

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 |

5 DISCUSSIÓ

Els resultats descrits en la present tesi doctoral contribueixen, per una banda, al coneixement dels efectes que són conseqüència de la depleció d'un enzim de traducció genètica mitocondrial emprant un organisme model i, per altra banda, a la caracterització d'una proteïna paràloga a la seril-ARNt sintetasa mitocondrial de *Drosophila melanogaster*.

En *D. melanogaster* coexisteixen dos sistemes de síntesi proteica, un al mitocondri i un al citoplasma, els quals requereixen de maquinàries de traducció genètica independents. Aquest fet es fa palès amb la presència de dues poblacions de $DmARNt^{Ser}$ pròpies de cada compartiment cel·lular (vegeu l'apartat 4.1.1). Una d'elles és capaç de descodificar els codons serina específics del genoma nuclear, que segueixen el codi genètic estàndard, i l'altra de descodificar els codons serina propis del genoma mitocondrial. El codi genètic mitocondrial d'invertebrats, a part dels sis codons serina UCN i AGY, mostra la reassignació dels codons arginina AGR a serina. Per tal de descodificar aquests dos nous codons, cada organisme emprà una estratègia diferent: els nemàtodes posseeixen un $ARNt^{Ser}$ (UCU) (Okimoto et al., 1992) i els equinoderms i cefalòpodes presenten una modificació m^7G en la posició *wobble* de l'anticodó de l' $ARNt^{Ser}$ (GCU) que permet el reconeixement de tots els codons AGN (Matsuyama et al., 1998; Tomita et al., 1998). El codó AGG és absent en el genoma mitocondrial de *Drosophila* (de Bruijn, 1983; Garesse, 1988) però, tot i així, necessita descodificar el codó arginina AGA a serina. En *Drosophila* no hi ha evidències que cap $ARNt$ sigui importat al mitocondri, no existeix cap $ARNt^{Ser}$ (UCU), ni presenta la modificació m^7G en la posició *wobble* de l'anticodó del $DmARNt^{Ser}$ (GCU) mt, per això, se suggereix que la G no modificada del $DmARNt^{Ser}$ (GCU) mt seria capaç d'emparellar-se amb l'A del codó AGA, atès que no existeix, de moment, cap $ARNt$ competidor que pugui reconèixer aquest codó (Tomita et al., 1999).

La sorprenent troballa de tres possibles seqüències codificadores de seril-ARNt sintetases en *D. melanogaster*, que també comparteixen la resta d'insectes, una espècie d'aràcnid i una d'equinoderm (vegeu els apartats 4.1.2 i 4.1.3), ha requerit, en primer lloc, l'estudi bioinformàtic i filogenètic de les seqüències per tal de definir de manera preliminar el paper de cada una de les proteïnes en aquest organisme (consulteu els apartats 4.1.4-4.1.7). Així doncs, s'ha determinat que la seqüència CG17259 codifica la seril-ARNt sintetasa citoplasmàtica (*DmSRS1*), que la CG4938 dona lloc a la seril-ARNt sintetasa mitocondrial canònica (*DmSRS2*) i que la CG31133 codifica una proteïna homòloga a la *DmSRS2* que ha divergit evolutivament i funcionalment d'aquesta, que hem denominat SLIMP.

Tot i no formar part dels objectius d'aquest projecte de tesi, la funció de la *DmSRS1* com a SRS citoplasmàtica s'ha validat *in vitro*, ja que la proteïna ha estat emprada com a control en diversos experiments d'aquest treball. S'ha confirmat que la *DmSRS1* aminoacila l' $ARNt^{Ser}$ (GCU)

citoplasmàtic, té un centre catalític actiu que és capaç d'unir ATP (vegeu el subapartat 4.3.1.4) i que presenta una conformació dimèrica (consulteu el subapartat 4.3.1.5). Addicionalment, experiments d'ARNi (ARN d'interferència), que no formen part d'aquest treball, revelen que el silenciament constitutiu i ubic de la *DmSRS1* no permet la viabilitat adulta, fet que confirma l'essencialitat d'aquest enzim per a l'organisme.

