

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

GENERACIÓN DE UN MODELO DE PATOLOGÍA
MITOCONDRIAL POR DEFECTO DE
COMUNICACIÓN INTERGENÓMICA EN *Drosophila*
melanogaster

Memoria que presenta el Licenciado en Bioquímica

Álvaro Sánchez Martínez

para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis:

Rafael Garesse Alarcón

Catedrático de Universidad

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Instituto de investigaciones Biomédicas "Alberto Sols". CSIC-UAM.

Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica

Rafael Garesse Alarcón, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la UAM, como Director de Tesis, y
Miguel Manzanares Fourcade, Científico Titular del CSIC, como Tutor,

CERTIFICAN:

Que Don Álvaro Sánchez Martínez con D.N.I.: 01935465S, licenciado en Bioquímica ha realizado, bajo la dirección del Director de Tesis, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid / Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", el trabajo titulado:

GENERACIÓN DE UN MODELO DE PATOLOGÍA MITOCONDRIAL POR DEFECTO DE COMUNICACIÓN INTERGENÓMICA EN *Drosophila melanogaster*

Una vez supervisado el trabajo, consideramos que reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad y calidad para ser presentado como Tesis Doctoral con el objeto de optar al título de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 29 de Julio de 2009

Madrid, 29 de Julio de 2009

Miguel Manzanares Fourcade
Tutor

Rafael Garesse Alarcón
Director de Tesis

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de un Beca de Formación de Personal Investigador por parte de la Comunidad Autónoma de Madrid a Álvaro Sánchez Martínez

A mis padres

“As long as I live, I’ll hear
waterfalls and birds and
winds sing. I’ll interpret the
rocks, learn the language of
flood, storm, and the avalanche.
I’ll acquaint myself with the
glaciers and wild gardens, and
get as near the heart of the
world as I can.”

- John Muir

Agradecimientos

John Muir, naturalista del siglo XIX, y permitidme ilustrar el significado de la palabra naturalista: nombre con el que se conoce a los científicos que realizaban estudios sobre ciencias naturales o historia natural, y poseían conocimientos simultáneos en diversas áreas de la ciencia y de la vida. Varios de ellos eran prominentes pensadores que actuaban en distintos aspectos de la sociedad. Dio a conocer al mundo los sinuosos caminos del increíble y misterioso parque nacional de Yosemite, al que llegó en uno de sus muchos viajes en busca de conocimiento natural rodeado de su gente más cercana. Y sí, esta última parte es, desde mi interior, la más importante, rodeado de las personas con las que todo compartía.

Y no pretendo engañaros cuando os digo que a veces lo que da sentido a la vida no es conseguir el fin deseado, es el camino más sinuoso e increíble que te ha llevado a él, con las personas que te han querido y apoyado. Yo en este caso, no he estado solo, ni mucho menos, ni en los momentos buenos ni en los malos. Permitidme agradecerlo, y perdonarme que sea desde esta manera, con palabras, porque siempre he creído que muy pocas de ellas pueden expresar realmente lo que el corazón y sentimiento dictan, sólo espero haberlo agradecido en el día a día, con todos vosotros y con todo mi corazón, en este nuestro camino.

Empezaré por el principio, es hora, y éste un buen momento para agradecer a unas personas que se merecen, no sólo unas palabras, sino una mirada, un gesto, un todo, mis padres. Me disteis la vida, me disteis lo necesario para esforzarme cada día en ser mejor persona, sigo en ello. Pero hay algo que no me habéis dado, que lo adquirí desde el día que me iluminó la conciencia, el orgullo de ser vuestro hijo. Estáis donde y cuando os queremos, y siempre cuando lo necesitamos. Esta tesis está dedicada a Víctor y Lucía, mis padres.

Sin duda, el siguiente en la lista es el naturalista Rafael Garesse, porque sin duda ejemplificas el significado de esta palabra. Siempre me acordaré del verano hace ya nueve años, y se dice pronto, que entré en el laboratorio y me diste la oportunidad de conocer este mundo. A lo largo de este tiempo me has enseñado que la felicidad no es hacer lo que uno quiere, sino querer lo que uno hace. En tu capacidad de divulgar, de conocer, de respetar y no sólo en lo científico, está presente la humanidad de tu ser, la que hace que estés presente como esa persona cercana que eres.

Siguiendo con este gran repaso de esta mi segunda casa, el B19, estás tú, Miguel. Como dijo el ensayista, se conoce el corazón del hombre por lo que hace, y su sabiduría por lo que dice, y en tu caso no tiene límites. Quiero agradecerte tu confianza, tus aventuras, tu capacidad de enseñarnos que siempre se puede hacer algo más, de comprender una mirada que no necesita explicación, por ser un amigo.

Desde que comencé a asociar lo animal a la patología, y aunque sé que la apariencia de este animal no te gusta en exceso, siempre has estado para apoyarnos en este campo tan complejo y trascendente y darnos parte de esa ilusión que siempre tienes por aprender, por ello, muchas gracias Belén. También, he de agradecer de manera muy especial a Laurie Kaguni todo lo ofrecido, sin el cual las bases de este trabajo no existirían.

Son muchas personas con las que he compartido todo durante este tiempo transcurrido, cada una de ellas me ha aportado humildad, madurez, cualidades que sigo intentando asimilar. Pilar, Paco, Mari Carmen, Pablo y Cristina. Vosotros me acogisteis y me enseñasteis a desenvolverme en el laboratorio. Pilar, gracias por estar ahí, por darme el cariño y apoyo que necesita cualquiera en sus

inicios, a Paco, pocas personas aportan algo a todos los aspectos de la vida y tú eres una de ellas, siempre aprendí de nuestras charlas. Mari Carmen, una trayectoria dura pero sin duda has sabido salir victoriosa, gracias por esos ánimos desde la distancia. Pablo, me acogiste en tu poyata, siempre recordaré con gran cariño ese primer clonaje, gracias por integrarme entre vosotros, y Cristina, sin duda eres un ejemplo de cómo se deben hacer las cosas, aportando además cariño y amistad. Gracias, no me puedo imaginar un mejor comienzo, ha sido un placer.

Bien, es tiempo de los que ahora formáis el B19. Como dijo un buen amigo, sé que he tenido una inmensa suerte y oportunidad de coincidir con todos vosotros en esta nuestra vida. Emiliano, Rosana, Lucy, Paula y Vero. Sois las personas con las que más he compartido, más momentos buenos y malos, más alegrías, más valores, más vida, nuestra vida. Emiliano, además de ese fenotipo que compartimos, me imagino pocas personas con las que poder compartir vida en un entorno como este. Me has aportado amistad, ilusión y conocimientos, cualidades esenciales para poder llegar lejos. Llegado ese momento me sentiré orgulloso de haberlo compartido contigo. Rosana, el sentimiento y sonrisa que pones día a día hacen todo más fácil. Hay buenos y malos momentos, pero me has enseñado que siempre hay algo en lo cual apoyarse, y en los momentos difíciles me ha bastado con una mirada tuya para saber que todo tiene solución, gracias por ello. Lucy, contigo he compartido inquietudes y aficiones, algo que me ha valido para seguir adelante. No sólo gracias por tu cariño y por hacer de un momento algo digno de compartir. Sé de todo corazón que llegarás donde te propongas, porque tienes lo necesario. Tú Paula, me has demostrado a lo largo de los días que cualquier cosa es posible, que lo no sabido, no tiene porqué ser lo no aprendido. Darte las gracias se quedaría corto, esa sonrisa que aparece tras las palabras que la provocan hacen sonreír al alma más escondida. Y como darte las gracias a ti, Vero, que nadie dude que muchas de estas páginas se han escrito gracias a ti. Sí, mucho hemos de aprender aún de tus ganas, de tu dar sin esperar recibir. Pero sobre todo, gracias por esa complicidad difícil de encontrar, de ese cariño, no me imagino mejor matrimonio laboral.

Es el turno de nuestras senior, Esther, Carmen y Susana. Nos conocimos con una copa de vino de equilibrio dudoso, Esther, tenías que ser tú. Me has dado consejos, carácter para hacer las cosas y sobretodo cariño, gracias por ser el ejemplo que eres. Carmen, sin duda eres la persona que complementa en muchos aspectos el laboratorio, me has aportado madurez y saber estar, además siempre has sabido sacar esa ligera personalidad traviesa de mí. Y sí, el humor te puede llegar a cambiar, y tú Susana, me has ayudado a hacer de él algo mas llevadero. Gracias por hacer de los mosqueros un grupo integrado.

No podían faltar nuestras itinerantes, María, Berta y Justine. María, créeme cuando te digo que esa personalidad es difícil de encontrar, gracias por haberla compartido. Berta, estás en el camino que has elegido, gracias por habernos hecho parte de él, y Justine, es increíble el cariño que puedes coger a una persona en tan poco tiempo, gracias por este regalo.

Es hora de las nuevas incorporaciones, y no por ser los últimos son los menos importantes. Cristina, Maca, Sara, y Gonzalo, sí, Gonzalo, porque has sabido ganarte nuestro corazón, sigue siendo así. Todos sabréis continuar con este nuestro legado, la curiosidad debe mantenerse viva.

Os confesaré algo que creo sólo dije una vez en presencia de “Ron”, puedo tener miedo de la nueva etapa que me espera, pero dadme como hasta ahora un punto de apoyo y moveré la tierra y el cielo. Sólo puedo decir una cosa, no cambiéis nunca.

Por supuesto, gracias a los laboratorios que nos rodean, siempre habéis sido un gran apoyo en todos los sentidos. Al laboratorio de Margarita Cervera, Juan, Maricruz, un placer, Lucía, Jorge, conseguirás lo que te propongas, Leti, Raquel, todo es posible cuando lo tienes claro, María y Dioni, como eres, llegarás lejos hermano. Al laboratorio de Roberto Marco, fue un placer y un orgullo. Luisja, el ambiente creado mereció la pena. Al laboratorio de Jesús Cruces. Madalina, esa personalidad la has hecho tuya, no cambies. Y como no, a todas las personas con las que me he cruzado en estos años, en el departamento y en el instituto. Conocerlos enriquece a uno mismo. No me olvidaré de los distintos servicios, lo hacéis todo más fácil.

Quiero agradecerlo especialmente a Ernesto Sánchez Herrero y a todo su laboratorio, habéis ayudado a que esto sea algo real, ha sido un placer, me hicisteis sentir como en casa. A Manolo, qué decirte, gracias por tu apoyo, comprensión y consejo, por estar ahí. Gracias a los chicos y chicas del laboratorio de Ginés Morata, me aceptasteis en la vecindad como uno más, Salva, cuando llegues lejos, me sentiré más orgulloso de haberte conocido en tus inicios.

Como no, gracias a mis amigos de carrera, Arancha, Marimar, Martín, Dani y Ramón, hicimos de esa etapa algo aún más divertido, hagamos lo mismo en la vida. A Victoria, gracias por ser así, has logrado ser esa gran persona. A Aroa, por lo compartido.

Gracias a vosotros, mis hermanos, Aitor y Sergio. Me habéis dado lo más importante, sois mis hermanos, que más puedo decir, mis amigos. Aitor, el pequeño, mi hermano pequeño, no encuentro las palabras que expresen lo que siento, y tú Sergio, junto a Esther, me habéis dado la ilusión y las fuerzas para seguir adelante siempre, y sí, ahora ambas cosas tienen nombre, mi sobrino Marcos.

Y para finalizar, no sólo gracias a ti, Oihane. Y, si he empezado con naturaleza terminaré con el significado de tu nombre. He de agradecer tantas cosas que no sabría por donde empezar, pero permíteme decírtelo en persona, aunque sabes que prefiero los actos a las palabras, porque lo que decimos no siempre se parece a lo que somos. Sólo decir que la recompensa de una buena acción es el haberla hecho, y ella las tiene todas. Muchas gracias.

Y... como dijo Pascal, si he escrito esta carta tan larga, ha sido porque no he tenido tiempo de hacerla más corta.

Resumen/Summary

En el interior de la mitocondria tienen lugar un gran número de procesos esenciales para el metabolismo de la célula, entre los que se encuentra la que es considerada su función más importante, la generación de energía química en forma de ATP a través de la fosforilación oxidativa. En los últimos años se ha demostrado la participación de la mitocondria en importantes procesos celulares como son la apoptosis y la señalización intracelular mediada por calcio o por especies reactivas de oxígeno, entre otros. Debido a su papel central en la fisiología celular, alteraciones de la función mitocondrial están asociadas a un número cada vez mayor de enfermedades, denominadas mitocondriales, que agrupan a un conjunto de síntomas y síndromes genética, bioquímica y clínicamente heterogéneos.

Las enfermedades mitocondriales pueden tener dos orígenes genéticos diferentes, el ADN mitocondrial o alguno de los más de mil genes nucleares que codifican proteínas implicadas en la biogénesis mitocondrial. Con objeto de profundizar en el conocimiento de las causas moleculares y bioquímicas implicadas en la fisiopatología de la función mitocondrial, en este trabajo nos hemos centrado en el estudio de los defectos de comunicación intergenómica utilizando *Drosophila melanogaster* como sistema modelo. Por una parte hemos establecido y caracterizado líneas transgénicas que expresan variantes de la helicasa mitocondrial con mutaciones asociadas en humanos a Oftalmoplejía Progresiva Externa autosómica dominante (adPEO). Por otra parte, hemos utilizado la técnica de *Ends-in* de recombinación homóloga para generar un *knock-in* del gen que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa mitocondrial (Poly- α), introduciendo una doble mutación que elimina la actividad correctora de la enzima.

En el primer caso, la mutación K388A, que elimina la actividad helicasa de la proteína, y la mutación A442P, asociada a adPEO, producen letalidad en larvas tardías de tercer estadio. La expresión de las versiones mutantes del enzima induce defectos en la replicación del ADNmt que provoca una severa depleción y una disminución de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria. Como consecuencia, se inhibe la proliferación celular y se induce el proceso de muerte celular programada, lo que sugiere que la vía intrínseca de apoptosis mediada por la mitocondria es activa en *Drosophila* y por tanto podría desempeñar un papel importante en numerosos procesos fisiopatológicos, incluidos los defectos de comunicación intergenómica. Por el contrario, la mutación W441C solo provoca una moderada depleción de ADNmt sin consecuencias fenotípicas aparentes.

Utilizando la metodología *Ends-in* de recombinación homóloga hemos establecido líneas transgénicas de *Drosophila* que portan simultáneamente en proporción 2:1, la versión silvestre del gen Poly- α , y una versión mutante de la misma sin actividad correctora. El paso de reducción que permite establecer líneas en proporción 1:1 para ambos alelos ha resultado muy ineficiente, un resultado que sugiere que para la generación de *knock-ins* en *Drosophila* se requiera adicionalmente algunas de las nuevas estrategias descritas recientemente. Durante el desarrollo del trabajo, hemos utilizado el sistema UAS-GAL4 inducible por hormona y hemos expresado ambas versiones del enzima específicamente en músculo de adultos. Nuestros resultados sugieren que la falta de la actividad correctora de la ADN polimerasa mitocondrial en células postmitóticas reduce la longevidad en *Drosophila*.

A large number of essential metabolic processes take place inside mitochondria, and in particular, the generation of chemical energy in the form of ATP by the mechanism of oxidative phosphorylation. In addition, during the last few years it has been demonstrated that mitochondria play also an important role in many other essential cell processes such as apoptosis and calcium and reactive oxygen species intracellular signalling. In consequence, mitochondrial dysfunction is responsible of a growing number of diseases including a large variety of syndromes genetically, biochemically and clinically heterogeneous.

Mitochondrial diseases have two different genetic origins, the mtDNA or any of the hundreds of nuclear genes encoding proteins involved in mitochondrial function. To progress in the study of the molecular and biochemical basis of these complex pathologies, we have focused in the study of intergenomic communication defects using *Drosophila melanogaster* as animal model. We have established and characterised transgenic lines that express different mitochondrial helicase variants harbouring mutations associated to the autosomal dominant form of Progressive External Ophthalmoplegia (adPEO) in humans. In addition, we have used the *Ends-in* homologue recombination technique to generate a *knock-in* of the *Poly- α* gene, which encodes the catalytic subunit of the mitochondrial DNA polymerase, introducing a double mutation that eliminates the proofreading activity of the enzyme.

The overexpression in *Drosophila* of mutant helicase versions containing the K388A mutation, that eliminates the helicase activity of the protein, or the A442P mutation, associated to adPEO, induce lethality in late third stage larvae. These mutant helicases lead to defects in mtDNA replication, severe mtDNA depletion and reduction of the respiratory chain complexes activity. This mitochondrial dysfunction inhibits cell proliferation and promotes programmed cell death. These data suggest that the intrinsic pathway of apoptosis mediated by mitochondria is active in *Drosophila*, and that could thereby have an important role in many physiopathologic processes, including defects in intergenomic communication. Otherwise, the W441C mutation causes a slight depletion of mtDNA with no important phenotypical outcomes.

Using the *Ends-in* homologue recombination technique we have established *Drosophila* transgenic lines that carry both, the wild type gene encoding for the catalytic subunit of the mitochondrial DNA polymerase, and a mutant version of the gene lacking the proofreading activity, with a 2:1 ratio. The reduction step that results in the establishment of lines with a 1:1 ratio for both alleles has been very inefficient. These difficulties suggest that the efficient generation of *knock-ins* in *Drosophila* requires the combination of the previously described and recently developed techniques. In addition we have specifically expressed both versions of the enzyme in adult fly muscle, using the hormone inducible UAS-GAL4 system. Our experiments suggest that the lack of proofreading activity in mitochondrial DNA polymerase in postmitotic cells reduces longevity in *Drosophila*.

Índice

ÍNDICE

ABREVIATURAS	27
INTRODUCCIÓN.....	31
1. La mitocondria	33
1.1. Estructura, número y distribución de las mitocondrias en células y tejidos	34
1.2. Función mitocondrial	35
2. Estructura y metabolismo del ADN mitocondrial	36
2.1. Genoma mitocondrial	36
2.2. Replicación del ADNmt	38
2.2.1. Mecanismos de replicación del ADNmt	39
2.2.1.1. Modelo de replicación asimétrico y asincrónico	39
2.2.1.2. Modelo de replicación simétrico y acoplado	39
2.2.2. Proteínas implicadas en la replicación del ADNmt	40
2.2.2.1. mtSSB	41
2.2.2.2. Helicasa mitocondrial	41
2.2.2.3. ADN polimerasa γ (Poly o PolG)	42
2.3. Transcripción del ADNmt	43
2.4. Traducción de los ARN mensajeros mitocondriales	44
3. Patología mitocondrial: alteraciones del sistema de fosforilación oxidativa	44
3.1. Mutaciones en el ADNmt.....	45
3.1.1. Tipos y patogenicidad de las mutaciones en el ADNmt	46
3.2. Patología mitocondrial asociada a defectos de comunicación intergenómica	46
3.2.1. Mutaciones en la mtHelicasa	47
3.2.2. Mutaciones en la ADN polimerasa γ	48
4. <i>Drosophila melanogaster</i>	49
4.1. Ciclo vital de <i>Drosophila melanogaster</i>	49
4.2. Vía de apoptosis en <i>Drosophila</i>	50
4.3. <i>Drosophila melanogaster</i> como sistema modelo	51
4.3.1. Reemplazamiento génico por Recombinación Homóloga	52
4.3.1.1. <i>Ends-in</i>	52
4.3.1.2. <i>Ends-out</i>	52
OBJETIVOS	53
MATERIALES Y MÉTODOS	57
1. Materiales	59
1.1. Reactivos, soluciones y tampones	59
1.2. <i>Drosophila melanogaster</i>	59

1.2.1.	Condiciones estándar de cultivo de <i>Drosophila</i>	59
1.2.2.	Modificaciones de la temperatura	59
1.2.3.	Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i>	59
1.2.3.1.	Cepas control y balanceadoras	60
1.2.3.2.	Líneas trans-activadoras.....	60
1.2.3.3.	Líneas transgénicas generadas y efectoras UAS	61
1.2.3.4.	Líneas de reemplazamiento de genes para generar un knock-in	62
1.3.	Cepas bacterianas	62
1.4.	Vectores	62
1.5.	Oligonucleótidos	62
1.5.1.	Oligonucleótidos empleados	63
1.6.	Clones	63
1.7.	Sondas	65
1.8.	Radioisótopos.....	65
1.9.	Anticuerpos.....	65
1.10.	Fluoróforos.....	66
2. Métodos	66
2.1.	Clonajes.....	66
2.2.	Aislamiento de ácidos nucleicos.....	66
2.2.1.	Aislamiento de ARN de <i>D. melanogaster</i>	66
2.2.2.	Aislamiento de ADN	67
2.2.2.1.	Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	67
2.2.2.2.	Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa	67
2.2.2.3.	Aislamiento de ADN genómico de <i>D. melanogaster</i>	67
2.3.	Secuenciación de ácidos nucleicos y análisis de secuencias.....	67
2.4.	Obtención de proteínas	67
2.4.1.	Preparación de extractos de proteína total de <i>D. melanogaster</i>	67
2.4.2.	Preparación de proteínas mitocondriales de larvas	68
2.4.2.1.	Obtención de proteínas mitocondriales para inmunodetección	68
2.4.2.2.	Obtención de proteínas mitocondriales para medidas de la actividad de la cadena respiratoria	68
2.5.	Generación de líneas transgénicas	68
2.6.	Experimentos de sobreexpresión utilizando la estrategia UAS-GAL4	69
2.7.	Sistema de sobreexpresión UAS-GAL4 inducible	69
2.8.	Cuantificación de los niveles de ARNm mediante PCR cuantitativa a tiempo real	69
2.9.	Cuantificación relativa del ADNmt mediante PCR cuantitativa a tiempo real	70
2.10.	Marcaje de sondas radiactivas de ADN	70
2.11.	Hibridación de ADN unidos a membrana (Southern Blot)	70
2.11.1.	Determinación de la estructura genómica en líneas exo-.....	70
2.11.2.	Cuantificación de ADNmt por Southern Blot.....	71
2.12.	Detección de mutaciones por PCR-RFLP en líneas knock-in	71

2.13. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (Western Blot)	71
2.14. Determinación de actividades enzimáticas	71
2.14.1. Determinación de actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.....	72
2.14.2. Medida de la actividad de la citrato sintasa	72
2.15. Medida de la producción de anión superóxido.....	72
2.16. Medida del daño oxidativo en las proteínas celulares.....	72
2.17. Inmunohistoquímica	73
2.17.1. Visualización y cuantificación de células apoptóticas y células en proliferación en discos imaginales de ala de <i>Drosophila</i>	73
2.17.2. Generación de clones simples en el disco imaginal de ala de <i>Drosophila</i>	73
2.17.3. Generación de clones gemelos en el disco imaginal de ala de <i>Drosophila</i> ..	73
2.18. Estudio de viabilidad de líneas y cruces	73
2.19. Estudios de longevidad de líneas y cruces	74
2.20. Análisis estadístico de los resultados.....	74
RESULTADOS	75
1. Generación en <i>Drosophila melanogaster</i> de un modelo animal de patología mitocondrial asociado a mutaciones en el gen <i>TWINKLE</i>	77
1.1. Sobreexpresión de las diferentes versiones del gen <i>d-mthelicasa</i> en <i>Drosophila melanogaster</i> de forma ubicua y constitutiva	78
1.1.1. Cuantificación de los niveles de sobreexpresión del gen <i>d-mthelicasa</i> en las distintas líneas	79
1.1.2. Efecto de las mutaciones sobre el número de copias, integridad y expresión del genoma mitocondrial	81
1.1.3. Medida de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria.....	82
1.1.4. Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno.....	83
1.1.5. Fenotipo celular en el disco imaginal de ala	84
1.1.5.1. Fenotipo celular en el compartimento anterior del disco imaginal de ala de <i>Drosophila</i>	86
1.1.5.2. Análisis de clones en disco imaginal de ala	87
1.1.6. Efecto de la inhibición de la apoptosis en líneas de <i>Drosophila</i> que sobreexpresan versiones mutadas del gen <i>d-mthelicasa</i>	88
1.1.7. Caracterización fenotípica y molecular del efecto de la mutación W441C en adultos de <i>Drosophila</i>	91
1.2. Sobreexpresión en tejidos específicos.....	92
1.2.1. Fenotipo muscular en <i>Drosophila melanogaster</i>	92
1.2.2. Fenotipo en el ojo de <i>Drosophila melanogaster</i>	92

2. Generación de un fenotipo mutador del ADNmt en <i>Drosophila melanogaster</i>	93
2.1. Generación de líneas transgénicas	95
2.2. Ends-in: reemplazamiento génico	95
2.2.1. Primer evento de recombinación homóloga: generación de la estructura en tándem	95
2.2.2. Segundo evento de recombinación homóloga: reducción del tándem	98
2.2.3. Caracterización de las líneas obtenidas	99
2.3. Sobreexpresión de la ADN polimerasa γ-α deficiente en reparación en adultos de <i>Drosophila melanogaster</i>	102
DISCUSIÓN	105
1. Generación en <i>Drosophila melanogaster</i> de un modelo de disfunción mitocondrial provocado por mutaciones en el gen <i>d-mthelicasa (Twinkle)</i> ..	107
1.1. La sobreexpresión de las versiones mutantes K388A y A442P del gen <i>Twinkle</i> en <i>Drosophila</i> induce depleción del ADNmt	109
1.2. La sobreexpresión de las versiones mutantes K388A y A442P del gen <i>Twinkle</i> en <i>Drosophila</i> provoca un claro defecto en la función OXPHOS	111
1.3. La sobreexpresión de las versiones mutantes K388A y A442P del gen <i>Twinkle</i> en <i>Drosophila</i> no aumenta el estrés oxidativo	112
1.4. La sobreexpresión de las versiones mutantes K388A y A442P del gen <i>Twinkle</i> en <i>Drosophila</i> afecta a la proliferación celular	113
1.5. La sobreexpresión de las versiones mutantes K388A y A442P del gen <i>Twinkle</i> en <i>Drosophila</i> induce el proceso de apoptosis	114
1.6. La sobreexpresión del gen <i>Twinkle</i> en diferentes tejidos de <i>Drosophila</i> proporciona un buen modelo para el estudio de disfunción mitocondrial asociada a mutaciones PEO	117
2. Generación en <i>Drosophila</i> de mutantes del gen que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa γ	117
2.1. La sobreexpresión en músculo de la versión sin capacidad correctora de la PolG disminuye la longevidad en <i>Drosophila</i>	122
CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFÍA	129
ANEXOS	143

Abreviaturas

ABREVIATURAS

Act 5C	Actina 5C
ADNc	ADN complementario
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
adPEO	Oftalmoplejía Externa Progresiva de herencia autosómica dominante
AED	After egg deposition, después de la puesta
ap	Apterous
arPEO	Oftalmoplejía Externa Progresiva de herencia autosómica recesiva
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de suero bovino
Cadena H	Cadena pesada del ADNmt
Cadena L	Cadena ligera del ADNmt
Citb	Citocromo b
CO, COX	Citocromo C oxidasa
CPEO	Oftalmoplejía externa progresiva crónica
Cyo	Curly of Oyster
da	Daughterless
dCTP	Deoxicitosina trifosfato
Dir	Directo
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
FLP	Flipasa
FRT	Flipase Recombination Target, Diana de recombinación de la flipasa
GAM	Goat anti-mouse antibody, anticuerpo de cabra anti-ratón
GAR	Goat anti-rabbit antibody, anticuerpo de cabra anti-conejo
GFP	Green Fluorescent Protein, proteína verde fluorescente
HSP	Promotor de la cadena pesada del ADN mitocondrial
Kb	Kilobase
Kda	Kilodalton
LHON	Neuropatía óptica hereditaria de Leber
LS	Síndrome de Leigh
LSP	Promotor de la cadena ligera del ADN mitocondrial
MELAS	Miopatía, Encefalopatía, Acidosis Láctica y accidentes cerebrovasculares
MERRF	Epilepsia mioclónica y fibras rojas rasgadas

MKRS,Sb	Marcador cromosoma 3 con la mutación <i>Stubble</i>
MNGIE	Síndrome de encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial
mtHelicasa	Helicasa mitocondrial
mtRPOL	ARN polimerasa mitocondrial
mtTFA, Tfam	Factor de transcripción mitocondrial A
mtTFB1, B1, TFB1M	Factor de transcripción mitocondrial B1
mtTFB2, B2, TFB2M	Factor de transcripción mitocondrial B2
mtTTF, mTERF, DmTTF	Factor de terminación de transcripción mitocondrial
mut	Mutado
mtSSB	Proteína de unión a cadena sencilla de ADN mitocondrial
ND	NADH deshidrogenasa
O _H	Origen de replicación de la cadena pesada
O _L	Origen de replicación de la cadena ligera
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PoIG	ADN polimerasa gamma
qRT-PCR	RT-PCR cuantitativa
Rev	Reverso
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDH	Succinato deshidrogenasa
SOD	Superóxido dismutasa
Tb	Tubby
TBE	Tampón Tris borato EDTA
Tim	Translocasa de la membrana mitocondrial interna
TM6B, <i>tb, hu</i>	Balanceador cromosoma 3 con las mutaciones <i>Tubby</i> y <i>Humeral</i>
Tom	Translocasa de la membrana mitocondrial externa
UAS	Upstream activating sequence
w	White
wt	Wild-Type. Versión silvestre
yw	Yellow white

Introducción

1. La mitocondria

En el mundo macroscópico, casi toda la diversidad biológica se puede explicar por el principio de Darwin de variación y selección natural. Al no referirse a los procariotas, existen dos principios importantes de la evolución que Darwin no descubrió ni pudo prever, la endosimbiosis y la transferencia génica lateral u horizontal (Martin et al. 2001).

La teoría endosimbiótica postulada en los años 70 por F. Taylor y L. Margulis, hoy en día ampliamente aceptada, sitúa el origen de la mitocondria en este fenómeno de endosimbiosis (Margulis 1975). Según esta teoría, las mitocondrias presentes en las células eucariotas se originaron al establecerse una relación de endosimbiosis entre una célula protoeucariota huésped con metabolismo anaerobio, y una α -proteobacteria aerobia que vivía de forma independiente y, por tanto, contenía su propio genoma. Según el denominado modelo Ox-Tox en dicha relación la proteobacteria actuaba retirando el oxígeno del citosol del huésped, evitando así sus efectos tóxicos, mientras que éste suministraba nutrientes como lípidos, glicerol o aminoácidos a la proteobacteria (Gabaldon and Huynen 2003). Es aceptado por los distintos autores que dicho evento ocurrió una sola vez a lo largo de la evolución, y por lo tanto se admite un origen único y común del conjunto de mitocondrias presentes en los distintos organismos eucariotas (Scheffler 2001).

La relación simbiótica inicial dio lugar a lo que algunos autores denominan secuestro de la proto-mitocondria por parte de la célula huésped, en la que la primera fue especializándose progresivamente en metabolismo energético, perdiendo parte de su proteoma original que fue sustituido por proteínas procedentes del huésped (Gabaldon and Huynen 2003). Algunos autores sitúan el paso de endosimbionte a orgánulo en el momento en que la proteobacteria adquirió la capacidad de intercambiar ADP y ATP con el citosol de la célula huésped, integrándose de este modo en el metabolismo celular (Kurland and Andersson 2000).

Durante los cientos de miles de años desde la endosimbiosis, se ha ido produciendo la transferencia o pérdida de la mayor parte del genoma bacteriano al núcleo eucariota, de tal manera que el ADN de la mitocondria (ADNmt) actual sólo retiene un reducido número de los genes del genoma original de la proteobacteria, 37 en la inmensa mayoría de los animales. El resto de los aproximadamente 1500 genes que dan lugar al proteoma mitocondrial (Meisinger et al. 2008)(<http://www.mitop.de:8080/mitop2>), están codificados en el núcleo, son traducidos por ribosomas citoplásmicos y transportados a la mitocondria a través de diversos sistemas de importe de proteínas (Mokranjac and Neupert 2008; Wallace 2005). Por éste motivo, podemos decir que la mitocondria es un orgánulo semiautónomo ya que su genoma tiene una capacidad codificante limitada y necesita la contribución del genoma nuclear para su arquitectura, mantenimiento y funcionalidad (Garesse and Vallejo 2001; Kelly and Scarpulla 2004).

La mitocondria se encuentra presente en prácticamente todas las células eucariotas y en su interior tienen lugar un gran número de procesos metabólicos esenciales, que incluyen entre otros la oxidación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs, y algunas etapas de la biosíntesis de aminoácidos y del grupo hemo. Probablemente, la función más relevante de la mitocondria es la de generar energía química en forma de ATP mediante un proceso conocido como fosforilación oxidativa. Sin

embargo, esta visión se ha ampliado en los últimos años al identificarse varios procesos celulares fundamentales en los que la mitocondria desempeña un papel central, como son la muerte celular programada o apoptosis (Green 2005), y la señalización intracelular por calcio (Bianchi et al. 2004) y especies reactivas de oxígeno (Starkov 2008).

1.1. Estructura, número y distribución de las mitocondrias en células y tejidos

La dotación mitocondrial (cantidad y funcionalidad) presenta una gran plasticidad que se traduce en diferencias en la estructura, número y distribución de las mitocondrias en las distintas células del organismo, de tal modo que existe una enorme diversidad de mitocondrias estructural y funcionalmente diferentes en función de la demanda energética de los diferentes tejidos.

La mitocondria posee una doble membrana que da lugar a dos compartimentos: el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. La membrana mitocondrial externa, que separa el orgánulo del citoplasma, es permeable a pequeñas moléculas e iones. La mayor parte de las proteínas mitocondriales de origen nuclear entran en la mitocondria a través de la translocasa de la membrana externa mitocondrial (TOM), para posteriormente y en función de su destino final pasar a la maquinaria de clasificación y ensamblaje (Sambrook). Sin embargo, la membrana mitocondrial interna es mucho menos permeable, necesitando de la presencia de varios transportadores específicos, como TIM22 y TIM23 (Ahmed and Fisher 2009; Arco and Satrustegui 2005; Wiedemann et al. 2004) y OXA1 (Hartl et al. 1987). Es en ésta última donde se encuentra insertada la cadena de transporte electrónico y es, por tanto, el lugar físico donde se produce la síntesis de ATP mitocondrial. La membrana mitocondrial interna presenta invaginaciones lamelares, denominadas crestas, que incrementan en gran medida la superficie de la misma y aumentan su capacidad funcional.

A pesar de que la estructura interna de las mitocondrias está bastante conservada, su forma externa es muy variable. Las mitocondrias no tienen un tamaño fijo, aunque normalmente sus dimensiones están en torno a 3-4 μ m de largo y 1 μ m de diámetro. La posición de las mitocondrias en la célula no es estática y su distribución no es al azar. Frecuentemente forman una red reticular que se establece por interacciones de unas mitocondrias con otras, mediante un proceso dinámico que implica eventos continuos de fusión y fisión mitocondrial (D. C. Chan 2006) y, a su vez, de éstas con el citoesqueleto y con el sistema de retículo endoplásmico (Boldogh and Pon 2007; Nisoli et al. 2004). A pesar de esta situación dinámica, en las diferentes células del organismo, la masa mitocondrial ("número de mitocondrias") es constante para cada tipo celular (Scheffler 1999) y depende principalmente de su demanda energética.

La proliferación mitocondrial está ligada a la proliferación celular. Desde la fase S y hasta la fase M del ciclo celular, las mitocondrias crecen y se dividen para dotar a las células hijas con la cantidad adecuada de masa mitocondrial. La división de las mitocondrias se produce por la fisión de las mismas. No obstante, existen situaciones en que la fisión mitocondrial no está estrictamente asociada al ciclo celular, como ocurre en algunos procesos apoptóticos o en algunas situaciones patológicas. La fusión mitocondrial se desencadena cuando dos mitocondrias entran en contacto. A medida que se incrementa la motilidad de las mitocondrias, aumenta la probabilidad de choques

entre ellas, y los eventos de fusión se ven favorecidos. La función de este proceso podría estar relacionada con la protección de las células frente a fenómenos apoptóticos (Meeusen and Nunnari 2005; Suen et al. 2008).

1.2. Función mitocondrial

La mitocondria es la principal productora de energía celular en forma de ATP. En ella tiene lugar el proceso de fosforilación oxidativa mediante el cual las coenzimas reducidas $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 , procedentes del catabolismo de los nutrientes celulares, se oxidan y ceden sus electrones a la cadena de transporte electrónico (CTE) y finalmente al O_2 . La transferencia de electrones de unos elementos de la CTE a otros, que se realiza de forma secuencial a favor de potencial oxidorreductor, está acoplada al bombeo de H^+ por algunos de ellos desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. Este bombeo genera un gradiente electroquímico que se manifiesta como un gradiente de pH y una diferencia de potencial a través de la membrana mitocondrial interna. La energía generada por la disipación del gradiente de H^+ a través de la ATP-sintasa es utilizada para fosforilar el ADP, con la consiguiente formación de ATP. Esta reacción es reversible y la ATP-sintasa puede mantener el gradiente de H^+ a expensas de la hidrólisis de ATP (Scheffler 1999).

El correcto funcionamiento del sistema OXPHOS requiere la acción coordinada de una serie de complejos enzimáticos multiheteroméricos parcialmente integrados en la membrana interna mitocondrial. Estos incluyen los complejos I, III, y IV, responsables de la translocación de los protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, el complejo V, o ATP sintasa, y una serie de proteínas y complejos accesorios que suministran electrones a la coenzima Q (ubiquinona) que incluyen el complejo II (succinato-ubiquinona oxidorreductasa), la flavoproteína-ubiquinona oxidorreductasa y la dihidroorotato deshidrogenasa (Figura 1) (Smeitink et al. 2006).

Además de la producción de energía, en la mitocondria tienen lugar numerosas rutas metabólicas como el ciclo de Krebs, la β -oxidación de ácidos grasos, la síntesis de purinas, del grupo hemo o de complejos ferrosulfurados. Al mismo tiempo, la mitocondria participa en procesos celulares esenciales como el transporte no sólo de metabolitos sino también de iones inorgánicos como fosfato, sodio, potasio y calcio.

Las alteraciones en el funcionamiento de la mitocondria, y en particular los defectos en la síntesis de ATP, provocan situaciones patológicas que suelen afectar principalmente a los tejidos con una mayor demanda energética como son músculo y tejido nervioso (Schapira and Cock 1999). Por este motivo, las enfermedades producidas por una disfunción de la cadena respiratoria generalmente cursan con encefalomiopatías o síndromes neurodegenerativos. El estudio y el diagnóstico de las enfermedades mitocondriales resulta complejo puesto que éstas pueden ser ocasionadas por mutaciones en genes localizados tanto en el genoma nuclear como en el mitocondrial, su manifestación clínica es muy variable y sin una clara relación entre el fenotipo y el genotipo.

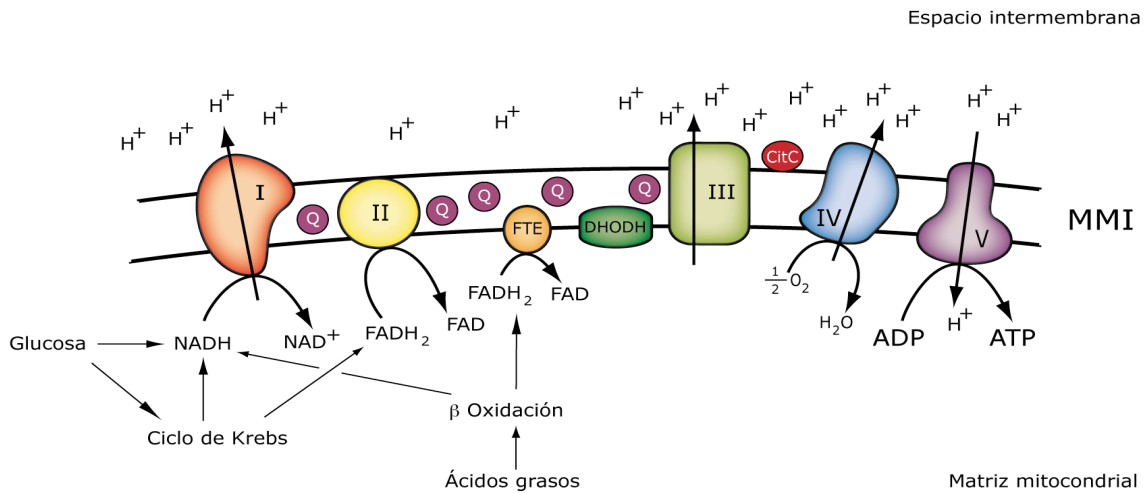


Figura 1. Sistema OXPHOS. Las coenzimas reducidas provenientes del catabolismo de los nutrientes celulares, se oxidan y ceden sus electrones a la cadena de transporte electrónico y finalmente al O₂. El gradiente de protones generado se transforma en energía química que es utilizada por el complejo V, ATP sintasa, para la producción de ATP. I: NADH coenzima Q oxidorreductasa (Complejo I); II: Succinato deshidrogenasa (Complejo II); III: Ubiquinona-Citocromo C oxidorreductasa (Complejo III); IV: Citocromo C oxidasa (Complejo IV); V: ATP sintasa (Complejo V). FTE: flavoproteína-ubiquinona oxidorreductasa, DHODH: dihidroorotato deshidrogenasa, CitC: Citocromo C, Q: Ubiquinona.

2. Estructura y metabolismo del ADNmt

2.1. Genoma mitocondrial

Aunque han pasado más de cuatro décadas desde el descubrimiento del ADNmt (Nass and Nass 1963) y actualmente se ha secuenciado completamente en cientos de especies diferentes, aún se desconocen muchos aspectos sobre los mecanismos implicados en regular su replicación y expresión.

Cada mitocondria contiene su propio genoma en un número de copias que oscila entre uno y diez. El ADNmt es una molécula circular de doble cadena que se encuentra formando parte de complejos nucleoproteicos asociados a la membrana mitocondrial interna denominados, por analogía a los cromosomas bacterianos, nucleoides (Bogenhagen et al. 2003). Dichos nucleoides se consideran la unidad de transmisión y herencia del ADNmt. En humanos se han descrito 27 proteínas presentes en los nucleoides. De éstas, 11 están directamente implicadas en el metabolismo del ADNmt como la ADN polimerasa mitocondrial (POLG), una proteína con actividad 5'-3' ADN helicasa (TWINKLE), la proteína de unión a cadena sencilla (mtSSB), o el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) (Holt et al. 2007). Además, incluyen no sólo factores implicados en replicación y transcripción sino también proteínas requeridas para el mantenimiento del ADNmt.

En metazoos, el genoma mitocondrial es una pequeña molécula circular de doble cadena de ADN, cuyo tamaño varía entre 16 y 20 kb. Su capacidad codificante es muy limitada puesto que codifica exclusivamente 37 genes: 13 polipéptidos que forman parte de complejos OXPHOS, 2 ARN ribosómicos (ARNr 12S y 16S) y 22 ARN de transferencia (ARNt). Las trece proteínas codificadas en el genoma mitocondrial son subunidades estructurales de los complejos del sistema OXPHOS: 7

subunidades (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 y ND6) de las 46 que forman el complejo I (NADH deshidrogenasa), una subunidad (citocromo b, Citb) de las 11 presentes en el complejo III (complejo bc₁), tres subunidades (COI, COII, COIII) de las que constituyen el complejo IV (citocromo C oxidasa) y dos subunidades (ATP6 y ATP8) de las 16 proteínas que forman el complejo V (ATP sintasa). A pesar de la extrema conservación de la capacidad codificante del genoma mitocondrial a lo largo de la evolución, existen variaciones entre vertebrados e invertebrados en cuanto a la disposición y distribución de los genes en ambas cadenas. Una de las características del genoma mitocondrial que mejor refleja su origen evolutivo es la extraordinaria compactación génica que presenta. Los genes codificados en el genoma mitocondrial carecen de intrones, secuencias intergénicas y regiones no traducidas (UTRs), pudiendo incluso llegar a ser solapantes. En mamíferos, la composición de nucleótidos de las dos cadenas del ADNmt es diferente; una de ellas es rica en residuos de guanina y citosina y se denomina cadena pesada (H) mientras que la otra se denomina cadena ligera (L).

Una de las propiedades más relevantes del genoma mitocondrial es que presenta un código genético propio, diferente del "universal", que varía ligeramente en los diferentes *phyla*. Por otro lado la genética mitocondrial presenta una serie de características que la diferencian claramente de la nuclear, entre las que se encuentran la herencia materna y la segregación mitótica (Hutchison et al. 1974; Macmillan et al. 1993).

Todos los genomas mitocondriales presentan una región no codificante de tamaño variable, pero en general pequeña. En mamíferos, se localizan en la misma el origen de replicación (O_H) y los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción (LSP y HSP). Aunque su secuencia no está muy conservada entre los distintos géneros, contiene segmentos pequeños que sí están conservados y que son funcionalmente relevantes (Figura 2A). En células metabólicamente activas, la región de control adopta una estructura de triple hélice, denominada *D-loop* o bucle de desplazamiento, en la que una pequeña molécula de ADN complementaria a la cadena L desplaza a la cadena H. La estructura de *D-loop* se genera durante la replicación del ADNmt por una parada en la síntesis de la cadena H naciente que tiene lugar dentro de la región de control. Aunque la secuencia del genoma mitocondrial de *Drosophila* se conoce desde hace tiempo (Lewis et al. 1995), aun no se han localizado con precisión los orígenes de replicación y sus regiones promotoras.

En *Drosophila*, la región de control varía entre 1-5 kb según la especie y presenta un contenido en residuos de adenina y timina del 90-96% por lo que también se denomina región A+T. La secuencia de esta región refleja la conservación interespecífica de un segmento rico en T y A de dos elementos, I y II. La implicación de éstos dos últimos en la replicación y transcripción del ADNmt es probable aunque todavía no se ha obtenido ninguna evidencia experimental (Figura 2B) (Garesse and Kaguni 2005).

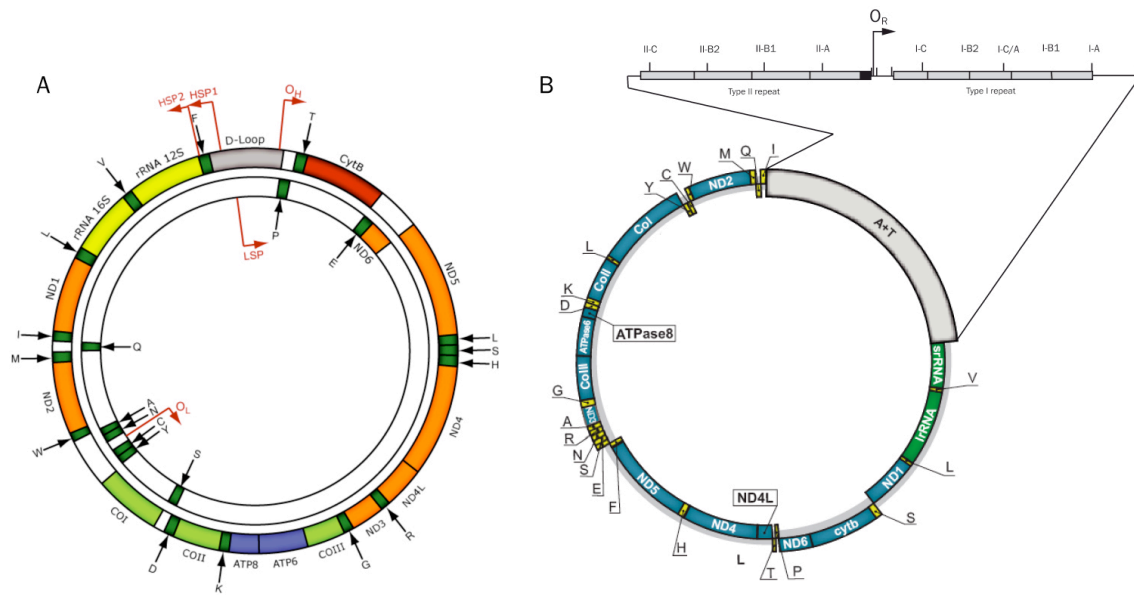


Figura 2. Organización del ADN mitocondrial de mamíferos y *Drosophila*. A) ADNmt de mamíferos. Esta molécula circular de doble hebra, de 16569 pb, codifica para 13 proteínas, 22 ARNt y 2 ARNr. La región de control, D-Loop, se representa en la caja gris. B) ADNmt de *Drosophila melanogaster*. Esta molécula circular de doble hebra, de 19517pb, codifica para 13 proteínas, 22 ARNt y 2 ARNr. La región de control de alto contenido en A+T, ampliada en la figura, incluye el origen de replicación de ambas cadenas (O_R) y diversas secuencias implicadas en la expresión del ADNmt. En ambos casos, los ARNt se representan en código de una letra con flechas (A) y subrayados (B). O_H , origen de replicación de la cadena pesada; O_L , origen de replicación de la cadena ligera; HSP; promotor de la cadena pesada; LSP, promotor de la cadena ligera.

2.2. Replicación del ADNmt

La biogénesis mitocondrial es un proceso complejo que implica la proliferación y la diferenciación de las mitocondrias, siendo la replicación del ADNmt un componente esencial. Este proceso está fuertemente regulado tanto a nivel transcripcional como traduccional (Hock and Kralli 2009), y tiene como objetivo satisfacer la demanda energética de las células en función de su contexto fisiológico (Garesse and Vallejo 2001).

A pesar de que el número de mitocondrias por célula permanece constante en cada tipo celular, no parece que la replicación del ADNmt esté estrictamente coordinada con la del ADN nuclear. En procesos tales como la embriogénesis y la diferenciación celular, se produce más de una duplicación del ADNmt durante el ciclo celular y en procesos como la oogénesis sólo algunas moléculas de ADNmt previamente seleccionadas se replican independientemente del ciclo celular (Poulton and Marchington 2002; Wai et al. 2008). En tejidos postmitóticos, como músculo y sistema nervioso, tienen lugar eventos de replicación del ADNmt como consecuencia del recambio de las mitocondrias, en ausencia de división celular y replicación del ADNn. Sin embargo, en algunos organismos se han descrito factores de transcripción que modulan la actividad de genes implicados en replicación del ADNn y de genes de replicación mitocondrial (Fernandez-Moreno et al. 2009), sugiriendo una posible coordinación o no entre ambos procesos en función de la situación fisiológica de la célula.

2.2.1. Mecanismos de replicación del ADNmt

Mientras que la maquinaria encargada de la replicación del ADNn es muy sofisticada, el número de factores necesarios para replicar el ADNmt es comparativamente pequeño (Kaguni 2004). En la actualidad existen dos modelos de replicación del ADNmt, el asimétrico y asincrónico y el tradicional simétrico y acoplado.

2.2.1.1. Modelo de replicación asimétrico y asincrónico:

Desde la década de los ochenta, ha sido aceptado como válido el modelo de replicación asimétrica y asincrónica propuesto por D.A. Clayton (Clayton 1982, 2000). En dicho modelo, la síntesis de nuevo ADNmt comienza en el origen de replicación de la cadena pesada (O_H), situado en la región de control, sintetizando únicamente una copia de esta cadena sin síntesis de la cadena ligera. Cuando el bucle de desplazamiento originado llega al origen de replicación de la cadena sencilla (O_L), situado a dos tercios del genoma del O_H , se inicia la replicación de esta cadena en sentido opuesto. Ambas hebras hijas se sintetizan de forma continua, siendo la cadena pesada la que se completaría primero y la ligera terminaría de sintetizarse más tarde. Dado el comportamiento asimétrico y asincrónico de la replicación de las cadenas hijas, la segregación de éstas comienza antes de que la cadena L hija complete su replicación (Brown et al. 2005) (Figura 3).

2.2.1.2. Modelo de replicación simétrico y acoplado:

En el año 2000, I. Holt, H. Jacobs y colaboradores han propuesto un modelo alternativo de replicación (Holt et al. 2000). En este modelo la replicación del ADNmt ocurriría de manera simétrica y simultánea en ambas cadenas (Figura 3), desde múltiples orígenes de replicación situados en una región amplia cercana al O_H . La síntesis de las cadenas hijas progresaría bidireccionalmente a partir de varias horquillas de replicación, lo que haría necesaria la existencia de proteínas que catalizaran la formación de fragmentos de Okazaki (Garesse and Kaguni 2005). Este modelo ha sido propuesto a partir del estudio de los intermediarios de replicación mediante electroforesis de dos dimensiones en geles de agarosa y del patrón de ribosustitución del ADNmt. A partir de los datos experimentales obtenidos, estos autores han propuesto que este mecanismo es la forma predominante de replicación del ADNmt en animales (Yang et al. 2002).

El debate que surgió en torno al mecanismo de replicación del ADNmt al postularse este nuevo modelo se mantiene en la actualidad. A pesar de los análisis recientes (Brown et al. 2005), ninguna evidencia experimental ha conseguido hasta la fecha establecer de forma concluyente, cual es el mecanismo de replicación del ADNmt. Los datos actuales sugieren que al menos en vertebrados, los dos mecanismos podrían estar presentes dependiendo de las condiciones fisiológicas (Garesse and Kaguni 2005).

Se sabe mucho menos sobre el mecanismo de replicación del ADNmt en *Drosophila*. Sólo se ha identificado un origen de replicación por análisis de microscopía electrónica, el cual, se sitúa en la región de control rica en A+T (Goddard and Wolstenholme 1978). Análisis de secuencia entre distintas especies de *Drosophila* han permitido detectar la presencia de tres elementos muy conservados en esta región, las repeticiones I y II, y una zona de residuos de deoxitimidina. Éstos

podrían estar implicados en la replicación y transcripción del ADNmt, aunque no se han obtenido evidencias funcionales hasta la fecha (Lewis et al. 1994; Oliveira et al. 2007; Tsujino et al. 2002).

