



Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Agronómica y Medio Natural (ETSIAMN)

Efectos del silenciamiento del gen *TMBIM6* en *Drosophila melanogaster*

Grado en Biotecnología

Curso 2015/2016

Valencia, Julio 2016

Autor: Sandra Fernández Rodríguez

Tutor: Máximo Ibo Galindo

Centro de Investigación Príncipe Felipe



License Type: Creative commons; Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0)

Título

Efectos del silenciamiento del gen *TMBIM6* en *Drosophila melanogaster*

Resumen

TMBIM6 o *Bax inhibitor 1* es un miembro de la familia de proteínas llamadas “transmembrane BAX inhibitor motif containing” o TMBIM expresado en el retículo endoplasmático de células del músculo esquelético, hígado, bazo y riñón, que está involucrado en la regulación del calcio celular, cuya función es dependiente de PH. El cribado de librerías de cDNA humano para descubrir proteínas capaces de suprimir la muerte de levadura inducida por la expresión ectópica de la proteína Bax, permitieron vislumbrar la función citoprotectora de esta proteína.

Ensayos similares se llevaron a cabo para identificar proteínas con la misma función en otras especies, lo que llevó al descubrimiento y caracterización básica del homólogo en *Drosophila melanogaster* (CG7188). Se demostró la homología funcional con la proteína humana, protegiendo a las células de la muerte inducida por la proteína proapoptótica Bax, del shock térmico y del estrés oxidativo. En trabajos posteriores se ha observado como la deficiencia de TMBIM6 lleva a una acumulación de vesículas ácidas y autofagosomas (en larva) y aumenta la supervivencia en condiciones de inanición en *Drosophila*. Pero no existen trabajos que hayan profundizado en la función de dicha proteína en organismo adulto de *Drosophila*. Por todo ello es interesante estudiar el efecto del silenciamiento del gen en un organismo vivo como es *Drosophila melanogaster*.

Se usarán dos cepas “UAS” diferentes que permitirán el silenciamiento (ARN de interferencia) del gen CG7188: [3235] y [37108] obtenidas del Vienna Drosophila Resource Center (VDRC). Estas cepas transgénicas contienen unas secuencias denominadas UAS que dictarán el silenciamiento de nuestro gen de interés, dicho silenciamiento solo se producirá si la secuencia UAS se activa. Por otra parte, utilizaremos dos cepas Gal4, son las que nos van a permitir la expresión dirigida y el silenciamiento en el tejido de interés. Estas cepas contienen la proteína Gal4 de levadura expresada bajo el promotor específico de tejido, se trata de un activador de la transcripción cuyo sitio de unión son las secuencias UAS. En nuestro caso, utilizaremos la actina y la cadena pesada de miosina para dirigir la expresión en todo el organismo o en músculo respectivamente.

Las moscas experimentales serán resultado del cruce entre las moscas “UAS” por las moscas “Gal4”, de esta manera tendremos individuos con la expresión reducida de nuestro gen de interés en todo el organismo y en músculo. Se estudiará la viabilidad, haciendo curvas de supervivencia; la degeneración muscular y anomalías mitocondriales mediante histología.

Palabras clave

Silenciamiento, *TMBIM6*, *Drosophila melanogaster*, RNAi, BI-1, retículo endoplasmático

Alumna: Dña. Sandra Fernández Rodríguez

Valencia, Julio de 2016

Tutor: Prof. D. Máximo Ibo Galindo

Títol

Efectes del silenciament del gen *TMBIM6* en *Drosophila melanogaster*

Resum

TMBIM6 o *Bax inhibitor 1* és un membre de la família de proteïnes anomenades "transmembrane BAX inhibitor motif containing" o TMBIM expressat en el reticle endoplasmàtic de cèl·lules del múscul esquelètic, fetge, melsa i ronyó, que està involucrat en la regulació del calci cel·lular, la funció és dependent de PH. Cribats de llibreries de cDNA humana, per descobrir proteïnes capaces de suprimir la mort de llevat induïda per l'expressió ectòpica de la proteïna Bax, van permetre descobrir la funció citoprotectora d'aquesta proteïna.

