



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**

**IMPORTANCIA DE LA DINÀMICA MITOCONDRIAL EN LA
DEGENERACIÓN NEUROMUSCULAR:**

***DROSOPHILA MELANOGASTER* COMO ORGANISMO MODELO**

Trabajo final de grado

Grado en Biotecnología

Curso académico: 2014-2015

Valencia, Julio 2015

Autora: Andrea Tapia González

Tutor: Miguel Leiva Brondo

Co-tutor: Máximo Ibo Galindo

Co-tutor colaborador: Víctor López del Amo

CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE (CIPF)



License Type: Creative commons; Attribution-Noncommercial-No Derivative Works

**IMPORTANCIA DE LA DINÁMICA MITOCONDRIAL EN LA DEGENERACIÓN
NEUROMUSCULAR: DROSOPHILA MELANOGASTER COMO ORGANISMO MODELO**

Autora: Andrea Tapia González

Tutor: Miguel Leiva Brondo

Co-tutor: Máximo Ibo Galindo

Co-tutor colaborador: Víctor López del Amo

València, Julio 2015

RESUMEN

Este trabajo se centra en la alteración de los genes implicados en la dinámica mitocondrial *Drp1*, *Opa1* y *Mfn2* por sobreexpresión (Ov) e interferencia (RNAi), y su relación con la supervivencia, la capacidad locomotora y defectos fisiológicos como el peso y la producción del ROS (*reactive oxygen species*). Dichas alteraciones se han dirigido en dos tejidos concretos (mosca entera y músculo) para ver posibles diferencias. Las graves consecuencias de la sobreexpresión de *Opa1* en mosca completa en todos los aspectos estudiados, y el aumento de supervivencia en las moscas RNAi en músculo han sido los resultados obtenidos más destacados. Este último resultado abre una nueva línea de estudio en la posible señalización desde el músculo hacia otros tejidos que desencadenen esta mayor supervivencia.

Por último, también se han estudiado los cambios de expresión en los diferentes genes para cada genotipo. Los resultados indican que la alteración de un único gen puede conllevar la alteración de otros distintos, será importante por tanto entender el organismo como un todo y no solo centrarse en un gen.

PALABRAS CLAVE: sobreexpresión e interferencia, fusión y fisión, alteraciones metabólicas, competencia neuromuscular, estrés oxidativo.

**IMPORTÀNCIA DE LA DINÀMICA MITOCONDRIAL EN LA DEGENERACIÓ
NEUROMUSCULAR: DROSOPHILA MELANOGASTER COM ORGANISME MODEL**

Autora: Andrea Tapia González

Tutor: Miguel Leiva Brondo

Co-tutor: Máximo Ibo Galindo

Co-tutor colaborador: Víctor López del Amo

València, Juliol 2015

RESUM

Este treball es centra en la alteració dels distints gens implicats en la dinàmica mitocondrial *Drp1*, *Opa1* y *Mfn2* per sobreexpressió (Ov) e interferència (RNAi), i la seua relació amb la supervivència, les capacitats locomotores i defectes fisiològics com el pes i la producció del ROS (*reactive oxygen species*). Estes alteracions s'han dirigit en dos teixits concrets (mosca sencera y múscul) per a observar possibles diferències. Les greus conseqüències de la sobreexpressió d'*Opa1* en mosca completa en tots els aspectes estudiats, i l'augment de supervivència en les mosques RNAi en múscul han sigut els resultats obtinguts més destacats. Este últim resultat obri una nova línia d'estudi en la possible senyalització des de el múscul fins a altres teixits que desencadenen esta major supervivència.

Per últim, també s'han estudiat els canvis d'expressió en els diferents gens per a cada genotip. Els resultats indiquen que l'alteració de un únic gen pot comportar l'alteració d'altres distints, serà important per tant entendre l'organisme com a un tot i no solament centrar-se en un gen.

PARAULES CLAU: sobreexpressió e interferència, fusió y fissió, alteracions metabòliques, competència neuromuscular, estrés oxidatiu.

**ROLE OF MITOCHONDRIAL DYNAMICS IN NEUROMUSCULAR DEGENERATION:
DROSOPHILA MELANOGASTER AS A MODEL ORGANISM**

Author: Andrea Tapia González

Tutor: Dr. Miguel Leiva Brondo

Co-tutor: Dr. Máximo Ibo Galindo

Co-tutor collaborator: Víctor López del Amo

Valencia, July 2015

ABSTRACT

This study focuses on altering the genes involved in mitochondrial dynamics *Drp1*, *Opa1* and *Mfn2* by overexpression (Ov) and interference (RNAi), and its relationship with survival, the engine capacity and physiological defects such as weight and ROS production (*reactive oxygen species*). These alterations have been directed in two specific tissues (whole fly and muscle) for possible differences. The serious consequences of overexpression of *Opa1* in whole fly in all aspects that we have studied, and the increased survival in RNAi flies in muscle have been the most outstanding results. This latter result opens a new line of study in the possible signalling from the muscle to other tissues that trigger this increased survival.

Finally, it has also been studied the expression changes in different genes for each genotype. The results indicate that altering a single gene may result in altered others, therefore, It will be important to understand the body as a whole and not only focusing on a single gene.

KEY WORDS: overexpression and interference, fusion y fission, metabolic disorders, neuromuscular capacity, oxidative stress.

AGRADECIMIENTOS

A Máximo Ibo Galindo, por su gran carácter y por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio sin dudarlo dos veces. A la gente del laboratorio que ha estado cerca siempre que he necesitado ayuda, ha creado un gran ambiente de trabajo y me ha hecho sentir cómoda en todo momento: Paula, Edu, Estela, Vincenzo, Maite y Tamara.

A mi compañero Fran, una de las personas que más me ha apoyado en el día a día y con el cual he pasado buenos momentos que no olvidaré. Me ha encantado coincidir aquí contigo y conocerte más allá de la universidad, te deseo lo mejor en el futuro y sabes que te echaré de menos por el laboratorio.

A Víctor López Del Amo, al que le debo mucho desde el primer día que llegué al laboratorio. Gracias por preocuparte tanto, por tu infinita paciencia, por tu entusiasmo y por tu insistencia en que aprendiese, no imagino como hubiese sido el trabajo sin ti.

Como no, a toda mi familia, aunque solo haya sido por la pregunta de cómo van las moscas durante las comidas familiares y otros comentarios graciosos similares. En especial, gracias a mis abuelos por estar tan orgullosos y hacer que creyera un poco más en mí. A mis padres y mi hermana, a ellos sí que les debo mucho. Gracias por soportarme siempre que he estado muy estresada e insoportable, por tranquilizarme, por obligarme a descansar y a que saliera para distraerme, y sobre todo, por recordarme que nada era el fin del mundo.

Por último, tengo mucho que agradecerle a una persona muy especial, Andrea. Gracias por estar siempre a mi lado y ser mi gran apoyo en todos los sentidos. Este trabajo tiene mucho de ti también. Por lo que nos queda juntas.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	I
I.	El concepto de dinámica mitocondrial y la importancia fisiológica de los procesos de fusión y fisión.	I
II.	La neurodegeneración y Drosophila como organismo modelo para su estudio	III
III.	Genes implicados en la dinámica mitocondrial	V
II.	OBJETIVOS	VII
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	VIII
IV.	Cepas obtenidas del stock y mantenimiento	VIII
V.	Sistema UAS-Gal4	IX
VI.	Supervivencia	IX
VII.	Geotaxis negativa: Climbing	IX
VIII.	Extracción de RNA	IX
IX.	Retrotranscripción.....	X
X.	PCR convencional.....	X
XI.	PCR cuantitativa	XII
XII.	Alteraciones metabólicas: peso	XII
XIII.	Medida del ROS	XII
XIV.	Gráficas y métodos estadísticos empleados.	XIII
IV.	RESULTADOS	XIV
XV.	Supervivencia	XIV
XVI.	Geotaxis negativa: Climbing	XVII
XVII.	Alteraciones metabólicas: peso	XIX
XVIII.	Gel prueba PCR convencional	XX
XIX.	Cuantificación de la expresión: qPCR.....	XXI
XX.	Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo.....	XXIII
V.	DISCUSIÓN.....	XXIV
VI.	CONCLUSIONES	XXVII
VII.	BIBLIOGRAFIA	XXVIII
VIII.	ANEXOS	XXXII
XXI.	Cruces.....	XXXII
I.	Ov actina.....	XXXII
II.	RNAi actina	XXXIII
III.	Ov miosina	XXXIV
IV.	RNAi miosina.	XXXV
XXII.	Medio de cultivo.....	XXXVI

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de las implicaciones fisiológicas de los procesos de la fisión y fusión mitocondrial. (Itoh, et al., 2013).....	II
Figura 2. Ejemplos de las enfermedades causadas por el desequilibrio entre los genes de fusión y fisión mitocondrial implicados. (Itoh, et al., 2013).....	II
Figura 3. Ciclo vital Drosophila Melanogaster. Arriba se muestran los adultos y abajo el desarrollo larvario y el estadio de pupa. Extraída de: http://www.artroposfera.com/	IV
Figura 4. Esquema representativo de los efectos del silenciamiento de Opa1 y Mfn2, y la sobreexpresión de Drp1 y Fis1 tanto en las mitocondrias como en moscas adultas, usando modelos de Parkinson. (Liu, et al., 2011)	VI
Figura 5. Curva de supervivencia genotipos Ov en actina. n =2	XIV
Figura 6. Curva de supervivencia genotipos RNAi en actina. n =2	XV
Figura 7. Fenotipo de alas alteradas del genotipo RNAi Mfn2 en actina. (A) Salvaje, (B) “Held-up”, (C) “Drooped”. A la izquierda se muestran hembras y a la derecha machos.	XV
Figura 8. Curva de supervivencia genotipos Ov en miosina. n=2.....	XVI
Figura 9. Curva de supervivencia genotipos RNAi en miosina. n =2	XVI
Figura 10. Climbing genotipos Ov en actina. n=2. El * representa la significatividad estadística por debajo de 0,5 empleando la prueba T. Las barras representan el error estándar.....	XVII
Figura 11. Climbing genotipos RNAi en actina. n=2. Las barras representan el error estándar.	XVII
Figura 12. Climbing genotipos Ov en miosina. n=2. Las barras representan el error estándar.	XVIII
Figura 13. Climbing genotipos RNAi en miosina. n=2. Las barras representan el error estándar	XVIII
Figura 14. Peso genotipos Ov en actina. n=2. El * representa la significatividad estadística por debajo de 0,5 empleando la prueba T. Las barras representan el error estándar.	XIX
Figura 15. Peso genotipos RNAi en actina. n=2. El * representa la significatividad estadística por debajo de 0,5 empleando la prueba T. Las barras representan el error estándar.....	XX
Figura 16. Gel prueba PCR. Los círculos indican la amplificación de la banda específica para cada gen.	XX
Figura 17. qPCR genotipos Ov Drp1. n=1. Las barras representan el error estándar	XXI
Figura 18. qPCR genotipos Ov Opa1. n=1. Las barras representan.....	XXII
Figura 19. qPCR genotipos RNAi Drp1 n=1 Las barras representan.....	XXII
Figura 20. qPCR genotipos RNAi Mfn2. n=1. Las barras representan el error estándar	XXIII
Figura 21. Medida ROS genotipos Ov en actina. El * representa la significatividad estadística por debajo de 0,5 empleando la prueba T. Las barras representan el error estándar.....	XXIII

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes humanos participantes en el proceso de dinámica mitocondrial con una enfermedad asociada y sus homólogos en Drosophila (Debattisti y Scorrano., 2013).	III
Tabla 2. Cepas empleadas en el trabajo.....	VIII
Tabla 3. Volúmenes y concentraciones de los reactivos empleados durante la retrotranscripción	X
Tabla 4. Secuencias de los primers empleados para amplificar los correspondientes genes.	XI
Tabla 5. Volúmenes de los reactivos empleados durante la PCR convencional	XI
Tabla 6. Volúmenes de los reactivos empleados durante la PCR cuantitativa	XII

ABREVIATURAS

Act	Actina
CMT	Charcot Marie Tooth
Mhc	Miosina
Mfn2	Mitofusina
n	Número de réplicas biológicas
OrR	Oregón
Ov	Sobreexpresión
qPCR	PCR cuantitativa
RNAi	Silenciamiento
ROS	Especies Reactivas del Oxigeno

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I. El concepto de dinámica mitocondrial y la importancia fisiológica de los procesos de fusión y fisión.