5.1 CREACIÓ D'UN MODEL ANIMAL DE MALALTIA HUMANA CAUSADA PER LA DISFUNCIÓ D'UNA aaRS MITOCONDRIAL

En primer lloc, la predicció d'un pèptid de senyalització mitocondrial, la conservació de la seqüència i l'estructura proteiques i la distribució evolutiva propera a altres SRS mitocondrials assignen la *DmSRS2* com la seril-ARNt sintetasa mitocondrial canònica de *D. melanogaster*. En diversos apartats de la secció 4.2, s'ha demostrat que la *DmSRS2* té una localització mitocondrial (vegeu els apartats 4.2.1 i 4.2.9) i, a més, la distribució diferencial de dues versions de la proteïna en les diferents fraccions cel·lulars suggereix que el mecanisme de transport de la *DmSRS2* al mitocondri seria posttraduccional, tal com ocorre per la majoria de proteïnes mitocondrials codificades al nucli (Wickner i Schekman, 2005). En segon lloc, la davallada de la *DmSRS2* mitjançant ARNi produeix una baixada del nivell d'aminoacilació dels ARNt^{Ser} mitocondrials de *Drosophila*, fet que corrobora la funció convencional de la *DmSRS2* com a seril-ARNt sintetasa mitocondrial (vegeu l'apartat 4.2.3). En tercer lloc, la inducció de l'ARNi contra la *DmSRS2* de manera constitutiva i ubiqua compromet la viabilitat de l'organisme, fet que confirma l'essencialitat de la proteïna, com a aaRS (consulteu l'apartat 4.2.4). Addicionalment, la manca de *DmSRS2* restringida en el teixit d'ala n'afecta greument el desenvolupament, i l'ARNi_{*DmSRS2*} afecta la densitat de cèl·lules de manera autònoma cel·lular (consulteu l'apartat 4.2.5). Aquestes evidències permeten definir quina és la seril-ARNt sintetasa mitocondrial canònica de *D. melanogaster* i, així, poder iniciar el desenvolupament del principal objectiu del nostre projecte d'investigació: la generació d'un model de malaltia mitocondrial humana en *D. melanogaster* mitjançant la manipulació de la seril-ARNt sintetasa mitocondrial.

La tècnica de l'ARNi combinada amb el sistema UAS-GAL4 (vegeu l'apartat 1.4.3) és la metodologia escollida per tal d'interrompre l'activitat de la SRS2 de *Drosophila*. L'estratègia emprada permet controlar el nivell de silenciament per poder generar mosques amb diferents graus de depleció de la proteïna, que es tradueixen en diversos nivells de severitat de fenotip. Aquesta característica suposa dos avantatges per al nostre treball: en primer lloc, ens permet estudiar els efectes graduals de la manca de *DmSRS2* segons el nivell de silenciament de l'expressió i, en segon lloc, ens permet reproduir la variabilitat de símptomes que habitualment exhibeixen les malalties mitocondrials hereditàries (vegeu l'apartat 1.3.4). El nivell de silenciament es pot modular mitjançant diferents aspectes: la utilització de soques que posseeixen transgens ARNi que tenen com a diana regions de l'ARNm de *DmSRS2*, localitzacions cromosòmiques, longituds i procedències diferents; l'ús de diversos promotors d'inducció de l'expressió de l'ARN de cadena doble; l'expressió de la proteïna dicer-2, que potencia l'activitat de l'ARNi i el manteniment dels encreuaments a diferents temperatures.

D'aquesta manera, s'han analitzat els efectes de la manca de *DmSRS2* tot emprant soques transgèniques amb graus d'astringència diferents (vegeu els apartats 4.2.2-4.2.5). La soca ARNi_{*DmSRS2*} estoc 23003, que procedeix del VDRC, resulta ser la soca més eficient, en primer lloc, perquè, a diferència de les altres soques, quan l'ARNi és induït de forma constitutiva i ubiqua a

29°C els individus no aconsegueixen sobreviure l'estadi de larva. Addicionalment, l'eficiència de degradació de l'ARNm de *DmSRS2*, la reducció en el grau d'aminoacilació dels ARNt^{Ser} mitocondrials, el nivell de mortalitat per inducció global de l'ARNi i les anormalitats tissulars a causa de la depleció restringida de la *DmSRS2* són sempre els més acusats. La soca ARNi_{*DmSRS2* estoc 1-dcr2}, de construcció pròpia, mostra efectes moderats pel que fa als diferents aspectes acabats d'esmentar. Per últim, la soca ARNi_{*DmSRS2* estoc 1} pot ser considerada la més dèbil, ja que no presenta la còpia extra del gen *dicer-2*, i els fenotips de viabilitat i d'efecte restringit d'ala són lleus.

La *DmSRS2* és una proteïna essencial per a la síntesi dels 13 polipèptids codificats al genoma mitocondrial necessaris per a la cadena respiratòria i l'OXPHOS. La funció respiratòria i la morfologia mitocondrials són dos aspectes estretament relacionats. Per exemple, la disposició dels complexos de la cadena respiratòria i de la F₁-F₀-ATPasa determinen la integritat dels mitocondris, especialment de les crestes mitocondrials (Schneider i Hogeboom, 1951; Allen, 1995; Paumard et al., 2002). Per això, s'han volgut investigar les implicacions del silenciament de la *DmSRS2* en la ultraestructura i la funció mitocondrials (vegeu els apartats 4.2.6-4.2.8).

