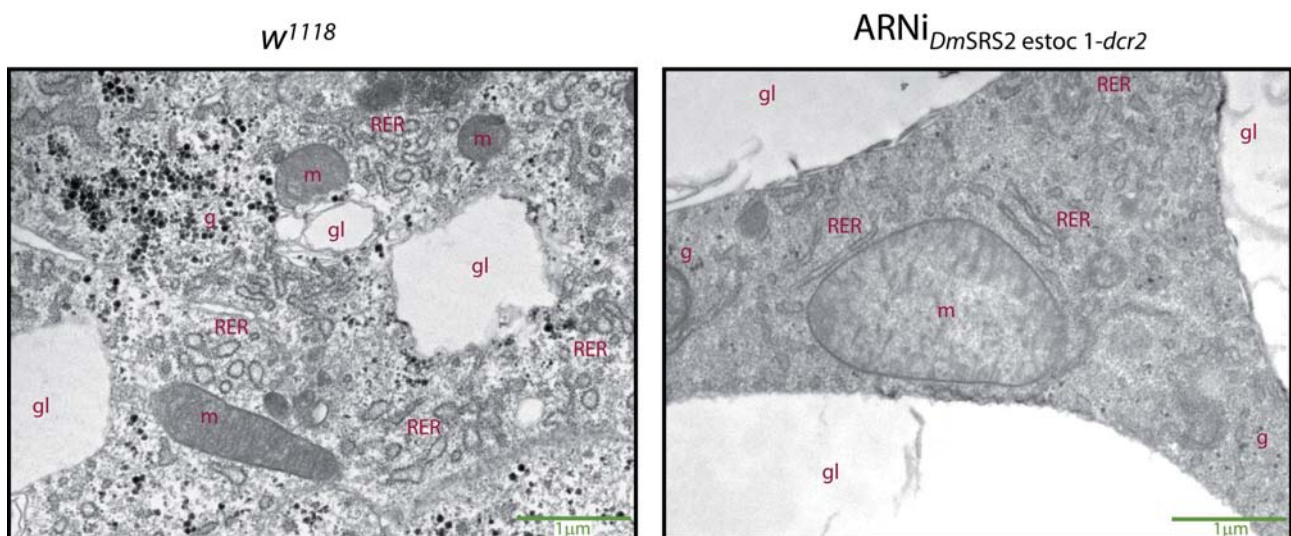


Figura 4.14 Ultraestructura d'adipòcits de larves de tercer estadi de *D. melanogaster*. S'exhibeixen imatges a 25.000X de la ultraestructura cel·lular d'adipòcits de larves *wt* (w^{1118}) a l'esquerra i de larves amb l'ARNi de *DmSRS2* induït de forma ubiqüa i constitutiva a la dreta. Amb caràcters de color granat se senyalen diverses estructures cel·lulars: gl, gotes lipídiques; RER, reticle endoplasmàtic rugós; g, glicogen i m, mitocondris. Les barres d'escala representen 1 μm .

En primer lloc, s'observa que totes dues mostres presenten un elevat grau de preservació de les estructures cel·lulars en general. Es pot observar a la figura 4.14 que les cèl·lules adiposes mostren gotes lipídiques (zones de baixa densitat electrònica) i grànuls de glicogen (punts d'elevada densitat als electrons), totes elles estructures característiques d'un teixit emmagatzemador d'energia com ho és l'adipós. També s'observa un citoplasma dens amb un elevat contingut de RER (reticle endoplasmàtic rugós) i mitocondris tallats en diferents plans.

Mentre l'estructura citoplasmàtica general es manté, la ultraestructura mitocondrial es veu greument afectada per la disminució dels nivells de *DmSRS2*. Com s'observa a la figura 4.15, els mitocondris de larves *wt* presenten matrius mitocondrials amb una elevada densitat als electrons, senyal d'un alt contingut en molècules a la matriu mitocondrial. D'altra banda, els mitocondris de larves actives per l'ARNi contra la *DmSRS2* tenen una matriu mitocondrial laxa i inflamada de baixa densitat electrònica. Els mitocondris *wt* presenten crestes que cobreixen tota la secció mitocondrial, en canvi, els mitocondris amb una reducció de la proteïna *DmSRS2* pateixen una pèrdua total o parcial d'estructures elaborades de la MMI, disminuint així la superfície total ocupada per crestes mitocondrials. Alguns mitocondris (fixeu-vos en els mitocondris de la segona i tercera renglera del panell inferior de la figura 4.15) mostren una pèrdua local de les crestes mitocondrials en regions que, alhora, pateixen una inflamació de la matriu mitocondrial, mentre que a l'altre extrem del mateix orgànul les crestes encara són normals.

A més, aquests mitocondris anormals mostren extensions, i pateixen un augment significatiu de la superfície mitocondrial (mitocondris mesurats $n=70-80$; *t de Student*: $p=0,0003$). La superfície mitocondrial mitjana en mostres *wt* és de $0,555 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$ i en mostres ARNi, aquesta superfície es veu incrementada al voltant d'un 65%, amb un valor mitjà de $0,920 \pm 0,08 \mu\text{m}^2$. La densitat mitocondrial també es veu influenciada pel silenciament de la *DmSRS2*, tot mostrant una tendència a l'augment, amb valors de $8,94 \pm 0,73$ mitocondris/ $100 \mu\text{m}^2$, que suposen un increment d'un 27,5% respecte a la densitat en larves control ($7,01 \pm 0,79$ mitocondris/ $100 \mu\text{m}^2$).

El silenciament de la seril-ARNt sintetasa mitocondrial de *D. melanogaster* produeix greus anormalitats morfològiques als mitocondris d'adipòcits de larves de tercer estadi.

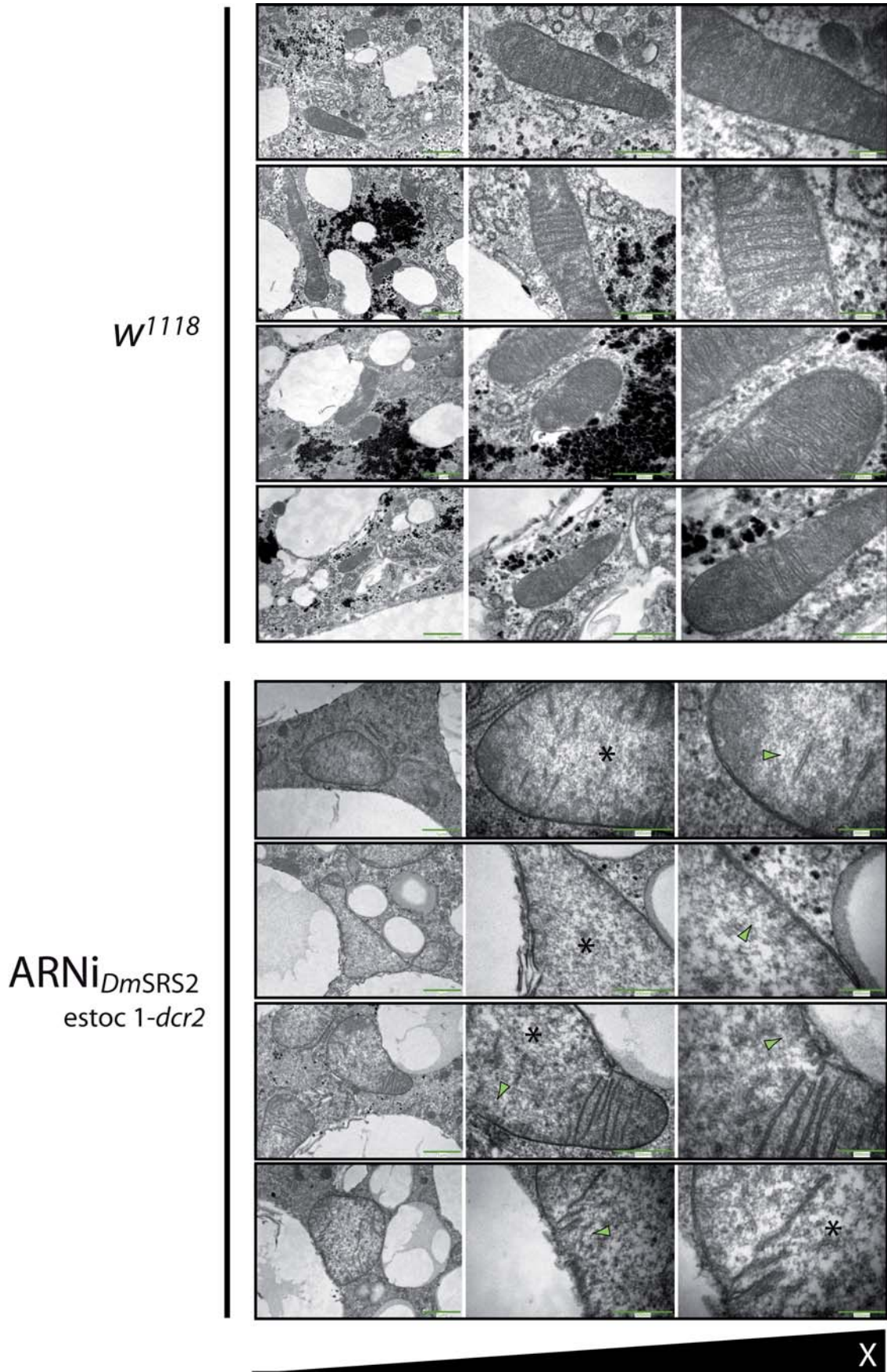


Figura 4.15 Conseqüències de la depleció de la *DmSRS2* en la morfologia mitocondrial. Es mostren micrografies electròniques de mitocondris d'adipòcits de larva, de menor a major augment amb barres d'escala que representen 1µm, 500nm i 200nm d'esquerra a dreta. El panell superior mostra mitocondris *wt* (*w¹¹¹⁸*) i, el panell inferior, mitocondris de larves de tercer estadi que procedeixen de l'encreuament entre la soca actina *5C-GAL4* i la soca *ARNi_{DmSRS2} estoc 1-dcr2* a 29°C. Els asteriscs indiquen zones de baixa densitat electrònica i els caps de fletxa senyalen regions amb pèrdua total o parcial de les crestes mitocondrials.

4.2.7 La interferència de la *DmSRS2* provoca un augment en la densitat mitocondrial

Amb el propòsit de determinar si existeixen diferències en referència a la biogènesi mitocondrial quan es redueixen els nivells de *DmSRS2*, es realitza la quantificació relativa del nombre de còpies d'ADNmt (ADN mitocondrial) mitjançant qPCR en temps real (vegeu l'apartat 3.10.1), que és reflex del nombre de mitocondris per cada còpia de genoma nuclear.

S'utilitzen dos parells d'oligonucleòtids (consulteu la taula 3.14): un d'ells per amplificar una regió del gen de l'ATPasa6 codificat al genoma mitocondrial, i un altre per detectar el gen nuclear mRp110. Es quantifica el nombre de còpies d'ADNmt de forma relativa respecte a l'abundància d'ADNn (ADN nuclear).

En primer lloc, s'optimitzen els dos parells d'oligonucleòtids tot construint una recta estàndard a partir de reaccions de PCR basades en dilucions seriadades d'ADN genòmic motlle de larves control *w¹¹¹⁸*. Els experiments de qPCR en temps real per tal de determinar l'abundància d'ADNmt en relació amb la quantitat d'ADNn, es realitzen amb mostres de larves de tercer estadi control *wt* (*w¹¹¹⁸*) i amb larves amb un silenciament constitutiu i ubic de la *DmSRS2* que emergeixen dels encreuaments entre la soca actina 5C-GAL4 i les soques ARNi_{*DmSRS2*} *estoc 1-dcr2* i ARNi_{*DmSRS2*} *estoc 23003* a 29°C i 25°C, respectivament. Els resultats es representen a la figura 4.16 com a percentatge mitjà (de cinc experiments independents) del nombre de còpies d'ADNmt, respecte al nombre de còpies d'ADNn i relatiu a l'abundància en la mostra control *w¹¹¹⁸* representada com a 100%.

Com posa de manifest la figura 4.16, les larves de tercer estadi amb una deficiència generalitzada de la proteïna *DmSRS2* mostren un augment en el nombre relatiu de còpies d'ADNmt respecte a les larves control, que és un reflex de la densitat mitocondrial. Les larves que procedeixen de l'encreuament a 25°C de la soca actina 5C-GAL4 amb la soca ARNi_{*DmSRS2*} *estoc 23003* mostren, tan sols, una tendència a l'augment en el nombre de mitocondris, amb un valor de 114,06 ± 4,49%. En canvi, les larves que apareixen de l'encreuament a 29°C entre les soques actina 5C-GAL4 i ARNi_{*DmSRS2*} *estoc 1-dcr2* presenten un increment significatiu de la biogènesi mitocondrial amb valors de 169,35 ± 8,61%.

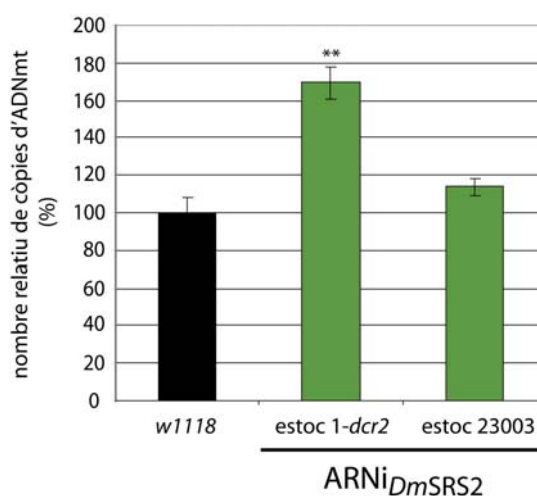


Figura 4.16 Quantificació relativa del nombre de còpies d'ADNmt. El gràfic mostra el percentatge mitjà d'ADNmt ± l'error estàndard de cinc experiments independents. S'estableix com a 100% el nombre de còpies d'ADNmt en larves control (columna negra), i relatiu a aquest valor es representen la resta de resultats (columnes verdes). Els valors s'analitzen estadísticament pel test *t* de Student (** $p < 0,01$).

D'acord amb els resultats obtinguts en aquest apartat, es pot concloure que una de les respostes compensatòries de la cèl·lula que pateix una reducció en els nivells de *DmSRS2* seria l'augment en el nombre de mitocondris. Sembla que l'increment de la densitat mitocondrial podria ser una resposta a la depleció parcial de la *DmSRS2*, ja que és significativament elevada quan la soca

ARNi_{DmSRS2 estoc 1-dcr2} s'empra a 29°C, tenint en compte que fins ara, ha estat considerada una soca d'eficiència moderada per al silenciament de *DmSRS2*. L'augment del nombre de mitocondris detectat per quantificació de l'ADNmt està en concordança amb l'increment de la biogènesi mitocondrial observat en adipòcits de larva per microscòpia electrònica a l'apartat anterior.

4.2.8 Els mitocondris que pateixen la depleció de la *DmSRS2* presenten una menor taxa de consum d'oxigen

Els resultats exposats en els dos apartats anteriors evidencien que el silenciament de la seril-ARNt sintetasa mitocondrial de *D. melanogaster* compromet greument la ultraestructura i la densitat mitocondrials. Per tal de comprovar si aquests efectes estan vinculats amb una disfunció del metabolisme energètic, es pretén mesurar el consum d'oxigen dels complexos de la cadena respiratòria de l'òrganul *in situ*. La tècnica emprada permet analitzar l'activitat de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa en mitocondris intactes en el propi teixit, tot preservant el context fisiològic i evitant, així, resultats artefactuals a causa de protocols d'aïllament d'òrganuls.

Els teixits larvaris utilitzats són sotmesos a permeabilització selectiva de les membranes plasmàtiques sense afectar les membranes mitocondrials externes (MME), de manera que s'elimina el contingut citoplasmàtic i l'espai intracel·lular queda equilibrat amb el tampó d'incubació. En tots els experiments realitzats es comprova la correcta permeabilització de les cèl·lules. Si la MME és anormalment permeable, el citocrom *c* endogen s'allibera juntament amb el citoplasma, tot reduint la capacitat respiratòria. Si en afegir citocrom *c* exogen (vegeu l'apartat 3.10.3) s'observa un increment del consum d'oxigen >10% es considera que la MME ha patit permeabilització i que ha perdut la seva integritat. Per a les larves control *w*¹¹⁸ a 29°C, l'increment del consum d'oxigen en afegir citocrom *c* és d'un 5,85 ± 0,6% i a 25°C és d'un 4,01 ± 1,08%. Per a les larves que provenen de la soca actina 5C-GAL4 encreuada amb la soca ARNi_{DmSRS2 estoc 1-dcr2} a 29°C l'increment és d'un 5,5 ± 0,94%. Finalment, amb la soca ARNi_{DmSRS2 estoc 23003} a 25°C, l'increment és d'un 7,03 ± 1%. Així doncs, les condicions de permeabilització emprades garanteixen, en tots els casos, la permeabilització selectiva de les membranes plasmàtiques de les cèl·lules.

Per assegurar que la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa estan correctament acoblades, es mesura la RCR (ràtio control respiratòria), definida convencionalment com el consum d'oxigen per activació amb ADP (GM_D; estat 3) dividit pel consum residual d'oxigen limitat per ADP (GM_N; estat 2). Es coneix que els valors RCR varien segons el teixit i organisme analitzats (Kuznetsov et al., 2008), però atès que s'han publicat pocs estudis respiromètrics en què s'hagin utilitzat larves de *Drosophila melanogaster*, no està definitivament establert un RCR referent. Tal com mostra la figura 4.17, els valors RCR de larves control *w*¹¹⁸ obtinguts són 3,1 ± 0,17 a 29°C, i 3,95 ± 0,34 a 25°C. Aquests nombres són molt semblants als valors RCR que es poden extreure

d'altres treballs publicats (Baltzer et al., 2009) i varien segons la temperatura a què han estat sotmeses les mostres durant l'experiment (Pichaud et al., 2010). Els valors RCR de larves afectades per la depleció constitutiva i ubiqua de la *DmSRS2* són significativament menors que els valors RCR control, degut a un major consum d'oxigen en l'estat 2, per a tots dos estocs utilitzats. Les larves que apareixen de l'encreuament de la soca actina 5C-GAL4 amb la soca *ARNi_{DmSRS2} estoc 1-dcr2* a 29°C presenten un valor RCR de $2,45 \pm 0,2$ i amb la soca *ARNi_{DmSRS2} estoc 23003* a 25°C de $2,89 \pm 0,07$. Un increment en el consum

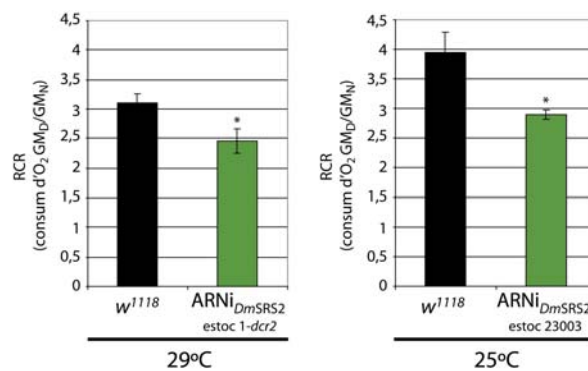


Figura 4.17 Valors RCR. Es calculen els valors RCR de larves *w¹¹¹⁸* (columnes negres) i *ARNi* (columnes verdes) que provenen de l'encreuament de la soca actina 5C-GAL4 amb les soques *ARNi_{DmSRS2} estoc 1-dcr2* i *ARNi_{DmSRS2} estoc 23003* a 29°C i 25°C respectivament i d'esquerra a dreta. Es representen les mitjanes \pm l'error estàndard de més de 3 experiments independents. Els resultats se sotmeten al test *t de Student* (* $p < 0,05$).

d'oxigen en l'estat 2, sense suplement d'ADP que permeti la generació d'ATP i la injecció activa de protons de l'espai intermembrana a la matriu mitocondrial, indica un desacoblament de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa. És a dir, en les larves sotmeses a l'ARNi, la MMI és anormalment permeable a l'entrada de protons per difusió des de l'espai intermembrana a la matriu mitocondrial, que permeten retroalimentar el complex I de la cadena respiratòria independentment de la síntesi d'ATP.