La dinámica mitocondrial es un concepto que incluye la arquitectura, el movimiento, y la conectividad de estos orgánulos con otros. Los dos mecanismos que regulan la mayoría de estos procesos son la fusión (unión) y la fisión (fragmentación) (Zorzano, et al., 2012). A día de hoy se conocen las proteínas que regulan ambos procesos y sus implicaciones en enfermedades tan conocidas como Parkinson, Huntington, diabetes, cáncer... (Zorzano et al., 2009).

Las mitocondrias son orgánulos que no se generan de novo, sino que surgen de la división y crecimiento de otras preexistentes. Esto implica que los procesos de fusión y fisión deben estar muy controlados y equilibrados. De ellos depende el mantenimiento de la red mitocondrial, la cual es imprescindible que esté adaptada en todo momento a las condiciones fisiológicas para poder asegurar un correcto funcionamiento y bienestar celular (Jornayvaz y Shulman., 2010).

En el intercambio de contenido celular que tiene lugar durante los procesos de fusión, se corrigen gran cantidad de mutaciones (Franck., 2006), se compensa la acumulación de radicales libres de oxígeno (Halliwell y Whiteman., 2004), y en el caso del metabolismo, permite disipar parte de la energía necesaria para la formación del ATP (Suen, et al., 2008).

Por otra parte, los procesos de fisión permiten la distribución y reorganización de la red mitocondrial, (Knott, et al., 2008). Cuando una célula se divide y da lugar a dos células hijas, es importante que ambas terminen con aproximadamente el mismo número de mitocondrias. Para agilizar el proceso, estos orgánulos se fisionan, se vuelven más pequeños, y se reparten más fácilmente. Cuando hay un desajuste en dicho orgánulo, aparecen mitocondrias dañadas que hay que eliminar. Para ello, de nuevo se fisionan en fragmentos más pequeños que son más fáciles de degradar en un proceso conocido como mitofagocitosis (Itoh, et al., 2013).

La gran variedad de implicaciones fisiológicas que presentan los fenómenos de fusión y fisión demuestran que la dinámica mitocondrial juega un papel muy importante en el control de la viabilidad celular, y que cualquier error derivado de su mal funcionamiento, puede acarrear serios problemas que se traducen en graves patologías (Zhao, et al., 2013).

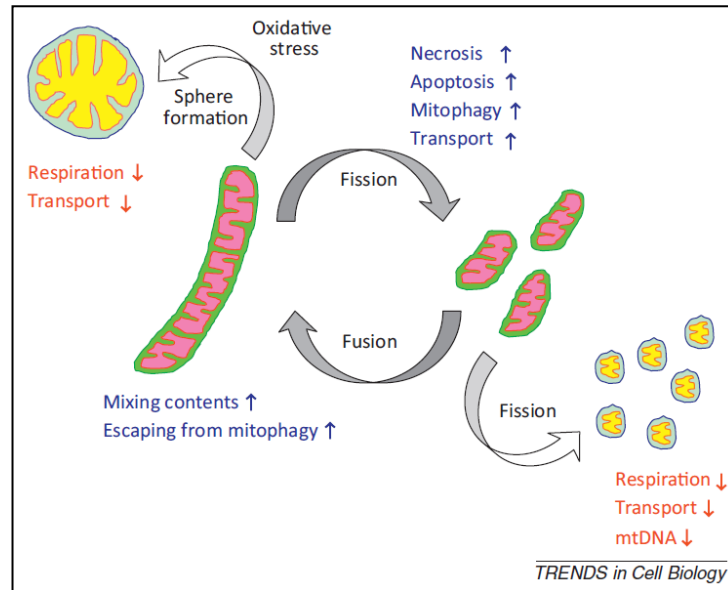






Figura 1. Ejemplos de las implicaciones fisiológicas de los procesos de la fisión y fusión mitocondrial. (Itoh, et al., 2013)

Las proteínas más destacadas que participan en los procesos de fusión son: Mitofusina (*Mfn2*) 1 y 2, situadas en la membrana mitocondrial externa, y *Opa1* en la membrana mitocondrial interna. Mientras que las proteínas implicadas en los procesos de fisión son *Drp1* y *Fis1*, situadas en el citosol y la membrana mitocondrial externa respectivamente (Zorzano, et al., 2012). Más recientemente, se ha demostrado que la sobreexpresión de *Gdap1* desencadena la fragmentación mitocondrial (Niemann, et al., 2005; Pla-Martí, et al., 2013; Del Amo, et al., 2015). Muchas de estas proteínas que causan enfermedades en humanos tienen su homólogo en *Drosophila*.

Fusion	Mitochondrial function and distribution	Fission
Mfn1 Mfn2 Opa1	 Normal	Drp1 GDAP1
↓ Mfn2 (CMT) ↓ Opa1 (ADOA)	 Impaired	↑ Synuclein/LRRK2 (PD) ↑ Huntingtin (HD) ↑ Aβ (AD)
↓ PINK1/Parkin (PD)?	 Impaired	↓↓ Drp1 (Neonatal death) ↓ GDAP1 (CMT)
	 Normal ?	↓ Drp1 ↑ Synuclein/LRRK2 (PD) ↑ Huntingtin (HD) ↑ Aβ (HD)

TRENDS in Cell Biology

Figura 2. Ejemplos de las enfermedades causadas por el desequilibrio entre los genes de fusión y fisión mitocondrial implicados. (Itoh, et al., 2013)

Tabla 1. Genes humanos participantes en el proceso de dinámica mitocondrial con una enfermedad asociada y sus homólogos en *Drosophila* (Debattisti y Scorrano., 2013).

Gen humano	Patología principal	Gen de <i>Drosophila</i>
GDAP1	CMT	Gdap1
MFN2	CMT	Mfn2
OPA1	Atrofia óptica	Opa1-like
DRP1	Encefalopatía fetal	Drp1
FIS1	-	Fis1
PINK1	Parkinson autosómico recesivo	Pink1
PARK	Parkinson autosómico recesivo	Parkina

II. La neurodegeneración y *Drosophila* como organismo modelo para su estudio

Los procesos neurodegenerativos son un conjunto de alteraciones que afectan progresivamente a la función y el mantenimiento del sistema nervioso (Debattisti y Scorrano, 2013). En 2001 se hizo un Blast, o alineamiento de secuencias, entre la OMIM, base de datos donde están descritas 929 enfermedades génicas humanas, y flybase, la base de datos de *Drosophila* (Barinaga, 1999). Este análisis reveló que más del 75% de los genes que provocan enfermedades en humanos tienen genes ortólogos en la mosca de la fruta. Muchos de estos genes están implicados en neurodegeneración y causan las mismas patologías en las moscas. Por ejemplo: las moscas con mutaciones en el gen *Parkina* (homólogo al gen humano PARK2 asociado a la enfermedad de Parkinson) tienen menos supervivencia que los controles, deficiencias en la locomoción y pérdida de neuronas dopaminérgicas tal como ocurre en humanos (Scherzer, et al, 2003). En otro trabajo demuestran que los defectos provocados por el gen de la *Parkina* en mosca, son recuperados cuando se sobreexpresa el gen humano sano de la *Parkina*.

Se puede distinguir tres aproximaciones que han sido aplicadas exitosamente al uso de *Drosophila* para estudiar procesos neurodegenerativos (Westermann, 2009):

1. Los screens genéticos para identificar genes de neurodegeneración. Se basan en el uso de elementos transponibles para generar un gran número de moscas mutantes, y posteriormente, ver cuáles de todas ellas presentan un determinado fenotipo asociado a una enfermedad. Después de esto, se identifican los genes que provocan dicho fenotipo, se busca los homólogos en humanos, y si tienen una enfermedad asociada se puede generar un modelo de estudio.
2. La sobreexpresión transgénica y la inhibición de genes endógenos. En estos casos las enfermedades son causadas por sobreexpresión o interferencia de ciertos genes. Lo que se hace es provocar esto a los genes homólogos de la enfermedad en *Drosophila*.
3. La búsqueda genética de reguladores, intensificadores o supresores que sean capaces de modificar el fenotipo causado por los dos enfoques anteriores.

INTRODUCCIÓN

Drosophila melanogaster, también conocida comúnmente como mosca del vinagre o mosca de la fruta, ha sido un organismo modelo muy fructífero a lo largo de la historia de la ciencia, prueba de ello, son los tres premios noveles a los que ha dado lugar. El primero de ellos, fue para su gran descubridor, Thomas Hunt Morgan, el cual demostró que los cromosomas eran los portadores de los genes. Después de este, vinieron los galardones a Hermann Joseph Muller, por sus estudios acerca de la acción de los rayos X como productores de mutaciones, y finalmente el de Edward Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard y Eric Wieschaus por sus descubrimientos sobre el control genético del desarrollo embrionario temprano (Wolpert, 2009).

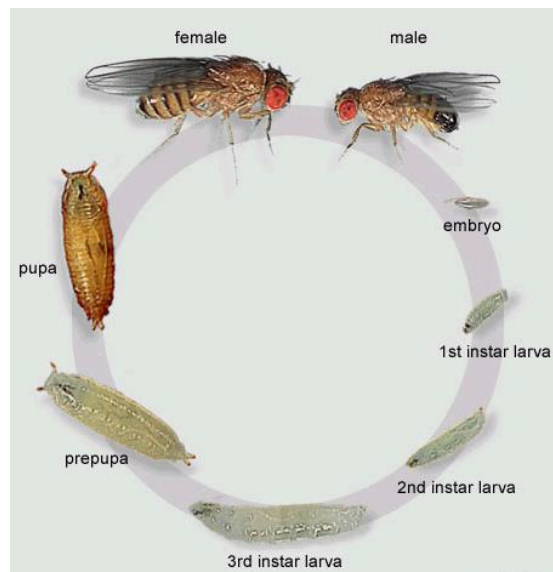


Figura 3. Ciclo vital *Drosophila Melanoganster*. Arriba se muestran los adultos y abajo el desarrollo larvario y el estadio de pupa. Extraída de: <http://www.artroposfera.com/>

Este organismo ha sido muy útil a la hora de identificar genes involucrados en la integridad neuronal y en descubrir sus funciones a nivel molecular. Presenta diversas ventajas que la convierten en un modelo biológico ideal para el estudio de enfermedades humanas. Entre ellas, un ciclo de vida relativamente corto (de 40 a 120 días dependiendo de la dieta y el estrés) que permite estudiar la formación y progresión de una enfermedad desde su nacimiento hasta su muerte. También puede dar lugar a un gran número de descendientes, lo cual permite obtener datos estadísticamente significativos. Además, su mantenimiento en el laboratorio es relativamente económico comparando con otros animales mamíferos, y es sencillo de manipular debido a su pequeño tamaño.

III. Genes implicados en la dinámica mitocondrial

La temática de este trabajo de final de grado, se centra en algunas de las implicaciones fisiológicas de la sobreexpresión e interferencia de los genes implicados en dinámica mitocondrial como son *Drp1*, *Opa1* y *Mfn2* en *D. melanogaster*, por lo que se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica relacionada con dichos genes.

En estudios recientes de *Drp1*, se ha demostrado su interacción con las proteínas $\alpha\beta$ causantes del Alzheimer (Manczak y Reddy., 2012). Los investigadores llegaron a esta conclusión tras ver que una disminución en la expresión de este gen, *Drp1*, implicó una mejora en los síntomas asociados a la patología en modelos animales. También se ha descubierto recientemente la sobreexpresión de este gen en tumores malignos de tiroides (Ferreira da Silva, et al., 2015).

Otro de los genes de estudio, *Opa1*, presenta una enfermedad asociada, la atrofia óptica. Algunos trabajos han demostrado, que la alteración de la expresión de *Opa1*, inhibiendo su expresión solo en algunas células, no mostraban defectos en la formación de los ojos ni apenas fenotipo, pero si defectos en la fototaxis (Shahrestani, et al., 2009). Además, tenían una reducción de su vida media, mitocondrias con morfología anormal, sobretodo en músculo, y un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS por *reactive oxygen species*). Se aplicó un tratamiento con antioxidantes y se observó un incremento de la vida media en las moscas tratadas. (Tang, et al., 2009). Recientemente también se ha descrito la importancia de *Opa1* en otro órgano como es el corazón, relacionándolo con cardiopatías dilatadas que provocan pérdida de contractibilidad (Dorn, et al., 2011).