Assaigs similars es van dur a terme per identificar proteïnes amb la mateixa funció en altres espècies, el que va portar al descobriment i caracterització de l'homòleg amb *Drosophila melanogaster* (*CG7188*). Després es va demostrar com les seves funcions i la de la proteïna humana són iguals, deixant constància de la homologia funcional, protegint a les cèl·lules de la mort induïda per la proteïna proapoptòtica Bax, del xoc tèrmic i de l'estrès oxidatiu. En treballs posteriors s'ha observat com la deficiència de BI-1 provoca una acumulació de vesícules àcides i autofagosomes i augmenta la supervivència en condicions d'inanició en *Drosophila* (larva). Encara que no hi ha treballs que aprofundeixin en la funció de BI-1 en l'organisme adult de *Drosophila*.

Van a ser utilitzades dues soques diferents "UAS" que permeten silenciar l'expressió del gen *CG7188*: [3235] i [37108] obtingudes a partir del Vienna *Drosophila* Resource Center (VDRC). Aquestes soques transgèniques contenen seqüències UAS trucades que han de dictar el silenciament del nostre gen d'interès, aquest silenciament només es produirà si s'activa la seqüència UAS. A més, l'ús de dues soques de Gal4, són les que ens permetrà el silenciament de l'expressió específica en el teixit d'interès. Aquestes soques contenen la proteïna Gal4 expressada sota el promotor específic de teixit, és un lloc d'unió de l'activador de la transcripció que són les seqüències UAS. En el nostre cas, utilitzem l'actina i la cadena pesada de la miosina per dirigir l'expressió en tot el cos o múscul, respectivament.

Les mosques experimentals són el resultat de l'encreuament entre les mosques "UAS" per les mosques "Gal4", de manera que tindran els individus amb una expressió reduïda del nostre gen d'interès a tot el cos i els músculs. Es faran estudis de viabilitat amb corbes de supervivència e histologia per a vore degeneració muscular i alteracions mitocondrials.

Paraules clau

Silenciament, *TMBIM6*, *Drosophila melanogaster*, RNAi, *BI-1*, reticle endoplasmàtic

Alumna: Donya Sandra Fernández Rodríguez

València, Julio de 2016

Tutor: Prof. D. Máximo Ibo Galindo

Title

Effects of *TMBIM6* gene silencing in *Drosophila melanogaster*

Abstract

TMBIM6 or *Bax inhibitor 1* it's a member of a family protein called "transmembrane BAX inhibitor motif containing" or TMBIM. It is expressed in endoplasmic reticulum of skeletal muscle cells, liver, spleen and kidney, which is involved in the regulation of cell calcium, whose function is dependent on pH. Screenings of human cDNA libraries, to discover proteins capable of suppressing yeast death induced by ectopic expression of Bax protein, have uncovered its cytoprotective function.

Similar assays were done to identify proteins with the same function in other species, which led to meet the homologue in *Drosophila melanogaster* (*CG7188*), then it demonstrated how its functions and the human protein are equal, protecting cells from the death induced by the proapoptotic protein Bax, heat shock and oxidative stress. Also it has been observed that the BI-1 deficiency leads to an accumulation of acid vesicles and autophagosomes and increases survival under starvation conditions in *Drosophila*. But it hasn't been studied BI-1 function in *Drosophila* adults.

It will be used two different "UAS" strains that allow us to silence *CG7188* gene expression: [3235] and [37108] obtained from Drosophila Resource Center Vienna (vDRC). These transgenic strains containing UAS sequences will lead the silencing of our gene of interest, it only will occur if the UAS sequence is activated.

Furthermore, we will use two Gal4 strains that enable to silence our gene of interest in a tissue specific manner. These strains contain the yeast Gal4 protein expressed under the tissue specific promoter. Gal4 is a transcriptional activator whose binding site is the UAS sequence. In our case, we use the actin and myosin heavy chain to direct expression in the whole body or muscle, respectively.

Experimental flies are the result of crossing "UAS" flies with "Gal4" flies, so individuals will have a reduced expression of our gene of interest throughout the body and thorax muscle. We are going to study viability by survival curves and muscle degeneration and mitochondrial disorders by histology.

Key words

Silencing, *TMBIM6*, *Drosophila melanogaster*, RNAi, BI-1, endoplasmic reticulum

Author: Miss Sandra Fernández Rodríguez
Valencia, Julio de 2016

Tutor: Prof. Mr. Máximo Ibo Galindo

Agradecimientos

A Ibo Galindo, por no dudar ni un momento en aceptarme como alumna en prácticas y darme la oportunidad de vivir la ciencia real en el día a día del laboratorio. A Víctor López, que me ha enseñado todo lo que sé de las moscas, gracias por guiarme todos los días, por la paciencia cuando me has tenido que contestar la misma pregunta varias veces y por estar ahí siempre para ayudar. A Andrea Tapia, por ayudarme siempre que lo necesito, por aconsejarme sobre el futuro y por sus “no pasa nada” tan reconfortantes, pero sobre todo por la compañía y las conversaciones durante las mañanas, se notaba mucho cuando no estabas.