Un cop garantida la correcta permeabilització dels teixits i hagin estat realitzats els càlculs de les ràtios RCR, s'analitzen els valors de consum d'oxigen mitocondrial en resposta a l'addició de diferents substrats i inhibidors de diversos complexos de la cadena respiratòria (vegeu l'apartat 3.10.3). El panell superior de la figura 4.18 mostra un esquema de la cadena respiratòria amb els substrats i els inhibidors utilitzats en aquest experiment, i el panell inferior exposa un gràfic com a exemple de respirometria. Tal com s'observa al panell superior de la figura 4.18 i com s'ha explicat a l'apartat introductori 1.3.2, el cicle de Krebs redueix substrats, com ara el glutamat i el malat, tot produint NADH que proporciona electrons al complex I de la cadena respiratòria. El consum d'oxigen en aquest estat (GM_N ; estat 2) és generalment baix (vegeu el panell inferior de la figura 4.18), ja que correspon a un consum d'oxigen restringit per la manca de protons bombats per l'ATPasa (complex V). Quan s'hi afegeix el substrat del complex V, ADP + Mg^{+2} en condicions saturants (GM_D ; estat 3), l'ATPasa sintetitza ATP, alhora que incorpora protons de l'espai intermembrana a la matriu mitocondrial per tal de retroalimentar la cadena respiratòria, fet que permet avaluar l'acoblament de la fosforilació oxidativa amb la cadena respiratòria mitjançant el càlcul de la ràtio RCR. Posteriorment, per addició de citocrom c s'avalua la integritat de la MME (GM_{cD}), com ja s'ha explicat anteriorment. El succinat, afegit a continuació, és oxidat pel complex II tot transferint electrons al coenzim Q (ubiquinona; Q) i, gràcies a la presència dels substrats del complex I i de l'ADP, permet mesurar la capacitat respiratòria de la cadena sense limitació pel sistema de fosforilació (GM_{ScD}). Seguidament, s'hi

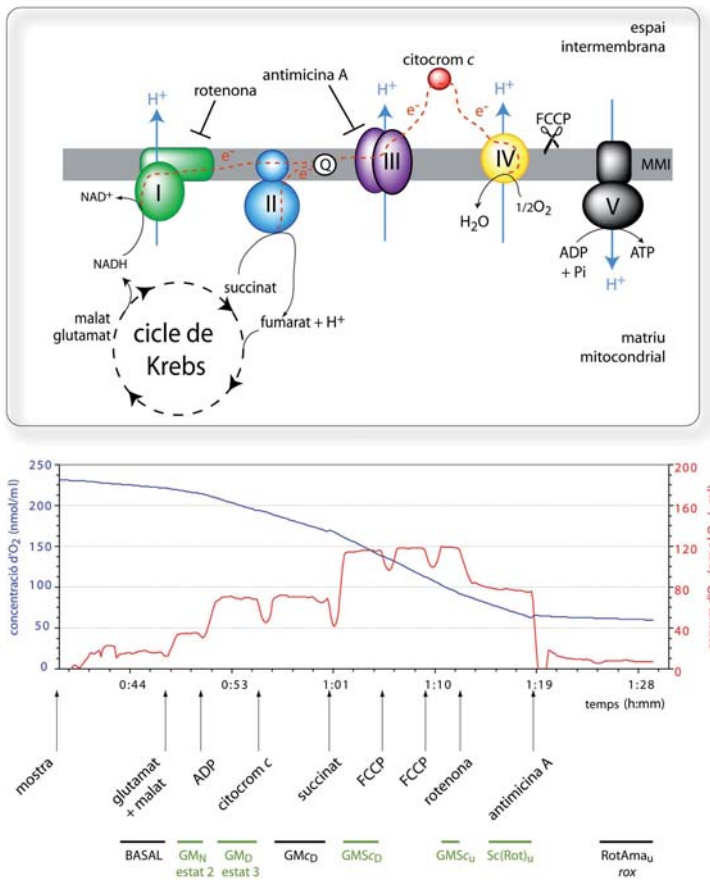


Figura 4.18 Exemple de respirometria. El panell superior mostra de manera esquemàtica la cadena respiratòria mitocondrial amb els substrats/inhibidors utilitzats al llarg de l'experiment. El símbol e⁻ correspon a electró i H⁺, a protó. El gràfic inferior correspon a un exemple de respirometria, on, en blau, es mostra la concentració d'O₂ i, en vermell, es representa el consum d'oxigen en resposta a la successiva addició de substrats/inhibidors dels complexos de cadena respiratòria. A la part inferior s'indiquen els diferents estats respiratoris i, marcats en verd, aquells emprats posteriorment per avaluar la capacitat respiratòria.

afegeix FCCP en dos passos successius, que desacobla la cadena respiratòria de la fosforilació oxidativa, tot permeabilitzant la MMI i permetent l'entrada de protons per difusió a la matriu mitocondrial. La mesura del consum d'oxigen en aquest estat (GM_{Sc_u}) és considerada la capacitat màxima de la cadena respiratòria. Després d'afegir-hi l'inhibidor del complex I, rotenona, la respiració mitocondrial es veu reduïda al consum d'oxigen a partir del complex II (Sc(Rot)_u). Finalment, s'inhibeix la cadena respiratòria per addició de l'inhibidor del complex III, antimicina A. El consum d'oxigen en aquest estat és considerat el consum independent de la respiració mitocondrial o consum d'oxigen residual (RotAma_u; rox) (Gnaiger, 2007).

En primer lloc, el consum d'oxigen mesurat en cada estadi es corregeix

pel pes de teixit larvari que s'ha utilitzat en cada experiment (vegeu la figura 4.19) i, en segon lloc, es normalitza tenint en compte la densitat mitocondrial mesurada a l'apartat 4.2.7 (consulteu la figura 4.20).

Tal com es veu representat a la figura 4.19, en general, el consum d'oxigen en els diferents estats respiratoris no varia de manera significativa en larves que pateixen una reducció de la *DmSRS2* en comparació amb larves control. En larves ARNi per a la *DmSRS2* s'observa un lleuger augment del consum d'oxigen en l'estat GM_N que, com s'ha esmentat anteriorment, produeix un descens significatiu de la ràtio RCR, indicant així un desacoblament de la cadena respiratòria de la síntesi d'ATP. També es pot detectar una disminució de la capacitat respiratòria màxima (GM_{Sc_u}) en les larves ARNi. Deixant de banda aquestes darreres observacions, es pot concloure que els mitocondris afectats pel silenciament de la *DmSRS2* no presenten defectes greus en la funció respiratòria mitocondrial.

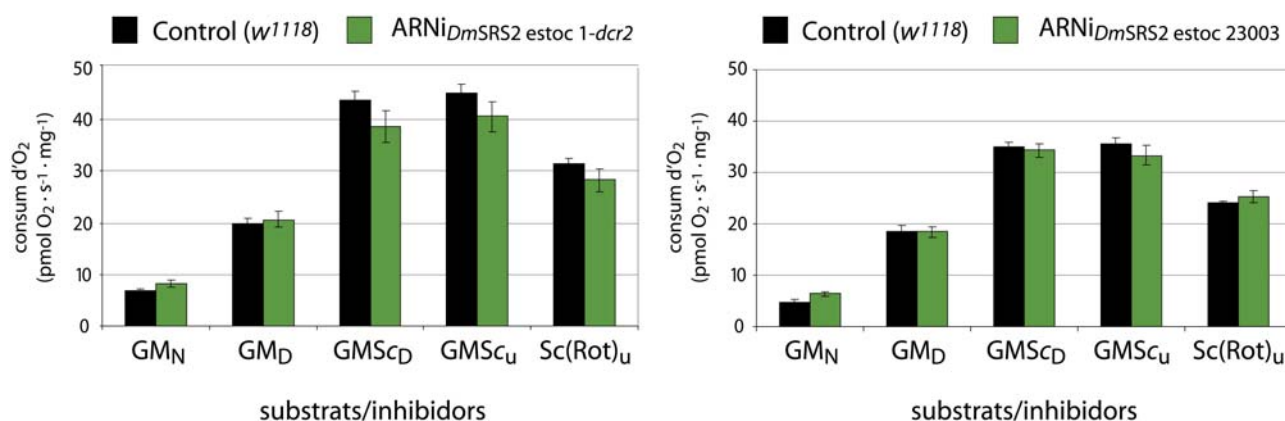


Figura 4.19 Consum mitocondrial d'oxigen corregit per pes de teixit larvari. Es presenten els gràfics dels diferents estats respiratoris per larves control (columnes negres) i larves ARNi (columnes verdes) que emergeixen dels encreuaments de la soca actina 5C-GAL4 amb les soques ARNi_{DmSRS2} estoc 1-dcr2 i ARNi_{DmSRS2} estoc 23003, a 29°C i 25°C, respectivament i d'esquerra a dreta.

Si es corregeixen els valors obtinguts, tenint en compte la densitat mitocondrial determinada anteriorment (vegeu l'apartat 4.2.7), el consum d'oxigen dels diferents estats respiratoris pateix un marcat descens, tal com queda palès a la figura 4.20. Així doncs, mentre que el consum d'oxigen general es manté dins uns valors normals, la capacitat respiratòria per mitocondri és menor en els teixits sotmesos a la depleció de la proteïna *DmSRS2*.

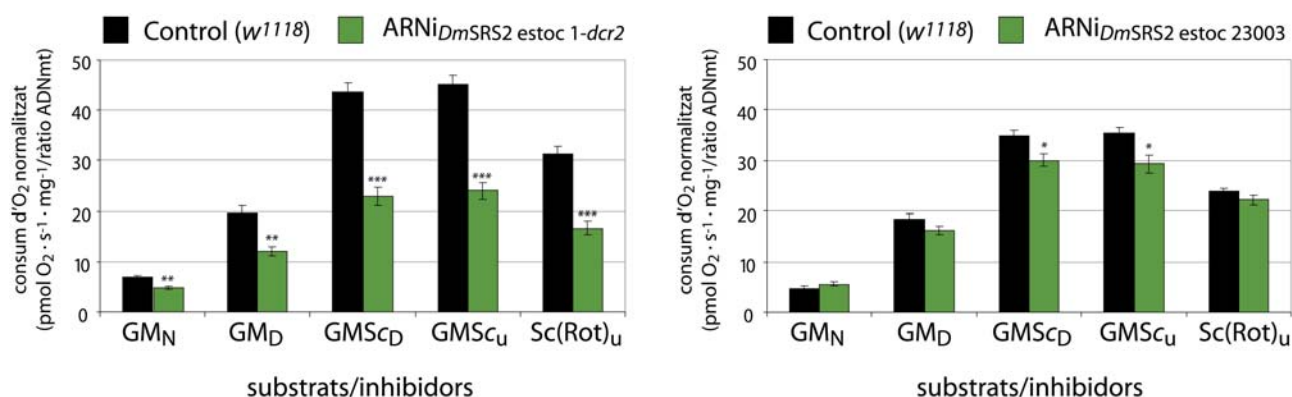


Figura 4.20 Consum mitocondrial d'oxigen normalitzat per la densitat mitocondrial. Es mostren els gràfics dels diferents estats respiratoris per larves control (columnes negres) i larves ARNi (columnes verdes) que procedeixen dels encreuaments de la soca actina 5C-GAL4 amb les soques ARNi_{DmSRS2} estoc 1-dcr2 i ARNi_{DmSRS2} estoc 23003, a 29°C i 25°C, respectivament i d'esquerra a dreta. Els resultats es normalitzen segons la densitat mitocondrial basada en el nombre relatiu de còpies d'ADNmt i se sotmeten al test *t de Student* (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Els resultats obtinguts en aquest apartat suggereixen que les larves sotmeses a la depleció de la seril-ARNt sintetasa mitocondrial veurien afectada la seva capacitat respiratòria mitocondrial (com mostra la figura 4.20) i, com a mecanisme de resposta, podrien incrementar la biogènesi mitocondrial fins a compensar la disfunció respiratòria a nivells similars a la normalitat (com evidencia la figura 4.19).

4.2.9 Les SRS2 per al rescat de les soques ARNi de *DmSRS2* són expressades i transportades als mitocondris en *D. melanogaster*

Un cop analitzats els efectes de la depleció de la SRS2 de *D. melanogaster*, descrits en els darrers apartats, un dels propòsits d'aquest treball és estudiar la complementació de la funció seril-ARNt sintetasa en els mitocondris de soques sotmeses al silenciament de la *DmSRS2*, mitjançant l'expressió de la seril-ARNt sintetasa mitocondrial humana (SARS2) o d'una versió de la *DmSRS2* resistent a l'ARNi.

En primer lloc, es genera una construcció per tal de sobreexpressar, tant en cèl·lules S2R+ com en mosques, la proteïna SARS2 i una construcció control, que consisteix en la seqüència d'ADN de *DmSRS2* amb la regió interna reconeguda per l'ARN de cadena doble modificada per tal d'evitar la degradació del seu ARNm via ARNi (*DmSRS2_m*) (consulteu el subapartat 3.2.2.5).

L'ADN de SARS2 conté el fragment N-terminal que codifica el pèptid de senyalització mitocondrial. Per tal de testar si la proteïna heteròloga SARS2 és transportada als mitocondris mitjançant el reconeixement del pèptid senyal d'*Homo sapiens* per part de la maquinària d'import de *D. melanogaster*, s'analitza la localització subcel·lular de la proteïna en cultius S2R+. Les cèl·lules són cotransfectades de manera transitòria amb les construccions mencionades i un vector que expressa el factor de transcripció GAL4 sota el control del promotor de l'actina i, posteriorment, se sotmeten a immunofluorescència per detecció de la cua myc (vegeu els apartats 3.8.5 i 3.8.6).

La figura 4.21 revela que les dues proteïnes, *DmSRS2_m* i SARS2, són sobreexpressades en cèl·lules

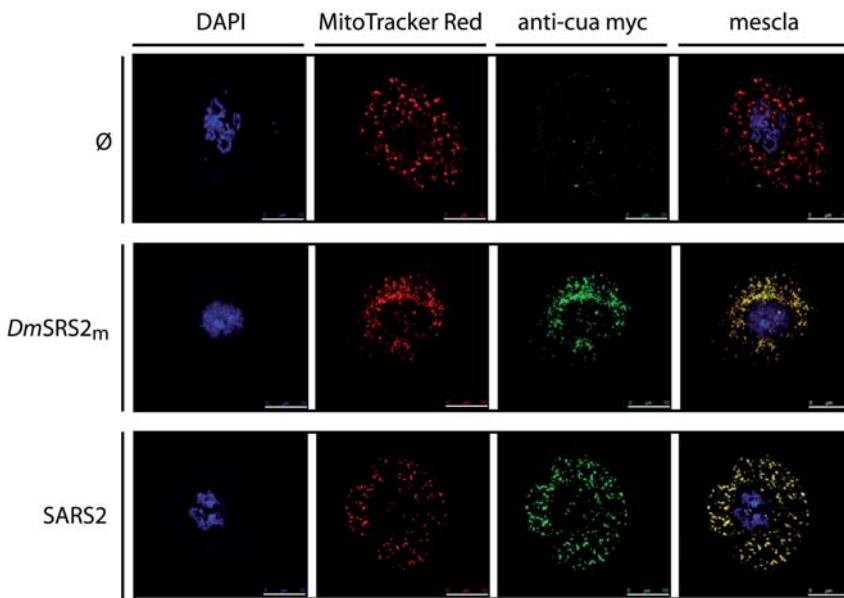


Figura 4.21 Sobreexpressió i localització de les proteïnes *DmSRS2_m* i SARS2 en cèl·lules S2R+. Les rengleres exhibeixen, de dalt a baix, imatges d'immunofluorescències de cèl·lules S2R+ no transfectades (Ø), transfectades amb la construcció per a la *DmSRS2_m* i per a la SARS2. Les columnes mostren, d'esquerra a dreta, la tinció de nuclis (DAPI), de mitocondris (MitoTracker Red), de les proteïnes transfectades (anti-cua myc) i la superposició dels tres senyals (mescla). Les barres d'escala representen 10µm.

S2R+, mentre que no s'observa senyal fluorescent en cèl·lules no transfectades (panell superior). El senyal de les dues SRS2 colocalitza amb el senyal emès per la tinció mitocondrial amb MitoTracker Red. Aquest experiment, per una banda, confirma de nou la localització mitocondrial de la *DmSRS2* mitjançant una tècnica independent a la que s'havia emprat a l'apartat 4.2.1 i, per altra banda, revela que la SRS2 humana és expressada i importada als mitocondris de cèl·lules de *Drosophila*.

Un cop comprovada la localització mitocondrial de les proteïnes en cèl·lules S2R+, es generen soques transgèniques de *D. melanogaster* de sobreexpressió de la *DmSRS2_m* i la SARS2 (consulteu l'apartat 3.9.2). Una soca provisional per a cada una de les construccions (*DmSRS2_m*_{estoc 30.5} i SARS2_{estoc 82.3}; vegeu el subapartat 3.3.4.3) s'encreua amb la soca patched-GAL4 a 25°C per tal d'induir la sobreexpressió de les proteïnes seguint un patró d'expressió restringit a la línia anteroposterior dels discs imaginals. La figura 4.22 presenta les immunofluorescències de discs imaginals d'ala i pota de larves que mostren la sobreexpressió de les proteïnes *DmSRS2_m* i SARS2, seguint el patró d'expressió del gen *patched* al llarg de la línia anteroposterior dels discs imaginals.

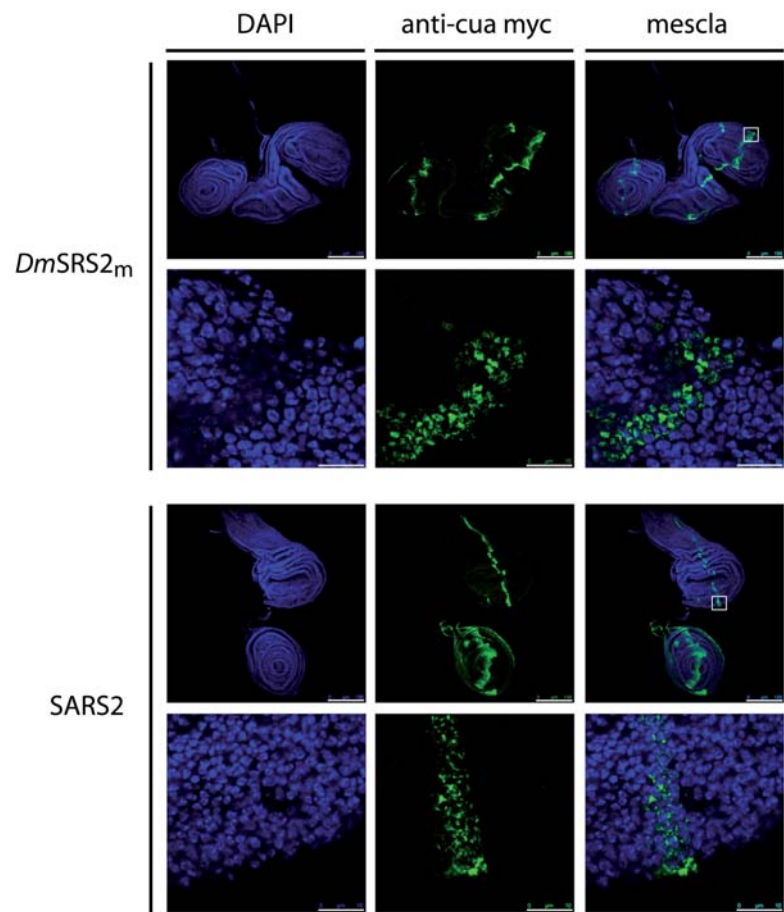


Figura 4.22 Sobreexpressió de les proteïnes *DmSRS2_m* i SARS2 en discs imaginals de larva. Les files mostren imatges d'immunofluorescències de discs imaginals de larves que produeixen les proteïnes *DmSRS2_m* i SARS2 seguint el patró d'expressió de *patched*. A la segona i la quarta fila s'ensenyen en detall les zones corresponents als requadres de les imatges de la primera i la tercera fila. Les columnes mostren, d'esquerra a dreta, la tinció de nuclis (DAPI), de les proteïnes transgèniques (anti-cua myc) i la superposició dels dos senyals (mescla). Les barres d'escala representen 100µm a la primera i tercera fila i 10µm a la segona i quarta fila.