Como sucede con *Opa1*, la inhibición específica de *Mfn2* en corazón dio lugar a una alteración en la función cardíaca (Dorn, et al., 2011). Además, también está demostrada la implicación directa de este gen con CMT (Charcot Marie Tooth) (Kostera-Pruszczyk, et al., 2014).

Por último, se ha descrito la importancia de *Drp1*, *Opa1* y *Mfn2* en un modelo de Parkinson. En esta patología, los principales genes implicados son *Pink1* y *Parkina* (Deng, et al., 2008). Recientemente, se ha observado que tras una inhibición parcial en músculo de las proteínas *Mfn2* y *Opa1*, y así como la sobreexpresión de *Drp1* y *Fis1*, consiguen rescatar muchos de sus fenotipos (Liu, et al., 2011)

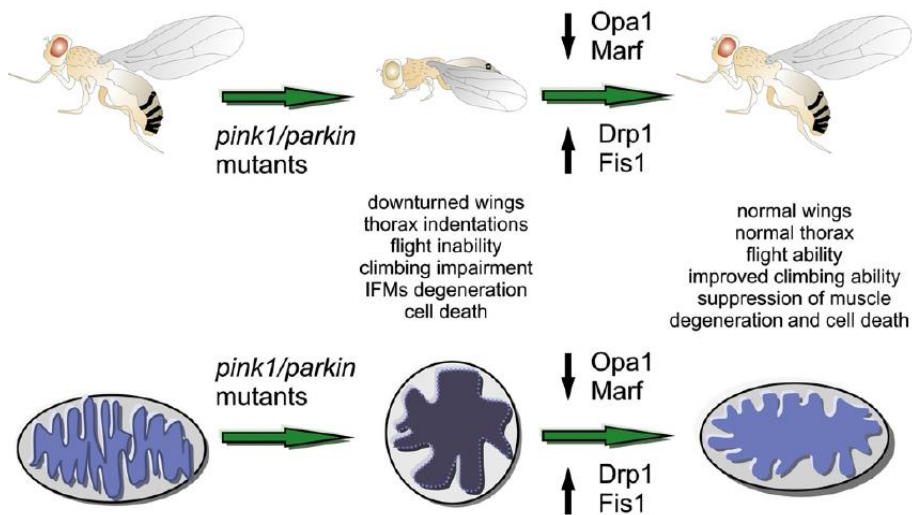


Figura 4. Esquema representativo de los efectos del silenciamiento de *Opa1* y *Mfn2*, y la sobreexpresión de *Drp1* y *Fis1* tanto en las mitocondrias como en moscas adultas, usando modelos de Parkinson. (Liu, et al., 2011)

Se ha visto que en estas moscas mutantes para *Pink1* y *Parkina*, presentan mitocondrias alargadas y crestas fragmentadas. Esto, va acompañado de defectos en la posición de las alas, relacionado con la pérdida muscular e incapacidad para volar. Todos estos fenotipos fueron rescatados disminuyendo la actividad de *Opa1* y *Mfn2*, y aumentando la actividad de *Drp1* y *Fis1*, mejorando la morfología mitocondrial y la forma de las crestas.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es conocer cuál/es de los genes estudiados pueden ser más importantes en la función de la mitocondria relacionada con: envejecimiento, supervivencia, implicaciones en competencia neuromuscular y otras alteraciones metabólicas. Para ello, se emplearon las técnicas de sobreexpresión e interferencia. Estas aproximaciones se llevaron a cabo tanto en mosca completa empleando el Gal4 de actina (Act), como en músculo, con el de la cadena pesada de miosina (Mhc).

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

IV. Cepas obtenidas del stock y mantenimiento

En la siguiente tabla se muestran el origen, nombre y genotipo completo de las moscas empleadas durante el trabajo. El signo de puntuación; del genotipo representa la separación entre los cromosomas 2 y 3.

Tabla 2. Cepas empleadas en el trabajo.

ORIGEN	NOMBRE DE LA CEPA	GENOTIPO
Bloomington	Oregón R	<i>orR (wild type)</i>
Bloomington (B#3954)	Act-Gal4	<i>+/+ ; Act – Gal4 /TM6B</i>
Generada en el laboratorio	UAS-Drp1	<i>+/+ ; UAS – Drp1/TM6B</i>
Generada en el laboratorio	UAS-Opa1	<i>+/+ ; UAS – Opa1/TM6B</i>
Generada en el laboratorio	UAS-Mfn2	<i>UAS – Mfn2/Cyo ; +/+</i>
Generada en el laboratorio	Act-Gal4;UAS-Dcr	<i>Act – Gal4/Cyo ; UAS – Dcr/UAS – Dcr</i>
Bloomington (B#31157)	RNAi-Mfn2	<i>+/+ ; RNAi – Mfn2/RNAi – Mfn2</i>
Bloomington (B#32358)	RNAi-Opa1	<i>+/+ ; RNAi – Opa1/RNAi – Opa1</i>
Bloomington (B#27682)	RNAi-Drp1	<i>+/+ ; RNAi – Drp1/RNAi – Drp1</i>
Universidad de Valencia	Mhc-Gal4	<i>Mch – Gal4/Mch – Gal4 ; +/+</i>
Generada en el laboratorio	Mhc-Gal4;UAS-Dcr	<i>Mch – Gal4/Mch – Gal4 ; UAS – Dcr /UAS Dcr</i>

Para distinguir los individuos de interés tras cada cruce se hace uso de cromosomas equilibradores o balanceadores. Estos cromosomas llevan al menos, una mutación dominante para la selección de individuos que lo portan. En este trabajo se emplean los siguientes:

Cyo → 2° cromosoma, marcador visible *Cy: Curly*, alas curvadas.

TM6B → 3° cromosoma, marcador visible *Hu: Humeral*, quetas humerles extra y *Tb: Tubby*; larvas y pupas más cortas.

Además, los balanceadores se caracterizan por tener múltiples inversiones que impiden que sus homólogos recombinen con ellos, y son letales en homocigosis dado que llevan alguna mutación letal recesiva.

Las cepas se conservaron a 17'5°C y las moscas empleadas en los experimentos se mantuvieron a 25°C, ambas en medio estándar de harina de maíz (véase composición en anexos).

V. Sistema UAS-Gal4

El sistema UAS-Gal4 es un sistema de regulación transcripcional de levaduras por el que la proteína activadora Gal4 (un factor de transcripción) se une a la secuencia UAS (*upstream activator sequence*), activando la transcripción del gen ubicado hacia la dirección 3' de dicha secuencia. En este trabajo se utilizan dos GAL4 distintos. En un caso, con la actina (Act-Gal4), una proteína que se expresa de manera ubicua en toda la mosca, y en el otro, con la miosina (Mhc-Gal4), que se expresa de manera específica en músculo. Cruzando estas moscas con otras que contienen el UAS seguido por los genes de estudio se consigue la sobreexpresión o interferencia del mismo. El gran potencial de este sistema reside en que permite lograr una expresión espacio-temporal controlada de genes. Además, es una herramienta habitual en muchos laboratorios, y existen un gran número de líneas transgénicas. Los cruces llevados a cabo en este trabajo están descritos con más detalle en anexos.

VI. Supervivencia

Para cuantificar la supervivencia se mantuvieron 15 moscas de cada genotipo de actina y miosina, y se fue anotando cada día las moscas que iban muriendo. Se hicieron dos repeticiones por genotipo.

VII. Geotaxis negativa: Climbing

La teoría en la que se basa este experimento se apoya en que las moscas presentan geotaxis negativa, es decir, tienden a trepar por la superficie de los tubos de manera innata.

Para realizar este ensayo, se pasaron 15 moscas de cada genotipo de actina y miosina a tubos vacíos sin comida, en los cuales, por debajo de los tapones, se pintaron unas rayas que delimitaban un margen superior. Tras esto, se golpeaba los tubos contra la superficie, las moscas caían, empezaban a subir, y todo esto era grabado en vídeo cámara. A los 10s de grabación desde que caían todas al fondo del tubo, se cuantificaba cuantas moscas habían sobrepasado el margen superior, obteniendo así un porcentaje de "climbing". Este experimento se repitió a los 10, 20 y 30 días de vida. Se hicieron dos repeticiones por genotipo.

VIII. Extracción de RNA

Para llevar a cabo la qPCR cuantitativa, previamente se extrajo el RNA de 15 moscas de cada uno de los genotipos en actina a la semana de vida. A continuación se muestra el protocolo (ThermoFisher Scientific Inc, Waltham) empleado.

1. Homogeneizar las moscas con un mortero y 800 µl de Trizol (ThermoFisher Scientific Inc, Waltham)
2. Incubar a temperatura ambiente durante 5'.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. Añadir 160µl de cloroformo, agitar vigorosamente durante 15'', e incubar durante 3' a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 12.000g durante 15' a 4°C.
5. Transferir la fase acuosa a otro eppendorf y precipitar con 400µl de isopropanol.
6. Dejar 10' a temperatura ambiente, y posteriormente centrifugar a 12.000g durante 15' a 4°C.
7. Eliminar el sobrenadante, lavar el pellet con 1mL de etanol al 75%, y centrifugar de nuevo a 12.000g durante 5'.
8. Eliminar el sobrenadante, y dejar secar al aire el pellet de RNA durante 15'.
9. Resuspender el pellet en 1,2µl de agua libre de RNAsa
10. Incubar durante 10' a 55°C.
11. Añadir 1,2µl de DNAsa (Sigma-Aldrich, Missouri) e incubar durante 30'a 37°C
12. Añadir 1,2 µl de STOP-solution e incubar durante 15' a 70°C.

Tras esto, se cuantificó la cantidad de RNA obtenido empleando el NanoDrop Spectrophotometer ND 1000 (Thermo Scientific, Wilmington).

IX. Retrotranscripción

Para este paso usamos el kit qScript cDNA SuperMix (Quanta BIOSCIENCES, Inc Gaithersburg), en el cual se indicaba las siguientes cantidades de reactivos para llevar a cabo la reacción en el termociclador Veriti (Applied Biosystems, California).

Tabla 3. Volúmenes y concentraciones de los reactivos empleados durante la retrotranscripción

Componentes	Volumen para 20-µL de reacción	Concentración final
qScriptcDNASuperMix (5X)	4µL	1X
Molde RNA	variable	1µg
Agua libre de RNasa/DNasa	variable	
Volumen total(µL)	20µL	

Condiciones de la reacción en el termociclador:

- 5'a 25°C
- 30' a 42°C
- 5' a 85°C
- ∞ a 4°C

X. PCR convencional

Antes de llevar a cabo la PCR cuantitativa, para asegurar que los primers (ROCHE, Suiza) amplificaban correctamente el fragmento deseado y testar diferentes temperaturas de amplificación, se hizo una puesta a punto mediante una PCR convencional con gradiente y posteriormente se corrió un gel de concentración 0,25g agarosa/100µL TAE 1X.

MATERIAL Y MÉTODOS

En las siguientes tablas se detallan las secuencias de los primers empleados, las cantidades de los reactivos y las condiciones de la PCR.

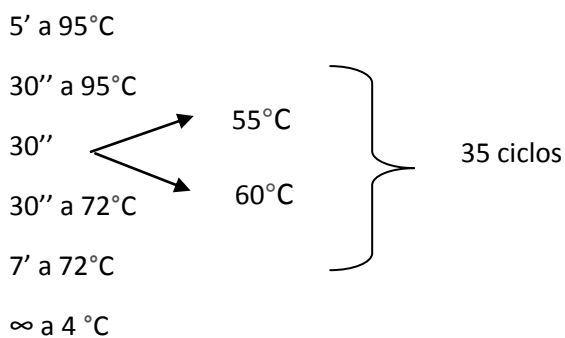
Tabla 4. Secuencias de los primers empleados para amplificar los correspondientes genes.