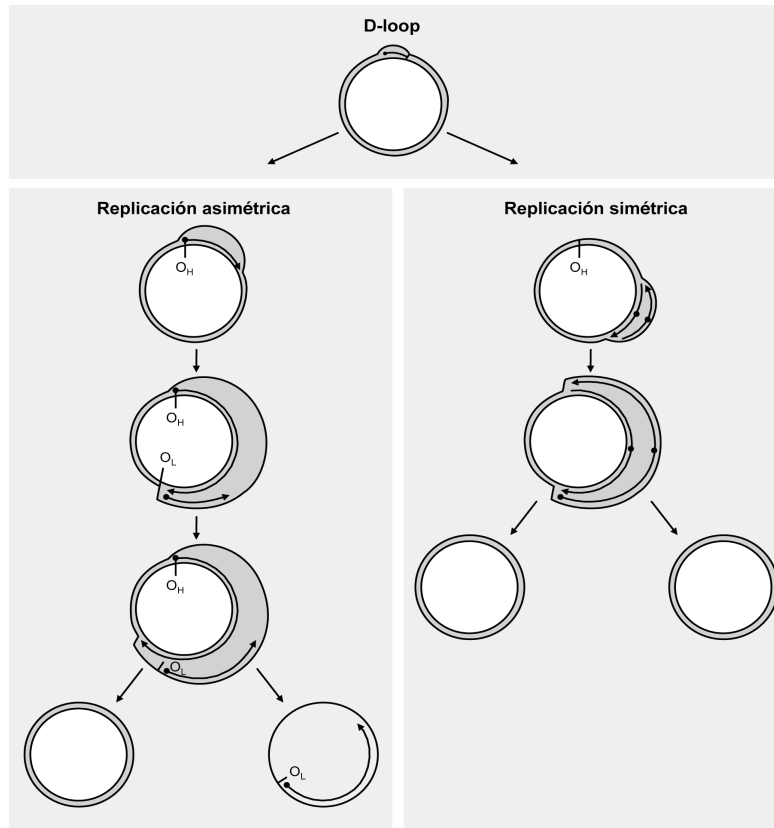


Figura 3. Modelos de replicación del ADNmt. Existen dos modelos de replicación descritos hasta la fecha, el modelo de replicación asimétrico y asíncrono y el modelo de replicación simétrico y acoplado.

2.2.2. Proteínas implicadas en la replicación del ADN mitocondrial

Según el modelo de replicación asimétrico, el proceso de replicación del ADNmt está íntimamente relacionado con su transcripción, ya que el inicio de la replicación a partir del O_H requiere un cebador de ARN que se sintetiza a partir del promotor de la cadena ligera (LSP). Dependiendo de qué proteínas se encuentren en la región de control, la transcripción puede generar transcritos policistrónicos o transcritos muy cortos que terminan en el O_H, aportando los extremos 3' necesarios para el inicio de la replicación del ADNmt. La síntesis de ADN a partir del O_L requiere una ADN-primasa que probablemente reconoce la estructura de bucle y el procesamiento endonucleotídico de la molécula híbrida ARN-ADN lo realiza probablemente una endonucleasa denominada ARNasa-MRP (mtRNA processing endonuclease) (Lee and Clayton 1998).

Estudios realizados recientemente sobre la maquinaria necesaria para la replicación del ADNmt (Figura 4), han permitido reconstituir *in vitro* el replisoma mínimo necesario para la replicación del ADNmt en mamíferos, con sólo dos componentes; la ADN polimerasa γ , con sus dos subunidades α y β , y la helicasa Twinkle (Korhonen et al. 2004). A su vez, la presencia de mtSSB incrementa la procesividad hasta niveles similares a los observados *in vivo*. Por tanto, la unidad

replicativa mínima parece constar de estos tres factores: mtSSB, helicasa mitocondrial (*d*-mtHelicasa) y Pol γ .

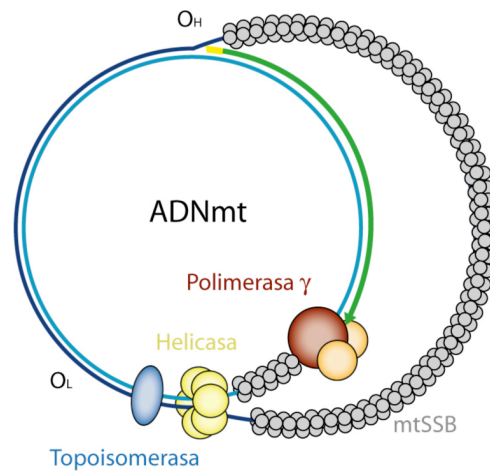


Figura 4. Maquinaria básica de replicación del ADNmt.

2.2.2.1. mtSSB

Las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla (SSB) juegan un papel fundamental en la replicación, reparación y recombinación del ADN. La SSB mitocondrial tiene un tamaño que varía en función de su origen entre 13 y 15 kDa y en solución acuosa forma un tetrámero. Su presencia en la horquilla de replicación, además de proteger al ADN de cadena sencilla, estimula la actividad de la polimerasa γ , favoreciendo el reconocimiento del cebador de ARN y facilitando su unión al origen de replicación (Kaguni 2004). Recientemente se ha observado que la proteína mtSSB es capaz de unirse al dominio N-terminal de la proteína p53 translocada a la mitocondria. Esta unión estimula la actividad exonucleasa 3'-5' de p53, a la cual se le atribuye un papel dual, por un lado iniciador del programa de apoptosis y por otro como factor de reparación del mtDNA bajo condiciones de estrés celular (T. S. Wong et al. 2009).

En *Drosophila*, la proteína mtSSB es un tetrámero formado por subunidades de 16 kDa de tamaño. Los mutantes en este gen presentan una capacidad de respiración mitocondrial reducida, que produce defectos en la proliferación celular y que es la responsable de la letalidad observada durante el periodo larvario (Maier et al. 2001).

2.2.2.2. Helicasa mitocondrial

La función de la mtHelicasa es catalizar la ruptura de los enlaces de hidrógeno que mantienen apareadas las dos cadenas de la molécula de ADNmt situados por delante de la horquilla de replicación, permitiendo el avance de la ADN polimerasa. La enzima funcional es un hexámero formado por seis subunidades idénticas. Descrita originalmente en levaduras (Lahaye et al. 1993; Sedman et al. 2000), en humanos se ha clonado el gen que codifica la mtHelicasa que se ha denominado TWINKLE (Spelbrink et al. 2001). Se localiza en los nucleoides y presenta homología de secuencia en su región carboxilo terminal (Ct) con una helicasa/primasa del bacteriófago T7 y la

familia de las helicasas DnaB. La inhibición de la expresión de TWINKLE en células en cultivo provoca una rápida depleción del ADNmt, mientras que su sobreexpresión en ratón conlleva un considerable aumento en el número de copias del ADNmt. Estos datos sugieren que TWINKLE es esencial para la estabilidad del ADNmt y se comporta como un regulador independiente y limitante del número de copias del ADNmt (Tynismaa et al. 2004).

Recientemente se ha descrito una nueva proteína con actividad nucleasa/helicasa localizada en la mitocondria, denominada DNA2. En humanos, hDNA2 forma un complejo con la ADN polimerasa γ , estimulando su actividad polimerasa. Esta proteína juega un papel en el procesamiento de los intermediarios de ADN durante la replicación y reparación del ADNmt (Zheng et al. 2008).

En *Drosophila* se ha identificado una única helicasa mitocondrial similar a TWINKLE. Posee un dominio primasa y un dominio helicasa, separados por una región de unión. Dentro de estos dominios existen motivos conservados entre distintas especies (1,1a,2,3,4 y 5), que definen las dos actividades principales de la enzima. Por una parte los motivos 2, 4 y 5 se localizan en el dominio primasa de la proteína, mientras que los motivos 1, 1a, 2, 3 y 4 lo hacen en el dominio helicasa (Figura 5).

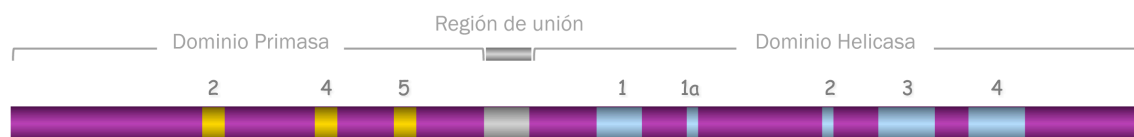


Figura 5. Localización de los diferentes dominios dentro de la proteína *d*-mtHelicasa. Se señalan los tres motivos conservados en el dominio primasa, la región de unión y los cinco dominios conservados en el dominio helicasa.

2.2.2.3. ADN polimerasa γ (Pol γ o PolG)

En contraste con la especialización funcional que se observa en las ADN polimerasas nucleares, la polimerasa γ es la única enzima responsable de la síntesis de ADN en procesos de replicación, reparación y recombinación en la mitocondria.

La polimerasa γ fue identificada a principio de los años 70 como una ADN polimerasa dependiente de ARN en células HeLa humanas (Fridlender et al. 1972), y fue posteriormente reconocida como la ADN polimerasa mitocondrial (Bolden et al. 1977). Pertenece a la familia A de las polimerasas, de la que es prototipo la ADN polimerasa I de *Escherichia coli* y a la que pertenecen, entre otras, la ADN polimerasa del bacteriófago T7 (Kaguni 2004). La mayor parte de las polimerasas γ animales están compuestas por una subunidad catalítica de un tamaño de 120-140 kDa que contiene la actividad polimerasa 5'-3' y exonucleasa 3'-5' (correctora de errores), y una subunidad accesoria de un tamaño de 35-40 kDa, que confiere procesividad a la enzima y aumenta su eficacia catalítica. Además, esa última presenta similitudes estructurales y de secuencia con las aminoacil-tRNA-sintetasas de la clase IIa presentes en procariontes, y se ha sugerido que podría participar en el reconocimiento del cebador de ARN necesario para el inicio de la replicación del ADNmt.

En humanos, la enzima es un heterotrímero formado por una subunidad catalítica (p140, codificada por el gen *POLG* o *POLG1*, localizado en el cromosoma 15q25) y dos subunidades

acesorias idénticas (p55, codificada por el gen *POLG2*, localizado en el cromosoma 17q) que dimerizan entre sí (Yakubovskaya et al. 2006). La polimerasa γ posee una alta fidelidad (un error por cada 2×10^6 nucleótidos) en parte debido a la presencia de una actividad exonucleasa 3'-5' o correctora de errores, en la subunidad catalítica.

La subunidad catalítica posee diversos motivos conservados en las diferentes especies y compartidos con las polimerasas de la familia A. Seis de estos motivos están agrupados en dos dominios que definen las dos actividades principales de la subunidad. Además existen otros seis motivos conservados en las polimerasas γ , cuatro de ellos en la región espaciadora comprendida entre los dominios polimerasa y exonucleasa (Kaguni 2004) (Figura 6).

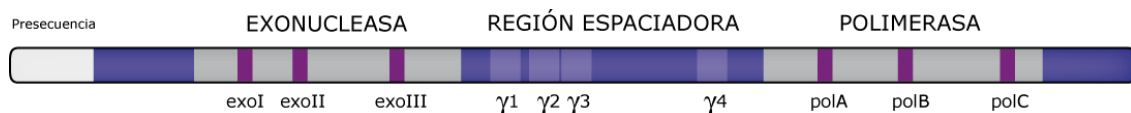


Figura 6. Localización de los diferentes dominios dentro de la proteína PolG. Se señalan los tres motivos conservados en el dominio exonucleasa (exo I, exo II y exo III), los cuatro motivos conservados en la región espaciadora (γ^1 , γ^2 , γ^3 y γ^4) y los tres motivos del dominio polimerasa (polA, polB, y polC). En el extremo amino terminal se encuentra el dominio de localización mitocondrial (presecuencia).

En *Drosophila*, los genes que codifican ambas subunidades se encuentran codificados en un “cluster” cuya densidad génica es superior a la media del resto del genoma (Lefai et al. 2000a). El complejo heterodimérico que constituye la holoenzima da lugar a una polimerasa eficiente y procesiva con alta fidelidad en la selección e incorporación de nucleótidos (Kaguni 2004).

Otros posibles componentes del replisoma mitocondrial incluyen la RNasa H1, que ha sido localizada en la mitocondria y podría estar implicada en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki en el modelo simétrico de replicación, la topoisomerasa mitocondrial I (TOP1mt), la topoisomerasa III α (hTOP3 α) y la ADN ligasa III (Hudson and Chinnery 2006).

2.3. Transcripción del ADNmt

A diferencia del genoma nuclear, que se transcribe fundamentalmente por tres ARN polimerasas multiméricas y del bacteriano, que se transcribe por un complejo multiproteico de 6 subunidades, el ADNmt se transcribe por una única ARN-polimerasa monomérica, relacionada evolutivamente con las polimerasas de los bacteriófagos T3 y T7. Los promotores de la transcripción mitocondrial están localizados en la región de control del ADNmt y se denominan LSP, el de la cadena ligera, y HSP1 y HSP2 los de la cadena pesada (Bonawitz et al. 2006). La transcripción del genoma mitocondrial genera un único transcrito policistrónico de cada una de las cadenas de la molécula de ADNmt, además de un transcrito de menor tamaño que codifica los dos ARN ribosómicos. La maduración de los transcritos primarios policistrónicos es un proceso que requiere pocas enzimas y que se realiza de acuerdo con el modelo de puntuación por ARNs de transferencia (Montoya et al. 1981). En mamíferos, el inicio de la transcripción a partir de los promotores mitocondriales requiere la presencia simultánea de la ARN polimerasa mitocondrial (POLRMT), del factor de transcripción

mitocondrial A (Tfam o mtTFA) y, del factor de transcripción mitocondrial B1 o B2 (mtTFB1 y mtTFB2) (Gaspari et al. 2004). La abundancia de transcritos mitocondriales se correlaciona con la síntesis de ATP acoplada a la respiración mitocondrial, por el requerimiento de altas concentraciones de ATP para el inicio de la transcripción. Esto podría representar un nuevo y elegante mecanismo para ligar la producción de energía a la transcripción de las subunidades de la cadena respiratoria (Amiott and Jaehning 2006). Recientemente se ha demostrado que la POLRMT también se localiza en el núcleo y que está ligada a la expresión de algunos genes nucleares. Su papel concreto en la transcripción nuclear y las implicaciones funcionales para la biogénesis mitocondrial son actualmente desconocidas (Scarpulla 2008).

2.4. Traducción de los ARN mensajeros mitocondriales

Al contrario que la replicación y transcripción del ADNmt, la traducción mitocondrial es un proceso poco conocido. Los elementos conocidos implicados en la traducción de los ARNm-mts son similares a los procariotas. De ellos, 22 ARNt y 2ARNr se sintetizan en la propia mitocondria. Su papel es sintetizar los trece polipéptidos codificados en el ADNmt y que forman parte del sistema OXPHOS. Este proceso requiere, además de los ARNt codificados en el ADNmt, la acción concertada de factores de traducción y ribosomas mitocondriales. En mamíferos, han sido clonados y secuenciados los genes que codifican dos factores de iniciación, IF2 e IF3; cuatro de elongación, EFTu, EFTs, EFG1 y EFG2 (Spremulli et al. 2004); un factor de liberación, RF1; y un factor de reciclado ribosomal, RRF (Zhang and Spremulli 1998). Los ribosomas mitocondriales presentan características diferenciales con respecto a los procariotas y eucariotas. Son partículas 55S compuestas por una subunidad pequeña (28S) y una grande (39S) y la relación proteína : ARN es mayor que en otros ribosomas (O'Brien 2002). A pesar de los estudios realizados, todavía no se ha desarrollado un sistema que reproduzca *In vitro* la síntesis de las proteínas mitocondriales.

Recientemente se ha visto que podría existir una posible relación entre la transcripción y la traducción del ADNmt en células de mamífero, debido a una interacción directa entre POLRMT y la proteína mitocondrial ribosomal (MRPL12) (Z. Wang et al. 2007). Adicionalmente, se ha demostrado que el factor de transcripción TFB1M actúa *in vivo* como un regulador traduccional, tanto en *Drosophila* (Matsushima et al. 2005), como en mamíferos (Metodieiev et al. 2009).

3. Patología mitocondrial: alteraciones del sistema de fosforilación oxidativa

Dado el amplio número de procesos celulares en los que participa la mitocondria, no es extraño que los defectos en la fisiología mitocondrial estén asociados a un número de enfermedades y síndromes cada vez más amplio que abarcan prácticamente todas las especialidades médicas (Copeland 2008). El concepto de enfermedad mitocondrial data de 1962, cuando el grupo de Rolf Luft describió a una paciente con hipermetabolismo severo no debido a enfermedad tiroidea (Luft et al. 1962).

A partir de la sistematización de los estudios bioquímicos fue posible una primera clasificación de las enfermedades mitocondriales en función de cual de las 5 etapas principales del metabolismo mitocondrial estaba afectada: transporte de sustratos, utilización de sustratos, ciclo de Krebs, cadena de transporte electrónico y acoplamiento oxidación/fosforilación (Dimauro 2004). Pronto, el uso del término enfermedad mitocondrial se empezó a restringir a aquellas enfermedades donde el defecto afectaba a la síntesis de ATP. Las primeras mutaciones en el ADN mitocondrial se describieron a finales de la década de los 80 (Holt et al. 1988; Singh et al. 1987). En 1989 se describió una familia donde la oftalmoplejía externa progresiva era heredada de manera autosómica dominante asociada a la presencia de deleciones múltiples en el ADNmt (Zeviani et al. 1989). Era la primera evidencia de un nuevo grupo de enfermedades mitocondriales de origen nuclear. Esto hizo volver la mirada al núcleo, describiéndose en 1995 la primera mutación en el ADN nuclear asociada a enfermedad mitocondrial por el grupo de A. Munnich (Bourgeron et al. 1995).

La epidemiología de las enfermedades mitocondriales es complicada dado el amplio espectro de manifestaciones clínicas y la dificultad de asignar un origen definido a muchos de los fenotipos. Esto ha conducido tradicionalmente a una subestimación de la prevalencia de este grupo de enfermedades (Schapira 2006). Desgraciadamente, es un campo donde prácticamente no se han producido avances eficaces a nivel terapéutico, de hecho, a día de hoy claramente insuficientes cuando no inexistentes (DiMauro et al. 2006; Koene and Smeitink 2009).

3.1. Mutaciones en el ADNmt

Debido a la propia naturaleza del ADNmt, hay algunos aspectos que diferencian la genética mitocondrial de la mendeliana. La naturaleza poliploide del ADNmt hace que se definan conceptos como homoplasmia y heteroplasmia. Se define homoplasmia cuando todas las copias del genoma mitocondrial son idénticas y heteroplasmia cuando coexisten dos o más genotipos distintos. Por ello, es necesario que exista un nivel mínimo de mutación para que exista expresión fenotípica o bioquímica del defecto mitocondrial, es lo que se conoce como efecto umbral (Taylor and Turnbull 2005).

Una mutación homoplásmica se transmite a toda la descendencia materna. Sin embargo, existen factores adicionales que hacen que la expresión del defecto mitocondrial pueda ser diferente entre los portadores de dicha mutación, indicando que puedan existir factores de origen nuclear modulando la expresión fenotípica de estas mutaciones (Man et al. 2003). El caso de las mutaciones heteroplásmicas añade un punto de complejidad. A los factores nucleares y medioambientales se une el hecho de que durante la oogénesis se produce un cuello de botella genético que hace que la cantidad de ADN mutado que hereda la descendencia sea variable (Taylor and Turnbull 2005), y la segregación mitótica, que hace que los distintos tejidos puedan recibir distinta carga mutacional, lo que hace que el porcentaje de ADNmt mutado presente en un determinado tejido sea impredecible, variando entre los diferentes hermanos de una familia que sufre una enfermedad mitocondrial.

3.1.1. Tipos y patogenicidad de las mutaciones en el ADNmt

Molecularmente se pueden distinguir varios tipos de mutaciones en el ADNmt:

- Reorganizaciones en el ADNmt: Pueden ser deleciones y duplicaciones. El tamaño de las deleciones varía entre una única base y varias kilobases, y puede afectar en principio a cualquier región del ADNmt. La deleción más frecuente, conocida como deleción común, tiene un tamaño de 5kb y abarca la región comprendida entre los genes *CITB* y *COXII*. Las deleciones han sido asociadas ocasionalmente con una amplia variedad de síndromes mitocondriales (Schapira 2006).
- Mutaciones puntuales: Hasta la fecha han sido descritas más de 150 mutaciones que afectan a los genes codificados en el ADNmt (<http://www.mitomap.org>). Estas mutaciones afectan a los ARNt, a los ARNr y a los genes que codifican subunidades estructurales de los complejos OXPHOS (Dimauro 2004). La presentación clínica es muy variable e incluye fenotipos que van desde MELAS (Miopatía con Encefalopatía, Acidosis Láctica y accidentes cerebrovasculares) hasta el LHON (Neuropatía Óptica Hereditaria de Leber). La mayoría de las mutaciones patogénicas son heteroplásmicas, correlacionando el grado de heteroplasmia con la severidad del fenotipo.

El mecanismo patogénico de muchas enfermedades producidas por mutaciones en el ADNmt es actualmente desconocido, especialmente en lo que se refiere a mutaciones en los genes que codifican para los ARNt mitocondriales, donde la misma mutación puede causar fenotipos distintos, y a su vez, un mismo fenotipo puede estar causado por distintas mutaciones (Schapira 2006). De un modo general, la patogénesis de las enfermedades mitocondriales causadas por mutaciones en el ADNmt parece ser el resultado de una combinación de la propia mutación, el resto de la molécula de ADNmt, el fondo nuclear, factores medioambientales, la distribución de la mutación en los distintos tejidos, y la dependencia de éstos con respecto al sistema de fosforilación oxidativa.

3.2. Patología mitocondrial asociada a defectos en comunicación intergenómica

Además de las enfermedades causadas por mutaciones en el ADNmt, los defectos mitocondriales comprenden un grupo de enfermedades y fenotipos asociados con alteraciones en genes nucleares, las cuales se pueden dividir en los siguientes grupos:

- defectos debidos a mutaciones en subunidades de la cadena respiratoria;
- defectos debidos a mutaciones en proteínas accesorias;
- defectos debidos a alteraciones en la comunicación intergenómica que afectan al mantenimiento y expresión del ADNmt;
- defectos debidos a alteraciones en enzimas biosintéticas de lípidos o cofactores;

La integridad, replicación y expresión del ADNmt, depende de numerosos factores codificados en el núcleo (Lucía Echevarría 2008). Como se ha discutido previamente, algunos de ellos han sido identificados en humanos, incluyendo la ADN polimerasa γ , la proteína de unión a cadena sencilla

(mtSSB), la mthelicasa Twinkle, una ADN ligasa y algunas topoisomerasas. A éstas se suman las proteínas implicadas en la síntesis del precursor de cadena sencilla de ARN como son, la ARN-polimerasa mitocondrial, y factores y reguladores de transcripción: factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), factores de transcripción mitocondrial de tipo B (TFB2M), factor de terminación mitocondrial (mTERF), etc. En principio, cualquier defecto en alguna de estas proteínas puede provocar alteraciones en el ADNmt y por tanto una patología asociada a un defecto de comunicación intergenómica.

Hasta ahora, sólo algunas de estas proteínas han sido identificadas como responsables de patologías mitocondriales humanas (Spinazzola and Zeviani 2009). Su alteración funcional puede causar enfermedades caracterizadas por alteraciones cualitativas (deleciones múltiples) o cuantitativas (depleciones) en el ADNmt, o por una expresión deficiente de los componentes de la cadena respiratoria codificados en el ADNmt. Recientemente, se ha visto que estos defectos de comunicación intergenómica son una causa frecuente en alteraciones metabólicas hereditarias (Suomalainen and Kaukonen 2001) y también están implicados en neurodegeneración y envejecimiento (Luoma et al. 2004; Trifunovic et al. 2004). La complejidad de la maquinaria mitocondrial (OXPHOS) supone una excepción del paradigma de Garrod propuesto para errores del metabolismo: “una proteína, una enzima, un defecto”. De hecho, sólo una fracción de las alteraciones OXPHOS son atribuidas a mutaciones primarias en subunidades de enzimas de la cadena respiratoria. La mayoría son debidas a defectos en varias rutas implicadas en la formación de la cadena respiratoria, regulando su actividad o controlando su recambio.

En función de las manifestaciones clínicas, las enfermedades mitocondriales causadas por defectos de comunicación intergenómica se pueden clasificar en varios grupos:

- a) Encefalomiopatía en adultos, definida clínicamente por oftalmoplejía externa progresiva (PEO) de transmisión autosómica dominante (ad) o recesiva (ar) y molecularmente por la presencia de deleciones múltiples del ADNmt.
- b) Enfermedad multisistémica autosómica recesiva conocida como encefalomiopatía mitocondrial gastrointestinal (MNGIE), caracterizada por acumulación combinada de deleciones y depleción del ADNmt.
- c) Un espectro de síndromes neurológicos recesivos que van desde polidistrofia neurológica infantil (síndrome de Alpers-Huttenlocher) hasta neuropatía sensorial y ataxia juvenil, disartria y oftalmoparesis (SANDO) y una combinación de ataxia espino-cerebelar y epilepsia (SCAE) con o sin PEO.
- d) Síndromes órgano-específicos de aparición temprana asociados con una profunda depleción del ADNmt. Incluyendo miopatía, mionefropatía, encefalomiopatía y formas hepatocerebrales.

3.2.1. Mutaciones en la mtHelicasa

La mtHelicasa está codificada por el gen *TWINKLE*, también conocido como *PEO1*. Se aisló por primera vez como un locus asociado a PEO en la localización cromosómica C10orf2. El cribado original del gen *Twinkle* en individuos con adPEO, que cursa con deleciones múltiples del ADNmt, permitió identificar 11 mutaciones diferentes en la región codificante que correlacionan con los

defectos observados en 12 familias afectadas (Spelbrink et al. 2001). La mayoría de estas mutaciones residen en la región de unión entre el dominio helicasa del carboxilo terminal y la región N-terminal. Se hipotetiza que esta región está implicada en la interacción entre las subunidades que forman el hexámero funcional.

Las mutaciones en el gen *TWINKLE* están principalmente asociadas a adPEO, pero recientemente se han descrito mutaciones recesivas asociadas a SANDO (Hudson et al. 2005) y ataxia espino-cerebelar infantil (IOSCA) (Nikali et al. 2005). Curiosamente, no se han observado acumulaciones de deleciones ni mutaciones puntuales en el ADNmt. Esto sugiere que las mutaciones causantes de IOSCA en el gen *TWINKLE*, afectan a la estabilidad del ADNmt de manera específica de tejido y de contexto.

Recientemente, se han generado modelos de ratón que sobreexpresan el gen de la mtHelicasa con mutaciones causantes de PEO. Estos ratones muestran deleciones del ADNmt, una progresiva disfunción de la cadena respiratoria y una deficiencia en la citocromo c oxidasa (Tynnismaa et al. 2005).

3.2.2. Mutaciones en la ADN polimerasa γ

La ADN polimerasa γ está codificada por el gen *POLG* y se localiza en el locus cromosómico 15q25. Se han descrito más de 150 mutaciones en este gen asociadas a un amplio número de enfermedades mitocondriales, acompañadas tanto de depleción como de deleciones en el ADNmt (Spinazzola and Zeviani 2009). Las primeras mutaciones fueron descritas en familias con oftalmoplejía externa progresiva en su forma autosómica dominante (adPEO) asociada a deleciones múltiples del ADNmt (Van Goethem et al. 2001), enfermedad que también ha sido asociada a mutaciones en los genes *Twinkle* (Spelbrink et al. 2001) como hemos visto, y *ANT1*, que codifica para una isoforma del transportador de nucleótidos de adenina mitocondrial (Kaukonen et al. 2000).

Todas las mutaciones en el gen *POLG* asociadas con adPEO afectan al dominio polimerasa de la proteína. Estudios basados en la caracterización bioquímica de proteínas recombinantes portadoras de mutaciones en dicho dominio, muestran una correlación entre la severidad del fenotipo observado en pacientes y la disminución de la actividad polimerasa y de la procesividad causada por las mutaciones (Graziewicz et al. 2004). También han sido descritas mutaciones en heterocigosis en pacientes con las formas esporádica y recesiva de PEO (arPEO). Estas mutaciones suelen afectar al dominio exonucleasa o a la región espaciadora de la proteína. Estudios bioquímicos en proteínas recombinantes portadoras de mutaciones en la región espaciadora muestran una drástica disminución de la eficacia catalítica, así como de la capacidad de interaccionar con la subunidad accesoria (S. S. Chan et al. 2005).

Sorprendentemente, hasta hace poco tiempo no se había identificado ninguna mutación en el gen *POLG2*, que codifica para la subunidad accesoria de la polimerasa γ , y que como se ha discutido previamente, desempeña una función esencial para la actividad de la holoenzima (Longley et al. 2006).

Con objeto de generar un fenotipo mutador en ratón que imite la acumulación de mutaciones asociadas al envejecimiento, el gen *POLG* silvestre se ha sustituido mediante recombinación

homóloga por una versión mutada que carece de actividad correctora (Kujoth et al. 2005; Trifunovic et al. 2004). Los tejidos somáticos del ratón homocigótico para la polimerasa deficiente en actividad exonucleasa 3'-5', acumulan una variedad de mutaciones en el ADNmt, la mayor parte generadas durante el desarrollo embrionario. Estos ratones presentan signos de envejecimiento prematuro como pérdida de pelo, disminución de la fertilidad, curvatura de la columna, pérdida prematura de peso y disminución de la esperanza de vida.

4. *Drosophila melanogaster*

4.1. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*

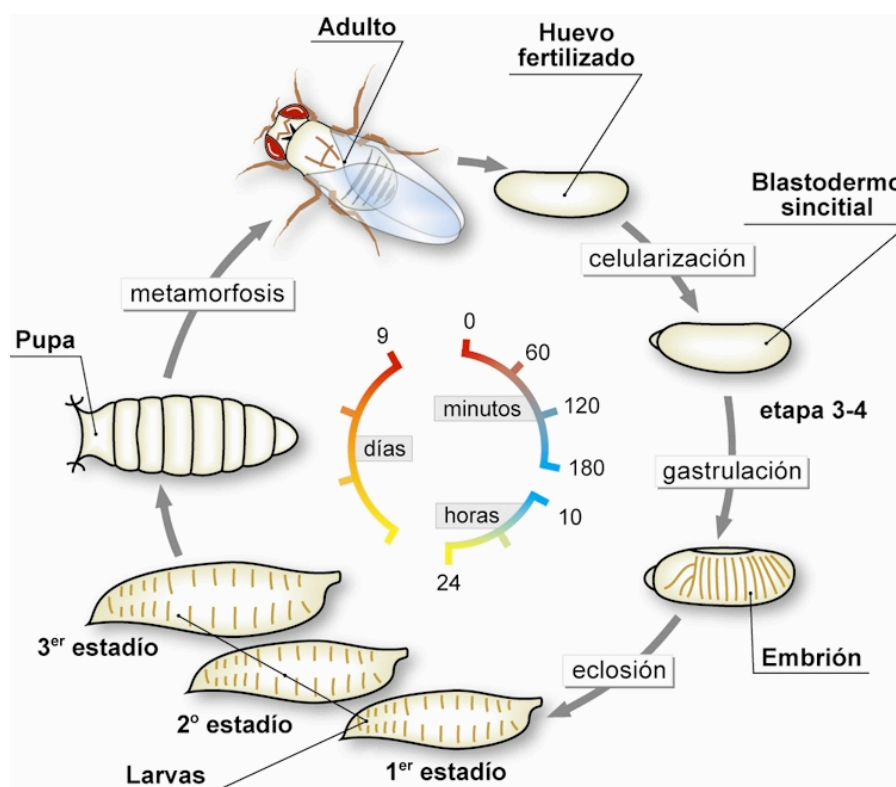


Figura 7. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*.

Drosophila melanogaster es un insecto holometábolo y, como tal, presenta un ciclo vital dividido en dos fases diferentes: larva y adulto. Durante el desarrollo embrionario, que dura 24 horas aproximadamente, se establece el patrón corporal segmentado del animal. A continuación, tiene lugar la fase de vida larvaria en la que se distinguen tres estadios de desarrollo y durante la cual se producen dos mudas de las estructuras cuticulares. El 1^{er} estadio larvario tiene una duración de 24 horas y finaliza con la primera muda. El 2^o estadio larvario transcurre durante las siguientes 24 horas y, tras la segunda muda, comienza el 3^{er} estadio larvario de dos días de duración. La transición de larva a imago (adulto) se inicia con la pupación de la larva en torno al sexto día de

desarrollo. En este momento, *Drosophila* sufre un proceso de metamorfosis en el que se histolizan la mayoría de los tejidos larvarios y, a partir de los primordios o discos imaginales, se generan las estructuras que darán lugar a la mosca adulta. El imago emerge del pupario aproximadamente tres días después. El proceso de desarrollo de *D.melanogaster*, desde la formación del embrión hasta la eclosión del imago, tiene una duración aproximada de 9 días a 25°C (Figura 7) (Bodenstein 1994).

4.2. Vía de apoptosis en *Drosophila*

Numerosos estudios han demostrado que la mitocondria desempeña un papel esencial en el proceso de apoptosis en mamíferos (Ott et al. 2007). Sin embargo, a pesar de que la mayoría de las proteínas implicadas en muerte celular programada están estrictamente conservadas a lo largo de la evolución de los metazoos, la importancia de la mitocondria en la apoptosis de *Drosophila* es un área de controversia y activa investigación (Krieser and White 2009). Resultados previos de nuestro grupo (Adan et al. 2008; Lefai et al. 2000b) muestran que una disfunción mitocondrial asociada a defectos de la replicación y expresión del ADNmt inducen el proceso de apoptosis, lo que sugieren que la vía intrínseca de apoptosis mediada por la mitocondria es activa en *Drosophila*, pudiendo desempeñar un papel importante en numerosos procesos fisiopatológicos.

De un modo similar a lo que sucede en vertebrados, la regulación de la apoptosis en *Drosophila* es altamente dinámica e implica una gran variedad de estímulos que se originan tanto en la propia célula como en el ambiente que las rodea. Estos estímulos incluyen muchas señales diferentes, diversas formas de estrés celular o daño en el ADN, especies reactivas de oxígeno y defectos en la diferenciación y especificación celular (Steller 2008).

Drosophila posee todas las proteínas canónicas del apoptosoma, incluyendo ortólogos de APAF-1, Caspasa-9 y Citocromo C, cuya función es similar a la descrita en células de mamíferos para activar las caspasas efectoras (Salvesen and Abrams 2004). Además, existen mecanismos eficientes que previenen la activación no deseada de las caspasas. Una familia importante de inhibidores de caspasas son las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs), las cuales pueden unirse a éstas, e inhibirlas. Estas proteínas se caracterizan por la presencia de al menos un dominio BIR (baculovirus inhibitory repeat), el cual es capaz de unirse directamente a las caspasas. En *Drosophila*, Diap1 es esencial para prevenir la inapropiada activación de las caspasas y la apoptosis ubicua (S. L. Wang et al. 1999). Diap1 funciona como una E3-ubiquitin ligasa, y tiene como diana el ortólogo de la caspasa-9 en *Drosophila* (Dronc), la cual es señalizada para su degradación.

Por el contrario, la familia de las proteínas Reaper, entre las que se incluyen Reaper, Grim y Hid, son las encargadas de inducir apoptosis bajo condiciones específicas. Estos tres genes son transcripcionalmente activados en respuesta a diferentes señales pro-apoptóticas, incluidas las hormonas esteroideas, una variedad de señales del desarrollo, radiación o diversas formas de estrés o daño celular (Steller 2008). Además, Reaper puede estimular la actividad ubiquitin-ligasa intrínseca de las IAPs para promover su auto-ubiquitinación y degradación (Ryoo et al. 2002). Uno de los mecanismos por los que diferentes vías de señalización convergen en *Drosophila*, es a través de la activación transcripcional de Reaper, Grim y Hid. Por ello, parece que la familia de proteínas Reaper en *Drosophila* sirve de vínculo para conectar diferentes señales con el núcleo del programa de muerte celular (Kornbluth and White 2005).

La inactivación de Diap-1 no sólo desemboca en la activación de las caspasas y muerte celular, sino que también es capaz de promover de forma indirecta la regeneración de los tejidos en *Drosophila*, compensando la masiva pérdida de células en respuesta a daño o estrés, mediante un fenómeno denominado proliferación compensatoria (Fan and Bergmann 2008). En una serie de estudios se ha observado que las células apoptóticas estimulan la regeneración del tejido por la secreción de mitógenos que promueven la proliferación de las células vecinas (Figura 8) (Ryoo et al. 2004).

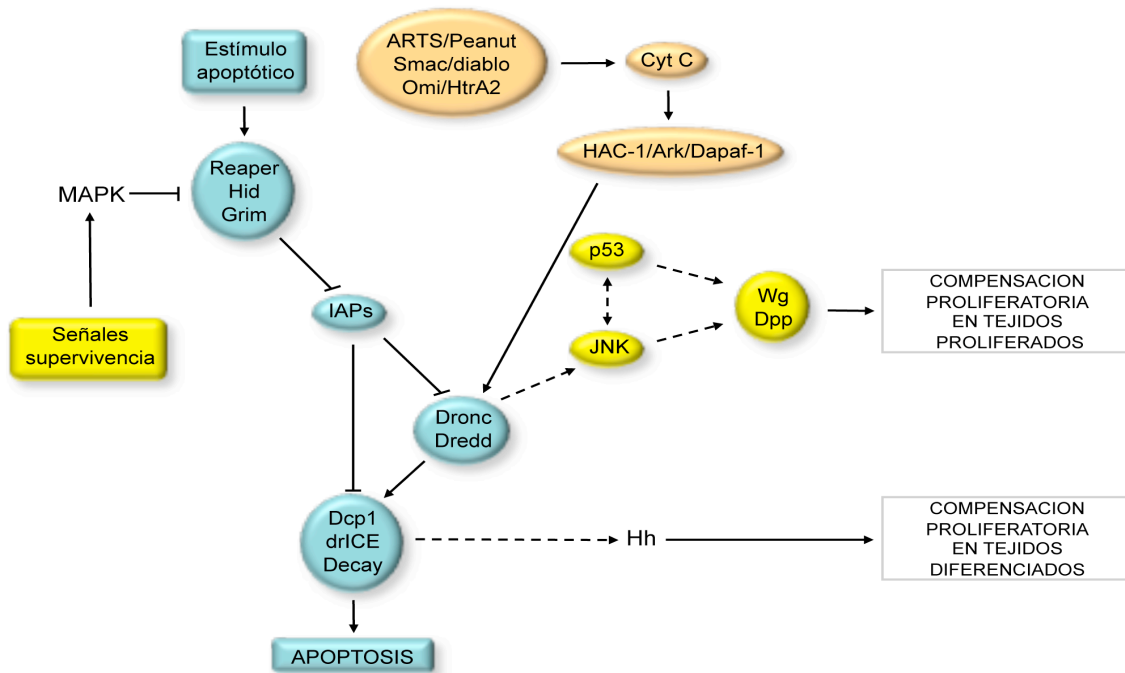


Figura 8. Vía de apoptosis en *Drosophila melanogaster*. Se muestran las rutas implicadas en la regulación de la apoptosis (azul y naranja) entre las que se incluyen las señales de supervivencia (amarillo) y la respuesta proliferativa de los tejidos.

4.3. *Drosophila melanogaster* como sistema modelo

Los primeros estudios sobre Genética en los que se utilizó *D.melanogaster* como modelo animal se remontan al año 1909. Morgan y su grupo escogieron este sistema como modelo por tratarse de un organismo muy prolífico, de ciclo vital corto, con una organización cromosómica sencilla y cuyo cultivo resultaba fácil y de escaso coste económico (Echalier 1997). Durante el siglo XX se han puesto a punto un gran número de técnicas genéticas y moleculares que han permitido estudiar en detalle procesos biológicos complejos utilizando *Drosophila* como modelo (Venken and Bellen 2005). La sistematización de las técnicas de transformación mediada por elementos P (Spradling and Rubin 1982) ha permitido la generación de una larga colección de mutantes que se encuentran disponibles en el *Drosophila* Bloomington Stock Center (<http://flystocks.bio.indiana.edu>). En la década de los 90, se desarrolló una potente herramienta experimental basada en el sistema UAS-GAL4 de levadura para estudiar *in vivo* la función de genes de interés (Brand and Perrimon 1993). Aunque originalmente fue ideado para generar fenotipos de ganancia de función mediante la

sobreexpresión del gen sujeto a estudio, la lista de aplicaciones del sistema UAS-GAL4 se ha diversificado enormemente en los últimos años (Duffy 2002).

Drosophila proporciona un poderoso modelo para estudiar procesos biológicos complejos ya que es fácilmente manipulable a nivel genético, bioquímico, molecular y fisiológico. Recientemente se ha completado la secuenciación del genoma de doce especies de *Drosophila* (<http://flybase.bio.indiana.edu/>), lo que permite estudios de genómica comparada de enorme utilidad en la identificación de genes ortólogos implicados en enfermedades humanas, despertando el interés en utilizar *Drosophila* para comprender las bases moleculares de numerosas enfermedades y para descubrir nuevas terapias. Las enfermedades mitocondriales están asociadas con un amplio rango de síntomas clínicos, especialmente aquellos que cursan con procesos neurodegenerativos. Uno de los principales retos para entender la fisiopatología de estas enfermedades es generar modelos animales que reproduzcan la variedad de síntomas asociados con este complejo grupo de patologías humanas (Sanchez-Martinez et al. 2006).

4.3.1. Reemplazamiento génico por Recombinación Homóloga

A pesar de estos avances, el estudio de mutaciones específicas asociadas a enfermedades humanas, ha sido frenado por la falta de técnicas de sustitución génica, una de las mayores limitaciones de *Drosophila* como sistema modelo. El grupo de Golic y colaboradores ha solventado este inconveniente con el desarrollo de un método eficiente basado en la recombinación homóloga (Rong and Golic 2000). Con ello, cualquier locus endógeno puede ser reemplazado o delecionado mediante la expresión de una recombinasa y una nucleasa específica, aprovechando que las roturas de doble hebra en *Drosophila* son recombinogénicas. Existen dos técnicas que utilizan la recombinación homóloga para el reemplazamiento de genes, “Ends-in” y “Ends-out”. Estos sistemas tienen eficiencias similares pero presentan diferentes ventajas e inconvenientes.

4.3.1.1. Ends-in

Esta aproximación introduce primero una versión del gen diana con una mutación de interés en tándem con el alelo endógeno, siendo posteriormente eliminada una de las dos copias dejando sólo la versión mutada o silvestre en el cromosoma. La mayor ventaja de esta técnica es que se recuperan los alelos intactos que portan la mutación deseada.

4.3.1.2. Ends-out

Esta aproximación experimental es la más utilizada en ratón. Se diferencia del Ends-in en que la construcción donadora y las posiciones específicas para las endonucleasas son distintas. El proceso en general es similar a la sustitución por Ends-in. Dos de las ventajas de método End-out son por un lado que el gen diana se puede reemplazar sin la regeneración previa de la estructura en tándem, y por otro que la generación del knock-in o knock-out tiene lugar en un solo paso. La desventaja de esta técnica es que el producto final deja secuencias exógenas en el locus diana, usualmente el gen marcador.

Objetivos

En los últimos años se ha producido un importante cambio en nuestra visión de la mitocondria al identificarse que, además de su esencial función metabólica, es una organela muy dinámica que desempeña un importante papel en procesos como la señalización mediada por radicales libres de oxígeno y calcio y la regulación de la muerte celular programada.

Las enfermedades mitocondriales agrupan a una amplia variedad de manifestaciones clínicas que tienen como nexo de unión una disfunción del proceso de fosforilación oxidativa que conduce a un defecto en la síntesis de ATP. Son genética, bioquímica y molecularmente heterogéneas y su fisiopatología es prácticamente desconocida, en parte por la falta de sistemas modelo adecuados.

Dentro de este contexto, el objetivo general del trabajo se enmarca en el interés de nuestro laboratorio en estudiar diferentes aspectos de la fisiopatología de la biogénesis mitocondrial, y específicamente en establecer *Drosophila melanogaster* como sistema modelo para el estudio de enfermedades mitocondriales humanas con dos líneas complementarias, i) caracterizar la fisiopatología de los defectos de comunicación intergenómica, ii) desarrollar nuevas técnicas que permitan la expresión a niveles fisiológicos de genes mitocondriales con mutaciones identificadas como patógenas en sus ortólogos humanos.

Dentro de este interés general, los objetivos concretos planteados en este trabajo han sido:

- Desarrollar en *Drosophila* un modelo de patología mitocondrial asociado a mutaciones en el gen que codifica la helicasa mitocondrial (*Twinkle*), mediante su sobreexpresión utilizando el sistema UAS-GAL4.
- Desarrollar en *Drosophila* un modelo de patología mitocondrial asociado a mutaciones en la subunidad catalítica de la ADN polimerasa γ utilizando la tecnología de recombinación homóloga y la sobreexpresión inducible por hormona.

_____Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1. Reactivos, soluciones y tampones

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico o de grado apto para las técnicas de Biología Molecular. La composición de las soluciones y tampones empleados en los distintos experimentos se especifica en la descripción de los métodos o, en su defecto, en la bibliografía correspondiente.

1.2. *Drosophila melanogaster*

1.2.1. Condiciones estándar de cultivo de *Drosophila*

Las moscas se cultivaron en un medio compuesto de 10% de levadura, 7,5% de azúcar, 3,5% de harina de trigo, utilizando 0,6% de ácido propiónico como antimicótico y 1,25% de agar para solidificar el medio.

Para los estudios realizados en este trabajo las moscas se han crecido en una cámara de 25°C de temperatura y un 60% de humedad relativa, bajo un ciclo de 12 horas luz – 12 horas oscuridad. Otras condiciones de temperatura usadas se detallan en el apartado 1.2.2.

1.2.2. Modificaciones de la temperatura

Cultivo a 18°C. Las moscas se crecieron en una cámara de 18°C de temperatura y un 60% de humedad relativa bajo un ciclo de 12 horas luz – 12 horas oscuridad.

Cultivo a 29°C. Las moscas se crecieron en un estufa a 29°C de temperatura que contenía un recipiente con agua para mantener la humedad en el ambiente.

Choque térmico a 38°C. Los viales con embriones y larvas de primer estadio (0-72 horas de desarrollo) se introdujeron en un baño de agua durante 1 hora previamente equilibrado a 38°C.

Choque térmico a 36°C. Los viales con embriones y larvas de primer estadio (0-72 horas de desarrollo) se introdujeron en un baño de agua durante 1 hora previamente equilibrado a 36°C.

Choque térmico a 37°C. Los viales con embriones de 0-24 horas de desarrollo, se introdujeron en un baño de agua durante 10 minutos previamente equilibrado a 37°C.

1.2.3. Líneas de *Drosophila melanogaster*

Las líneas de *Drosophila melanogaster* empleadas en el desarrollo de este trabajo se describen en las tablas 1.2.3.1-4.

1.2.3.1. Cepas control y balanceadoras.

Nombre	Genotipo	Origen	Referencia	Observaciones
yellow white	<i>y,w;;</i>	R. Garesse		Línea control
<i>w¹¹¹⁸</i>	<i>w¹;;</i>	R. Garesse		Parental de líneas transgénicas
Doble balanceada-doble marcada	<i>w; Cyo/If; TM6,Tb/MKRS</i>	R. Garesse		Utilizada en el mapeo de los elementos P en las líneas transgénicas generadas

1.2.3.2. Líneas trans-activadoras GAL4.

Nombre	Genotipo	Origen	Referencia	Observaciones
<i>daughterless-GAL4</i>	<i>w¹¹¹⁸;; P{da-GAL4.w-}3</i>	Bloomington Stock Centre n° 8641	FlyBase, (1992-)	Activador ubicuo y constitutivo
<i>act5C-GAL4</i>	<i>y1 w*;; P{Act5C-GAL4}17bFO1/TM6B, Tb1</i>	Bloomington Stock Centre n° 3954	FlyBase, (1992-)	Activador ubicuo y constitutivo
<i>engrailed-GAL4</i>	<i>w;en-GAL4 UAS GFP/Cyo</i>	Ernesto Sánchez-Herrero		Activador específico de compartimento posterior
<i>mef2-GAL4</i>	<i>w;mef2-GAL4</i>	Mar Ruiz Gómez		Activador específico de músculo
1151	<i>crc1 cn1/crc1 cn1/Dp(2;f)B1</i>	Mar Ruiz Gómez		Activador específico de músculo
<i>hs-flp act5C-GAL4</i>	<i>yw hs-flp;act>y>GAL4 UAS GFP/SM5-TM6,Tb/TM2</i>	Ernesto Sánchez-Herrero		Activador ubicuo para la generación de clones simples
GS216	<i>yw hsFLP122 tubgal4UASGFP-nls/FM7;FRT42D tubgal80^{ts}/Cyo</i>	Manuel Calleja		Activador ubicuo para la generación de clones gemelos
<i>MHC-Switch-GAL4</i>	<i>Yw;Sp/Cyo,ftz-lacZ;MHC-GeneSwitch</i>	Haig Keshishian	(Osterwalder et al. 2001)	Activador inducible por la hormona RU486 específico de músculo
<i>eyeless-GAL4</i>	<i>w;eyeless-GAL4</i>	Manuel Calleja		Activador específico de ojo

1.2.3.3. Líneas transgénicas generadas y efectoras UAS.

Nombre	Genotipo	Origen	Referencia	Observaciones
UAS - WT	w;;UAS-helicasa WT/(TM3,Sb) w;UAS-helicasa WT/(Cyo)	Esta tesis	Esta tesis	mtHelicasa de <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i> silvestre
UAS - 388	w;;UAS-helicasa 388/(TM3,Sb) w;UAS-helicasa 388/(Cyo)	Esta tesis	Esta tesis	mtHelicasa de <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i> con la mutación puntual K388A
UAS - 441	w;;UAS-helicasa 441/(TM3,Sb) w;UAS-helicasa 441/(Cyo)	Esta tesis	Esta tesis	mtHelicasa de <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i> con la mutación puntual W441C
UAS - 442	w;;UAS-helicasa 442/(TM3,Sb) w;UAS-helicasa 442/(Cyo);	Esta tesis	Esta tesis	mtHelicasa de <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i> con la mutación puntual A442P
pTV2-30.1	w;;30.1	Esta tesis	Esta tesis	Línea portadora del gen POLG1 sin actividad correctora (exo ⁻)
pTV2-40.1	w;;40.1/TM6,Tb	Esta tesis	Esta tesis	Línea portadora del gen POLG1 sin actividad correctora (exo ⁻)
UAS-GFP	w;UAS-GFP-nls	Manuel Calleja		Proteína verde fluorescente nuclear
UAS-Diap1	w; P{UAS Diap1 mw ⁺ }/ CyO;	Manuel Calleja		Inhibidor de proteínas apoptóticas
UAS-ARNi Dronc	w;UAS-ARNi Dronc	Manuel Calleja		ARN interferente de caspasa iniciadora
UAS-ARNi Drice	w;UAS-ARNi Drice	Manuel Calleja		ARN interferente de caspasa efectora
UAS-POLG	w;;UAS-POLG/TM6B,tb,Hu	Rafael Garesse	(Lefai et al. 2000b)	Subunidad catalítica de la POLG
UAS-POLG ^{exo-}	w;;UAS-POLG ^{exo-} /TM6B, tb, Hu	Rafael Garesse	(Lefai et al. 2000b)	Subunidad catalítica de la POLG sin actividad correctora (exo ⁻)
FRT-Helicasa	W;FRTh7Darmz/Cyo;UAS- Helicasa	Esta tesis		Líneas FRT-Helicasa para la generación de clones gemelos

1.2.3.4. Líneas de reemplazamiento de genes para generar un knock-in.

Nombre	Genotipo	Origen	Referencia	Observaciones
6935	<i>y[1] w[*]; P{70FLP}23 P{70I-SceI}4A/TM6</i>	Bloomington Stock Centre nº 6935	(Rong and Golic 2000)	Proteína de reconocimiento de sitios FRT (FLP) y endonucleasa de restricción (SceI)
6937	<i>w[1118]; P{hs-I- Crel.R}1A Sb[1]/TM6</i>	Bloomington Stock Centre nº 6937	(Rong and Golic 2000)	Endonucleasa de restricción (Crel)
6938	<i>w[1118]; P{70FLP}10</i>	Bloomington Stock Centre nº 6938	(Rong and Golic 2000)	Proteína de reconocimiento de sitios FRT (FLP)

1.3. Cepas bacterianas

Para la transformación y amplificación de plásmidos se ha utilizado la cepa de *E. coli* DH5 α (Sambrook 2001).

1.4. Vectores

- pGEMT-Easy (Promega). Utilizado para el clonaje y la amplificación de productos de PCR.
- pMT/Hy. Contiene el promotor del gen metalotioneína inducible por Cu²⁺.
- pBluescript II SK(+). Utilizado para el subclonaje y la amplificación de fragmentos genómicos.
- pPUAST (Brand and Perrimon 1993). Contiene elementos P, el gen de selección *white* y un promotor basal precedido de elementos UAS delante de un sitio múltiple de clonaje. Permite la expresión del inserto clonado bajo el control del sistema UAS-GAL4. Utilizado en la transformación de *Drosophila* para el análisis *in vivo* de la función del gen de la helicasa mitocondrial con y sin mutaciones puntuales.
- pTV2. Contiene elementos P que permiten su inserción en el genoma, sitios FRT, el gen de selección *white*, una diana para la enzima de restricción Crel y una diana NotI para el clonaje, elementos necesarios para llevar a cabo la técnica de sustitución alélica por recombinación homóloga.

1.5. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por las empresas Isogen (Holanda) y Sigma. En la tabla 1.5.1. se especifica el nombre, la secuencia en dirección 5'→3', la aplicación para la que fueron diseñados, su temperatura de fusión y la referencia.

