

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

6 CONCLUSIONS

1. *Drosophila melanogaster* posseeix dues maquinàries de serilació independents, al citoplasma i al mitocondri, que inclouen dues poblacions d'ARNt^{Ser} i una seril-ARNt sintetasa per a cada compartiment (*DmSRS1* i *DmSRS2*, respectivament).

2. La manipulació de l'expressió de la seril-ARNt sintetasa mitocondrial de *D. melanogaster* (*DmSRS2*) mitjançant ARNi (ARN d'interferència) reproduïx fenotips característics de malalties mitocondrials humanes i, per tant, els animals afectats representen un nou model de malaltia de traducció genètica mitocondrial.

2.1. La *DmSRS2* és una seril-ARNt sintetasa activa, de localització mitocondrial, l'import a l'òrganul de la qual es du a terme de manera posttraduccional.

2.2. Els diferents transgens ARNi emprats per tal de silenciar l'expressió de la *DmSRS2* són capaços de reduir els nivells d'ARNm de *DmSRS2* i, consegüentment, disminuir la quantitat d'ARNt^{Ser} mitocondrials aminoacilats de manera específica, amb graus d'eficiència diferents segons la soca ARNi utilitzada.

2.3. *DmSRS2* és una proteïna essencial per a *D. melanogaster*, atès que la depleció generalitzada de la proteïna afecta significativament la viabilitat adulta.

2.4. La reducció de l'expressió de la *DmSRS2* restringida al teixit d'ala impedeix el desenvolupament complet de l'òrgan i disminueix la densitat cel·lular a la zona afectada per l'ARNi contra la *DmSRS2*.

2.5. El silenciament de la *DmSRS2* afecta la morfologia i la biogènesi mitocondrials en larves de tercer estadi. Els mitocondris es caracteritzen per: matrius mitocondrials inflamades i de baixa densitat electrònica, una pèrdua total o parcial de crestes mitocondrials, un increment notable de la superfície mitocondrial i un augment de la densitat mitocondrial.

2.6. Els mitocondris de larves sotmeses a l'activació ubiqüa i constitutiva de l'ARNi contra la *DmSRS2* exhibeixen un cert desacoblament de la cadena respiratòria i la fosforilació oxidativa, i una capacitat de consum d'oxigen limitada que, en alguns casos, es veu pal·liada per l'augment en el nombre de mitocondris.

2.7. La seril-ARNt sintetasa mitocondrial humana (SARS2) i la *DmSRS2* resistent a l'ARNi contra la *DmSRS2* nativa (*DmSRS2_m*) són sintetitzades i transportades al mitocondri en cèl·lules S2R+, i són expressades en *D. melanogaster*.

3. *D. melanogaster* posseeix un gen que codifica una proteïna, no caracteritzada fins al moment, similar a la seril-ARNt sintetasa mitocondrial (SLIMP).

3.1. Totes les espècies de la classe Insecta seqüenciades fins ara, l'aràcnid *Ixodes scapularis* i l'equinoderm *Strongylocentrotus purpuratus* contenen gens que, potencialment, codifiquen proteïnes homòlogues a SLIMP. A més, *D. melanogaster* i *Tribolium castaneum* expressen activament la proteïna SLIMP.

3.2. SLIMP no desenvolupa una funció com a seril-ARNt sintetasa mitocondrial. La divergència evolutiva de SLIMP respecte a les SRS mitocondrials i el baix nivell de conservació del domini catalític de SLIMP es tradueixen en una incapacitat per unir els substrats inicials de la reacció d'aminoacilació i per activar cap dels aminoàcids del codi genètic estàndard.

3.3. SLIMP té un patró d'expressió regulat a nivell traduccional al llarg del cicle vital de *D. melanogaster*. L'ARNm de SLIMP no és traduït en forma de proteïna fins a estadis embrionaris tardans.

3.4. SLIMP és una proteïna de localització mitocondrial, el transport de la qual depèn de la presència d'un pèptid N-terminal i té lloc de manera posttraduccional.

3.5. SLIMP reté certes característiques del seu origen evolutiu comú amb la *DmSRS2*: així com ho fan les SRS, SLIMP presenta una conformació dimèrica i és capaç d'interaccionar *in vitro* de manera específica i amb una afinitat elevada amb els dos isoacceptors d'ARNt^{Ser} mitocondrials de *D. melanogaster*.

3.6. Les soques ARNi utilitzades per tal d'impedir l'expressió de SLIMP provoquen una reducció significativa dels nivells d'ARNm que codifica la proteïna.

3.7. La davallada de l'expressió de SLIMP no afecta el grau d'aminoacilació dels ARNt^{Ser} mitocondrials de *D. melanogaster*.

3.8. SLIMP és una proteïna essencial per a *D. melanogaster*, ja que el seu silenciament ubic i constitutiu redueix significativament la viabilitat dels individus.

3.9. El silenciament de SLIMP restringit al teixit d'ala impedeix el correcte desenvolupament de l'òrgan i redueix la densitat cel·lular a l'àrea afectada, en part, com a conseqüència d'un augment de la mort cel·lular programada.

3.10. Els mitocondris de teixit adipós larvari sotmès a la depleció de SLIMP pateixen greus anormalitats a nivell d'ultraestructura i de biogènesi. Les matrius mitocondrials tenen una aparença laxa i inflamada, s'observa una disminució de la superfície ocupada per crestes mitocondrials i la superfície mitocondrial augmenta significativament.

3.11. La inhibició de l'expressió de SLIMP afecta la funció mitocondrial, que es veu reflectida en una reducció de la capacitat respiratòria mitocondrial. Aquesta reducció és compensada amb un augment gradual de la densitat mitocondrial segons l'astringència de la soca utilitzada per tal d'activar l'ARNi.

3.12. L'addició de molècules antioxidants a la dieta de les mosques és capaç d'incrementar la viabilitat adulta en individus sotmesos al silenciament generalitzat de SLIMP. Addicionalment, la recuperació de la viabilitat és inversament proporcional al nivell de severitat de la soca ARNi utilitzada.