A Cristina, Lydia, Juliette, Bea, Paola y Olaya porque juntas hemos vivido esta aventura de cuatro años y entre todas nos hemos apoyado, superado las dificultades, los agobios y el cansancio pero también nos hemos reído mucho. En especial a Paola y Olaya por ser mi pilar, por haber compartido muchas horas y comidas en las que nos hemos podido a conocer a fondo, porque sois las únicas con las que puedo discutir y porque hemos perfeccionado nuestra técnica en PowerPoints. Y como no a todos los que este último curso habéis llegado y me habéis hecho disfrutar del final de la etapa universitaria y sorprenderme de lo bien que lo podemos pasar juntos, lástima que fuera el último año.

A mis padres y mi hermano, que han sufrido casi como yo el estrés de la carrera. Gracias por la paciencia, por aguantar mi mal humor, por la comprensión, por animarme cuando no podía más y por estar orgullosos de mí. También porque me habéis educado y gracias a vosotros y vuestro cariño soy quien soy hoy en día. A Rafa, por su constante interés desde el día en el que le hablé de las moscas y por cuidarme, preocuparse por mí y darme su amor cada día, tú también tienes el mío.

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1 TMBIM6..... | 1 |
| 1.2 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo animal | 2 |
| 1.3 TMBIM6 en <i>D. melanogaster</i> | 5 |
| 2. Objetivos | 7 |
| 3. Material y métodos | 8 |
| 3.1. Cepas del stock y mantenimiento | 8 |
| 3.2. Sistema UAS-Gal4 | 8 |
| 3.3. Supervivencia y viabilidad | 10 |
| 3.4. Geotaxis negativa: <i>climbing</i> | 10 |
| 3.5. Alteraciones metabólicas: Peso | 10 |
| 3.6. Histología..... | 10 |
| 3.7. Metabolómica | 11 |
| 3.8. Gráficas y métodos estadísticos empleados | 12 |
| 4.Resultados y discusión | 13 |
| 4.1 Viabilidad y supervivencia | 13 |
| 4.2 Geotaxis negativa: <i>climbing</i> | 16 |
| 4.3 Peso | 16 |
| 4.4 Interferencia muscular | 18 |
| 4.5 Histología..... | 21 |
| 4.6 Perspectivas futuras | 23 |
| 5. Conclusiones | 24 |
| 6. Bibliografía | 25 |
| ANEXO I | 27 |
| ANEXO II | 28 |
| Cruces Actina..... | 28 |
| Cruces Miosina | 29 |

Índice de tablas y figuras

| | |
|---|----|
| <i>Figura 1. Modelos de homología de hTMBIM6 en su conformación cerrada (A) y abierta (B).....</i> | 1 |
| Figura 2. Estadios de vida de la mosca de la fruta. Extraída de la web http://flymove.uni-muenster.de | 3 |
| <i>Figura 3. Cruce de líneas para alterar la expresión génica de un gen de interés utilizando el sistema UAS-Gal4. (Elliot and Brand, 2008).....</i> | 4 |
| Figura 4. Comparación del porcentaje de colonias formadas para la proteína BI-1 WT o mutante en distintas especies. | 5 |
| Figura 5. Supervivencia bajo condiciones de inanición..... | 6 |
| Figura 6. Cruce para expresar el RNAi CG7188 [37108] ubicuamente | 9 |
| <i>Figura 7. Cruce para expresar el RNAi CG7188 [3235] en músculo con el promotor Mhc.....</i> | 9 |
| Figura 8. Proporción de larvas observadas en la descendencia con interferencia ubicua. La línea roja marca el 50% del porcentaje esperado | 13 |
| Figura 9. Porcentaje de pupas eclosionadas con interferencia ubicua de TMBIM6..... | 14 |
| Figura 10. Ratios de viabilidad de las moscas nacidas con interferencia de TMBIM6 ubicua tras 48 horas..... | 14 |
| Figura 11. Análisis de supervivencia de las moscas con interferencia de TMBIM6 ubicua | 15 |
| Figura 12. Resultados de geotaxis negativa a los 10, 20 y 30 días en moscas experimentales con Act-Gal4..... | 16 |
| Figura 13. Peso individual de las moscas con interferencia de TMBIM6 ubicua tras 4 días de vida expresado en mg. | 17 |
| Figura 14. Peso por mosca con interferencia de TMBIM6 ubicua tras 10 días de vida, expresado en mg..... | 18 |
| Figura 15. Ratios de eclosión de pupas con interferencia muscular..... | 19 |
| Figura 16. Porcentaje de eclosión en moscas con el promotor <i>twi-Mef</i> | 19 |
| Figura 17. Resultados de geotaxis negativa a los 10, 20 y 30 días en moscas experimentales con Mhc-Gal4..... | 20 |
| Figura 18. Muestras histológicas del tórax de los tres genotipos expresados con Act-Gal4 vistas por microscopía electrónica a diferentes aumentos. | 21 |
| Figura 19. Cortes histológicos del tórax de <i>D. melanogaster</i> de los tres genotipos expresados con Act-Gal4 vistos con el microscopio vertical a zoom 1x y 40x. | 22 |