1.5.1. Oligonucleótidos empleados

Nombre	Secuencia	Aplicación	Tm	Referencia
Polga Dir	CAGCTGCCGAAGCGTCCGAA	Secuenciación de las mutaciones del gen <i>POLGA</i> Dir y RFLP	56°C	Esta tesis
Polga Rev	TCACTCCACTGACACACATGTG	Secuenciación de las mutaciones del gen <i>POLGA</i> Rev y RFLP	56°C	Esta tesis
Dm mt genome A Dir	GCTGGAATTGCTCATGGTGA	Long PCR ADNmt Dir	64°C	(Yui et al. 2003)
Dm mt genome A Rev	AGGGTGATTTGAGTGTGTAGAC	Long PCR ADNmt Rev	64°C	(Yui et al. 2003)
Dm mt genome B Dir	GTCTACACACTCAAATCACCT	Long PCR ADNmt Dir	64°C	(Yui et al. 2003)
Dm mt genome B Rev	TAGGGTGAGATGGTTTAGGACT	Long PCR ADNmt Rev	64°C	(Yui et al. 2003)
Dm mt genome C Dir	TGTGAATAATAGCCCCAGCACA	Long PCR ADNmt Dir	64°C	(Yui et al. 2003)
Dm mt genome C Rev	GTTGAATATGGGCAGGTGTTAC	Long PCR ADNmt Rev	64°C	(Yui et al. 2003)
Dm mt genome D Dir	GTAACACCTGCCATATTCAAC	Long PCR ADNmt Dir	64°C	(Yui et al. 2003)
Dm mt genome D Rev	GCCAGCAGTCGCGGTTATAC	Long PCR ADNmt Rev	64°C	(Yui et al. 2003)
Helicasa Dir	ATGAGACGCGCCGGTTAAT	mtHelicase Dir	60°C	Esta tesis
Helicasa Rev	TCAGTTCTCGGATGGCGTCT	mtHelicase Rev	62°C	Esta tesis
pUAST Dir	CCAATTATGTCACACCACAGA	Secuenciación clones helicasa	58°C	Esta tesis
pUAST Rev	CTGCAACTACTGAAATCTGCC	Secuenciación clones helicasa	62°C	Esta tesis
1659	ACACACGGAACACGAATGCTCG	Sonda cluster histonas Dir	68°C	Esta tesis
1660	AGCGAAGCCAAAGCCTGTAGTAGC	Sonda cluster histonas Rev	70°C	Esta tesis
Polgb-gatc Dir	AAACTACCACCTGCGCTCTG	Sonda <i>POLGB</i> Dir	62°C	Esta tesis
Polgb-gatc Rev	AAAGATCAGACAAGTCAGCAGA	Sonda <i>POLGB</i> Rev	62°C	Esta tesis

1.6. Clones

Las siguientes construcciones fueron diseñadas y preparadas en el laboratorio de la Dra. L. Kaguni en East Lansing University (Michigan, EE.UU.):

- pMT/Hy-*helicasa* WT. Contiene el ADNc completo de la mtHelicasa de *Drosophila melanogaster*, amplificado por PCR y clonado en las dianas XhoI y SpeI del vector pMT/Hy.
- pMT/Hy-*helicasa* 388. Contiene el ADNc completo de la mtHelicasa de *Drosophila melanogaster* con la mutación puntual K388A, amplificado por PCR y clonado en las dianas XhoI y SpeI del vector pMT/Hy.
- pMT/Hy-*helicasa* 441. Contiene el ADNc completo de la mtHelicasa de *Drosophila melanogaster* con la mutación puntual W441C, amplificado por PCR y clonado en las dianas XhoI y SpeI del vector pMT/Hy.
- pMT/Hy-*helicasa* 442. Contiene el ADNc completo de la mtHelicasa de *Drosophila melanogaster* con la mutación puntual A442P, amplificado por PCR y clonado en las dianas XhoI y SpeI del vector pMT/Hy.
- pTV2-exo. Contiene una región genómica de 12 kb del genoma de *Drosophila melanogaster* con los genes *RPII33*, *POLGB-GatC*, *ORC5*, *SOP2/ARC41* y *POLGA* con dos mutaciones puntuales, D185A y D263A que eliminan la actividad correctora de la enzima (exonucleasa 3'→5'), clonada en la diana NotI del vector pTV2.
- pTV2-2.1-poly- α . Contiene una región genómica de 12 kb del genoma de *Drosophila melanogaster* con los genes *RPII33*, *POLGB-GatC*, *ORC5*, *SOP2/ARC41* y *POLGA* con una mutación puntual, F578A causante de patología mitocondrial en humanos, clonada en la diana NotI del vector pTV2.
- pTV2-2.2-poly- α/β . Contiene una región genómica de 12 kb del genoma de *Drosophila melanogaster* con los genes *RPII33*, *POLGB-GatC* con las mutaciones puntuales T312P-D313A-G316A, *ORC5*, *SOP2/ARC41* y *POLGA* con una mutación puntual, Y873C, causante de patología mitocondrial en humanos, clonada en la diana NotI del vector pTV2.
- pTV2-2.3-poly- α/β Contiene una región genómica de 12 kb del genoma de *Drosophila melanogaster* con los genes *RPII33*, *POLGB-GatC* con la mutación puntual D313A, *ORC5*, *SOP2/ARC41* y *POLGA* con la mutación puntual Y869F, D185A y D263A causante de patología mitocondrial en humanos, clonada en la diana NotI del vector pTV2.

Las siguientes construcciones fueron diseñadas y preparadas en el presente trabajo:

- pPUAST-WT. Contiene el ADNc completo de la mtHelicasa de *Drosophila melanogaster*, amplificado por PCR a partir del clon pMT/Hy-*helicasa* WT con los oligos Helicasa Dir y Helicasa Rev, y clonado en la orientación adecuada en la diana NotI del vector pPUAST.
- pPUAST-388. Contiene el ADNc completo de la mtHelicasa de *Drosophila melanogaster* con la mutación puntual K388A en el dominio helicasa, que inhibe la actividad de la enzima. Fue amplificado por PCR a partir del clon pMT/Hy-*helicasa* 388 con los oligos Helicasa Dir y Helicasa Rev, y clonado en la orientación adecuada en la diana NotI del vector pPUAST.
- pPUAST-441. Contiene el ADNc completo de la mtHelicasa de *Drosophila melanogaster* con la mutación puntual W441C, ortóloga a una mutación causante de adPEO en humanos. Fue amplificado por PCR a partir del clon pMT/Hy-*helicasa* 441 con los oligos Helicasa Dir y Helicasa Rev, y clonado en la orientación adecuada en la diana NotI del vector pPUAST.

- pPUAST-442. Contiene el ADNc completo de la mtHelicasa de *Drosophila melanogaster* con la mutación puntual A442P, ortóloga a una mutación causante de adPEO en humanos. Fue amplificado por PCR a partir del clon pMT/Hy-helicasa 442 con los oligos Helicasa Dir y Helicasa Rev, y clonado en la orientación adecuada en la diana NotI del vector pPUAST.

1.7. Sondas

- POLGB – GATC. Fragmento que contiene los genes *POLGB* y *GatC*, ambos codificados en un bicistrón en el genoma nuclear. Se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando como molde ADN genómico de *Drosophila melanogaster* y los oligonucleótidos Polgb-gatc Dir y Polgb-gatc Rev.
- Histonas. Fragmento que contiene una región del “cluster” de histonas. Se obtuvo por amplificación por PCR utilizando como molde ADN genómico de *Drosophila melanogaster* y los oligonucleótidos 1659 y 1660.
- MIT H: Contiene los genes ND2, COI, COII y ATP 6/8 del ADNmt de *D. melanogaster* clonado en la diana HindIII del vector pBluescript II SK(+).
- MIT B. Contiene los genes ND5, ND4, ND4L, ND6 y CytB del ADNmt de *D. melanogaster* clonado en la diana EcoRI del vector pBluescript II SK(+).
- MIT D. Contiene los genes ND1 y IrRNA del ADNmt de *D. melanogaster* clonado en la diana EcoRI del vector pBluescript II SK(+).

1.8. Radioisótopos

El nucleótido radiactivo [α - 32 P]dCTP (Amersham) se utilizó en el marcaje de sondas.

1.9. Anticuerpos

- Anti- β -ATPasa. Generado en conejo contra la proteína β -ATPasa de *Drosophila*. Utilizado en inmunotransferencias, dilución 1:1000. Obtenido en el laboratorio del Dr. R. Garesse.
- Anti-caspasa 3 (Cell Signalling). Obtenido en conejo. Utilizado en inmunohistoquímica, dilución 1:50.
- Anti-histona deacetylase 3/anti-fosfohistona 3 (Sigma). Obtenido en conejo. Utilizado en inmunohistoquímica, dilución 1:200.
- Anti-POLG. Generado en conejo contra la proteína POLG α de *Drosophila*. Utilizado en inmunotransferencias, dilución 1:1000. Obtenido en el laboratorio de la Dra. L. Kaguni.
- Anti-mtHelicasa. Generado en conejo contra la proteína mtHelicasa de *Drosophila*. Utilizado en inmunotransferencias, dilución 1:1000. Obtenido en el laboratorio de la Dra. L. Kaguni.
- GAR (Nordic). Anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa. Obtenido en cabra. Utilizado como anticuerpo secundario en inmunotransferencias, dilución 1:5000.
- GAM (Santa Cruz Biotechnology). Anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa. Obtenido en cabra. Utilizado como anticuerpo secundario en inmunotransferencias, dilución 1:5000.

- Anti-IgG de conejo acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 647 (Invitrogen). Utilizado como anticuerpo secundario en inmunohistoquímica, dilución 1:200. Emisión en azul.
- Anti-IgG de ratón acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 555 (Invitrogen). Utilizado como anticuerpo secundario en inmunohistoquímica, dilución 1:200. Emisión en rojo.
- Anti-IgG de conejo acoplado al fluorocromo FITC (Jackson ImmunoResearch). Utilizado como anticuerpo secundario en inmunohistoquímica, dilución 1:200. Emisión en verde.

1.10. Fluoróforos

- TO-PRO-3 iodide. Utilizado para teñir ácidos nucleicos. Intercalante de ADN de doble hebra acoplado a un fluoróforo, dilución 1:500. Emisión en azul.
- Phalloidin-TRITC. Utilizado para teñir contorno celular. Proteína de unión específica a filamentos de actina acoplado a un fluoróforo, dilución 1:500. Emisión en rojo.

2. Métodos

Las técnicas básicas de biología molecular, las técnicas electroforéticas aplicadas al análisis de ácidos nucleicos y proteínas, los cultivos bacterianos, etc., se realizaron según describen Sambrook y colaboradores (Sambrook 2001) o de acuerdo con los protocolos especificados en las citas correspondientes.

2.1. Clonajes

Las reacciones de PCR se realizaron con la enzima PLATINUM Pfx DNA polymerase con actividad correctora (Invitrogen) cuando los fragmentos de ADN a clonar tenían un tamaño superior a 2 kb. En el resto de los casos se utilizaron ADN polimerasas termorresistentes de distintas casas comerciales (Eppendorf, Finnzymes o Biotools).

Las enzimas de restricción necesarias para los clonajes se emplearon siguiendo las recomendaciones indicadas por las casas comerciales (Invitrogen, Roche, New England Biolabs). Para las reacciones de ligación de fragmentos de ADN se utilizaron indistintamente la enzima T4 DNA ligase (Promega) o el kit Quick Ligation (New England Biolabs).

2.2. Aislamiento de ácidos nucleicos

2.2.1. Aislamiento de ARN de *D. melanogaster*

El ARN total fue obtenido con el reactivo TRIzol Reagent (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante, usualmente a partir de larvas de tercer estadio. Todo el material y las soluciones utilizadas para trabajar con ARN se trataron con 0.1% DEPC. La concentración de ARN se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de la disolución a una longitud de onda de 260nm.

2.2.2. Aislamiento de ADN

2.2.2.1. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*

Para la obtención de pequeñas cantidades de ADN de plásmidos se partió de 3ml de cultivo líquido y el ADN se extrajo utilizando el kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega). Para obtener ADN plasmídico a gran escala se partió de 250ml de cultivo líquido y la extracción de ADN se realizó con el kit QIAGEN Plasmid Maxi (QIAGEN).

2.2.2.2. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

La purificación de ADN de geles de agarosa se realizó con el kit QIAEX II Gel Extraction (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.2.3. Aislamiento de ADN genómico de *D. melanogaster*

El ADN genómico fue obtenido a partir de larvas y adultos de tiempo de desarrollo conocido. Se homogenizaron 10-50 larvas o adultos en 10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM EDTA, 60mM NaCl y 0.5% SDS. Tras eliminar los restos celulares por centrifugación (10000xg 5min), la solución fue fenolizada y tratada con 10µg/ml de enzima RNAsa A durante 15 min a 37°C. La solución se fenolizó de nuevo, el ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol (EtOH) 100%, NaAc 0.3M y se lavó con 80% EtOH. El ADN se resuspendió en H₂O y se cuantificó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de la disolución a una longitud de onda de 260nm.

Para la preparación del ADN genómico a partir de una única mosca se utilizó el método descrito por Gloor (Gloor et al. 1993). Se homogeneizó la mosca durante 5-10 segundos en un tubo eppendorf de 0,5 ml en 50 µl de 10 mM Tris-HCl pH 8,2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl y 200 µg/ml proteinasa K. El homogenado se incubó 30 min a temperatura ambiente y posteriormente a 95°C 2 min para inactivar la proteinasa K. Posteriormente se eliminaron los restos de tejidos por centrifugación 1min a 10.000xg, recogiendo tras este paso el sobrenadante.

2.3. Secuenciación de ácidos nucleicos y análisis de secuencias

La secuenciación de los distintos fragmentos de ADN se realizó utilizando el método de secuenciación automática (ABI 3719) en geles desnaturalizantes de acrilamida/bis en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM, (Madrid). El análisis y alineamiento de las secuencias y la generación de mapas de restricción, se realizaron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 5.0.9 (Hall 1999) y Vector NTI versión 9.0.0 (InforMax). Las comparaciones de secuencias con las bases de datos del NCBI y FlyBase se realizaron con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.4. Obtención de proteínas

2.4.1. Preparación de extractos de proteína total de *D. melanogaster*

Las larvas o adultos de *D. melanogaster* fueron homogenizadas utilizando homogenizadores vidrio-teflón en el volumen adecuado (usualmente 200-500µL) de tampón RIPA (1% Nonidet P40, 0,5% Deoxicolato de sodio, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8) al que se le habían añadido previamente inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, SIGMA). Tras incubar 15 minutos en hielo, los extractos se centrifugaron a 16000xg durante 3 minutos a 4°C. La

concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad).

2.4.2. Preparación de proteínas mitocondriales de larvas

2.4.2.1. Obtención de proteínas mitocondriales para inmunodetección

Los extractos de proteínas mitocondriales se obtuvieron a partir de mitocondrias purificadas parcialmente por centrifugación diferencial. Para ello, las larvas de 3^{er} estadio se homogenizaron mecánicamente con 4 pases de émbolo utilizando homogenizadores de vidrio-teflón y el tampón 20mM Tris-HCl pH8, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 0.5mM EDTA, 0,25M sacarosa, 1mM DTT, 1mM PMSF en una proporción 20µl tampón/larva. Los homogenizados se centrifugaron a 800xg durante 10min a 4°C. Para obtener las mitocondrias, los sobrenadantes se centrifugaron a 7500xg 10min 4°C, se lavaron una vez y se resuspendieron suavemente en tampón de homogenización. La concentración final de proteínas mitocondriales en los extractos se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad).

2.4.2.2. Obtención de proteínas mitocondriales para medidas de la actividad de la cadena respiratoria

Aproximadamente 50 mg de larvas de 3^{er} estadio se homogeneizaron mecánicamente con 5 pases de émbolo en 800µl de tampón SETH (250mM sacarosa, 2mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH7.4, 100U/L heparina) utilizando homogenizadores de vidrio-teflón. El homogenado se centrifugó a 800xg durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se centrifugó una segunda vez a 7500xg durante 10min a 4°C. El pellet obtenido, que corresponde a la fracción mitocondrial, se lavó y se resuspendió en 200µl de tampón SETH pipeteando suavemente. Las mitocondrias se sonicaron durante 6 seg a intensidad media. La concentración final de proteínas mitocondriales en los extractos se determinó utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad).

2.5. Generación de líneas transgénicas

Las líneas transgénicas se generaron a partir de embriones yw utilizando la técnica de transformación mediada por elementos P descrita inicialmente por Spradling y Rubin (Spradling and Rubin 1982) con ligeras modificaciones. Los embriones de 45min AED se microinyectaron de forma independiente con una solución que contenía 0.6µg/µl de la construcción pTV2-30.1 y pTV2-40.1 y 0.2µg/µl del plásmido pUChsπΔ2-3, que codifica la transposasa necesaria para la inserción. Los embriones que llegaron a la etapa adulta se cruzaron con moscas yw, seleccionando de esta descendencia las moscas transformantes por el color rojo de los ojos. Éstas se cruzaron entre ellas con el fin de obtener líneas homocigóticas y, para determinar el cromosoma de inserción, se realizaron dos cruces sucesivos con la línea balanceadora *w;CyO/If;TM6,Tb/MKRS*.

Las líneas transgénicas portadoras de los elementos P pUAST-helicasa en sus distintas versiones, se generaron en “Best Gene - Drosophila Embryo Injection Services” (<http://www.thebestgene.com>), siguiendo las instrucciones de la empresa.

2.6. Experimentos de sobreexpresión utilizando la estrategia UAS-GAL4

Para el análisis de las construcciones generadas durante esta tesis se utilizó el sistema UAS/GAL4 desarrollado por Brand y Perrimon (Brand and Perrimon 1993), que permite la expresión selectiva de los genes clonados en patrones específicos celulares, de tejido y/o temporales en *D. melanogaster*. Para ello se cruzaron las diferentes líneas activadoras GAL4, que expresan el factor de transcripción de levaduras GAL4 bajo el control de diferentes promotores (pudiendo dirigir así su expresión en diferentes tejidos y etapas del desarrollo) con las líneas transgénicas efectoras UAS, que portan el transgén que nos interesa expresar clonado en posición 3' de las secuencias UAS, a las que se une el factor GAL4. La descendencia expresará el transgén con el patrón que presente el factor de transcripción GAL4.

2.7. Sistema de expresión UAS-GAL4 inducible

Las líneas que expresan el activador transcripcional GeneSwitch-GAL4 con un patrón específico de tejido se cruzaron con las líneas UAS que portan el transgén que nos interesaba sobreexpresar (Figura 8). Los machos adultos emergentes de dicho cruce se transfirieron a tubos con comida que contenía la hormona mifepristona (RU486) (Sigma-Aldrich). Para ello, se preparó un stock de RU486 a 1mg/ml en etanol y se diluyó hasta una concentración final en la comida de 32µgr/ml. Los adultos se transfirieron a tubos nuevos en presencia de la hormona cada tres días.

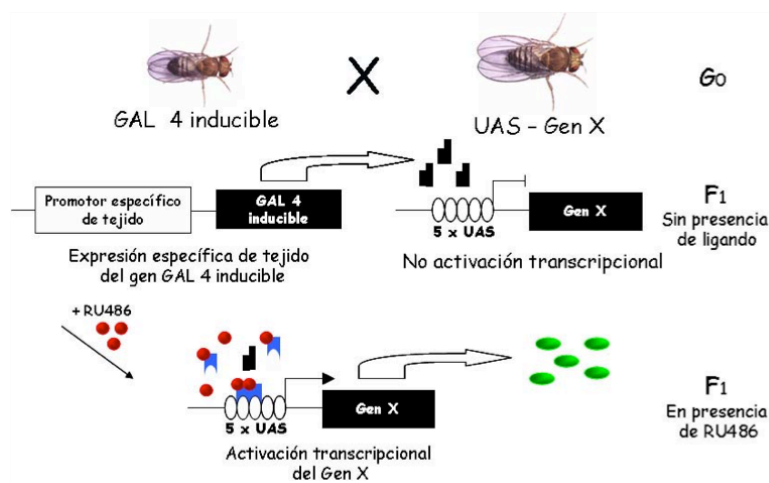


Figura 8. Sistema de expresión UAS-GAL4 inducible en *Drosophila*. Las líneas que expresan el activador transcripcional GeneSwitch en un tejido específico se cruzan con las líneas UAS efectoras que contienen el gen diana. En ausencia de la hormona RU486, la proteína GeneSwitch se expresa en los tejidos diana pero permanece transcripcionalmente silenciada (cajas negras), por lo que el gen diana no se expresa. Tras la aplicación sistémica de RU486

(rojo), la proteína GeneSwitch se activa (azul) por la unión a la hormona, mediando la expresión del gen diana sólo en aquellos tejidos donde se exprese el activador.

2.8. Cuantificación de los niveles de ARNm mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

La cuantificación relativa de los niveles de ARNm se realizaron por PCR a tiempo real usando un equipo 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). El ARN de las muestras fue extraído y cuantificado según protocolos descritos previamente (2.2.1). 2µgr de ARN total de cada muestra se retrotranscribieron utilizando el kit QuantiTect Reverse Transcription Kit

(QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación se realizó utilizando sondas Taqman marcadas con FAM para diversos genes implicados en biogénesis mitocondrial, diseñadas por Applied Biosystems. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron establecidas por el Servicio de Secuenciación y PCR a tiempo Real del instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM, (Madrid). Las curvas de calibración utilizadas para cuantificar el número de copias de ADNmt y ADNn se basaron en la relación lineal entre los puntos de corte de los ciclos y el logaritmo del número de copias inicial. En todos los casos se analizaron por triplicado al menos tres muestras independientes.

2.9. Cuantificación relativa del ADNmt mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

La cuantificación relativa del ADNmt respecto al ADNn se realizó por PCR a tiempo real usando un equipo 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). El ADN de las muestras fue extraído y cuantificado según protocolos descritos previamente (2.2). Para la detección del ADNn y del ADNmt se usaron sondas Taqman marcadas con FAM para el gen 18S y ND5 respectivamente diseñadas por Applied Biosystems. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron establecidas por el Servicio de Secuenciación y PCR a tiempo Real del instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM, (Madrid). Las curvas de calibración utilizadas para cuantificar el número de copias de ADNmt y ADNn se basaron en la relación lineal entre los puntos de corte de los ciclos y el logaritmo del número de copias inicial. En todos los casos se analizaron por triplicado al menos tres muestras independientes.

2.10. Marcaje de sondas radiactivas de ADN

Las sondas se marcaron con 25 μ Ci [α -³²P]dCTP utilizando el kit Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para purificar las sondas y eliminar los nucleótidos radiactivos no incorporados se emplearon las columnas de Sephadex G-50 NICK (Amersham).

2.11. Hibridación de ADN unidos a membrana (Southern Blot)

2.11.1. Determinación de la estructura genómica en líneas exo-

20 μ g de ADN de cada muestra se digirieron con las enzimas XbaI y BspHI (Invitrogen y New England Biolabs respectivamente) y los fragmentos resultantes se resolvieron en geles de agarosa/TAE al 0.8%. Antes de transferirlos, los geles se lavaron con H₂O desionizada, se incubaron en 0.25N HCl durante 15 minutos y finalmente se realizaron dos lavados de 30 minutos, el primero con 0.5N NaOH, 1,5M NaCl y posteriormente con una solución 0,5N Tris-HCl pH7,5, 1,5M NaCl. A continuación y siguiendo protocolos rutinarios (Sambrook 2001), se transfirieron mediante transferencia alcalina (NaOH 0,4M) a membranas de nylon Zeta-Probe (Bio-Rad) y se fijaron a las mismas mediante cross-linking con luz UV. Las membranas se prehibridaron durante al menos 2 horas a 65°C en tampón Z (170mM Na₂HPO₄, 79mM NaH₂PO₄, 7% SDS) y se hibridaron con la sonda correspondiente en las mismas condiciones durante al menos 14 horas. Las membranas se

lavaron dos veces en condiciones de baja selectividad (1X SSC, 0,1% SDS a 65°C 10 min) y una en condiciones de alta selectividad (0,1X SSC, 0.1% SDS a 65°C 10min) y, finalmente, se autorradiografiaron.

2.11.2. Cuantificación de ADNmt por Southern Blot

10µg de ADN de cada muestra se digirieron con la enzima XhoI (Invitrogen) y los fragmentos genómicos resultantes se resolvieron en geles de agarosa/TAE al 0.8%. El protocolo que se llevó a cabo es el mismo descrito en el apartado anterior.

2.12. Detección de mutaciones por PCR-RFLP en líneas knock-in

Para la amplificación del fragmento de ADN específico del gen POL γ - α que codifica el dominio exonucleasa de la enzima se usaron los oligonucleótidos Polga Dir y Polga Rev descritos previamente (Tabla 1.4.1). Una de las mutaciones puntuales introducidas que eliminan la actividad correctora de la ADN pol γ , D185A, introduce un sitio de corte para la enzima XhoI. El patrón de bandas resultante se muestra en la figura 9 para los casos de una línea portadora de la versión silvestre (WT) y una línea con la mutación en heterocigosis (HT) u homocigosis (HM):

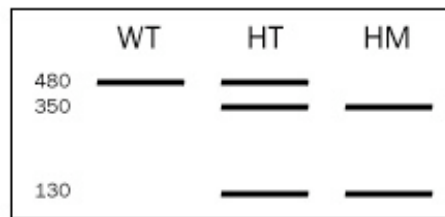


Fig. 9. Patrón de bandas de la digestión con XhoI para la detección de la mutación D185A.

2.13. Inmunodetección de proteínas unidas a membrana (Western Blot)

20µg de proteína mitocondrial de cada muestra se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% utilizando protocolos descritos previamente (Sambrook 2001), y fueron transferidas a membranas de PVDF (Millipore). Las membranas se preincubaron durante 1 hora en solución de bloqueo (1X TBS, 0.1% Tween 20, 5% leche desnatada en polvo) y, a continuación, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en las condiciones preestablecidas para cada uno de ellos en solución de bloqueo. Las membranas se lavaron cuatro veces con 1X TBS, 0.1% Tween 20 y se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo usando la dilución correspondiente. La membrana se lavó tres veces con 1X TBS, 0.1% Tween 20, y otras tres veces con 1X TBS. Como reactivo de revelado se utilizó el kit ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham).

2.14. Determinación de actividades enzimáticas

Todas las medidas se realizaron a partir de extractos de proteínas mitocondriales preparados como se ha descrito previamente (2.4.2.2).

2.14.1. Determinación de actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

La actividad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial fue medida mediante espectrofotometría, según técnicas descritas previamente (Perez-Carreras et al. 2003) con ligeras modificaciones, usando un espectrofotómetro UV-1603 (Shimadzu).

El complejo II (Succinato Deshidrogenasa) se determinó monitorizando la reducción del aceptor artificial de electrones 2,6-Diclorofenol-indofenol (DCPIP) a 600 nm. El medio de reacción contenía: succinato 32 mM, tampón fosfato 50 mM pH=7, KCN 1.5 mM, CoQ₁ 50 µM y DCPIP 0.1 mM.

El complejo III (Ubiquinona-Citocromo C oxidorreductasa) fue valorado según la aparición de Citocromo C reducido a 550 nm, en una mezcla de reacción que contenía tampón fosfato 50 mM pH=7.5, NaN₃ 2 mM, BSA-EDTA 0.1 %, citocromo C 1 mM y decilubiquinol (DBH₂) 50 µM.

La actividad del complejo IV (Citocromo C oxidasa) se determinó por la oxidación del Citocromo C reducido a 550 nm en una solución con tampón fosfato 10 mM pH=7 y citocromo C reducido 80 µM. Todas las reacciones se llevaron a cabo a 30°C excepto la del complejo IV que se incubó a 38°C. Los resultados fueron normalizados frente a la concentración de proteínas del extracto celular.

2.14.2. Medida de la actividad de la citrato sintasa

La actividad de esta enzima se cuantificó en función del cambio en la absorbancia a 412 nm producida por la reacción de DNTB (ácido 5-5´ ditio bis 2-nitrobenzoico) 100 µM con el coenzima A libre formado por la reacción del acetil-CoA (350 µg/mL) con 0.5 mM oxalacetato, en una solución con tampón 75 mM Tris-HCl pH=8 y 0,1% Tritón X-100. Los resultados fueron normalizados frente a la concentración de proteínas del extracto celular.

2.15. Medida de la producción de anión superóxido

Para la medida de la producción de anión superóxido mitocondrial se utilizó el reactivo MitoSOX (Molecular Probes), el cual se une específicamente al anión superóxido mitocondrial, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se diseccionaron 40 discos imaginales de ala de larvas de tercer estadio, que posteriormente se disgregaron durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en tripsina-EDTA 1X (SIGMA). Se incubaron con MitoSOX 5 µM durante 10 minutos a 37°C en oscuridad. Esta muestra fue analizada mediante citometría de flujo en un FacScan (Becton Dickinson). Mediante el uso del software Cell Quest (Becton Dickinson) fueron analizadas 10000 células por muestra.

2.16. Medida del daño oxidativo en las proteínas celulares

Para la medida del daño oxidativo provocado por el aumento de las especies reactivas de oxígeno, se llevó a cabo la extracción de proteínas totales de 20 larvas de tercer estadio, en presencia de un agente reductor (DTT 50mM). Posteriormente se llevó a cabo un western blot con 10 µg de proteína total utilizando el Oxiblot Protein Oxidation Detection Kit (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.17. Inmunohistoquímica

2.17.1. Visualización y cuantificación de células apoptóticas y células en proliferación en discos imaginales de ala de *Drosophila*

Las células apoptóticas se visualizaron en discos imaginales de ala de las líneas UAS-helicasa, daGAL4 y de las líneas de sobreexpresión del gen de la *d-mthelicasa* en sus distintas versiones mediante inmunohistoquímica, utilizando el anticuerpo anti-caspasa 3. Las células en proliferación se detectaron del mismo utilizando el anticuerpo anti-fosfohistona 3. Los discos imaginales de larvas de 3^{er} estadio se diseccionaron en 1x PBS a 4°C y se fijaron con 1x PBS, 4% paraformaldehído durante 27 min a temperatura ambiente. A continuación se bloquearon con 1x PBS, 1% BSA, 0.3% Triton X-100 durante 1 hora y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante 16 horas a 4°C. Tras cuatro lavados de 15min en solución de bloqueo (2.13.), se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado durante 2 horas en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se lavaron y se montaron en Vectashield (Vector Laboratories). Las preparaciones se visualizaron utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica). Para cuantificar el número de células en apoptosis se utilizó el software Image J 1.36b (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

2.17.2. Generación de clones simples en el disco imaginal de ala de *Drosophila*

Para la generación de clones simples en el disco imaginal de ala, se cruzó el stock *hs-flp act5C-GAL4* con las líneas UAS-mtHelicasa. Después de 48 horas de desarrollo, se dio un choque térmico a los embriones y larvas de primer estadio durante 7 minutos a 37°C. A los tres días de desarrollo a 25°C, los discos imaginales de ala de las larvas de tercer estadio se diseccionaron, fijaron e incubaron con los anticuerpos correspondientes como se ha descrito previamente.

2.17.3. Generación de clones gemelos en el disco imaginal de ala de *Drosophila*

Con objeto de generar clones gemelos en el disco imaginal de ala, se cruzó el stock GS216 con las líneas FRT-Helicasa. Tras 24-48 horas de desarrollo, se dio un choque térmico a los embriones y larvas de primer estadio durante 10 minutos a 37°C. A los tres días de desarrollo a 25°C, los discos imaginales de ala de las larvas de tercer estadio se diseccionaron, fijaron e incubaron con los anticuerpos correspondientes como se ha descrito previamente.

2.18. Estudio de viabilidad de líneas y cruces

Para cuantificar la viabilidad de las distintas líneas parentales y de los cruces en el que se produce la sobreexpresión de la d-mtHelicasa se recogieron alrededor de 300 embriones de cada uno de los genotipos en placas de agar-mosto. Los embriones se incubaron a 25°C y se alimentaron con levadura seca humedecida en agua. Se anotó el número de animales que alcanzaron los siguientes estadios de desarrollo: larva III, pupa y adulto. Posteriormente se calcularon los porcentajes relativos de supervivencia de cada uno de ellos.

2.19. Estudios de longevidad de líneas y cruces

Para determinar la longevidad de las distintas líneas control y de los cruces analizados, se recogieron 200 machos adultos recién emergidos. Se dividieron en distintos viales para simplificar la cuantificación de los individuos. Los animales se cambiaron a tubos con comida fresca cada dos días cuantificando el número de individuos muertos, prolongándolo en el tiempo hasta el máximo de días en los cuales llegaban individuos vivos.

2.20. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó con los programas Excel (Microsoft) y GraphPad Prism versión 4.03 para Macintosh (GraphPad Software). En la mayoría de los casos se utilizó el test ANOVA de una variable y el post-test de Bonferroni para determinar la significación estadística de las diferencias obtenidas en los resultados de las distintas muestras.

Resultados

1. Generación en *Drosophila melanogaster* de un modelo animal de patología mitocondrial asociado a mutaciones en el gen *TWINKLE*

Uno de los mayores retos y, al mismo tiempo, de las mayores dificultades, en el campo del estudio de las enfermedades mitocondriales es establecer modelos animales con el objetivo de dilucidar los mecanismos fisiopatogénicos asociados a estas patologías. Actualmente existen diversos sistemas celulares y animales que han aportado grandes avances en este campo, como son entre otros, los cultivos primarios, los híbridos transmitocondriales, *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *M. musculus* y *D. melanogaster*. Éste último ofrece una serie de ventajas como ya hemos comentado previamente.

El ADNmt animal codifica 13 subunidades de los complejos de la cadena respiratoria y por tanto, todos los factores necesarios para su replicación y estabilidad se encuentran codificados por el genoma nuclear. En general, mutaciones en estos factores provocan una pérdida de la integridad del ADNmt, tanto mutaciones puntuales, como duplicaciones, deleciones y depleciones del ADNmt. La oftalmoplejía externa progresiva autosómica dominante (adPEO) es una enfermedad mitocondrial asociada a la presencia de deleciones múltiples del ADNmt (Spinazzola and Zeviani 2005). La mayoría de las familias que manifiestan esta patología portan mutaciones en uno de estos tres genes: *ANT1* (translocador de nucleótidos de adenina 1), *POLG1* (subunidad catalítica de la ADN polimerasa mitocondrial) y *TWINKLE* (Helicasa mitocondrial, mtHelicasa) (Kaukonen et al. 2000; Spelbrink et al. 2001; Spinazzola and Zeviani 2005).

En el desarrollo del presente trabajo, hemos generado un sistema modelo para adPEO en *Drosophila melanogaster* con objeto de profundizar en la fisiopatología de esta enfermedad. Para ello, se seleccionaron dos mutaciones en el gen *mthelicasa* de *Drosophila* (*d-mthelicasa*) causantes de adPEO en humanos, W441C (W474C en humanos) y A442P (A475P en humanos), descritas por primera vez en una familia italiana y una paquistaní respectivamente (Spelbrink et al. 2001). Como controles positivo y negativo respectivamente hemos utilizado el gen silvestre y una mutación en el dominio helicasa (K388A) que elimina completamente la actividad de esta proteína (Figura 10). Resultados previos llevados a cabo en el laboratorio de la Dra. Laurie Kaguni (Michigan State University) utilizando cultivos de células embrionarias de *Drosophila* (SL2), han demostrado que la sobreexpresión de versiones de la mtHelicasa que contienen las mutaciones K388A y A442P provocan una fuerte depleción del ADNmt, mientras que la mtHelicasa mutante W441C no induce ningún efecto significativo. Este fenotipo no va asociado, al contrario que ocurre en humanos, con deleciones múltiples del ADNmt (Matsushima and Kaguni 2007).

Para llevar a cabo la caracterización del efecto que provocan las mutaciones seleccionadas en *Drosophila*, se clonaron las diferentes versiones del gen *d-mthelicasa* en el vector pUAST, y posteriormente se generaron líneas transgénicas que portan el transgén bajo el promotor UAS, lo que permite sobreexpresar éstas con trans-activadores GAL4, tanto ubicuos como específicos de tejido o compartimentos celulares. Se obtuvieron al menos 9 líneas transgénicas independientes para cada una de las versiones del gen *d-mthelicasa* (Figura 11).

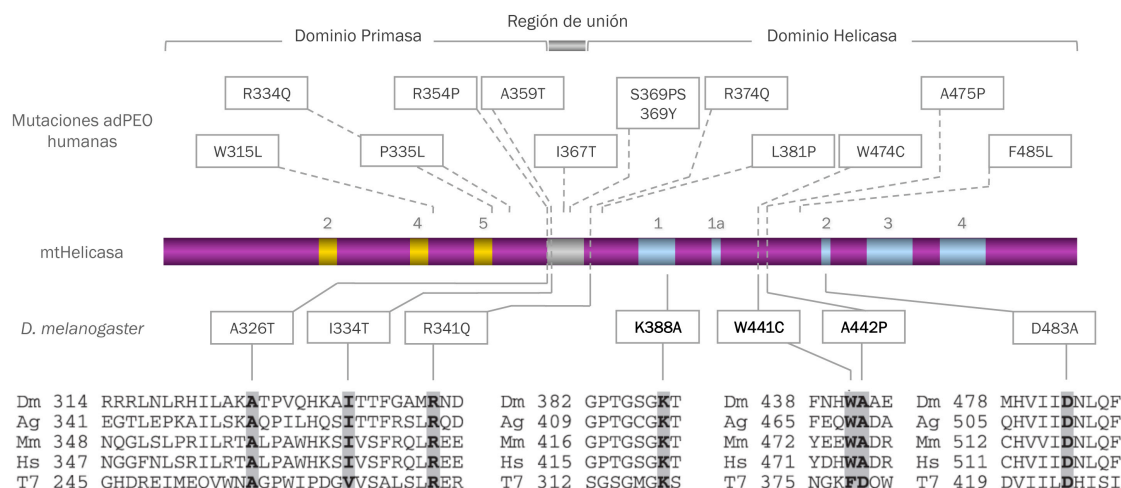


Figura 10. Diagrama esquemático de la estructura de la *d*-mtHelicasa y las mutaciones asociadas a adPEO. Se muestran en azul los cinco motivos comunes del anillo helicasa, en gris, la secuencia homóloga a la región de unión de la proteína del bacteriófago T7 gp4 y en amarillo los tres motivos comunes del anillo primasa. Las mutaciones en la mtHelicasa humana encontradas en adPEO se muestran en la parte superior del esquema. Las posiciones de las mutaciones de la *d*-mtHelicasa usadas en nuestro trabajo se presentan resaltadas en la parte inferior del esquema. En el panel inferior se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de dos regiones de la proteína que contienen cambios de aminoácidos que provocan adPEO. Dm, *Drosophila melanogaster*; Ag, *Anopheles gambiae*; Mm, *Mus musculus*; Hs, *Homo sapiens*; T7, bacteriófago T7.

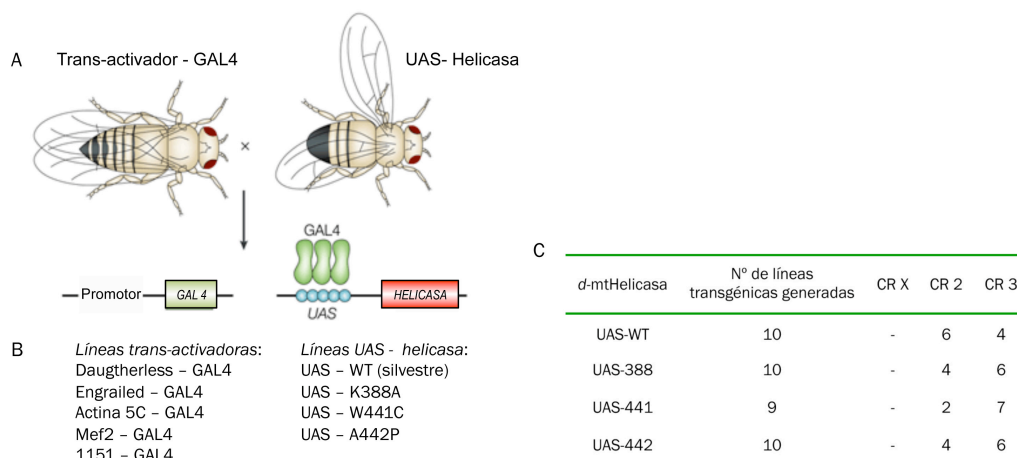


Figura 11. Sistema UAS-GAL4 en *Drosophila melanogaster*. A) La descendencia del cruce entre una línea trans-activadora GAL4 y una línea UAS-helicasa, sobreexpresa el transgén de forma específica de tejido y/o tiempo de desarrollo. B) Líneas trans-activadoras GAL4 y líneas UAS - helicasa empleadas en este trabajo. C) Número de líneas transgénicas generadas para cada una de las mutaciones del gen *d*-mthelicasa siguiendo los procedimientos detallados en materiales y métodos. Se indica el cromosoma de inserción del transgén.

1.1. Sobreexpresión de las diferentes versiones del gen *d*-mthelicasa en *Drosophila melanogaster* de forma ubicua y constitutiva

La primera aproximación que se llevó a cabo, con objeto de determinar el efecto de las distintas mutaciones del gen *d*-mthelicasa, ha sido sobreexpresar éstas con un trans-activador ubicuo, que expresa el factor de transcripción GAL4 bajo el control del promotor del gen *daughterless*. Los

resultados obtenidos mostraron que la sobreexpresión de la versión silvestre y de la que contiene la mutación W441C, no provocaban ningún fenotipo aparente. El desarrollo desde etapas embrionarias hasta el estadio de pupa era idéntico al de líneas control, obteniéndose posteriormente un número similar de individuos adultos en ambas líneas (Figura 12A,C). Sin embargo, la sobreexpresión de las que contienen las mutaciones K388A y A442P producía una letalidad del cien por cien en larvas tardías de tercer estadio y pupa respectivamente (Figura 12B,D). El fenotipo obtenido fue idéntico al utilizar varias líneas transgénicas independientes de cada una de las versiones de la *d*-mtHelicasa estudiadas, lo que demuestra que es independiente del lugar de inserción del transgén. Por este motivo se han utilizado sólo una o dos líneas de cada versión en los experimentos diseñados para caracterizar los efectos que provocan las diferentes mutaciones a nivel celular y molecular.

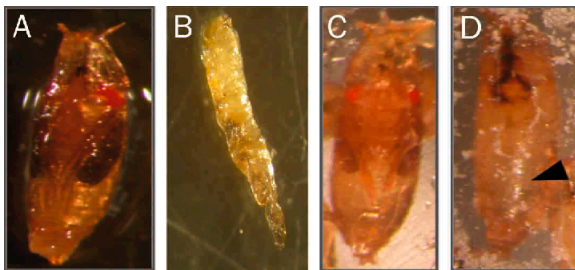


Figura 12. Fenotipos asociados a la sobreexpresión de las versiones del gen *d-mthelicasa* con un transactivador constitutivo y ubicuo (*daughterless*). En la figura B se observa una degeneración del tejido en la parte anterior de una larva de tercer estadio. En la figura D se observa una bolsa de aire que indica, al igual que en el caso anterior, una degeneración del tejido (cabeza de flecha). A) Control, B) UAS-K388A x *da-GAL4*, C) UAS-W441C x *da-GAL4*, D) UAS-A442P x *da-GAL4*.

Para llevar a cabo una cuantificación más precisa del efecto que provoca la sobreexpresión de las diferentes versiones del gen *d-mthelicasa* en la viabilidad de las moscas, se alinearon cien embriones de cada una de los cruces UAS-*mtHelicasa* x *da-GAL4* y se contaron los individuos en cada una de las etapas de desarrollo, larvas de primer (L1), segundo (L2) y tercer estadio (L3), pupas e individuos adultos. Como se muestra en la Figura 13A, se observó que sólo para las líneas de sobreexpresión de la versión silvestre y la mutación W441C se obtenían individuos adultos, comportándose ambas de igual manera a las líneas control. La letalidad inducida por la mutación K388A era 100% en larvas de tercer estadio y la inducida por la mutación A442P 100% en pupas (Figura 13A). Como controles se cruzaron las diferentes líneas transgénicas UAS-*mtHelicasa* con la cepa *w¹¹¹⁸*, que es la utilizada para generar los stocks *GAL4*, y por tanto contiene un fondo genético similar. La Figura 13B muestra que las distintas líneas UAS tienen una viabilidad ligeramente disminuida, que es independiente de la mutación.

1.1.1. Cuantificación de los niveles de sobreexpresión del gen *d-mthelicasa* en las distintas líneas

Con objeto de comprobar el nivel de expresión de las diferentes versiones del gen *d-mthelicasa* se cuantificaron en primer lugar utilizando RT-PCR cuantitativo los niveles de ARNm obtenidos en los diferentes cruces UAS-*mtHelicasa* x *da-GAL4* analizados en el presente estudio. Los datos mostraron

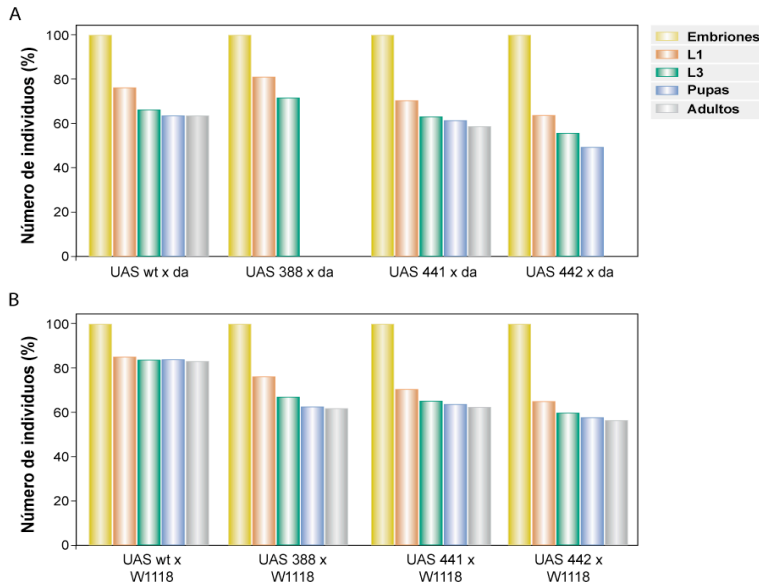


Figura 13. Cuantificación de la viabilidad de las líneas que sobreexpresan el gen *d-mthelicasa*. A) Cruces UAS-mtHelicasa x da-GAL4, que sobreexpresan de una forma constitutiva las diferentes versiones de la proteína. La línea 388 posee una letalidad del 100% en el estadio L3 mientras que la línea 442 tiene la misma letalidad en estadio de pupa. B) Cruces UAS-mtHelicasa x w¹¹¹⁸ utilizados como control.

que en todos los casos se obtenía un elevado aumento en la expresión del gen comparado con la expresión endógena, que oscilaba entre 70 y 600 veces (Figura 14A).

Recientemente hemos podido utilizar un anticuerpo policlonal que reconoce la proteína *d-mtHelicasa* de *Drosophila* cedido amablemente por la Dra. L. Kaguni. Hemos analizado mediante western blot tanto la localización subcelular como los niveles de proteína *d-mtHelicasa* presente en los diferentes cruces UAS-mtHelicasa x da-Gal4. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 14B. A partir de larvas de tercer estadio se obtuvo la fracción mitocondrial tal y como se explica en materiales y métodos. Para las tres versiones mutantes de la *d-mtHelicasa* el nivel de proteína que se localiza en la mitocondria es muy similar, y en todos los casos muy superior al endógeno que es prácticamente indetectable.

Estos resultados demuestran no sólo que los niveles de proteína mutante son similares, sino también que las distintas versiones de la *d-mtHelicasa* son importadas a la mitocondria. Además, el considerable aumento en los niveles de *d-mtHelicasa* mutante sugiere que en todos los casos se obtiene un reemplazamiento prácticamente completo de la proteína endógena por la mutante, y que por tanto la mayoría de las subunidades del hexámero que constituyen la proteína funcional corresponden a la expresada exógenamente.

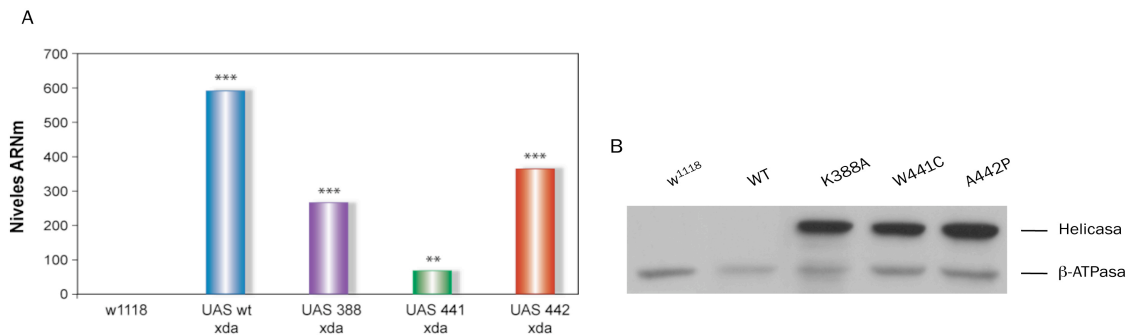


Figura 14. Cuantificación de los niveles de ARNm y proteína del gen *d-mthelicasa* en larvas de tercer estadio en los cruces

UAS-mtHelicasa x da-GAL4. A) Niveles de ARNm cuantificados por qPCR. Se observa un incremento de ARNm de entre 70 y 600 veces con respecto a la línea control. B) Western Blot. 30µg de proteínas mitocondriales de los distintos cruces y controles se separaron mediante electroforesis en un gel de acrilamida 12% SDS/PAGE y la presencia de mtHelicasa se detectó utilizando un anticuerpo policlonal como se detalla en materiales y métodos. Como control de carga se cuantificaron los niveles de β -ATPasa. Se observan unos niveles similares para cada una de las proteínas mutantes, mientras que en el control y el cruce UAS-WT x da-GAL4 los niveles son prácticamente indetectables. El grado de significación estadística se indica como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

Desgraciadamente, el mRNA mtHelicasa-WT no se traduce eficazmente en ninguna de las diez líneas transgénicas independientes generadas. Aunque este resultado nos ha impedido poder comparar los resultados obtenidos al sobreexpresar las versiones mutadas de la *d*-mtHelicasa con una sobreexpresión similar de la proteína silvestre, hemos utilizado el cruce UAS-mtHelicasa WT x da-GAL4 como control, adicionalmente a la línea w^{1118} , ya que las líneas UAS-mtHelicasa WT obtenidas han sufrido el mismo proceso que las líneas UAS-mtHelicasa mutantes, y por tanto su fondo genético es similar.

1.1.2. Efecto de las mutaciones sobre el número de copias, integridad y expresión del genoma mitocondrial

El efecto más relevante de la sobreexpresión de las versiones mutantes de la mtHelicasa en células SL2 es inducir una depleción del ADNmt de una magnitud variable (Matsushima and Kaguni 2007). Por ello se cuantificó por RT-PCR cuantitativa la cantidad de ADNmt presente en larvas de tercer estadio que sobreexpresan las tres versiones mutantes de la *d*-mtHelicasa. Se observó una fuerte depleción del ADNmt superior al 60% en las líneas K388A y A442P comparadas con los controles (w^{1118} y UAS-WT x da-GAL4) (Figura 15), siendo más pronunciada la disminución en el caso de la K388A (80%). En la línea que sobreexpresa la versión W441C se inducía también una depleción significativa, aunque menor que en el caso de las dos anteriores, aproximadamente de un 40%.

La disminución del número de copias de ADNmt tiene como consecuencia directa una disminución en los niveles estacionarios de los transcritos codificados en el genoma mitocondrial, al menos en células en cultivo (Goffart et al. 2009; Matsushima and Kaguni 2007). Con objeto de ver si las mutaciones analizadas en nuestro estudio en *Drosophila* tenían las mismas consecuencias, o por el contrario se inducía un efecto compensatorio aumentando la transcripción del genoma mitocondrial, cuantificamos los niveles de transcritos mitocondriales en las líneas que sobreexpresan las versiones mutantes de la *d*-mtHelicasa. Como se muestra en la Figura 16, los

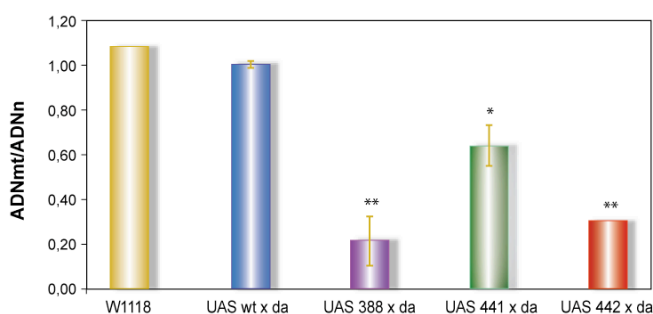


Figura 15. Cuantificación del ADNmt en larvas de tercer estadio de los cruces UAS-mtHelicasa x da-GAL4. Los niveles de ADNmt se cuantificaron mediante qPCR según se describe en materiales y métodos. Se observa una depleción del ADNmt en las líneas K338A, A442P y W441C, siendo más severa en las dos primeras. El grado de significación estadística se indica como ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

niveles de los dos ARNm cuantificados (ND5 y COX I) están significativamente disminuidos con valores inferiores a los de los controles (w^{1118} y UAS-WT x da-GAL4) en las líneas K388A y A442P. Sorprendentemente, los niveles de ambos ARNm no disminuyen significativamente en la línea que sobreexpresa la *d*-mtHelicasa W441C, a pesar de que los niveles de ADNmt han disminuido un 40% (Figura 16).