La morfologia mitocondrial es veu greument afectada per la manca de *DmSRS2*, amb matrius mitocondrials laxes i inflamades, disminució de la superfície ocupada per la MMI a causa d'una pèrdua total o parcial de crestes mitocondrials i, a més, s'observa un augment significatiu de la superfície mitocondrial. S'han publicat nombrosos exemples de malalties mitocondrials reproduïdes en *D. melanogaster* que presenten fenotips similars als que hem observat en teixit adipós larvari d'aquest organisme. Per exemple, alguns tipus de Parkinson en individus joves que són deguts a mutacions d'herència autosòmica recessiva en el gen *PINK1*, que codifica una serina/treonina cinasa de localització mitocondrial, afecten la morfologia de l'òrganul (Exner et al., 2007). Mutacions en la proteïna homòloga de *PINK1* en *Drosophila melanogaster* donen lloc a mitocondris amb crestes fragmentades, matrius laxes (Clark et al., 2006) i mitocondris engrandits (Park et al., 2006). Un altre cas similar és la síndrome de Wolf-Hirschhorn, que és deguda a una deleció al cromosoma 4, que inclou el gen *LETM1*, que codifica una proteïna implicada en l'homeostasi del K⁺ mitocondrial i en la integració de proteïnes a la MMI. Recentment, s'ha observat que el silenciament de la proteïna ortòloga de *Drosophila* també provoca inflamació dels mitocondris que, a més, mostren matrius transparents i restes de crestes mitocondrials (McQuibban et al., 2010).

A part d'anomalies ultraestructurals en els mitocondris, la interferència de la *DmSRS2* produeix una tendència a l'augment de la densitat mitocondrial (vegeu els apartats 4.2.6 i 4.2.7).

Per tal d'intentar relacionar els fenotips morfològics mitocondrials amb la funció de l'òrganul s'ha analitzat la funció respiratòria mitocondrial mitjançant la mesura del consum mitocondrial d'oxigen en les larves amb un silenciament constitutiu i ubic de la *DmSRS2*, que provenen de les dues soques més astringents de què disposem (consulteu l'apartat 4.2.8). Aquestes larves presenten una reducció de la ràtio control respiratòria a causa d'un augment del consum

d'oxigen en l'estat respiratori 2, que és senyal d'un desacoblament entre la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa, probablement causat per una permeabilitat anormal de la MMI als protons, que poden entrar a la matriu mitocondrial per difusió passiva i retroalimentar la cadena respiratòria sense la intervenció de la F_1-F_0 -ATPasa (Gnaiger, 2007). L'anàlisi de l'activitat de la cadena respiratòria mitjançant l'addició successiva de substrats i inhibidors revela que el teixit larvari té una capacitat respiratòria normal. Tanmateix, si es corregeixen els valors de consum d'oxigen segons la densitat mitocondrial (Boushel et al., 2007), calculada a través del nombre relatiu de còpies d'ADNmt, s'observa una baixada generalitzada del consum d'oxigen. Així doncs, sembla que els teixits afectats per la depleció de la *DmSRS2*, en realitat, tenen una capacitat respiratòria mitocondrial anormal que es veu emmascarada per un increment de la biogènesi mitocondrial. Aquest tipus de resposta compensatòria s'ha observat en diversos pacients amb símptomes de MELAS/MERRF causats per mutacions en l'ADNmt (Mita et al., 1995; Oldfors et al., 1995; Melone et al., 2004). Més recentment, en línies cel·lulars de ratolí que presenten insercions en el gen de l'ARNt^{Arg} mitocondrial, s'ha evidenciat que l'increment de la proliferació mitocondrial es desencadena per un augment en la producció d'espècies reactives d'oxigen (Moreno-Loshuertos et al., 2006). S'ha proposat que l'augment de la concentració de ROS intracel·lular modula la massa mitocondrial i el nombre de còpies d'ADNmt (Lee i Wei, 2005). De la mateixa manera, una deficiència en la *DmSRS2* podria estar induint, de manera directa o indirecta, un augment de la biogènesi mitocondrial impulsada per un increment de ROS. La mesura de la concentració de ROS, dels nivells de marcadors d'estrès oxidatiu o de l'efecte de molècules antioxidants en els individus afectats per la depleció de la *DmSRS2* són alguns dels possibles experiments que ens permetran, en un futur, determinar si existeix una vinculació entre els fenotips observats i l'estrès oxidatiu.

Ara per ara, no podem definir el procés pel qual una davallada de la *DmSRS2* pot generar els fenotips observats en aquest treball, però la baixada en els nivells de *DmARNt*^{Ser} mt aminoacilat ens permeten especular que les larves poden patir un alentiment de la taxa de síntesi proteica mitocondrial, i/o que la fidelitat de la traducció dels codons serina pot veure's afectada. Tots dos processos afectarien l'adequada síntesi dels polipèptids de la cadena respiratòria i, en conseqüència, es podria produir un increment de ROS, un mal funcionament de la cadena respiratòria, una reducció de la síntesi d'ATP, etc., que conduirien, finalment, a la mort cel·lular. Per tal d'esbrinar com la deficiència de *DmSRS2* afecta la síntesi proteica mitocondrial, es podria mesurar el grau d'expressió dels polipèptids codificats al genoma mitocondrial, que formen part dels complexos de la cadena transportadora d'electrons, mitjançant immunodetecció i, addicionalment, quantificar l'activitat dels complexos a través d'assajos espectrofotomètrics.