Abreviaturas

TMBIM = Transmembrane Bax Inhibitor Motif

BI-1 = Bax Inhibitor – 1

RE = Retículo endoplasmático

Act = Actina

Mhc = Cadena pesada de miosina

twi = Twist

Mef = Factor activador de miocitos

RNAi = RNA de interferencia

KO = Knockout

1. Introducción

1.1 TMBIM6

TMBIM6, también conocido como Bax Inhibitor-1 (BI-1), es un canal de calcio dependiente de pH evolutivamente conservado que media la liberación de calcio al citosol desde el retículo endoplasmático (RE). TMBIM6 se encuentra expresado en la membrana del RE de células del músculo esquelético, bazo, hígado y riñón (Lisak et al., 2015). Es el miembro fundador de la familia proteica “transmembrane BAX inhibitor motif containing” (TMBIM) que en humanos consta de seis proteínas todas ellas con siete hélices transmembrana y un dominio N-terminal donde se encuentran la mayoría de variaciones entre las proteínas TMBIM (Chang et al., 2014). La salida de Ca^{2+} desde el RE mediada por TMBIM6 funciona a pH neutro, se detiene completamente a pH 6 y a pH 8 el canal se cierra. En la conformación cerrada a pH neutro mostrada en la Figura 1A el Asp209 localizado en la hélice 7 de la proteína humana, parece interactuar con la His78 de la hélice 2 bloqueando así el poro con las cadenas laterales de los residuos Leu71, Thr74 y Met181. La disminución del pH supone que el Asp209 pierde su interacción con His78 afectando a los valores del pKa del residuo diaspártico (Asp188-Asp213), que actúa como sensor de pH, haciéndolo muy sensible a los cambios de pH. A pH 7 ha de haber suficiente electronegatividad en el diaspártico desprotonado y el Asp209 para permitir con la conformación abierta mostrada en la Figura 1B el flujo de Ca^{2+} a través del poro. A pH 6 las cadenas laterales de Asp188 y Asp213 pueden protonarse debido a los valores elevados de pKa, esta pérdida de electronegatividad junto con la formación de un puente de hidrógeno entre el Asp209 y el Asp188 previene la salida de Ca^{2+} a través del poro abierto de TMBIM6. (Bultynck et al., 2014).

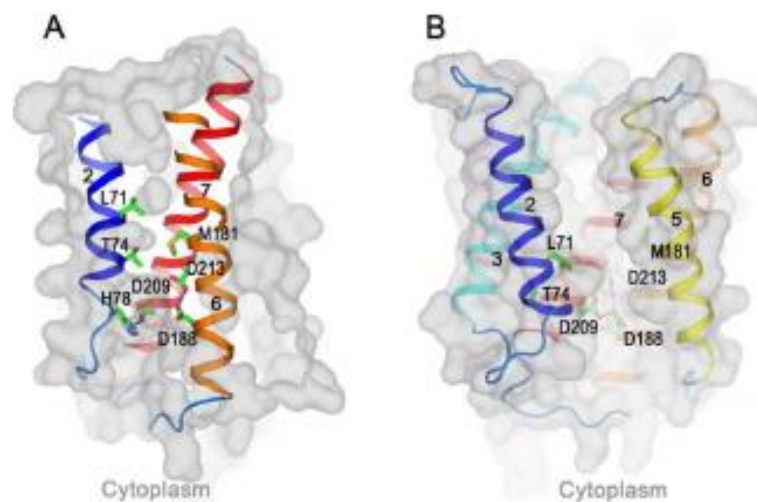


Figura 1. Modelos de homología de hTMBIM6 en su conformación cerrada (A) y abierta (B)