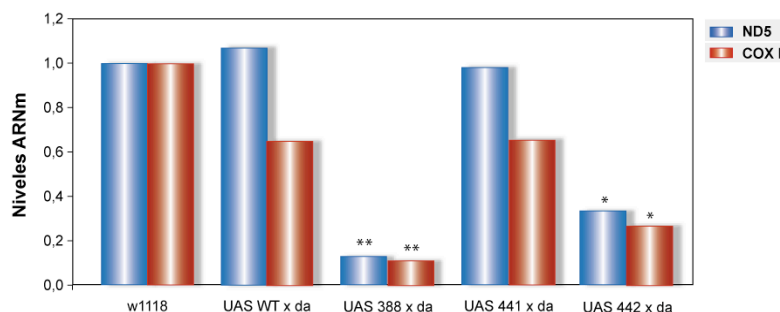


Figura 16. Cuantificación de los niveles de los transcritos mitocondriales ND5 y COX I por qRT-PCR en larvas de tercer estadio de los cruces UAS-mtHelicasa x da-GAL4. Los datos se expresan como el porcentaje de mtRNA ND5 y COX I respecto al presente en la línea w^{1118} . Se observa una disminución de los niveles de los transcritos ND5 y COX I en las líneas mutantes K388A y A442P, mientras que en las líneas control (w^{1118} y UAS-WT x da-GAL4) y en la línea W441C no existen diferencias significativas. El grado de significación estadística se indica como ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

Una de las características más relevantes de los pacientes con PEO, es la presencia en músculo esquelético de deleciones múltiples del ADNmt. Con objeto de determinar si la sobreexpresión de las *d*-mtHelicases mutantes provocaba el acúmulo de deleciones múltiples en el ADNmt en *Drosophila* analizamos la integridad del genoma mitocondrial utilizando la técnica de southern. El resultado mostró en todos los casos una única banda que corresponde al fragmento lineal de la molécula completa del ADNmt de *Drosophila* (Figura 17). Exposiciones prolongadas de la membrana no mostraron ningún indicio de fragmentos de menor tamaño en ninguna de las líneas mutantes (datos no mostrados). Estos resultados se confirmaron mediante estudios de PCR, en el que se analizaron amplicones que cubrían toda la molécula (datos no mostrados). En el southern se puede observar claramente la fuerte depleción de ADNmt inducida por las *d*-mtHelicases K388A y A442P, que contrasta con la leve disminución de ADNmt presente en larvas que sobreexpresan la mtHelicasa W441C (Figura 17).

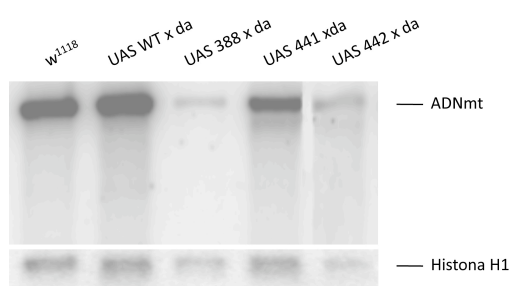


Figura 17. Análisis de la integridad del ADNmt mediante southern blot. Se cargaron en el gel 5 μ g de ADN total extraído de larvas de tercer estadio de los cruces UAS-mtHelicasa x da-GAL4, previamente digerido con la enzima XhoI según se describe en materiales y métodos. No se observan deleciones en ninguna de las líneas y si depleción en las líneas K388A, W441C y A442P. Como control de carga se utilizó una sonda que detecta el gen de la histona H1

1.1.3. Medida de las actividades de los complejos de la cadena respiratoria

La mayor parte de las enfermedades de origen mitocondrial cursan con la disminución de la

actividad de uno (déficit únicos) o varios (déficit combinados) de los complejos de la cadena respiratoria. Los déficit combinados están frecuentemente asociados a mutaciones en ARNt-mts o genes de comunicación intergenómica que afectan a la integridad o número de copias del ADNmt. Por ello, nuestro siguiente paso fue analizar si la depleción inducida por la sobreexpresión de las mutaciones adPEO en el gen *d-mtHelicasa*, tenían consecuencias directas en la función OXPHOS en *Drosophila*. Cuantificamos la actividad de los complejos III y IV (que contienen subunidades codificadas en el genoma mitocondrial), II (cuyas cuatro subunidades están codificadas en el núcleo) y la citrato sintasa (codificada también en el núcleo) como medida de la masa mitocondrial. Los resultados obtenidos, que se muestran en la Figura 18, revelaron un claro defecto en la actividad de los complejos III y IV en la línea K388A y una disminución en la actividad del complejo IV, y en menor medida el III en la A442P. Coherentemente con la leve depleción inducida por la mutación W441C, la actividad de los complejos III y IV es en esta línea similar a la de los controles. Sorprendentemente, la actividad del complejo II sufre una caída significativa en las líneas que sobreexpresan las *d-mtHelicasa* con las mutaciones K388A y A442P, a pesar de que todas sus subunidades están codificadas en el núcleo.

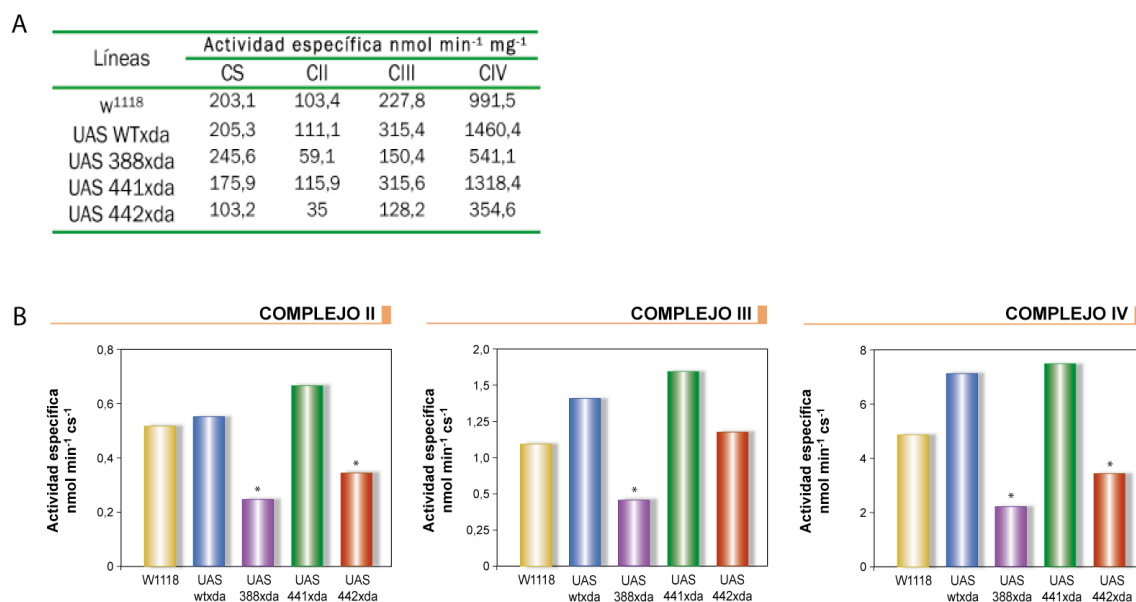


Figura 18. Actividades de los complejos de la cadena respiratoria en larvas de tercer estadio de los cruces UAS-*mtHelicasa* x da-GAL4. A) Actividades específicas de la citrato sintasa y de los complejos II, III y IV de las distintas líneas expresadas por mg de proteína. B) Las gráficas representan las actividades específicas de los complejos II, III y IV estandarizados con los valores de citrato sintasa. Se observa una disminución de la actividad específica en los complejos II, III y IV en la línea 388, y en el complejo II y IV en la línea 442. El grado de significación estadística se indica como * $p < 0.05$.

1.1.4. Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno

Diversas evidencias experimentales sugieren que mutaciones en factores implicados en biogénesis mitocondrial, y en particular en aquellos que afectan a la integridad y función del ADNmt y la cadena respiratoria, pueden inducir un incremento en la producción de ROS, jugando este aumento un importante papel en la patogénesis de las enfermedades mitocondriales. Así mismo, existen evidencias de que el aumento de ROS es un fenómeno que depende en gran medida del gen

afectado y de las consecuencias que provoquen en el funcionamiento de los complejos de la cadena respiratoria (Vives-Bauza et al. 2006).

Con objeto de estudiar los niveles de ROS en las líneas que sobreexpresan las diferentes versiones mutantes de la *d*-mtHelicasa, se determinaron la producción de anión superóxido utilizando la sonda MitoSOX según se describe en materiales y métodos. Los resultados obtenidos muestran que los niveles de anión superóxido no varían en ninguna de las líneas con respecto al control, y por tanto los ROS generados como consecuencia directa del funcionamiento de la cadena respiratoria son similares en todos los casos (Figura 19).

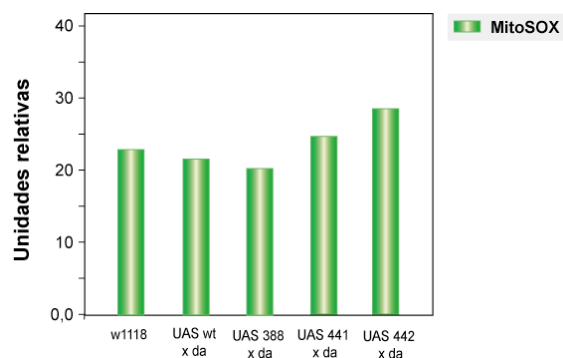


Figura 19. Cuantificación de los niveles de anión superóxido mitocondrial producidos por el funcionamiento de la cadena respiratoria en discos imaginales de larvas de tercer estadio larvario de los cruces UAS-*mtHelicasa* x *da-GAL4*. Los discos previamente tratados con el reactivo MitoSOX se cuantificaron por citometría de flujo como se indica en materiales y métodos. No se observan diferencias significativas entre las distintas líneas.

Con objeto de ver daño celular provocado por las cantidades de ROS presentes en las distintas líneas, se llevó a cabo una medida del daño oxidativo en las proteínas celulares mediante un western blot utilizando el kit OxiBlot, tal y como se describe en materiales y métodos. Los resultados no mostraron un aumento del daño oxidativo en ninguno de los cruces UAS-*mtHelicasa* x *da-GAL4* (datos no mostrados).

1.1.5. Fenotipo celular en el disco imaginal de ala

La mitocondria es el centro energético de la célula y está implicada adicionalmente en numerosos procesos celulares. Entre ellos, juega un papel muy importante en la apoptosis y en la proliferación celular. Nuestro siguiente objetivo fue determinar los niveles de apoptosis y proliferación celular en las líneas controles, W441C, K388A y A442P mediante inmunohistoquímica en discos imaginales de ala de larvas de tercer estadio de las líneas que sobreexpresan las diferentes versiones de la *d*-*mtHelicasa*, tal y como se describe en materiales y métodos. Los discos imaginales son sacos de células epiteliales que darán lugar a las estructuras que forman el individuo adulto tras el estadio de pupa, por lo que suponen un buen modelo para estudios de proliferación celular, apoptosis, diferenciación celular y morfogénesis. En primer lugar estudiamos los niveles de apoptosis utilizando un anticuerpo que detecta específicamente la caspasa 3 en su forma activada. Los resultados mostraron que los niveles de apoptosis en las líneas K388A y A442P estaban aumentados con respecto a los controles, sin embargo, la línea W441C no presentaba diferencias significativas (Figura 20A-E).

La proliferación celular se estudió utilizando un anticuerpo que detecta específicamente la presencia de fosfohistona 3. Como se observa en la Figura 20F-J, los niveles de proliferación celular en discos imaginales de las líneas K388A y A442P, son inferiores comparados con los controles

(w¹¹¹⁸ y UAS-WT x da-GAL4), mientras que en la línea W441C no se observaban diferencias apreciables. Coherentemente con estos resultados, en las líneas K388A y A442P los discos imaginales de ala eran más pequeños, siendo este fenotipo más acusado en la línea K388A.

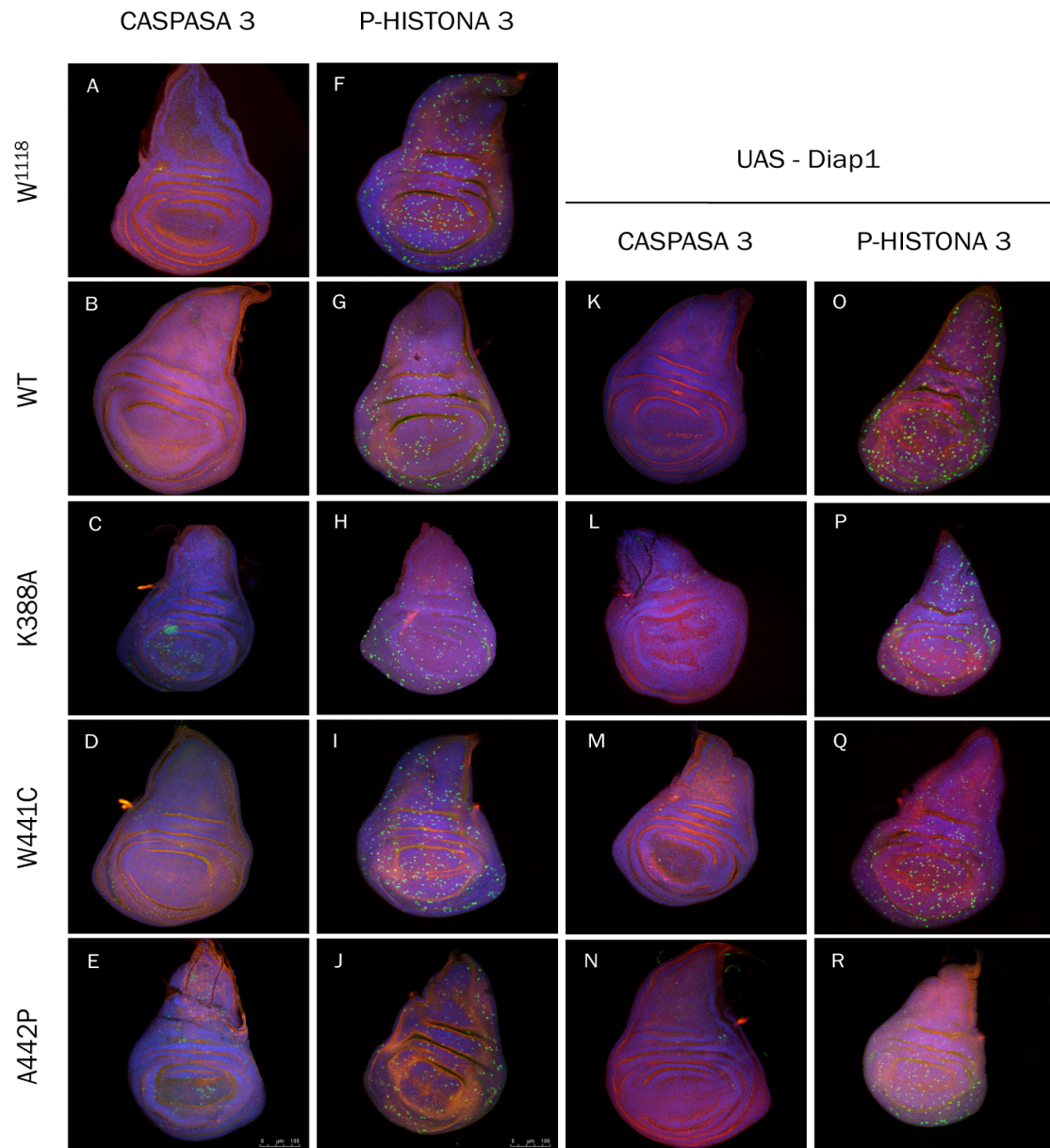


Figura 20. Niveles de apoptosis y proliferación celular en discos imaginales de ala de larvas de tercer estadio de los cruces UAS-mtHelicasa x da-GAL4. A-E) Inmunodetección con un anticuerpo anti caspasa 3 activada. Se observan niveles aumentados de células apoptóticas en las líneas K388A y A442P. F-J) Inmunodetección con un anticuerpo anti fosfo-histona 3. En las líneas K388A y A442P se observan niveles de proliferación disminuidos con respecto a los controles. K-N) Niveles de apoptosis en discos imaginales de ala que expresan simultáneamente mthelicasas mutantes y la proteína Diap-1. En las líneas K388A y A442P, los niveles de apoptosis disminuyen con respecto a la sobreexpresión exclusiva de las mthelicasas O-R) Niveles de proliferación celular en discos imaginales de ala que expresan simultáneamente mthelicasas mutantes y la proteína Diap-1. Se observa un aumento de la proliferación en discos que sobreexpresan las mthelicasas K388A y A442P. La tinción se ha realizado utilizando los anticuerpos anti caspasa 3 activada y anti fosfo-histona 3 tal como se describe en Materiales y Métodos; El contorno celular se visualiza con faloidina marcada (rojo) y los núcleos con TopRO (azul).

El análisis cuantitativo de los resultados se muestra en la Figura 21, donde se puede observar que la disminución en la proliferación celular es muy importante en las dos líneas mutantes, K388A y A442P. El aumento de la apoptosis es moderado aunque estadísticamente significativo en la línea A442P, y muy importante en la línea K388A.

En su conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la sobreexpresión de la mutación K388A en el gen *d-mthelicasa* que elimina la actividad de la enzima, y la mutación A442P, causante de adPEO en humanos, producen una depleción del ADNmt y como consecuencia un aumento de los niveles de apoptosis y una disminución de la proliferación celular. Sin embargo, la mutación W441C, causante también de adPEO en humanos, es prácticamente asintomática y excepto una leve depleción de ADNmt no produce efectos significativos a nivel celular.

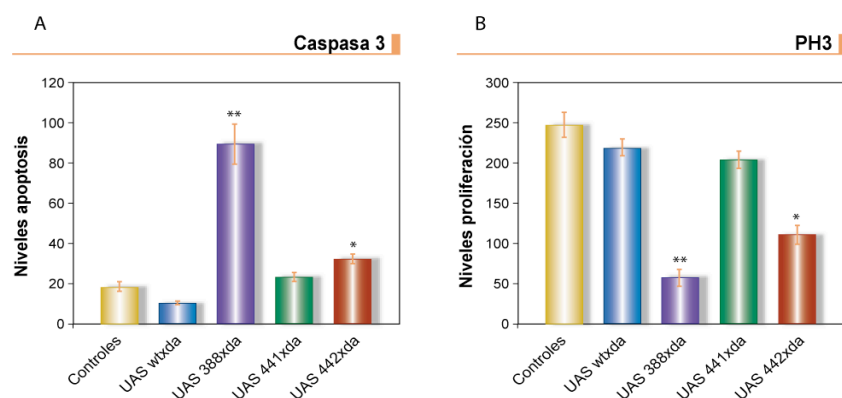


Figura 21. Cuantificación de los niveles de apoptosis y proliferación celular en discos imaginales de ala de larvas de tercer estadio de los cruces UAS-mtHelicasa x da-GAL4. El número de células apoptóticas y los niveles de proliferación celular se cuantificaron mediante análisis de las imágenes de al menos 20 discos independientes utilizando el programa Image J 1.36b. A) Niveles de apoptosis. Se observa un aumento significativo de células apoptóticas en las líneas 388 y 442, siendo más acusado en la primera. B) Niveles de proliferación. Se observa una disminución de la proliferación celular en las líneas 388 y 442. El grado de significación estadística se indica como ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

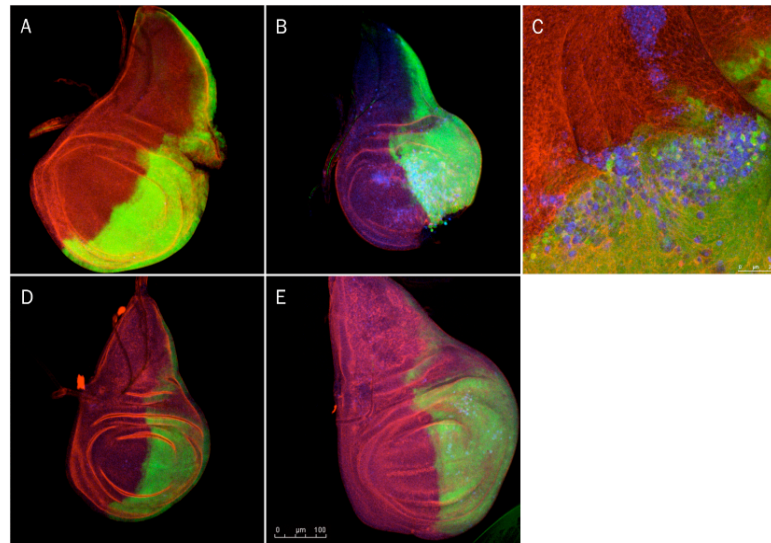
1.1.5.1. Fenotipo celular en el compartimento anterior del disco imaginal de ala de *Drosophila*

El disco imaginal de ala de *Drosophila* está dividido en distintos compartimentos celulares, por un lado los compartimentos dorsal y ventral y por otro lado los compartimentos anterior y posterior, los cuales van a fijar la polaridad de las estructuras adultas. El sistema UAS-GAL4 permite sobreexpresar transgenes de un modo específico en los distintos compartimentos, de tal manera que en un mismo disco imaginal de ala podemos observar el fenotipo que se produce tras la sobreexpresión del gen diana en un compartimento, teniendo como control, dentro de un mismo entorno celular, el otro compartimento. Se seleccionó un trans-activador que sobreexpresa el factor GAL4 bajo el promotor del gen *engrailed*, el cual dirige su expresión al compartimento anterior del disco imaginal, y que por tanto permite sobreexpresar las diferentes versiones del gen *d-mthelicasa*.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22, donde se puede observar que los niveles de muerte celular en el compartimento anterior estaban aumentados con respecto al compartimento posterior (control) en las líneas K388A y A442P, y sin embargo no había diferencias

significativas en la línea W441C, al igual que ocurría con el trans-activador constitutivo y ubicuo (Figura 20).

Figura 22. Niveles de apoptosis en el compartimento anterior del disco imaginal de ala de *Drosophila melanogaster* en larvas de tercer estadio de los cruces UAS-mtHelicasa x *engrailed*-GAL4. En verde se muestra el compartimento anterior marcado con GFP. En rojo se visualiza el contorno celular con faloidina unido a un fluoróforo. En azul se observan las células en apoptosis, aumentados en las líneas 388 y 442. A) línea WT (control), B) línea K388A, C) detalle de K388A, D) línea W441C y E) línea A442P.



1.1.5.2. Análisis de clones en disco imaginal de ala

Otra de las herramientas experimentales que nos proporciona *Drosophila* es la posibilidad de sobreexpresar las distintas versiones del gen *d-mthelicasa* en grupos clonales de células dentro de un contexto celular determinado, en nuestro estudio, el disco imaginal de ala. Este sistema permite observar las diferencias fenotípicas existentes tanto en los clones que sobreexpresan el transgén de interés, como en los bordes y células que limitan con él. La primera aproximación que se llevó a cabo fue usar el sistema basado en la flipasa, FLP-FRT, bajo un promotor inducible por choque térmico que induce la sobreexpresión del transgén bajo el promotor del gen *actina 5C*, lo que da lugar a clones simples, tal y como se explica detalladamente en materiales y métodos. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 23, donde se muestra un ejemplo representativo del análisis realizado. Se observó que no existían diferencias significativas en el comportamiento de los clones comparados con los controles, siendo el tamaño y forma similares entre las distintas líneas que sobreexpresan las diferentes versiones de la *d-mtHelicasa*.

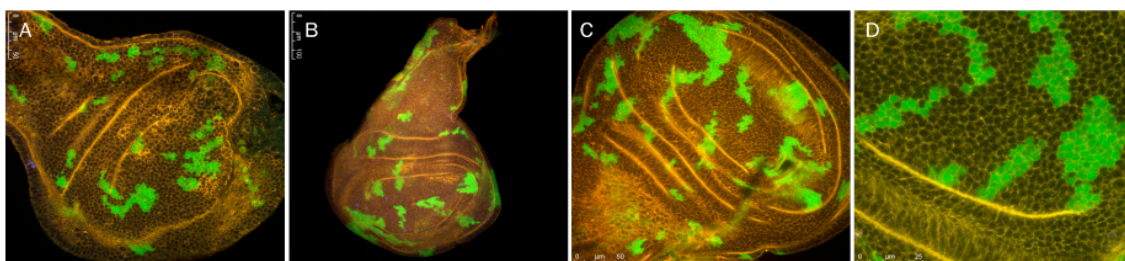


Figura 23. Generación de clones simples en el disco imaginal de ala de larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster* marcados con GFP. El choque térmico inducido en larvas de 24-48 horas de vida produce la recombinación entre los alelos de determinadas células, lo que induce la expresión del transgén marcando el grupo clonal de células con GFP (ver materiales y métodos). No se observan diferencias fenotípicas entre las distintas líneas. A) Línea WT. B) Línea K388A. C) Línea W441C. D) Línea A442P.

Para visualizar de manera exacta el comportamiento de este tipo de clones, generamos clones gemelos, de tal manera que el desarrollo del grupo clonal de células que sobreexpresan el transgén se produce de forma adyacente y paralela a otro grupo de células que no sobreexpresan el gen diana, pudiendo visualizar las posibles diferencias en crecimiento celular de las distintas versiones del gen *d-mthelicasa* dentro de un mismo fondo genético. Al igual que la aproximación de los clones simples, se observó que la proliferación no se afecta de un modo importante cuando se sobreexpresan estas mutaciones (Figura 24).

Aunque no es posible utilizar un análisis molecular simultáneo que nos indique el contenido en ADNmt de las células del clon con respecto a sus células vecinas, la interpretación más probable de estos resultados es que en las condiciones experimentales utilizadas, la depleción de ADNmt ocasionada por las formas mutantes de la *d-mtHelicasa* no ha sido suficiente para afectar a la proliferación celular.

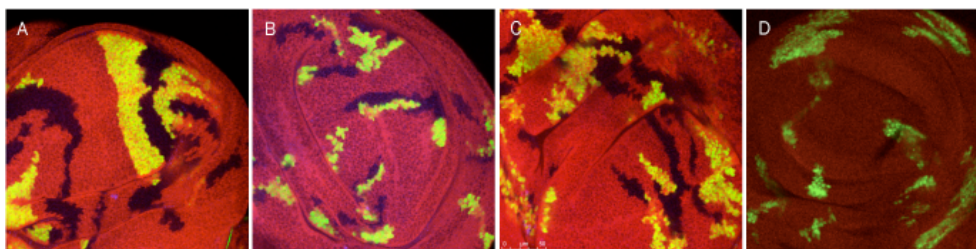


Figura 24. Clones gemelos mutantes (verde) y silvestres (negro). El choque térmico inducido en larvas de 48-72 horas de vida produce la recombinación entre los alelos de determinadas células, lo que induce la expresión del transgén marcando el grupo clonal de células con GFP y su clón gemelo control por la ausencia de GFP (ver materiales y métodos). No se observan diferencias fenotípicas entre las distintas líneas. A) Línea WT. B) Línea K388A. C) Línea W441C. D) Línea A442P.

1.1.6. Efecto de la inhibición de la apoptosis en líneas de *Drosophila* que sobreexpresan versiones mutadas del gen *d-mthelicasa*

En *Drosophila* se ha descrito la presencia de todas las proteínas canónicas del apoptosoma, incluyendo los ortólogos de Apaf-1, Caspasa-9 y Citocromo C y al igual que en vertebrados, la regulación de la apoptosis es un proceso dinámico dotado de una alta plasticidad, que implica una gran variedad de estímulos. La sobreexpresión del gen *d-mthelicasa* con las mutaciones K388A y A442P en *Drosophila* producen un incremento significativo en los niveles de apoptosis. Por ello, nos planteamos bloquear el proceso de apoptosis con objeto de estudiar su posible efecto sobre el fenotipo de las líneas que sobreexpresan la *d-mtHelicasa* mutante. Para ello sobreexpresamos la proteína inhibidora de apoptosis de *Drosophila* 1 (Diap-1) utilizando la estrategia UAS-GAL4, de un modo simultáneo a la sobreexpresión de las *d-mtHelicasa*s mutantes. Esta proteína inhibe la vía de muerte celular programada a nivel de las caspasas iniciadoras y efectoras, Dronc y Drice respectivamente (ver Figura 8). Para la sobreexpresión se utilizó el mismo trans-activador (da-GAL4) y el mismo modelo celular, llevando a cabo el análisis en el disco imaginal de ala. Se observó que la sobreexpresión constitutiva de Diap-1 rescataba el fenotipo de las líneas K388A y A442P, de tal modo que las líneas de *Drosophila* que sobreexpresaban simultáneamente Diap-1/*mtHelicasa*-K388A y Diap-1/*mtHelicasa*-A442P tenían un desarrollo similar a los controles, y la mayoría de los

individuos alcanzaban el estadio adulto.

Para comprobar si los niveles de apoptosis de estas líneas disminuían en comparación con las líneas que sobreexpresaban únicamente las *d*-mtHelicasas mutantes realizamos un análisis inmunohistoquímico en disco imaginal de ala utilizando un anticuerpo que reconoce la caspasa 3 activada. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 20K-N, donde se puede observar una significativa disminución de la apoptosis, fundamentalmente en la línea que sobreexpresa la *d*-mtHelicasa portadora de la mutación K388A. De forma paralela analizamos los niveles de proliferación celular utilizando un anticuerpo que reconoce la fosfohistona 3. Los niveles de proliferación aumentaban también de un modo significativo, fundamentalmente en la línea que sobreexpresa la *d*-mtHelicasa portadora de la mutación K388A (Figura 20 O-R). La cuantificación del número de células apoptóticas y los niveles de proliferación celular se muestran en la Figura 25, donde se puede observar que las variaciones son estadísticamente significativas. Por tanto el rescate de la letalidad estaba acompañado de una disminución en la muerte celular programada y un aumento paralelo en la proliferación celular.

Para comprobar que el rescate del fenotipo de letalidad inducido por la sobreexpresión de mutantes de la *d*-mtHelicasa era debido a un bloqueo del proceso de apoptosis, se sobreexpresó simultáneamente, el ARN interferente de la caspasa efectora Drice (ver Figura 8; UAS-ARNi Drice), utilizando el driver da-GAL4. Los resultados mostraron un rescate del fenotipo hasta el estadio de pupa en todas las líneas UAS-mtHelicasa/UAS-Drice. En este caso no era esperable la obtención de adultos debido a que la propia sobreexpresión del ARNi de Drice con el mismo trans-activador era letal en estadio de pupa.

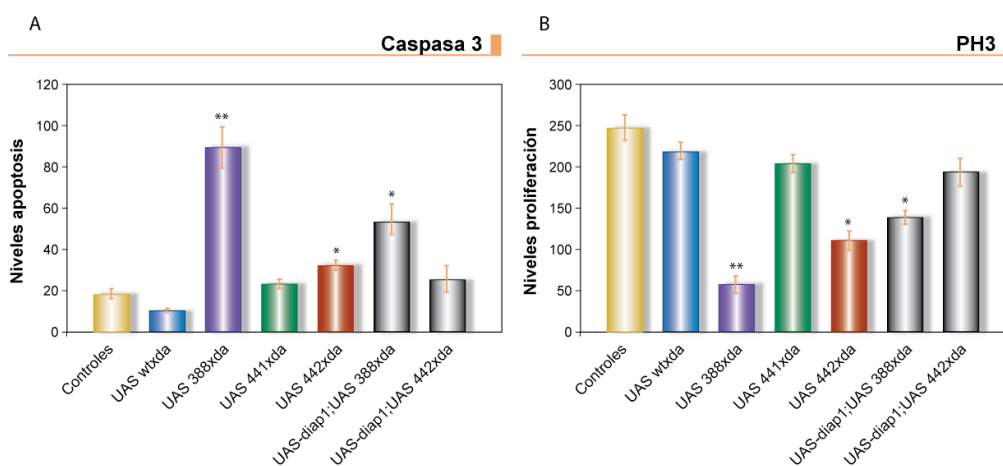


Figura 25. Cuantificación de los niveles de apoptosis y proliferación tras la sobreexpresión de la proteína Diap-1 en discos imaginales de ala de larvas de tercer estadio de *Drosophila melanogaster* de los cruces UAS-mtHelicasa x da-GAL4. A) Niveles de caspasa 3 activada. B) Niveles de fosfo-histona 3. Se observa una disminución de los niveles de apoptosis y un aumento de los niveles de proliferación en las líneas 388 y 442. El grado de significación estadística se indica como ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

Una de las posibles explicaciones del rescate producido al bloquear la apoptosis mediante la sobreexpresión de proteína Diap-1 o el RNAi de Drice, es que debido a la presencia de dos promotores UAS, uno correspondiente a la versión de la *d*-mtHelicasa y otro a Diap-1 o RNAi Drice, el

factor de transcripción GAL4 presente se reparta entre ambos, disminuyendo la expresión de las *d-mthelicasas* mutantes y como consecuencia provocando un fenotipo de depleción de ADNmt menos severo. Para comprobar esta hipótesis se generaron líneas que portaban tanto las distintas versiones del gen *d-mthelicasa*, como la proteína GFP, ambos bajo un promotor UAS. Tras la sobreexpresión con el transactivador da-GAL4 se observó una letalidad del 100% en larvas de tercer estadio (línea 388) o pupa (línea 442), indicando que la única presencia de un doble transgen UAS (UAS-mtHelicasa/UAS-GFP) no rescata el fenotipo, y sugiriendo por tanto que los resultados obtenidos se debían específicamente al bloqueo de la apoptosis mediante Diap-1 o RNAi-Drice.

Finalmente, para analizar los niveles de la proteína *d-mtHelicasa* que se obtenían en los experimentos realizados se llevó a cabo un análisis en western blot de la sobreexpresión de las distintas versiones del gen *d-mthelicasa*, tanto de un modo individual como en las coexpresiones con Diap-1 y GFP. Los resultados obtenidos mostraron que en la coexpresión con Diap-1 y GFP, los niveles de proteína disminuían, siendo la disminución más acusada en el caso de la coexpresión con la proteína Diap1 (Figura 26A). Al mismo tiempo, se cuantificaron los niveles de ADNmt, observándose un aumento de la cantidad de ADNmt en las coexpresiones de las mutaciones del gen *d-mthelicasa* y Diap-1 (Figura 26B) que correlacionaban con los niveles de expresión de las proteínas mutantes. Estos resultados sugieren que el rescate fenotípico obtenido en los experimentos de co-expresión con Diap-1 son indirectos debidos a una disminución en los niveles de proteína mutante y por tanto, a una disminución de la depleción de ADNmt que ocasionan. Es por tanto necesario desarrollar estrategias alternativas para estudiar el impacto que la inducción de la apoptosis tiene en el fenotipo inducido por las *d-mtHelicasa*s mutantes.

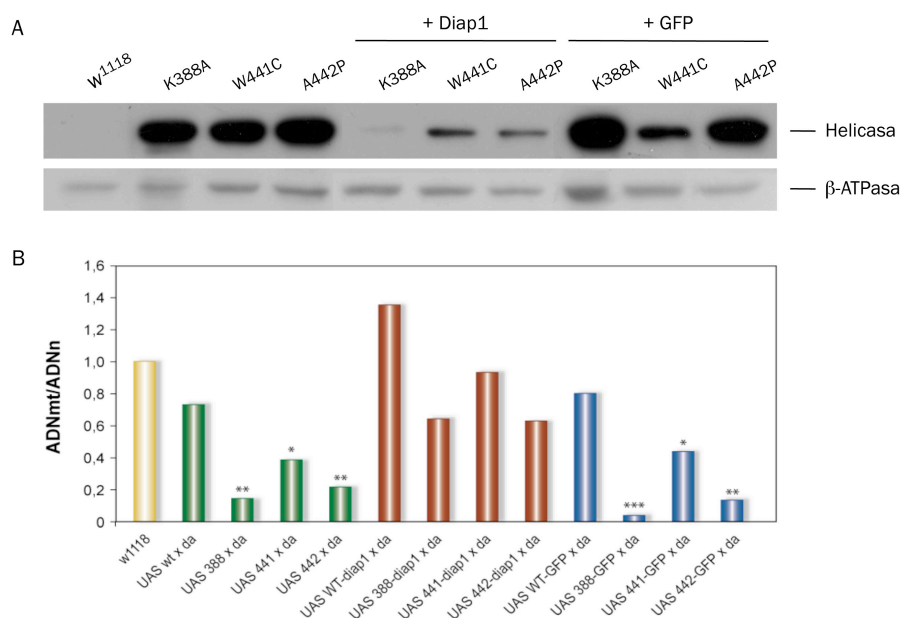


Figura 26. Cuantificación de los niveles de la proteína *d-mtHelicasa* y ADNmt de larvas de tercer estadio de los cruces UAS-mtHelicasa x da-GAL4 y su coexpresión con la proteína Diap-1 y GFP. A) Western Blot. 30 μ g de proteína mitocondrial se cargaron en un gel de acrilamida 12% SDS/PAGE, se separaron electroforéticamente, y una vez transferidos a nitrocelulosa se incubaron con los anticuerpos correspondientes como se indica en materiales y métodos. Se observa una disminución de los niveles de la *d-mtHelicasa* en la coexpresión con Diap1 y GFP, siendo más drástica en el primer caso. B) Cuantificación de

los niveles de ADNmt mediante qPCR. Los resultados muestran un aumento de los niveles de ADNmt en los rescates de las distintas mutaciones con Diap-1. El grado de significación estadística se indica como *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

1.1.7. Caracterización fenotípica y molecular del efecto de la mutación W441C en adultos de *Drosophila*

Los pacientes portadores de mutaciones en el gen *d-mthelicasa* causantes de adPEO, presentan manifestaciones clínicas en edades comprendidas entre los 20 y los 40 años de edad, probablemente debido a que la helicasa mutante solo ocupa un porcentaje de las subunidades del hexámero que constituye la helicasa funcional. Dado que en la línea de *Drosophila* que sobreexpresa la mutación W441C los individuos alcanzan el estadio adulto a pesar de inducir una moderada depleción del ADNmt, podría tratarse de un buen modelo para estudiar los efectos de una mutación de patogenicidad leve. Para ello se realizaron curvas de longevidad con el objeto de ver si la mutación W441C producía algún tipo de fenotipo a lo largo de la vida adulta en tejidos postmitóticos. El comportamiento de la línea que sobreexpresa la mutación, era similar a la de la línea utilizada como control (UAS-mtHelicasa-WT), aunque se puede observar una ligera disminución en la vida media de la población (Figura 27), y por tanto el efecto a nivel poblacional es muy moderado.

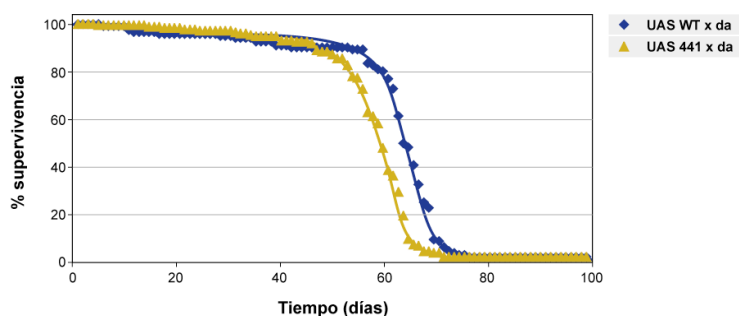


Figura 27. Curvas de longevidad de adultos de los cruces UAS-WT x da-GAL4 y UAS-441 x da-GAL4. Para llevar a cabo estas curvas, se partió de 100 machos adultos para cada una de las líneas. Se observa una ligera disminución de la vida media de la población de la línea que expresa la mutación comparada el control (UAS WT x da-GAL4).

Para estudiar el posible efecto de la *d-mtHelicasa* que porta la mutación W441C sobre la replicación del ADNmt se cuantificó la cantidad de ADNmt por qRT-PCR en la línea mutante y en la control a lo largo de la vida adulta, en individuos de cinco, veinticinco y cincuenta días de edad.

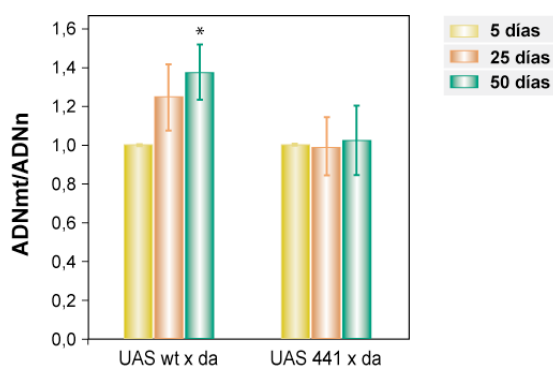


Figura 28. Cuantificación de los niveles de ADNmt en adultos de las líneas que sobreexpresan la versión WT y W441C de la *d-mtHelicasa* por qRT-PCR (cruces UAS-WT x da-GAL4 y UAS-441 x da-GAL4). El grado de significación estadística se indica como * $p < 0.05$.

Como se muestra en la Figura 28, el único cambio significativo en los niveles de ADNmt que hemos detectado es un ligero aumento en el control UAS-mtHelicasa WT x da-GAL4, que probablemente no tiene ninguna incidencia funcional. Estos resultados están de acuerdo con los

publicados previamente por nuestro grupo (Calleja et al. 1993), en el que describimos, que al contrario de lo que sucede en otros organismos, la cantidad de ADNmt no varía durante el envejecimiento de *Drosophila*. Por tanto, la *d-mtHelicasa* portadora de la mutación W441C no parece inducir ningún efecto en la replicación del mtDNA ni durante el desarrollo embrionario ni en tejidos postmitóticos durante el envejecimiento, aunque la ligera disminución que provoca en la vida media de la población (60 vs 68 días) sugiere que se puede estar produciendo algún cambio que origina una respuesta a nivel de organismo, y que será interesante estudiar en el futuro.

1.2. Sobreexpresión en tejidos específicos

Como se ha comentado previamente, la clínica de las patologías de origen mitocondrial se manifiesta en la mayor parte de los casos en tejidos de alta demanda energética como son músculo y sistema nervioso. Teniendo en cuenta esta característica, se seleccionaron trans-activadores GAL4 con promotores específicos de músculo y ojo de *Drosophila* para sobreexpresar las diferentes versiones del gen *d-mthelicasa* con el sistema UAS-GAL4, y así poder caracterizar el fenotipo producido en los tejidos más afectados en las enfermedades mitocondriales.

1.2.1. Fenotipo muscular en *Drosophila melanogaster*

Para llevar a cabo la sobreexpresión en músculo, se utilizaron dos trans-activadores con promotores musculares, *mef2* y 1151, siendo este último de expresión más fuerte que el anterior. Para el primero de ellos, se observó que la sobreexpresión en la línea K388A tenía como consecuencia problemas de movilidad y una disminución de la esperanza de vida. Sin embargo, la sobreexpresión en las otras líneas mutantes no tenía fenotipo aparente. Cuando se llevó a cabo la sobreexpresión con el trans-activador 1151, se observó que en la línea K388A se producía un 100% de letalidad tras la eclosión de la pupa. La línea A442P presentaba con este mismo trans-activador un problema de movilidad y una disminución de la esperanza de vida. Para las líneas WT (control) y W441C no se observó fenotipo aparente. Además, resultados preliminares de microscopía electrónica en estas líneas mutantes, mostraron alteraciones en la estructura de las mitocondrias y una desorganización de las fibras musculares (datos no mostrados).

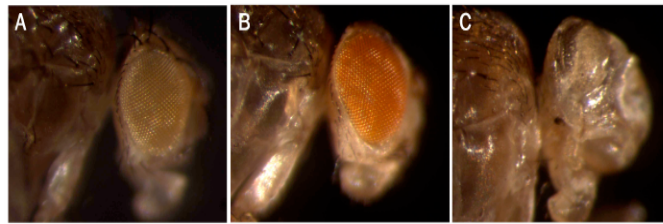
1.2.2. Fenotipo en el ojo de *Drosophila melanogaster*

El ojo de *Drosophila* proporciona un buen modelo para el estudio de genes implicados en diversos procesos celulares, ya que permite observar el fenotipo en el individuo adulto de manera sencilla y rápida. Ello permite estudiar genes que inducen letalidad cuando se sobreexpresan de manera constitutiva y ubicua al ser esenciales en el desarrollo embrionario. Se seleccionó un trans-activador GAL4 con el promotor del gen *eyeless*, ortólogo del gen *Pax6* en humanos (Quiring et al. 1994). Se observó que mientras la sobreexpresión de las líneas W441C y A442P no producía un fenotipo significativo, la línea K388A, que sobreexpresa la mutación en el dominio helicasa del gen *d-mthelicasa*, tenía como consecuencia la degeneración del ojo de los individuos adultos (Figura 29).

Aunque en el presente trabajo no se han realizado experimentos adicionales, se trata de la primera vez que se observa una degeneración del ojo de *Drosophila* inducido por una disfunción mitocondrial. Esto abre la posibilidad de utilizar este sistema en un futuro para realizar screenings de

modificadores fenotípicos de manera similar al utilizado en el estudio de diversas enfermedades neurodegenerativas (Bilen and Bonini 2005).

Figura 29. Sobreexpresión del gen *d-mthelicasa* en sus distintas versiones, en el ojo de *Drosophila melanogaster* A) Ojo de la línea parental *eyeles-GAL4*. B) Sobreexpresión de la mutación W441C en el que no se observa fenotipo aparente. C) Sobreexpresión de la línea K388A que provoca un ojo aberrante.



2. Generación de un fenotipo mutador del ADNmt en *Drosophila melanogaster*

Como se ha comentado previamente, existen una gran cantidad de métodos y estrategias genético-moleculares disponibles en *Drosophila melanogaster*, lo que hace de este organismo un sistema con grandes posibilidades para modelizar patologías mitocondriales humanas. La mayor parte de las estrategias utilizadas hoy en día, se basan en el análisis de mutantes de falta de función y el la sobreexpresión de genes portadores de mutaciones patogénicas específicas utilizando el sistema UAS-GAL4. Desgraciadamente, la capacidad de llevar a cabo reemplazamiento génico, una estrategia experimental ampliamente utilizada en otros sistemas biológicos, sigue siendo uno de los mayores retos en *Drosophila*. En los últimos años, K. Golic y colaboradores han desarrollado un nuevo método de recombinación homóloga para llevar a cabo la sustitución alélica, basado en la capacidad recombinogénica de la roturas de doble hebra de ADN en *Drosophila* (Rong and Golic 2000) lo que ha abierto las puertas para poder utilizar esta metodología de un modo eficaz.

En este contexto, el segundo objetivo de nuestro trabajo se ha centrado en desarrollar en *Drosophila* un modelo de patología mitocondrial asociado a mutaciones en la ADN polimerasa γ utilizando la tecnología de recombinación homóloga. Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que la sobreexpresión, utilizando métodos basados en el sistema UAS-GAL4, de la versión silvestre del gen *Pol γ - α* (*POLG* en humanos), que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa γ , es letal en estadio de pupa, lo que imposibilita el estudio de mutaciones asociadas a este gen utilizando dicha metodología (Lefai et al. 2000b). Por ello, hemos diseñado una nueva estrategia que nos permite utilizar el reemplazamiento génico por recombinación homóloga. Nuestro objetivo ha sido poner a punto la metodología e introducir variantes del gen *Pol γ - α* con mutaciones que han sido caracterizadas funcionalmente en estudios previos y/o que han sido asociadas a diversas enfermedades mitocondriales. De las aproximadamente 160 mutaciones que se han identificado en el gen *POLG* (<http://tools.niehs.nih.gov/polg>) una gran parte están conservadas en el gen ortólogo *Pol γ - α* de *Drosophila*. De ellas se seleccionaron en colaboración con el grupo de la Dra. Kaguni las siguientes mutaciones (Figura 30B): Y873C (Y955C en humanos) e Y869F (generada en el laboratorio de la Dra. Kaguni) que se localizan en el dominio polimerasa, y la mutación F578A situada en el elemento γ 3 de la región espaciadora para la cual se han

caracterizado los defectos bioquímicos que provoca (Luo and Kaguni 2005). Además, se ha seleccionado una doble mutación (D185A y D263A) en los residuos activos de aspartato del dominio exonucleasa, los cuales eliminan la actividad correctora de la ADN polimerasa γ (Figura 30B), y por tanto permitiría aumentar la tasa mutacional del ADNmt, generando un fenotipo mutador en *Drosophila*. Es importante resaltar, que el gen *POLG* es el gen nuclear en el que se han descrito más mutaciones asociadas a una amplia variedad de enfermedades mitocondriales humanas (S. S. Chan and Copeland 2009), y por tanto la puesta a punto de un modelo animal donde poder estudiar el efecto de las diferentes mutaciones sería un avance sustancial en el campo.

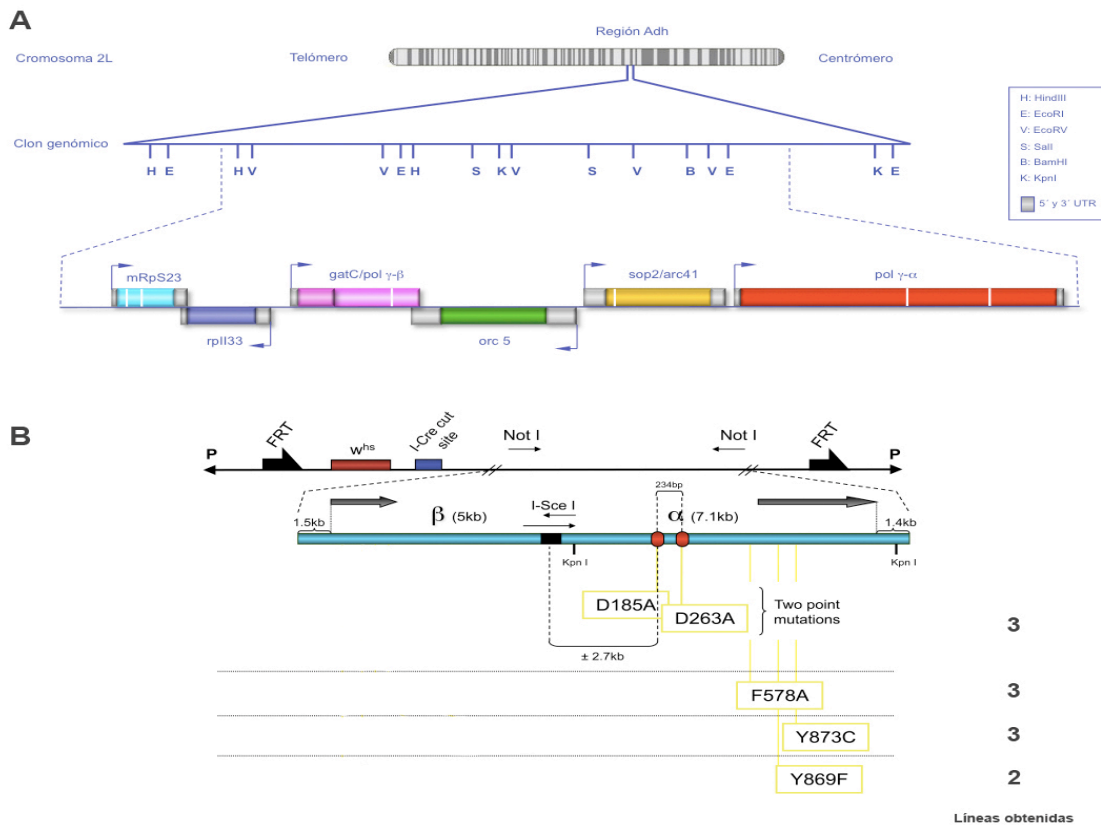


Figura 30. Estructura del cluster POLG y localización de las mutaciones generadas en el gen Poly- α . A) Representación esquemática de la estructura de la región genómica correspondiente al cluster POLG de *Drosophila melanogaster*. Esta región del cromosoma 2L contiene siete genes fuertemente compactados: mRPS23 (proteína ribosomal mitocondrial S23), rpl133 (subunidad de 33 kDa de la RNA polimerasa II), gatC (subunidad C de la glutamil tRNAGln amidotransferasa), Poly- β (subunidad accesoria de la ADN polimerasa mitocondrial), orc5 (subunidad del complejo de reconocimiento de orígenes de replicación), sop2 (subunidad del complejo arc) y Poly- α (subunidad catalítica de la ADN polimerasa mitocondrial). B) Se amplificó por PCR aproximadamente 12kb de ADN de la región genómica del cluster POLG de *D. melanogaster* y se clonó en el vector pBluescript. Para simplificar, sólo se esquematizan los genes Poly- α y Poly- β . El sitio de corte para la endonucleasa Sce-I se ha introducido entre ambos genes, siendo usada esta construcción para generar mutaciones específicas (cajas amarillas) en las región codificante del gen Poly- α . Cada una de las regiones genómicas modificadas se clonaron en los sitios NotI del vector pTV2, y la orientación del inserto se confirmó por digestión con KpnI. Estas construcciones fueron utilizadas para generar moscas transgénicas por procedimientos rutinarios. Se muestra el número de líneas obtenidas para cada mutación.

El primer paso de la técnica consiste en generar un fragmento donador, que contenga la

mutación específica, clonado en un vector adecuado, pTV2 (ver materiales y métodos), que se utiliza para generar moscas transgénicas que porten dicho fragmento. Se ha descrito que para que la eficiencia de recombinación entre el elemento donador y el locus endógeno sea lo más alta posible, el tamaño de la región homóloga donadora debe ser mayor de 4,5kb. En nuestro caso hemos utilizado un fragmento de aproximadamente 12kb que contiene los genes *Poly- α* y *Poly- β* al que hemos introducido un sitio Scel entre ambos (Figura 30A). Este fragmento pertenece a una región genómica localizada en el brazo cromosómico 2L, que contiene un cluster con seis genes (Lefai et al. 2000a), algunos de los cuales codifican proteínas implicadas en biogénesis mitocondrial.

En primer lugar hemos generado líneas transgénicas conteniendo el fragmento donador para todas las mutaciones seleccionadas según se describe en materiales y métodos y se resume en la Figura 30. Para el desarrollo de este trabajo, y para tratar de optimizar la técnica descrita por Golic y colaboradores, se escogió para continuar con la estrategia metodológica la doble mutación D185A/D263A que elimina la capacidad correctora del enzima (a la que nos referiremos como *exo*).