És necessari mencionar que, en contra del que es podia preveure, els descendents de la soca més astringent (*ARNi*_{*DmSRS2*} *estoc* 23003) deficients en *DmSRS2* presenten una resposta compensatòria suau, que es fa palesa amb un lleuger augment del nombre de còpies d'ADNmt, la qual sembla suficient per tal de mantenir una taxa respiratòria normal. Aquesta observació fa que ens

plantejem la possibilitat que algun mecanisme compensatori addicional tingui lloc en aquestes larves. Podria ser que diferents vies de resposta s'activessin seqüencialment, segons el nivell d'afectació de la síntesi proteica mitocondrial. Per una banda, el futur anàlisi ultraestructural de mitocondris de larves que procedeixen d'aquest estoc pot servir d'ajuda per tal de dilucidar si existeixen altres fenòmens morfològics compensatoris que permetin mantenir la funció mitocondrial. Per altra banda, un ampli estudi transcriptòmic de l'expressió de gens en larves sotmeses al silenciament de la *DmSRS2*, procedents de diferents estocs, és un dels experiments que, en un futur, ens aportarà informació valuosa per tal d'establir quines vies cel·lulars són induïdes en resposta a una disfunció en una aaRS mitocondrial, així com, recentment, s'ha dut a terme per al model *tko* (Fernández-Ayala et al., 2010).

Com ja s'ha exposat al capítol introductori (consulteu l'apartat 1.3.4), les malalties hereditàries humanes causades per mutacions en gens de l'ADNmt o l'ADNn que codifiquen elements de l'aparell de traducció genètica mitocondrial presenten un ampli rang de símptomes. El rol essencial que desenvolupen els nombrosos components de la maquinària de traducció mitocondrial fa que molts dels trets propis de patologies relacionades amb mutacions en aquests elements es reproduïxin també en el model animal que hem construït al llarg del present projecte de tesi, atès que afecta un d'aquests components: la seril-ARNt sintetasa mitocondrial. Les malalties mitocondrials que han estat més estudiades són les causades per mutacions en els ARNt mitocondrials. Els defectes directes de l'alteració dels ARNt mt són les anomalies en la traducció i la disminució de la taxa de síntesi proteica, que es manifesten, posteriorment, en un descens de l'activitat de la cadena respiratòria causat per una menor abundància dels polipèptids dels complexos codificats a l'ADNmt, o bé per la presència de subunitats no funcionals (Florentz et al., 2003). Aquest mateix tipus d'alteracions són les que s'esperen quan s'altera el funcionament d'una aaRS mitocondrial, com ho és la *DmSRS2*. Per exemple, el descens en els nivells d'aminoacilació dels *DmARNt^{Ser}* mt en el model que hem creat es pot comparar amb la reduïda eficiència d'aminoacilació de l'*ARNt^{Leu}* (UAA) mt humà que conté el canvi puntual A3243G (Park et al., 2003), que és una de les mutacions més comunes en malalts de MELAS, o bé amb les alteracions en el nivell d'aminoacilació de l'*ARNt^{Lys}* mt que posseeix la mutació A8344G (Enríquez et al., 1995), en pacients afectats per la malaltia MERRF. De la mateixa manera que els pacients de MELAS i MERRF mostren un funcionament o acoblament anormal de la cadena respiratòria (Larsson et al., 1992; Sasarman et al., 2008), el model que hem generat també presenta una capacitat respiratòria mitocondrial limitada. Mentre que les implicacions d'algunes mutacions en els *ARNt^{Leu}* (UAA) i *ARNt^{Lys}* mt en la funció i morfologia mitocondrials s'han estudiat àmpliament, els treballs publicats entorn els efectes que provoquen mutacions en els *ARNt^{Ser}* mt en els mitocondris són més limitats. Per una banda, s'han descrit diverses mutacions a l'isoacceptor *ARNt^{Ser}* (UGA) mt que causen malalties com la SNHL, entre les quals, la inserció 7472insC produeix una reducció de l'eficiència d'aminoacilació i una deficiència moderada en la funció mitocondrial (Toompuu et al., 2002), i la mateixa mutació

combinada amb un polimorfisme en el mateix ARNt provoca anormalitats en la ultraestructura mitocondrial (Cardaioli et al., 2006). Per altra banda, la substitució C12258A a l'ARNt^{Ser} (GCU) mt, que s'ha relacionat amb la DMDF, provoca defectes en la funció mitocondrial (Lynn et al., 1998). Un altre cas és el d'una pacient amb símptomes de MELAS/MERRF que posseeix la mutació G12207A en l'ARNt^{Ser} (GCU). Aquesta mutació desencadena un conjunt de símptomes que coincideixen estretament amb els fenotips observats en el model de malaltia mitocondrial que hem construït en aquest treball: presència de mitocondris pleomòrfics, reducció de l'activitat de la cadena respiratòria (especialment del complex I) i un increment de la densitat mitocondrial com a resposta compensatòria a la deficiència funcional (Wong et al., 2006).