Genes	Directo	Reverso
<i>Drp1</i>	GAAGTGCAGCAGGAGATGCT	AGCTCGATGGCCACAATG
<i>Opa1</i>	TGCTACTAGCCGAGGAGCTAAT	CATGGCACACTACTTTTCCTGA
<i>Mfn2</i>	CATCGAATCTCGTTCACAGT	AAGCGTGAGATCAACGACAG

Tabla 5. Volúmenes de los reactivos empleados durante la PCR convencional

Molde DNA genómico moscas orR	0,5µl
Primers	0'4µl F + 0'4µl R = 0,8µl
dNTPs	0,5µl
Tampón	2,5µl
Taq-poliemerasa	0,5µl
Agua	20,2µl
Volumen total	25µl

El programa que se aplicó en el termociclador fue:



XI. PCR cuantitativa

Tabla 6. Volúmenes de los reactivos empleados durante la PCR cuantitativa

SYBR	4µl
Primers	0'5µl F + 0'5µl R = 0,8µl
cDNA	1µl de una dilución 1/5
H₂O	4µl
Volumen total	10µl/reacción

Las condiciones en las cuales se llevó a cabo la qPCR en el Light Cycler 480 (Roche, Suiza) fueron de 40 ciclos a una temperatura intermedia de 58°C.

XII. Alteraciones metabólicas: peso

Para pesar a las moscas, se durmieron 15 mosca de cada genotipo de Ov en actina con CO₂ a la semana y cinco semanas de vida, se pasaron a un eppendorf previamente tarado, y se pesaron en la balanza analítica AB204-S (Mettler Toledo Intl Inc, Suiza).

XIII. Medida del ROS

Este experimento se llevó a cabo en los genotipos de Ov actina a los 30 días de vida. El protocolo empleado fue el siguiente:

1. Preparación del buffer: 10µl Triton 1x + 990 PBS 1x
2. Homogeneización de 5 moscas de cada genotipo en 50µl del buffer previamente preparado.
3. Centrifugación a 1000g durante 5'.
4. Preparación del reactivo H2DCF 5µm: Mezclar en un eppendorf opaco 0,002g de H2DCF (2',7'-dichlorofluorescein) + 1,5mL de PBS 1x con un agitador automático y vórtex.
5. En una gradilla de 96 poner en cada pocillo que se vaya a emplear 100µl del H2DCF previamente preparado + 10µl de muestra e inmediatamente después tapar la placa con papel de aluminio comercial.
6. Dejar durante 20' a temperatura ambiente en la oscuridad mientras tiene lugar la reacción.

Medida de la fluorescencia con Wallac 1420 Victor2 plate reader (GMI, Minnesota) en unas longitudes de onda de 485nm excitación/590nm emisión.

XIV. Gráficas y métodos estadísticos empleados.

Para hacer las representaciones gráficas de los resultados empleamos el programa GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, Inc, California), mientras que para hacer la estadística se usó el Excel (Microsoft, Alburquerque).

Se analizó la homogeneidad de las varianzas y se calculó el P-value para ver la representatividad de los resultados.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

XV. Supervivencia

Está descrito que algunos de estos genes están implicados en procesos de apoptosis (Suen, et al., 2008). Para realizar el ensayo de supervivencia dos son las aproximaciones que realizamos: en primer lugar utilizamos el Gal4 o “driver” de actina, que nos permite expresar o silenciar el gen de interés en la mosca entera. Con dicho “driver” sobreexpresamos y silenciamos los tres genes implicados en dinámica mitocondrial: *Drp1*, *Opa1* y *Mfn2*. Como resultado de los cruces se pudo comprobar que tanto la sobreexpresión de *Mfn2* como la interferencia de *Opa1* en mosca completa, fueron letales.

Por otra parte, utilizamos el “driver” de miosina (Mhc) que nos permite dirigir la expresión solo en el músculo, en este caso ningún genotipo resultó letal. Tras obtener estos primeros resultados, se quiso analizar los efectos en la supervivencia.

A continuación se mostrarán los resultados de las curvas de supervivencia en actina de los genotipos no letales y posteriormente los de miosina.

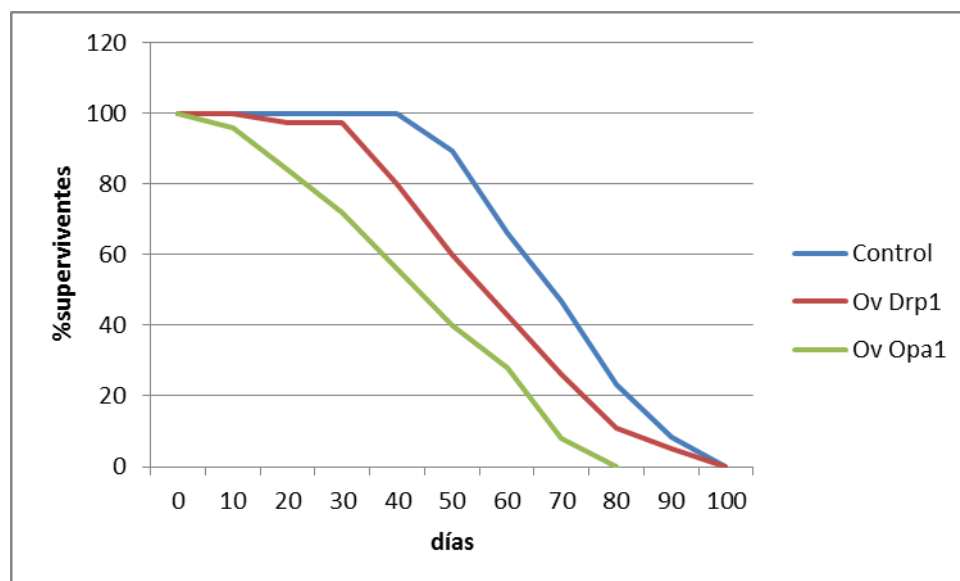


Figura 5. Curva de supervivencia genotipos Ov en actina. n =2

Por lo que se refiere a la sobreexpresión en actina, se puede ver como los controles mantienen el 100% de la población hasta los 50 días aproximadamente, momento a partir del cual empiezan a morir con una tendencia aparentemente lineal hasta llegar a los 100 días de vida. Las moscas de Ov *Drp1* presentan la misma tendencia, pero empezando a decaer a los 40 días de vida. Por el contrario, las moscas de Ov *Opa1*, empiezan a morir mucho antes, desde los 10 días de vida, y además el 100% de la población muere a los 80 días de vida, 20 días antes que los controles.

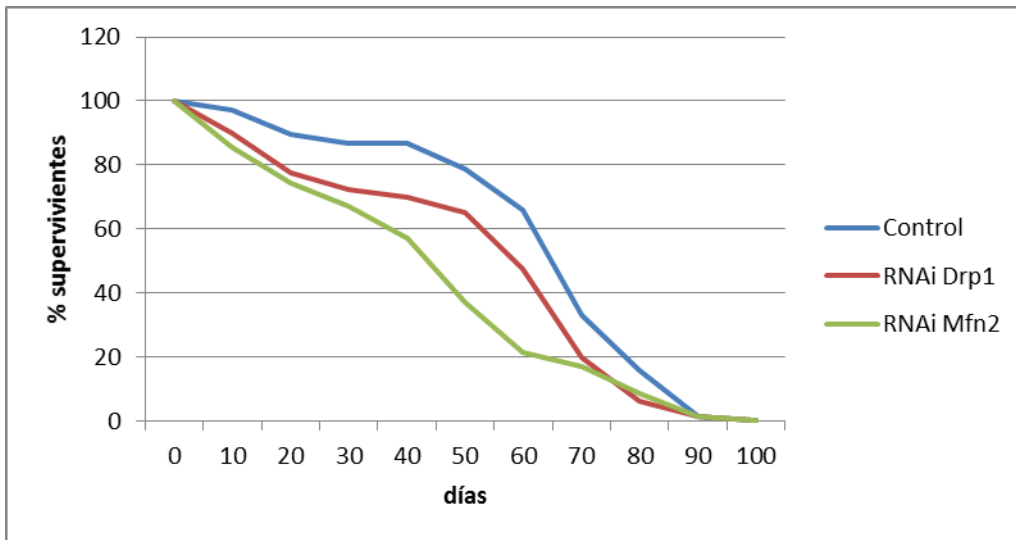


Figura 6. Curva de supervivencia genotipos RNAi en actina. n =2

En el caso de la interferencia podemos observar como hay un cambio de tendencia en los tres genotipos, ya que no observamos una tendencia tan lineal. También podemos comprobar que el 100% de las moscas control mueren a los 100 días aproximadamente, al igual que en el caso anterior. Cabe destacar, que sí hay diferencias en la vida media, RNAi *Mfn2* a los 40 días, ve reducida al 50% su población, *Drp1* a los 60 y finalmente las moscas control a los 65.

Otro detalle que podemos destacar de este experimento es el fenotipo de alas alteradas (“held up” o “drooped”; alas en posición vertical o bajadas respecto la posición natural de las moscas control) asociado al genotipo *RNAi Mfn2* en actina. Esto es un indicativo de degeneración muscular (Fernandes, et al., 2011)

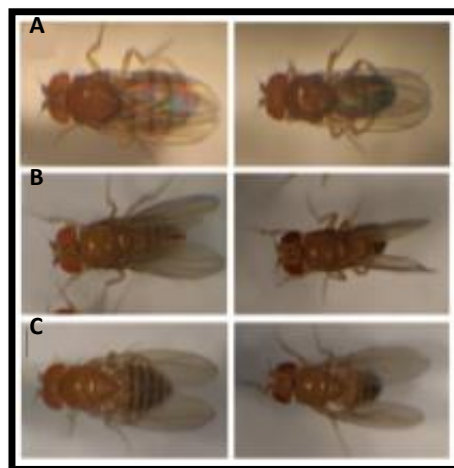


Figura 7. Fenotipo de alas alteradas del genotipo *RNAi Mfn2* en actina. (A) Salvaje, (B) “Held-up”, (C) “Drooped”. A la izquierda se muestran hembras y a la derecha machos.

RESULTADOS

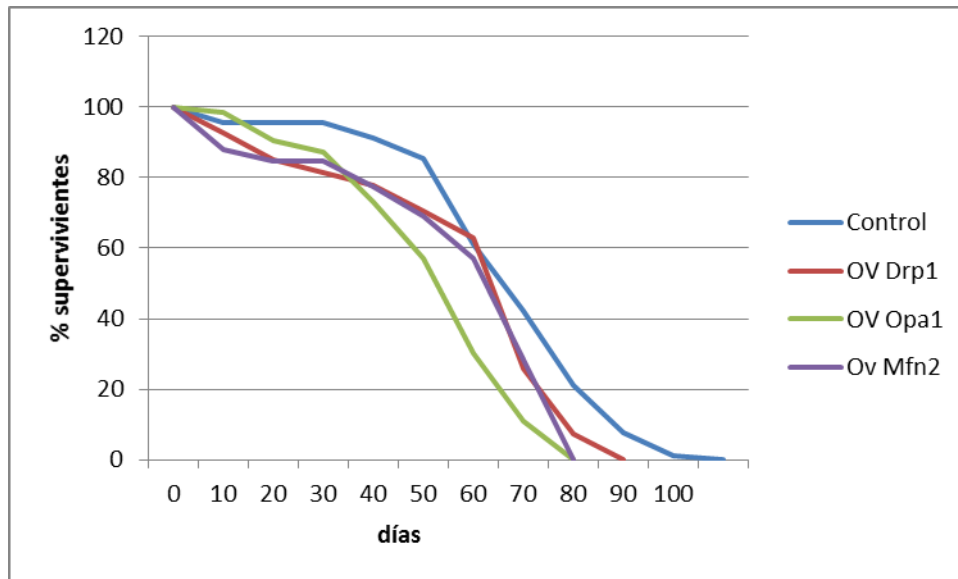


Figura 8. Curva de supervivencia genotipos Ov en miosina. n=2

Analizando la curva de supervivencia de las moscas de OV en miosina podemos ver que las moscas más longevas son los controles, llegando a los 110 días de vida. Por otra parte, las moscas de *Ov Drp1*, alcanzaron los 100 días de vida, y finalmente las moscas con sobreexpresión de *Mfn2* y *Opa1*, solo llegaron a los 80 días. Además, las moscas de *Ov Opa1* son las que antes alcanzan la reducción al 50% de su población, a los 50 días, mientras que el resto lo hacen a los 60.