Els resultats presentats en aquest apartat demostren que les proteïnes SARS2 i *DmSRS2_m* són expressades en cèl·lules S2R+ i que la seva localització subcel·lular és mitocondrial. A més, les soques transgèniques provisionals generades són capaces de sobreexpressar les dues proteïnes per inducció amb el sistema UAS-GAL4. Les soques transgèniques de sobreexpressió de SARS2 i *DmSRS2_m* seran una eina útil per a estudis de rescat del fenotip en individus deficientes en la *DmSRS2* nativa, un cop s'hagin establert com a soques homozigotes o balancejades i s'hagi determinat la localització cromosòmica dels transgens. En el futur, es pretén generar soques que continguin el transgèn ARNi per tal de silenciar la *DmSRS2* i, alhora, el transgèn de sobreexpressió d'una de les SRS2 (humana o de *D. melanogaster*), tots dos sota el control de seqüències UAS. Això es durà a terme per múltiples encreuaments entre les soques SARS2 o *DmSRS2_m* amb la soca ARNi_{*DmSRS2*}_{estoc 23003}. Posteriorment, per encreuament d'aquestes soques amb d'altres d'expressió del factor de transcripció GAL4, s'espera induir el silenciament de la SRS2 nativa de *D. melanogaster* i, de manera simultània, compensar aquesta depleció amb la sobreexpressió de la SRS2 humana. Un cop s'hagi determinat si la SRS2 humana té la capacitat

de complementar la depleció de la SRS2 nativa, el següent objectiu és la creació de diferents soques transgèniques de *D. melanogaster* que expressin, al mateix temps que l'ARNi_{DmSRS2}, diverses versions mutants de la SRS2, per tal d'estudiar els trastorns causats per mutacions concretes de la proteïna humana.

Durant el transcurs d'aquesta secció 4.2, en primer lloc, s'han corroborat experimentalment dues de les observacions detectades *in silico* a la secció 4.1. Per una banda, la *DmSRS2* (CG4938) té una localització subcel·lular mitocondrial i, per l'altra, la proteïna té funció seril-ARNt sintetasa, ja que el seu silenciament en *D. melanogaster* dona lloc a una reducció significativa dels nivells de *DmARNt^{Ser}* mitocondrials.

En segon lloc, s'ha generat un model animal de malaltia mitocondrial a partir de la construcció de soques transgèniques de *D. melanogaster* per silenciar, mitjançant dos transgens ARNi funcionals amb diferents nivells d'eficiència, la seril-ARNt sintetasa mitocondrial. S'han estudiat les conseqüències de la depleció de la *DmSRS2* en la viabilitat adulta i els efectes en el teixit d'ala, per inducció constitutiva i ubiqua o bé restringida de l'ARNi, tot emprant el sistema UAS-GAL4.

En tercer lloc, s'ha analitzat la morfologia, biogènesi i funció mitocondrials en larves amb una deficiència de la *DmSRS2*. Per microscòpia electrònica, s'han observat greus anomalies en la ultraestructura de l'òrganul i, alhora, un augment significatiu de la superfície mitocondrial. S'ha detectat un increment de la biogènesi mitocondrial emprant dues tècniques diferents, la quantificació relativa de còpies d'ADN mitocondrial i la quantificació del nombre de mitocondris respecte a l'àrea cel·lular a través de microscòpia electrònica. Aquestes observacions a nivell morfològic, a més, s'han vist acompanyades d'una limitació funcional de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa.

En darrer lloc, s'han generat soques transgèniques de *D. melanogaster* que expressen la seril-ARNt sintetasa mitocondrial de *D. melanogaster* i d'*Homo sapiens* que permetran, en un futur, realitzar experiments de rescat de la funció de la SRS2 nativa.

4.3 CARACTERITZACIÓ D'UNA NOVA PROTEÏNA SIMILAR A SRS AMB FUNCIO MITOCONDRIAL ESSENCIAL

En el transcurs d'aquest treball, que té com a objectiu prioritari la construcció d'un model animal de malaltia mitocondrial en *D. melanogaster*, vam descobrir una peculiaritat del sistema de serilació en aquesta espècie, que també comparteixen altres invertebrats. Com ja s'ha descrit a la secció 4.1, *D. melanogaster* compta amb tres gens que codifiquen proteïnes homòlogues a seril-ARNt sintetases. Mentre que, dues d'elles són considerades les SRS citoplasmàtica (*DmSRS1*) i mitocondrial (*DmSRS2*) convencionals, una tercera, que hem anomenat SLIMP (*seryl-tRNA synthetase-like insect mitochondrial protein* o proteïna d'insecte similar a seril-ARNt sintetasa mitocondrial), per ara, no està caracteritzada.

Així doncs, la caracterització bioquímica i funcional de la proteïna SLIMP ha esdevingut, inesperadament, un dels objectius principals d'aquest projecte.

4.3.1 Caracterització bioquímica de la proteïna SLIMP

El propòsit d'aquest apartat és la compilació de dades bioquímiques i cel·lulars de la proteïna SLIMP, mitjançant l'anàlisi de la distribució en espècies d'insectes, el patró d'expressió, la localització subcel·lular, l'activitat enzimàtica i d'unió a substrats i la conformació. La informació obtinguda pot proporcionar indicis útils per tal de dilucidar la funció biològica de SLIMP en *D. melanogaster*.

4.3.1.1 SLIMP és una proteïna present en insectes

Com ja s'ha explicat detalladament a la secció 4.1, existeixen seqüències homòlogues al gen que codifica la proteïna SLIMP (CG31133) en diferents espècies d'invertebrats, concretament en totes les espècies d'insectes, les seqüències genòmiques de les quals són disponibles total o parcialment i, també, en l'aràcnid *Ixodes scapularis* (paparra del cérvol) i en l'equinoderm *Strongylocentrotus purpuratus* (eriçó de mar).

Per tal de comprovar si SLIMP és una proteïna activament sintetitzada en insectes, es fan créixer individus d'espècies que pertanyen a diferents tàxons de la classe Insecta (vegeu la taula 3.19): *Drosophila melanogaster* (ordre: Diptera), *Tribolium castaneum* (ordre: Coleoptera), *Blattella germanica* (ordre: Blattaria), *Bombyx mori* (ordre: Lepidoptera) i *Lepisma spp.* (subclasse: Thysanura), i se n'obtenen extractes de proteïna total d'individus adults (vegeu

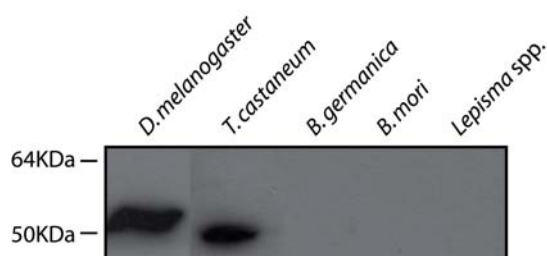


Figura 4.23 Immunodetecció de la proteïna SLIMP en diferents espècies d'insectes. Extractes proteics totals d'adults de diferents espècies d'insecte sotmesos a immunodetecció amb l'anticòs anti-Nt-SLIMP. Els dos primers carrils mostren senyals de pes molecular ~52,92KDa i ~49,88KDa.

l'apartat 3.6.4). Com evidencia la figura 4.23, a través de tècniques d'immunodetecció amb la utilització d'un anticòs que reconeix la proteïna SLIMP sencera (anti-Nt-SLIMP; consulteu la taula

3.16), es detecta un senyal que correspon al pes molecular aproximat de la proteïna SLIMP de *D. melanogaster* (~52,92KDa). L'anticòs dissenyat expressament perquè reconegui el pèptid de senyalització mitocondrial N-terminal de la proteïna de *D. melanogaster*, també és capaç de reconèixer una proteïna de *Tribolium castaneum* de pes molecular similar a l'estimat per a la proteïna homòloga a SLIMP en aquesta espècie (~49,88KDa). L'anticòs emprat no té la capacitat de detectar cap proteïna en les altres espècies d'insecte testades, tot i que algunes d'elles posseeixen gens codificadors d'homòlegs a SLIMP (vegeu l'apartat 4.1.3).

Aquest resultat proporciona una informació molt valuosa, ja que demostra que el gen que codifica SLIMP és activament traduït, tot donant lloc a una proteïna que existeix, aparentment, en almenys dues espècies d'insecte que pertanyen a diferents ordres: *D. melanogaster* (Diptera) i *T. castaneum* (Coleoptera).

4.3.1.2 SLIMP presenta un patró d'expressió variable al llarg del cicle vital de *D. melanogaster*

Amb l'objectiu d'analitzar el patró d'expressió del gen CG31133, tant a nivell transcripcional com traduccional, s'estudia la presència de l'ARNm i de la proteïna SLIMP en diferents estadis del cicle vital de la mosca del vinagre.

Els extractes proteics d'embrions de 0-1h, 1-3h, 3-6h i 20-24h des del moment de la posta, de larves de primer, segon i tercer estadi, de pupes i d'adults (vegeu l'apartat 3.6.4) se sotmeten a immunodetecció de proteïnes (consulteu l'apartat 3.6.8) amb l'anticòs dissenyat per tal de detectar la proteïna SLIMP sencera.

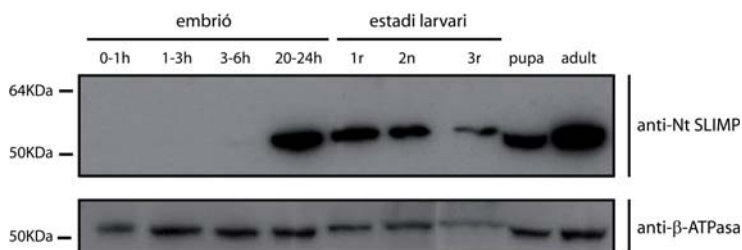


Figura 4.24 Immunodetecció de SLIMP en diferents estadis del cicle vital de *D. melanogaster*. Es mostren els experiments d'immunodetecció d'extractes proteics totals d'embrions, larves, pupes i adults de *D. melanogaster*. El panell superior mostra el senyal corresponent a la proteïna SLIMP sencera (~52,92KDa) i el panell inferior, el de la proteïna β-ATPasa (~50,8KDa), utilitzada com a control de càrrega mitocondrial.

Com exposa el panell superior de la figura 4.24, la proteïna SLIMP comença a expressar-se en estadis embrionaris tardans i la seva presència es manté al llarg de tot el cicle vital de *D. melanogaster*. Per assegurar que l'extracció de proteïnes mitocondrials s'ha dut a terme correctament en tots els estadis testats, s'utilitza un anticòs que reconeix la subunitat β de la F₁-F₀-ATPasa. El panell inferior de la figura

4.24 mostra que la β-ATPasa és present en tots els estadis del desenvolupament de *D. melanogaster*.

Per altra banda, s'analitzen, de forma semiquantitativa, els nivells d'ARNm que codifica la proteïna SLIMP en estadis embrionaris de 0-0,5h, 2,5-3h i 19,5-20h, de larva, de pupa i d'adult, mitjançant la tècnica de transcripció inversa i sqPCR (vegeu l'apartat 3.5.5). Es fa ús d'un parell

d'oligonucleòtids que amplifiquen una regió de 282nt de l'ADNc de SLIMP i un altre parell que detecta un fragment de 244nt de l'ADNc de l'actina 5C (consulteu la taula 3.12).

El panell superior de la figura 4.25 posa de manifest que l'ARNm de SLIMP es troba en tots els estadis del cycle vital de *D. melanogaster*, fins i tot en aquells estadis embrionaris primerencs, en els quals la proteïna encara no hi és present. El panell inferior de la figura 4.25 mostra, com a control, els nivells d'ARNm de l'actina 5C.

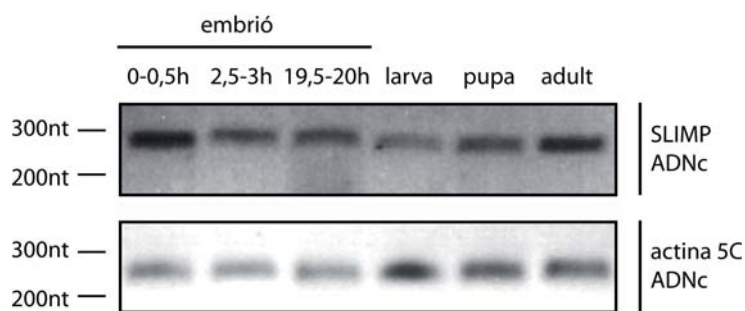


Figura 4.25 Detecció de l'ARNm de SLIMP en diferents estadis del cycle vital de *D. melanogaster*. Es mostren fotografies d'electroforesis en gel d'agarosa dels productes de sqPCR sotmesos a l'amplificació de l'ADNc de SLIMP (panell superior) i de l'ADNc de l'actina 5C (panell inferior).

Per una banda, el patró d'expressió de SLIMP refuta, de nou, la hipòtesi que aquesta proteïna funcioni com una seril-ARNt sintetasa, ja que és absent en bona part del desenvolupament embrionari de *D. melanogaster*. Per altra banda, la presència de l'ARNm de SLIMP, no traduït en forma de proteïna en fases embrionàries primerenques, suggereix que la traducció d'aquest ARNm està regulada al llarg del desenvolupament de *D. melanogaster*, tot mantenint-se silent fins al moment en què la proteïna és necessària per a l'organisme.

4.3.1.3 SLIMP té una localització subcel·lular mitocondrial

L'estudi computacional presentat a la secció 4.1 posa de manifest que la proteïna SLIMP de *D. melanogaster* i els seus homòlegs posseeixen una preseqüència N-terminal d'import al mitocondri, i que comparteixen un origen evolutiu mitocondrial comú amb les SRS2 canòniques. Amb el propòsit d'investigar la localització subcel·lular de SLIMP, es duen a terme experiments de fraccionament cel·lular de cultius S2 (consulteu l'apartat 3.8.3) per tal de separar les fraccions citoplasmàtica i mitocondrial. Les fraccions cel·lulars se sotmeten a immunodetecció (consulteu l'apartat 3.6.8) amb anticossos específics per tal de reconèixer la proteïna SLIMP i la subunitat β de la proteïna mitocondrial F_1-F_0 -ATPasa, utilitzada com a control del correcte enriquiment en proteïnes mitocondrials.

El primer panell de la figura 4.26 mostra el resultat de la immunodetecció amb un anticòs que reconeix un pèptid intern de la proteïna SLIMP (anti-SLIMP) i que, per tant, té la capacitat de detectar tant la proteïna sencera (SLIMP) com la proteïna processada sense el pèptid de senyalització mitocondrial (Δ Nt-SLIMP). En aquest cas, apareixen dos senyals de mida diferent: un senyal superior present a totes les fraccions cel·lulars, que probablement correspon a la versió sencera de la proteïna SLIMP de pes molecular $\sim 52,9$ KDa, i un senyal inferior que tan sols apareix a la fracció total (T) i mitocondrial (M) i que coincideix aproximadament amb el pes molecular estimat de la proteïna Δ Nt-SLIMP ($\sim 49,7$ KDa), és a dir, que probablement correspon a

la proteïna processada un cop ha estat transportada als mitocondris. El segon panell exhibeix el senyal corresponent a la subunitat proteica β -ATPasa, de pes molecular $\sim 50,8$ KDa (Peña i Garesse, 1993), que permet confirmar la idoneïtat de la tècnica de fraccionament cel·lular per a

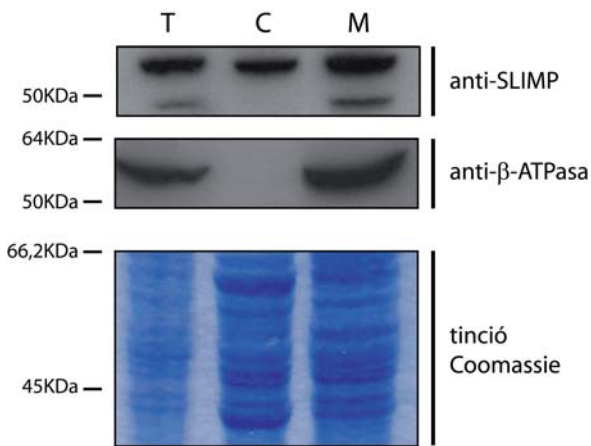


Figura 4.26 Localització de SLIMP mitjançant fraccionament cel·lular i immunodetecció. Immunodetecció de la proteïna SLIMP sobre la fracció total (T), citoplasmàtica (C) i mitocondrial (M) de cèl·lules S2 i tinció amb blau de Coomassie. Com a marcador mitocondrial s'utilitza un anticòs contra la subunitat β de la F_1 - F_0 -ATPasa.

l'obtenció d'una fracció enriquida en proteïnes mitocondrials (M). El panell inferior mostra la tinció de les proteïnes de cada fracció amb blau de Coomassie. Com hem esmentat, en contra el que es podia esperar, quan s'utilitza l'anticòs contra SLIMP, apareix un senyal a la fracció mitocondrial d'un pes molecular que concorda amb el de la proteïna SLIMP sencera.

Aquest fet pot ser degut a diferents causes, o bé per una combinació de totes elles. Una primera opció és que hi hagi un cert grau de contaminació de contingut citoplasmàtic a la fracció mitocondrial, fet al qual donen suport els resultats obtinguts a la secció 4.2, on s'ha emprat

aquesta mateixa tècnica. Una altra opció és que SLIMP tingui una localització mitocondrial dual, que la proteïna sencera estigui localitzada a la membrana mitocondrial externa i que una proporció d'aquesta sigui processada i internalitzada a la matriu mitocondrial, un fenomen que s'ha descrit per algunes proteïnes (Huang i Yang-Yen, 2010). Una darrera possibilitat és que la proteïna sencera s'acumuli a l'entorn dels mitocondris a causa d'un alentiment de la taxa d'excisió del pèptid senyal per part de la MPP (peptidasa de processament mitocondrial), a causa d'un excés de substrat o d'una baixa afinitat de la MPP per aquest. Deixant de banda aquestes últimes apreciacions, el que cal remarcar d'aquest experiment és que la proteïna madura (Δ Nt-SLIMP) tan sols és present a la fracció mitocondrial.

Amb el propòsit de confirmar els resultats de localització subcel·lular mitjançant una tècnica independent, es realitzen immunofluorescències de cèl·lules S2 que expressen una de les dues versions de la proteïna SLIMP (vegeu l'apartat 3.8.6). Una de les línies estables S2 utilitzades (vegeu l'apartat 3.8.4) expressa la proteïna SLIMP truncada, sense la preseqüència d'import mitocondrial predita (Δ Nt-SLIMP), i l'altra expressa la versió completa de SLIMP, totes dues versions amb una cua de sis histidines a l'extrem C-terminal.

A la figura 4.27 s'exposen imatges de cèl·lules S2 que sobreexpressen les proteïnes Δ Nt-SLIMP i SLIMP sencera. La proteïna truncada, en la qual s'ha eliminat la regió N-terminal corresponent al pèptid de senyalització mitocondrial predit, s'expressa però no és transportada als mitocondris. En canvi, la proteïna sencera, que presenta el pèptid d'import al mitocondri, presenta un patró de colocalització amb el senyal que prové de la tinció mitocondrial amb MitoTracker Red.

Mitjançant el mètode de fraccionament cel·lular i immunodetecció amb un anticòs dissenyat contra SLIMP, es demostra que la proteïna madura és present a la fracció enriquida en mitocondris i que, per tant, és processada dins l'òrganul tot donant lloc a una versió de la proteïna de pes molecular menor.

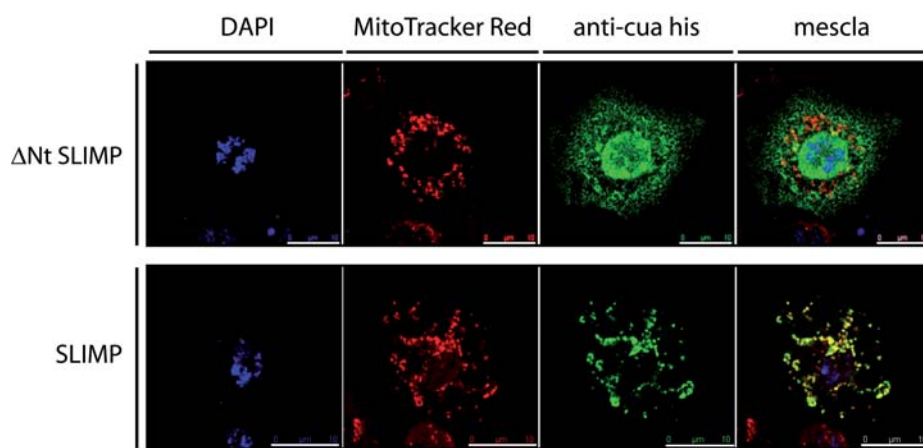


Figura 4.27 Sobreexpressió i localització de les proteïnes Δ Nt-SLIMP i SLIMP en cultius S2. Les files exhibeixen, de dalt a baix, imatges d'immunofluorescències de cèl·lules S2 transfectades amb la construcció truncada i sencera de SLIMP. Les columnes mostren, d'esquerra a dreta, la tinció de nuclis (DAPI), de mitocondris (MitoTracker Red), de les proteïnes transfectades (anti-cua his) i la superposició dels tres senyals (mescla). Les barres d'escala representen 10 μ m.