Tot i que la majoria de desordres mitocondrials són causats per mutacions en l'ADNmt, molts dels desordres de l'OXPPOS són heretats de manera autosòmica, suggerint, així, que les mutacions en gens nuclears tenen un paper important en les malalties mitocondrials (Shoubridge, 2001). Les mutacions en gens nuclears que codifiquen proteïnes mitocondrials involucrades en la traducció genètica dins l'òrganul també produeixen patologies caracteritzades per una reducció de la síntesi proteica i per defectes en la cadena respiratòria mitocondrial. Alguns exemples són: la mutació E220X en la proteïna de modificació de l'ARNt, PUS1 (Fernández-Vizorra et al., 2007), mutacions en les proteïnes mitoribosomals MRPS16 i MRPS22 (Miller et al., 2004; Saada et al., 2007) o diverses substitucions en els gens que codifiquen factors de traducció mitocondrials (Coenen et al., 2004; Valente et al., 2007; Akama et al., 2010; Antonicka et al., 2010). Addicionalment, els malalts amb alteracions en els gens que codifiquen aaRS mitocondrials (*DARS2*, *RARS2* i *YARS2*) mostren una davallada en l'eficiència d'aminoacilació dels seus substrats, i les mutacions que afecten la *RARS2* i la *YARS2* produeixen disfuncions de la cadena respiratòria mitocondrial (Edvardson et al., 2007; Scheper et al., 2007a; Riley et al., 2010).

Així doncs, el model de malaltia mitocondrial en *D. melanogaster*, que hem generat al llarg d'aquesta tesi doctoral, en el qual el funcionament de la *DmSRS2* mitocondrial es veu compromès, és capaç de reproduir moltes de les característiques pròpies de malalties mitocondrials humanes i, per aquest motiu, pot ser una eina útil per tal de recopilar informació pel que fa a les conseqüències, a nivell funcional i estructural, que afecten el mitocondri quan el sistema de traducció mitocondrial està alterat.

Per tal de desenvolupar un model animal més acurat i informatiu de malaltia mitocondrial hereditària, en el futur, es pretén estudiar els efectes fenotípics de canvis puntuals en la SRS mitocondrial humana (*SARS2*) mitjançant la sobreexpressió de diverses versions mutants de la *SARS2* en mosques que, alhora, estan sotmeses a una davallada de la *DmSRS2*. Aquest tipus d'estratègia és la que s'ha emprat recentment per tal de construir un model en *D. melanogaster* que mimetizzi els símptomes de la malaltia humana Charcot-Marie-Tooth dominant intermèdia (DI-CMT) (Storkebaum et al., 2009). Storkebaum et al. han sobreexpressat la YRS citoplasmàtica humana (*YARS*) amb cada una de les tres mutacions descrites en malalts de DI-CMT en mosques

sotmeses al silenciament de la YRS endògena. En el nostre cas, per tal de dur a terme el sistema de complementació amb diferents SARS2 mutants, prèviament ha estat necessari determinar si la SARS2 *wt* és capaç de ser expressada i importada als mitocondris de *Drosophila* on, eventualment, podrà complementar la manca de *DmSRS2* (consulteu l'apartat 4.2.9). Un cop comprovada la localització de la proteïna heterològa cal determinar si la SARS2 *wt* sobreexpressada és capaç de reconèixer i aminoacilar els ARNt^{Ser} mt de *D. melanogaster*, i si té l'habilitat de rescatar el fenotip causat pel silenciament de la *DmSRS2* per, finalment, estudiar els efectes fenotípics de SARS2 mutants.

Mentre que en els darrers anys s'ha avançat notablement en la construcció d'organismes model per a diverses malalties mitocondrials humanes, existeixen molt pocs models animals per a malalties mitocondrials de traducció genètica (consulteu l'apartat 1.4.1). Per aquest motiu, el model animal que hem donat a conèixer en el present treball pot contribuir a ampliar aquest reduït grup d'organismes. En base a la literatura científica, és important posar de manifest que aquest és el primer animal model de malaltia mitocondrial humana associada a la disfunció d'una aminoacil-ARNt sintetasa mitocondrial. El descobriment, en els darrers tres anys, de les primeres malalties hereditàries associades a aaRS mitocondrials fa que, cada cop més, siguin necessaris models animals per a patologies d'aquesta etiologia. El model de *D. melanogaster* presentat en la present tesi de doctorat pot ajudar a entendre els mecanismes patogènics d'aquestes afeccions i cercar estratègies terapèutiques en el futur.