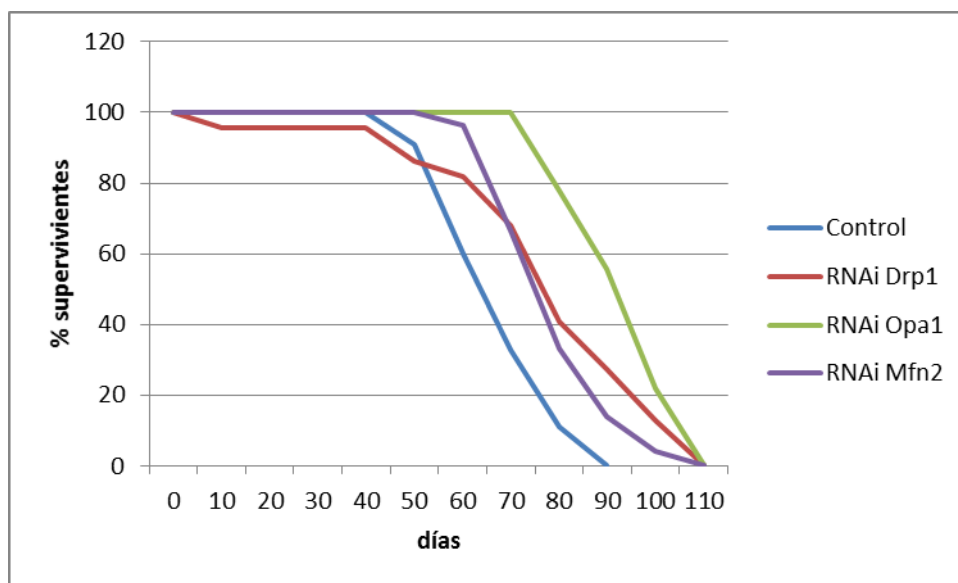


Figura 9. Curva de supervivencia genotipos RNAi en miosina. n=2

Si nos fijamos en las moscas de interferencia con el “driver” de miosina, podemos ver que los controles empiezan a morir sobre los 55 días de vida, del mismo modo que las moscas RNAi *Drp1*, mientras que RNAi *Mfn2* y *Opa1* no lo empiezan a hacer hasta los 70 y 80 respectivamente. Además, mientras que los controles sobreviven hasta los 100 días, los 3 genotipos RNAi lo hacen hasta los 110. Este es un resultado muy llamativo e interesante que discutiremos más adelante.

XVI. Geotaxis negativa: Climbing

Algunos estudios han asociado alteraciones de los genes implicados en la dinámica mitocondrial con defectos locomotores en enfermedades neurodegenerativas, es el caso de *Mfn2* y CMT (Zorzano, et al., 2012). A través de los ensayos de climbing, se puede asociar la neurodegeneración a un fenotipo locomotor en *D. melanogaster*, y cuantificarla. Con este objetivo, se llevaron a cabo estos experimentos tanto en las moscas de actina como las de miosina.

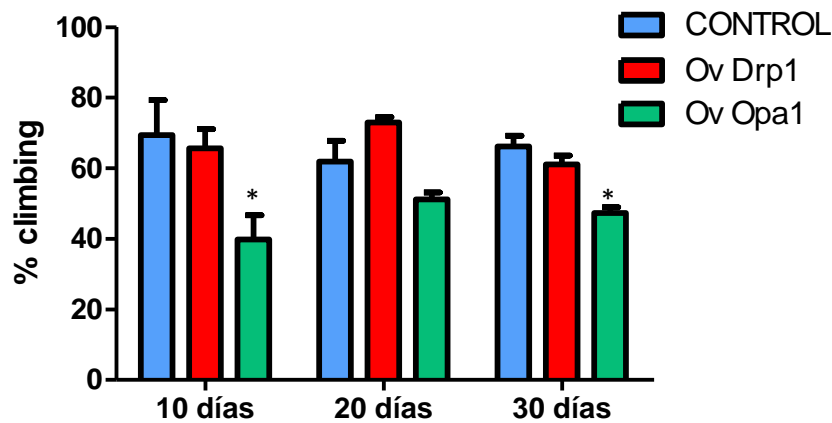


Figura 10. Climbing genotipos Ov en actina. n=2. El * representa la significatividad estadística por debajo de 0,5 empleando la prueba T. Las barras representan el error estándar.

En primer lugar, las moscas de OV en actina podemos ver que a los 10 días, el porcentaje de climbing del control, es de aproximadamente un 75%. No observamos diferencias entre las moscas *Ov Drp1* y el control, pero sí vemos una bajada estadísticamente significativa en las moscas *Ov Opa1*. A los 20 días los valores del control han descendido ligeramente (65%), en cambio las moscas *Ov Drp1* mantienen su capacidad de escalar el tubo, por último, las moscas *Ov Opa1* siguen teniendo menor capacidad respecto el control. Finalmente, a los 30 días, vemos la misma tendencia en los tres genotipos, las moscas control no presentan diferencias respecto las *Ov Drp1* mientras que las moscas *Ov Opa1* tienen una menor capacidad de climbing que vuelve a ser significativa con respecto a los controles.

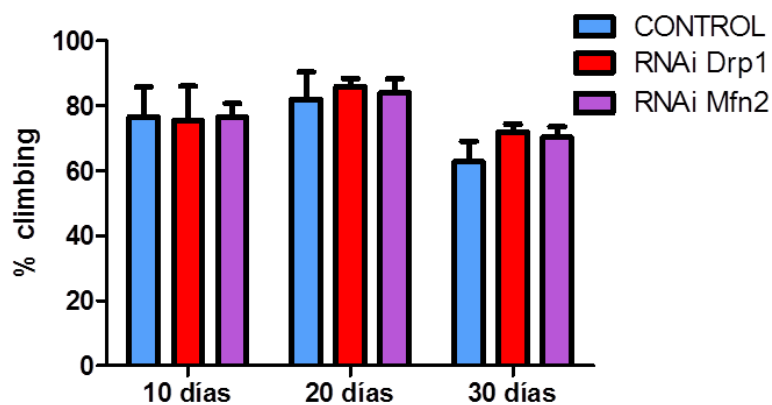


Figura 11. Climbing genotipos RNAi en actina. n=2. Las barras representan el error estándar.

En el caso de la interferencia en actina, se puede ver que tanto las moscas de los controles como RNAi *Drp1* y RNAi *Mfn2* tienen un porcentaje de climbing muy parecidos entre ellos durante los 10, 20 y 30 días que dura el experimento.

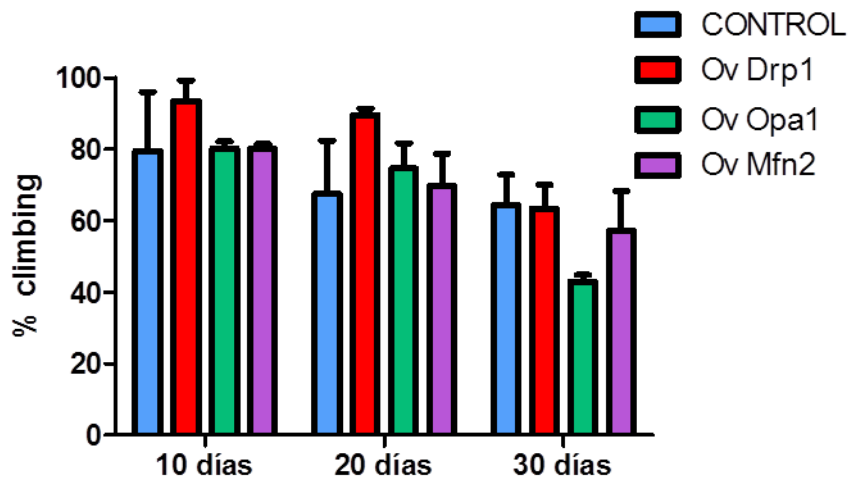


Figura 12. Climbing genotipos Ov en miosina. n=2. Las barras representan el error estándar.

Si nos centramos en la sobreexpresión en miosina, podemos observar a los 10 días todos los grupos presentan unos porcentajes similares, alrededor del 75%. A los 20 días se sigue manteniendo esta tendencia con una leve disminución en todos los genotipos por igual, en cambio, a los 30 días sí que vemos una disminución de cerca del 20% con respecto a los controles en las moscas OV *Opa1*.

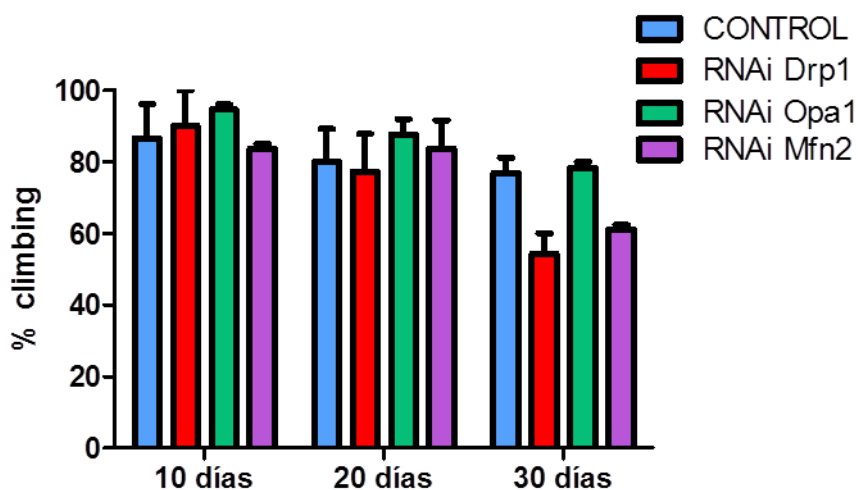


Figura 13. Climbing genotipos RNAi en miosina. n=2. Las barras representan el error estándar

En el caso de la interferencia con el Gal4 de miosina, a los 10 días podemos ver que prácticamente todas las moscas tienen un porcentaje de climbing muy similar, alrededor de un 80-90%. A los 20 días, estos porcentajes disminuyen ligeramente pero siguen la misma tendencia en todos los genotipos (70-80%). A los 30 días el silenciamiento de *Drp1* y *Mfn2* muestra una reducción del porcentaje de climbing de más del 20%, cayendo hasta valores cercanos al 50%, mientras que el control y RNAi *Opa1* apenas reducen sus valores con respecto a los 20 días.

XVII. Alteraciones metabólicas: peso

En los últimos años, se ha demostrado que alteraciones en la actividad de las proteínas de dinámica mitocondrial afectan al metabolismo energético (Zorzano et al., 2012). Un ejemplo es la relación entre la *Mfn2* y la diabetes (Sebastián. et al., 2011). En este caso, se quiso estudiar el peso. Este experimento se realizó con el Gal4 de actina.

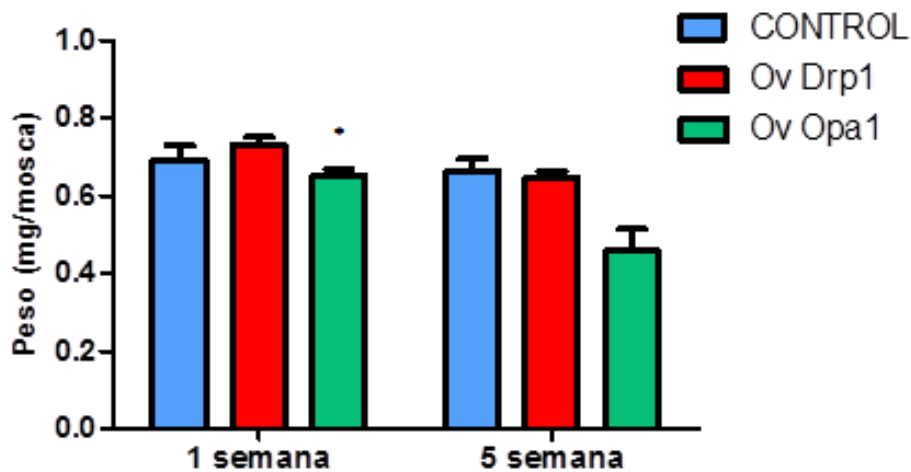


Figura 14. Peso genotipos Ov en actina. n=2. El * representa la significatividad estadística por debajo de 0,5 empleando la prueba T. Las barras representan el error estándar.

Empezando por la OV en actina, podemos ver que a la primera semana de vida los controles pesan aproximadamente $0,7 \pm 0,1$ mg/mosca, y las moscas de *OV-Drp1* presentaban un ligero aumento, 0,75 mg/mosca aproximadamente. En el caso de *OV-Opa1*, 0,65 mg/mosca, siendo esta última diferencia de peso significativa con respecto a los controles.