2.1. Generación de líneas transgénicas

Para generar las líneas transgénicas se llevaron a cabo protocolos estándar de microinyección a partir de una construcción de 22kb. Para ello, microinyectamos alrededor de 1500 embriones en dos tandas distintas, de las cuales obtuvimos tres líneas transgénicas para la doble mutación. La eficiencia de la transgénesis fue muy baja (aproximadamente 0,2%), pudiéndose explicar por el gran tamaño de la construcción de partida. Una vez obtenidas las líneas transgénicas originales, se llevó a cabo un mapeo cromosómico para determinar el lugar de inserción usando para ello líneas dobles marcadas-doble balanceadas, obteniéndose los siguientes resultados:

- w;Cyo/lf;20.1/TM6B,tb – Cromosoma III (no viable en homocigosis): línea 20.1
- w;30.1;TM6B,tb/MKRS – Cromosoma II (viable en homocigosis): línea 30.1
- w;40.1/Cyo;TM6B,tb/MKRS – Cromosoma II (no viable en homocigosis): línea 40.1

2.2. Ends-in: reemplazamiento génico

Partiendo de las líneas obtenidas previamente, 30.1 y 40.1, se comenzó el proceso de generación del reemplazamiento génico (knock-in) mediante la técnica de Ends-in. Esta metodología consta de dos eventos de recombinación homóloga. Tras el primer evento se introduce la versión mutada del gen de interés (en nuestro caso *Poly- α*) en el locus del gen silvestre produciendo así una estructura duplicada (tándem *gen mutante-w⁺-gen wt*). En un segundo evento de recombinación homóloga, la estructura duplicada se reduce a una sola copia, eliminando la copia silvestre y el gen marcador *white⁺* y dejando la versión mutada, en el caso del knock-in, o viceversa en el caso de ser eliminada la versión mutada, obteniendo así un control que ha sufrido todo el proceso (Figura 31).

2.2.1. Primer evento de recombinación homóloga: generación de la estructura en tándem

Dado que existe una gran variabilidad de la eficiencia del proceso en función de la línea transgénica de partida, se seleccionaron las líneas 30.1 y 40.1 para realizar los diferentes pasos de la misma.

Para simplificar, en el esquema del proceso nos referiremos a ambas líneas como P{gen^mw+}, refiriéndose a gen mutado y gen marcador *white*⁺ que es el responsable del fenotipo de ojos rojos que se puede seguir en este primer evento. Como se muestra en el esquema 1, en un primer paso se cruzaron las líneas transgénicas originales con un stock que expresa la FLP y la endonucleasa I-SceI con un promotor de choque térmico. Con ello, se provocó el salto de la inserción original, su circularización debido al sitio FRT y su posterior linearización por el corte con I-SceI. Esto produce un enfrentamiento de la región donadora con su región homóloga en el locus diana, produciendo un evento de recombinación homóloga y como consecuencia una estructura en tándem *gen mutante-wt* (Figura 31A y Esquema 1).

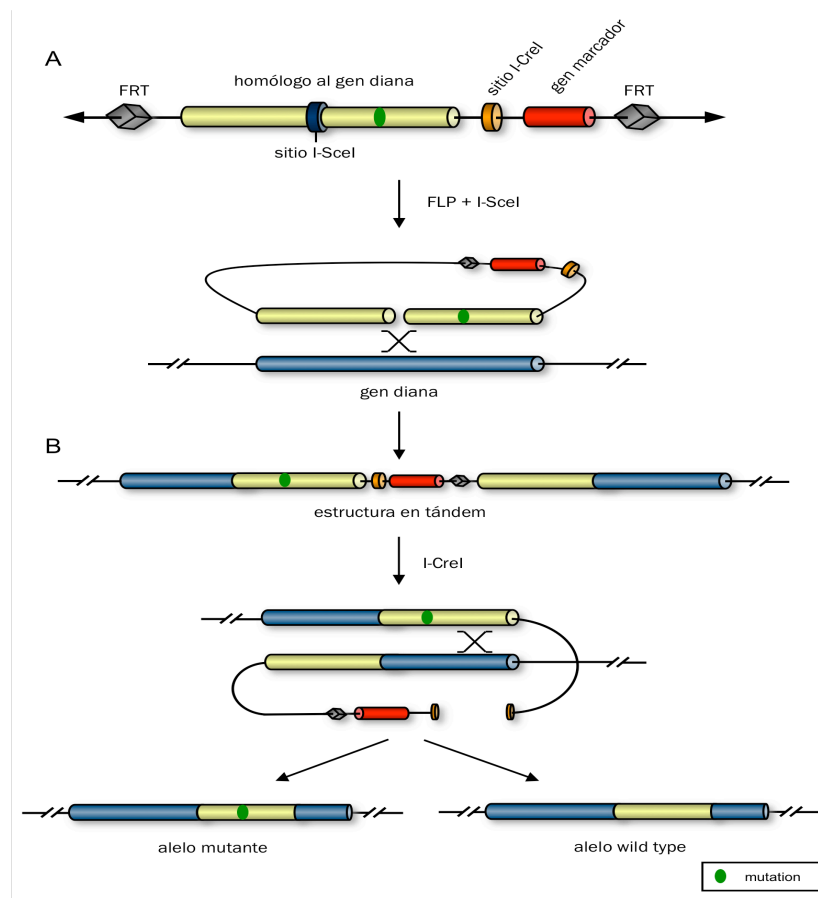
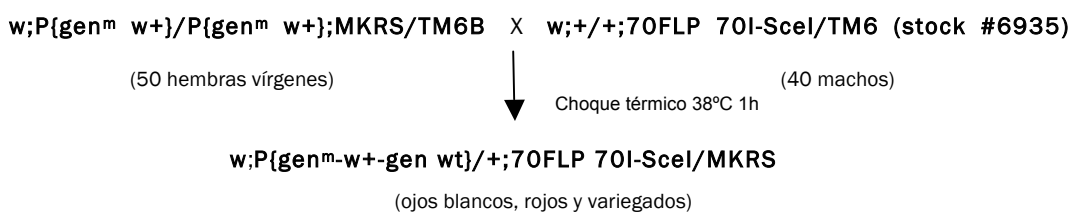


Figura 31. Reemplazamiento génico en *Drosophila melanogaster*. A) Técnica Ends-in y los elementos de la construcción donadora. Tras la transgénesis la acción combinada de la flipasa (FLP) y la endonucleasa I-SceI genera un molde recombinogénico, el cual produce la duplicación en el locus del gen diana por recombinación homóloga. B) Reducción de la estructura en tándem generada. La rotura de doble hebra producida por la endonucleasa I-CreI induce un segundo evento de recombinación. Esta técnica introduce una mutación puntual (punto verde) en uno de los alelos del gen diana.

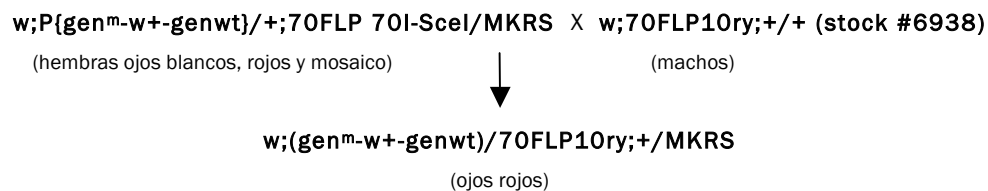
Esquema 1:



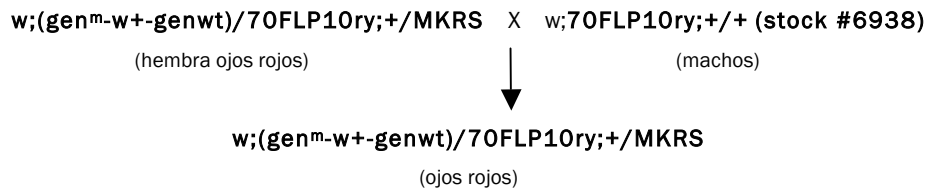
En la descendencia de este primer cruce, la línea somática y germinal pueden haber tenido diferentes eficiencias de corte y recombinación, por lo que existe poca relación entre el fenotipo producido por el gen marcador *white*⁺ y el genotipo de la línea germinal. Por ello, se recogieron hembras de ojos blancos, rojos y variegados con el genotipo adecuado para llevar a cabo un rastreo de aquellos eventos de recombinación correctos y así descartar los producidos de forma errónea o incompleta o en líneas somáticas, dado que son los producidos en la línea germinal los que interesan para el proceso. Con este objetivo se llevó a cabo dos rondas de confirmación en la que se cruzaron los individuos obtenidos de ojos blancos, rojos y variegados con un stock que porta una flipasa (FLP). En el elemento donador, el gen *white*⁺ está flanqueado por secuencias FRT mientras que en el elemento diana recombinado no está presente. Cuando se produce la recombinación homóloga, el fenotipo *white*⁺ es invisible a la ruptura o corte inducido por FRT, por lo que el rastreo basado en FLP permite diferenciar claramente los elementos recombinados de los que no han sufrido la recombinación (Esquema 2).

Esquema 2:

1ª ronda confirmación

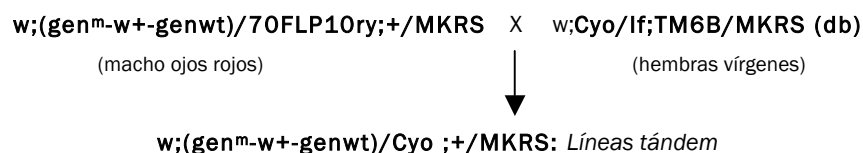


2ª ronda confirmación



Aquellos elementos que no hayan recombinado, sufrirán un corte provocado por la FLP lo que conllevará una circularización del elemento insertado y su posterior degradación. Posteriormente, las líneas resultantes se cruzaron con un stock doble marcado-doble balanceado (db) para eliminar la FLP del cromosoma dos ya que podría interferir en el proceso (Esquema 3).

Esquema 3:



Tras este proceso se obtuvieron 23 líneas independientes, las cuales denominaremos líneas tándem, que debían de haber sufrido la primera recombinación homóloga y por tanto tendrían que tener la estructura en tándem *gen mutado-w⁺-gen wt*. Para comprobar que existe esta estructura, se realizó un análisis en southern blot tras digerir con las enzimas de restricción XbaI y BspHI que

permitieran identificar la estructura en tándem (Figura 32A). El corte de estas enzimas producía un patrón específico, donde los fragmentos esperados eran de 6,5 kb en el caso de las líneas control y 6,5 y 3,5 kb en aquellas líneas portadoras de la estructura en tándem. Para poder visualizarlo se utilizó la sonda de gen *Poly-β/GatC* marcada con ³²P-dCTP (Figura 32B).

Además, para confirmar la presencia de la doble mutación en esta estructura, se secuenció la zona que contiene dichas mutaciones observando un doble pico en los nucleótidos en los que se había introducido el cambio. Los datos de secuencia confirmaron la presencia de la mutación y que ésta se encuentra en proporción 1:2 con respecto al alelo silvestre (Figura 32C). Con estos resultados se comprobó que para las 23 líneas tándem obtenidas, el primer evento de recombinación homóloga se había producido de forma correcta.

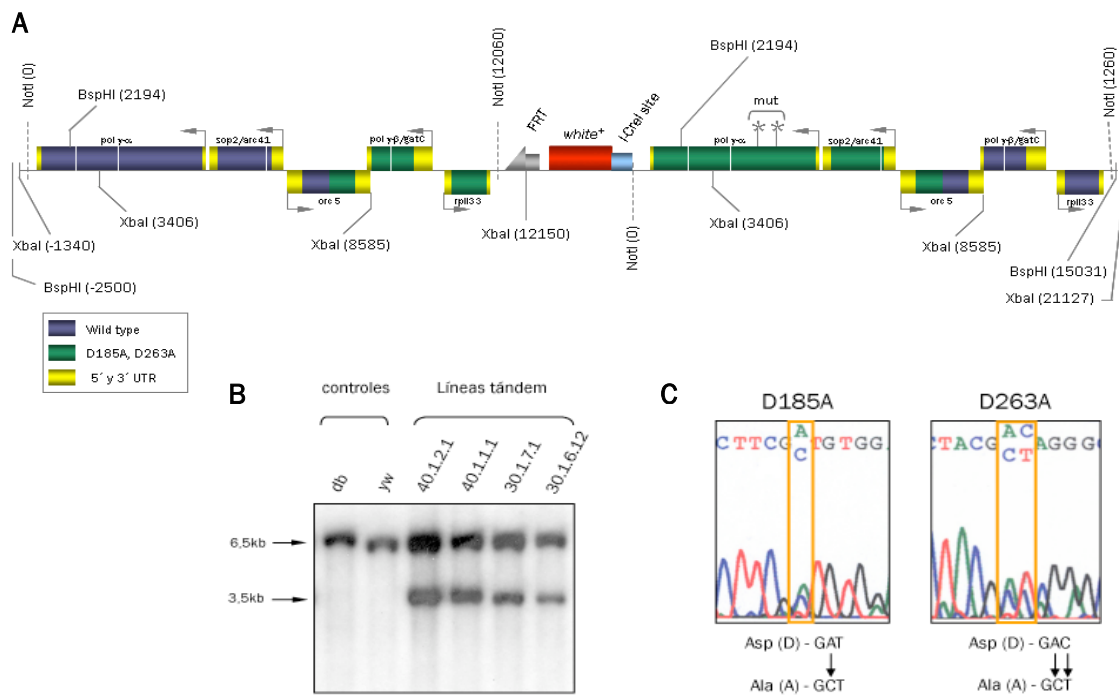


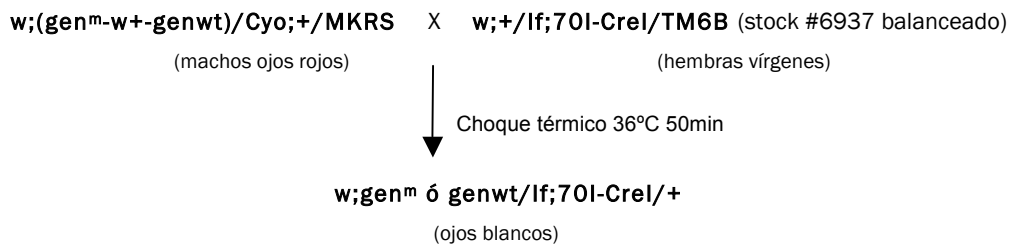
Figura 32. Comprobación de la estructura en tándem. A) Mapa de restricción del locus genómico en el que se incluye la estructura en tándem *gen wt-w⁺-gen mut*. B) Southern Blot de algunas de las líneas tándem seleccionadas. La digestión con la enzimas de restricción XbaI y BspHI e hibridación con la sonda del gen *poly-β/gatC*, proporciona un patrón de bandas característico: 6,5kb para los controles (líneas control que no han sufrido el proceso y que por tanto no tienen el tándem) y 6,5kb y 3,5kb para las líneas tándem. (*db*) stock doble marcado, doble balanceado, (*yw*) stock silvestre. C) Secuenciación con los oligos Polga-Dir y Polga-Rev, en los que se observa la presencia de las mutaciones D185A y D263A en heterocigosis.

2.2.2. Segundo evento de recombinación homóloga: reducción del tándem

Tras comprobar que el primer evento de recombinación homóloga se ha producido correctamente, se llevó a cabo un análisis fenotípico de las líneas tándem no observándose un fenotipo anómalo aparente. Se seleccionaron algunas de estas líneas para llevar a cabo el segundo paso de la técnica Ends-in. Para ello, éstas se cruzaron con un stock que expresa la endonucleasa I-Cre1 bajo el promotor sensible a temperatura Hsp70. Esta enzima genera un corte en la cadena de doble hebra de ADN entre la versión silvestre y la versión mutante del tándem, lo que provoca un enfrentamiento de las dos regiones de homología presentes en el tándem. Tras ello, los mecanismos endógenos de

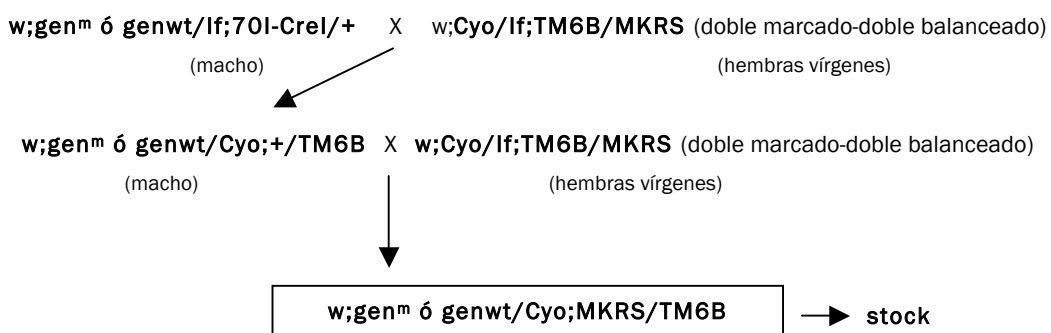
reparación mediante recombinación homóloga provocan la pérdida del gen marcador *white*⁺ y una de las copias del gen. Si la copia eliminada es la versión mutada, se obtiene un control silvestre del proceso, mientras que si la eliminada es la copia endógena se obtiene el knock-in para el gen Poly- α (Figura 31B). Tras este segundo evento de recombinación homóloga, se seleccionaron aquellos machos de ojos blancos debido a que la descendencia con el genotipo adecuado ha perdido el gen marcador *white*⁺, responsable del color de ojo (Esquema 4).

Esquema 4:



La eficiencia de este cruce, y por tanto los individuos obtenidos del genotipo adecuado fue muy baja. Esto es esperable, ya que la endonucleasa I-CreI tiene sitios de corte en los cromosomas X e Y, lo que podría producir letalidad. Por ello se varió la temperatura y tiempo de choque térmico con el objetivo de establecer un punto de equilibrio entre éstos y la eficiencia del proceso estableciéndolo en 50 minutos a 36°C. Posteriormente, y una vez seleccionada la descendencia adecuada, se eliminó la endonucleasa I-CreI de las líneas obtenidas para evitar cortes inespecíficos, ya que niveles basales de este enzima a 25°C son suficientes para efectuar dicha función. Para ello, se cruzaron machos individuales con un stock doble marcado-doble balanceado dos veces para establecer las líneas finales (Esquema 5).

Esquema 5:



2.2.3. Caracterización de las líneas obtenidas

Una vez obtenidas las líneas finales, se caracterizó molecularmente cada una de ellas con objeto de establecer si el proceso se había producido correctamente. Para ello se diseñó una estrategia de RFLP tal y como se describe en materiales y métodos. De las aproximadamente 400 líneas analizadas, se obtuvieron dos positivas (9.20 y 9.106) para la doble mutación (Figura 33A), lo que indicaban que eran líneas knock-in *exo*. El resto de las líneas habían por tanto retenido el alelo silvestre y eliminado la copia mutada, estableciéndose como controles del proceso. Estos resultados

indican que la eficiencia del proceso ha sido del 0,5%, dato que se corresponde con lo descrito para esta técnica (Rong et al. 2002). Tras el análisis por southern blot se observó que para las líneas finales que no portaban la doble mutación, siendo por tanto líneas control, la reducción del tándem se produjo de forma correcta, dado que el patrón de bandas esperado correspondía con las líneas control (Figura 33B), mientras que para las líneas *exo* la reducción se habría producido de forma incorrecta o incompleta como se puede ver en la Figura 33C. Para descartar la inserción de secuencias de la construcción utilizada en otras regiones cromosómicas, y tal como se ha descrito en la bibliografía (O'Keefe and Richards 2006), se realizaron retrocruces de las líneas knock-in con líneas doble marcadas-doble balanceadas, con el objetivo de eliminar el fondo genético aberrante que se haya podido producir como consecuencia del proceso. Sin embargo, el análisis molecular después de más de seis cruces confirmó que la zona genómica estaba alterada y que la recombinación no se había realizado de un modo correcto.

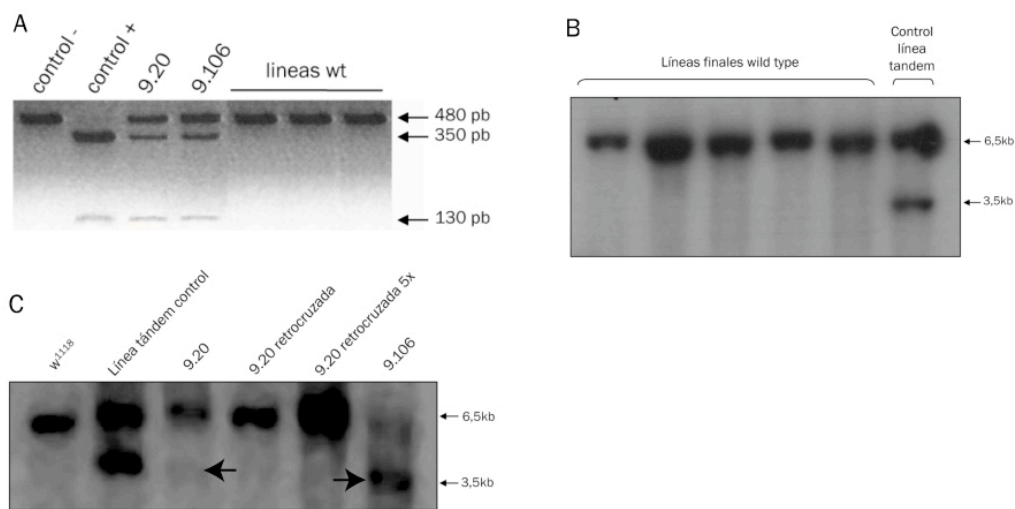


Figura 33. Caracterización molecular de las líneas finales. A) Análisis mediante RFLP según se describe con detalle en Materiales y Métodos. El control negativo procede de una línea silvestre *w¹¹¹⁸* la cual no tiene diana para *Xho*I. El control positivo corresponde a la amplificación y digestión del vector pTV2 que porta la doble mutación. 9.20 y 9.106, posibles líneas knock-in con las mutaciones *exo* en heterocigosis y líneas silvestres que no portan la doble mutación. B) Southern Blot de las líneas finales y una línea que contiene la estructura en tándem utilizada como control en los que se observa la reducción del tándem mediante la desaparición del fragmento de 3,5 Kb (ver Figura 32). C) Análisis mediante Southern Blot de líneas knock-in con los controles correspondientes. Se observa una estructura genómica aberrante en las líneas 9.20 y 9.106 (flechas). La línea 9.20 tras cruzarla sucesivas veces con una línea doble marcada-doble balanceada para eliminar el fondo genético aberrante, parece tener un patrón similar a control.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos y para determinar la presencia de la doble mutación en adultos de las líneas heterocigóticas obtenidas, se amplificó por PCR, a partir de ADN genómico, la región que abarca dichos cambios para posteriormente clonarlo en el vector pGEMT-easy (ver materiales y métodos). Tras la transformación de estos plásmidos en la cepa bacteriana DH5 α se obtuvieron colonias independientes, las cuales fueron secuenciadas para determinar la presencia de la mutación *exo*. De esta manera es posible discernir la presencia de alelos distintos para un determinado gen en las líneas obtenidas. Se observó que en las líneas heterocigóticas para las mutaciones *exo*, se pueden diferenciar claramente los dos alelos correspondientes a la versión

silvestre y a la versión mutante (Figura 34A). Además, no se observaron individuos adultos homocigóticos, distinguibles por la ausencia del balanceador *Cyo* (ver Esquema 5), pudiendo por tanto ser la mutación *exo*-letal en estas condiciones. Dadas las características de este marcador, no se podía descartar que los individuos homocigóticos fuesen viables hasta el estadio de larva o pupa. Para poder distinguir éstos, se cruzaron las líneas 9.20 y 9.106 con una línea que portaba los balanceadores *SM5-TM6B,tb*, sustituyendo el balanceador *Cyo*. Gracias a la presencia de la mutación *tubby* (*tb*) en este balanceador, es posible distinguir las larvas heterocigóticas (*tubby* positivas) de las homocigóticas (*tubby* negativas), ya que provoca que tanto las larvas como las pupas sean más pequeñas y engrosadas. Analizando cada una de las líneas independientemente se observó que existían larvas y pupas homocigóticas en la línea 9.106, obteniéndose una letalidad del 100% en este último estadio. Sin embargo, las larvas homocigóticas en la línea 9.20 eran incapaces de ascender por la pared del tubo obteniéndose una letalidad del 100% en tercer estadio larvario temprano (Figura 34C). Para comprobar si las mutaciones también estaban presentes, en homocigosis, se secuenció la región correspondiente a la doble mutación de estas larvas. Sorprendentemente, se observó que aún siendo fenotípicamente homocigóticas, en las posiciones correspondientes a cada una de las mutaciones, aparecían picos dobles, lo que indicaba que en estas líneas homocigóticas estaban presentes tanto el alelo silvestre como el mutado (Figura 34B).

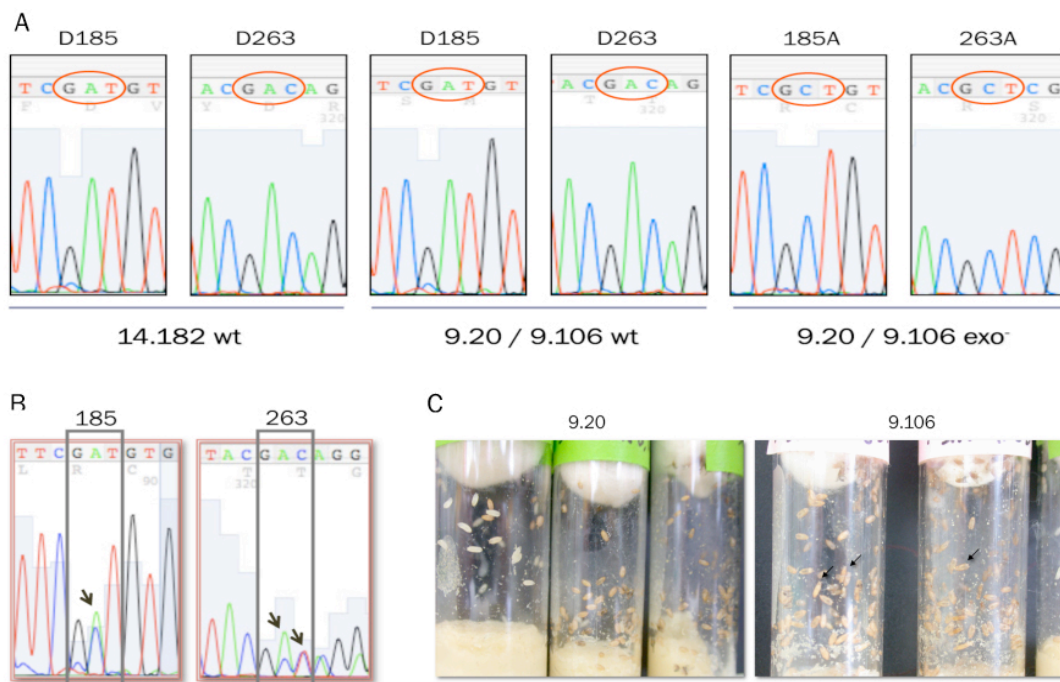


Figura 34. Caracterización molecular y fenotípica de las líneas obtenidas. A) Secuenciación de clones independientes correspondientes a los alelos de adultos heterocigóticos de las líneas 9.20, 9.106 y una línea control 14.182, obtenidos por amplificación por PCR, clonaje en el vector pGEM-T easy y posterior secuenciación con los oligos Polga Dir y Polga Rev. Se muestran los alelos silvestre y mutado de las distintas líneas. B) Secuenciación con los oligos anteriormente mencionados de un fragmento de PCR amplificado a partir de ADN total extraído de larvas homocigóticas de las líneas knock-in donde se muestran los picos dobles correspondientes a la presencia de los alelos silvestre y mutado (flechas). C) Fenotipos de las líneas 9.20 y 9.106. Se observa que en la línea 9.20 ninguna larva homocigótica (*TM6B,tb*) asciende por la pared del tubo, mientras que en la línea 9.106 las larvas homocigóticas (*TM6B,tb*) llegan a pupar por la pared del tubo sin llegar a eclosionar (flechas).

Tras estos resultados se pensó que podría existir alguna anomalía genómica dentro de la zona recombinada o fuera de ella. Para evidenciarlo, se llevó a cabo un test de complementación génica entre ambas líneas knock-in, para lo cual se cruzaron entre sí. Este ensayo es capaz de discernir entre anomalías en distintas posiciones del genoma de ambas líneas, donde existirá complementación y se obtendrán individuos homocigóticos en la descendencia, y alteraciones idénticas entre ambas, donde no existiría complementación y por tanto no se obtendrán individuos homocigóticos. No se obtuvo en ningún caso complementación entre ambas líneas, indicando que el fenotipo era debido a la presencia de las mutaciones o alteraciones que afectaban a la misma región, probablemente dentro de la región recombinada, y no por ninguna alteración distinta originada en otra localización cromosómica.

A la vista de estos resultados, se obtuvieron, tras todo el proceso de Ends-in, varias líneas que han eliminado la copia mutada y por tanto son controles perfectos para el posterior análisis. Sin embargo, las líneas knock-in generadas han podido sufrir alguna alteración en la región debido a un proceso de recombinación defectuoso, algo que podría explicar la presencia tanto del alelo silvestre como del mutante en las larvas homocigóticas. Actualmente, estamos llevando a cabo diversas estrategias experimentales para caracterizar tanto la estructura genómica correspondiente al cluster como el fenotipo de estas dos líneas knock-in.

2.3. Sobreexpresión de la ADN polimerasa γ - α deficiente en reparación en adultos de *Drosophila melanogaster*

Como se ha comentado anteriormente, resultados previos de nuestro grupo habían demostrado que la sobreexpresión de la subunidad catalítica de la ADN polimerasa γ (*Pol γ - α*), en su versión silvestre, de forma constitutiva y desde las etapas embrionarias, es letal en estadio de pupa. Además, en estos individuos existe una fuerte depleción del ADNmt, siendo ésta la causa probable de la letalidad (Lefai et al. 2000b). Por ello, se utilizó un sistema UAS-GAL4 inducible por la hormona mifepristona (RU486), que activa al factor de transcripción GAL4 uniéndose a una forma inactiva del mismo y por tanto permite inducir el sistema suministrándola en la comida de los individuos adultos (ver materiales y métodos). Esta estrategia permite sobreexpresar el gen *Pol γ - α* tanto en su versión silvestre como en la *exo* específicamente en el estadio adulto, evitando así los problemas ocasionados por la sobreexpresión desde el estadio embrionario.

Para realizar los experimentos se seleccionó una línea Switch-GAL4 que porta el gen que codifica para el factor GAL4 bajo el promotor del gen de la cadena pesada de la miosina de músculo (MHC), ya que es un tejido de alta demanda energética muy dependiente de la función mitocondrial. Las líneas UAS-PolG utilizadas habían sido generadas previamente en el laboratorio (Lefai et al. 2000b) y llevan tanto la versión silvestre del gen *Pol γ - α* como una versión mutada en las posiciones D185A/D263A que eliminan su capacidad de corregir errores (*exo*).

Para inducir la expresión del transgén, la descendencia del cruce UAS-PolG wt ó *exo* x Switch-GAL4, y por tanto con el genotipo UAS-PolG;Switch-GAL4, se traspasaron a tubos en presencia de la hormona RU486 (RU). Con objeto de comprobar que la proteína *Pol γ - α* , tanto en sus versiones silvestre como *exo* se estaban sobreexpresando correctamente se realizó un análisis en Western de

proteína mitocondrial extraída de adultos, utilizando un anticuerpo policlonal cedido amablemente por la Dra. Kaguni. Los resultados se muestran en la Figura 35A. Tras comprobar que el sistema inducible estaba funcionando correctamente, se llevó a cabo una curva de supervivencia con machos en los cuales se estaba sobreexpresando las dos versiones de la *Polγ-α*. Los resultados obtenidos mostraron que la vida media de la población que sobreexpresaba el gen *Polγ-α*, era inferior a la de los controles. Para la versión *Polγ-α wt* la vida media de la población era inferior (40 días) comparado con su cultivo en ausencia de la hormona (50 días), debido probablemente a la propia presencia de la hormona RU486 (Figura 35B). Este efecto es dramático en el caso de la sobreexpresión de la versión *Polγ-α exo-*, con una disminución en la vida media de la población de aproximadamente 50 a 25 días. Estos datos sugieren que como consecuencia de la ausencia de la actividad correctora de la ADN polimerasa mitocondrial, se acumulan mutaciones en el ADNmt lo que provoca una disminución de la vida media de los individuos.

Para comprobar si la cantidad de ADNmt se veía afectada como ocurriría en resultados previos, se cuantificó por qRT-PCR la cantidad de ADNmt usando sondas específicas. Se observó que para la sobreexpresión de la *Polγ-α wt* y *exo-* existía una pequeña disminución del número de copias del ADNmt comparado con los controles, debidas probablemente a la propia sobreexpresión del transgén (Figura 35C).

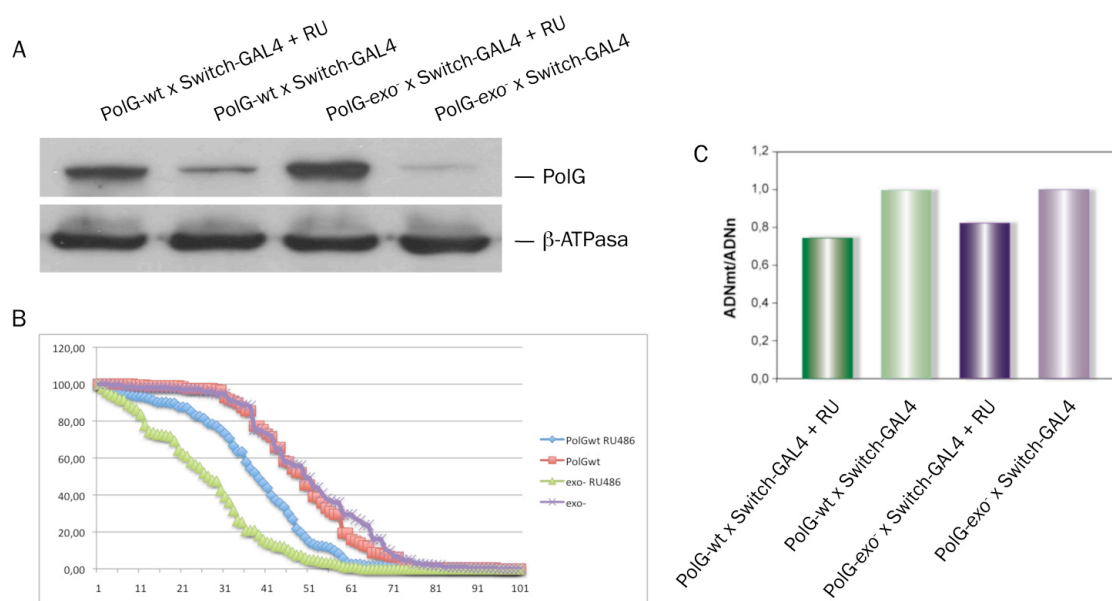


Figura 35. Caracterización de la sobreexpresión en estadio adulto de los genes *Polγ-α wt* y *Polγ-α exo-*. A) Análisis en Western blot. Se utilizaron 30µg de extractos de proteínas mitocondriales, que se separaron electroforéticamente en un gel de acrilamida 12% SDS/PAGE. La proteína Pol γ - α se detectó utilizando un anticuerpo policlonal cedido por la Dra Kaguni. Se observa un aumento de los niveles de POLG en presencia de la hormona RU486 (RU) con respecto a los controles. B) Curva de supervivencia de 100 machos adultos cultivados en presencia o ausencia de hormona según se especifica en Materiales y Métodos. Se observa una disminución en la vida media de la población que sobreexpresa la *Polγ-α exo-*, no siendo significativa las variaciones encontradas en la sobreexpresión de la *Polγ-α wt*. C) Cuantificación del ADNmt en machos de 40 días de vida que sobreexpresan el gen *Polγ-α wt* y *Polγ-α exo-* en presencia de la hormona RU486 (RU). No se observan diferencias significativas en las distintas líneas.

Discusión

1. Generación en *Drosophila melanogaster* de un modelo de disfunción mitocondrial provocado por mutaciones en el gen *d-mthelicasa* (*Twinkle*)

La disfunción mitocondrial es una de las mayores causas de enfermedad metabólica hereditaria y, adicionalmente, está asociada a numerosas enfermedades de alta prevalencia incluyendo el cáncer, diversas patologías neurodegenerativas y muy probablemente el envejecimiento fisiológico (Brandon et al. 2006; Howell et al. 2005). La enorme variedad de síntomas clínicos y diferentes enfermedades asociadas a la disfunción mitocondrial está probablemente relacionada con el amplio rango de funciones esenciales que residen en la mitocondria. A pesar de ello, la enorme mayoría de las enfermedades mitocondriales conocidas actualmente son debidas a una disfunción de la cadena respiratoria y por tanto del proceso de fosforilación oxidativa (enfermedades OXPHOS) y síntesis de ATP (Huttemann et al. 2008; Trezeguet et al. 2008).

Debido al control genético dual del proceso de síntesis de ATP, las enfermedades OXPHOS pueden estar provocadas por mutaciones en el ADNmt o por mutaciones en genes nucleares. En particular, las mutaciones en los genes que codifican factores implicados en la replicación y/o estabilidad del ADNmt ocasionan enfermedades de herencia autosómica (dominante y recesiva), que cursan con una inestabilidad secundaria del genoma mitocondrial, y se denominan por tanto defectos de comunicación intergenómica. Las alteraciones provocadas incluyen mutaciones, duplicaciones, deleciones y depleciones del ADNmt (Spinazzola and Zeviani 2005).

A diferencia de las enfermedades causadas por mutaciones primarias en el ADNmt, caracterizadas por lo heterogéneo de sus presentaciones clínicas, en las enfermedades producidas por mutaciones en el ADN nuclear es muy frecuente encontrar fenotipos mucho más homogéneos y característicos para cada gen, así como fenotipos similares para distintos genes que codifican factores que participan en el mismo proceso, con la notable excepción de los genes implicados en los defectos de comunicación intergenómica (Spinazzola and Zeviani 2009; L. J. Wong et al. 2008) que se asocian a manifestaciones clínicas muy variadas. Entre las más frecuentes se encuentra la Oftalmoplejía Externa Progresiva (PEO) de herencia autosómica dominante (adPEO) o autosómica recesiva (arPEO), una enfermedad mitocondrial asociada a la presencia de deleciones múltiples del ADN mitocondrial en tejidos postmitóticos. Se manifiesta en la edad adulta, típicamente entre los 20 y 40 años de vida, con una sintomatología variable pero que incluye siempre debilidad muscular que afecta fundamentalmente a los músculos extraoculares y, que por tanto, provoca una ptosis bilateral y una severa limitación de los movimientos del ojo. Se acompaña frecuentemente de una variedad de síntomas (PEO "plus") que incluyen intolerancia al ejercicio, ataxia, disfagia, pérdida auditiva, cardiomiopatía y neuropatía periférica (Spinazzola and Zeviani 2005). La mayoría de las familias con algún miembro afectado de PEO, portan mutaciones heterocigóticas en alguno de estos tres genes: *ANT1* (translocador de nucleótidos de adenina 1), *POLG1* (subunidad catalítica de la ADN polimerasa mitocondrial), y *Twinkle* (helicasa de ADN mitocondrial) (Gonzalez-Vioque et al. 2006; Spelbrink et al. 2001; Spinazzola and Zeviani 2005; Van Goethem et al. 2001).

Las alteraciones del ADNmt provocadas por defectos de comunicación intergenómica se puede clasificar en dos grandes grupos: alteraciones cualitativas, en forma de deleciones múltiples, o cuantitativas, en forma de depleción (Hudson and Chinnery 2006), siendo estas últimas mucho menos frecuentes. Las mutaciones en el gen *Twinkle* están principalmente asociadas a adPEO, y cursan con acúmulo de deleciones múltiples en el ADNmt, aunque recientemente se han descrito mutaciones recesivas asociadas a SANDO (Hudson et al. 2005) y ataxia espinocerebelar infantil (IOSCA) (Nikali et al. 2005).

Una de las limitaciones fundamentales en la investigación de la compleja fisiopatología de las enfermedades mitocondriales es la falta de sistemas modelo generados en animales genéticamente manipulables (Sanchez-Martinez et al. 2006; Torraco et al. 2009). En el presente trabajo hemos generado y caracterizado preliminarmente un modelo de disfunción mitocondrial en *Drosophila melanogaster* provocada por defectos de comunicación intergenómica. Para ello hemos generado moscas transgénicas que sobreexpresan tres mutaciones del gen que codifica la *d*-mtHelicasa, el gen ortólogo de *TWINKLE*: una mutación en el dominio helicasa que elimina la actividad de la proteína, K388A y dos mutaciones causantes de adPEO en humanos, W441C (W474C en humanos) y A442P (A475P en humanos).

Los grupos de Laurie Kaguni (Matsushima et al. 2008; Matsushima and Kaguni 2009) y María Falkenberg (Holmlund et al. 2009) están realizando una caracterización funcional exhaustiva de la mtHelicasa mediante mutagénesis dirigida en un clásico estudio de estructura-función, análisis bioquímicos del enzima reconstituido *in vitro* y expresión en células en cultivo transfectadas establemente. Los fenotipos de los diferentes mutantes son relativamente heterogéneos, aunque inducen usualmente depleción y/o acúmulo de deleciones múltiples del ADNmt. En particular, el efecto de las mutaciones seleccionadas para nuestro estudio ha sido caracterizado previamente en células Schneider. La sobreexpresión de las mutaciones K388A y A442P induce una severa depleción de ADNmt, mientras que la sobreexpresión de la mutación W441C no provoca ningún cambio y, en todo caso, una ligera subida de los niveles de ADNmt (Matsushima and Kaguni 2007).

En nuestro estudio, para sobreexpresar las versiones mutadas de la *d*-mtHelicasa en *Drosophila melanogaster*, hemos utilizado el sistema UAS-GAL4 que proporciona una herramienta muy poderosa para la sobreexpresión de transgenes de forma constitutiva o específica de tejido y/o tiempo de desarrollo. Los niveles de sobreexpresión dependen en gran medida del sitio de inserción del transgén en el genoma debido a la presencia de potenciadores, silenciadores o zonas de baja expresión génica en la región que flanquea el transgén. Por ello, para cada una de las mutaciones analizadas hemos generado varias líneas independientes y analizado sus niveles de expresión. Se han obtenido niveles de sobreexpresión de ARNm de cada una de las versiones de la *d*-mtHelicasa que oscilan en las diferentes líneas entre 70 y 600 veces superiores comparados con los controles. A pesar de ello, los niveles de proteína de *d*-mtHelicasa que se localiza en la mitocondria son similares en la mayoría de las líneas utilizadas, y muy superiores al nivel de expresión de proteína endógena que es prácticamente indetectable con el anticuerpo disponible. Este resultado sugiere que existe un mecanismo que regula los niveles máximos de proteína que se importa a la mitocondria. Podría ser que el ARNm presente no se traduzca eficazmente, o que superado un determinado nivel, el resto de la proteína se degrada. Por otro lado, este alto nivel de

sobreexpresión virtualmente asegura un reemplazamiento completo de la proteína endógena por la mutada.

La sobreexpresión de las tres *d*-mtHelicasas mutadas utilizando un trans-activador constitutivo y ubicuo, *daughterless*, provoca una letalidad del cien por cien en larvas de tercer estadio en el caso de la mutación K388A. Del mismo modo, la línea A442P muestra una letalidad del cien por cien en pupas. Sin embargo, la sobreexpresión de la mutación W441C no reduce la viabilidad, comportándose de manera similar a las líneas control. Por tanto la sobreexpresión de las tres *d*-mtHelicasas mutantes, expresadas a un nivel similar, tienen un fenotipo diferente sobre la viabilidad de *Drosophila*.

1.1. La sobreexpresión de las versiones mutantes K388A y A442P del gen *Twinkle* en *Drosophila* induce depleción de ADNmt

En células Schneider de *Drosophila* en las que la cantidad de *d*-mtHelicasa se ha suprimido hasta niveles indetectables mediante silenciamiento génico mediado por ARNi, se observa un crecimiento lento del cultivo celular, una reducción de la viabilidad y una disminución de hasta 5 veces de la cantidad de ADNmt. Por otro lado, la sobreexpresión de la proteína silvestre, incrementa modestamente el número de copias del ADNmt (Matsushima and Kaguni 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la sobreexpresión de versiones de la mtHelicasa que contienen las mutaciones W441C y A442P, análogas a las mutaciones de pacientes con adPEO, reducen el número de copias de ADNmt en larvas de *Drosophila*. Lo mismo ocurre con la sobreexpresión de una versión que contiene la mutación K388A en el dominio helicasa, siendo tanto en ésta como en la línea A442P reducciones drásticas, y mucho más moderada en el caso de la mutación W441C. En su conjunto estos resultados sugieren fuertemente que la *d*-mtHelicasa es esencial para el proceso de replicación del genoma mitocondrial en el contexto del desarrollo de *Drosophila*. Este resultado es especialmente relevante, ya que en numerosas ocasiones existen discrepancias entre los resultados obtenidos en el animal y en células en cultivo. La sobreexpresión de la subunidad catalítica de la ADN polimerasa γ , un enzima esencial para el procesos de replicación del ADNmt tiene un efecto dramático en *Drosophila* induciendo una fuerte depleción de ADNmt, pero sin embargo no provoca ningún efecto en células Schneider (Lefai et al. 2000b). En nuestro caso los resultados obtenidos en ambos sistemas son esencialmente coincidentes, excepto en el caso de la mutación W441C, que induce depleción en larvas, y sin embargo no parece afectar a la replicación del ADNmt en células en cultivo. Aunque por el momento no hemos podido identificar las consecuencias fisiopatológicas de esta reducción del número de copias de ADNmt, sin embargo estos datos abren la vía para explicar los efectos patológicos de esta mutación, que en patología humana provoca PEO plus.

Al contrario de los resultados publicados en pacientes que padecen adPEO (Suomalainen et al. 1992), y al igual que ocurre en las células Schneider SL2 de *Drosophila*, no se han encontrado deleciones múltiples del ADNmt en ninguna de las sobreexpresiones de las diferentes versiones mutantes de la *d*-mtHelicasa. Una posible explicación es que la eficiencia de generación de moléculas de ADNmt delecionadas podría ser muy baja en *Drosophila*, al igual que ocurre en células

SL2. Por otro lado, la proporción de genomas mitocondriales delecionados varía ampliamente en los diferentes tejidos de pacientes con adPEO (Suomalainen et al. 1992; Suomalainen et al. 1997). En general, la acumulación de deleciones múltiples de ADNmt en estos pacientes tiene lugar en tejidos postmitóticos, como el músculo y el cerebro, y tiene lugar de una manera probablemente muy lenta a lo largo de la vida del individuo. De forma análoga, en el ratón transgénico que expresa una duplicación típica de adPEO en el gen *Twinkle*, las deleciones se detectan sólo a partir de los 18 meses de vida (Tynismaa et al. 2005). Por tanto, parece probable que la acumulación de moléculas delecionadas en una etapa como es el desarrollo larvario de *Drosophila*, pueda ser muy lenta. De cualquier modo, hoy en día se desconoce el mecanismo molecular por el cual una mutación dominante en la mtHelicasa genera deleciones múltiples (Hirano et al. 2001).

De forma paralela a la depleción de ADNmt que inducen, hemos comprobado que en las líneas que sobreexpresan las *d*-mtHelicasas con las mutaciones K388A y A442P, los niveles de transcritos mitocondriales disminuyen de forma proporcional a la disminución en la cantidad de ADNmt. Es interesante destacar que en células embrionarias de *Drosophila*, la cantidad de transcritos mitocondriales no varía, en condiciones en que la sobreexpresión de estas versiones mutadas de *d*-mtHelicasa provocan depleción del ADNmt. Asimismo, el incremento de ADNmt en este mismo modelo debido a la sobreexpresión de la *d*-mtHelicasa, no aumenta los niveles de los ARN mitocondriales (Matsushima and Kaguni 2007). Estos resultados indican que existen niveles de ADNmt en exceso con respecto a los niveles necesarios de transcritos mitocondriales en células Schneider de *Drosophila*, y que el proceso de transcripción del ADNmt está fuertemente regulado. Los resultados obtenidos en *Drosophila*, donde la cantidad de transcritos mitocondriales es proporcional a la dosis génica, sugiere que durante los procesos de proliferación y diferenciación celular que tienen lugar durante el desarrollo, la cantidad de ADNmt es, sin embargo, un factor limitante, y que los factores de transcripción necesarios para la síntesis de ARNmts están probablemente en exceso.

Como se ha comentado previamente, la adPEO presenta sus manifestaciones clínicas entre los 20 y 40 años de edad del paciente y, por ese motivo, la línea que sobreexpresa la mtHelicasa W441C, que a pesar de inducir una clara, aunque moderada, depleción de ADNmt, es viable, podría resultar un modelo interesante para caracterizar las consecuencias de un defecto de replicación del ADNmt a lo largo de la vida adulta del individuo. Sin embargo, aunque los niveles totales de ADNmt en las moscas mutantes son moderadamente más bajos que en las silvestres, no hemos observado que disminuyan progresivamente durante el envejecimiento. Ello indica que la depleción se produce durante el desarrollo embrionario y/o larvario y que el recambio del ADNmt en células postmitóticas es relativamente lento y no se ve afectado de un modo significativo por la mutación W441C, al menos durante el tiempo relativamente corto de vida de *Drosophila*. El único fenotipo que hemos observado es una moderada disminución en la vida media de la línea que sobreexpresa la mtHelicasa mutante, aunque por el momento no hemos detectado ninguna alteración bioquímica o molecular adicional a la moderada depleción del ADNmt.

Dado que el PEO causado por mutaciones en el gen *Twinkle* tiene una herencia autosómica dominante, las proteínas mutantes coexisten con las silvestres. Por tanto, se asume que las variantes *Twinkle* adPEO son dominantes negativas y pueden alterar la función de las proteínas

silvestres por interacción, lo cual requiere de la co-hexamerización. En pacientes con adPEO, muchas de las mutaciones se localizan dentro de una pequeña región, la cual corresponde con la región de unión (linker) de la proteína gp4 del bacteriófago T7. La región de unión separa los dominios primasa y helicasa, y juega un papel muy importante en la formación del hexámero (Guo et al. 1999). Por ello, mutaciones en la mtHelicasa que se encuentran en esta región (ver figura 10) podrían afectar a la interacción entre subunidades ((Singleton et al. 2000).

En nuestro estudio hemos observado que la mutación A442P presenta un efecto dominante negativo, tal y como ocurre con la mutación K388A que afecta a la Lys³⁸⁸ del sitio activo de la helicasa. La Lys³⁸⁸ es análoga a la Lys³¹⁸ en la proteína gp4, la cual no es esencial para la formación del hexámero en el bacteriófago T7 (Patel et al. 1994; Washington et al. 1996). Ello sugiere que la versión mutante de la helicasa portadora de la mutación K388A no interfiere con la interacción de las subunidades y forma hexámeros en *Drosophila*. Esta interpretación es coherente con los resultados obtenidos en estudios bioquímicos *in vitro* y en células en cultivo que han demostrado que las *d*-mtHelicasas mutantes K388A y A442P forman hexámeros y que su sobreexpresión reduce de manera dosis dependiente la cantidad de ADNmt (Matsushima and Kaguni 2007). Bajo condiciones de inducción con el sistema UAS-GAL4, la cantidad de ADNmt en estos mutantes es <25% con respecto al control, siendo además la relación molar entre los polipéptidos de la *d*-mtHelicasa endógenos y exógenos mucho mayor en este último. Si los mutantes forman hexámeros con la misma eficiencia que las proteínas silvestres, un gran porcentaje de éstos deberían contener sólo protómeros mutantes, estando el resto compuesto por un protómero silvestre y cinco mutantes. La severa depleción consecuencia de la sobreexpresión de estas mutaciones, indica que una única subunidad silvestre es insuficiente para la actividad helicasa *in vivo* y por tanto que la mutación A442P afecta a la actividad helicasa del enzima. El bolsillo de unión e hidrólisis de este tipo de helicasas se forma en las zonas de unión entre las subunidades (Donmez and Patel 2006). Cualquier alteración debida a alguna mutación, por sutil que sea, puede afectar al ciclo de hidrólisis y al mecanismo de acoplamiento al ADN relajado, lo que resulta en una pérdida de efectividad de la enzima (Goffart et al. 2009). Finalmente, se han descrito modificaciones post-traduccionales que pueden influir y regular la actividad de esta proteína *in vivo* (Goffart et al. 2009) y que podrían estar alteradas en los mutantes.

1.2. La sobreexpresión de las versiones mutantes K388A y A442P del gen *Twinkle* en *Drosophila* provoca un claro defecto en la función OXPHOS

En este trabajo hemos encontrado que la *d*-mtHelicasa con la mutación K388A que elimina la actividad helicasa de la proteína y la que contiene la mutación A442P asociada a adPEO, que se localiza en la región de unión entre los dominios helicasa y primasa, inducen una significativa disminución en la actividad de todos los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial analizados, no solo aquellos que tienen subunidades codificadas en el genoma mitocondrial (III y IV), sino también el complejo II, el cual, tiene todas sus subunidades codificadas en el genoma nuclear. En nuestro grupo hemos descrito previamente que mutaciones o alteraciones en genes implicados

en la biogénesis mitocondrial (Adan et al. 2008; Lefai et al. 2000b) que producen un claro defecto en la cadena respiratoria, provocan déficits de los complejos I, III y IV, y una actividad elevada del complejo II (Adan et al. 2008). Además, los niveles de citrato sintasa, una enzima del ciclo de Krebs utilizada frecuentemente como marcadora de masa mitocondrial, también presentan un incremento en estos casos. Este efecto corresponde probablemente a un mecanismo compensatorio por parte del núcleo como respuesta a señales retrógradas procedentes de la mitocondria con el fin de recuperar la función mitocondrial (Garesse and Vallejo 2001). En el caso de las mutaciones en el gen *d*-mtHelicasa, el núcleo no es capaz de generar una respuesta compensatoria, lo que podría significar que la vía de comunicación retrógrada está afectada, o que el núcleo es incapaz de compensar el defecto (depleción de ADNmt) provocado por estas mutaciones.