5.2 CARACTERITZACIÓ D'UNA NOVA PROTEÏNA ESSENCIAL D'INSECTE SIMILAR A SRS2

En el decurs del present projecte sobre la generació d'un model de malaltia mitocondrial humana en *D. melanogaster*, hem descobert una nova proteïna similar a seril-ARNt sintetases mitocondrials (SLIMP: *seryl-tRNA synthetase-like insect mitochondrial protein*; proteïna d'insecte similar a seril-ARNt sintetasa mitocondrial) que ha atret la nostra atenció, de tal manera que la seva caracterització ha esdevingut un dels objectius d'aquesta tesi doctoral. Com ja s'ha presentat a la introducció (vegeu l'apartat 1.2.4), existeixen nombroses proteïnes homòlogues a aaRS que han aparegut per fenòmens de duplicació, de transferència lateral de gens o de reorganització genòmica. Gran part d'aquestes proteïnes, normalment petites, tan sols mostren homologia amb un dels dominis que conformen les aaRS i poden desenvolupar funcions relacionades o no amb el procés d'aminoacilació dels ARNt. SLIMP es diferencia d'aquestes proteïnes perquè presenta un notable grau d'identitat amb seqüències senceres de seril-ARNt sintetases mitocondrials (SRS2). Mentre que, en general, les proteïnes similars a aaRS exhibeixen vastes distribucions filogenètiques, que en suggereixen un origen ancestral (Schimmel i Ribas de Pouplana, 2000; Geslain i Ribas de Pouplana, 2004), SLIMP sembla que és producte d'un esdeveniment relativament recent de duplicació del gen de la SRS2, que tingué lloc a la base de l'evolució dels metazous. SLIMP ha patit una elevada taxa evolutiva de divergència de la SRS2 canònica, que contrasta amb l'elevat grau de conservació que caracteritza les SRS (vegeu els apartats 4.1.5 i 4.1.6). El gen que codifica SLIMP s'ha mantingut en el genoma de tots els insectes dels quals se'n coneix la seqüència, de la paparra del cérvol i de l'eriçó de mar. La restringida informació genòmica d'altres espècies d'artròpodes i invertebrats, de moment, no permet estudiar de manera més extensa la distribució del gen que codifica SLIMP. Tanmateix, sembla que el gen codificador de SLIMP és present de manera universal en insectes (vegeu l'apartat 4.1.3) i és activament traduït en algunes espècies (consulteu l'apartat 4.3.1.1), fet que suggereix que la proteïna desenvolupa una funció important en insectes. Amb la informació genòmica de què disposem, no podem afirmar que els gens homòlegs a SLIMP en la paparra del cérvol i en l'eriçó de mar tinguin la mateixa funció que SLIMP en insectes. Existeix la possibilitat que l'antecessor de SLIMP, producte de la duplicació d'una SRS, adquirís una funció relacionada amb les propietats dels mitocondris dels invertebrats ancestrals. A més, el fet que SLIMP es trobi majoritàriament en insectes ens fa especular que el rol de la proteïna en aquests organismes pot representar una alternativa funcional que en altres metazous té lloc gràcies a la intervenció de proteïnes diferents. Una anàlisi més àmplia de la distribució evolutiva i de les característiques bioquímiques i funcionals de SLIMP en invertebrats, eventualment, proporcionarà informació sobre la funció i l'evolució mitocondrials en aquests organismes.

Tot i que SLIMP presenta homologia amb SRS mitocondrials, la seva funció no està relacionada amb aquests enzims. En *Drosophila melanogaster*, SLIMP no posseeix l'estructura del centre catalític típica de les SRS (vegeu l'apartat 4.1.7), no és capaç d'aminoacilar l'ARNt^{Ser} mitocondrial de *Drosophila*, ni d'activar l'aminoàcid serina *in vitro*. Addicionalment, s'ha

demostrat que SLIMP no té funció SRS mitocondrial *in vivo*, ja que la seva depleció en larves de drosòfila no redueix significativament el nivell d'aminoacilació dels ARNt^{Ser} mt (consulteu el subapartat 4.3.2.2). El baix nivell de conservació dels residus del domini catalític de SLIMP que, presumptament, interaccionarien amb la serina ens ha fet plantejar la possibilitat que l'enzim pugui adenilar algun altre tipus d'aminoàcid. S'ha demostrat, però, que SLIMP no és capaç d'activar cap dels aminoàcids estàndards del codi genètic, i la manca d'afinitat que la proteïna exhibeix per l'ATP descarta l'opció que pugui activar algun aminoàcid no convencional (consulteu el subapartat 4.3.1.4), tal com ho fa alguna aaRS canònica (Martinis i Fox, 1997).