A la quinta semana de vida, menos los controles, el resto de moscas han perdido peso. Una causa podría ser la pérdida de músculo con la edad. Los controles y *OV-Drp1* muestran valores más similares que durante la primera semana, alrededor de 0,6 mg/mosca. En cambio, las de *OV-Opa1* parecen ser las que más peso han perdido, aunque hay una gran variabilidad

RESULTADOS

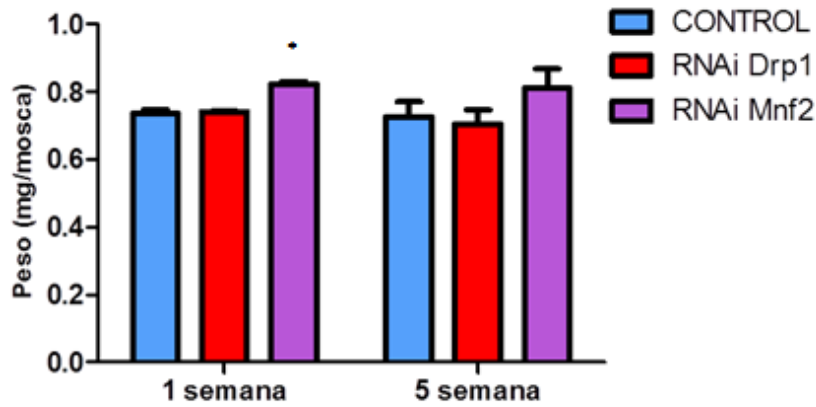


Figura 15. Peso genotipos RNAi en actina. n=2. El * representa la significatividad estadística por debajo de 0,5 empleando la prueba T. Las barras representan el error estándar.

En el caso de la interferencia, durante la primera semana de vida, los controles, al igual que las moscas RNAi *Drp1*, pesan 0,75 mg/mosca, mientras que las moscas RNAi *Mnf2* pesan 0,8 mg/mosca, un aumento significativamente mayor con respecto a las anteriores. Al cabo de 5 semanas, tanto los controles como las moscas RNAi *Drp1* han aumentado ligeramente de peso pero no existen diferencias significativas entre ellos. En el caso de las moscas RNAi *Mfn2* también se mantiene esta tendencia, sobrepasando ahora los 0,82 mg/mosca.

XVIII. Gel prueba PCR convencional

Se hizo una PCR convencional para ver las temperaturas óptimas de amplificación de los primers de los genes de estudio. En la siguiente fotografía se muestran las bandas obtenidas.

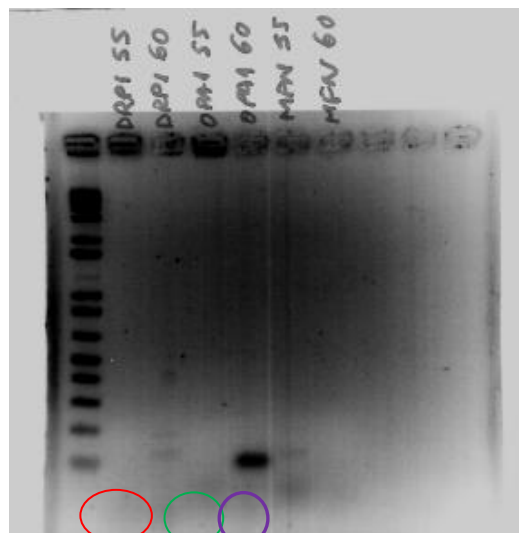


Figura 16. Gel prueba PCR. Los círculos indican la amplificación de la banda específica para cada gen.

Rojo: *Drp1* ; Verde: *Mnf2*; Morado: *Mfn2*

En la figura 15 del gel se puede ver:

- *Drp1* no amplifica a 55°C pero sí a 60°C.
- *Opa1* tampoco tiene banda a 55°C pero sí una muy fuerte a 60°C.
- *Mfn2* por el contrario parece amplificar mejor a 55°C donde si aparece banda, a 60°C no se aprecia.

XIX. Cuantificación de la expresión: qPCR

Los estudios mostrados hasta el momento se realizaron mediante el método UAS-Gal4 (detallado en material y métodos) que nos permite la sobreexpresión o silenciamiento de nuestros genes de interés. Para corroborar el funcionamiento de dicha técnica, cuantificamos los niveles de transcrito en las moscas que utilizamos el driver de actina.

Los valores que se expresan en las gráficas están referenciados respecto al control, es decir, un valor de 1 significa que los niveles no han variado. Empezando por el genotipo de sobreexpresión de *Drp1*, se puede ver como el gen más expresado es el propio *Drp1*, aproximadamente cinco veces más que el control, confirmando el funcionamiento de la técnica. No parece que *Opa1* vea alterada su expresión, ya que su valor es aproximadamente 1. Por último, *Mfn2* experimenta una bajada en su expresión tras la sobreexpresión de *Drp1*.

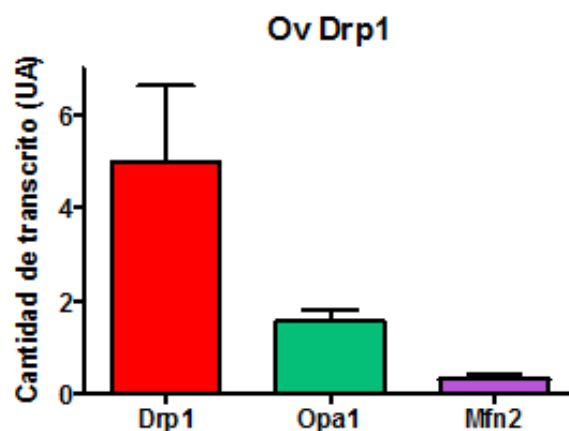


Figura 17. qPCR genotipos Ov *Drp1*. n=1. Las barras representan el error estándar

En el caso del genotipo de Ov *Opa1*, se corrobora la sobreexpresión del propio gen, siendo aproximadamente cinco veces superior a la del control. Además, también ve incrementada la expresión de otro gen de fusión como es *Mfn2*, cerca de los valores de *Opa1*, y del de fisión *Drp1*, con cerca de cuatro veces más niveles de expresión que en sus niveles basales.

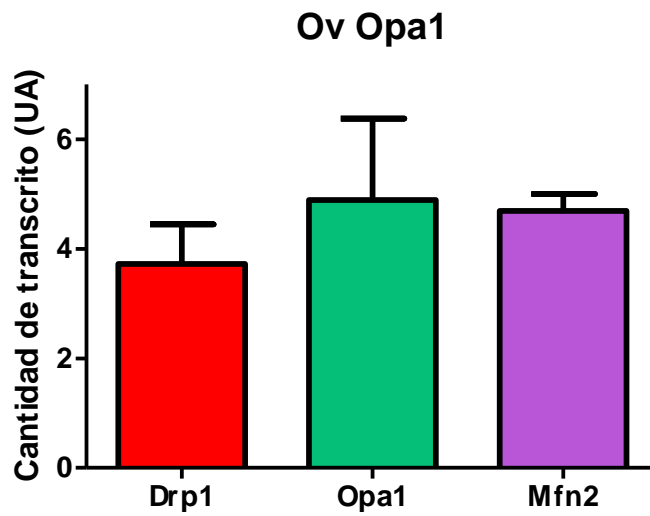


Figura 18. qPCR genotipos Ov Opa1. n=1. Las barras representan el error estándar

Pasando a analizar los genotipos de silenciamiento, en el genotipo RNAi Drp1, el silenciamiento ha sido del 60%. Por otra parte, los otros dos genes, Opa1 y Mfn2 también reducen su expresión, con valores del 40% y 65% respectivamente

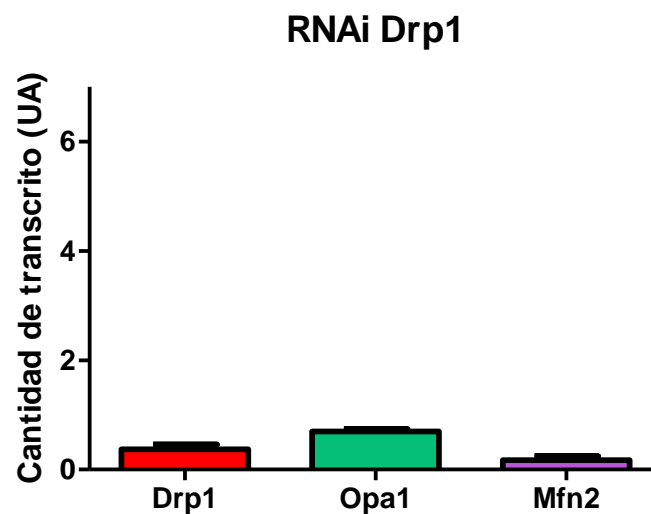


Figura 19. qPCR genotipos RNAi Drp1 n=1 Las barras representan el error estándar

En el caso de la interferencia de *Mfn2*, se observa que la expresión de *Mfn2* esta silenciada un 90%, mientras que las de *Drp1* y *Opa1* no experimentan grandes cambios.

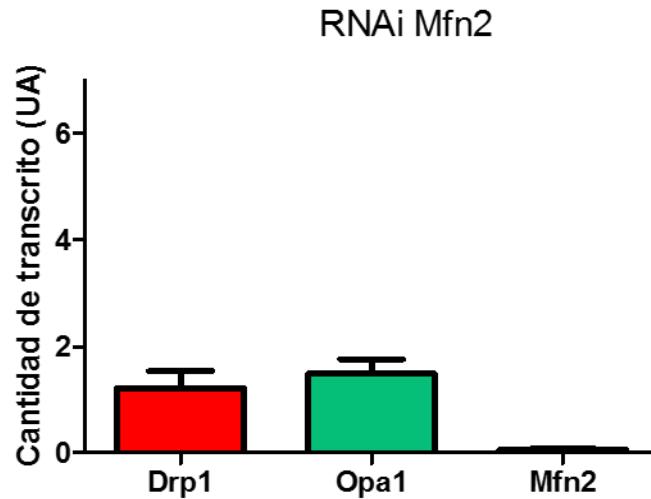


Figura 20. qPCR genotipos RNAi Mfn2. n=1. Las barras representan el error estándar

XX. Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) está relacionadas con el estrés oxidativo (Harman, 1955; Halliwell y Whiteman., 2004), queremos comprobar entonces si alguno de nuestros genotipos presentaba una mayor producción del ROS. Este experimento final solo se llevó a cabo con las moscas de Ov en actina, por ser las moscas de Ov *Opa1* las que presentan un fenotipo más evidente (menor supervivencia, menor climbing y menor peso). Por ello, podrían ser buenas candidatas para llevar a cabo el ensayo del ROS. De nuevo todo se ha relativizado al control, por ello el control es 1. *Ov Drp1* no supone variaciones en los niveles del ROS, mientras que *Ov Opa1* experimenta un aumento significativo en la producción de ROS, corroborando así nuestra sospecha.

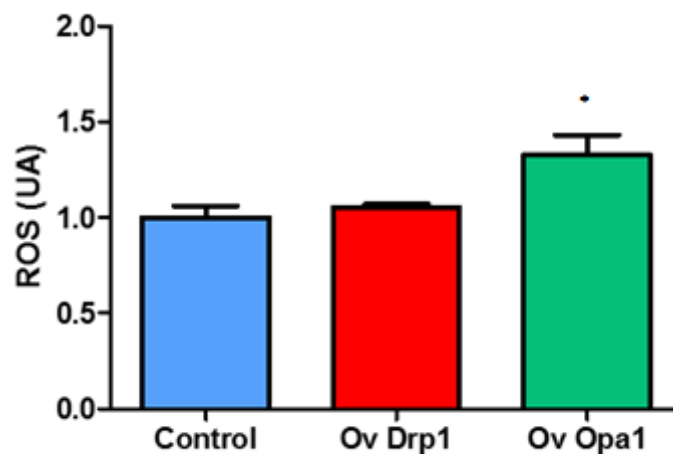


Figura 21. Medida ROS genotipos Ov en actina. El * representa la significatividad estadística por debajo de 0,5 empleando la prueba T. Las barras representan el error estándar.

DISCURSIÓN

V. DISCUSIÓN

Con este trabajo y los experimentos que se han llevado a cabo en él, se ha ampliado el conocimiento existente acerca de los genes implicados en dinámica mitocondrial *Drp1*, *Opa1* y *Mfn2* y su papel en la neurodegeneración.