Paral·lelament, per mitjà d'immunofluorescències de cèl·lules S2 que sobreexpressen diferents versions de la proteïna SLIMP, amb la utilització d'un anticòs comercial diferent de l'anticòs emprat en els experiments d'immunodetecció, es corrobora que SLIMP és una proteïna de localització mitocondrial i que el seu import a l'òrganul de destí depèn de la presència d'un pèptid senyal a la seva regió N-terminal.

4.3.1.4 SLIMP no té activitat d'aminoacilació

Atès que l'anàlisi estructural del centre catalític de SLIMP (vegeu l'apartat 4.1.7) evidencia un grau de conservació baix dels residus involucrats en la interacció amb l'intermediari de la reacció d'aminoacilació, seril adenilat, es pretén comprovar *in vitro* si SLIMP té activitat enzimàtica com a aminoacil-ARNt sintetasa.

L'activitat enzimàtica de la proteïna recombinant SLIMP sense el pèptid de senyalització mitocondrial (Δ Nt-SLIMP), expressada i purificada a partir de cultius d'*E. coli*, és testada mitjançant diversos assaigs. El gràfic esquerre de la figura 4.28 mostra el resultat d'un assaig d'aminoacilació (consulteu l'apartat 3.7.1) on es mesura l'habilitat de la proteïna per incorporar l'aminoàcid serina a l'ARNt^{Ser} (GCU) mitocondrial de *D. melanogaster*. Δ Nt-SLIMP no

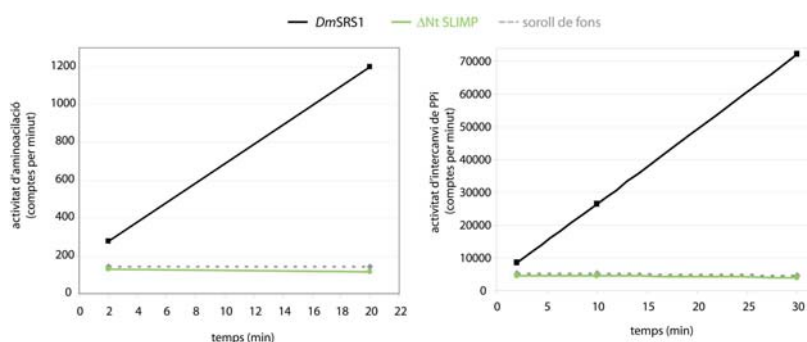


Figura 4.28 Assaigs d'aminoacilació i d'intercanvi de PPI. Els gràfics mostren l'activitat enzimàtica de les proteïnes *DmSRS1*, com a control positiu (en negre) i Δ Nt-SLIMP (en verd). El soroll de fons s'indica en línia discontinua gris. El gràfic esquerre mostra el grau d'aminoacilació del *DmARNt^{Ser}* (GCU) citoplasmàtic per a la *DmSRS1* i del mitocondrial per a la Δ Nt-SLIMP. El gràfic dret ensenya l'activitat d'intercanvi de PPI tot emprant una mescla dels 20 aminoàcids del codi genètic estàndard.

té activitat d'aminoacilació, mentre que la seril-ARNt sintetasa citoplasmàtica de *Drosophila* (*DmSRS1*), emprada com a control positiu, sí que és capaç d'aminoacilar l'ARNt^{Ser} (GCU) citoplasmàtic. A continuació, es mesura la capacitat del domini catalític de l'enzim per tal d'activar aminoàcids amb ATP a través de l'assaig d'intercanvi de pirofosfat (consulteu l'apartat 3.7.2). Aquest assaig es realitza amb una barreja que inclou els 20 aminoàcids estàndards, amb els objectius de descartar que la manca d'activitat observada anteriorment sigui deguda al *DmARNt^{Ser}* utilitzat com a substrat, i de determinar si SLIMP ha modificat la seva especificitat per l'aminoàcid, atès que el baix nivell de conservació del domini catalític de SLIMP afecta principalment aquells residus relacionats amb la interacció amb l'aminoàcid serina (vegeu l'apartat 4.1.7). Com s'evidencia al gràfic dret de la figura 4.28, Δ Nt-SLIMP tampoc no és capaç d'activar cap dels aminoàcids del codi genètic convencional.

Els residus del domini catalític de SLIMP que formarien enllaços amb el seril adenilat presenten un grau de conservació més elevat a la regió d'interacció amb les porcions de l'adenina, la ribosa i el fosfat de l'ATP, i no pas amb l'aminoàcid serina. Tot i que Δ Nt-SLIMP no pot activar cap aminoàcid, s'estudia, a través d'experiments d'unió per entrecreuament amb llum ultraviolada, si aquesta proteïna és capaç d'unir ATP (vegeu l'apartat 3.7.3).

La figura 4.29 exposa un experiment d'unió a ATP on es testa la capacitat de la proteïna Δ Nt-SLIMP, de la *DmSRS1*, del BSA (com a control negatiu d'unió) i d'extractes proteics d'*E. coli* (com

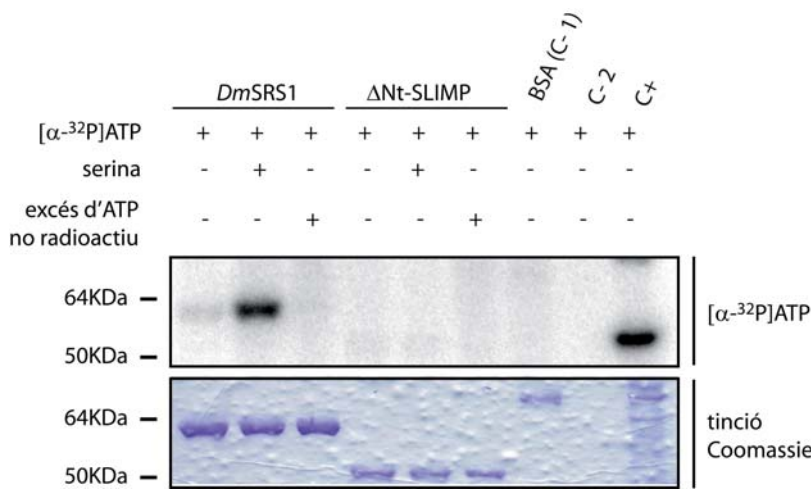


Figura 4.29 Assaig d'unió a ATP per entrecreuament amb llum UV. Es testa l'habilitat de les proteïnes *DmSRS1* i Δ Nt-SLIMP per unir ATP radioactiu. Per cada una d'elles, es preparen reaccions sense serina, amb serina (per afavorir la unió a l'ATP) i amb un excés d'ATP no radioactiu (per determinar l'especificitat per competició). Com a controls negatius d'utilitza BSA pur (C- 1) i tampó d'incubació (C- 2). Com a control positiu (C+) s'empren extractes de proteïna total d'*E. coli*.

a control positiu) per interaccionar amb l'ATP. El panell superior mostra el senyal de l'ATP radioactiu unit a les diferents proteïnes, i el panell inferior exhibeix les diferents proteïnes separades en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) i tenyides amb blau de Coomassie. Com es podia preveure, la *DmSRS1* té l'habilitat d'unir ATP, tant en absència de serina, com quan aquesta és afegida a la reacció. La serina afavoreix la unió de la *DmSRS1* a l'ATP tot

proporcionant un senyal de major intensitat. En afegir un excés d'ATP no radioactiu, el senyal desapareix, indicant, així, l'especificitat de la unió entre la *DmSRS1* i l'ATP radioactiu. Per contra, la Δ Nt-SLIMP no és capaç d'unir ATP, atès que no s'observa cap senyal radioactiu en presència o absència de serina a la reacció.

En conclusió, Δ Nt-SLIMP no té la capacitat d'unir *in vitro* els substrats inicials necessaris per tal de dur a terme la reacció de serilació (serina o ATP) i, a més, no pot activar cap dels aminoàcids del codi genètic. Per tant, Δ Nt-SLIMP no té funció aminoacil-ARNt sintetasa.

4.3.1.5 SLIMP té una conformació dimèrica

S'ha determinat que SLIMP no és una aminoacil-ARNt sintetasa catalíticament activa, però atès que presenta una notable homologia amb la seril-ARNt sintetasa mitocondrial de *D. melanogaster*, s'analitza si la proteïna encara conserva la conformació dimèrica característica de les seril-ARNt sintetases.

La cromatografia de filtració en gel o d'exclusió molecular permet separar proteïnes segons el seu PM (pes molecular) en condicions natives. En primer lloc, es fa passar per la columna una mescla de proteïnes estàndard, es monitora el patró d'elució a una densitat òptica de 280nm i es construeix una recta de regressió, on es representa el logaritme del pes molecular respecte al volum de retenció (vegeu el gràfic dret de la figura 4.30). Posteriorment, la proteïna pura d'interès Δ Nt-SLIMP s'injecta a la columna i es monitora el perfil d'elució d'aquesta. Com evidencia el gràfic esquerre de la figura 4.30, apareixen dos pics principals d'absorbància a 280nm que elueixen als volums de 7,54mL (1) i 13,6mL (2). Després de conèixer els volums de retenció de cada pic, s'interpol·la el pes molecular aproximat de cada un d'ells, fent ús de la recta de regressió construïda anteriorment a partir de la barreja de proteïnes estàndard. Així doncs, els pics d'absorbància obtinguts, de dos experiments independents, corresponen a $616,37 \pm 51,52$ KDa i $132,93 \pm 3,57$ KDa. El primer pic es considera proteïna agregada, mentre que el segon pic té un pes molecular estimat que, tot i ser superior a l'esperat, podria tractar-se de la forma dimèrica de la proteïna Δ Nt-SLIMP, de pes molecular teòric ~101,96KDa. Per una banda, el fet que els punts d'elució corresponents a les proteïnes estàndard catalasa i ADH estiguin per damunt de la recta de regressió (vegeu el gràfic de la dreta de la figura 4.30) suggereix que la

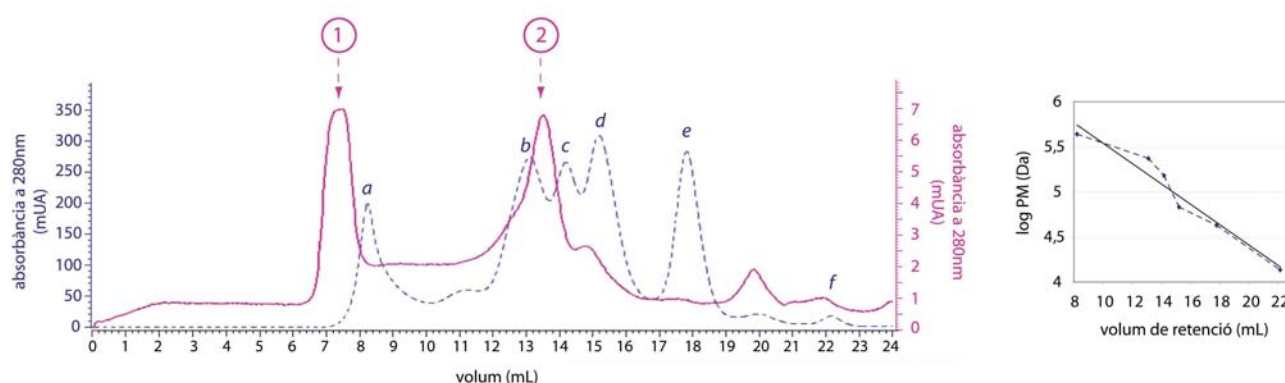


Figura 4.30 Cromatografia de filtració en gel de Δ Nt-SLIMP. El gràfic de l'esquerra exposa el perfil d'absorbància a 280nm de la mescla de proteïnes estàndard (línia blava discontinua) on: a és la ferritina (PM ~440KDa), b és la catalasa (PM ~232KDa), c és l'ADH (PM ~150KDa), d és el BSA (PM ~67KDa), e és l'ovoalbúmina (PM ~43KDa) i f és l'ARNasa A (PM ~13,7KDa). La línia rosa mostra el patró d'absorbància a 280nm d'una de les injeccions de la Δ Nt-SLIMP. El pic 1 correspon a ~667,89KDa i el pic 2 a ~136,49KDa. El gràfic de la dreta mostra la recta de regressió, de $R^2 \geq 0,95$, construïda a partir del patró d'absorbància de la mescla estàndard de proteïnes, d'on s'interpol·la el pes molecular de cada pic després d'injectar la Δ Nt-SLIMP.

interpolació del pes molecular dels dos pics d'absorbància s'està sobrestimant. De fet, quan es construeix la recta de regressió eliminant els punts corresponents a la catalasa i l'ADH, aquesta presenta una $R^2 > 0,99$, de la qual s'interpolava un pes molecular del pic (2) de $109,55 \pm 2,77$ KDa, que és molt similar al pes esperat per a un dímer ($\sim 101,96$ KDa). Per altra banda, la sobreestimació del pes molecular de Δ Nt-SLIMP pot ser deguda a una elució prematura de la Δ Nt-SLIMP a causa de l'estructura especialment elongada que presenta a la seva regió N-terminal en *coiled-coil* (consulteu l'apartat 4.1.2). Per la seva morfologia, Δ Nt-SLIMP podria recórrer més ràpidament la columna que les proteïnes globulars que s'han emprat per construir la recta de regressió (GE Healthcare, 2007). La presumpta sobreestimació del pes molecular mitjançant la cromatografia de filtració en gel es veu recolzada pels resultats dels mateixos experiments realitzats amb la seril-ARNt sintetasa citoplasmàtica (*DmSRS1*) (dades no mostrades). El patró d'elució de la *DmSRS1* també mostra un pic, que segons la recta estàndard, correspondria a un pes molecular major al teòric per a un dímer d'aquesta proteïna. En aquest cas es coneix que la *DmSRS1* és una SRS canònica, amb una estructura i una regió de dimerització conservades i que, a més, presenta activitat enzimàtica d'aminoacilació *in vitro* (consulteu el subapartat 4.3.1.4). Totes aquestes observacions indicarien que els pesos moleculars dels dímers de les proteïnes *DmSRS1* i Δ Nt-SLIMP s'han sobreestimat a causa de la baixa resolució de la pròpia tècnica, que no permet realitzar determinacions de pes molecular prou precises, sinó estimacions aproximades; i/o a causa d'un perfil d'elució diferent degut a la configuració especialment allargada de les SRS.

En definitiva, en aquest subapartat s'ha determinat que Δ Nt-SLIMP mostra un patró de mobilitat compatible amb la conformació dimèrica de la proteïna, característica que comparteix amb les seril-ARNt sintetases convencionals.

4.3.1.6 SLIMP uneix els $DmARNt^{Ser}$ mitocondrials

A l'apartat 4.1.2 s'ha determinat, per experiments realitzats *in silico*, que SLIMP té un domini N-terminal d'unió a ARNt en forma de *coiled-coil* conservat. Aquesta estructura és una característica única dels dominis d'unió als $ARNt^{Ser/Sec}$ de les seril-ARNt sintetases convencionals (vegeu l'apartat 1.2.6). L'objectiu d'aquest subapartat és comprovar si SLIMP pot unir els $ARNt^{Ser}$ mitocondrials de *D. melanogaster* per mitjà d'assaigs de mobilitat electroforètica (EMSA).

Es testa la interacció de la proteïna pura Δ Nt-SLIMP amb els dos isoacceptors d' $ARNt^{Ser}$ mitocondrials (GCU i UGA) i dos ARNt citoplasmàtics ($ARNt^{Ser}$ (GCU) i $ARNt^{Arg}$ (UCU)) de *D. melanogaster*, tots ells transcrits *in vitro* i marcats radioactivament a l'extrem 5' (consulteu els apartats 3.5.1 i 3.7.4). Per tal de descartar la unió inespecífica entre la Δ Nt-SLIMP i els $DmARNt^{Ser/Arg}$ marcats radioactivament, es realitzen assaigs de competició amb ARNt no radioactius. Per una banda, s'afegeix a les reaccions un excés de cada isoacceptor $DmARNt^{Ser/Arg}$ no radioactiu, de manera que aquest desplaça el $DmARNt^{Ser/Arg}$ radioactiu unit a la proteïna. Per

altra banda, s'addiciona a cada reacció un excés d'ARNt^{Lys} d'*E. coli*, que no hauria d'interaccionar específicament amb la proteïna ΔNt-SLIMP, ja que és un ARNt heteròleg que, a més, té una especificitat diferent. Si la unió entre la ΔNt-SLIMP i els diferents *Dm*ARNt^{Ser/Arg} radioactius és específica, l'ARNt^{Lys} d'*E. coli* no aconseguirà competir amb els ARNt^{Ser/Arg} de *D. melanogaster*.

El panell superior de la figura 4.31 mostra els experiments d'EMSA realitzats amb la proteïna ΔNt-SLIMP pura i diferents *Dm*ARNt. La ΔNt-SLIMP és capaç d'unir els dos *Dm*ARNt^{Ser} mitocondrials i els dos *Dm*ARNt citoplasmàtics (*Dm*ARNt^{Ser} (GCU) i *Dm*ARNt^{Arg} (UCU)) (vegeu les bandes de retardament del segon carril de cada imatge). Quan s'afegeixen els corresponents *Dm*ARNt^{Ser} o *Dm*ARNt^{Arg} no radioactius en excés a les mateixes reaccions, el senyal radioactiu es

veu reduït substancialment en tots els casos (vegeu les bandes de retardament del tercer carril de cada imatge). Tot i així, quan s'incorpora a les reaccions un excés de l'*Ec*ARNt^{Lys}, aquest és capaç de desplaçar en gran mesura els dos ARNt citoplasmàtics radioactius (*Dm*ARNt^{Ser} (GCU) i *Dm*ARNt^{Arg} (UCU)), fet que indica que la unió entre la ΔNt-SLIMP i aquests dos ARNt no és específica. En canvi els dos isoacceptors *Dm*ARNt^{Ser} (GCU i UGA) mt radioactius resten units a la proteïna, aliens a la presència de l'*Ec*ARNt^{Lys}.

Per tal d'estimar el nivell d'especificitat de la ΔNt-SLIMP per cada ARNt, es mesura la intensitat dels senyals radioactius de retardament.