SLIMP té un extrem N-terminal amb una arquitectura en forma de *coiled-coil*, que és un dels trets característics dels dominis N-terminals d'unió als ARNt^{Ser/Sec} en les SRS (vegeu l'apartat 1.2.6) (Cusack et al., 1990). Proposem que la interacció específica entre SLIMP i els dos isoacceptors d'ARNt^{Ser} mitocondrials de *D. melanogaster in vitro* (consulteu el subapartat 4.3.1.6) podria ser conseqüència d'una afinitat romanent de SLIMP per la conformació característica d'aquests ARNt, que pot haver mantingut degut al seu origen evolutiu, de manera independent a la seva funció. El fet que no variïn els nivells d'ARNt^{Ser} (GCU) i (UGA) mt aminoacilats en larves sotmeses al silenciament de l'expressió de SLIMP (vegeu el subapartat 4.3.2.2) descarta que SLIMP, *in vivo*, tingui un efecte dominant negatiu, és a dir, que impedeixi l'accés dels ARNt^{Ser} mt a la *DmSRS2* i, alhora, refuta l'opció que SLIMP, per contra, funcioni com un factor estabilitzador que afavoreixi l'accés del substrat a la *DmSRS2*. Així doncs, sembla que, tot i que SLIMP és una proteïna de localització mitocondrial (vegeu el subapartat 4.3.1.3), és probable que no estableixi contacte real amb els *DmARNt^{Ser}* mt en aquest orgànul. Aquest fenomen seria possible si, per exemple, SLIMP formés part d'un complex que no permetés l'exposició del domini N-terminal en *coiled-coil* i, per tant, l'accés dels ARNt. La recerca de possibles proteïnes d'interacció amb SLIMP, per exemple, a través de coimmunoprecipitació o bé, mitjançant gels *blue native* seguits d'identificació proteica per espectrometria de masses, ens permetrien obtenir informació sobre la participació de SLIMP en complexos proteics i, a més, aportarien dades funcionals sobre la proteïna. Una altra opció és que SLIMP i els ARNt^{Ser} mt no contactin físicament *in vivo* perquè es troben en compartiments diferents del mitocondri. Se sap que els elements de traducció genètica mitocondrial, com els mitoribosomes, es troben situats a la MMI, propers a la membrana en forma de crestes (CM) (Vogel et al., 2006), així doncs, és probable que els ARNt mitocondrials es trobin també en aquesta zona. SLIMP, en canvi, podria ocupar una altra posició del mitocondri que impedís la interacció física amb els ARNt^{Ser} mt. Mitjançant tècniques de separació per centrifugació diferencial dels compartiments mitocondrials seguides de detecció per *western blot*, i/o a través de tècniques de reconeixement molecular *in situ* per microscòpia electrònica, podrem precisar, en un futur, la localització concreta de SLIMP dins el mitocondri. Addicionalment, aquestes tècniques de localització ens permetran determinar si part de la proteïna es troba unida a la MME i, per tant, elucidar si SLIMP pot tenir una localització dual en el mitocondri.

Tot i que, com s'ha dit, la interacció entre SLIMP i els dos ARNt^{Ser} és, probablement, un tret residual del seu origen comú amb la SRS2, no es pot descartar que l'estructura en *coiled-coil* de SLIMP no tingui una funció relacionada amb la unió d'altres àcids nucleics (Pabo i Sauer, 1984). La capacitat d'unir ARNt^{Ser} no és l'única propietat ancestral que SLIMP ha retingut al llarg de l'evolució, sinó que també ha mantingut la conformació dimèrica típica de les SRS (vegeu els subapartat 4.3.1.5).

Malgrat que la funció concreta de SLIMP dins la cèl·lula no ha estat elucidada en la present tesi doctoral, s'han obtingut nombroses dades que aporten indicis que, més endavant, seran útils per tal d'esbrinar la funció biològica d'aquesta proteïna similar a seril-ARNt sintetases. En aquest treball s'ha demostrat que la proteïna SLIMP és essencial en *Drosophila melanogaster*, atès que el seu silenciament generalitzat redueix la viabilitat adulta i, en teixits específics, n'impedeix dràsticament el desenvolupament (vegeu els subapartats 4.3.2.3 i 4.3.2.4).

S'ha observat que SLIMP presenta un patró d'expressió característic en el transcurs del cicle vital de la mosca del vinagre (consulteu el subapartat 4.3.1.2). La proteïna s'expressa en les darreres fases embrionàries, a partir d'una població d'ARNm ja presents en els estadis anteriors. Sembla, doncs, que l'expressió de l'ARNm de SLIMP està regulada a nivell traduccional, de la mateixa manera que ocorre amb nombrosos gens durant el desenvolupament de *Drosophila* (Wilhelm i Smibert, 2005). Aquest fet suggereix, de nou, que SLIMP no es comporta com una aminoacil-ARNt sintetasa canònica.