El rol de estos genes en procesos de apoptosis está muy estudiado (Scorrano, et al., 2002; Frank, 2005; Suen, et al., 2008). Cuando se produce un desequilibrio en los procesos de fusión y fisión, la red mitocondrial encargada de realizar los controles de calidad al DNA y las proteínas se desintegra. Al mismo tiempo, se libera el citocromo C y se activan las caspasas y los procesos de fisión en cadena, lo que lleva a la muerte celular. Esto puede correlacionar con la letalidad en actina de la sobreexpresión de *Mfn2* y el silenciamiento de *Opa1* observado en nuestros experimentos. En el primer caso, el de la sobreexpresión de *Mfn2*, los procesos de fusión en los que este está implicado y la conectividad entre las mitocondrias aumentan. Esto produce un interacción de *Mfn2* con la proteína Bax (Frank, 2005; Hoppins, et al., 2014) implicada en apoptosis celular. Por otra parte, los experimentos en los que se ha querido analizar la interferencia de *Opa1*, se ha tenido que recurrir a mutaciones heterocigotas por la letalidad de la homocigosis (Frank, 2005; Shahrestani, et al., 2009; Debattisti y Scorrano., 2013).

Los resultados de las curvas de supervivencia llevadas a cabo con el resto de genotipos que no fueron letales, tanto en actina como en miosina, también mostraron las consecuencias de los desajustes entre los procesos de fusión y fisión, corroborando la hipótesis de la importancia de que haya un balance entre ambos para el buen funcionamiento celular. En este caso, dichas repercusiones se tradujeron en una reducción de la vida media y menor supervivencia con respecto a los controles. Como en el caso de la apoptosis, las alteraciones en la expresión de los genes *Opa1* y *Mfn2* fueron las más graves en la mayoría de los casos de actina y miosina. La modificación de los niveles de *Drp1* resultó ser el menos agresivo en los estudios realizados, siempre con valores más cercanos a los controles. En corazón, se ha demostrado que tanto la interferencia como al sobreexpresión de *Opa1* Y *Mfn2* inducen apoptosis celular (Chen, et al., 2009; Sugioka, et al., 2004; Frank, 2005). En cambio, La Ov de *Drp1* produce un aumento del número de mitocondrias en dendritas favoreciendo la formación de sinapsis en neuronas (Knott, et al., 2008), y el silenciamiento se ha demostrado que inhibe la fisión y apoptosis (Frank, 2005; Suen, et al., 2008; Itoh, et al., 2013).

Un resultado de este experimento que llama mucho la atención, sería que todas las moscas que tienen todos estos genes de estudio silenciados en miosina son capaces de sobrevivir más que los controles. Esta observación está de acuerdo con la hipótesis de que un pequeño estrés en músculo provocado por el silenciamiento de algún gen, podría incrementar la esperanza de vida debido a alteraciones en la ruta de la insulina. (Dillin, et al., 2002; Owusu-Ansah, et al., 2013).

Los resultados del climbing, cuyo objetivo es cuantificar defectos locomotores, muestran una disminución en la capacidad de trepar en función de la edad en la mayoría de los casos. Además, parece que de nuevo se mantienen las tendencias observadas en las curvas de supervivencia con respecto a la *Ov Opa1* tanto en actina (desde los primeros 10 días) como en miosina (30 días). En ninguno de los genotipos de silenciamiento de actina se observaron diferencias. Se sabe que el silenciamiento de *Mfn2* tiene graves implicaciones en cardiopatías y músculo cardíaco (Dorn, et al., 2011; Dorn, et al., 2015). Por otra parte, la inhibición de *Drp1* da lugar a mitocondrias demasiado largas que no se pueden localizar adecuadamente ni en las dendritas ni en los axones, por lo que la sinapsis no es buena, no hay ATP ni una buena transmisión de información entre las neuronas. (Li et al., 2004; Itoh, et al., 2013). Esto podría dar sentido a nuestros resultados donde observamos una reducción en el “climbing” a largo plazo (30 días) en los genotipos de *Mfn2* y *Drp1* silenciados.

Por lo que se refiere a las medidas del peso, los datos más relevantes fueron una disminución de peso en la *Ov Opa1* y un aumento en las RNAi *Mfn2*, siempre con el driver de Actina, ya que queríamos ver efectos globales. Como hipótesis podríamos decir que estas moscas, RNAi *Mfn2*, podrían sufrir anomalías metabólicas, ya que se ha relacionado los bajos niveles de *Mfn2* con la intolerancia a la glucosa o la diabetes y el sobrepeso (Zorzano, et al., 2012; Sandoval, et al., 2014). Al igual que en los experimentos anteriores, las moscas de *Drp1* no mostraron grandes diferencias con respecto a los controles.

Finalmente, a través de la PCR cuantitativa, se pudo corroborar la sobreexpresión e interferencia de los genes en actina, confirmando el funcionamiento de la técnica. Por otra parte, hemos estudiado la alteración de los otros genes de dinámica mitocondrial en cada genotipo.

Las moscas de *Ov Drp1* presentaron una reducción drástica de los niveles de *Mfn2*, esto incrementaría la fisión mitocondrial e iría en la línea de que la sobreexpresión de *Drp1* produce una mayor fragmentación mitocondrial. En cambio, los niveles de *Opa1* aumentaron, posiblemente en un intento de compensar el incremento de fisión.

Por lo que se refiere a las *Ov Opa1*, observamos un incremento esperado de *Opa1* y también de *Mfn2*, corroborando que ambas proteínas funcionan al unísono (Dorn, et al., 2015). Por otra parte, también observamos un incremento de *Drp1*, de nuevo como una posible respuesta para mantener el equilibrio mitocondrial.

Centrándonos en los genotipos de interferencia, en el genotipo de RNAi *Drp1*, el resto de genes también reducen su expresión. Esto parece corroborar también que la escasez de fisión se traduce también en disminución de fusión. Por último, en el genotipo de RNAi *Mfn2*, *Opa1* presenta una pequeña subida en su expresión, pero sin ser muy acusada. En principio, este efecto podría ser un intento de compensar la falta de fusión celular. En la bibliografía se ha visto que en mutantes RNAi *Mfn2*, la sobreexpresión de *Opa1* podía resultar beneficiosa (Suen, et al., 2008; Seo, et al., 2010).

Finalmente, el experimento de la medida del ROS en los genotipos de actina y los resultados obtenidos sirvieron para corroborar lo que el resto de experimentos también parecían indicar, que la *Ov Opa1* en actina era el genotipo más afectado en todos los sentidos; supervivencia, climbing y peso, y que este exceso en ROS provocó también la muerte

prematura. Del mismo modo, las moscas de *Ov Drp1* en actina que apenas mostraron alteraciones en supervivencia, climbing y peso, tampoco mostraron alteraciones en el ROS. Por otro lado, las moscas de interferencia de miosina sobreviven más, sería interesante cuantificar la producción del ROS en estos genotipos, ya que otros trabajos han visto la estimulación de la defensas bajo un leve defecto provocado en músculo (Ristow, et al., 2011; Owusu-Ansah, et al., 2013).

Por los resultados obtenidos en este trabajo y la discusión de los mismos, algunas líneas futuras de investigación podrían centrarse en seguir estudiando los fenotipos de posición anómala de las alas: held-up o drooped de las moscas de RNAi *Mfn2*, se podría llevar a cabo estudios histológicos de los músculos del vuelo. Además, este genotipo se sabe que también a apoptosis en el desarrollo de los discos de ala (Thomenius, et al., 2011; Sandoval, et al., 2014). También podrían hacerse pruebas de rescate de unos genotipos con otro para ver la relación antagonista entre los diferentes genes implicados en procesos de dinámica mitocondrial y la tendencia al balance en ambos procesos. Otra opción sería emplear el promotor “elav” para relacionar realmente las alteraciones en las competencias neuromusculares con el cerebro. Retomando el dato de los RNAi en miosina, que sobreviven más, será interesante estudiar las rutas en común que pueden estar alteradas en estos genes y que conllevan a una mayor supervivencia, siendo la ruta de la insulina una gran candidata (De Kreutzenberg, et al., 2010).

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

Los defectos observados en las moscas del genotipo de Ov Opa1 en actina en todos los aspectos analizados: supervivencia, peso, climbing y ROS, corroboran la importancia de este gen en el mantenimiento celular y sistémico, y hacen de él un gran candidato para futuros estudios que tengan el objetivo de entender mejor las bases moleculares de los mecanismos implicados.

Otro resultado que ha llamado mucho la atención, es el incremento de supervivencia en las moscas de todos los genotipos de RNAi en músculo. Este resultado, junto con otros ya existentes en los que también se ha visto que la estimulación de las defensas bajo un leve defecto provocado en músculo puede incrementar la supervivencia, abre una nueva línea de estudio en la posible señalización desde el músculo hacia otros tejidos que desencadenen esta mayor supervivencia

Por último, también se ha estudiado los cambios de expresión en los diferentes genes para cada genotipo. Estos resultados indican que la alteración de un único gen puede conllevar la alteración de otros distintos, será importante por tanto entender el organismo como un todo y no solo centrarnos en un gen.

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFIA

Artroposfera, Drosophila mosca de la fruta. Consultado el 29 Junio de 2015: <http://www.artroposfera.com/art%C3%ADculos/alimento-vivo/cr%C3%ADa-de-drosophila-mosca-de-la-fruta/>

BARINAGA, M. (1999). Mutant fruit flies respond to Lorenzo's oil. *Science*, 284 (5422), 1899-1901.

CHEN, L., GONG, Q., STICE, J. P., & KNOWLTON, A. A. (2009). Mitochondrial OPA1, Apoptosis and Heart Failure. *Cardiovascular research*, cvp181.

DE KREUTZENBERG, S. V., CEOLOTTO, G., PAPPARELLA, I., BORTOLUZZI, A., SEMPLICINI, A., DALLA MAN, C., & AVOGARO, A. (2010). Downregulation of the longevity-associated protein sirtuin 1 in insulin resistance and metabolic syndrome: potential biochemical mechanisms. *Diabetes*, 59(4), 1006-1015.

DEBATTISTI, V., & SCORRANO, L. (2013). D. melanogaster, mitochondria and neurodegeneration: small model organism, big discoveries. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 55, 77-86.

DEL AMO, V. L., SECO-CERVERA, M., GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L., WHITWORTH, A. J., PALLARDÓ, F. V., & GALINDO, M. I. (2014). Mitochondrial defects and neuromuscular degeneration caused by altered expression of Drosophila Gdap1: implications for the Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Human molecular genetics*.

DENG, H., DODSON, M. W., HUANG, H., & GUO, M. (2008). The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14503-14508.

DILLIN, A., HSU, A. L., ARANTES-OLIVEIRA, N., LEHRER-GRAIWER, J., HSIN, H., FRASER, A. G., & Kenyon, C. (2002). Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science*, 298(5602), 2398-2401.

DORN, G. W. (2015). Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change. *EMBO molecular medicine*, e201404575.

DORN, G. W., CLARK, C. F., ESCHENBACHER, W. H., KANG, M. Y., ENGELHARD, J. T., WARNER, S. J., & JOWDY, C. C. (2011). Mfn2 and Opa1 control mitochondrial and cardiac function in Drosophila. *Circulation research*, 108(1), 12-17.

FERNANDES, C., & RAO, Y. (2011). Genome-wide screen for modifiers of Parkinson's disease genes in Drosophila. *Mol brain*, 4, 17.

FERREIRA DA SILVA, A., VALACCA, C., RIOS, E., PÓPULO, H., SOARES, P., SOBRINHO-SIMÕES, M., & CAMPELLO, S. (2015). Mitochondrial Dynamics Protein Drp1 Is

Overexpressed in Oncocytic Thyroid Tumors and Regulates Cancer Cell Migration. *PloS one*, 10(3), e0122308.

FRANK, S. (2006). Dysregulation of mitochondrial fusion and fission: an emerging concept in neurodegeneration. *Acta neuropathologica*, 111(2), 93-100.

HALES, K. G., & FULLER, M. T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*, 90(1), 121-129.

HALLIWELL, B., & WHITEMAN, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology*, 142(2), 231-255.

HARMAN, D. (1955). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.