El considerable número de procesos fisiológicos en los que la mitocondria está implicada y el papel central que desempeña en cascadas de señalización celular, han hecho necesario un cambio en la visión clásica de los defectos de la cadena respiratoria. En los últimos años se ha situado a la mitocondria en un nuevo escenario, donde distintas vías de regulación como las mediadas por NO (Moncada 2006), HIF1- α (Simon 2006), PGC1- α (Green 2005; Puigserver 2005) o Ca²⁺ (Bianchi et al. 2004), juegan un papel fundamental en la regulación del metabolismo mitocondrial. Es fácil suponer por tanto, que las mutaciones que afectan al ADNmt puedan estar alterando no sólo la función OXPHOS y la capacidad de sintetizar ATP, sino procesos celulares muy variados, y que existan mecanismos adaptativos mediados por los mismos que puedan estar modificando la expresión fenotípica de dichas mutaciones. Nuestros resultados indican que la señalización mediada por defectos de replicación provocados por versiones mutantes de la *d*-mtHelicasa, aunque provocan una importante disminución en la cantidad de ADNmt y son por tanto un excelente modelo de estudio de síndromes de depleción mitocondrial, no son capaces de inducir una señalización retrógrada compensatoria como ocurre en la disfunción mitocondrial provocada mediante estrategias diferentes.

1.3. La sobreexpresión de las versiones mutantes K388A y A442P del gen *Twinkle* en *Drosophila* no aumenta el estrés oxidativo

Los radicales libres de oxígeno (ROS) son generados fundamentalmente en la cadena de transporte electrónico, y por ello la mitocondria es un elemento central en la regulación de sus niveles celulares. Los ROS actúan como moléculas señalizadoras de numerosos procesos y rutas de transducción de señales, pero en exceso generan estrés oxidativo y daño a moléculas y estructuras celulares, incluyendo proteínas y ácidos nucleicos (Starkov 2008; Vives-Bauza et al. 2006). Numerosas evidencias experimentales sugieren que el estrés oxidativo, y por tanto la mitocondria, están directamente asociados al envejecimiento y a una amplia variedad de enfermedades neurodegenerativas (Fatokun et al. 2008; Polidori et al. 2007). En particular, la teoría mitocondrial del envejecimiento propone que el incorrecto funcionamiento de la cadena de transporte electrónico y el incremento en la producción de radical superóxido O₂⁻, incrementa el estrés oxidativo en el interior de la mitocondria y el acúmulo de mutaciones en el ADNmt. Ello provoca una disfunción mayor del sistema OXPHOS y el consiguiente aumento de ROS, de tal modo que se establecería un

círculo vicioso que induciría el envejecimiento y numerosas enfermedades (Gruber et al. 2008; Harman 1972a; Muller et al. 2007). Aunque la teoría mitocondrial del envejecimiento está en continuo debate (Gruber et al. 2008; Kujoth et al. 2005; Trifunovic et al. 2004), está ampliamente aceptado que el aumento del estrés oxidativo provoca una amplia variedad de respuestas a nivel celular.

Los niveles de radical superóxido en larvas que sobreexpresan las versiones mutadas de la *d*-mtHelicasa son similares a los de las larvas controles, indicando que la depleción de ADNmt y la disfunción del proceso de fosforilación oxidativa que provocan no lleva asociado una mayor producción de ROS. Este resultado es especialmente interesante analizado en comparación con los efectos provocados por otras mutaciones asociadas a defectos mitocondriales en *Drosophila*. Por ejemplo, la sobreexpresión de la subunidad catalítica de la ADN polimerasa γ , interfiere con la replicación del ADNmt, lo que provoca depleción de ADNmt y disminución de la actividad OXPHOS y aumenta significativamente el estrés oxidativo (Martinez-Azorin et al. 2008). Por tanto, diferentes alteraciones de la cadena respiratoria pueden afectar de un modo diferente a la producción de ROS. Comprender las causas de esos efectos diferenciales ayudará sin duda a comprender la fisiopatología de las enfermedades que cursan con disfunción mitocondrial.

1.4. La sobreexpresión de las versiones mutantes K388A y A442P del gen *Twinkle* en *Drosophila* afecta a la proliferación celular

El mantenimiento de la homeostasis celular es crucial para la supervivencia de los organismos multicelulares. Consecuentemente, la proliferación, el crecimiento y la muerte celular están altamente coordinados y estrictamente controlados durante el desarrollo. Hemos observado que la sobreexpresión de las versiones de la *d*-mtHelicasa con las mutaciones K388A y A442P produce una disminución significativa de la proliferación celular, utilizando como sistema de análisis los discos imaginales de ala, y en consecuencia, las larvas mutantes tienen un tamaño menor que los respectivos controles. Este claro fenotipo ha sido también observado en líneas de *Drosophila* en las que se ha silenciado mediante ARNi la expresión del gen *TFB2M*, que codifica un factor esencial para la transcripción del genoma mitocondrial (Adan et al. 2008). Por tanto una de las consecuencias directas de una alteración del proceso de fosforilación oxidativa y la consecuente disminución en la síntesis de ATP mitocondrial, es una disminución en el ritmo de proliferación celular. Sin embargo, el tamaño celular no se afecta (Adan et al. 2008), lo cual sugiere que la inhibición de la división celular es un proceso específico. En este sentido, estudios recientes en los que se ha analizado la falta de función en el disco imaginal de ojo del gen *tenured* de *Drosophila* que codifica la subunidad COXVa del complejo IV de la cadena respiratoria (Mandal et al. 2005), han demostrado la existencia de un punto de control del ciclo celular mediado por ciclina E, que afectaría a la transición G1-S provocando la parada del ciclo celular. Esta vía está mediada por AMP Kinasa, que se activa al disminuir el cociente ATP/AMP y activa a su vez a la proteína p53, reduciéndose los niveles de ciclina E.

Con objeto de completar el estudio hemos realizado un análisis de clones mutantes en los discos imaginales de ala, tanto clones simples como clones gemelos. Desafortunadamente no

hemos observado diferencias significativas en la proliferación celular entre los clones de células que expresan las distintas versiones de la *d*-mtHelicasa y los controles. Ello se debe muy probablemente al uso de distintos trans-activadores con expresión temporal y cuantitativa diferente al da-GAL4 utilizado como trans-activador de expresión ubicua. Como se ha discutido previamente, el umbral de depleción de ADNmt que tiene claras consecuencias fenotípicas es relativamente estrecho, y es probable que en los clones mutantes no se haya sobrepasado. No obstante se trata de una estrategia experimental muy potente que permite utilizar diferentes combinaciones genéticas en un fondo silvestre, y estamos realizando nuevas aproximaciones que nos permitan obtener un nivel de depleción de ADNmt suficiente en los clones mutantes.

1.5. La sobreexpresión de las versiones mutantes K388A y A442P del gen *Twinkle* en *Drosophila* induce el proceso de apoptosis

Fisiológicamente, la muerte celular o apoptosis, elimina células para controlar su número, la morfología del tejido y eliminar células dañadas o peligrosas para el resto del tejido (Danial and Korsmeyer 2004). En nuestro grupo hemos descrito previamente que la manipulación, ya sea por sobreexpresión o disminución, de genes implicados en la replicación y expresión del ADNmt en *Drosophila*, aumenta de un modo significativo el número de células apoptóticas (Adan et al. 2008; Lefai et al. 2000b).

En el presente trabajo, hemos observado que la sobreexpresión ubicua de las versiones mutantes K388A y A442P de la *d*-mtHelicasa induce de igual manera un aumento de los niveles de apoptosis, muy probablemente debido a la depleción de ADNmt y déficit del sistema OXPHOS que provocan. Coherentemente, en la línea que sobreexpresa la versión mutante W441C, que no provoca una disfunción de la mitocondria, no se observa un aumento significativo de los niveles de apoptosis.

Estos resultados los hemos confirmado sobreexpresando las versiones mutantes de la *d*-mtHelicasa en el compartimento anterior del disco imaginal de ala. Ello provoca un aumento del número de células apoptóticas de un modo específico en este compartimento comparado con el posterior. Este tipo de aproximaciones experimentales permiten tener un control interno dentro del propio entorno celular, lo que evita las posibles diferencias que pueden presentarse al llevar a cabo experimentos de forma independiente.

Numerosos estudios han demostrado que la mitocondria desempeña un papel esencial en el proceso de apoptosis en mamíferos (Ott et al. 2007). Sin embargo, a pesar de que la mayoría de las proteínas implicadas en muerte celular programada están estrictamente conservadas durante la evolución de los metazoos, la importancia de la mitocondria en la apoptosis de *Drosophila* es un área de controversia y activa investigación (Krieser and White 2009). En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo y los previos de nuestro grupo (Adan et al. 2008; Lefai et al. 2000b) permiten concluir que la disfunción mitocondrial asociada a defectos de la replicación y expresión del ADNmt inducen el proceso de apoptosis, un resultado especialmente relevante ya que sugieren que la vía intrínseca de apoptosis mediada por la mitocondria es activa en *Drosophila* y por tanto podría desempeñar un papel importante en numerosos procesos fisiopatológicos.

Como se ha discutido previamente, la sobreexpresión de las versiones K388P y A442P de la *d*-mtHelicasa es letal en *Drosophila* y detiene el desarrollo en larvas de tercer estadio o pupa temprana debido a una fuerte depleción del ADNmt. Una parte importante de este fenotipo es muy probablemente debido a la disminución en la proliferación celular y el simultáneo aumento en la apoptosis que provocan. Para tratar de discernir entre el papel que desempeñan ambas alteraciones hemos intentado bloquear de un modo específico la entrada de la células en apoptosis mediante la sobreexpresión simultánea de las versiones mutantes de la *d*-mtHelicasa y la proteína de inhibición de la apoptosis 1 de *Drosophila* (Diap-1). Desde el descubrimiento quince años atrás por Miller y colaboradores de la proteína IAP, un gen de baculovirus que inhibe la apoptosis en células de insectos infectadas por *Spodoptera frugiperda* (Crook et al. 1993), se han identificado ortólogos en levaduras, nematodos, moscas y vertebrados superiores (O'Riordan et al. 2008). Los miembros de esta familia de inhibidores de apoptosis (IAP) se caracterizan por la presencia de un número variable de repeticiones baculovirales IAP (BIR, Baculoviral IAP repeat). Resultados bioquímicos, estructurales y datos *in vivo*, han demostrado que las proteínas IAPs regulan las caspasas a través de distintos mecanismos y que los diferentes miembros de esta familia tienen diferentes funciones (Shi 2004).

La proteína Diap-1 de *Drosophila* bloquea las caspasas efectoras a través de su señalización por poliubiquitilación e inactivación independiente de proteasoma (Ditzel et al. 2008). Posee dos dominios BIR, BIR1 y BIR2, estando este último implicado en la unión de caspasas y moléculas reguladoras de la apoptosis. Por otro lado, BIR1 interacciona con un diverso grupo de intermediarios de señalización. Un ejemplo de este tipo de interacciones, incluye las proteínas mitocondriales SMAC (también llamadas DIABLO) y Omi (también conocido como HtrA2), las cuales poseen un motivo IBM (Motivo de Interacción con BIR). Cuando en las células se activa el programa de muerte celular por apoptosis, estas moléculas maduras son liberadas del espacio intermembrana mitocondrial al citosol, donde se unen con los dominios BIR2 de las proteínas IAP a través de los motivos IBM. Este modo de interacción entre los dominios BIR, las caspasas y las moléculas con motivos IBM, están conservadas a lo largo de las especies, incluido en *Drosophila* (Srinivasula and Ashwell 2008).

La sobreexpresión de Diap-1 reduce significativamente los niveles de células apoptóticas y rescata el fenotipo de letalidad en las líneas K388A y A442P. Simultáneamente, los niveles de proliferación se recuperan de tal manera que la sobreexpresión de Diap-1 provoca una disminución de apoptosis y una recuperación de la tasa de proliferación celular. Para confirmar que estábamos interfiriendo de un modo específico la apoptosis y que el efecto observado no era indirecto, hemos sobreexpresado simultáneamente las versiones mutantes de la *d*-mtHelicasa y un transgén UAS-GFP, y comprobado que los niveles de expresión de las *d*-mtHelicases no variaba. Ello nos permitía demostrar que el factor de transcripción GAL4, aunque se repartía entre los dos promotores UAS, se encontraba sobreexpresado en exceso. Sin embargo cuando realizamos la cuantificación los niveles de las *d*-mtHelicases mutantes sobreexpresadas simultáneamente a Diap-1 observamos que su sobreexpresión había disminuido drásticamente, y consecuentemente los niveles de ADNmt eran similares a los controles. Ello sugiere que los promotores UAS del transgén y Diap-1, al contrario de lo que sucedía con el UAS-GFP, secuestra en este caso la mayor parte del factor GAL4 y enfatiza la

importancia de utilizar los controles adecuados en este tipo de estrategias experimentales. De cualquier modo, el resultado obtenido corrobora de un modo directo que la disfunción mitocondrial en nuestros mutantes es provocada por la presencia de las *d*-mtHelicasas mutantes y, por otro lado, no descarta que el bloqueo de la apoptosis esté desempeñando algún papel en la recuperación del fenotipo. Actualmente estamos desarrollando estrategias experimentales que nos permitan mantener altos niveles de expresión de las *d*-mtHelicasas mutantes (y consecuente depleción de ADNmt) en presencia de un inhibidor del proceso de apoptosis.

En *Drosophila*, se ha demostrado que la pérdida de células por apoptosis en respuesta a estrés o daño puede inducir divisiones adicionales en el resto de las células, un proceso denominado proliferación compensatoria inducida por apoptosis (Fan and Bergmann 2008). Durante el desarrollo de los organismos multicelulares, la proliferación compensatoria es crucial para recuperar la homeostasis tisular en respuesta a estrés o daño celular. Dado que las células que han entrado en un proceso de muerte celular son eliminadas rápidamente por fagocitosis, se ha estudiado en *Drosophila* cómo estas células pueden inducir la proliferación compensatoria. Para ello, se ha bloqueado la ejecución de la muerte celular utilizando diferentes estrategias (Perez-Garjito et al. 2004). Consecuentemente, y bajo un estímulo proapoptótico, las células que han entrado en proceso de muerte se mantienen vivas, denominándose células “undead”, y continúan secretando señales para la proliferación compensatoria, lo que resulta en un sobrecrecimiento del tejido (Morata and Martin 2007). Esta aproximación ha permitido la identificación de los componentes en la vía de apoptosis que están ligados a la proliferación compensatoria. En diferentes estudios, se han identificado como coordinadores de estos dos procesos Diap-1 (Ryoo et al. 2004), y fundamentalmente la caspasa iniciadora Dronc (Huh et al. 2004; Kondo et al. 2006). Probablemente p53 y la vía de JNK, coordinados por Dronc y/o Diap1, juegan un papel importante en la activación de la proliferación compensatoria a través de la activación de los morfógenos Dpp y Wg de forma indirecta. Además, las vías de Notch y JAK/STAT parecen jugar un papel en la activación de este proceso (Fan and Bergmann 2008).

Como se ha discutido previamente, en nuestro estudio hemos encontrado una relación inversa entre proliferación celular y apoptosis, de tal modo que la disfunción OXPHOS aumenta la entrada celular en apoptosis, pero también induce una disminución de la proliferación celular. Por tanto, nuestros resultados sugieren, que independientemente de la vía de señalización implicada, el fenómeno de proliferación compensatoria inducida por apoptosis necesita una mitocondria y una cadena respiratoria funcional, probablemente para mantener los niveles adecuados de ATP. Para confirmar esta hipótesis, sería muy interesante estudiar el fenómeno de proliferación compensatoria en respuesta a estrés celular en un fondo genético de disfunción mitocondrial y, en particular, el de sobreexpresión de *d*-mtHelicasas mutantes.

1.6. La sobreexpresión del gen *Twinkle* en diferentes tejidos de *Drosophila* proporciona un buen modelo para el estudio de disfunción mitocondrial asociada a mutaciones PEO

La principal función de la mitocondria es la producción de ATP celular, aunque como se ha comentado previamente participa en un gran número de procesos celulares. Por ello, las mutaciones en genes que afectan a la biogénesis mitocondrial y por tanto a su función, tienen mayores consecuencias en aquellos tejidos con mayor demanda energética, como el tejido muscular y el tejido nervioso. Utilizando trans-activadores adecuados hemos sobreexpresado las versiones mutadas de la *d*-mtHelicasa en el músculo y el ojo de *Drosophila*. La sobreexpresión obtenida depende de la línea GAL4 utilizada, de tal modo que es importante utilizar líneas que aseguren una alta sobreexpresión y que por tanto, la mayoría de los hexámeros de la helicasa funcional sean mutantes. Aunque los resultados presentados en el presente trabajo son todavía muy preliminares, la sobreexpresión en músculo de las *d*-mtHelicasas mutantes K388A y A442P provocan una desestructuración de las fibras musculares y pérdida de movilidad en los animales. De igual modo, la sobreexpresión específica de la *d*-mtHelicasa con la mutación K388A provoca una clara degeneración del ojo. La importancia de estos fenotipos es que se pueden analizar fácilmente y son compatibles con la viabilidad de los individuos. Ello permitirá utilizar en el futuro estrategias genéticas, de las cuales se tiene una amplia experiencia en *Drosophila* (Lessing and Bonini 2009; Zoghbi and Botas 2002) para identificar modificadores fenotípicos, lo cual abre una importante vía para comprender la fisiopatología de las enfermedades provocadas por una disfunción mitocondrial.

2. Generación en *Drosophila* de mutantes del gen que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa γ

Como se ha discutido previamente, los defectos de comunicación intergenómica están provocados por mutaciones en genes que codifican factores esenciales para la replicación y estabilidad del ADNmt. Entre ellos, las mutaciones en el gen que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa mitocondrial, *PolG* (*PolG1* o *Pol γ - α*), son una de las principales causas genéticas de enfermedad mitocondrial, habiéndose descrito hasta el momento más de 160 mutaciones que se localizan en los diferentes dominios funcionales de la misma (Spinazzola and Zeviani 2009) (Human DNA Polymerase Gamma Mutation Database; <http://tools.niehs.nih.gov/polg>). Las mutaciones en el gen *PolG* son la mayor causa de adPEO, pero están asociadas también a una heterogénea y amplia variedad de enfermedades. La causa de esta heterogeneidad se desconoce actualmente, y es probable que esté relacionada con la complejidad estructural y funcional del enzima.

Con objeto de estudiar la fisiopatología de las disfunciones mitocondriales provocadas por las mutaciones en el gen *PolG*, uno de nuestros objetivos ha sido establecer un modelo en *Drosophila melanogaster* de enfermedades mitocondriales generando líneas transgénicas que expresen versiones mutantes del gen *Pol γ - α* , el ortólogo en *Drosophila* del gen *PolG* humano. Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que en *Drosophila*, la sobreexpresión de la subunidad catalítica de la ADN polimerasa mitocondrial utilizando el sistema UAS-GAL4 produce letalidad en el

estadio de pupa (Lefai et al. 2000b), impidiendo por tanto llevar a cabo estudios de sobreexpresión de las variantes mutantes del enzima utilizando este modelo. Una alternativa ideal es, sin duda, la utilización de la recombinación homóloga, una técnica ampliamente utilizada en ratón y otras especies pero que ha sido una de las principales limitaciones de la utilización de *Drosophila* como sistema modelo. La posibilidad de generar cambios específicos en el genoma es sin duda una poderosa herramienta en la investigación genética en cualquier organismo, pero especialmente en especies en las cuales está secuenciado su genoma. En los últimos años, se ha descrito en *Drosophila* la metodología de reemplazamiento génico específico (*knock-in*) basada en la recombinación homóloga (Rong and Golic 2000), lo que ha levantado grandes expectativas para la generación de sistemas modelo de enfermedades humanas en *Drosophila*.

Con objeto de generar el modelo de *Drosophila* de mutantes en el gen *PoIG* hemos seleccionado inicialmente, en colaboración con el grupo de la Dra L. Kaguni, las mutaciones Y873C e Y869F, localizadas en el dominio polimerasa, la mutación F578A localizada en el elemento $\gamma 3$ de la región espaciadora, y la doble mutación (D185A y D263A) que modifica los residuos activos de aspartato del dominio exonucleasa y eliminan la actividad correctora de la enzima. Para todas las mutaciones se han generado líneas transgénicas independientes que portan el elemento donador con las mutaciones específicas. Con objeto de incrementar la probabilidad de reemplazamientos génicos eficientes durante el proceso de recombinación es conveniente usar una región de homología lo más extensa posible, siendo siempre igual o superior a 5 kb (Rong et al. 2002) y que en nuestro caso ha sido de 12 kb. Por ello la eficiencia que se ha obtenido para la transgénesis inicial fue muy baja, de un 0,2%, debido al gran tamaño del plásmido de partida (22kb).

La generación de un modelo en *Drosophila* con la doble mutación D185A y D263A tiene una especial relevancia. Como se ha discutido previamente, la hipótesis mitocondrial postula que la acumulación de mutaciones en su genoma como resultado de la acción de los ROS desempeña un papel central en el proceso de envejecimiento (Fleming et al. 1982; Harman 1972b). Para comprobar de un modo directo esta hipótesis, recientemente dos grupos independientes han generado mediante recombinación homóloga ratones transgénicos que portan una versión mutante del gen *PoIG* con la mutación D257A (equivalente a la D185A de *Drosophila*), lo que provoca la eliminación de la capacidad correctora de la enzima (Kujoth et al. 2005; Trifunovic et al. 2004). La expresión de esta variante provoca que los errores en la replicación del ADNmt no sean reparados, lo que origina que el acúmulo de mutaciones en el genoma mitocondrial sea más rápido de lo normal, generando por tanto un fenotipo mutador del ADNmt. Teniendo en cuenta que el aumento de mutaciones en el ADNmt es un proceso que ocurre normalmente en el envejecimiento, con esta aproximación experimental se pretende comprobar si se acelera dicho proceso.

Los ratones mutadores de ADNmt homocigóticos para el gen *PoIG^{exo}* acumulan una carga sustancial de mutaciones somáticas en el ADNmt, asociadas con envejecimiento prematuro y reducción de la esperanza de vida. Presentan un fenotipo aparentemente normal durante la adolescencia temprana, pero sin embargo, los signos de envejecimiento tales como pérdida de peso, reducción del cuerpo graso, alopecia, cifosis, osteoporosis, anemia, disminución de la fertilidad e hipertrofia cardiaca se desarrollan a partir de las 25 semanas de vida. El acúmulo de mutaciones puntuales en el ADNmt en las células somáticas de los ratones mutantes aumenta

entre 3 y 5 veces con respecto a los ratones control. Este aumento de mutaciones en el ADNmt se produce fundamentalmente en las etapas embrionarias, y aumenta de manera lineal en las etapas postnatales (Trifunovic et al. 2005), manteniéndose la carga mutacional estable durante la vida adulta de los individuos, por lo que ha sido cuestionado como modelo de envejecimiento (Khrapko et al. 2006). Adicionalmente, los ratones heterocigóticos jóvenes acumulan un nivel de mutaciones más elevados que los ratones control de edad avanzada, y sin embargo no manifiestan ningún fenotipo (Kujoth et al. 2005; Kujoth et al. 2007). La acumulación de mutaciones puntuales en los ratones transgénicos se produce de una manera aparentemente aleatoria, y por tanto podría tener efectos cuantitativos y cualitativos sobre la función de la cadena respiratoria mitocondrial, y provocar un aumento de la cantidad de ROS. Sin embargo, se ha demostrado que el desarrollo acelerado de los signos que caracterizan el envejecimiento provocado por mutaciones en el ADNmt, ocurre en ausencia de un incremento en la producción de ROS y estrés oxidativo, y que la disfunción de tejidos es debida a un déficit de la actividad de la cadena respiratoria y a un significativo aumento en los niveles de apoptosis (Kujoth et al. 2005). Además, estudios recientes sugieren que la expresión de una ADN polimerasa carente de actividad correctora en la mitocondria podría resultar en una pausa en la replicación del ADNmt y consiguiente rotura cromosómica en los sitios frágiles del ADNmt O_H y O_L , lo cual induciría el acumulo de moléculas con deleciones (Bailey et al. 2009). Los resultados obtenidos en el modelo de ratón mutador de ADNmt han abierto por tanto numerosas incógnitas y el poder disponer de un modelo similar en *Drosophila* permitiría poder utilizar la amplia variedad de estrategias genético-moleculares disponibles en este sistema para profundizar en los efectos que provoca la falta de reparación de ADNmt en diferentes situaciones fisiopatológicas.

Una vez generadas las líneas transgénicas con la mutación *exo-* se llevó a cabo el primer evento de recombinación homóloga, tras el cual se obtuvieron diversas líneas con la construcción insertada en el locus *PoIG* y por tanto con la estructura genómica de la zona duplicada. La presencia de la duplicación en tándem de los dos genes, silvestre y mutado, se comprobó por RFLP, Southern blot y secuenciación. El elevado número de líneas independientes obtenidas indica que el corte de la doble hebra de ADN que genera la endonucleasa I-SceI es suficientemente eficaz para que se repare por recombinación homóloga usando el elemento donador como molde, obteniéndose así la estructura en tándem. Las líneas de *Drosophila* con la estructura duplicada, contienen una copia mutante (*exo-*) del gen *PoIG* y dos copias del gen silvestre. Hemos comprobado que los dos alelos se expresan y sin embargo no se manifiesta ningún fenotipo aparente, una situación similar a la descrita para los ratones heterocigóticos que expresan una copia de la subunidad PolG sin capacidad correctora (Kujoth et al. 2005; Trifunovic et al. 2004). El fenotipo de falta de reparación del ADNmt es, por tanto, recesivo.

A partir de las líneas con la duplicación en tándem hemos realizado el proceso de reducción de una de las copias por medio de la endonucleasa I-CreI, obteniendo dos posibles reemplazamientos génicos del gen endógeno por la versión *exo-* de la POLG. La frecuencia estimada del proceso ha sido de 1 en 30.000 gametos, lo que supone una eficiencia muy baja, aunque dentro del margen obtenido previamente por otros grupos que oscila entre 1 de cada 300 hasta valores de 1 de cada 100.000 gametos (Maggert et al. 2008; Rong et al. 2002). Esta baja frecuencia de

recuperación de alelos *exo*- y silvestres puede deberse a distintos factores. Durante la reducción de una de las copias, la recombinación homóloga puede provocar anillamientos de cadena simple de ADN y una reparación defectuosa. Aunque esto es un problema que disminuye la eficacia de la técnica, algunos grupos lo utilizan como una ventaja para generar una serie de diferentes alelos con distintas alteraciones o lesiones que de otra manera necesitaría un gran esfuerzo (Dolezal et al. 2003). Por otro lado, la endonucleasa I-Crel reconoce una secuencia de ADN ribosómico en los cromosomas X e Y de *Drosophila*, y la presencia de altos niveles de expresión de esta enzima pueden causar una delección o translocación del ADN ribosómico entre ambos cromosomas (Maggert and Golic 2005), pudiendo incluso causar letalidad. En nuestro estudio hemos observado que la descendencia que expresa la endonucleasa I-Crel, y que por tanto tiene el genotipo adecuado, está infrarrepresentada. Para mejorar la eficacia de la técnica se optimizaron los tiempos y la temperatura del choque térmico utilizados, obteniéndose los mejores resultados con un choque térmico de 50 minutos a 36°C. A pesar de ello, la eficacia ha sido muy baja, fundamentalmente en la recuperación del alelo mutante *exo*-. La mejor eficacia en la obtención de los alelos silvestres, podría indicar una haploinsuficiencia para ese gen. Sin embargo, esta interpretación es muy poco probable ya que se han descrito que las mutaciones en el gen *Polγ-α*, que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa mitocondrial en *Drosophila*, son letales en el estadio de pupa temprana en homocigosis, pero viables en heterocigosis (Iyengar et al. 1999).

Hemos confirmado, tanto por RFLP como por secuenciación de la zona diana, que las dos líneas mutantes obtenidas poseen la doble mutación (D185A y D263A). Sin embargo, mediante análisis en Southern blot hemos observado que la región en la cual han tenido lugar los dos eventos de recombinación homóloga ha sufrido algún tipo de alteración. Además, y posiblemente como consecuencia de este hecho, en homocigosis ambas líneas son letales en el estadio de larva temprana. Para descartar posibles alteraciones en otros cromosomas se cruzaron al menos cinco veces ambas líneas con stocks dobles balanceados - doble marcados (retrocruces). Desafortunadamente, las líneas 9.20 y 9.106 aunque se desarrollan mejor tras los retrocruces, mantienen su letalidad en homocigosis, lo que indica que se debe muy probablemente a alguna alteración genómica adicional a la doble mutación en la zona del locus *PolG*, un resultado coherente con los estudios de complementación. En este sentido es interesante destacar que existen diferencias en el comportamiento de ambas líneas a nivel fenotípico. La letalidad en el caso de la línea 9.106 es más tardía, observándose en algunos casos pupas homocigóticas que no llegan a eclosionar, mientras que en la línea 9.20 las larvas no llegan a ascender por la pared del tubo ni a pupar. Aunque no hemos podido determinar la alteración genómica generada en cada una de las líneas transgénicas, es posible especular que probablemente se deba a la presencia de fragmentos de ADN que no han sido escindidos tras la acción de la endonucleasa I-Crel, o como hemos mencionado previamente, a la reparación incorrecta de errores generados por anillamientos de cadena simple de ADN. Cabe destacar que en las líneas control obtenidas tras sufrir de una forma simultánea todo el proceso de recombinación homóloga, que han retenido el alelo silvestre y que por tanto no portan la doble mutación, también hemos observado diferencias fenotípicas entre ellas donde algunas son viables en homocigosis y otras no, ilustrando la variabilidad en la eficiencia del último paso de la técnica de Ends-in. Sin embargo, la frecuencia de recuperación de líneas

transgénicas que han retenido el alelo silvestre es muy superior a la que han retenido el alelo mutante, un hecho para el cual no tenemos explicación.

Debido a lo complicado del proceso de recombinación homóloga en *Drosophila*, algunos autores han sugerido que es posible lograr con mutágenos químicos una eficiencia similar (Gao et al. 2008). Sin embargo, para llevar a cabo el reemplazamiento génico no es necesario conocer el fenotipo mutante, mientras que los protocolos clásicos de mutagénesis se basan en un rastreo fenotípico que habitualmente requiere múltiples cruces recesivos. Además, la identificación molecular del gen que ha sido mutado y que produce el fenotipo observado, requiere una larga inversión de tiempo y esfuerzo. El rastreo fenotípico de mutaciones aleatorias es una estrategia muy poderosa que ha dado excelentes resultados en *Drosophila*, especialmente porque ha permitido identificar genes esenciales para procesos donde su participación no se sospechaba. Pero, cuando el gen de interés ya ha sido identificado por métodos bioquímicos o bioinformáticos, el reemplazamiento génico es el proceso más directo y eficiente para obtener mutantes.

Desafortunadamente los resultados obtenidos tanto en este trabajo como en el realizado por otros grupos, indican que en *Drosophila* la recombinación homóloga es todavía una metodología con una aplicabilidad limitada y la eficiencia de la técnica depende mucho de la localización genómica original del elemento donador. Por ello, en organismos como *Drosophila* en los cuales existen técnicas eficientes de transgénesis, la alternativa a la recombinación homóloga es la integración de transgenes utilizando diferentes estrategias experimentales. El inconveniente de esta aproximación es que cada transgén se inserta en diferentes sitios del genoma de forma aleatoria y está sujeto a efectos dependientes de la posición cromosómica, como elementos potenciadores o silenciadores de la expresión génica. A lo largo de los años, se han desarrollado diferentes métodos para solucionar este problema. El más efectivo de ellos es integrar el transgén en una localización genómica específica (Golic et al. 1997; Horn and Handler 2005; Oberstein et al. 2005). Con este fin, se ha introducido recientemente en *Drosophila* la utilización de la integrasa del bacteriofago phiC31 (Groth et al. 2004) que cataliza la recombinación unidireccional entre las dianas de ADN *attP* y *attB*, siendo irreversible bajo condiciones normales. Adicionalmente se ha descrito un método denominado SIRT (site-specific integrase-mediated repeat targeting) el cual combina la integración mediada por la integrasa phiC31 y la maquinaria endógena de recombinación homóloga (Gao et al. 2008). Este método elimina la variabilidad de eficiencia existente que depende del sitio de integración del elemento donador de la técnica Ends-in, por lo que supone una mejora en el tiempo y esfuerzo necesario para llevar a cabo este tipo de aproximación. Actualmente, esta metodología para generar knock-in en *Drosophila* sigue poniéndose a punto, ya que existen multitud de parámetros que afectan a la eficiencia del proceso. Sin embargo, el método basado en la recombinación homóloga para generar knock-out, Ends-out, está proporcionando mejores resultados debido a que durante el desarrollo de la técnica no se generan estructuras intermediarias que necesitan de un segundo evento de recombinación homóloga para ser reducidas, como ocurre en el método de Ends-in. Aún así, y debido al esfuerzo que implican este tipo de aproximaciones, a lo largo de estos últimos cinco años sólo se han generado knock-outs de aproximadamente 50 genes usando estos dos tipos de metodologías, lo que ilustra la dificultad de este tipo de aproximación en *Drosophila* (Chen et al. 2009).

Recientemente se ha descrito un método basado en la inyección en embriones de *Drosophila* de ARNm que codifica nucleasas específicas de dedos de zinc (ZFN-zinc-finger nucleases). Estas nucleasas proporcionan una herramienta muy poderosa para la manipulación genómica directa (Cathomen and Joung 2008). El dominio de corte no específico de estas proteínas está ligado a un dominio de unión a ADN de dedo de zinc que puede ser modificado para reconocer un amplio rango de secuencias de ADN específicas (Carroll et al. 2006). La integridad del cromosoma fracturado tras el corte de doble hebra mediado por las nucleasas puede ser reparado por mecanismos basados en recombinación homóloga, de tal manera que versiones modificadas del gen introducidas de forma exógena pueden servir como molde para dicha reparación, siendo posible generar knock-in o knock-out de un gen de interés (Beumer et al. 2008).

En conclusión, y consecuentemente con su importancia, aunque la metodología de recombinación homóloga en *Drosophila* es aún muy ineficaz, está sufriendo constantemente cambios y mejoras, y probablemente se está cerca de establecer un método eficaz que permita la introducción de mutaciones específicas en genes de interés, incluidas las mutaciones responsables de numerosas enfermedades humanas.

2.1. La sobreexpresión en músculo de la versión sin capacidad correctora de la PolG disminuye la longevidad en *Drosophila*

La localización próxima del ADNmt a la cadena respiratoria, la mayor fuente celular de ROS, lo hace especialmente susceptible al daño oxidativo y al acúmulo de mutaciones, lo que constituye la base de la teoría mitocondrial del envejecimiento (Gruber et al. 2008; Harman 1972a). Numerosas evidencias obtenidas durante los últimos veinte años han demostrado que durante el envejecimiento se produce una progresiva disminución en la actividad de los complejos de la cadena respiratoria y un acúmulo de mutaciones en el ADNmt (Calleja et al. 1993; Cottrell et al. 2001). Tanto la mayor incidencia de mutaciones puntuales como de reorganizaciones y deleciones genómicas se han asociado al envejecimiento en numerosas especies de mamíferos e invertebrados, incluyendo *Drosophila* (Kukat and Trifunovic 2009). Una demostración experimental del efecto deletéreo que produce el rápido acúmulo de mutaciones en el genoma mitocondrial la ha aportado el elegante estudio de los ratones transgénicos con fenotipo mutador de ADNmt discutido previamente, que expresan una ADN polimerasa mitocondrial sin actividad correctora. Sin embargo, en estos ratones las mutaciones se generan al azar fundamentalmente durante las etapas embrionarias y neonatales, permaneciendo la tasa mutacional prácticamente invariable durante al etapa adulta (Kujoth et al. 2005; Trifunovic et al. 2004). Sin embargo, durante el envejecimiento fisiológico las mutaciones en el ADNmt se acumulan de un modo progresivo en los tejidos postmitóticos (Jang and Remmen 2009). Ello cuestiona que lo que realmente se esté estudiando en este modelo de ratones transgénicos sea envejecimiento (Khrapko et al. 2006).

Para eliminar este problema hemos diseñado una estrategia que permite expresar de un modo específico en el músculo de adultos de *Drosophila* la subunidad catalítica de la ADN polimerasa mitocondrial, con la doble mutación que elimina la actividad correctora de la enzima (exo). Para ello hemos generado líneas transgénicas independientes UAS-PolG y UAS-PolG^{exo-} y utilizado para sobreexpresarlas en células musculares específicamente a partir del periodo adulto

un sistema UAS-GAL4 inducible por la hormona mifepristona (RU486), que suministramos en la comida de los animales. Esta aproximación experimental nos ha permitido observar el fenotipo que se produce por la acumulación a partir de la eclosión del adulto de un potencialmente elevado número de mutaciones puntuales en el ADNmt en un tejido postmitótico de alta demanda respiratoria. Aunque los resultados obtenidos son aún preliminares, las líneas que expresan la versión *exo-* de la PolG tienen una vida media y una longevidad menor que las líneas control, que sobreexpresan la versión silvestre del enzima. Dado que el enzima mutante se expresa exclusivamente a partir de la vida adulta, la mayor carga mutacional se debe haber generado exclusivamente en las células musculares durante el proceso de recambio de la molécula de ADNmt, de un modo similar a lo que ocurre durante el envejecimiento. Como se ha discutido previamente, la sobreexpresión del gen *POLG* desde el estadio embrionario produce una fuerte depleción del ADNmt en *Drosophila*. Sin embargo, la sobreexpresión en músculo adulto inducida por hormona, no provoca diferencias significativas en el contenido de ADNmt de las moscas transgénicas con respecto a los controles. Una posible explicación de la depleción producida durante el desarrollo embrionario puede ser que el exceso de subunidades catalíticas de la POLG provoque que éstas compitan por los sitios de unión al ADNmt, iniciando la replicación del ADNmt en ausencia de la subunidad accesoria. En esta situación la enzima posee menor procesividad, y menor eficiencia catalítica provocando que la subunidad catalítica unida se libere de la cadena molde, produciendo moléculas de ADNmt aberrantes que son posteriormente degradadas. La depleción sería consecuencia de la alta tasa de replicación del ADNmt que tiene lugar durante la proliferación celular. Sin embargo, en tejidos postmitóticos, los niveles de replicación del ADNmt son mucho menores que durante la embriogénesis.

Actualmente estamos poniendo a punto en el laboratorio técnicas basadas en el corte de la endonucleasa TaqI y posterior secuenciación (Haag-Liautard et al. 2008; Vermulst et al. 2008), que nos permitan cuantificar los niveles de mutaciones puntuales que posiblemente se están acumulando en las moléculas de ADNmt como consecuencia de la ausencia de la actividad correctora de la POLG. Por otro lado, estamos poniendo a punto la expresión inducible por hormona de diferentes versiones de POLG en sistema nervioso. Una vez establecido el modelo de fenotipo mutador de ADNmt en tejidos postmitóticos podremos caracterizarlo bioquímica y molecularmente y aplicar las técnicas genéticas disponibles en *Drosophila* para encontrar genes que modifiquen el fenotipo, y que posiblemente podrían desempeñar un importante papel durante el proceso de envejecimiento.

Conclusiones

1. La sobreexpresión ubicua en *Drosophila* de variantes de la helicasa mitocondrial (*d*-mtHelicasa) que contienen las mutaciones K388A, localizada en el dominio helicasa de la enzima, y A442P asociada a Oftalmoplejía Progresiva Externa autosómica dominante (adPEO) provoca letalidad en tercer estadio larvario y pupa temprana respectivamente. Sin embargo, la sobreexpresión de una variante de la *d*-mtHelicasa portadora de la mutación W441C asociada a adPEO no afecta a la viabilidad.
2. Las líneas transgénicas de *Drosophila* que sobreexpresan las distintas variantes del gen *d*-*mt*helicasa tienen niveles similares de ésta proteína en la mitocondria, muy superiores al endógeno. Ello sugiere que en todos los casos se ha obtenido un reemplazamiento prácticamente completo de la proteína endógena por la mutante, y que por tanto la mayoría de las subunidades del hexámero que constituyen la *d*-mtHelicasa funcional corresponden a la expresada exógenamente.
3. La *d*-mtHelicasa portadora de la mutación adPEO W441C provoca una moderada disminución en los niveles de ADNmt, y las *d*-mtHelicases portadoras de las mutaciones adPEO A442P y K388A, provocan una severa depleción de ADNmt, acompañada de una disminución similar en los niveles de transcritos mitocondriales. Sin embargo, no se han encontrado en ningún caso deleciones múltiples del ADNmt.
4. Las *d*-mtHelicases portadoras de las mutaciones K388A y A442P provocan un claro defecto en la función OXPHOS mitocondrial, con una disminución en la actividad tanto de complejos que contienen subunidades codificadas en el ADNmt (III y IV), como del complejo II, que sólo contiene subunidades codificadas en el núcleo. Al contrario de lo que sucede en otras situaciones de disfunción OXPHOS, no hemos detectado ninguna respuesta retrógrada nuclear de inducción de biogénesis mitocondrial destinada a compensar el defecto.
5. Las líneas transgénicas de *Drosophila* que sobreexpresan las *d*-mtHelicases mutantes K388A y A442P presentan una significativa disminución de la proliferación celular y un aumento de células apoptóticas. Ello sugiere fuertemente que la vía intrínseca de apoptosis mediada por la mitocondria es activa en *Drosophila* y por tanto podría desempeñar un papel importante en numerosos procesos fisiopatológicos, incluidos los defectos de comunicación intergenómica.
6. Hemos sobreexpresado diferentes *d*-mtHelicases mutantes específicamente en músculo y ojo de *Drosophila*, provocando en ambos casos una importante disfunción. La posibilidad de poder expresar genes implicados en enfermedades mitocondriales en diferentes tejidos de *Drosophila* proporciona un excelente modelo para caracterizar el efecto de mutaciones patogénicas y realizar despistajes genéticos destinados a identificar modificadores fenotípicos.
7. La metodología de Ends-in utilizada para generar un fenotipo mutador de ADNmt en *Drosophila* mediante recombinación homóloga ha sido muy ineficiente y requerirá en el futuro utilizar una

combinación de técnicas con objeto de disminuir la variabilidad del proceso. Hemos generado líneas transgénicas portadoras de la doble mutación D185A y D263A en el gen que codifica la subunidad catalítica de la ADN polimerasa mitocondrial y que eliminan su capacidad correctora (PolG^{exo-}). La presencia de las versiones mutante y silvestre del gen en una proporción 1:2 no provoca ningún fenotipo aparente.

8. La sobreexpresión de la versión PolG^{exo-} en músculo de adultos de *Drosophila* usando el sistema UAS-GAL4 inducible por hormona, provoca una disminución de la longevidad de la población. La utilización de esta metodología nos ha permitido expresar el fenotipo mutador en tejidos postmitóticos y evitar su expresión durante los periodos de desarrollo embrionario y larvario.

Bibliografía

- Adan, C., et al. (2008), 'Mitochondrial transcription factor B2 is essential for metabolic function in *Drosophila melanogaster* development', *J Biol Chem*, 283 (18), 12333-42.
- Ahmed, A. U., Fisher, P. R. (2009), 'Import of nuclear-encoded mitochondrial proteins: a cotranslational perspective', *Int Rev Cell Mol Biol*, 273, 49-68.
- Amiott, E. A., Jaehning, J. A. (2006), 'Mitochondrial transcription is regulated via an ATP "sensing" mechanism that couples RNA abundance to respiration', *Mol Cell*, 22 (3), 329-38.
- Arco, A. D., Satrustegui, J. (2005), 'New mitochondrial carriers: an overview', *Cell Mol Life Sci*, 62 (19-20), 2204-27.
- Bailey, L. J., Cluett, T. J., Reyes, A., Prolla, T. A., Poulton, J., Leeuwenburgh, C., Holt, I. J. (2009), 'Mice expressing an error-prone DNA polymerase in mitochondria display elevated replication pausing and chromosomal breakage at fragile sites of mitochondrial DNA', *Nucleic Acids Res.*
- Beumer, K. J., Trautman, J. K., Bozas, A., Liu, J. L., Rutter, J., Gall, J. G., Carroll, D. (2008), 'Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (50), 19821-6.
- Bianchi, K., Rimessi, A., Prandini, A., Szabadkai, G., Rizzuto, R. (2004), 'Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship', *Biochim Biophys Acta*, 1742 (1-3), 119-31.
- Bilen, J., Bonini, N. M. (2005), '*Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease', *Annu Rev Genet*, 39, 153-71.
- Bodenstein, D. (1994), 'The postembryonic development of *Drosophila*.', in Cold Spring Harbor (ed.), *Biology of Drosophila* (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 275-367.
- Bogenghagen, D. F., Wang, Y., Shen, E. L., Kobayashi, R. (2003), 'Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes', *Mol Cell Proteomics*, 2 (11), 1205-16.
- Bolden, A., Noy, G. P., Weissbach, A. (1977), 'DNA polymerase of mitochondria is a gamma-polymerase', *J Biol Chem*, 252 (10), 3351-6.
- Boldogh, I. R., Pon, L. A. (2007), 'Mitochondria on the move', *Trends Cell Biol*, 17 (10), 502-10.
- Bonawitz, N. D., Clayton, D. A., Shadel, G. S. (2006), 'Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery', *Mol Cell*, 24 (6), 813-25.
- Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Pequignot, E., Munnich, A., Rotig, A. (1995), 'Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency', *Nat Genet*, 11 (2), 144-9.
- Brand, A. H., Perrimon, N. (1993), 'Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes', *Development*, 118 (2), 401-15.
- Brandon, M., Baldi, P., Wallace, D. C. (2006), 'Mitochondrial mutations in cancer', *Oncogene*, 25 (34), 4647-62.
- Brown, T. A., Cecconi, C., Tkachuk, A. N., Bustamante, C., Clayton, D. A. (2005), 'Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism', *Genes Dev*, 19 (20), 2466-76.
- Calleja, M., Pena, P., Ugalde, C., Ferreiro, C., Marco, R., Garesse, R. (1993), 'Mitochondrial DNA remains intact during *Drosophila* aging, but the levels of mitochondrial transcripts are significantly reduced', *J Biol Chem*, 268 (25), 18891-7.

- Carroll, D., Morton, J. J., Beumer, K. J., Segal, D. J. (2006), 'Design, construction and in vitro testing of zinc finger nucleases', *Nat Protoc*, 1 (3), 1329-41.
- Cathomen, T., Joung, J. K. (2008), 'Zinc-finger nucleases: the next generation emerges', *Mol Ther*, 16 (7), 1200-7.
- Chan, D. C. (2006), 'Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development', *Cell*, 125 (7), 1241-52.
- Chan, S. S., Copeland, W. C. (2009), 'DNA polymerase gamma and mitochondrial disease: understanding the consequence of POLG mutations', *Biochim Biophys Acta*, 1787 (5), 312-9.
- Chan, S. S., Longley, M. J., Copeland, W. C. (2005), 'The common A467T mutation in the human mitochondrial DNA polymerase (POLG) compromises catalytic efficiency and interaction with the accessory subunit', *J Biol Chem*, 280 (36), 31341-6.
- Chen, H., Ma, Z., Liu, Z., Tian, Y., Xiang, Y., Wang, C., Scott, M. P., Huang, X. (2009), 'Case studies of ends-out gene targeting in *Drosophila*', *Genesis*.
- Clayton, D. A. (1982), 'Replication of animal mitochondrial DNA', *Cell*, 28 (4), 693-705.
- Clayton, D. A. (2000), 'Transcription and replication of mitochondrial DNA', *Hum Reprod*, 15 Suppl 2, 11-7.
- Copeland, W. C. (2008), 'Inherited mitochondrial diseases of DNA replication', *Annu Rev Med*, 59, 131-46.
- Cottrell, D. A., Blakely, E. L., Johnson, M. A., Borthwick, G. M., Ince, P. I., Turnbull, D. M. (2001), 'Mitochondrial DNA mutations in disease and ageing', *Novartis Found Symp*, 235, 234-43; discussion 43-6.
- Crook, N. E., Clem, R. J., Miller, L. K. (1993), 'An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif', *J Virol*, 67 (4), 2168-74.
- Danial, N. N., Korsmeyer, S. J. (2004), 'Cell death: critical control points', *Cell*, 116 (2), 205-19.
- Dimauro, S. (2004), 'Mitochondrial medicine', *Biochim Biophys Acta*, 1659 (2-3), 107-14.
- DiMauro, S., Hirano, M., Schon, E. A. (2006), 'Approaches to the treatment of mitochondrial diseases', *Muscle Nerve*, 34 (3), 265-83.
- Ditzel, M., et al. (2008), 'Inactivation of effector caspases through nondegradative polyubiquitylation', *Mol Cell*, 32 (4), 540-53.
- Dolezal, T., Gazi, M., Zurovec, M., Bryant, P. J. (2003), 'Genetic analysis of the ADGF multigene family by homologous recombination and gene conversion in *Drosophila*', *Genetics*, 165 (2), 653-66.
- Donmez, I., Patel, S. S. (2006), 'Mechanisms of a ring shaped helicase', *Nucleic Acids Res*, 34 (15), 4216-24.
- Duffy, J. B. (2002), 'GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife', *Genesis*, 34 (1-2), 1-15.
- Echalier, G. (1997), *Drosophila cells in culture*, ed. Academic Press New York.
- Fan, Y., Bergmann, A. (2008), 'Apoptosis-induced compensatory proliferation. The Cell is dead. Long live the Cell!', *Trends Cell Biol*, 18 (10), 467-73.

- Fatokun, A. A., Stone, T. W., Smith, R. A. (2008), 'Oxidative stress in neurodegeneration and available means of protection', *Front Biosci*, 13, 3288-311.
- Fernandez-Moreno, M. A., Bruni, F., Adan, C., Sierra, R. H., Polosa, P. L., Cantatore, P., Garesse, R., Roberti, M. (2009), 'The Drosophila nuclear factor DREF positively regulates the expression of the mitochondrial transcription termination factor DmTTF', *Biochem J*, 418 (2), 453-62.
- Fleming, J. E., Miquel, J., Cottrell, S. F., Yengoyan, L. S., Economos, A. C. (1982), 'Is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome?', *Gerontology*, 28 (1), 44-53.
- Fridlender, B., Fry, M., Bolden, A., Weissbach, A. (1972), 'A new synthetic RNA-dependent DNA polymerase from human tissue culture cells (HeLa-fibroblast-synthetic oligonucleotides-template-purified enzymes)', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69 (2), 452-5.
- Gabaldon, T., Huynen, M. A. (2003), 'Reconstruction of the proto-mitochondrial metabolism', *Science*, 301 (5633), 609.
- Gao, G., McMahon, C., Chen, J., Rong, Y. S. (2008), 'A powerful method combining homologous recombination and site-specific recombination for targeted mutagenesis in Drosophila', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (37), 13999-4004.
- Garesse, R., Vallejo, C. G. (2001), 'Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes', *Gene*, 263 (1-2), 1-16.
- Garesse, R., Kaguni, L. S. (2005), 'A Drosophila model of mitochondrial DNA replication: proteins, genes and regulation', *IUBMB Life*, 57 (8), 555-61.
- Gaspari, M., Falkenberg, M., Larsson, N. G., Gustafsson, C. M. (2004), 'The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells', *EMBO J*, 23 (23), 4606-14.
- Gloor, G. B., Preston, C. R., Johnson-Schlitz, D. M., Nassif, N. A., Phillis, R. W., Benz, W. K., Robertson, H. M., Engels, W. R. (1993), 'Type I repressors of P element mobility', *Genetics*, 135 (1), 81-95.
- Goddard, J. M., Wolstenholme, D. R. (1978), 'Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from *Drosophila melanogaster*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75 (8), 3886-90.
- Goffart, S., Cooper, H. M., Tynismaa, H., Wanrooij, S., Suomalainen, A., Spelbrink, J. N. (2009), 'Twinkle mutations associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia lead to impaired helicase function and in vivo mtDNA replication stalling', *Hum Mol Genet*, 18 (2), 328-40.
- Golic, M. M., Rong, Y. S., Petersen, R. B., Lindquist, S. L., Golic, K. G. (1997), 'FLP-mediated DNA mobilization to specific target sites in *Drosophila* chromosomes', *Nucleic Acids Res*, 25 (18), 3665-71.
- Gonzalez-Vioque, E., et al. (2006), 'Association of novel POLG mutations and multiple mitochondrial DNA deletions with variable clinical phenotypes in a Spanish population', *Arch Neurol*, 63 (1), 107-11.
- Graziewicz, M. A., Longley, M. J., Bienstock, R. J., Zeviani, M., Copeland, W. C. (2004), 'Structure-function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia', *Nat Struct Mol Biol*, 11 (8), 770-6.
- Green, D. R. (2005), 'Apoptotic pathways: ten minutes to dead', *Cell*, 121 (5), 671-4.
- Groth, A. C., Fish, M., Nusse, R., Calos, M. P. (2004), 'Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31', *Genetics*, 166 (4), 1775-82.