La davallada dels nivells d'expressió de SLIMP provoca greus anormalitats estructurals en els mitocondris del teixit adipós de larves de *D. melanogaster* (vegeu el subapartat 4.3.2.5). La majoria de trets són similars als que s'han observat per a la depleció de la *DmSRS2*, com ho són les matrius mitocondrials inflamades de baixa densitat electrònica i la pèrdua total o parcial d'estructures en forma de crestes. En aquest cas, l'augment de la superfície mitocondrial és més acusat que en el cas de silenciament de la *DmSRS2*.

De la mateixa manera que ocorre quan se silencia l'expressió de la *DmSRS2*, la disminució constitutiva i ubiqua de SLIMP produeix un augment de la densitat mitocondrial (consulteu el subapartat 4.3.2.6). A més, aquest augment és directament proporcional a l'astringència dels estocs utilitzats, de manera que la soca ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2} és la més severa en tots els aspectes fenotípics estudiats en aquest treball, la soca ARNi_{SLIMP estoc 33774} té un efecte moderat i la soca ARNi_{SLIMP estoc 8} és la que presenta l'efecte menys astringent. Així com s'ha discutit anteriorment (vegeu la secció 5.1), sembla que la davallada de SLIMP activa un sistema compensatori gradual tot incrementant el nombre de mitocondris.

Tot i els defectes morfològics mitocondrials causats per la manca generalitzada de SLIMP, l'acoblament de la cadena respiratòria amb la fosforilació oxidativa (avaluat mitjançant el càlcul de la ràtio RCR) no es veu afectat i la capacitat respiratòria mitocondrial es manté dins uns nivells normals. La disfunció respiratòria mitocondrial, probablement, és pal·liada per l'augment de la densitat i la superfície mitocondrials, de manera que la respiració global del

teixit no es veu afectada, tot i que el consum d'oxigen per mitocondri és menor (vegeu el subapartat 4.3.2.7). Sembla que el silenciament de SLIMP desencadena una resposta compensatòria basada en un increment en el nombre i en la mida dels mitocondris, per tal de mantenir la funció mitocondrial. Proposem que aquesta resposta compensatòria pot ser induïda per una producció excessiva de ROS, com ja hem comentat a la secció anterior (Lee i Wei, 2005; Moreno-Loshuertos et al., 2006). El fet que la presència de molècules antioxidants a la dieta de les mosques produeixi una recuperació del fenotip causat per la deficiència de SLIMP suggereix que els individus pateixen una acumulació de ROS (vegeu el subapartat 4.3.2.8). Addicionalment, s'observa que el grau de supervivència dels adults augmenta de manera inversament proporcional al grau de severitat de la soca utilitzada. Aquest fet indicaria que la soca més astringent (ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2}), probablement, pateix un increment acusat de radicals lliures, que és difícil d'alleujar amb molècules antioxidants, en canvi, la mortalitat causada pel silenciament de SLIMP en les soques menys severes (ARNi_{SLIMP estoc 33774} i ARNi_{SLIMP estoc 8-dcr2}) pot ser revertida parcialment. Així doncs, el silenciament de SLIMP afecta l'estructura, la biogènesi i la funció mitocondrials, fet que ens fa pensar en una relació directa o indirecta de la proteïna amb el metabolisme mitocondrial. Una possibilitat és que SLIMP tingui un rol important en la replicació de l'ADNmt o en la biogènesi mitocondrial, de la mateixa manera que ocorre amb la subunitat accessòria de l'ADN polimerasa γ , que presenta una elevada identitat de seqüència amb aaRS de classe II i, en concret, amb la glicil-ARNt sintetasa (Carrodeguas et al., 1999; Carrodeguas et al., 2001).

És necessari esmentar que, recentment, en una anàlisi de mosaics genètics en *Drosophila*, s'ha determinat que la inactivació de CG31133 rescata el fenotip causat per mutacions en el gen que codifica el factor de transcripció dE2F1 (Ambrus et al., 2009). És a dir, les cèl·lules que presenten una mutació en el gen CG31133 exhibeixen un increment de la proliferació cel·lular quan aquesta es troba prèviament inactivada per mutacions en el gen *de2f1*. Tot i que el significat d'aquests resultats no és clar, suggereixen que la funció de SLIMP podria estar relacionada, de manera directa o indirecta, amb alguna de les vies de senyalització retrògrada entre el mitocondri i factors de transcripció nuclears que regulen la proliferació cel·lular (Butow i Avadhani, 2004).

En conclusió, en aquest treball hem contribuït a la caracterització de SLIMP, una nova proteïna que comparteix ancestre amb la seril-ARNt sintetasa mitocondrial i que du a terme una funció essencial en insectes probablement independent de la reacció de serilació.