HOPPINS, S., EDLICH, F., CLELAND, M. M., BANERJEE, S., MCCAFFERY, J. M., YOULE, R. J., & NUNNARI, J. (2011). The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes. *Molecular cell*, 41(2), 150-160.

ITOH, K., NAKAMURA, K., IJIMA, M., & SESAKI, H. (2013). Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends in cell biology*, 23(2), 64-71.

JORNAYVAZ, F. R., & SHULMAN, G. I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem*, 47, 69-84.

KNOTT, A. B., & BOSSY-WETZEL, E. (2008). Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147(1), 283-292.

KNOTT, A. B., PERKINS, G., SCHWARZENBACHER, R., & BOSSY-WETZEL, E. (2008). Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(7), 505-518.

LI, Z., OKAMOTO, K. I., HAYASHI, Y., & SHENG, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell*, 119(6), 873-887.

LIU, W., ACÍN-PERÉZ, R., GEGHMAN, K. D., MANFREDI, G., LU, B., & LI, C. (2011). Pink1 regulates the oxidative phosphorylation machinery via mitochondrial fission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), 12920-12924.

MANCZAK, M., & REDDY, P. H. (2012). Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage. *Human molecular genetics*, 21(11), 2538-2547.

NIEMANN, A., RUEGG, M., LA PADULA, V., SCHENONE, A., & SUTER, U. (2005). Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *The Journal of cell biology*, 170(7), 1067-1078.

OWUSU-ANSAH, E., SONG, W., & PERRIMON, N. (2013). Muscle mitohormesis promotes longevity via systemic repression of insulin signaling. *Cell*, 155(3), 699-712.

PLA-MARTÍN, D., RUEDA, C. B., ESTELA, A., SÁNCHEZ-PIRIS, M., GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, P., TRABA, J., & PALAU, F. (2013). Silencing of the Charcot–Marie–Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca²⁺ homeostasis by reducing store-operated Ca²⁺ entry. *Neurobiology of disease*, 55, 140-151.

RISTOW, M., & SCHMEISSER, S. (2011). Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(2), 327-336.

SANDOVAL, H., YAO, C. K., CHEN, K., JAISWAL, M., DONTI, T., LIN, Y. Q., & BELLEN, H. J. (2014). Mitochondrial fusion but not fission regulates larval growth and synaptic development through steroid hormone production. *Elife*, 3, e03558.

SCHERZER, C. R., JENSEN, R. V., GULLANS, S. R., & FEANY, M. B. (2003). Gene expression changes presage neurodegeneration in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Human molecular genetics*, 12(19), 2457-2466.

SCORRANO, L., ASHIYA, M., BUTTLE, K., WEILER, S., OAKES, S. A., MANNELLA, C. A., & KORSMEYER, S. J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Developmental cell*, 2(1), 55-67.

SEBASTIÁN, D., HERNÁNDEZ-ALVAREZ, M. I., SEGALÉS, J., SORIANELLO, E., MUÑOZ, J. P., SALA, D., & ZORZANO, A. (2012). MITOFUSIN 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), 5523-5528.

SEO, A. Y., JOSEPH, A. M., DUTTA, D., HWANG, J. C., ARIS, J. P., & LEEUWENBURGH, C. (2010). New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *Journal of cell science*, 123(15), 2533-2542.

SHAHRESTANI, P., LEUNG, H. T., LE, P. K., PAK, W. L., TSE, S., OCORR, K., & Huang, T. (2009). Heterozygous mutation of *Drosophila* Opa1 causes the development of multiple organ abnormalities in an age-dependent and organ-specific manner. *PLoS One*, 4(8), e6867.

SUEN, D. F., NORRIS, K. L., & YOULE, R. J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes & development*, 22(12), 1577-1590.

SUGIOKA, R., SHIMIZU, S., & TSUJIMOTO, Y. (2004). Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52726-52734.

TANG, S., LE, P. K., TSE, S., WALLACE, D. C., & HUANG, T. (2009). Heterozygous mutation of Opa1 in *Drosophila* shortens lifespan mediated through increased reactive oxygen species production. *PLoS One*, 4(2), e4492.

BIBLIOGRAFÍA

THOMENIUS, M., FREEL, C. D., HORN, S., KRIESER, R., ABDELWAHID, E., CANNON, R., & KORNBLUTH, S. (2011). Mitochondrial fusion is regulated by Reaper to modulate *Drosophila* programmed cell death. *Cell Death & Differentiation*, 18(10), 1640-1650.

WESTERMANN, B. (2010, August). Mitochondrial dynamics in model organisms: what yeasts, worms and flies have taught us about fusion and fission of mitochondria. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 21, No. 6, pp. 542-549). Academic Press.

WOLPERT, L. (2009). *Principios del desarrollo*. Ed. Médica Panamericana.

ZHAO, J., ZHANG, J., YU, M., XIE, Y., HUANG, Y., WOLFF, D. W., & Tu, Y. (2013). Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*, 32(40), 4814-4824.

ZORZANO, A., SEGALÉS, J., HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, M. I., & SORIANELLO, E. (2012). Dinámica mitocondrial y sus implicaciones en la desregulación metabólica y en la neurodegeneración. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*.

ANEXOS

VIII. ANEXOS

XXI. Cruces.

I. *Ov actina*

$$P: \frac{+}{+}; \frac{Act-Gal4}{TM6B} \times \frac{UAS-Mfn2}{Cyo}; \frac{+}{+}$$

$$F1: \frac{UAS-Mfn2}{+}; \frac{Act-Gal4}{+} / \frac{UAS-Mfn2}{+}; \frac{TM6B}{+} / \frac{Cyo}{+}; \frac{Act-Gal4}{+} / \frac{Cyo}{+}; \frac{TM6B}{+}$$

$$P: \frac{+}{+}; \frac{Act-Gal4}{TM6B} \times \frac{+}{+}; \frac{UAS-Drp1}{TM6B}$$

$$F1: \frac{+}{+}; \frac{Act-Gal4}{TM6B} / \frac{+}{+}; \frac{Act-Gal4}{UAS-Drp1} / \frac{+}{+}; \frac{UAS-Drp1}{TM6B}$$

$$P: \frac{+}{+}; \frac{Act-Gal4}{TM6B} \times \frac{+}{+}; \frac{UAS-Opa1}{TM6B}$$

$$F1: \frac{+}{+}; \frac{Act-Gal4}{TM6B} / \frac{+}{+}; \frac{Act-Gal4}{UAS-Opa1} / \frac{+}{+}; \frac{UAS-Opa1}{TM6B}$$

$$P. Control: \frac{+}{+}; \frac{Act-Gal4}{TM6B} \times or R \left(\frac{+}{+}; \frac{+}{+} \right)$$

$$F1: \frac{+}{+}; \frac{Act-Gal4}{+} / \frac{+}{+}; \frac{TM6B}{+}$$

II. RNAi actina

$$P: \frac{Act-Gal4}{Cyo}; \frac{UAS-Dcr}{UAS-Dcr} \times \frac{+}{+}; \frac{RNAi-Mfn2}{RNAi-Mfn2}$$

$$F1: \frac{Act-Gal4}{+}; \frac{UAS-Dcr}{RNAi-Mfn2} / \frac{Cyo}{+}; \frac{UAS-Dcr}{RNAi-Mfn2}$$

$$P: \frac{Act-Gal4}{Cyo}; \frac{UAS-Dcr}{UAS-Dcr} \times \frac{+}{+}; \frac{RNAi-Opa1}{RNAi-Opa1}$$

$$F1: \frac{Act-Gal4}{+}; \frac{UAS-Dcr}{RNAi-Opa1} / \frac{Cyo}{+}; \frac{UAS-Dcr}{RNAi-Opa1}$$

$$P: \frac{Act-Gal4}{Cyo}; \frac{UAS-Dcr}{UAS-Dcr} \times \frac{+}{+}; \frac{RNAi-Drp1}{RNAi-Drp1}$$

$$F1: \frac{Act-Gal4}{+}; \frac{UAS-Dcr}{RNAi-Drp1} / \frac{Cyo}{+}; \frac{UAS-Dcr}{RNAi-Drp1}$$

$$P. Control: \frac{Act-Gal4}{Cyo}; \frac{UAS-Dcr}{UAS-Dcr} \times or R \left(\frac{+}{+}; \frac{+}{+} \right)$$

$$F1: \frac{Act-Gal4}{+}; \frac{UAS-DCR}{+} / \frac{Cyo}{+}; \frac{UAS-DCR}{+}$$

III. Ov miosina

$$P: \frac{Mch-Gal4}{Mch-Gal4}; \frac{+}{+} \times \frac{+}{+}; \frac{UAS-Opa1}{TM6B}$$

$$F1: \frac{Mch-Gal4}{+}; \frac{UAS-Opa1}{+} / \frac{Mch-Gal4}{+}; \frac{TM6B}{+}$$

$$P: \frac{Mch-Gal4}{Mch-Gal4}; \frac{+}{+} \times \frac{+}{+}; \frac{UAS-Drp1}{TM6B}$$

$$F1: \frac{Mch-Gal4}{+}; \frac{UAS-Drp1}{+} / \frac{Mch-Gal4}{+}; \frac{TM6B}{+}$$

$$P: \frac{Mch-Gal4}{+}; \frac{+}{+} \times \frac{UAS-Mfn2}{Cyo}; \frac{+}{+}$$

$$F1: \frac{Mch-Gal4}{Cyo}; \frac{+}{+} / \frac{Mch-Gal4}{UAS-Mfn2}; \frac{+}{+}$$

$$P. Control: \frac{Mch-Gal4}{Mch-Gal4}; \frac{+}{+} \times orR \left(\frac{+}{+}; \frac{+}{+} \right)$$

$$F1: \frac{Mch-Gal4}{+}; \frac{+}{+}$$

IV. RNAi miosina.

$$P: \frac{Mch-Gal4}{Mch-Gal4}; \frac{UAS-Dcr}{UAS-Dcr} \times \frac{+}{+}; \frac{RNAi-Mfn2}{RNAi-Mfn2}$$

$$F1: \frac{Mch-Gal4}{+}; \frac{UAS-Dcr}{RNAi-Mfn2}$$

$$P: \frac{Mch-Gal4}{Mch-Gal4}; \frac{UAS-Dcr}{UAS-Dcr} \times \frac{+}{+}; \frac{RNAi-Drp1}{RNAi-Drp1}$$

$$F1: \frac{Mch-Gal4}{+}; \frac{UAS-Dcr}{RNAi-Drp1}$$

$$P: \frac{Mch-Gal4}{Mch-Gal4}; \frac{UAS-Dcr}{UAS-Dcr} \times \frac{+}{+}; \frac{RNAi-Opa1}{RNAi-Opa1}$$

$$F1: \frac{Mch-Gal4}{+}; \frac{UAS-Dcr}{RNAi-Opa1}$$

$$P. Control: \frac{Mch-Gal4}{Mch-Gal4}; \frac{UAS-Dcr}{UAS-Dcr} \times or R \left(\frac{+}{+}; \frac{+}{+} \right)$$

$$F1: \frac{Mch-Gal4}{+}; \frac{UAS-Dcr}{+}$$

XXII. Medio de cultivo.

1. Preparación de las alícuotas, cantidades para preparar 2L de comida:
 - 20g de agar
 - 20g de harina integral de soja
 - 120g de harina de maíz
 - 100g de azúcar.
2. Calentar 1,2L de agua (tipo II) aproximadamente durante 5'.
3. Preparar el autoclave: poner la bandeja sin agujeros para evitar que se salga la comida, rellenarla con agua y ponerlo en marcha para que se vaya calentando.
4. Pesar 60g de levadura en fresco cada vez que se haga la comida.
5. Poner la levadura ya pesada en el agua caliente y mezclarla con las alícuotas con la ayuda de la batidora.
6. Tapar la mezcla con papel de aluminio y la cinta de autoclavado, ponerla en el autoclave esperar durante aproximadamente 30' a que termine.
7. Volver a calentar 600-700ml de agua durante 5'.
8. Llevar la mezcla autoclavada a la cabina y rellenar con el agua previamente calentada hasta alcanzar los 2L.
9. Echar antifúngico y antibacteriano y mezclar bien con la batidora. Las cantidades son:
 - Ácido propionico → 10ml
 - Nipagin → 20ml
10. Dispensar la comida en los tubos.
11. Tapar los tubos y dejarlos en la cabina durante una noche o un día entero.