Com es veu representat gràficament al panell inferior de la figura 4.31, aquelles interaccions que presenten valors similars a 1 són considerades no específiques, com ho són les interaccions de la ΔNt-SLIMP amb el *Dm*ARNt^{Ser} (GCU) i el *Dm*ARNt^{Arg} (UCU) citoplasmàtics, amb valors de 0,984 i 1,26, respectivament. Les unions que mostren ràtios superiors a 1, en canvi, es

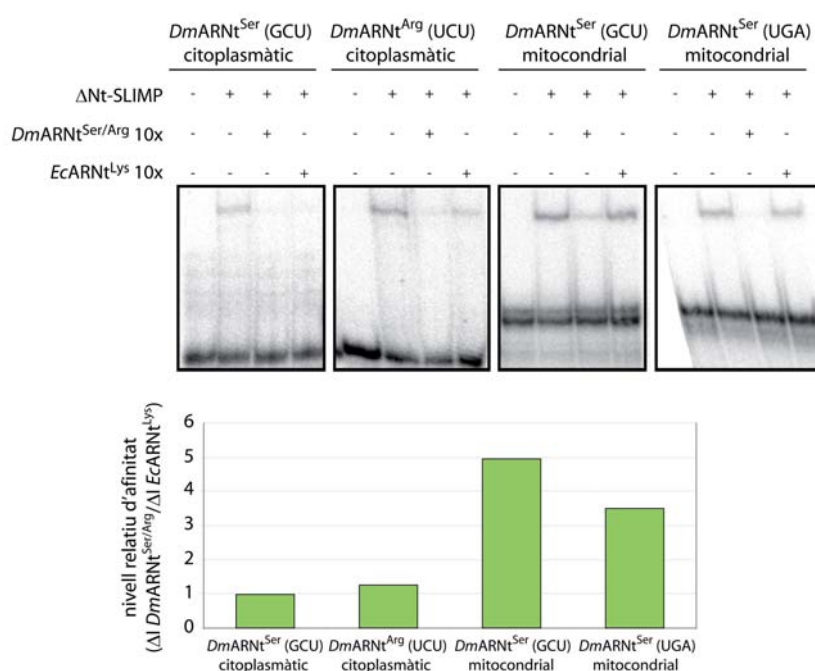


Figura 4.31 Assaigs d'EMSA d'unió a *Dm*ARNt^{Ser} i *Dm*ARNt^{Arg}. El panell superior mostra els senyals radioactius dels *Dm*ARNt^{Ser} (GCU) i *Dm*ARNt^{Arg} (UCU) citoplasmàtics, *Dm*ARNt^{Ser} (GCU) mt i *Dm*ARNt^{Ser} (UGA) mt, d'esquerra a dreta. En cada cas, es mesuren els senyals de retardament dels *Dm*ARNt^{Ser/Arg} per la presència de la ΔNt-SLIMP (bandes superiors), amb un excés de *Dm*ARNt^{Ser/Arg} o un excés d'*Ec*ARNt^{Lys}, no radioactius. El gràfic inferior representa el nivell d'afinitat per a cada *Dm*ARNt^{Ser/Arg} com a $\Delta I \text{ DmARNt}^{\text{Ser/Arg}} / \Delta I \text{ EcARNt}^{\text{Lys}}$ on $\Delta I \text{ DmARNt}^{\text{Ser/Arg}}$ és [la intensitat de senyal de la reacció que conté *Dm*ARNt^{Ser/Arg} radioactiu - la intensitat de senyal afegint-hi 10x *Dm*ARNt^{Ser/Arg} no radioactiu] i la $\Delta I \text{ EcARNt}^{\text{Lys}}$ és [la intensitat de senyal de la reacció que conté *Dm*ARNt^{Ser/Arg} radioactiu - la intensitat de senyal afegint-hi 10x *Ec*ARNt^{Lys} no radioactiu]. Si la ràtio ~1, l'afinitat de la ΔNt-SLIMP per l'ARNt és baixa i si és >1, l'afinitat és major com més elevat sigui el valor de la ràtio.

consideren específiques, com ho són les unions de la Δ Nt-SLIMP amb el *Dm*ARNt^{Ser} (GCU) mt, amb una ràtio de 4,95, i de Δ Nt-SLIMP amb el *Dm*ARNt^{Ser} (UGA) mt, amb un valor de 3,50.

Els experiments de mobilitat electroforètica posen de manifest que SLIMP té la propietat d'unir de manera específica els dos isoacceptors d'ARNt^{Ser} mitocondrials de *D. melanogaster in vitro* amb una elevada afinitat.

4.3.2 Caracterització funcional de SLIMP *in vivo* en *Drosophila melanogaster*

Un cop s'han caracteritzat diversos aspectes bioquímics de la proteïna SLIMP, el propòsit del següent apartat és l'obtenció d'informació pel que fa a la importància funcional de la proteïna *in vivo*. Per tal de recopilar dades sobre el rol de SLIMP a l'organisme, es generen soques de *D. melanogaster* que pateixen una reducció en el nivell d'expressió de SLIMP mitjançant ARNi (ARN d'interferència).

4.3.2.1 Els transgens ARNi dissenyats per silenciar SLIMP produeixen una davallada en els seus nivells d'ARNm

Amb l'objectiu de crear individus que pateixin un silenciament de la proteïna SLIMP, s'utilitzen tres soques transgèniques ARNi que, per inducció amb el sistema UAS-GAL4, expressen un ARN de cadena doble dissenyat per degradar l'ARNm que codifica SLIMP. Els transgens ARNi emprats consten de dues seqüències de l'ADN de SLIMP disposades en forma de repetició invertida entorn un intró (consulteu el subapartat 3.2.2.4).

Per tal de confirmar l'especificitat dels ARN de cadena doble pel que fa al reconeixement i la degradació de l'ARNm de SLIMP, s'empen dos transgens ARNi diferents que tenen com a diana dos sectors diferents de l'esmentat ARNm: un d'ells, de construcció pròpia, s'uneix a una regió de 566nt (de la posició 824 a la 1389) de l'ARNm de SLIMP i es troba dins les soques ARNi_{SLIMP estoc 8} i ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2}; l'altre ARNi reconeix una regió de 370nt (de la posició 650 a la 1019) de l'ARNm de SLIMP i està integrat dins la soca ARNi_{SLIMP estoc 33774}, proporcionada pel VDRC.

Igual com s'ha procedit anteriorment per a les soques ARNi contra la proteïna *Dm*SRS2 (vegeu l'apartat 4.2.2), es comprova l'eficiència dels diferents transgens emprats per reduir els nivells de ARNm de SLIMP. S'utilitzen larves de la progènie dels encreuaments de les soques ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} i ARNi_{SLIMP estoc 33774} amb la soca actina 5C-GAL4 a 29°C. S'extreu l'ARN total de larves de tercer estadi, que provenen dels encreuaments, que no mostrin el marcador Tb, fet que implica que l'ARNi contra la proteïna SLIMP està en funcionament. Mitjançant la transcripció inversa dels ARNm i la tècnica de qPCR en temps real (vegeu els apartats 3.9.7 i 3.5.6), es determina l'abundància relativa de l'ARNm de SLIMP i es normalitza respecte a un ARNm de referència (Rp49).

L'amplificació específica de fragments d'ADNc de SLIMP i Rp49 es du a terme amb dos parells d'oligonucleòtids (consulteu la taula 3.13) que són, prèviament, optimitzats amb la construcció

d'una recta estàndard (consulteu el subapartat 3.5.6.1). Les reaccions es realitzen amb mostres que provenen de larves control (*wt*; w^{1118}) i de larves amb l'ARNi en funcionament i, paral·lelament, es preparen reaccions on no s'ha efectuat la transcripció inversa prèvia, per tal de descartar contaminació per ADN genòmic.

La figura 4.32 representa els percentatges mitjans (de dos experiments independents) d'ARNm de SLIMP, normalitzats per l'ARNm de referència (Rp49) i relatius als nivells presents en la mostra control *wt*.

Els nivells d'ARNm de SLIMP en larves que procedeixen de l'encreuament de la soca actina 5C-GAL4 amb la soca ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} són d'un $21,91 \pm 4,98\%$, i amb la soca ARNi_{SLIMP estoc 33774} són d'un $30,61 \pm 8,45\%$.

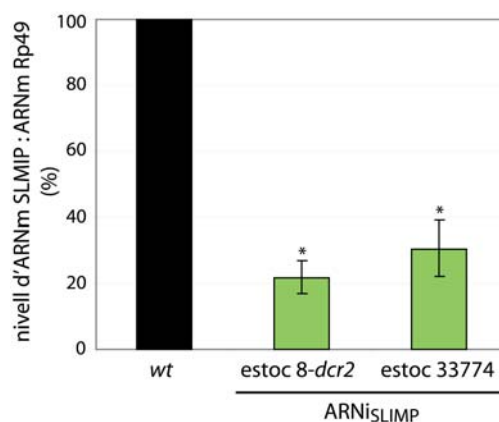


Figura 4.32 Reducció dels nivells de l'ARNm de SLIMP. Es representa el percentatge mitjà ± l'error estàndard d'ARNm de SLIMP normalitzat segons l'abundància d'un ARNm de referència (Rp49). Els valors obtinguts se sotmeten al test *t de Student* (* $p < 0,05$).

Els dos transgens ARNi usats amb l'objectiu de reduir els nivells de SLIMP en *D. melanogaster* produeixen una davallada significativa en el nivell d'ARNm que codifica la proteïna SLIMP.

4.3.2.2 La reducció de SLIMP no afecta el grau de serilació mitocondrial

Anteriorment, s'ha descrit que SLIMP és capaç d'interaccionar de manera específica amb els dos isoacceptors d'ARNt^{Ser} mitocondrials de *D. melanogaster in vitro* (consulteu el subapartat 4.3.1.6), tot i que no té l'habilitat d'aminoacilar-los amb cap aminoàcid estàndard (vegeu el subapartat 4.3.1.4). Existeix, per tant, la possibilitat que SLIMP uneixi els *DmARNt^{Ser} mt, in vivo*. Si fos així, una opció seria que SLIMP segrestés els *DmARNt^{Ser} mitocondrials* i, per tant, estaria reduint l'accessibilitat d'aquests ARNt a la seril-ARNt sintetasa mitocondrial (*DmSRS2*), i una altra opció seria que SLIMP actués com una xaperona que, per contra, estabilitzés els *DmARNt^{Ser} mt* per tal de facilitar-ne la disponibilitat a la *DmSRS2*. Amb els objectius, en primer lloc, de ratificar *in vivo* que SLIMP no és una seril-ARNt sintetasa funcional i, en segon lloc, de determinar si el silenciament de SLIMP influeix en el grau d'aminoacilació dels ARNt^{Ser}, es mesuren els nivells de serilació dels dos *DmARNt^{Ser} mt* de *D. melanogaster* en larves ARNi per a la proteïna SLIMP.

S'extreu l'ARN total de larves de tercer estadi que provenen dels encreuaments de les soques ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} i ARNi_{SLIMP estoc 33774} amb la soca actina 5C-GAL4 a 29°C (consulteu el subapartat 3.9.3.1) i se sotmeten a electroforesi d'ARN en gel de poliàcrilamida àcid d'alta resolució (consulteu l'apartat 3.5.3), seguida de *northern blot* d'ARNt (vegeu l'apartat 3.5.4). Es mesuren els nivells d'aminoacilació dels *DmARNt^{Ser} (GCU) mt*, *DmARNt^{Ser} (UGA) mt* i *DmARNt^{Lys} (CUU) mt* (emprat com a control), en larves que no mostren el marcador Tb i que, per tant, tenen l'ARNi

en funcionament (*ON*), i es comparen amb els nivells d'ARNt aminoacilat d'aquelles larves on l'ARNi no està en funcionament (*OFF*) i que presenten el marcador Tb.

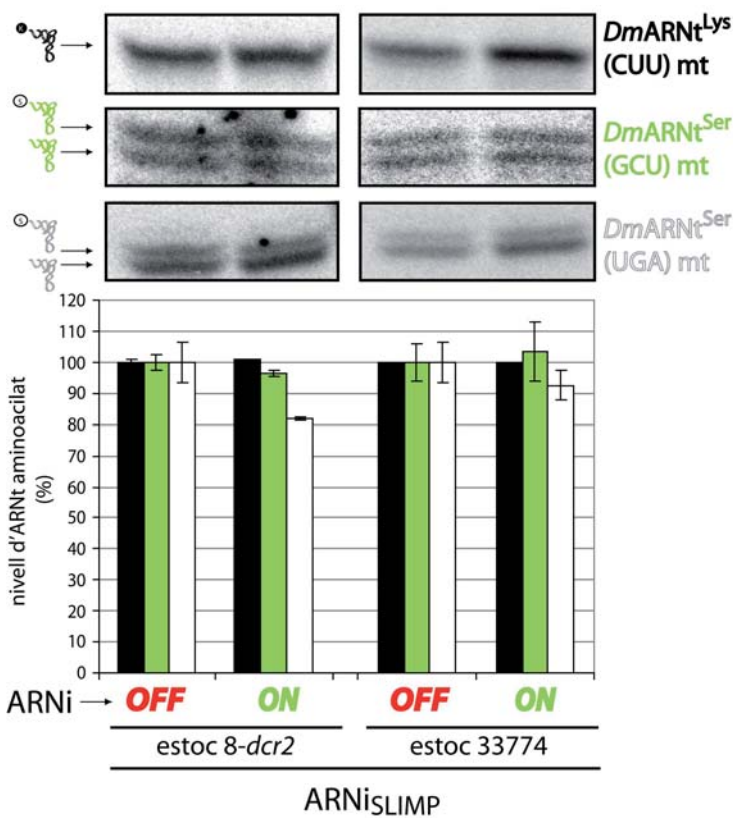


Figura 4.33 Determinació del grau d' aminoacilació dels *DmARNt^{Ser}* (GCU) i (UGA) mt de larves ARNi per SLIMP. Es compara el nivell d' aminoacilació de diferents ARNt a partir de mostres de 30µg d'ARN total de larves ARNi *ON* i *OFF*, que emergeixen dels encreuaments de les soques ARNi_{SLIMP} estoc 8-dcr2 i ARNi_{SLIMP} estoc 33774 amb la soca actina 5C-GAL4 a 29°C. El panell superior presenta els *northern blot* realitzats amb sondes contra els *DmARNt^{Lys}* (CUU) mt (control), *DmARNt^{Ser}* (GCU) i (UGA) mt. Les bandes superiors corresponen a ARNt aminoacilats i les inferiors a ARNt desacilats. El gràfic inferior representa la quantificació relativa del grau d' aminoacilació dels ARNt de larves ARNi *ON*, respecte al grau d' aminoacilació de larves ARNi *OFF*, que es considera el 100%. Les columnes simbolitzen el percentatge mitjà ± l'error estàndard de dos experiments independents, en negre es mostren els nivells de *DmARNt^{Lys}* (CUU) mt, en verd els de *DmARNt^{Ser}* (GCU) mt i en blanc els de *DmARNt^{Ser}* (UGA) mt. Els valors se sotmeten al test *t* de Student.

El panell superior de la figura 4.33 ensenya els resultats dels *northern blot* amb sondes que reconeixen el *DmARNt^{Lys}* (CUU) mt, el *DmARNt^{Ser}* (GCU) mt i el *DmARNt^{Ser}* (UGA) mt. En consonància amb els resultats de l'apartat 4.2.3, en les larves Tb (*OFF*) el *DmARNt^{Lys}* (CUU) mitocondrial està totalment aminoacilat i, en canvi, els dos *DmARNt^{Ser}* mitocondrials estan parcialment aminoacilats, en condicions normals.

El gràfic inferior de la figura 4.33 representa el nivell d'ARNt aminoacilat respecte al màxim establert com el nivell d' aminoacilació en larves Tb (*OFF*). Per a tots dos estocs utilitzats, quan l'ARNi està en funcionament (*ON*), tant el nivell d' aminoacilació del *DmARNt^{Lys}* (CUU) mt control, com del *DmARNt^{Ser}* (GCU) mt no varia. Quan s'usen larves de la soca ARNi_{SLIMP} estoc 8-dcr2 el grau de *DmARNt^{Ser}* (UGA) mt aminoacilat es veu lleugerament reduït de forma estadísticament no significativa.

Per una banda, els resultats confirmen que SLIMP no actua *in vivo* com una seril-ARNt sintetasa mitocondrial i suggereixen que no afavoreix l'accés dels *DmARNt^{Ser}* a la *DmSRS2*, atès que el silenciament de SLIMP no produeix una reducció significativa dels nivells d' aminoacilació dels dos *DmARNt^{Ser}* mitocondrials. Per altra banda, els resultats indiquen que SLIMP no segresta ni dificulta l'accés dels *DmARNt^{Ser}* mt a la seril-ARNt sintetasa mitocondrial de *D. melanogaster*, ja que no s'observa un augment en el grau d' aminoacilació d'aquests ARNt quan hi ha una depleció de la proteïna SLIMP.

4.3.2.3 L'activació ubiqa i constitutiva de l'ARNi contra SLIMP afecta la viabilitat en adults

Per tal d'ampliar coneixements pel que fa a la funcionalitat de la proteïna SLIMP, es testa l'essencialitat d'aquesta per mitjà del silenciament de la seva expressió tot seguint un patró constitutiu i ubic (vegeu el subapartat 3.9.3.1).

Les soques ARNi_{SLIMP estoc 8}, ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} i ARNi_{SLIMP estoc 33774} s'encreuen a 25°C i 29°C amb la soca actina 5C-GAL4. Els individus que emergeixen dels esmentats encreuaments poden ser de dos tipus (vegeu la figura 3.1): les larves que posseeixen el marcador *Tubby* (Tb), que en l'estadi d'adult presenten el marcador *Humeral* (Hu) tenen l'ARNi contra SLIMP desactivat, mentre que els individus que no presenten cap marcador, contenen l'ARNi activat. Es comptabilitza la descendència i es calcula el percentatge de viabilitat dels adults que tenen, alhora, el transgèn ARNi i l'activador GAL4.

La figura 4.34 posa de manifest que la viabilitat adulta de la progènie dels diferents encreuaments a 25°C es veu afectada amb diferents nivells de severitat, segons la soca ARNi emprada en l'experiment. Els descendents de la soca ARNi_{SLIMP estoc 33774} mostren una viabilitat d'un 12% i els de la soca ARNi_{SLIMP estoc 8} d'un 41,35%. L'efecte moderat d'aquest últim ARNi es pot intensificar amb l'addició d'una còpia transgènica del gen *dicer-2* sota el control de seqüències UAS a la soca ARNi_{SLIMP estoc 8} (ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2}), de manera que la viabilitat es veu reduïda fins a un 3,9%. La mortalitat encara és més acusada per a tots tres estocs quan els encreuaments es mantenen a 29°C, amb valors de viabilitat adulta del 0,87% per a la progènie de la soca ARNi_{SLIMP estoc 33774}, de l'11,25% per a la descendència de la soca ARNi_{SLIMP estoc 8} i de l'1,8% per als descendents de la soca ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2}. Donat que el funcionament del sistema UAS-GAL4 és dependent de la temperatura (Duffy, 2002), i que el grau de mortalitat es veu afectat per aquesta variable, es demostra que els efectes observats són deguts a l'expressió de l'ARNi, i no són conseqüència d'un fenomen de mortalitat sintètica. Per a tots tres estocs, la mortalitat dels individus amb l'ARNi actiu té lloc a l'estadi de pupa.

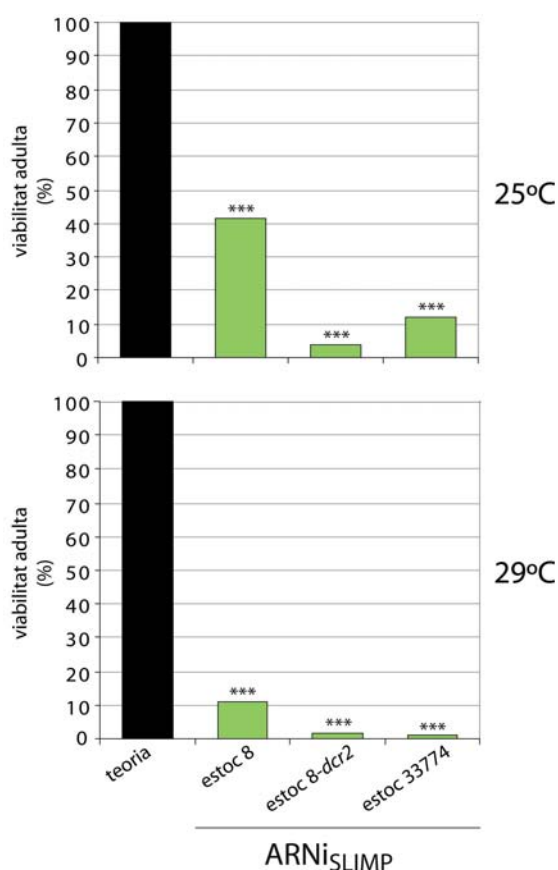


Figura 4.34 Efecte de la davallada constitutiva i ubiqa de SLIMP en la viabilitat adulta. Els gràfics mostren els percentatges de viabilitat adulta de la descendència dels encreuaments de les soques ARNi_{SLIMP estoc 8}, ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} i ARNi_{SLIMP estoc 33774} amb la soca actina 5C-GAL4, respecte al nivell teòric. El panell superior correspon als resultats a 25°C i l'inferior a 29°C. Es comptabilitzen >150 individus adults i els resultats se sotmeten al test estadístic X² (***) p<0,001).

Tot i que hi ha una certa variabilitat segons l'estoc ARNi utilitzat, es pot concloure que la proteïna SLIMP és essencial per al correcte desenvolupament de *D. melanogaster*, ja que la seva depleció seguint un patró ubic i constitutiu compromet la viabilitat adulta de forma significativa, en tots els casos.