- Gruber, J., Schaffer, S., Halliwell, B. (2008), 'The mitochondrial free radical theory of ageing—where do we stand?', *Front Biosci*, 13, 6554-79.
- Guo, S., Tabor, S., Richardson, C. C. (1999), 'The linker region between the helicase and primase domains of the bacteriophage T7 gene 4 protein is critical for hexamer formation', *J Biol Chem*, 274 (42), 30303-9.
- Haag-Liautard, C., Coffey, N., Houle, D., Lynch, M., Charlesworth, B., Keightley, P. D. (2008), 'Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*', *PLoS Biol*, 6 (8), e204.
- Hall, T. (1999), 'BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT', *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 45, 95-98.
- Harman, D. (1972a), 'Free radical theory of aging: dietary implications', *Am J Clin Nutr*, 25 (8), 839-43.
- Harman, D. (1972b), 'The biologic clock: the mitochondria?', *J Am Geriatr Soc*, 20 (4), 145-7.
- Hartl, F. U., Ostermann, J., Guiard, B., Neupert, W. (1987), 'Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide', *Cell*, 51 (6), 1027-37.
- Hirano, M., Marti, R., Ferreira-Barros, C., Vila, M. R., Tadesse, S., Nishigaki, Y., Nishino, I., Vu, T. H. (2001), 'Defects of intergenomic communication: autosomal disorders that cause multiple deletions and depletion of mitochondrial DNA', *Semin Cell Dev Biol*, 12 (6), 417-27.
- Hock, M. B., Kralli, A. (2009), 'Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function', *Annu Rev Physiol*, 71, 177-203.
- Holmlund, T., Farge, G., Pande, V., Korhonen, J., Nilsson, L., Falkenberg, M. (2009), 'Structure-function defects of the twinkle amino-terminal region in progressive external ophthalmoplegia', *Biochim Biophys Acta*, 1792 (2), 132-9.
- Holt, I. J., Harding, A. E., Morgan-Hughes, J. A. (1988), 'Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies', *Nature*, 331 (6158), 717-9.
- Holt, I. J., Lorimer, H. E., Jacobs, H. T. (2000), 'Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA', *Cell*, 100 (5), 515-24.
- Holt, I. J., He, J., Mao, C. C., Boyd-Kirkup, J. D., Martinsson, P., Sembongi, H., Reyes, A., Spelbrink, J. N. (2007), 'Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome', *Mitochondrion*, 7 (5), 311-21.
- Horn, C., Handler, A. M. (2005), 'Site-specific genomic targeting in *Drosophila*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (35), 12483-8.
- Howell, N., Elson, J. L., Chinnery, P. F., Turnbull, D. M. (2005), 'mtDNA mutations and common neurodegenerative disorders', *Trends Genet*, 21 (11), 583-6.
- Hudson, G., Chinnery, P. F. (2006), 'Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease', *Hum Mol Genet*, 15 Spec No 2, R244-52.
- Hudson, G., Deschauer, M., Busse, K., Zierz, S., Chinnery, P. F. (2005), 'Sensory ataxic neuropathy due to a novel C100rf2 mutation with probable germline mosaicism', *Neurology*, 64 (2), 371-3.
- Huh, J. R., Guo, M., Hay, B. A. (2004), 'Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role', *Curr Biol*, 14 (14), 1262-6.

- Hutchison, C. A., 3rd, Newbold, J. E., Potter, S. S., Edgell, M. H. (1974), 'Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA', *Nature*, 251 (5475), 536-8.
- Huttemann, M., Lee, I., Pecinova, A., Pecina, P., Przyklenk, K., Doan, J. W. (2008), 'Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease', *J Bioenerg Biomembr*, 40 (5), 445-56.
- Iyengar, B., Roote, J., Campos, A. R. (1999), 'The *tamas* gene, identified as a mutation that disrupts larval behavior in *Drosophila melanogaster*, codes for the mitochondrial DNA polymerase catalytic subunit (DNApol-gamma125)', *Genetics*, 153 (4), 1809-24.
- Jang, Y. C., Remmen, V. H. (2009), 'The mitochondrial theory of aging: insight from transgenic and knockout mouse models', *Exp Gerontol*, 44 (4), 256-60.
- Kaguni, L. S. (2004), 'DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase', *Annu Rev Biochem*, 73, 293-320.
- Kaukonen, J., Juselius, J. K., Tiranti, V., Kyttala, A., Zeviani, M., Comi, G. P., Keranen, S., Peltonen, L., Suomalainen, A. (2000), 'Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance', *Science*, 289 (5480), 782-5.
- Kelly, D. P., Scarpulla, R. C. (2004), 'Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function', *Genes Dev*, 18 (4), 357-68.
- Khrapko, K., Kravtsov, Y., de Grey, A. D., Vijg, J., Schon, E. A. (2006), 'Does premature aging of the mtDNA mutator mouse prove that mtDNA mutations are involved in natural aging?', *Aging Cell*, 5 (3), 279-82.
- Koene, S., Smeitink, J. (2009), 'Mitochondrial medicine: entering the era of treatment', *J Intern Med*, 265 (2), 193-209.
- Kondo, S., Senoo-Matsuda, N., Hiromi, Y., Miura, M. (2006), 'DRONC coordinates cell death and compensatory proliferation', *Mol Cell Biol*, 26 (19), 7258-68.
- Korhonen, J. A., Pham, X. H., Pellegrini, M., Falkenberg, M. (2004), 'Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro', *EMBO J*, 23 (12), 2423-9.
- Kornbluth, S., White, K. (2005), 'Apoptosis in *Drosophila*: neither fish nor fowl (nor man, nor worm)', *J Cell Sci*, 118 (Pt 9), 1779-87.
- Krieser, R. J., White, K. (2009), 'Inside an enigma: do mitochondria contribute to cell death in *Drosophila*?', *Apoptosis*.
- Kujoth, G. C., Bradshaw, P. C., Haroon, S., Prolla, T. A. (2007), 'The role of mitochondrial DNA mutations in mammalian aging', *PLoS Genet*, 3 (2), e24.
- Kujoth, G. C., et al. (2005), 'Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging', *Science*, 309 (5733), 481-4.
- Kukat, A., Trifunovic, A. (2009), 'Somatic mtDNA mutations and aging—facts and fancies', *Exp Gerontol*, 44 (1-2), 101-5.
- Kurland, C. G., Andersson, S. G. (2000), 'Origin and evolution of the mitochondrial proteome', *Microbiol Mol Biol Rev*, 64 (4), 786-820.
- Lahaye, A., Leterme, S., Foury, F. (1993), 'PIF1 DNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical characterization of the enzyme', *J Biol Chem*, 268 (35), 26155-61.
- Lee, D. Y., Clayton, D. A. (1998), 'Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-loop processing', *J Biol Chem*, 273 (46), 30614-21.

- Lefai, E., Fernandez-Moreno, M. A., Kaguni, L. S., Garesse, R. (2000a), 'The highly compact structure of the mitochondrial DNA polymerase genomic region of *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications', *Insect Mol Biol*, 9 (3), 315-22.
- Lefai, E., Calleja, M., Ruiz de Mena, I., Lagina, A. T., 3rd, Kaguni, L. S., Garesse, R. (2000b), 'Overexpression of the catalytic subunit of DNA polymerase gamma results in depletion of mitochondrial DNA in *Drosophila melanogaster*', *Mol Gen Genet*, 264 (1-2), 37-46.
- Lessing, D., Bonini, N. M. (2009), 'Maintaining the brain: insight into human neurodegeneration from *Drosophila melanogaster* mutants', *Nat Rev Genet*.
- Lewis, D. L., Farr, C. L., Kaguni, L. S. (1995), 'Drosophila melanogaster mitochondrial DNA: completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons', *Insect Mol Biol*, 4 (4), 263-78.
- Lewis, D. L., Farr, C. L., Farquhar, A. L., Kaguni, L. S. (1994), 'Sequence, organization, and evolution of the A+T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA', *Mol Biol Evol*, 11 (3), 523-38.
- Longley, M. J., et al. (2006), 'Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia', *Am J Hum Genet*, 78 (6), 1026-34.
- Lucia Echevarria, Alvaro Sanchez-Martinez, Paula Clemente, Rosana Hernandez-Sierra, Miguel Angel Fernandez-Moreno, Rafael Garesse (2008), 'Intergenomic Nuclear-Mitochondrial Cross-Talk in *Drosophila melanogaster*', in Landes Bioscience and Springer Science+Business Media (ed.).
- Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L., Afzelius, B. (1962), 'A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study', *J Clin Invest*, 41, 1776-804.
- Luo, N., Kaguni, L. S. (2005), 'Mutations in the spacer region of *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase affect DNA binding, processivity, and the balance between Pol and Exo function', *J Biol Chem*, 280 (4), 2491-7.
- Luoma, P., et al. (2004), 'Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study', *Lancet*, 364 (9437), 875-82.
- Macmillan, C., Lach, B., Shoubridge, E. A. (1993), 'Variable distribution of mutant mitochondrial DNAs (tRNA(Leu[3243])) in tissues of symptomatic relatives with MELAS: the role of mitotic segregation', *Neurology*, 43 (8), 1586-90.
- Maggert, K. A., Golic, K. G. (2005), 'Highly efficient sex chromosome interchanges produced by I-Crel expression in *Drosophila*', *Genetics*, 171 (3), 1103-14.
- Maggert, K. A., Gong, W. J., Golic, K. G. (2008), 'Methods for homologous recombination in *Drosophila*', *Methods Mol Biol*, 420, 155-74.
- Maier, D., Farr, C. L., Poeck, B., Alahari, A., Vogel, M., Fischer, S., Kaguni, L. S., Schneuwly, S. (2001), 'Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein is required for mitochondrial DNA replication and development in *Drosophila melanogaster*', *Mol Biol Cell*, 12 (4), 821-30.
- Man, P. Y., Griffiths, P. G., Brown, D. T., Howell, N., Turnbull, D. M., Chinnery, P. F. (2003), 'The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England', *Am J Hum Genet*, 72 (2), 333-9.
- Mandal, S., Guptan, P., Owusu-Ansah, E., Banerjee, U. (2005), 'Mitochondrial regulation of cell cycle progression during development as revealed by the tenured mutation in *Drosophila*', *Dev Cell*, 9 (6), 843-54.

- Margulis, L. (1975), 'Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof', *Symp Soc Exp Biol*, (29), 21-38.
- Martin, W., Hoffmeister, M., Rotte, C., Henze, K. (2001), 'An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle', *Biol Chem*, 382 (11), 1521-39.
- Martinez-Azorin, F., Calleja, M., Hernandez-Sierra, R., Farr, C. L., Kaguni, L. S., Garesse, R. (2008), 'Over-expression of the catalytic core of mitochondrial DNA (mtDNA) polymerase in the nervous system of *Drosophila melanogaster* reduces median life span by inducing mtDNA depletion', *J Neurochem*, 105 (1), 165-76.
- Matsushima, Y., Kaguni, L. S. (2007), 'Differential phenotypes of active site and human autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia mutations in *Drosophila* mitochondrial DNA helicase expressed in Schneider cells', *J Biol Chem*, 282 (13), 9436-44.
- Matsushima, Y., Kaguni, L. S. (2009), 'Functional importance of the conserved N-terminal domain of the mitochondrial replicative DNA helicase', *Biochim Biophys Acta*, 1787 (5), 290-5.
- Matsushima, Y., Adan, C., Garesse, R., Kaguni, L. S. (2005), '*Drosophila* mitochondrial transcription factor B1 modulates mitochondrial translation but not transcription or DNA copy number in Schneider cells', *J Biol Chem*, 280 (17), 16815-20.
- Matsushima, Y., Farr, C. L., Fan, L., Kaguni, L. S. (2008), 'Physiological and biochemical defects in carboxyl-terminal mutants of mitochondrial DNA helicase', *J Biol Chem*, 283 (35), 23964-71.
- Meeusen, S. L., Nunnari, J. (2005), 'How mitochondria fuse', *Curr Opin Cell Biol*, 17 (4), 389-94.
- Meisinger, C., Sickmann, A., Pfanner, N. (2008), 'The mitochondrial proteome: from inventory to function', *Cell*, 134 (1), 22-4.
- Metodiev, M. D., Lesko, N., Park, C. B., Camara, Y., Shi, Y., Wibom, R., Hultenby, K., Gustafsson, C. M., Larsson, N. G. (2009), 'Methylation of 12S rRNA is necessary for in vivo stability of the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome', *Cell Metab*, 9 (4), 386-97.
- Mokranjac, D., Neupert, W. (2008), 'Energetics of protein translocation into mitochondria', *Biochim Biophys Acta*, 1777 (7-8), 758-62.
- Moncada, S. (2006), 'Adventures in vascular biology: a tale of two mediators', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361 (1469), 735-59.
- Montoya, J., Ojala, D., Attardi, G. (1981), 'Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs', *Nature*, 290 (5806), 465-70.
- Morata, G., Martin, F. A. (2007), 'Cell competition: the embrace of death', *Dev Cell*, 13 (1), 1-2.
- Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A., Van Remmen, H. (2007), 'Trends in oxidative aging theories', *Free Radic Biol Med*, 43 (4), 477-503.
- Nass, M. M., Nass, S. (1963), 'Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions', *J Cell Biol*, 19, 593-611.
- Nikali, K., Suomalainen, A., Saharinen, J., Kuokkanen, M., Spelbrink, J. N., Lonnqvist, T., Peltonen, L. (2005), 'Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky', *Hum Mol Genet*, 14 (20), 2981-90.
- Nisoli, E., Clementi, E., Moncada, S., Carruba, M. O. (2004), 'Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework', *Biochem Pharmacol*, 67 (1), 1-15.

- O'Brien, T. W. (2002), 'Evolution of a protein-rich mitochondrial ribosome: implications for human genetic disease', *Gene*, 286 (1), 73-9.
- O'Keefe, L. V., Richards, R. I. (2006), 'Common chromosomal fragile sites and cancer: focus on FRA16D', *Cancer Lett*, 232 (1), 37-47.
- O'Riordan, M. X., Bauler, L. D., Scott, F. L., Duckett, C. S. (2008), 'Inhibitor of apoptosis proteins in eukaryotic evolution and development: a model of thematic conservation', *Dev Cell*, 15 (4), 497-508.
- Oberstein, A., Pare, A., Kaplan, L., Small, S. (2005), 'Site-specific transgenesis by Cre-mediated recombination in *Drosophila*', *Nat Methods*, 2 (8), 583-5.
- Oliveira, M. T., Azeredo-Espin, A. M., Lessinger, A. C. (2007), 'The mitochondrial DNA control region of Muscidae flies: evolution and structural conservation in a dipteran context', *J Mol Evol*, 64 (5), 519-27.
- Osterwalder, T., Yoon, K. S., White, B. H., Keshishian, H. (2001), 'A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (22), 12596-601.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2007), 'Mitochondria, oxidative stress and cell death', *Apoptosis*, 12 (5), 913-22.
- Patel, S. S., Hingorani, M. M., Ng, W. M. (1994), 'The K318A mutant of bacteriophage T7 DNA primase-helicase protein is deficient in helicase but not primase activity and inhibits primase-helicase protein wild-type activities by heterooligomer formation', *Biochemistry*, 33 (25), 7857-68.
- Perez-Carreras, M., Del Hoyo, P., Martin, M. A., Rubio, J. C., Martin, A., Castellano, G., Colina, F., Arenas, J., Solis-Herruzo, J. A. (2003), 'Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis', *Hepatology*, 38 (4), 999-1007.
- Perez-Garijo, A., Martin, F. A., Morata, G. (2004), 'Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*', *Development*, 131 (22), 5591-8.
- Polidori, M. C., Griffiths, H. R., Mariani, E., Mecocci, P. (2007), 'Hallmarks of protein oxidative damage in neurodegenerative diseases: focus on Alzheimer's disease', *Amino Acids*, 32 (4), 553-9.
- Poulton, J., Marchington, D. R. (2002), 'Segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) in human oocytes and in animal models of mtDNA disease: clinical implications', *Reproduction*, 123 (6), 751-5.
- Puigserver, P. (2005), 'Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha', *Int J Obes (Lond)*, 29 Suppl 1, S5-9.
- Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U., Gehring, W. J. (1994), 'Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans', *Science*, 265 (5173), 785-9.
- Rong, Y. S., Golic, K. G. (2000), 'Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*', *Science*, 288 (5473), 2013-8.
- Rong, Y. S., et al. (2002), 'Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*', *Genes Dev*, 16 (12), 1568-81.
- Ryoo, H. D., Gorenc, T., Steller, H. (2004), 'Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways', *Dev Cell*, 7 (4), 491-501.

- Ryoo, H. D., Bergmann, A., Gonen, H., Ciechanover, A., Steller, H. (2002), 'Regulation of Drosophila IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcD1', *Nat Cell Biol*, 4 (6), 432-8.
- Salvesen, G. S., Abrams, J. M. (2004), 'Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies', *Oncogene*, 23 (16), 2774-84.
- Sambrook, J. and Russel, D. W. (ed.), (2001), *Molecular cloning, a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanchez-Martinez, A., Luo, N., Clemente, P., Adan, C., Hernandez-Sierra, R., Ochoa, P., Fernandez-Moreno, M. A., Kaguni, L. S., Garesse, R. (2006), 'Modeling human mitochondrial diseases in flies', *Biochim Biophys Acta*, 1757 (9-10), 1190-8.
- Scarpulla, R. C. (2008), 'Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function', *Physiol Rev*, 88 (2), 611-38.
- Schapira, A. H. (2006), 'Mitochondrial disease', *Lancet*, 368 (9529), 70-82.
- Schapira, A. H., Cock, H. R. (1999), 'Mitochondrial myopathies and encephalomyopathies', *Eur J Clin Invest*, 29 (10), 886-98.
- Scheffler, I. E. (1999), 'Mitochondria' New York', *John Wiley&Sons, Inc.*
- Scheffler, I. E. (2001), 'Mitochondria make a come back', *Adv Drug Deliv Rev*, 49 (1-2), 3-26.
- Sedman, T., Kuusk, S., Kivi, S., Sedman, J. (2000), 'A DNA helicase required for maintenance of the functional mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*', *Mol Cell Biol*, 20 (5), 1816-24.
- Shi, Y. (2004), 'Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view', *Protein Sci*, 13 (8), 1979-87.
- Simon, M. C. (2006), 'Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxic HIF alpha stabilization', *Adv Exp Med Biol*, 588, 165-70.
- Singh, G., Neckelmann, N., Wallace, D. C. (1987), 'Conformational mutations in human mitochondrial DNA', *Nature*, 329 (6136), 270-2.
- Singleton, M. R., Sawaya, M. R., Ellenberger, T., Wigley, D. B. (2000), 'Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential hydrolysis of nucleotides', *Cell*, 101 (6), 589-600.
- Smeitink, J. A., Zeviani, M., Turnbull, D. M., Jacobs, H. T. (2006), 'Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders', *Cell Metab*, 3 (1), 9-13.
- Spelbrink, J. N., et al. (2001), 'Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria', *Nat Genet*, 28 (3), 223-31.
- Spinazzola, A., Zeviani, M. (2005), 'Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling', *Gene*, 354, 162-8.
- Spinazzola, A., Zeviani, M. (2009), 'Disorders from perturbations of nuclear-mitochondrial intergenomic cross-talk', *J Intern Med*, 265 (2), 174-92.
- Spradling, A. C., Rubin, G. M. (1982), 'Transposition of cloned P elements into Drosophila germ line chromosomes', *Science*, 218 (4570), 341-7.

- Spremulli, L. L., Coursey, A., Navratil, T., Hunter, S. E. (2004), 'Initiation and elongation factors in mammalian mitochondrial protein biosynthesis', *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 77, 211-61.
- Srinivasula, S. M., Ashwell, J. D. (2008), 'IAPs: what's in a name?', *Mol Cell*, 30 (2), 123-35.
- Starkov, A. A. (2008), 'The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling', *Ann N Y Acad Sci*, 1147, 37-52.
- Steller, H. (2008), 'Regulation of apoptosis in Drosophila', *Cell Death Differ*, 15 (7), 1132-8.
- Suen, D. F., Norris, K. L., Youle, R. J. (2008), 'Mitochondrial dynamics and apoptosis', *Genes Dev*, 22 (12), 1577-90.
- Suomalainen, A., Kaukonen, J. (2001), 'Diseases caused by nuclear genes affecting mtDNA stability', *Am J Med Genet*, 106 (1), 53-61.
- Suomalainen, A., Majander, A., Haltia, M., Somer, H., Lonnqvist, J., Savontaus, M. L., Peltonen, L. (1992), 'Multiple deletions of mitochondrial DNA in several tissues of a patient with severe retarded depression and familial progressive external ophthalmoplegia', *J Clin Invest*, 90 (1), 61-6.
- Suomalainen, A., et al. (1997), 'Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple deletions of mtDNA: clinical, biochemical, and molecular genetic features of the 10q-linked disease', *Neurology*, 48 (5), 1244-53.
- Taylor, R. W., Turnbull, D. M. (2005), 'Mitochondrial DNA mutations in human disease', *Nat Rev Genet*, 6 (5), 389-402.
- Torraco, A., Diaz, F., Vempati, U. D., Moraes, C. T. (2009), 'Mouse models of oxidative phosphorylation defects: powerful tools to study the pathobiology of mitochondrial diseases', *Biochim Biophys Acta*, 1793 (1), 171-80.
- Trezeguet, V., Pelosi, L., Lauquin, G. J., Brandolin, G. (2008), 'The mitochondrial ADP/ATP carrier: functional and structural studies in the route of elucidating pathophysiological aspects', *J Bioenerg Biomembr*, 40 (5), 435-43.
- Trifunovic, A., et al. (2005), 'Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (50), 17993-8.
- Trifunovic, A., et al. (2004), 'Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase', *Nature*, 429 (6990), 417-23.
- Tsujino, F., Kosemura, A., Inohira, K., Hara, T., Otsuka, Y. F., Obara, M. K., Matsuura, E. T. (2002), 'Evolution of the A+T-rich region of mitochondrial DNA in the melanogaster species subgroup of Drosophila', *J Mol Evol*, 55 (5), 573-83.
- Tyynismaa, H., Mjosund, K. P., Wanrooij, S., Lappalainen, I., Ylikallio, E., Jalanko, A., Spelbrink, J. N., Paetau, A., Suomalainen, A. (2005), 'Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (49), 17687-92.
- Tyynismaa, H., et al. (2004), 'Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number', *Hum Mol Genet*, 13 (24), 3219-27.
- Van Goethem, G., Dermaut, B., Lofgren, A., Martin, J. J., Van Broeckhoven, C. (2001), 'Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions', *Nat Genet*, 28 (3), 211-2.

- Venken, K. J., Bellen, H. J. (2005), 'Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*', *Nat Rev Genet*, 6 (3), 167-78.
- Vermulst, M., Bielas, J. H., Loeb, L. A. (2008), 'Quantification of random mutations in the mitochondrial genome', *Methods*, 46 (4), 263-8.
- Vives-Bauza, C., Gonzalo, R., Manfredi, G., Garcia-Arumi, E., Andreu, A. L. (2006), 'Enhanced ROS production and antioxidant defenses in cybrids harbouring mutations in mtDNA', *Neurosci Lett*, 391 (3), 136-41.
- Wai, T., Teoli, D., Shoubridge, E. A. (2008), 'The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes', *Nat Genet*, 40 (12), 1484-8.
- Wallace, D. C. (2005), 'A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine', *Annu Rev Genet*, 39, 359-407.
- Wang, S. L., Hawkins, C. J., Yoo, S. J., Muller, H. A., Hay, B. A. (1999), 'The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID', *Cell*, 98 (4), 453-63.
- Wang, Z., Cotney, J., Shadel, G. S. (2007), 'Human mitochondrial ribosomal protein MRPL12 interacts directly with mitochondrial RNA polymerase to modulate mitochondrial gene expression', *J Biol Chem*, 282 (17), 12610-8.
- Washington, M. T., Rosenberg, A. H., Griffin, K., Studier, F. W., Patel, S. S. (1996), 'Biochemical analysis of mutant T7 primase/helicase proteins defective in DNA binding, nucleotide hydrolysis, and the coupling of hydrolysis with DNA unwinding', *J Biol Chem*, 271 (43), 26825-34.
- Wiedemann, N., Frazier, A. E., Pfanner, N. (2004), 'The protein import machinery of mitochondria', *J Biol Chem*, 279 (15), 14473-6.
- Wong, L. J., et al. (2008), 'Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to POLG mutations', *Hum Mutat*, 29 (9), E150-E72.
- Wong, T. S., Rajagopalan, S., Townsley, F. M., Freund, S. M., Petrovich, M., Loakes, D., Fersht, A. R. (2009), 'Physical and functional interactions between human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein and tumour suppressor p53', *Nucleic Acids Res*, 37 (2), 568-81.
- Yakubovskaya, E., Chen, Z., Carrodeguas, J. A., Kisker, C., Bogenhagen, D. F. (2006), 'Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer', *J Biol Chem*, 281 (1), 374-82.
- Yang, M. Y., Bowmaker, M., Reyes, A., Vergani, L., Angeli, P., Gringeri, E., Jacobs, H. T., Holt, I. J. (2002), 'Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication', *Cell*, 111 (4), 495-505.
- Yui, R., Ohno, Y., Matsuura, E. T. (2003), 'Accumulation of deleted mitochondrial DNA in aging *Drosophila melanogaster*', *Genes Genet Syst*, 78 (3), 245-51.
- Zeviani, M., Servidei, S., Gellera, C., Bertini, E., DiMauro, S., DiDonato, S. (1989), 'An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region', *Nature*, 339 (6222), 309-11.
- Zhang, Y., Spremulli, L. L. (1998), 'Identification and cloning of human mitochondrial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor', *Biochim Biophys Acta*, 1443 (1-2), 245-50.
- Zheng, L., et al. (2008), 'Human DNA2 is a mitochondrial nuclease/helicase for efficient processing of DNA replication and repair intermediates', *Mol Cell*, 32 (3), 325-36.

Zoghbi, H. Y., Botas, J. (2002), 'Mouse and fly models of neurodegeneration', *Trends Genet*, 18 (9), 463-71.

Anexos

El trabajo presentado en esta Tesis ha dado lugar a la publicación del siguiente artículo:

Sánchez-Martínez, A., N. Luo, et al. (2006). "Modeling human mitochondrial diseases in flies." Biochim Biophys Acta 1757(9-10): 1190-8.

Además, el doctorando ha participado en la elaboración del las siguiente capítulo:

Echevarría, L., Sánchez-Martínez, Á., Clemente, P., Hernández-Sierra, R., Fernández-Moreno, M.A., Garesse, R. (2008). "Intergenicomic Nuclear-Mitochondrial Cross-talk in *Drosophila melanogaster*". *Nuclear-mitochondrial Crosstalk: Dual Genome Control of Mitochondrial Biogenesis and Metabolism*, edited by Graziano Pesole, David Horner and Marco Sardiello. Landes Bioscience and Springer Science.

Review

Modeling human mitochondrial diseases in flies

Álvaro Sánchez-Martínez^a, Ningguang Luo^b, Paula Clemente^a, Cristina Adán^a,
Rosana Hernández-Sierra^a, Pilar Ochoa^a, Miguel Ángel Fernández-Moreno^a,
Laurie S. Kaguni^b, Rafael Garesse^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo 4, E-28029 Madrid, Spain

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Michigan State University, East Lansing, MI 48824-1319, USA

Received 1 March 2006; received in revised form 24 April 2006; accepted 5 May 2006

Available online 13 May 2006

Abstract

Human mitochondrial diseases are associated with a wide range of clinical symptoms, and those that result from mutations in mitochondrial DNA affect at least 1 in 8500 individuals. The development of animal models that reproduce the variety of symptoms associated with this group of complex human disorders is a major focus of current research. *Drosophila* represents an attractive model, in large part because of its short life cycle, the availability of a number of powerful techniques to alter gene structure and regulation, and the presence of orthologs of many human disease genes. We describe here *Drosophila* models of mitochondrial DNA depletion, deafness, encephalopathy, Friedreich's ataxia, and diseases due to mitochondrial DNA mutations. We also describe several genetic approaches for gene manipulation in flies, including the recently developed method of targeted mutagenesis by recombinational knock-in.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Drosophila*; Mitochondria; Mitochondrial diseases; Gene targeting; Oxidative phosphorylation

1. Introduction

The fruit fly *Drosophila* has played a critical role in the origin and development of modern biology, particularly in the field of genetics. In 1910, T. H. Morgan's experiments demonstrating the chromosome theory of heredity initiated *Drosophila* as a tool to investigate the basis of genetics and development [1]. Features that made *Drosophila* useful as an animal model in the first half of the past century are still attractive today [1,2]. These include (i) a short life cycle, (ii) the facility to feed and maintain stocks and populations without specialized instrumentation or infrastructure, (iii) the availability of non-recombinogenic balancer chromosomes, (iv) physical mapping of genes on

polytene chromosomes, (v) the straightforward use of X-rays and other mutagenic agents to generate large collections of mutant stocks and, (vi) the physical accessibility of the mechanosensory apparatus for experimentation. During the remainder of the century, new technologies were developed to manipulate and understand the *Drosophila* genome, leading to remarkable discoveries such as the genetic control of embryonic development by E. Lewis, C. Nüsslein-Volhard and E. Wieschaus [3]. Advances in molecular biology have allowed the generation of transgenic flies using P-element transposons [4], the development of the yeast UAS-GAL4-based gene overexpression system [5] and more recently, technologies based on site specific recombination to knock-in and knock-out specific genes, and RNA interference (RNAi) to knock-down gene expression (for a review, see [6]). At the same time, *Drosophila melanogaster* was one of the first organisms to be sequenced in its entirety. The first annotated sequence was published in March 2000, and it has been updated regularly (<http://flybase.net/annot/dmel-release4-notes.html>). The *Drosophila* genome contains a large number of human orthologs, demonstrating its potential as a model of human disease [7].

Abbreviations: mtDNA, mitochondrial DNA; OXPHOS, oxidative phosphorylation; NRG, Nuclear respiratory gene; COX, cytochrome oxidase; MDS, mtDNA depletion syndrome; pol γ - α , DNA polymerase γ catalytic subunit; LS, Leigh syndrome; CNS, central nervous system; FA, Friedreich's ataxia; adPEO, autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia; RNAi, RNA interference; PNS, peripheral nervous system; DSB, double-strand break

* Corresponding author. Tel.: +34 91 4975452; fax: +34 91 5854401.

E-mail address: rafael.garesse@uam.es (R. Garesse).

2. Mitochondrial biogenesis in *Drosophila*

Mitochondrial biogenesis is an essential process in cell proliferation and differentiation. It depends on the co-ordinated expression of two genomes located in different subcellular compartments, the nucleus and the mitochondrion [8]. Mitochondrial DNA (mtDNA) is a circular double-stranded DNA molecule with an extremely compact organization, and a gene content that is well conserved in the animal kingdom. It encodes 22 tRNAs, 2 rRNAs and 13 polypeptides, all of which are components of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS). The rest of the subunits of the OXPHOS system (about 90) and all of the proteins involved in the maintenance and expression of mtDNA, and all other mitochondrial functions, are encoded in nuclear DNA [8].

In the last few years, several mammalian transcriptional regulators have been characterized that control the expression of both nuclear and mitochondrial genes, and therefore play a critical role in intergenomic communication [9]. Extracellular signals induce expression of PGC-1 family coactivators, which in cooperation with specific transcription factors (mainly Nuclear Respiratory Factors, NRF-1 and NRF-2), have been found to regulate the expression of many genes involved in mitochondrial biogenesis. These include structural subunits of the OXPHOS system, enzymes involved in intermediary metabolism, and several factors involved in mtDNA maintenance and transcription (reviewed in [10]). A similar framework to explain the integrated control of *Drosophila* mitochondrial gene expression has not been identified. The ortholog of *nrf-1* in *Drosophila*, *erect wing*, is essential for neurogenesis and myogenesis [11], but it has not been linked directly to regulation of mitochondrial gene expression. Thus, it is presently unknown if the circuitry that coordinates mitochondrial biogenesis at the transcriptional level in mammals is conserved in *Drosophila*.

Our laboratories and others have carried out a systematic characterization of the promoter regions of *Drosophila* genes encoding factors involved in mtDNA replication, maintenance and transcription [reviewed in [12]]. To date, these include the genes encoding the two subunits of DNA polymerase γ (α and β) [13], mtSSB [14], mtDNA helicase (L.S. Kaguni, unpublished data), mtRNA polymerase (R. Garesse, unpublished data), TFAM [15], mtTFB1 [16], mtTFB2 [17] and DmTTF [18] (Table 1). We have found that the expression of most of these genes is regulated by DREF, a transcription factor that also regulates the expression of genes involved in nuclear DNA replication and cell cycle control, including the catalytic subunit of DNA polymerase α , proliferating cell nuclear antigen, cyclin A and E2F [12]. In addition, a recently identified conserved sequence element (RTTAYRTAAY), designated as the Nuclear Respiratory Gene element (NRG), is located downstream of the transcriptional initiation site of a high proportion of nuclear genes encoding mitochondrial proteins [19]. Although there are no functional studies and the transcription factors that recognize the NRG site have yet to be identified, this element represents a good candidate for involvement in the coordinate response of genes involved in energy production in *Drosophila*, perhaps in combination with DREF. In support of this hypothesis, several of the genes encoding factors of the *Drosophila* mtDNA replication

Table 1

DNA sequence elements involved in the regulated expression of essential factors for mtDNA metabolism in *Drosophila*

Gene	DNA sequence elements		
	DRE	NRG	EWG
pol γ - α	–	–	+
pol γ - β	+	+	–
mtSSB	+	+	–
mtDNA helicase	+	–	–
mtRNA pol	–	+	–
TFAM	+	+	–
mtTFB1	+	–	–
mtTFB2	+	–	–
mtTTF	+	–	–

The proximal promoter (2 Kb) and 3'-upstream gene regions of several genes encoding essential factors for *Drosophila* mtDNA metabolism have been analyzed *in silico*, to search for potential binding sites for DREF, NRG and EWG. The functional role of all DREF binding sites except that in the gene for mtTFB1 has been demonstrated by EMSA and cell transfection analyses. [14 (mtSSB), 65 (pol γ - β), 66 (Tfam) and unpublished data from our laboratories].

and transcription machineries contain both DRE and NRG sites.

To begin to understand the regulation of mitochondrial biogenesis during embryonic development, we have studied by *in situ* hybridization and immunostaining the spatio-temporal expression pattern of genes encoding mtDNA replication factors as markers of mitochondrial proliferation, and those encoding structural components of the OXPHOS system as markers of mitochondrial differentiation. We have found that genes involved in mtDNA metabolism are highly expressed in the gut, and in some cases in additional cellular domains of the embryo. OXPHOS genes are also highly expressed in the gut, but are also expressed at high levels in other tissues including the mesoderm (M.A. Fernández-Moreno and R. Garesse, unpublished data). These results indicate that mitochondrial proliferation and differentiation are not strictly coupled during development.

Interestingly, the molecular characterization of *bonsai* mutants has also revealed that the gut is extremely active in mitochondrial biogenesis during *Drosophila* development [20]. The Bonsai protein is highly expressed in the gut, localizes to mitochondria and shows strong homology to prokaryotic ribosomal protein S15, suggesting a role in mitochondrial translation. However, the precise role of Bonsai in mitochondrial function remains to be determined.

3. *Drosophila* as an animal model to study human mitochondrial diseases

Drosophila provides a useful model for studying several complex biological processes because it is ideally tractable at the genetic, biochemical, molecular and physiological levels. It has served as a model in studies of development and differentiation [3], aging [21], cell cycle [22], transcriptional and translational control [23], signaling pathways [24], response to hypoxia [25], sensorial perception [26], and circadian rhythms [27]. In addition, the presence in *Drosophila* of orthologs of genes involved in human diseases has spawned interest in using it to

understand the molecular basis of disease, and to discover new therapies. Representative research using *Drosophila* has been focused on neurodegenerative diseases [7,28], cancer [29], cardiac pathologies [30], age-associated dysfunction [31], sensitivity to pollutants [32], and more recently on mitochondrial diseases (see below).

Mitochondrial diseases, mainly due to the alteration of OXPHOS functions, are associated with a wide range of clinical symptoms, especially those in neurodegenerative disorders, such as blindness, deafness, dementia, movement disorders, ataxia, corea, and encephalopathies [33,34]. Mitochondrial defects are also associated with muscular weakness, cardiac failure, diabetes, renal dysfunction and hepatic disease. The clinical and genetic diversity of mitochondrial pathologies makes it difficult to estimate their incidence in the population, which in composite, is considered relatively high. The alteration of OXPHOS function caused by known mutations in mtDNA affects at least 1 in 8500 people. One of the main objectives in understanding the pathophysiology of mitochondrial diseases is to create amenable animal models that reproduce the variety of symptoms associated with this group of complex human disorders. Although a great effort is currently focused on developing mammalian models of human mitochondrial pathologies, *Drosophila* emerges as an attractive, tractable alternative.

3.1. mtDNA depletion

mtDNA depletion syndrome (MDS) is caused by a defect in intergenomic communication that results in decreased mtDNA content (i.e., a low mtDNA/ nDNA ratio). Children usually present with hypotonia, lactic acidosis and elevated serum creatine kinase. Some also have severe hepatopathy or renal involvement mimicking de Toni–Fanconi syndrome. The symptoms can also involve multiple systems affecting the muscle. Mutations in the genes encoding the mitochondrial deoxyguanosine and deoxythymidine kinases are associated with the hepatocerebral and the myopathic forms of MDS [35]. In addition, preliminary studies have also shown a deficient activity of DNA polymerase γ in tissues of patients suffering MDS [36].

Our laboratories have used the UAS-GAL4 system to alter the level of mtDNA in the fly. Overexpression of a wild-type version of the catalytic subunit of mitochondrial DNA polymerase (pol γ - α) interferes with the process of mtDNA replication and produces a significant decrease in the amount of mtDNA [37]. We have analyzed the consequences of the mtDNA depletion in the whole animal, and specifically in two tissues affected in MDS patients, muscle and nervous system. mtDNA depletion resulting from constitutive overexpression is lethal at the pupal stage, a phenotype that is also observed upon specific overexpression in the muscle. Interestingly, the induction of mtDNA depletion in the nervous system is not lethal. The main phenotype detected in adults is an increase in the population mortality rate, and a moderate but significant increase in apoptosis in the larval brain, which likely contributes to the phenotype. This model presents the opportunity to characterize the molecular and metabolic responses of various tissues to mtDNA depletion, and to develop methods that alle-

viate it. At the same time, recognizing that overexpression of the wild-type catalytic subunit may generate secondary effects not related directly to the mtDNA depletion, we are complementing these studies with the introduction of specific mtDNA mutations in the pol γ - α gene by homologous recombination (see below).

3.2. Mitochondrial deafness

The *Drosophila* mutant *technical knock-out*, *tko*, carries a point mutation affecting a phylogenetically conserved residue in the nuclear gene encoding the mitochondrial ribosomal protein S12 (MRPS12). This behavioural mutant exhibits developmental retardation at the larval stage, bang sensitivity, defective response to sound, quantitatively reduced mitochondrial translational capacity and impaired male courtship [38]. The primary biochemical defect is a decrease in OXPHOS and ATP synthase activities in mitochondria. *tko* mutants possess various features of mitochondrial disorders in humans, and these phenotypes are reverted by transgenic expression of a wild-type copy of the *tko* gene. The transgenic reversion analysis revealed critical steps and cell types that were responsible for the disease-like phenotype [39]. Furthermore, inbreeding of mutant lines resulted in a systematic improvement of the phenotypic outcome. These features have made the *tko* mutant a suitable model for many forms of human mitochondrial disease that are characterized by a reduction in the mitochondrial respiratory capacity and a generalized OXPHOS deficiency and in particular, for sensorineural deafness.

3.3. Mitochondrial encephalopathy

Mutations in mtDNA and in nuclear-encoded mitochondrial proteins cause a group of devastating encephalomyopathies with complex clinical features [40]. Leigh syndrome (LS) is the most common infantile mitochondrial encephalopathy and is characterized by symmetric necrotic lesions in the brainstem, diencephalon and basal ganglia. Symptoms usually include nystagmus, ataxia, dystonia, hypotonia and optic atrophy. Although the cause of the disease is genetically heterogeneous, mutations in the *surf-1* gene are the single most prevalent cause of LS [41]. The *surf-1* gene is highly conserved from prokaryotes to humans, and is expressed ubiquitously in human tissues, albeit at higher levels in aerobic tissues. It encodes a 31 kDa protein located in the inner mitochondrial membrane. Previous studies in human cells [42], mice [43] and yeast [44] showed that Surf-1 is involved in COX complex assembly. Nonetheless, the molecular mechanism leading to the pathogenic course of LS is not fully understood.

Zordan and co-workers performed a functional knock-down of Surf-1 in *Drosophila* using an RNAi strategy [45]. Post-transcriptional gene silencing was induced by GAL4-mediated expression of an UAS inverted-repeat transgene. Ubiquitous silencing results in severely impaired development. Larvae are smaller and exhibit profound alterations in spontaneous and light-induced locomotion. Most individuals die before entering pupariation. Notably, behavioural and electrophysiological abnormalities were found not to be due to structural defects, but

were rather caused by a deficient energy supply. When *surf-1* was silenced exclusively in the central nervous system (CNS), individuals developed to adulthood and exhibited altered mitochondria in larval muscles, and decreased COX activity in cephalic sections. Because both development and metamorphosis are high energy-requiring processes, a defect in respiration and ATP synthesis may be responsible for the developmental delay and the late larval lethality observed in Surf-1-deficient larvae. The results obtained in the *Drosophila* model suggest important functions for Surf-1 in COX activity, and establish a critical role for mitochondrial energy pathways in organogenesis, development and CNS function that are likely to be similar in humans.

3.4. Friedreich ataxia

Friedreich ataxia (FA) is an inherited recessive neurodegenerative disorder associated with a genetic insufficiency of frataxin in humans [46]. Frataxin is encoded by the *FRDA* gene and has a predicted size of 210 amino acids [47]. It is a mitochondrial iron chaperone that plays a critical role in iron storage, cellular iron homeostasis and biogenesis of Fe–S clusters. As an iron binding protein, frataxin prevents Fe⁺² from generating toxic hydroxyl radicals inside the mitochondrial matrix.

Most FA patients are homozygous for a GAA triplet repeat expansion in the first intron of the *FRDA* gene. While normal chromosomes contain up to 40 repeats, FA chromosomes harbor between 90 and 1000 triplets. Due to the meiotic and mitotic instability of the expanded alleles, FA patients have insufficient frataxin levels, resulting in iron accumulation in mitochondria and dysfunctional iron-containing proteins, specifically aconitase and the OXPHOS complexes. The peripheral nervous system (PNS) and heart are among the most severely affected tissues. Hence, FA is characterized by progressive neurological disability and heart abnormalities. The age of onset may vary from infancy to adulthood, but FA usually appears during childhood. Variations in symptoms and age of onset suggest that other factors in addition to the degree of triplet expansion influence disease progression, and there is currently no effective therapy for this devastating disease.

Frataxin is highly conserved throughout evolution. Orthologs have been identified in mammals, invertebrates, yeast and plants, and several models have already been used to gain insight into the functions of frataxin and its related disease. Previous studies in yeast revealed that deletion of YFH1, the frataxin homolog, produces iron accumulation in mitochondria and a progressive loss of respiratory competence and mtDNA. As a result, Δ YFH1 strains exhibit permanent mitochondrial damage and dysfunction [48]. Cell differentiation experiments performed in mouse cell lines demonstrated that frataxin is essential for development of neural lineages [49]. Although mouse models for FA showed early embryonic lethality [50] conditional inactivation of the mouse FA gene led to cardiomyopathy, sensory nerve defects and Fe–S enzyme deficiency [51].

An RNAi strategy was used in *Drosophila* to suppress production of the frataxin homolog (DFH) in a global or tissue-specific manner [52]. The main advantage in the *Drosophila* system as compared to other eukaryotic models is that inverted

repeat transgenes used in RNAi reduce rather than totally eliminate the corresponding protein. Thus, the *Drosophila* model mimics more accurately the genetic origin of FA, which arises from a decrease rather than a complete loss of frataxin. Furthermore, the fly model also circumvents the early embryonic lethality reported in frataxin-null mice. Systemic suppression of the *dfh* gene led to large, long-lived larvae that showed diminished iron cofactor-dependent enzyme activity, and increased susceptibility to iron toxicity. Because prolonged larval development and failure to initiate and complete metamorphosis are common features of *Drosophila* mutants defective in mtDNA maintenance, observations from this model prompted the hypothesis that DFH depletion may lead to increased mtDNA damage. Whereas silencing of the *dfh* gene in motor neurons had no deleterious effect, silencing in the PNS resulted in normal larval development but a reduced adult life span. Overexpression of primary ROS-metabolizing enzymes, such as SOD1, SOD2 and catalase in combination with silencing of the *dfh* gene did not improve the phenotype, suggesting that oxidative stress is not a major contributor.

The *Drosophila* model of FA is further validated by the fact that the vulnerability of the PNS to frataxin depletion is conserved across the animal kingdom. Because a DFH deficiency produces a robust phenotype in *Drosophila*, the fly model may aid in the identification of factors that alleviate FA symptoms, and the development of novel treatment strategies.

3.5. Mitochondrial diseases caused by mtDNA mutations

Point mutations in mtDNA are associated with a wide range of severe mitochondrial diseases, including a number of encephalomyopathies with complex clinical features [33]. Although some of the mutations have been characterized in cybrid cell lines, and demonstrated to produce a clear mitochondrial impairment, it has not been possible to study the consequences of the mutations in animal model systems because of the currently inability to transform mitochondria with exogenous DNA. Very recently, the first pathogenic mtDNA mutation in an intact animal was reported in *Drosophila*, a G–A transition that affects an evolutionarily conserved amino acid residue in the *ATP6* gene [53]. Point mutations in the human *ATP6* gene cause neuropathy, ataxia, and retinitis pigmentosa (NARP), maternally inherited Leigh's syndrome (MILS) and familial bilateral striatal necrosis (FBSN) [33]. Notably, the G–A transition in the *ATP6* gene was found in virtually homoplasmic levels in a *Drosophila sesB* stock that carries a mutation in the *ANTI* gene, which is associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia (adPEO) in humans [54]. Patients with PEO are predisposed to secondary mtDNA mutations, and it is thus possible that a similar mutator effect has occurred in *Drosophila*. The *ATP6* mutation inhibits significantly the activity of ATP synthase, but surprisingly does not affect the respiration rate, and therefore the mitochondria are uncoupled. Most interestingly, *Drosophila ATP6* mutants have a short life span, locomotion impairment and myodegeneration that are strictly progressive, a situation similar to human mitochondrial encephalomyopathy of mitochondrial origin. Although the

mutation per se does not induce neurodegeneration, neurological dysfunction was apparent.

4. New perspectives for gene manipulation in *Drosophila*

Until recently, *Drosophila* models used in the study of mitochondrial dysfunction were based on the analysis of mutants generated by random mutagenic screens, or by gene silencing by RNAi that is based on P-element transgenesis. One of the main advantages of the fly system is the UAS–GAL4 binary system, which can be exploited to knockdown a target gene under the control of alternative promoters, thus restricting silencing to a desired spatio-temporal pattern. More recently, new technologies for gene manipulation in *Drosophila* have been expanded to include new genome integration methods based on bacteriophage ϕ C31 or *piggybacks* that show much less insertional specificity than P-elements [6]. Despite these advances, the study of specific mutations associated with human diseases has been hampered by the lack of gene targeting techniques, one of the main limitations in working with *Drosophila*. Golic and co-

workers have recently circumvented this drawback with the development of efficient homologous recombination-based methods [55]. Any endogenous locus can be replaced or deleted by the expression of a site-specific recombinase and a site-specific nuclease, taking advantage of the fact that double-strand breaks (DSB) in *Drosophila* DNA are recombinogenic. There are currently two techniques that use homologous recombination for gene replacement, “Ends-in” and “Ends-out”. These systems have similar efficiencies but present different advantages and disadvantages.

4.1. Ends-in

The Ends-in approach first introduces a version of the gene containing the mutation of interest in tandem with the endogenous allele, and then removes one of the copies leaving only the mutated or wild-type allele in the chromosome. The main advantage of this approach is that intact alleles can be recovered that harbor the desired mutation.

The Ends-in targeting technique is executed in three steps (Fig. 1A and B). First, a P-element construct is generated that

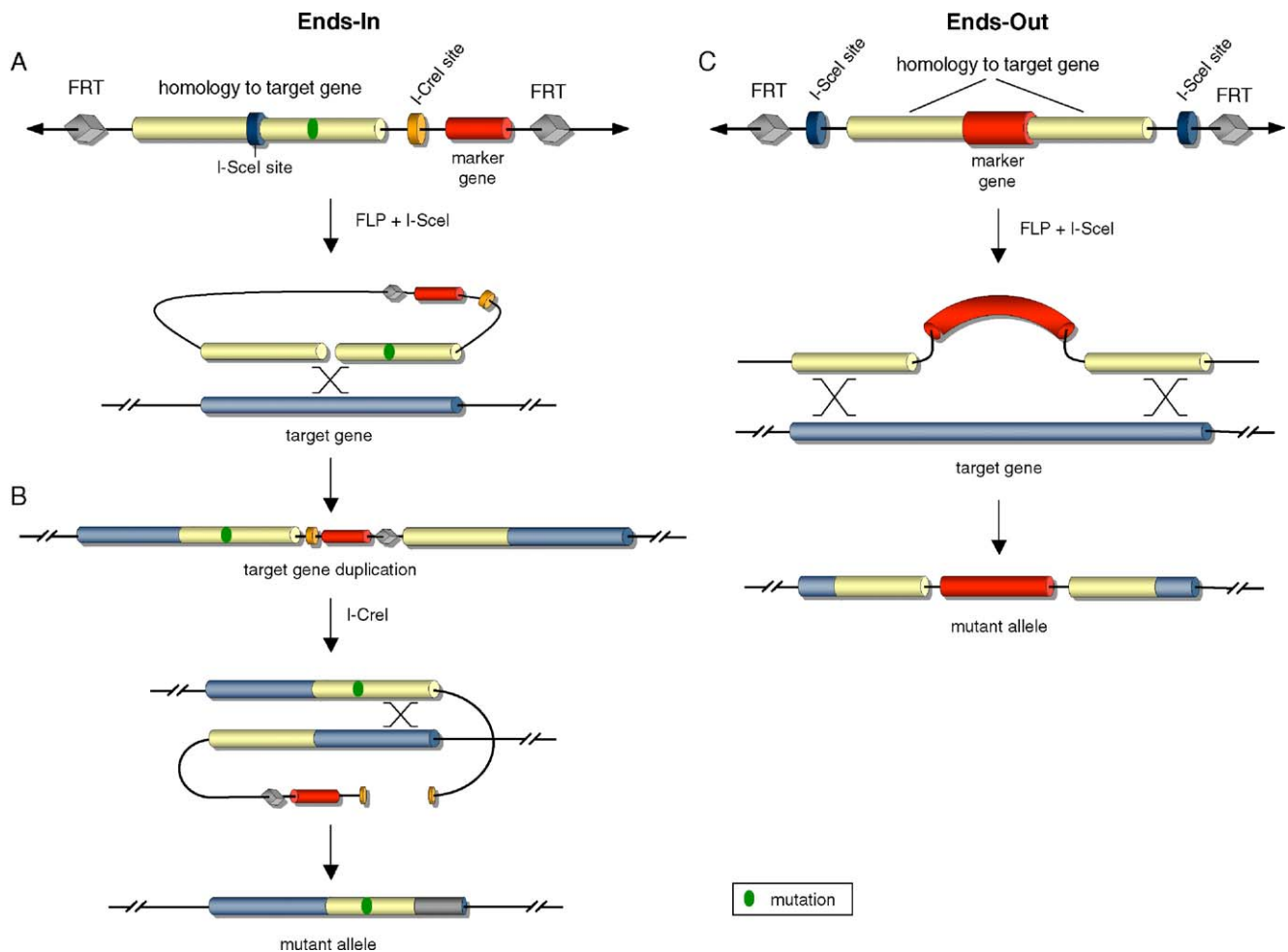


Fig. 1. Gene targeting in *Drosophila*. A, Ends-in technique and the elements of the donor construct. After transgenesis the combined action of FLP and endonuclease I-SceI generates the recombinogenic template, which produces the duplication at the target gene locus by homologous recombination. B, reduction of target gene repeats. The double-strand break caused by endonuclease I-CreI induces the second recombination. Ends-in targeting introduces a point mutation (green dot) in one of the alleles of the target gene. C, Ends-out technique. FLP and I-SceI generate a linear DNA molecule that undergoes homologous recombination with the target gene.

incorporates several specific features: a DNA region homologous to the target gene containing the specific mutation(s), two FLP Recombination Target (FRT) sequences, an I-SceI endonuclease recognition site, an I-CreI endonuclease recognition site, and a marker gene, usually *white*⁺. P-element transformation is performed by standard methods [4]. The range of total local homology that has led to successful targeting is between 2 kb and 9 kb, with >4 kb utilized in most cases [56]. Second, a series of crosses between the transgenic flies carrying the donor element with fly stocks harboring FLP and I-SceI transgenes allow the expression of the enzymes by heat shock induction, thus generating the recombinogenic donor, and inducing targeted homologous recombination. Homologous recombination generates a typical structure in which the endogenous and the mutant copies of the gene flank the marker gene at the target locus. The *wild-type-white⁺-mutant* gene structure is not expected to manifest a phenotype until reduction. Finally, a second homologous recombination event resulting from expression of the endonuclease I-CreI removes one copy of the gene, the wild-type or the mutant, and the *white* marker. This results in the replacement of the endogenous copy with a version containing the specific mutation without any other alterations in the genome. To date, this novel method has been used to generate mutant alleles of several endogenous *Drosophila* genes [57].

4.2. Ends-out

Ends-out targeting is the most frequently used method in mice and yeast. This technique starts with a different donor construct structure, and also differs from Ends-in in the position of the specific-site endonuclease cleavage sites (Fig. 1C). The double-stranded breakage occurs at the outer ends of donor DNA. The

process of Ends-out targeting is similar to Ends-in targeting; through the action of FLP and I-SceI, a linear DNA extrachromosomal donor fragment is generated, and it is targeted to the endogenous allele by homologous recombination. Two of the advantages of the Ends-out method are that the target gene can be replaced without the involvement of a tandem duplication, thus generating a knock-in or knock-out in one step. In addition, the donor construct is easier to make than in Ends-in. The disadvantage of this technique is that the end product leaves exogenous sequence at the altered locus, usually the marker gene [58]. Ends-out gene targeting has been used successfully to target *yellow*, the myocardin-related transcription factor *DMRTF*, and the odorant-receptor gene, *Or83b* (reviewed in [6]).