4.3.2.4 L'activació de l'ARNi de SLIMP restringida a l'ala genera una greu deformació de l'òrgan

Per tal d'analitzar els efectes tissulars de la deficiència de la proteïna SLIMP, s'indueix l'expressió de l'ARN de cadena doble, destinat a degradar l'ARNm que codifica SLIMP de forma restringida en un teixit determinat, de tal manera que la viabilitat adulta no es vegi afectada. Com ja s'ha dut a terme anteriorment (vegeu l'apartat 4.2.5) s'utilitzen dues soques que expressen el factor de transcripció GAL4 de manera restringida a l'òrgan d'ala, sota els promotors/estimuladors dels gens *nubbin* i *patched*.

El gen *nubbin* és expressat des del segon estadi de larva de forma localitzada al sector del disc imaginal d'ala que dona lloc a la fulla i la frontissa de l'òrgan adult (Ng et al., 1995). Només una part de la progènie dels encreuaments entre les soques ARNi_{SLIMP} estoc 8 i ARNi_{SLIMP} estoc 33774 i la soca *nubbin-GAL4-UAS-dcr2* presenta l'ARNi contra SLIMP actiu, atès que conté l'activador *nubbin-GAL4* juntament amb el transgèn *UAS-dcr2*, i es caracteritza per no tenir cap marcador associat

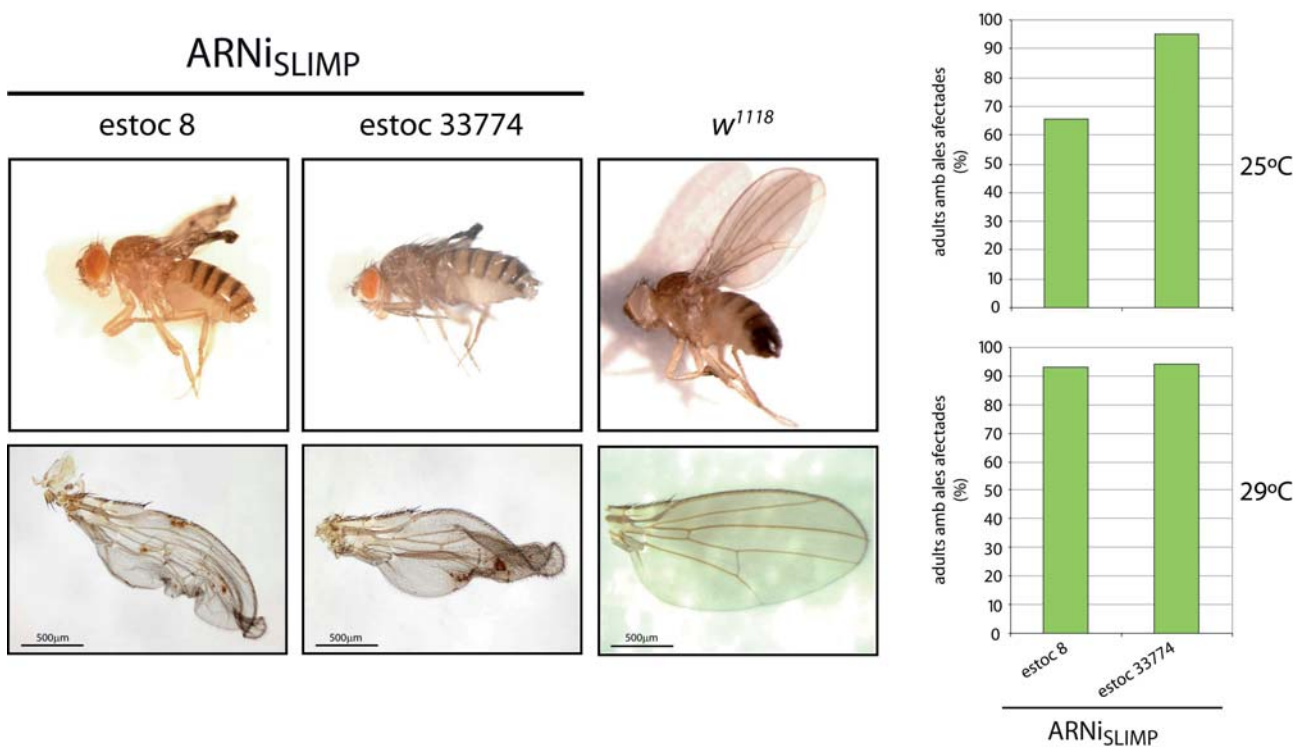


Figura 4.35 Efectes de la reducció de SLIMP a l'ala de *D. melanogaster*. El panell esquerre exposa fotografies d'individus adults i detalls d'ales de la progènie dels encreuaments entre les soques ARNi_{SLIMP} estoc 8 i ARNi_{SLIMP} estoc 33774 amb la soca *nubbin-GAL4-UAS-dcr2* a 29°C i de mosques *wt* (*w¹¹¹⁸*). Les barres d'escala representen 500µm. Els gràfics del panell dret mostren els percentatges d'individus amb ales anormals respecte al total d'individus que presenten l'ARNi actiu, a 25°C (gràfic superior) i 29°C (gràfic inferior), per als encreuaments amb tots dos estocs.

(consulteu la figura 3.2). L'altra part de la descendència té l'ARNi desactivat, ja que no conté els transgens nubbin-GAL4 ni UAS-*dcr2*, i es caracteritza per la presència dels marcadors d'adult CyO i Hu.

Es comptabilitza la descendència dels encreuaments a 25°C i 29°C i es calcula el percentatge d'individus amb l'ARNi en funcionament que exhibeixen efectes fenotípics a l'òrgan. El panell esquerre de la figura 4.35 ensenya imatges d'adults i detalls d'ales afectades per la depleció de SLIMP. El silenciament de SLIMP sembla no afectar l'estructura global de l'òrgan, però el teixit es col·lapsa evitant el correcte desenvolupament de la fulla de l'ala. Aquesta observació suggereix que els trastorns produïts per la disminució de SLIMP són acumulatius, ja que la inducció de l'ARNi no impedeix la formació de l'òrgan en estadis primerencs del desenvolupament de *D. melanogaster*.

El panell dret de la figura 4.35 mostra els gràfics amb els percentatges d'individus adults de la progènie que presenten defectes a les ales, relatius al nombre total d'individus que tenen l'ARNi actiu, a 25°C i a 29°C, per a tots dos estocs ARNi testats. A 25°C, el percentatge d'individus amb ales afectades és elevat, amb valors del 65,56% i del 95,35% per a les soques ARNi_{SLIMP estoc 8} i ARNi_{SLIMP estoc 33774}, respectivament, encreuades amb la soca nubbin-GAL4-UAS-*dcr2*. A 29°C, aquesta proporció arriba al 93% (ARNi_{SLIMP estoc 8}) i al 94,44% (ARNi_{SLIMP estoc 33774}).

El gen *patched* és expressat a la línia anteroposterior de tots els discs imaginals de larva (Phillips et al., 1990) i, en les ales adultes, a la zona delimitada per les venes longitudinals L3 i L4. Els encreuaments a 29°C de la soca *patched*-GAL4 amb les soques ARNi_{SLIMP estoc 8}, ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} i ARNi_{SLIMP estoc 33774} (consulteu la figura 3.3) donen lloc a una descendència que expressa l'ARNi contra SLIMP a la zona flanquejada per les venes L3 i L4 de l'ala.

El panell superior de la figura 4.36 exposa imatges detallades d'ales d'adults mascles i femelles que provenen d'encreuaments entre la soca *patched*-GAL4 i les diferents soques ARNi. En tots els casos, es detecta una disminució de la superfície afectada pel silenciament de SLIMP, que és més acusada a la part distal de l'ala i, en alguns casos, s'observa una reducció o eliminació de la vena anterior creuada. El gràfic inferior de la figura 4.36 representa les mesures d'àrea de les regions flanquejades per les venes L3 i L4 de 24-30 ales. Quan s'usa la soca ARNi_{SLIMP estoc 8} l'àrea L3-L4 es veu reduïda a valors del $93,86 \pm 2,22\%$, quan s'empra la soca ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} la davallada és del $88,29 \pm 2,11\%$ i amb la soca ARNi_{SLIMP estoc 33774} del $94,11 \pm 3\%$, prenent com a referència les àrees L3-L4 de mosques *patched*-GAL4.

Les àrees delimitades per les venes longitudinals L2 i L3 també són mesurades per tal d'estudiar si l'efecte de l'ARNi s'estén a regions contigües a la zona L3-L4. L'àrea L2-L3, en ales de la progènie dels encreuaments entre la soca *patched*-GAL4 amb la soca ARNi_{SLIMP estoc 8} correspon a un $102,6 \pm 2,27\%$, amb la soca ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} a un $95,92 \pm 2,36\%$ i amb la soca ARNi_{SLIMP estoc 33774} a un $99,33 \pm 3,03\%$, sempre utilitzant com a referent l'àrea d'ales *patched*-GAL4. Aquests resultats permeten concloure que l'efecte del silenciament de SLIMP és autònom cel·lular, ja que no afecta de manera significativa l'àrea contigua a la regió d'expressió de l'ARNi.

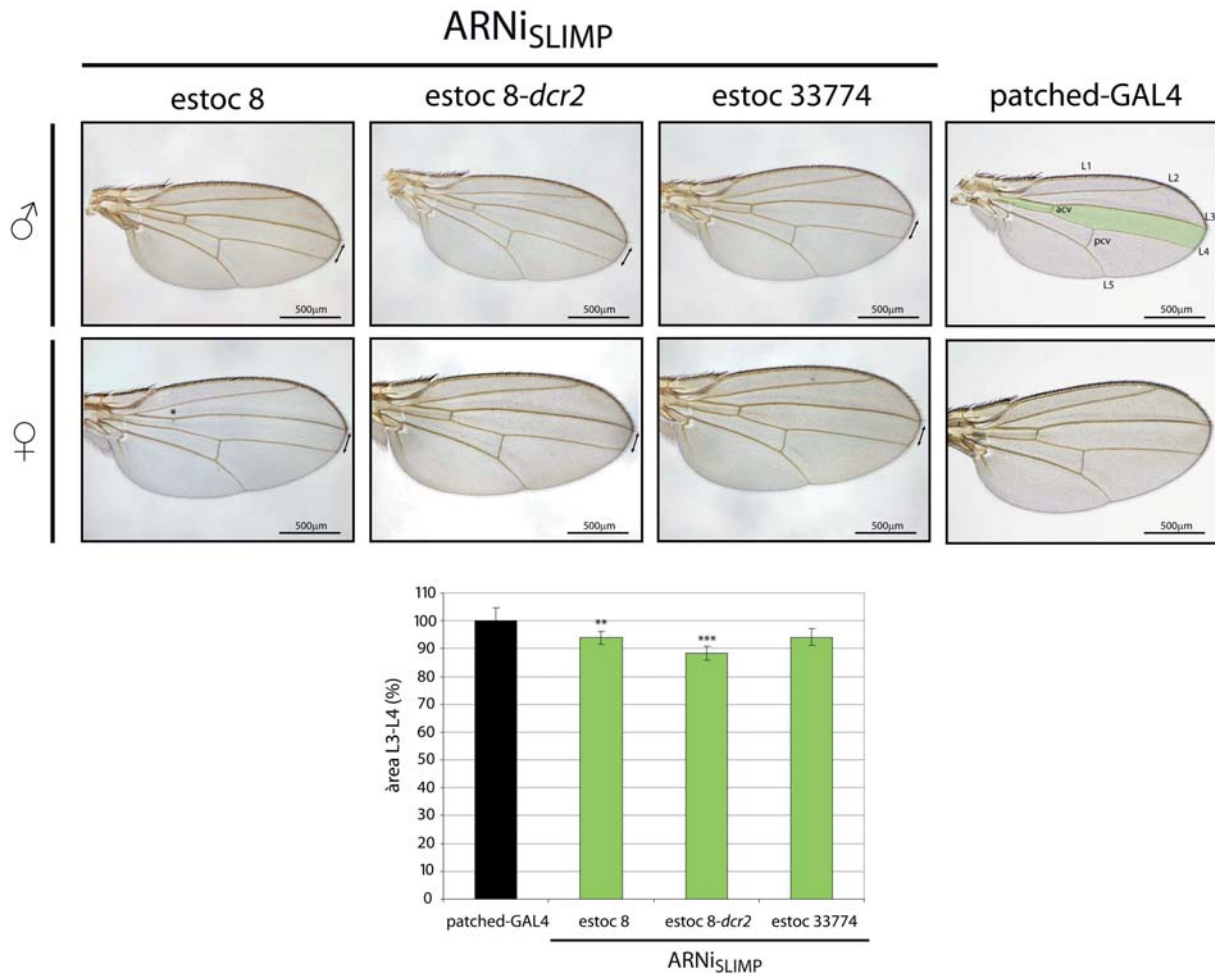


Figura 4.36 Efecte de la depleció de SLIMP restringida a la regió flanquejada per les venes longitudinals d'ala L3 i L4. El panell superior presenta fotografies d'ales de mascles i femelles descendents dels encreuaments entre la soca patched-GAL4 i les soques ARNi_{SLIMP} estoc 8, ARNi_{SLIMP} estoc 8-*dcr2* i ARNi_{SLIMP} estoc 33774 a 29°C, i de mosques control (patched-GAL4). En la imatge superior dreta s'indiquen les venes longitudinals L1, L2, L3, L4 i L5, les venes anterior (acv) i posterior (pcv) creuades i, en color verd, la regió d'expressió de l'ARNi. Les barres d'escala representen 500µm, les fletxes negres indiquen l'estrenyiment de l'àrea L3-L4 i els asteriscs senyalen la pèrdua total o parcial de l'acv. El gràfic del panell inferior representa els resultats de les mesures de les àrees L3-L4 de la descendència afectada pels ARNi (columnes verdes) respecte a les àrees control (columna negra) d'encreuaments a 29°C. Les columnes corresponen al percentatge mitjà ± l'error estàndard. Els resultats s'analitzen estadísticament amb el test two-way ANOVA (** p<0,01; *** p<0,001).

Es mesura la densitat cel·lular de 24-27 ales d'adults control patched-GAL4 i de descendents de l'encreuament entre la soca patched-GAL4 i la soca ARNi_{SLIMP} estoc 8-*dcr2*. La densitat cel·lular, de $10,61 \pm 0,16$ cèl·lules/100µm, no és significativament diferent de la densitat en ales control, de $10,95 \pm 0,15$ cèl·lules/100µm. Si la densitat cel·lular no es veu influenciada per l'activació de l'ARNi significa que l'àrea cel·lular no ha variat, sinó que hi ha un menor nombre de cèl·lules a la regió L3-L4.

La reducció de la densitat cel·lular, fruit de la depleció de SLIMP a la zona L3-L4, pot ser causada per una disminució de la taxa de divisió cel·lular i/o un augment de la mort cel·lular. L'apoptosi, o mort cel·lular programada en metazous és necessària per a l'eliminació controlada de cèl·lules al llarg del desenvolupament i per al manteniment de l'homeòstasi (Danial i

Korsmeyer, 2004), però també té lloc en situacions patològiques que requereixen la mort cel·lular en benefici de l'organisme. Per tal d'investigar si les cèl·lules de la línia anteroposterior dels discs imaginals d'ala pateixen un increment del nivell d'apoptosi quan estan sotmeses a l'ARNi contra SLIMP, es realitzen experiments d'immunofluorescència de discs imaginals d'ala de larves que sorgeixen dels encreuaments a 29°C entre la soca *patched-GAL4* i les soques $ARNi_{SLIMP}^{estoc\ 8}$, $ARNi_{SLIMP}^{estoc\ 8-dcr2}$ i $ARNi_{SLIMP}^{estoc\ 33774}$. Com a control positiu d'apoptosi, s'utilitzen larves que sobreexpressen el gen *reaper* (*rpr*), que està involucrat en l'apoptosi durant el desenvolupament de *D. melanogaster* (White et al., 1994; Grether et al., 1995), tot seguint el patró d'expressió de *patched* (vegeu el subapartat 3.9.3.2). Com a control negatiu s'empren larves *patched-GAL4*.

Per tal de detectar si les cèl·lules presenten un increment del grau d'apoptosi, s'empra un anticòs comercial dissenyat per al reconeixement de la Caspasa-3 humana processada i activa. En *D. melanogaster*, aquest anticòs és capaç de reconèixer les caspases efectores actives DCP-1 i, probablement, DRICE en cèl·lules apoptòtiques i, alhora, reacciona amb productes de l'activitat de la proteïna DRONC, similar a la Caspasa-9 de mamífers (Fan i Bergmann, 2010).

A la figura 4.37 s'ensenyen imatges d'immunofluorescències de discs imaginals, on s'observa que els discs que sobreexpressen el gen proapoptòtic *reaper* amb el patró del gen *patched* mostren un senyal a la franja anteroposterior del primordi (vegeu la primera renglera), en canvi, els discs que posseeixen el transgèn *patched-GAL4* sol, no mostren senyal d'apoptosi (vegeu la segona renglera). Els discs imaginals de larves que procedeixen de la soca $ARNi_{SLIMP}^{estoc\ 8}$ no exhibeixen senyal apoptòtic,

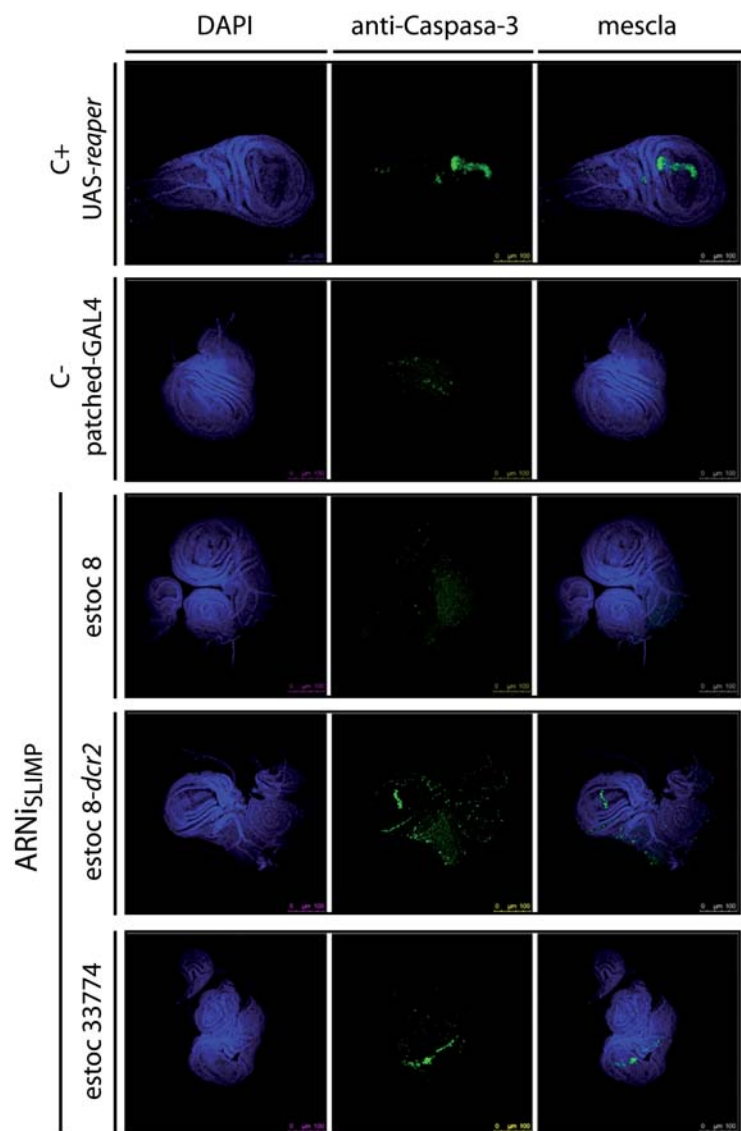


Figura 4.37 Anàlisi de l'apoptosi a la línia anteroposterior dels discs imaginals d'ala. S'exposen imatges d'immunofluorescències de discs imaginals de larves que sobreexpressen el gen *rpr*, de larves amb el transgèn *patched-GAL4* i larves sota la influència de l'ARNi contra SLIMP seguint el patró d'expressió de *patched* tot usant les soques $ARNi_{SLIMP}^{estoc\ 8}$, $ARNi_{SLIMP}^{estoc\ 8-dcr2}$ i $ARNi_{SLIMP}^{estoc\ 33774}$, de dalt a baix. Les columnes mostren, d'esquerra a dreta, la tinció de nuclis (DAPI), de les proteïnes proapoptòtiques DCP-1, DRICE i DRONC (anti-Caspasa-3) i la superposició dels dos senyals (mescla). Les barres d'escala representen 100µm.

mentre que els dos estocs més astringents, ARNi_{SLIMP} estoc 8-dcr2 i ARNi_{SLIMP} estoc 33774, sí que presenten senyal apoptòtic a la línia anteroposterior dels discs d'ala.