5. Current models of mitochondrial diseases in flies

In our laboratories, we are developing a *Drosophila* model of mitochondrial pathology associated with pol γ mutations using the knock-in technology. Even though we have been successful in circumventing by low-level expression the deleterious phenotypes engendered with high-level overexpression of wild-type pol γ-α we recognize that potential problems may result from developmental and spatial mis-expression of a transgene. Thus, we have altered our strategy for mutagenesis in *Drosophila* to use targeted gene replacement by homologous recombination (Fig. 2). Our objective has been to introduce in *Drosophila* versions of the *pol* γ-α gene that are associated with PEO in humans, and to examine the effects of several mutations in the *Drosophila* *pol* γ-α and *pol* γ-β genes for which disease phenotypes have not yet been reported in humans. Of the 30 different mutations that have been identified in the human *pol* γ-α gene [59], approximately half are in strictly conserved positions in the orthologous gene in

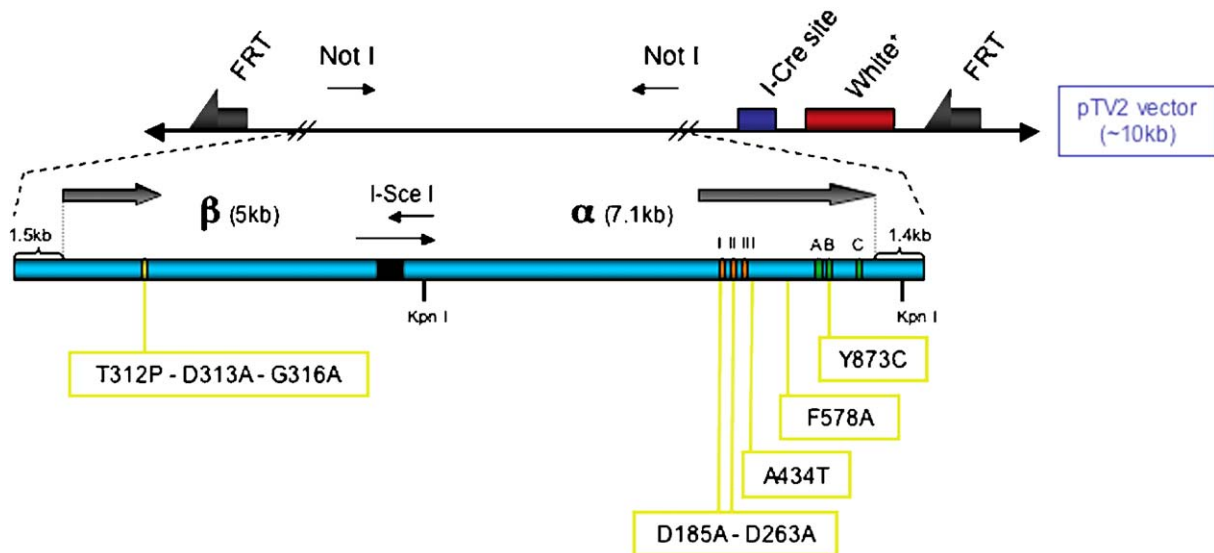


Fig. 2. Pol γ knock-in in *Drosophila*. Approximately 12 kb of DNA from the *D. melanogaster* *pol* γ cluster genomic region [60] was amplified by PCR and cloned into the vector pBluescript. For simplicity, only the *pol* γ-α and *pol* γ-β genes are shown schematically (arrows). The I-SceI recognition site was introduced between the genes, and this construct was used to generate specific mutations (boxed in yellow) in the *pol* γ-α or *pol* γ-β coding regions. The conserved exonuclease (I, II and III), and polymerase (A, B and C) active site motifs are indicated by boxes. Each of the modified genomic DNAs was cloned into the *NotI* site of the pTV2 vector, and the orientation of the inserted DNA was confirmed by *KpnI* digestion. The main features of the pTV2 vector are indicated as follows: FRTs (arrows), *white*⁺ marker gene (red box), I-CreI recognition site (blue box), *NotI* recognition sites (thin arrows).

Drosophila. We have selected two, A467T and Y955C (A434T and Y873C in *Drosophila*), which map within the conserved $\gamma 1$ element in the spacer region and the pol domain, respectively, and for which we and others have already evaluated the biochemical defects upon recombinant expression in the baculovirus system [60–63]. We have also selected the *Drosophila* $\gamma 3$ spacer-region mutation F578A, for which we have defined the biochemical defects [64]. In addition, we have introduced a double mutation (D185A and D263A) within two active site aspartate residues in the exonuclease domain, which we have shown to cause developmental defects, delays and arrest, and to limit life span when it is expressed at a low level using the UAS-GAL4 system in transgenic animals. Finally, we took advantage of our prior discovery that the two subunits of *Drosophila* pol γ map within a compact gene cluster [13] to generate a fragment containing ~12 kb donor homology that carries both the *pol* γ - α and γ - β genes, with the *I-SceI* site introduced between them. This allowed us to introduce specific amino acid substitutions in both pol γ - α and γ - β in a single recombinant donor construct. After homologous recombination, the expected product is a tandem partial duplication of the target genome sequence, with one copy containing the desired pol γ - α mutation and the other copy containing the desired pol γ - β mutation. As a result, we have also introduced three mutations in the C-terminal region of the *Drosophila* accessory subunit gene, which we have shown to be deleterious in our biochemical analysis of human pol γ - β .

Our immediate goals will be to evaluate these models using established protocols in *Drosophila* to analyze mtDNA content and integrity, respiratory chain complex activity, mitochondrial distribution and function, apoptotic signaling and importantly, larval and adult behaviour. We expect to establish an experimental system of mtDNA replication failure that is analogous to that associated with human pathologies and in doing so, we will establish a direct correlation between the defect(s) that the mutants exhibit in our biochemical assays and their phenotypic effects *in vivo*. We anticipate that this will set the stage for us to use the power of *Drosophila* molecular genetics to search for factors that modulate the phenotype, either augmenting or ameliorating it.

6. Concluding remarks

Although tissues requiring high oxidative metabolism are affected most severely in mitochondrial disorders, specific tissue involvement varies considerably. In order to develop therapies for these diseases, it is necessary to determine both the cellular processes and the tissues that are altered by insufficient energy supply. *Drosophila* models can help us to understand common aspects of these pathologies because they enable the identification of critical times, cell types and tissues that account for the disease-like phenotypes. Global transcriptional analysis of these models has already revealed many sets of genes, including those related to stress responses and metabolism, which are systematically up- or down-regulated according to the degree of the mitochondrial dysfunction. The ultimate aim of such transcriptomic approaches is to identify potential pharmacological targets in mitochondrial disease.

Because the recent development of efficient gene targeting methods has paved the way for the introduction of specific mutations responsible for human mitochondrial diseases, *Drosophila* offers substantial promise for understanding the pathogenic mechanisms of this devastating group of diseases.

Acknowledgements

We thank Erin Wakeling for critical reading and comments on the manuscript. This work was supported by European Union Project QLGI-CT-2001-00966, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (Grants BMC01-1525 and BFU2004-04591) and Instituto de Salud Carlos III, Redes de centros RCMN (C03/08) and Temáticas (G03/011 (to R.G.) and National Institutes of Health Grant GM45295 (to L.S.K.).

References

- [1] G.M. Rubin, E.B. Lewis, A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research, *Science* 287 (2000) 2216–2218.
- [2] M.A. Fernández-Moreno, C.L. Farr, L.S. Kaguni, R. Garesse. *Drosophila melanogaster* as a Model System to Study Mitochondrial Function, in *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc, Totowa, NJ. (in press).
- [3] M. Bate, A. Martínez-Arias, *The Development of Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1993.
- [4] G.M. Rubin, A.C. Spradling, Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors, *Science* 218 (1982) 348–353.
- [5] A.H. Brand, N. Perrimon, Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes, *Development* 118 (1993) 401–415.
- [6] K.J. Venken, H.J. Bellen, Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*, *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005) 167–178. (Erratum in: *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005)340).
- [7] J. Bilen, N.M. Bonini, *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease, *Annu. Rev. Genet.* 39 (2005) 153–171.
- [8] R. Garesse, C.G. Vallejo, Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes, *Gene* 263 (2001) 1–16.
- [9] R.C. Scarpulla, Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1576 (2002) 1–14.
- [10] R.C. Scarpulla, Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells, *J. Cell. Biochem.* 97 (2006) 673–683.
- [11] S.M. DeSimone, K. White, The *Drosophila* erect wing gene, which is important for both neuronal and muscle development, encodes a protein which is similar to the sea urchin P3A2 DNA binding protein, *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 3641–3649.
- [12] R. Garesse, L.S. Kaguni, A *Drosophila* model of mitochondrial DNA replication: proteins, genes and regulation, *IUBMB Life* 57 (2005) 555–561.
- [13] E. Lefai, M.A. Fernández-Moreno, L.S. Kaguni, R. Garesse, The highly compact structure of the mitochondrial DNA polymerase genomic region of *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications, *Insect Mol. Biol.* 9 (2000) 315–322.
- [14] I. Ruiz de Mena, E. Lefai, R. Garesse, L.S. Kaguni, Regulation of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein gene expression links nuclear and mitochondrial DNA replication in *Drosophila*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 13628–13636.
- [15] K. Takata, H. Yoshida, F. Hirose, M. Yamaguchi, M. Kai, M. Oshige, I. Sakimoto, O. Koizumi, K. Sahaguchi, *Drosophila* mitochondrial transcription factor A: characterization of its cDNA and expression pattern during development, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287 (2001) 474–483.
- [16] Y. Matsushima, C. Adán, R. Garesse, L.S. Kaguni, *Drosophila* transcription factor B1 modulates mitochondrial translation but not transcription or DNA copy number in Schneider cells, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 16815–16820.

- [17] Y. Matsushima, R. Garesse, L.S. Kaguni, *Drosophila* transcription factor B2 regulates mitochondrial DNA copy number and transcription in Schneider cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 26900–26905.
- [18] M. Roberti, P. Fernández-Silva, P.L. Polosa, E. Fernández-Viana, F. Bruni, S. Deceglie, J. Montoya, M.N. Gadaleta, P. Cantatore, In vivo transcription termination activity of the *Drosophila* mitochondrial DNA-binding protein DmTTF, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331 (2005) 357–362.
- [19] M. Sardiello, G. Tripoli, A. Romito, C. Minervini, L. Viggiano, C. Caggese, G. Pesole, Energy biogenesis: one key for coordinating two genomes, *Trends Genet.* 21 (2005) 12–16.
- [20] M. Galloni, Bonsai, a ribosomal protein S15 homolog, involved in gut mitochondrial activity and systemic growth, *Dev. Biol.* 264 (2003) 482–494.
- [21] S.L. Helfand, B. Rogina, Genetics of aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, *Annu. Rev. Genet.* 37 (2003) 329–348.
- [22] Y.H. Song, *Drosophila melanogaster*: a model for the study of DNA damage checkpoint response, *Mol. Cell* 19 (2005) 67–179.
- [23] J.E. Wilhelm, C.A. Smibert, Mechanisms of translational regulation in *Drosophila*, *Biol. Cell* 97 (2005) 235–252.
- [24] S.A. Davies, Signalling via cGMP: Lessons from *Drosophila*, *Cell. Signal.* 18 (2006) 409–421.
- [25] R. Farahani, C.G. Haddad, Understanding the molecular responses to hypoxia using *Drosophila* as a genetic model, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 135 (2003) 221–229.
- [26] R.L. Davis, Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience, *Annu. Rev. Neurosci.* 28 (2005) 275–302.
- [27] P.E. Hardin, The circadian timekeeping system of *Drosophila*, *Curr. Biol.* 15 (2005) 714–722.
- [28] L. Chen, M.B. Feany, Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease, *Nat. Neurosci.* 8 (2005) 657–663.
- [29] E.C. Woodhouse, L.A. Liotta, *Drosophila* invasive tumors: a model for understanding metastasis, *Cell Cycle* 3 (2004) 38–40.
- [30] M.J. Wolf, H. Amrein, J.A. Izatt, M.A. Choma, M.C. Reedy, H.A. Rockman, *Drosophila* as a model for the identification of genes causing adult human heart disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 1394–1399.
- [31] M. Saitoe, J. Horiuchi, T. Tamura, N. Ito, *Drosophila* as a novel animal model for studying the genetics of age-related memory impairment, (16) *Rev. Neuroscience* (2005) 137–149.
- [32] M. Wilson, J.H. Widdicombe, K. Gohil, K.C. Burtis, A.Z. Reznick, C.E. Cross, J.P. Elserich, Are *Drosophila* a useful model for understanding the toxicity of inhaled oxidative pollutants: a review, *Inhal. Toxicol.* 17 (2005) 765–774.
- [33] R. McFarland, R.W. Taylor, D.M. Turnbull, The neurology of mitochondrial DNA disease, *Lancet Neurol.* 1 (2002) 343–351.
- [34] J.A. Smeitink, M. Zeviani, D.M. Turnbull, H.T. Jacobs, Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders, *Cell Metab.* 3 (2006) 9–13.
- [35] A. Spinazzola, M. Zeviani, Disorders of nuclear-mitochondrial inter-genomic signalling, *Gene* 354 (2005) 16–18.
- [36] R.K. Naviaux, W.L. Nyhan, B.A. Barshop, J. Poulton, D. Markusic, N.C. Karpinski, R.H. Haas, Mitochondrial DNA polymerase γ deficiency and mtDNA depletion in a child with Alpers' syndrome, *Ann. Neurol.* 45 (1999) 54–58.
- [37] E. Lefai, M. Calleja, I. Ruiz de Mena, A.T. Lagina III, L.S. Kaguni, R. Garesse, Overexpression of the catalytic subunit of DNA polymerase γ results in depletion of mitochondrial DNA in *Drosophila melanogaster*, *Mol. Gen. Genet.* 264 (2000) 37–46.
- [38] J.M. Toivonen, K.M. O'Dell, N. Petit, S.C. Irvine, G.K. Knight, M. Lehtonen, M. Longmuir, K. Luoto, S. Touraille, Z. Wang, S. Alziari, Z.H. Shah, H.T. Jacobs, Technical knockout, a *Drosophila* model of mitochondrial deafness, *Genetics* 159 (2001) 241–254.
- [39] H.T. Jacobs, J. Fernandez-Ayala, S. Manjiry, E. Kemppainen, J.M. Toivonen, K.M. O'Dell, Mitochondrial disease in flies, *Biochim. Biophys. Acta* 1659 (2004) 190–196.
- [40] S. DiMauro, E.A. Schon, Mitochondrial respiratory chain diseases, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 2656–2658.
- [41] M. Bohm, E. Pronicka, E. Karcmarewicz, M. Pronicki, D. Piekutowska-Abramczuk, J. Sykut-Cegielska, H. Mierzewska, H. Hansikova, K. Vesela, M. Tesarova, H. Houstkova, J. Houstek, J. Zeman, Retrospective, multicentric study of 180 children with cytochrome *c* oxidase deficiency, *Pediatr. Res.* 59 (2006) 21–26.
- [42] V. Tiranti, C. Galimberti, L. Nijtmans, S. Bovolenta, M.P. Perini, M. Zeviani, Characterization of SURF-1 expression and Surf-1p function in normal and disease conditions, *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999) 2533–2540.
- [43] A. Agostino, F. Invernizzi, C. Tiveron, G. Fagiolari, A. Prella, E. Lamantea, A. Giavazzi, G. Battaglia, L. Tatangelo, V. Tiranti, M. Zeviani, Constitutive knockout of Surf1 is associated with high embryonic lethality, mitochondrial disease and cytochrome *c* oxidase deficiency in mice, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 399–413.
- [44] L.G. Nijtmans, M. Artal-Sanz, M. Bucko, M.H. Farhoud, M. Feenstra, G.A. Hakkaart, M. Zeviani, L.A. Grivell, Shy1p occurs in a high molecular weight complex and is required for efficient assembly of cytochrome *c* oxidase in yeast, *FEBS Lett.* 498 (2001) 46–51.
- [45] M.A. Zordan, P. Cisotto, C. Benna, A. Agostino, G. Rizzo, A. Piccin, M. Pegoraro, F. Sandrelli, G. Perini, G. Tognon, R. De Caro, S. Peron, T.T. Kronnie, A. Megighian, C. Reggiani, M. Zeviani, R. Costa, Post transcriptional silencing and functional characterization of the *Drosophila melanogaster* homolog of Human Surf1, *Genetics* 172 (2006) 229–241.
- [46] V. Campuzano, L. Montermini, M.D. Molto, L. Pianese, M. Cossee, F. Cavalcanti, E. Monros, F. Rodius, F. Duclos, A. Monticelli, F. Zara, J. Canizares, H. Koutnikova, S.I. Bidichandani, C. Gellera, A. Brice, P. Trouillas, G. De Michele, A. Filla, R. De Frutos, F. Palau, P.I. Patel, S. Di Donato, J.L. Mandel, S. Coccoza, M. Koenig, M. Pandolfo, Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion, *Science* 271 (1996) 1423–1427.
- [47] M. Pandolfo, Frataxin deficiency and mitochondrial dysfunction, *Mitochondrion* 2 (2002) 87–93.
- [48] M. Babcock, D. de Silva, R. Oaks, S. Davis-Kaplan, S. Jiralerspong, L. Montermini, M. Pandolfo, J. Kaplan, Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin, *Science* 276 (1997) 1709–1712.
- [49] M. McBurney, W.E.M. Jones-Villeneuve, M.K. Edwards, P.J. Anderson, Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line, *Nature* 299 (1982) 165–167.
- [50] M. Cossee, A. Gansmuller, H. Koutnikova, A. Dierich, M. LeMeur, K. Fischbeck, P. Dolle, M. Koenig, Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 1219–1226.
- [51] H. Puccio, D. Simon, M. Cossee, P. Criqui-Filipe, F. Tiziano, J. Melki, C. Hindelang, R. Matyas, P. Rustin, M. Koenig, Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits, *Nat. Genet.* 27 (2001) 181–186.
- [52] P.R. Anderson, K. Kirby, A.J. Hilliker, J.P. Phillips, RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 3397–3405.
- [53] A.M. Celotto, A.C. Frank, S.W. McGrath, T. Fergestad, W.A. Van Voorhies, K.F. Buttle, C.A. Mannella, M.J. Palladino, Mitochondrial encephalomyopathy in *Drosophila*, *J. Neurosci.* 26 (2006) 810–820.
- [54] J. Kaukonen, J.K. Juselius, V. Tiranti, A. Kittala, M. Zeviani, G.P. Comi, S. Keranene, L. Peltonene, A. Suomalainen, Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance, *Science* 289 (2000) 782–785.
- [55] Y.S. Rong, K.G. Golic, Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*, *Science* 288 (2000) 2013–2018.
- [56] X. Bi, Y.S. Rong, Genome manipulation by homologous recombination in *Drosophila*, *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, vol. 2, 2003, pp. 142–146.
- [57] Y.S. Rong, S.W. Titen, H.B. Xie, M.M. Golic, M. Bastiani, P. Bandyopadhyay, B.M. Olivera, M. Brodsky, G.M. Rubin, K.G. Golic, Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*, *Genes Dev.* 16 (2002) 1568–1581.
- [58] W.J. Gong, K.G. Golic, Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 2556–2561.

- [59] A. Di Fonzo, A. Bordoni, M. Crimi, G. Sara, R. Del Bo, N. Bresolin, G.P. Comi, POLG mutations in sporadic mitochondrial disorders with multiple mtDNA deletions, *Hum. Mutat.* 22 (2003) 498–499.
- [60] P.T. Luoma, N. Luo, W.N. Loscher, C.L. Farr, R. Horvath, J. Wanschitz, S. Kiechl, L.S. Kaguni, A. Suomalainen, Functional defects due to spacer-region mutations of human mitochondrial DNA polymerase in a family with an ataxia–myopathy syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 1907–1920.
- [61] S.S. Chan, M.J. Longley, W.C. Copeland, The common A467T mutation in the human mitochondrial DNA polymerase (POLG) compromises catalytic efficiency and interaction with the accessory subunit, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 31341–31346.
- [62] M.V. Ponamarev, M.J. Longley, D. Nguyen, T.A. Kunkel, W.C. Copeland, Active site mutation in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia causes error-prone DNA synthesis, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 15225–15228.
- [63] M.A. Graziewicz, M.J. Longley, R.J. Bienstock, M. Zeviani, W.C. Copeland, Structure–function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2004) 770–776.
- [64] N. Luo, L.S. Kaguni, Mutations in the spacer region of *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase affect DNA binding, processivity, and the balance between Pol and Exo function, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 2491–2497.
- [65] E. Lefai, M.A. Fernández-Moreno, A. Alahari, L.S. Kaguni, R. Garesse, The expression of the catalytic and accessory subunits of the mitochondrial DNA polymerase are differentially regulated in *Drosophila melanogaster*, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 33123–33133.
- [66] K. Takata, Y.H. Inoue, F. Hirose, S. Murakami, K. Shimanouchi, I. Sakimoto, K. Sakaguchi, Spatio-temporal expression of *Drosophila* mitochondrial transcription factor A during development, *Cell Biol. Int.* 27 (2003) 361–374.

Intergenomic Nuclear-Mitochondrial Cross-Talk in *Drosophila melanogaster*

Lucía Echevarría, Álvaro Sánchez-Martínez, Paula Clemente, Rosana Hernández-Sierra, Miguel Ángel Fernández-Moreno and Rafael Garesse*

Abstract

Mitochondrial biogenesis is a complex process that depends on the coordinated expression of genes encoded in two different genomes, the nuclear and the mitochondrial genome. In response to extracellular signals and environmental cues and based on the communication between the mitochondria and nucleus, this process is strictly controlled during cell differentiation to supply different tissues with the correct number of functional mitochondria. To understand the physiopathology of mitochondrial biogenesis, it is critical to unravel the biochemical and molecular basis of this intergenomic cross-talk. In mammals, cofactors of the PGC-1 family are fundamental to integrate the response of specific transcription factors. In particular, Nuclear Respiratory Factors 1 and 2 activate the expression of a wide variety of respiratory genes. This regulatory transcriptional circuit is poorly documented in *Drosophila*, although a well conserved element, the Nuclear Respiratory Gene element, could play an important role in orchestrating energetic metabolism. In addition, the *Drosophila* DNA replication-related element binding factor (DREF) regulates the expression of genes encoding critical elements of mtDNA metabolism, establishing a molecular link between mtDNA and nDNA replication. The use of *Drosophila* mutants with impaired oxidative phosphorylation has facilitated the study of several pathways involved in nuclear-mitochondrial communication.

Introduction

Mitochondria are essential endosymbiotic organelles that supply energy to the majority of eukaryotic cells through Oxidative Phosphorylation (OXPHOS). However, their complex integration into the dynamics of the cell extends far beyond the capacity to generate ATP. Indeed, the production of other essential metabolites as well as their role in integrating numerous cell signals in processes such as apoptosis, calcium homeostasis and ROS signaling mean that mitochondria are fundamental elements for cells physiology.¹ Since the energy demand varies considerably between different tissues, mitochondrial biogenesis needs to be strictly controlled during development and

*Corresponding Author: Rafael Garesse—Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Arzobispo Morcillo 4, E-28029 Madrid, Spain.
Email: rafael.garesse@uam.es

cell differentiation to supply the appropriate number of structural and functionally differentiated mitochondria to the various cell types of the organism.

In metazoans, mitochondria have their own genome, which is comprised of a small covalently closed circular molecule ranging in size between 16 and 21 kb. This DNA fragment encodes 22 tRNAs, 2 rRNAs and 13 subunits of the OXPHOS system: seven subunits of complex I (ND1-6 and ND4L), one subunit of complex III (Cytochrome b), three subunits of complex IV (COX I-III) and two subunits of complex V (ATPase: 6,8). However, the rest of the OXPHOS subunits and all of the proteins involved in the mitochondrial DNA (mtDNA) metabolism are encoded in the nucleus, translated in the cytoplasm and imported into mitochondria by translocases located in the inner and outer mitochondrial membranes.² Indeed, the restrictive coding capacity of mtDNA implies that bi-genomic synthesis of the respiratory chain subunits depends on the coordinated expression of two genomes, the mitochondrial and nuclear. Thus, mitochondrial biogenesis is an extremely complex and well orchestrated process that needs to be precisely regulated in response to the varying physiological demands of the cell.

Impaired mitochondrial function and particularly, defects in the synthesis of ATP, leads to pathological conditions that mainly affect tissues with a higher energy demand, such as muscle or nervous tissue.^{3,4} However, the study and diagnosis of mitochondrial diseases are complicated since the pathological mutations may occur in either the mitochondrial or nuclear genomes and they involve a wide variety of clinical signs. During recent years an increasing number of pathological mutations have been identified and studied in the mitochondrial genome and in nuclear-encoded mitochondrial genes. However, many challenging issues remain to be resolved before we can fully understand the pathophysiology of mitochondrial diseases, in part because the regulatory mechanisms underlying tissue-specific mitochondrial biogenesis are still virtually unknown. In this vein, the molecular pathways involved in nuclear-mitochondrial communication are among the processes that are still to be unraveled.

Nuclear-Mitochondrial Cross-Talk: Lessons from Mammals

The identification of regulatory mechanisms that might influence mitochondrial biogenesis began with the functional characterization of the promoter region of genes encoding the *cytochrome c* and *cytochrome c oxidase* subunits, both in mammals and yeast.^{5,6} This approach, led to the identification of several mammalian nuclear-encoded transcriptional regulators that play a key role in nuclear-mitochondrial intergenomic signaling.⁷ These regulatory proteins can be functionally divided into two classes: transcription factors that directly bind gene promoters; and co-activators that do not bind DNA but that regulate gene expression by interacting with other transcription factors and coregulators. In the first category, we can consider transcription factors such as the nuclear respiratory factor 1 (NRF-1) and nuclear respiratory factor 2 (NRF-2). Binding sites for NRF-1 and NRF-2 are present in the promoter regions of genes encoding structural subunits of the respiratory chain complexes, assembly factors, components of the machinery for mtDNA metabolism, factors in the mitochondrial protein import system and enzymes belonging to heme biosynthesis pathway.⁸ Furthermore, the mitochondrial transcription factor A (TFAM), the transcription specificity factors TFBM1 and TFBM2 and the mitochondrial RNA polymerase, all of which are essential for mtDNA maintenance and expression, bind NRF-1 in vivo, confirming that this transcription factor is a crucial element in nucleo-mitochondrial cross-talk.⁹

The second class of regulatory proteins belong to the PGC-1 family of co-activators (PGC-1 α , PGC-1 β and PRC), the expression of which is induced by extracellular signals leading to the trans-activation of respiratory target genes through NRF-1 and NRF-2.⁸ PGC-1 α was first identified in brown adipose tissue and thereafter two other analogous co-activators were found, PGC-1 β and the PGC-1 related co-activator (PRC).¹⁰ PGC-1 α and PGC-1 β are predominantly expressed in tissues with a high energy demand in which mitochondria are enriched. Indeed, several studies have shown that the over-expression of PGC-1 α and PGC-1 β is sufficient to induce the expression of regulatory genes responsible for cellular energy production in a variety of mammalian tissues.¹⁰ Recent studies have highlighted the role of these factors in integrating

respiratory gene expression with other cellular metabolic pathways and biological processes in a tissue-specific manner. Hence, NRFs and PGC-1 transcriptional regulators provide a molecular framework within which nuclear-mitochondrial communication can be understood in the general context of the cells response to a wide variety of environmental changes.^{8,10}

Nuclear-Mitochondrial Cross-Talk in *Drosophila melanogaster*

The Drosophila melanogaster Mitochondrial Genetic System

The structure of the mitochondrial genome in *Drosophila* displays some differences from vertebrate mtDNA. Although the gene content is the same, the order and distribution of the genes on both DNA strands differs substantially (Fig. 1). The only noncoding region (control region) contains 90-96% deoxyadenylate and thymidylate residues (the A+T rich-region) and it ranges in size from 1 to 5 Kb in the different *Drosophila* subgroups (approximately 5 Kb in *D.melanogaster*).

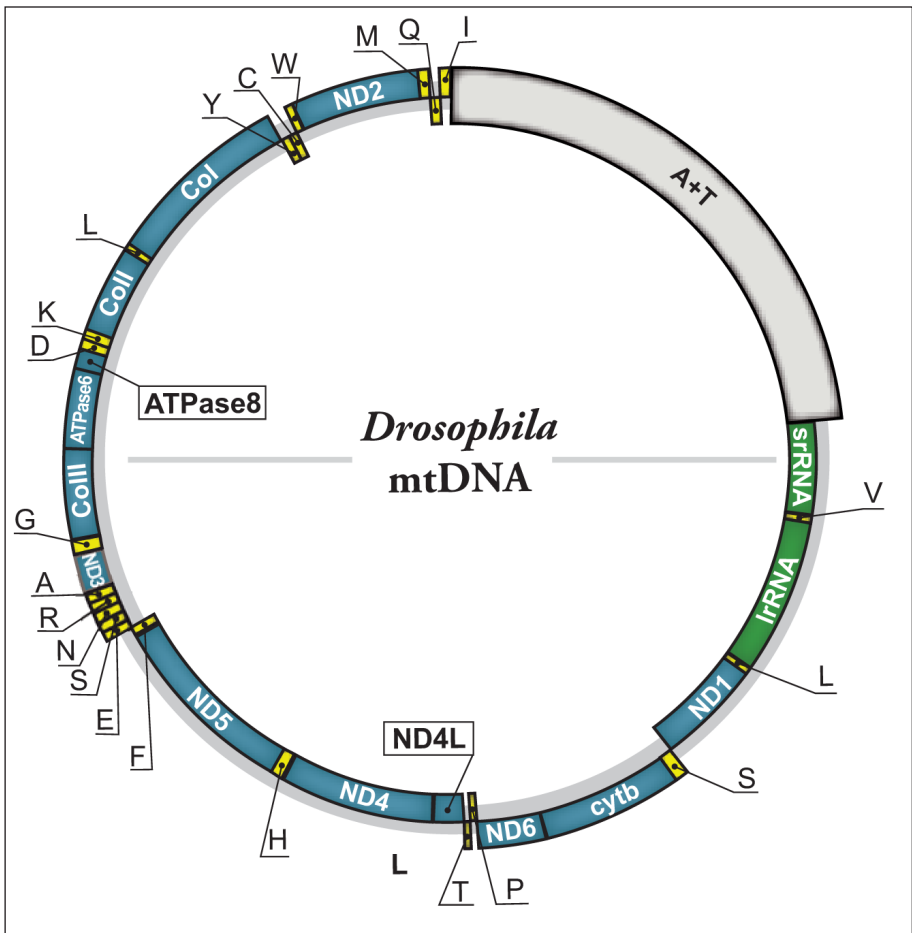


Figure 1. Map of the *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA. This circular molecule, of 19517 base pairs in length, encodes 13 proteins (in boxes), 22 tRNAs (in a single setter code) and 2 rRNAs (in boxes). The 5 kb control region with a high AT content is indicated in the thicker box and it includes the origins of replication for both strands. Sequence reference NC_001709.

Recently and in complete agreement with earlier electron microscopy analyses,^{11,12} the origins of replication for both strand were precisely located close to conserved T-stretches within the A+T region.¹³ Indeed, sequence analysis in several *Drosophila* species has also detected the presence of two additional highly conserved elements in the A+T region (I, II) that may be involved in transcription, although there is no evidence regarding their function to date.¹⁴⁻¹⁶

In contrast to the poor characterization of mtDNA metabolism in *Drosophila*, most of the genes encoding components of the replication and transcription machineries of the *Drosophila* mtDNA have been identified in the last few years. Moreover, the majority of these have been characterized at the genetic and molecular levels. Examples of such elements are: the catalytic and accessory subunits of the mitochondrial DNA polymerase, pol γ ; the mitochondrial single-stranded DNA binding protein, mtSSB; a mitochondrial DNA helicase; several transcription factors (TFAM, TFB1M and TFB2M); and a single RNA polymerase, mtRNAPol (reviewed in ref. 17). Several of these proteins are essential for the maintenance and transcription of mtDNA in *Drosophila*. Interestingly, all of these factors are well conserved with respect to their vertebrate counterparts, suggesting that the mechanisms involved in mtDNA replication and transcription, are conserved in metazoans.

Is Erect Wing (d-NRF1) Involved in Drosophila Mitochondrial Biogenesis?

Different members of a family of transcription factors closely related to NRF1 have been identified in several organisms including two invertebrates: the sea urchin (termed P3A2¹⁸) and *Drosophila* (termed Erect Wing, EWG,¹⁹). Several studies have demonstrated that EWG dimers bind to bona fide NRF1 binding sites and activate transcription in cell transfection assays.^{20,21} Like NRF1, EWG localizes in the nucleus and it specifically interacts with the dynein light chain, both in vitro and in transfected cells.²⁰ Therefore, it is clear that NRF1 and EWG are structurally and functionally related transcription factors, suggesting that EWG could play a similar role in nuclear-mitochondrial communication in *Drosophila* to that of NRF1 in mammals.

Genetic analysis of the *ewg* gene in *Drosophila* has firmly established that EWG is essential for the development of the nervous system and the specification of the myoblasts that give rise to the indirect flight muscles.²² However, no target genes for EWG have been identified to date. Although the exact binding site for EWG has not been precisely determined, it has a high affinity for the NRF1 binding sites and it is likely that both sites are highly related, or even identical. We have searched for the presence of the NRF1/EWG consensus binding sites (TGCGCATGCGCA) in the proximal promoter region of a wide number of nuclear-encoded mitochondrial genes, including OXPHOS genes (H⁺ ATP synthase subunits α and β), the δ -aminolevulinic synthase (δ -ALAS) and all the genes identified that encode factors involved in mtDNA replication and transcription. Neither the canonical conserved sequence nor the more relaxed (T/CN GCGC A/T) recognized by P3A2¹⁸ are present in the 5' upstream region of the majority of the mitochondrial genes analyzed. The exceptions are pol γ - α and d-TFAM that could contain potential candidate binding sites. We have analyzed the promoter region of the pol γ - α gene using site-directed mutagenesis and cell transfection assays. Surprisingly, EWG represses the expression of *Drosophila* pol γ - α , at least in Schneider cells, in contrast to the general activator role of NRF1 in mammals (M. Fernández-Moreno, unpublished data). Although it is obvious that much more effort is needed to elucidate the potential implication of EWG in energy biogenesis in *Drosophila*, it is important to note that the NRF1 homologue in sea urchin (P3A2) also functions as a repressor,¹⁸ a result that suggests a potential inhibitory function of NRF1 homologues in invertebrates. In addition, no obvious candidate orthologues of NRF-2 and PGC1- α co-activators have been identified in the *Drosophila* genome, indicating that nuclear-mitochondrial communication coordinating energy metabolism could operate through a different circuit in vertebrates and invertebrates.

DREF and Mitochondrial Biogenesis

In order to identify transcription factors that are potentially involved in nuclear-mitochondrial communication in *Drosophila*, we have functionally characterized a wide variety of the promoter regions of genes encoding proteins involved in mitochondrial biogenesis using cell transfection assays (refs. 23-26 and unpublished data). We found that several genes encoding factors involved

in mtDNA replication contain a conserved binding site in their proximal promoter region that is recognized by the *Drosophila* DNA replication-related element binding factor (DREF). Systematic mutational analysis of the DRE sites (5'-TATCGATA-3') demonstrated that they are functional in the genes encoding the accessory subunit of DNA polymerase γ ($pol\ \gamma-\beta$), the mitochondrial single strand binding protein (*mtSSB*) and the mitochondrial helicase, all of which are essential for mtDNA replication.¹⁷ In addition, the proximal promoters of the genes encoding transcription factors A (TFAM) and B2 (TFB2M) and the transcription termination factor (TTF), also contain functional DRE sites (R. Garesse et al unpublished data). It is important to bear in mind that the primer needed for initiating mtDNA replication is synthesized by the mitochondrial RNA polymerase and therefore, mitochondria mtDNA synthesis also depends on the mtDNA transcription machinery. In conclusion, these data indicate that mtDNA replication in *Drosophila* is reliant on DREF.

DREF is an 80 kDa protein that activates transcription as a homodimer.²⁷ This activation augments synergistically when the number of DRE elements in the promoter increases and it is greater if these elements are located close to the transcription start site. DREF not only activates transcription as a classic transcription factor but also, it acts as a component of the basal transcription machinery in conjunction with TRF-2 (TBP-related factor 2) and it serves as a promoter selectivity factor.²⁸

Interestingly, the DRE element was first identified in the promoter region of *Drosophila* genes encoding for DNA polymerase α and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA),²⁹ which are both involved in nuclear DNA replication. However, DRE has since also been shown to act on the promoter of other *Drosophila* genes related to nDNA replication and cell cycle control, including cyclin A and E2F.^{30,31} Accordingly, loss of function experiments in vivo demonstrated that DREF is critical for efficient growth and cell cycle progression in *Drosophila*.³² Recently, it has been determined that DREF drives the cell cycle dependent expression of 22 out of 79 genes encoding ribosomal proteins in humans,³³ suggesting that DREF is also a critical transcription factor for cell proliferation in mammals.

In sum, the DRE/DREF system regulates the coordinated expression of different genes that are essential for nDNA and mtDNA replication, as well as a variety of genes involved in cell cycle regulation and cell proliferation. This strongly suggests a molecular link between nDNA and mtDNA replication during the cell cycle, at least in *Drosophila*. This is especially relevant since it was generally assumed that mitochondria replicate their mtDNA in any phase of the cell cycle, independent of nDNA replication.³⁴ Although this is most likely the case in postmitotic cells, the data obtained from *Drosophila* suggest that mtDNA and nDNA replication could be at least partially coupled during the cell cycle of proliferating cells. Accordingly, a recent study of mitochondrial biogenesis and dynamics in liver cells, demonstrated that nuclear and mitochondrial DNA replication are synchronized during cell proliferation.³⁵

The Nuclear Respiratory Gene Element

In 2005, using an in silico genomic approach, a novel putative regulatory DNA element was identified that could play a central role in the coordinated expression of genes involved in energy production in *Drosophila*.³⁶ This conserved sequence element, designated the Nuclear Respiratory Gene element (NRG), is a 10 bp-long palindromic sequence (5'-RTTAYRTAA-3') located within the first 800 bp downstream of the transcription start site of many nuclear-encoded mitochondrial genes, preferentially in their first or second intron. Having used a phylogenetic footprinting strategy, this analysis was quite robust. Moreover, it demonstrated that the NRG element is conserved at similar positions in orthologous genes from *D. pseudoobscura*, a species that diverged from *D. melanogaster* 40-60 million years ago.

More than 180 *Drosophila melanogaster* genes with a mitochondrial function contain NRG sites and these include: all Krebs cycle genes; enzymes involved in pyruvate oxidation, lipid degradation and amino acid metabolism; proteins of the mitochondrial import machinery; and mitochondrial carriers. In addition, all the genes encoding OXPHOS subunits contain at least one NRG site and most interestingly, NRG elements are present in genes encoding essential factors of all aspects of

mtDNA metabolism: mtDNA replication, transcription and translation. This suggests that NRG could be coordinating the expression of nuclear and mitochondrial respiratory chain subunits.

Although the NRG elements had not previously been identified in *Drosophila*, similar consensus sequences had been found in vertebrates. They are recognized by the Proline and Acid rich (PAR) family of basic leucine zipper transcription factors³⁷ that are involved in a wide variety of essential processes ranging from amino acid metabolism to apoptosis.³⁸ Unfortunately, the *Drosophila* transcription factors that recognize the NRG site have not been identified and there is no experimental evidence supporting the role of NRG *in vivo*. Thus, an important challenge is to demonstrate how NRG elements are implicated in orchestrating nuclear-mitochondrial cross-talk and to identify the regulators that mediate these processes, in order to understand how energy metabolism in *Drosophila* is coordinated (Fig. 2).

Nuclear Response to OXPHOS Deficiency

Cells can respond to changes in mitochondrial activity with changes in nuclear gene expression, a process called retrograde communication or retrograde mitochondrial signaling. This pathway has mainly been characterized during the last few years in yeast and it involves several transcription factors (RTGs) sensitive to changes in mitochondrial activity.³⁹ Upon the reception of a nuclear signal, cell metabolism can adapt to deficiencies in mitochondrial function. In animal mitochondria retrograde signaling from the mitochondria to nucleus has mainly been described as a response to mitochondrial stress.^{40,41} Such signals provoke an increase in cytosolic Ca^{2+} concentrations thereby activating the Ca^{2+} /calmodulin pathway and modulating the activity of several transcrip-

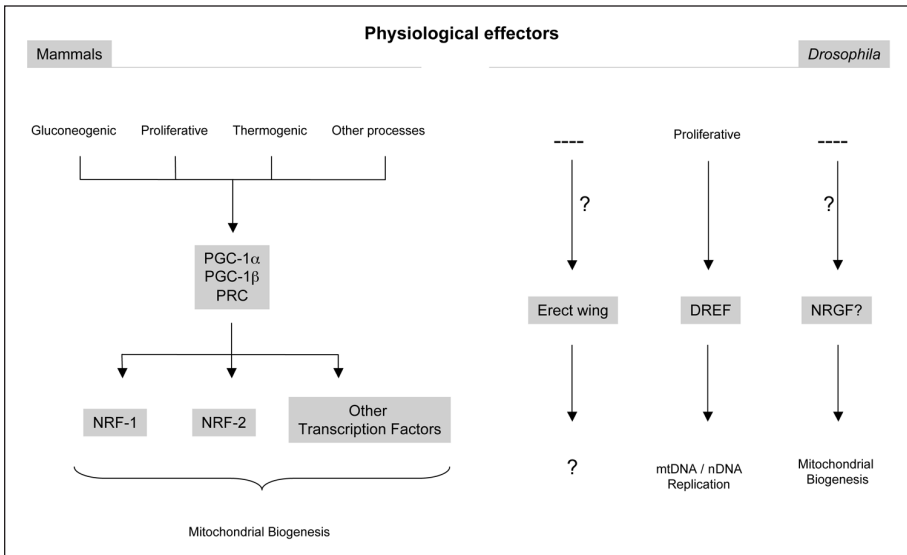


Figure 2. Transcriptional regulators of mitochondrial biogenesis in mammals and *Drosophila*. A parallel schematic representation shows the nuclear control of mitochondrial function and biogenesis by transcriptional regulators, activators and coactivators, in mammals and *Drosophila*. As shown, mammalian mitochondria are controlled by members of the PGC-1 family (PGC-1 α , PGC-1 β and PRC) that regulate the direct binding of the Nuclear Respiratory Factors- 1 and -2 to promoters of nuclear genes encoding mitochondrial proteins. In *Drosophila*, functional studies have only been carried out on DREF (*Drosophila* DNA Replication-related Element transcription Factor), establishing a link between nuclear and mitochondrial DNA replication. Two other factors are good candidates to regulate mitochondrial function and biogenesis in *Drosophila*, Erect wing (the putative orthologue of NRF-1) and NRGF (the Nuclear Respiratory Gene Factor).

tion factors. Furthermore, in a series of elegant experiments it was recently demonstrated that free radicals (ROS) modulate OXPHOS activity in cells containing different genetic versions of murine mtDNA, utilizing a retrograde signal that regulates the mtDNA content.⁴²

OXPHOS defects result in devastating multisystemic diseases, provoked by a wide variety of mutations in mitochondrial and nuclear encoded genes.⁴³ Many of these mutations induce mitochondrial proliferation in muscle cells, possibly to compensate for the OXPHOS deficiency.^{1,44} Unraveling the details of this mitochondrial to nuclear communication will undoubtedly be essential to understand the pathophysiology of mitochondrial diseases. In this regard, the availability of a wide range of genetic and molecular techniques in *Drosophila* may help us to understand common aspects of these pathologies, such as retrograde signaling. With this aim, several *Drosophila* models of OXPHOS impairment have been recently generated and several mutants in mitochondrial genes have been analyzed, including mutations in genes involved in mtDNA metabolism.⁴⁵ The complexity of the nuclear response to OXPHOS impairment is clearly illustrated in some of these models.

One of the first mitochondrial mutants analyzed was *tamas*, harboring mutations in the gene encoding the catalytic subunit of mitochondrial DNA polymerase (Pol γ). Flies carrying mutations in the *tamas* gene die prematurely as late third instar larvae.⁴⁶ These larvae never leave their food substrate to enter the wandering stage and undergo pupariation and they have a prolonged foraging stage that lasts up to 20 days when compared to that of 7 days in wild type flies. The *tamas* mutant larvae also suffer growth retardation and a delayed development. Despite this delay in development these mutant larvae have a normal morphology, although their body size and organs are smaller than average. Cell proliferation is also diminished in null mutants of the accessory subunit of Pol- γ , which die during early pupation.⁴⁷

The mutant *lopo* is the result of a P-element insertion in the mtSSB gene⁴⁸ and it displays a similar phenotype to the *tamas* mutant. The absence of mtSSB provokes deficient mtDNA replication and hence a depletion of mtDNA. The OXPHOS deficiency in *lopo* mutant leads to defects in cell proliferation, which is the main cause of the premature lethality of these larvae. The mtSSB deficiency provokes lethality in the late third larval instar, although 30% of the larvae enter pupariation and die during metamorphosis.

We have recently analyzed the knock down of the gene encoding the mitochondrial transcription factor B2 (TFB2M) induced by RNA interference. A reduced amount of TFB2M impairs mtDNA transcription, thereby inducing a severe OXPHOS deficiency (Adán et al submitted). The larvae undergo developmental arrest in the third instar, which extends their larval life up to five-fold that of wild type larvae. A detailed characterization of the mutant larvae demonstrated an important metabolic shift that increases the glycolytic flux, maintaining a reasonable level of ATP. In addition there is significant mitochondrial proliferation, probably as a compensatory response, that increases the mitochondrial mass. This retrograde signaling elicits changes in nuclear gene expression and accordingly, the expression of several genes is upregulated, including the transcription factor B1 (TFB1M).

In summary, the main consequences of impairing OXPHOS in *Drosophila* involve a specific block of cell proliferation, a metabolic change to glycolysis and a parallel increase in mitochondrial mass. Interestingly, cell growth is not affected and cell survival, cell differentiation and morphogenesis also remain unaltered (Adán et al submitted). It was recently demonstrated that the decrease in ATP induced in *Drosophila* OXPHOS mutants also induces specific arrest in G1-S, which is mediated by AMP Kinase (AMPK) and p53.⁴⁹ These findings open new avenues to investigate the molecular mechanisms involved in the retrograde mitochondrial-nuclear response using *Drosophila* as an excellent genetic model.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish "Ministerio de Educación y Ciencia" (Grant BFU2004-04591), the "Comunidad de Madrid" (S-GEN-0269/2006) and the "Instituto de Salud Carlos III" (CIBERER). L.E, P.C. and A. S-M were recipients of predoctoral fellowships

from the Spanish “Ministerio de Educación y Ciencia” (L.E.) and the “Comunidad de Madrid” (P.C. and A. S-M).

References

- Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 2005; 39:359-407.
- Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4(289):289-333.
- DiMauro S. Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1658(1-2):80-88.
- Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6(5):389-402.
- Evans MJ, Scarpulla RC. NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev* 1990; 4(6):1023-1034.
- Virbasius JV, Scarpulla RC. Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene. *Mol Cell Biol* 1991; 11(11):5631-5638.
- Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 2004; 18(4):357-368.
- Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 2006; 97(4):673-683.
- Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC. Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol* 2005; 25(4):1354-1366.
- Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 2005; 1(6):361-370.
- Goddard JM, Wolstenholme DR. Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75(8):3886-3890.
- Goddard JM, Wolstenholme DR. Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from the genus *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 1980; 8(4):741-757.
- Saito S, Tamura K, Aotsuka T. Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics* 2005; 171(4):1695-1705.
- Lewis DL, Farr CL, Farquhar AL et al. Sequence, organization and evolution of the A+T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* 1994; 11(3):523-538.
- Brehm A, Harris DJ, Hernandez M et al. Structure and evolution of the mitochondrial DNA complete control region in the *Drosophila* subobscura subgroup. *Insect Mol Biol* 2001; 10(6):573-578.
- Tsujino F, Kosemura A, Inohira K et al. Evolution of the A+T-rich region of mitochondrial DNA in the melanogaster species subgroup of *Drosophila*. *J Mol Evol* 2002; 55(5):573-583.
- Garesse R, Kaguni LS. A *Drosophila* model of mitochondrial DNA replication: proteins, genes and regulation. *IUBMB Life* 2005; 57(8):555-561.
- Calzone FJ, Hoog C, Teplow DB et al. Gene regulatory factors of the sea urchin embryo. I. Purification by affinity chromatography and cloning of P3A2, a novel DNA-binding protein. *Development* 1991; 112(1):335-350.
- DeSimone SM, White K. The *Drosophila* erect wing gene, which is important for both neuronal and muscle development, encodes a protein which is similar to the sea urchin P3A2 DNA binding protein. *Mol Cell Biol* 1993; 13(6):3641-3649.
- Herzig RP, Andersson U, Scarpulla RC. Dynein light chain interacts with NRF-1 and EWG, structurally and functionally related transcription factors from humans and drosophila. *J Cell Sci* 2000; 113 Pt 23:4263-4273.
- Fazio IK, Bolger TA, Gill G. Conserved regions of the *Drosophila* erect wing protein contribute both positively and negatively to transcriptional activity. *J Biol Chem* 2001; 276(22):18710-18716.
- DeSimone S, Coelho C, Roy S et al. ERECT WING, the *Drosophila* member of a family of DNA binding proteins is required in imaginal myoblasts for flight muscle development. *Development* 1996; 122(1):31-39.
- Ugalde C, Ochoa P, Pérez ML et al. Identification of a proximal promoter region critical for the expression of the b-F1-ATPase gene during *Drosophila melanogaster* development. *Mitochondrion* 2001; 225-236.
- Lefai E, Fernandez-Moreno MA, Alahari A et al. Differential regulation of the catalytic and accessory subunit genes of drosophila mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* 2000; 275:33123-33133.
- Ruiz de Mena I, Fernandez-Moreno MA, Bornstein B et al. Structure and regulated expression of the delta-aminolevulinic synthase gene from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 1999; 274(52):37321-37328.
- Talamillo A, Chisholm AA, Garesse R et al. Expression of the nuclear gene encoding mitochondrial ATP synthase subunit alpha in early development of *Drosophila* and sea urchin. *Mol Biol Rep* 1998; 25(2):87-94.

27. Hirose F, Yamaguchi M, Kuroda K et al. Isolation and characterization of cDNA for DREF, a promoter-activating factor for *Drosophila* DNA replication-related genes. *J Biol Chem* 1996; 271(7):3930-3937.
28. Hochheimer A, Zhou S, Zheng S et al. TRF2 associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in *Drosophila*. *Nature* 2002; 420(6914):439-445.
29. Hirose F, Yamaguchi M, Handa H et al. Novel 8-base pair sequence (*Drosophila* DNA replication-related element) and specific binding factor involved in the expression of *Drosophila* genes for DNA polymerase alpha and proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 1993; 268(3):2092-2099.
30. Ohno K, Hirose F, Sakaguchi K et al. Transcriptional regulation of the *Drosophila* *CycA* gene by the DNA replication-related element (DRE) and DRE binding factor (DREF). *Nucleic Acids Res* 1996; 24(20):3942-3946.
31. Sawado T, Hirose F, Takahashi Y et al. The DNA replication-related element (DRE)/DRE-binding factor system is a transcriptional regulator of the *Drosophila* *E2F* gene. *J Biol Chem* 1998; 273(40):26042-26051.
32. Hyun J, Jasper H, Bohmann D. DREF is required for efficient growth and cell cycle progression in *Drosophila* imaginal discs. *Mol Cell Biol* 2005; 25(13):5590-5598.
33. Yamashita D, Sano Y, Adachi Y et al. hDREF regulates cell proliferation and expression of ribosomal protein genes. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 2007-2013.
34. Clayton DA. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 1982; 28(4):693-705.
35. Martinez-Diez M, Santamaria G, Ortega AD et al. Biogenesis and Dynamics of Mitochondria during the Cell Cycle: Significance of 3' UTRs. *PLoS ONE* 2006; 1:e107.
36. Sardiello M, Tripoli G, Romito A et al. Energy biogenesis: one key for coordinating two genomes. *Trends Genet* 2005; 21(1):12-16.
37. Metzstein MM, Hengartner MO, Tsung N et al. Transcriptional regulator of programmed cell death encoded by *Caenorhabditis elegans* gene *ces-2*. *Nature* 1996; 382(6591):545-547.
38. Benito A, Gutierrez O, Pipaon C et al. A novel role for proline- and acid-rich basic region leucine zipper (PAR bZIP) proteins in the transcriptional regulation of a BH3-only proapoptotic gene. *J Biol Chem* 2006; 281(50):38351-38357.
39. Liu Z, Butow RA. Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet* 2006; 40:159-185.
40. Biswas G, Adebajo OA, Freedman BD et al. Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *Embo J* 1999; 18(3):522-533.
41. Amuthan G, Biswas G, Ananadatheerthavara HK et al. Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene* 2002; 21(51):7839-7849.
42. Moreno-Loshuertos R, Acin-Perez R, Fernandez-Silva P et al. Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nat Genet* 2006; 38(11):1261-1268.
43. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 2003; 348(26):2656-2668.
44. DiMauro S. Mitochondrial myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18(6):636-641.
45. Sanchez-Martinez A, Luo N, Clemente P et al. Modeling human mitochondrial diseases in flies. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757: 1190-1198.
46. Iyengar B, Roote J, Campos AR. The *tamas* gene, identified as a mutation that disrupts larval behavior in *drosophila melanogaster*, codes for the mitochondrial DNA polymerase catalytic subunit (DNApol-gamma125) [In Process Citation]. *Genetics* 1999; 153(4):1809-1824.
47. Iyengar B, Luo N, Farr CL et al. The accessory subunit of DNA polymerase gamma is essential for mitochondrial DNA maintenance and development in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(7):4483-4488.
48. Maier D, Farr CL, Poeck B et al. Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein is required for mitochondrial DNA replication and development in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell* 2001; 12(4):821-830.
49. Mandal S, Gupta P, Owusu-Ansah E et al. Mitochondrial regulation of cell cycle progression during development as revealed by the tenured mutation in *Drosophila*. *Dev Cell* 2005; 9(6):843-854.