Així doncs, es pot afirmar que l'apoptosi seria un dels mecanismes responsables de la reducció del nombre de cèl·lules quan el teixit és sotmès a la depleció de la proteïna SLIMP, especialment intensa en els dos estocs més eficients. De tota manera, no es pot descartar que la divisió de les cèl·lules afectades per l'ARNi no estigui patint un cert alentiment.

En definitiva, l'expressió restringida de l'ARNi dirigit contra SLIMP a l'òrgan d'ala de *D. melanogaster*, produeix defectes en el desenvolupament del teixit causant greus trastorns morfològics i una reducció en el nombre de cèl·lules que pot ser conseqüència d'un augment de l'apoptosi de les cèl·lules afectades.

4.3.2.5 Els mitocondris afectats per una reducció en els nivells de SLIMP pateixen seriosos defectes morfològics

Amb el propòsit d'analitzar els efectes de la restricció de l'expressió de la proteïna SLIMP a nivell cel·lular, s'estudia la ultraestructura mitocondrial per mitjà de mètodes de microscòpia electrònica de transmissió (MET), tal i com s'ha realitzat a la secció anterior (vegeu l'apartat 4.2.6). S'empren els cossos adiposos de larves de tercer estadi que procedeixen de l'encreuament a 29°C de la soca actina 5C-GAL4 amb la soca ARNi_{SLIMP} estoc 8-dcr2 i de larves control (*w*¹¹¹⁸).

En primer lloc, s'observa que l'estructura cel·lular estigui correctament preservada, per tal de descartar artefactes de la tècnica a l'hora d'analitzar el fenotip causat per la davallada de SLIMP. Com es posa de manifest a la figura 4.38, les mostres estan ben preservades i l'organització cel·lular dels adipòcits de larves control i ARNi no presenta alteracions.

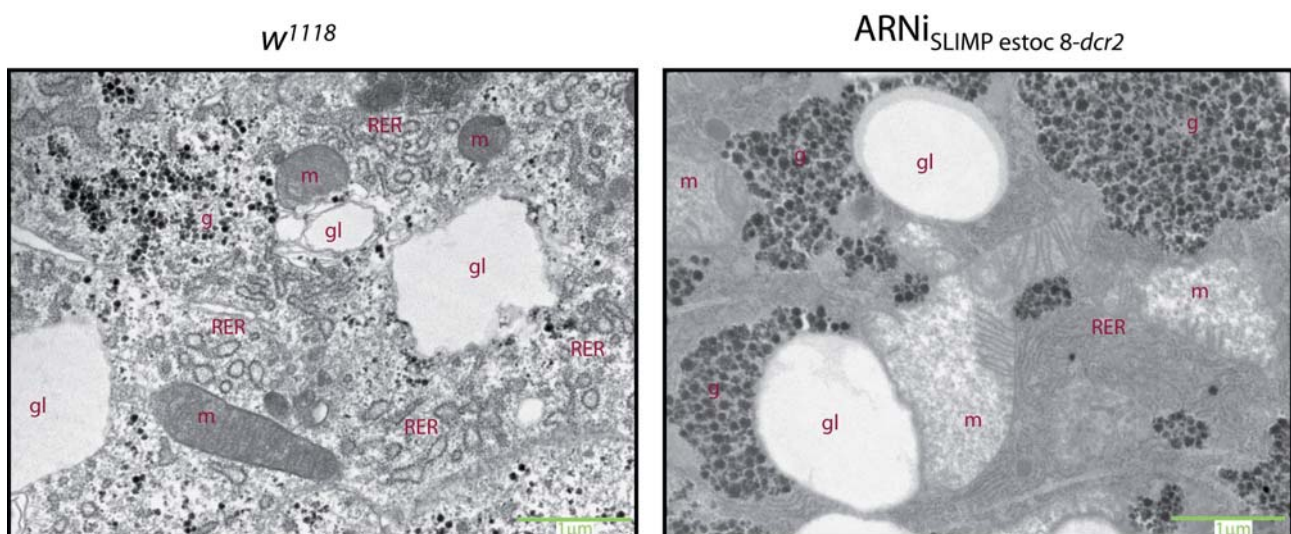


Figura 4.38 Organització ultraestructural d'adipòcits de larves de *D. melanogaster*. Es mostren micrografies electròniques preses a 25.000X de la ultraestructura d'adipòcits de larves *wt* (*w*¹¹¹⁸), a l'esquerra, i de larves que pateixen la depleció generalitzada de SLIMP. S'indiquen, amb caràcters de color granat, diferents estructures cel·lulars: gl, gotes lipídiques; RER, reticle endoplasmàtic rugós; g, glicogen i m, mitocondris. Les barres d'escala representen 1µm.

S'observen gotes lipídiques i acumulacions de grànuls de glicogen al citoplasma de les cèl·lules, així com un elevat contingut de RER i mitocondris.

En canvi, la ultraestructura mitocondrial s'observa com ha estat greument trastornada per la depleció de la proteïna SLIMP, en comparació amb la dels mitocondris *wt*, tal com es representa a la figura 4.39. Els mitocondris afectats per l'ARNi contra SLIMP mostren matrius amb una baixa densitat als electrons, que contrasten amb les matrius mitocondrials de les mostres control, que exhibeixen una alta densitat electrònica. Aquests mitocondris anormals tenen la matriu mitocondrial clarament inflamada, fet que va acompanyat d'un augment de la superfície total dels mitocondris. Tot i que els mitocondris mostren un increment de la seva àrea, les crestes mitocondrials no ocupen la totalitat de l'orgànul, sinó que, al contrari, pateixen una pèrdua total o local d'estructures complexes (observeu els mitocondris de la primera, tercera i quarta renglera del panell inferior). En alguns casos, la membranes mitocondrials internes (MMI) dels mitocondris de larves sotmesos a l'ARNi formen estructures aberrants (vegeu els mitocondris de la segona renglera del panell inferior).

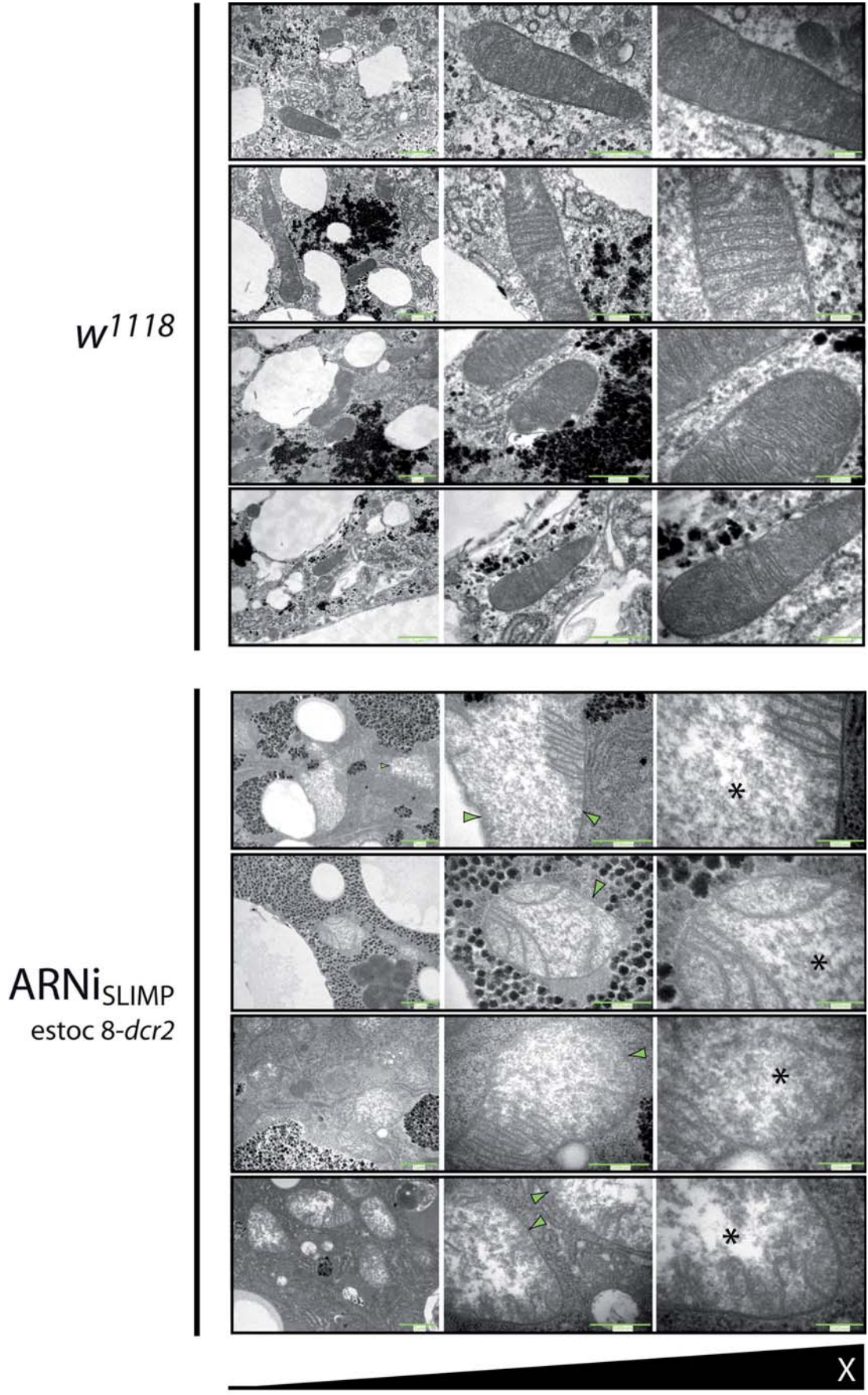


Figura 4.39 Efectes del silenciament de SLIMP en la ultraestructura mitocondrial. S'exhibeixen fotografies de MET de mitocondris d'adipòcits de larva, de menor a major augment amb barres d'escala que corresponen a 1μm, 500nm i 200nm d'esquerra a dreta. El panell superior ensenya mitocondris *wt* (*w¹¹¹⁸*) i, el panell inferior, mitocondris de larves de tercer estadi de l'encreuament de la soca actina 5C-GAL4 amb la soca *ARNi^{SLIMP} estoc 8-dcr2* a 29°C. Els asteriscs senyalen zones amb la matriu mitocondrial inflamada i de densitat electrònica baixa i els caps de fletxa indiquen zones amb una pèrdua total o parcial de les crestes mitocondrials.

Per tal de quantificar i comparar la superfície mitocondrial de cèl·lules control i de cèl·lules sotmeses a l'ARNi de SLIMP es mesura l'àrea dels mitocondris de micrografies electròniques per a cada mostra. Com revela el gràfic de la figura 4.40, els mitocondris de larves que emergeixen de l'encreuament a 29°C de la soca actina 5C-GAL4 amb la soca ARNi_{SLIMP} *estoc 8-dcr2* tenen una àrea mitjana de $0,718 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$, que és significativament superior a l'àrea mitjana de les larves control, $0,555 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$.

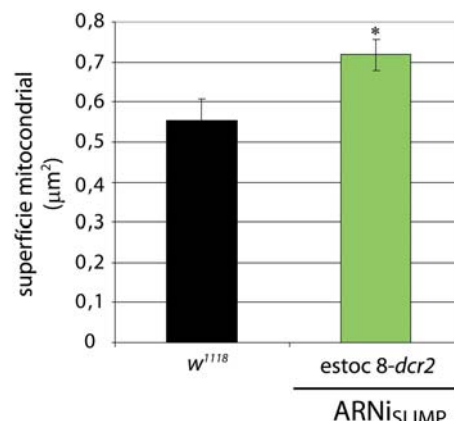


Figura 4.40 Mesura de la superfície mitocondrial. El gràfic representa l'àrea mitjana mitocondrial ± l'error estàndard d'adipòcits *wt* (columna negra) i afectats per l'ARNi de SLIMP (columna verda). Els valors són sotmesos al test *t* de Student (* $p < 0,05$).

En aquest apartat s'ha fet palès que la depleció de la proteïna SLIMP, de funció essencial en el desenvolupament de *D. melanogaster* i de localització mitocondrial, genera defectes generalitzats en l'estructura mitocondrial i un increment notable de la superfície mitocondrial en d'adipòcits de larves de tercer estadi.

4.3.2.6 El silenciament de SLIMP repercuteix en un increment de la densitat mitocondrial

Amb l'objectiu d'investigar la influència del silenciament de la proteïna SLIMP en la biogènesi mitocondrial, es calcula la densitat mitocondrial, de larves control i larves afectades per l'ARNi contra SLIMP, fent ús de la tècnica de qPCR en temps real (vegeu l'apartat 3.10.1). Aquesta mètode permet determinar el nombre relatiu de còpies d'ADNmt, que es tradueix en el nombre de mitocondris per còpia d'ADN nuclear.

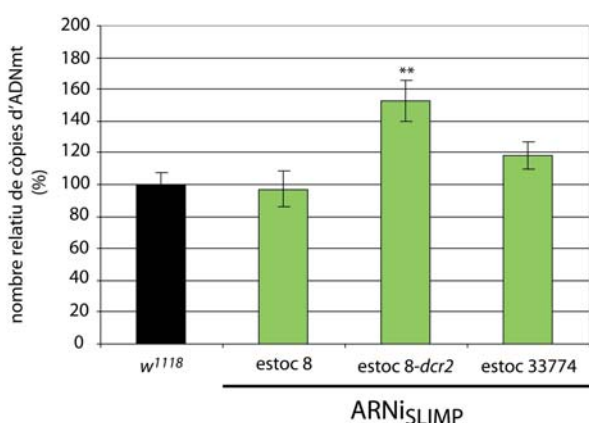


Figura 4.41 Abundància relativa del nombre de còpies d'ADNmt. El gràfic presenta el percentatge mitjà d'ADNmt ± l'error estàndard de cinc experiments independents. Es fixa com a 100% el nombre de còpies d'ADNmt en larves *w¹¹¹⁸* (columna negra) i, respecte a aquest, es representen la resta de valors (columnes verdes). Les dades són analitzades estadísticament per mitjà del test *t* de Student (** $p < 0,01$).

La tècnica es du a terme, com s'ha realitzat anteriorment a l'apartat 4.2.7, emprant un parell d'oligonucleòtids optimitzats que amplifiquen un fragment del gen mitocondrial de l'ATPasa6 i, un altre parell, que amplifica el gen nuclear mRp110. Les mostres d'ADN motlle per a les reaccions de qPCR corresponen a extraccions d'ADN genòmic de larves control (*w¹¹¹⁸*) i de larves que apareixen dels encreuaments entre la soca actina 5C-GAL4 i les soques ARNi_{SLIMP} *estoc 8*, ARNi_{SLIMP} *estoc 8-dcr2* i ARNi_{SLIMP} *estoc 33774* a 29°C.

El gràfic de la figura 4.41 ensenya l'abundància relativa d'ADNmt, respecte al nombre de còpies d'ADNn, tot utilitzant com a valor de referència

l'abundància relativa en les larves control.

Les larves sotmeses al silenciament de SLIMP mostren una tendència a l'increment en el nombre de còpies d'ADNmt, la qual cosa es reflecteix en un augment del nombre de mitocondris per cèl·lula. La densitat mitocondrial augmenta lleugerament, tot mostrant valors del $118,44 \pm 8,7\%$, quan s'empra la soca ARNi_{SLIMP estoc 33774}. Quan s'utilitza la soca ARNi_{SLIMP estoc 8}, no s'observen diferències de densitat mitocondrial ($96,94 \pm 11,25\%$), però, si es fa ús de la soca ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2}, que conté una còpia extra del gen *dicer-2* per tal d'intensificar l'efecte de l'ARNi, l'augment relatiu en el nombre de mitocondris s'eleva fins a un $152,43 \pm 13,16\%$.

Per tal de confirmar que la reducció del nivell d'expressió de SLIMP afecta la densitat mitocondrial, es comptabilitza el nombre de mitocondris en adipòcits a partir d'imatges de microscòpia electrònica de transmissió preses a 20.000X, tant per a larves control (*w¹¹¹⁸*), com per a larves que expressen de forma constitutiva i ubiqua l'ARNi contra SLIMP, fruit de l'encreuament a 29°C entre les soques actina 5C-GAL4 i ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2}.

Els resultats es posen de manifest a la figura 4.42. El gràfic del panell esquerre de la figura representa el nombre de mitocondris per unitat de superfície cel·lular. Mentre que la densitat de les mostres control és de $7,01 \pm 0,79$ mitocondris/100µm², la de les mostres sotmeses a l'ARNi de SLIMP és de $17,89 \pm 2,25$ mitocondris/100µm², fet que suposa un augment de la biogènesi mitocondrial de 2,5 vegades. Les imatges del panell dret de la figura 4.42 corresponen a dos exemples de micrografies electròniques, on s'observa el contingut cel·lular i la diferència en l'abundància de mitocondris en adipòcits *wt* i ARNi.

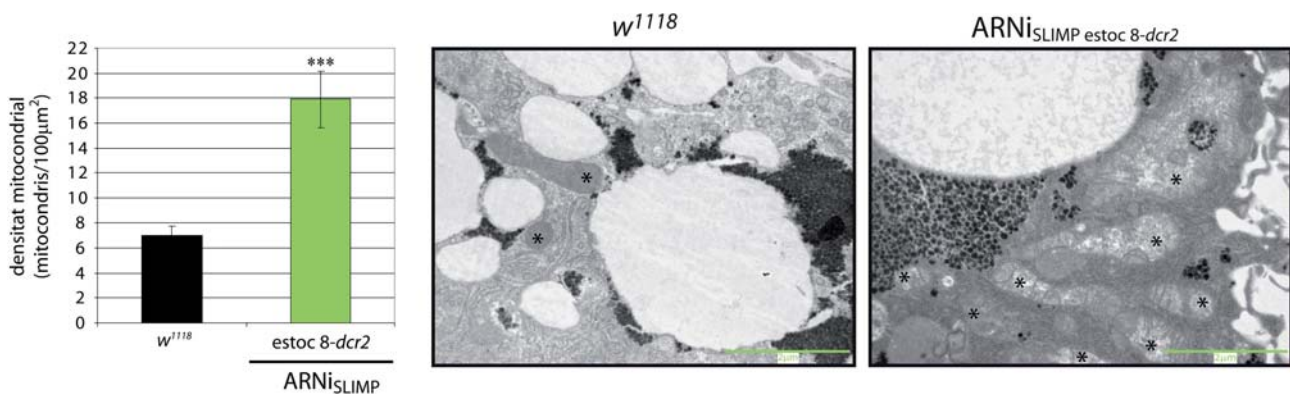


Figura 4.42 Càlcul de la densitat mitocondrial en teixit adipós larvari. El gràfic de l'esquerra mostra la densitat mitocondrial mitjana ± l'error estàndard, tot emprant teixit adipós de larves control (columna negra) i de larves que emergeixen de l'encreuament de les soques actina 5C-GAL4 i ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} a 29°C. Els resultats són sotmesos al test *t de Student* (***) $p < 0,001$). El panell de la dreta ensenya dues imatges representatives de MET, d'adipòcits control i ARNi, utilitzades per al càlcul de la densitat mitocondrial. Les barres d'escala indiquen 2µm i els asteriscs senyalen mitocondris.

Mitjançant la quantificació relativa del nombre de còpies d'ADNmt es demostra que una de les conseqüències de la depleció de la proteïna SLIMP és l'augment de la densitat mitocondrial. Aquest resultat es confirma, per a un dels estocs, amb una tècnica independent, tot comptabilitzant el nombre de mitocondris per unitat de superfície cel·lular en el teixit adipós de

larves de tercer estadi de *D. melanogaster* afectades per l'ARNi contra SLIMP amb un patró constitutiu i ubic.

S'observa que la tendència a augmentar la densitat mitocondrial és directament proporcional al grau de mortalitat detectat per inducció constitutiva i ubica de l'ARNi a 25°C (consulteu el subapartat 4.3.2.3), per als tres estocs utilitzats. És a dir, l'estoc ARNi_{SLIMP} estoc 8, que permet un nivell de viabilitat elevat (41%), no presenta un increment en el nombre de mitocondris, en canvi, els estocs que toleren un menor grau de supervivència, ARNi_{SLIMP} estoc 33774 (12%) i ARNi_{SLIMP} estoc 8-dcr2 (3,9%), presenten un augment gradual de la densitat mitocondrial, del 18% i del 52%, respectivament. Aquesta observació suggereix que l'increment del nombre de mitocondris és un mecanisme compensatori en resposta a la depleció de SLIMP.

4.3.2.7 La disminució de SLIMP genera un descens de la taxa de consum mitocondrial d'oxigen

Com acabem de descriure als subapartats 4.3.2.5 i 4.3.2.6, el silenciament de la proteïna SLIMP de *D. melanogaster* genera una sèrie de trastorns relacionats amb la morfologia i la biogènesi mitocondrials. Amb el propòsit d'investigar si els efectes de la davallada de SLIMP també repercuteixen en l'activitat metabòlica mitocondrial, es pretén estudiar la funció respiratòria mitocondrial *in situ*.

Per tal de realitzar els experiments de respirometria, es trien els dos estocs ARNi que generen fenotips més greus (ARNi_{SLIMP} estoc 8-dcr2 i ARNi_{SLIMP} estoc 33774). S'utilitzen larves de tercer estadi control (*w*¹¹⁸) i larves que expressen l'ARN de cadena doble contra SLIMP que provenen dels encreuaments a 29°C de la soca actina 5C-GAL4 amb els dos estocs mencionats. Les larves són disseccionades i permeabilitzades de manera selectiva, tot preservant la membrana mitocondrial externa intacta, fet que es comprova mitjançant la mesura del consum mitocondrial d'oxigen en resposta a l'addició de citocrom *c* (GM_{cD}). Per a les larves control *w*¹¹⁸ a 29°C, l'increment del consum en afegir citocrom *c* és d'un 5,85 ± 0,6%, per a les larves que provenen de la soca actina 5C-GAL4 encreuada amb la soca ARNi_{SLIMP} estoc 8-dcr2 a 29°C és d'un 5,08 ± 0,87% i amb la soca ARNi_{SLIMP} estoc 33774 a 29°C és d'un 5,52 ± 1,06%. Les condicions emprades garanteixen la permeabilització selectiva de les membranes plasmàtiques de les cèl·lules, ja que l'increment del consum d'oxigen en resposta a l'addició de citocrom *c* és, en tots els casos, menor al 10%.

Per tal d'avaluar el grau d'acoblament de la cadena respiratòria i la síntesi d'ATP, es calcula la ràtio control respiratòria (GM_D; estat 3/GM_N; estat 2). La

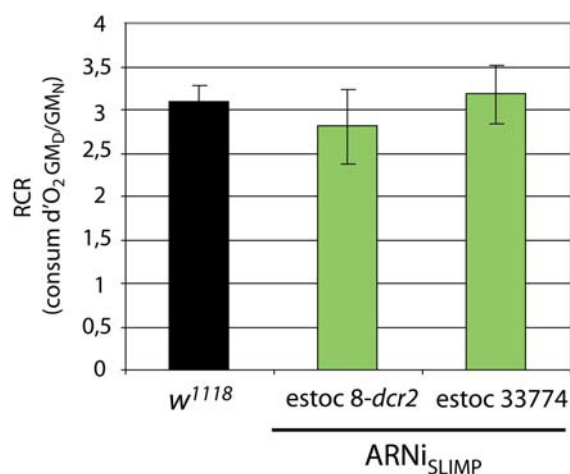


Figura 4.43 Valors RCR. Es representen els valors RCR de larves *w*¹¹⁸ (columnes negres) i ARNi (columnes verdes) que provenen de les soques ARNi_{SLIMP} estoc 8-dcr2 i ARNi_{SLIMP} estoc 33774 a 29°C. Es mostren les mitjanes ± els errors estàndard de més de 3 experiments independents. Els resultats se sotmeten al test estadístic *t de Student*.

figura 4.43 mostra que les ràtios RCR de les larves ARNi no varien significativament de la ràtio de larves control w^{1118} ($3,1 \pm 0,17$). Les larves que apareixen de l'encreuament de la soca actina 5C-GAL4 amb la soca ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} presenten un valor RCR de $2,81 \pm 0,43$, i amb la soca ARNi_{SLIMP estoc 33774} de $3,18 \pm 0,67$. Aquest resultat indica que les larves afectades per la depleció de la proteïna SLIMP presenten un grau d'acoblament de la cadena respiratòria amb la síntesi d'ATP similar al de les larves control.

A continuació, es monitora el consum mitocondrial d'oxigen en resposta a la successiva addició de substrats i inhibidors dels complexos de la cadena respiratòria, de la mateixa manera que s'ha realitzat abans per tal d'analitzar la respiració mitocondrial de larves ARNi per a la proteïna DmSRS2 (vegeu l'apartat 4.2.8). Es mesura el consum d'oxigen dels diferents estats respiratoris: GM_N (estat 2; per addició de glutamat i malat), GM_D (estat 3; després d'afegir-hi ADP + Mg⁺²), GM_{C_D} (un cop s'hi ha afegit citocrom c), GM_{Sc_D} (per incorporació de succinat), GM_{Sc_U} (després d'afegir-hi FCCP), Sc(Rot)_U (per presència de rotenona) i RotAma_U (rox; per addició d'antimicina A).

Inicialment, el consum mitocondrial d'oxigen és corregit pel pes de teixit de larva que s'ha utilitzat en cada cas (consulteu la figura 4.44), el qual ens proporciona informació de la funció respiratòria global del teixit larvari. Posteriorment, les dades són normalitzades tenint en compte la densitat mitocondrial (consulteu la figura 4.45), amb l'objectiu de valorar la capacitat respiratòria segons la biomassa mitocondrial. Com s'observa a la figura 4.44, el consum d'oxigen dels teixits de larves que procedeixen de la soca ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} no mostra diferències substancials amb el consum dels teixits de les larves control, i les larves que emergeixen de la soca ARNi_{SLIMP estoc 33774} exhibeixen una certa tendència a l'augment en el consum d'oxigen, especialment a l'estadi 3 (GM_D). Així doncs, a trets generals, la respiració mitocondrial dels teixits larvaris no es veu afectada per la deficiència de la proteïna SLIMP.

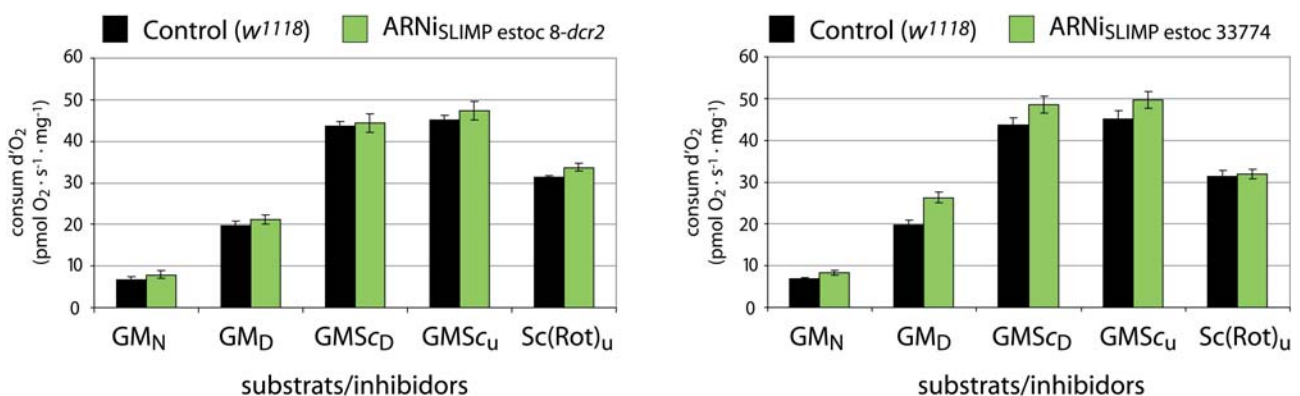


Figura 4.44 Consum mitocondrial d'oxigen per pes de teixit larvari. Es representa gràficament el consum d'oxigen dels diversos estats respiratoris de larves control (columnes negres) i larves ARNi (columnes verdes) que procedeixen dels encreuaments de la soca actina 5C-GAL4 amb les soques ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} i ARNi_{SLIMP estoc 33774}, a 29°C. Es mostren les mitjanes de més de 3 experiments independents ± els errors estàndards.

Fins ara, s'ha analitzat el consum mitocondrial d'oxigen general, sense tenir en compte la densitat mitocondrial en aquests teixits. Com ja hem observat anteriorment, l'augment de la densitat mitocondrial és una de les respostes a la depleció de SLIMP. Tenint en compte que els

mitocondris que pateixen el silenciament de SLIMP mostren una reducció parcial de la superfície ocupada per crestes mitocondrials, i que el perfil respiratori de larves ARNi és semblant al de larves control, es pot especular que el nivell respiratori es manté gràcies a l'increment de la densitat mitocondrial.

La figura 4.45 ensenya el consum d'oxigen dels diversos estats respiratoris normalitzats per la densitat mitocondrial determinada al subapartat 4.3.2.6. En el panell superior es representen els resultats de les respirometries, mostrades a la figura 4.44, corregides per l'abundància d'ADNmt determinada per qPCR en temps real. Les larves que contenen l'ARNi actiu de forma constitutiva i ubiqua que provenen de la soca ARNi_{SLIMP estoc 33774} no mostren diferències significatives respecte al control, pel que fa al perfil respiratori. Tot i així, es detecta una disminució de la capacitat respiratòria màxima (GMSc_u). En canvi, les larves que procedeixen de la soca ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} pateixen un descens significatiu de tots els valors de consum mitocondrial d'oxigen. Quan el consum d'oxigen és corregit per la densitat mitocondrial, calculada a partir de micrografies electròniques d'adipòcits de larves de tercer estadi, els valors de respirometria també es veuen greument limitats (vegeu el gràfic inferior de la figura 4.45). Aquest últim resultat confirma que els mitocondris de larves que emergeixen de l'encreuament a 29°C entre les soques actina 5C-GAL4 i ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} pateixen un marcat descens de la capacitat respiratòria.

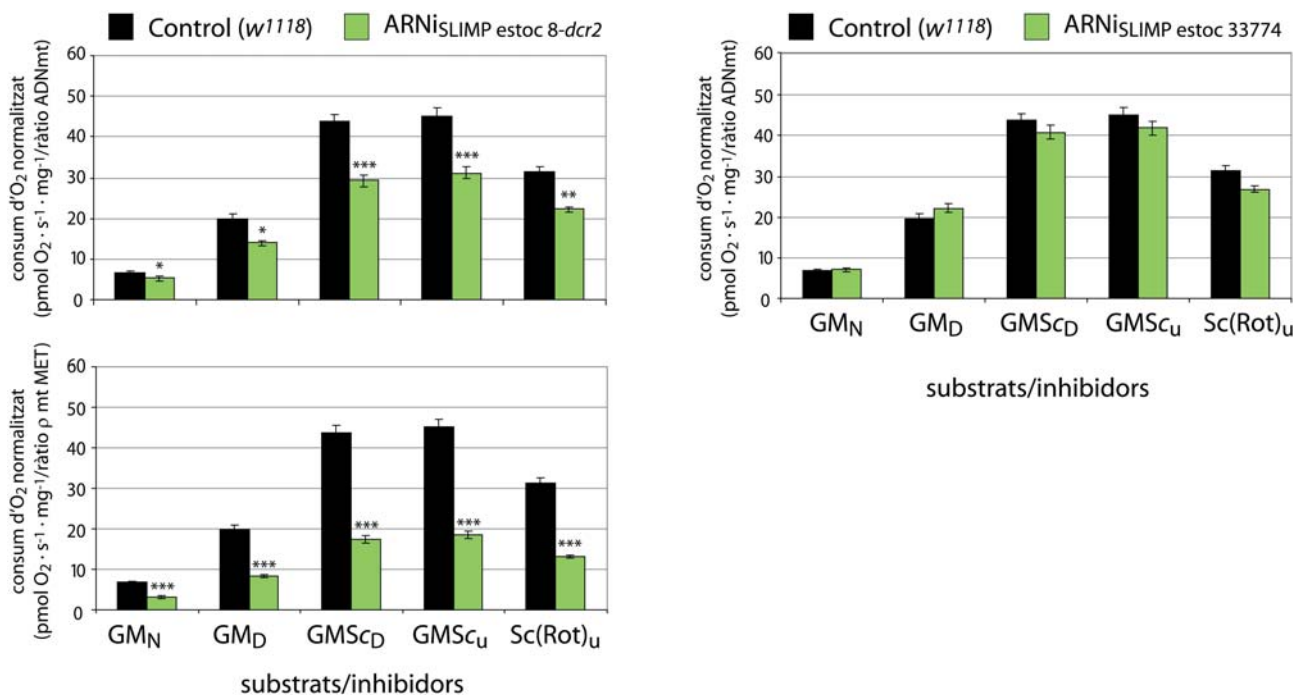


Figura 4.45 Consum mitocondrial d'oxigen normalitzat per la densitat mitocondrial. S'exhibeixen els gràfics dels diferents estats respiratoris per larves control (columnes negres) i larves ARNi (columnes verdes). Els gràfics del panell superior mostren els resultats normalitzats per la densitat mitocondrial, basada en l'abundància relativa de còpies d'ADNmt, per larves que emergeixen dels encreuaments de la soca actina 5C-GAL4 amb les soques ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} i ARNi_{SLIMP estoc 33774} a 29°C. El gràfic del panell inferior ensenya els valors normalitzats per la densitat (p) mitocondrial en adipòcits analitzada per MET. Es mostren les mitjanes ± els errors estàndard, i se sotmeten al test *t de Student* (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

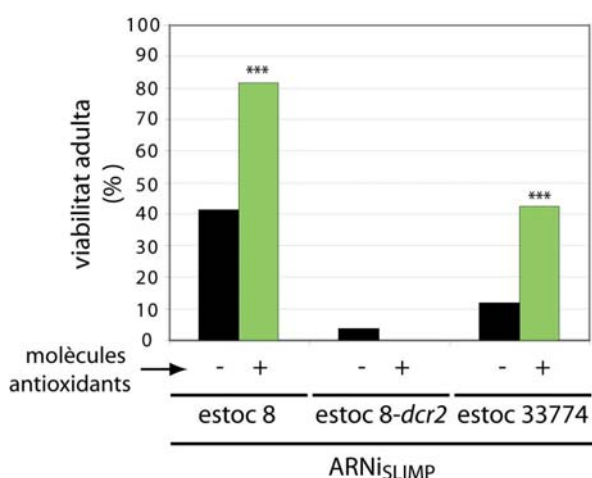
En conclusió, els resultats observats en aquest apartat indiquen que els mitocondris que pateixen l'efecte de l'ARNi contra la proteïna SLIMP mostren una capacitat respiratòria

mitocondrial limitada, proporcional a l'astringència de la soca ARNi utilitzada. La disfunció mitocondrial pot ser compensada amb un augment de la densitat i de la superfície mitocondrial que permeti un nivell respiratori òptim.

4.3.2.8 La presència de molècules antioxidants a la dieta de les mosques permet una recuperació parcial de la viabilitat a causa de la reducció de SLIMP

Fins ara, s'ha posat de manifest que la depleció de la proteïna mitocondrial SLIMP en *D. melanogaster* compromet l'estructura, la biogènesi i la funció mitocondrials. El funcionament inadequat de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa pot generar una acumulació d'electrons desaparellats que, combinats amb l'oxigen, donen lloc a espècies reactives d'oxigen (ROS) (vegeu l'apartat introductori 1.3.3). Sabent que la manca de SLIMP afecta la respiració mitocondrial, en aquest apartat es pretén investigar si el nivell de mortalitat adulta, quan s'expressa de manera global l'ARNi contra SLIMP, pot ser compensat amb un suplement alimentari ric en molècules antioxidants que puguin alleujar la toxicitat produïda per l'acumulació de ROS.

La mescla emprada (K-PAX) conté, entre altres molècules, antioxidants com el zinc, el seleni, l'àcid glutàmic, l'àcid ascòrbic (vitamina C), l'α-tocoferol (vitamina E), l'acetil-L-carnitina, l'àcid α-lipoic o la N-acetil L-cisteïna. Es realitzen encreuaments de la soca actina 5C-GAL4 amb



les soques ARNi_{SLIMP estoc 8}, ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} i ARNi_{SLIMP estoc 33774}, a la temperatura menys restrictiva de 25°C. Com s'observa a la figura 4.46, el suplement alimentari és capaç d'incrementar el grau de supervivència dels individus adults, malgrat el silenciament de SLIMP, en les dues soques d'efecte menys intens. Mentre que la mescla d'antioxidants no és capaç de recuperar la viabilitat adulta quan s'usa la soca més astringent, ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2}, la viabilitat de la progènie de la soca ARNi_{SLIMP estoc 33774} augmenta del 12% al 42,16% i la de la soca ARNi_{SLIMP estoc 8}, del 41,35% al 81,52%, valor que suposa una recuperació gairebé total del grau de supervivència.

Figura 4.46 Recuperació de la viabilitat mitjançant compostos antioxidants. Es veu representat el percentatge de supervivents adults procedents dels encreuaments a 25°C entre la soca actina 5C-GAL4 i les tres soques ARNi de SLIMP, mantingudes en absència (columnes negres) i presència (columnes verdes) de molècules antioxidants a la dieta. Els resultats s'analitzen estadísticament amb el test X² (***) p<0,001).

En primer lloc, el fet que l'addició de molècules antioxidants a la dieta de les mosques produeixi un augment de la viabilitat, juntament amb la reduïda capacitat respiratòria mitocondrial en els individus sotmesos al silenciament de SLIMP, suggereix que aquesta proteïna pot estar relacionada directament o indirectament amb el metabolisme mitocondrial. En segon lloc, el fet

que el nivell de recuperació de la viabilitat per la presència d'antioxidants sigui inversament proporcional al grau d'astringència dels estocs emprats suggereix que l'acumulació de ROS, probablement, és més elevada com més sever és l'estoc utilitzat. Per aquest motiu, pot ser que el suplement antioxidant no sigui suficient per tal de reduir uns nivells massa elevats de ROS que permetin recuperar la viabilitat en l'estoc més fort (ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2}).

En aquesta secció 4.3 s'ha estudiat bioquímicament i funcionalment una nova proteïna de *D. melanogaster*, que s'ha anomenat proteïna d'insecte similar a seril-ARNt sintetasa mitocondrial (SLIMP). Aquesta proteïna, és sintetitzada *in vivo* en espècies d'insectes i mostra una localització subcel·lular mitocondrial, dos aspectes que ja s'havien predit bioinformàticament a la secció 4.1. S'ha confirmat experimentalment que el centre catalític poc conservat de SLIMP no és capaç de dur a terme l'activitat enzimàtica d'aminoacilació ni d'unió a ATP, tot i que la proteïna conserva dues de les propietats típiques de les seril-ARNt sintetases mitocondrials convencionals: la conformació dimèrica i l'habilitat d'unir ARNt^{Ser} mitocondrials. A més, s'ha descrit que SLIMP té un patró d'expressió característic al llarg del cicle vital de *D. melanogaster*.

Per tal d'aprofundir en la funcionalitat de la proteïna SLIMP, s'ha determinat l'essencialitat d'aquesta, tot emprant soques de *D. melanogaster* transgèniques ARNi que permeten el silenciament específic de l'expressió de l'ARNm que codifica SLIMP. S'han observat greus trastorns com a conseqüència de la depleció de SLIMP, pel que fa a la mortalitat adulta i al desenvolupament de teixits concrets. De manera més específica, s'han descrit defectes greus en l'estructura, la biogènesi i la funció dels mitocondris de larves sotmeses a la reducció de SLIMP. En darrer lloc, un possible augment de l'estrès oxidatiu causat per la deficiència de la proteïna SLIMP s'ha vist compensat amb la presència d'un suplement alimentari ric en molècules antioxidants a la dieta de *D. melanogaster*.