Su gen fue el primer gen identificado como regulador de la muerte celular tanto en vegetales como en animales (Chae et al., 2003). Tiene una importante función antiapoptótica ya que la homeostasis de calcio es citoprotectora, pues se ha observado como una sobrecarga de calcio en el RE promueve la muerte celular mientras que una bajada del contenido en calcio del RE mediada por proteínas antiapoptóticas, como TMBIM6, provoca señales de supervivencia (Chang et al., 2014). De hecho, su expresión está sobrerregulada en diferentes tumores como

glioma, linfoma anaplásico de células grandes, próstata, carcinoma de pecho o adenocarcinoma pulmonar (Henke et al., 2011).

Se descubrió su función citoprotectora mediante cribados de librerías de cDNA humano para descubrir proteínas capaces de suprimir la muerte en levadura inducida por la expresión ectópica de la proteína Bax, una proteína proapoptótica propia de mamíferos perteneciente a la familia de proteínas Bcl-2 de las proteínas reguladoras de la apoptosis. Partiendo de que la expresión ectópica de la proteína de mamífero Bax en levadura supone la muerte celular se hicieron ensayos en librerías de cDNA humano que permitieron identificar la proteína humana TMBIM6 como una proteína citoprotectora que rescata la levadura de la muerte provocada por Bax sin interferir en los niveles de Bax intracelular. Por otro lado, parece no estar asociado con ella, lo que implica que no la inhibe directamente, sin embargo, la interacción física no es necesariamente requerida para el antagonismo entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas de la familia de proteínas Bcl-2. Además, TMBIM6 se encuentra en el RE mientras que Bax lo hace en la mitocondria, todos estos hechos apoyan la hipótesis de que TMBIM6 actúa aguas debajo de Bax (Xu and Reed, 1998).

Una compleja relación opera entre los mecanismos de señalización de la apoptosis y la autofagia en los que interviene la familia proteica Bcl-2 (Hetz and Glimcher, 2008), la desregulación de estos procesos supone diversas condiciones patológicas como cáncer, neurodegeneración y otras enfermedades (Castillo et al., 2011). Se ha demostrado como TMBIM6 modula negativamente la cinética y amplitud de los flujos autofágicos en células bajo condiciones de inanición siendo un regulador negativo de la autofagia ya que en muchos casos este proceso tiene un efecto adaptativo y de prosupervivencia que se ve bloqueado por proteínas antiapoptóticas. (Castillo et al., 2011). TMBIM6 cuenta con otras funciones ya que es además un regulador negativo del sensor de estrés del RE (IRE1 α), un regulador del citocromo P450 2E1, interviene en la metástasis de células cancerosas alterando el metabolismo de glucosa y activando la bomba de sodio-potasio e incrementa la adhesión celular regulando la polimerización de actina (Henke et al., 2011).

1.2 *Drosophila melanogaster* como modelo animal

El uso de *D. melanogaster* en la biología moderna se remonta 100 años atrás. Se ha utilizado como modelo para estudios genéticos de eucariotas que han proporcionado las bases de muchos aspectos fundamentales de la genética eucariota incluyendo las bases cromosómicas de la determinación sexual, la ligación genética y comportamiento y mecanismos cromosómicos (Kornberg and Krasnow, 2000) y además se trata del primer organismo complejo en tener el genoma secuenciado (Adams et al., 2000).

Hay muchas características que hacen de la mosca de la fruta un modelo de estudio atractivo: su genoma ha sido completamente secuenciado y anotado y codifica para más de 14000 genes en cuatro cromosomas; se estima que el 75% de los genes relacionados con enfermedades en humanos tienen ortólogos funcionales en mosca (Reiter et al., 2001), (Lloyd and Taylor, 2010): a pesar de que a nivel nucleotídico la homología entre proteínas mamíferas y de mosca es del 40%, a nivel de dominios funcionales conservados alcanza el 80 y 90%. Por otro lado, la mosca de la fruta ofrece muchas facilidades a nivel de laboratorio y permite reducir costes ya que ocupa poco espacio, su mantenimiento es sencillo y tiene un ciclo de vida rápido,

una pareja fértil puede producir cientos de progenitores genéticamente idénticos en tan solo 10 o 12 días a 25°C, a diferencia de los roedores que necesitan 3 o 4 meses para conseguir una descendencia de pocos individuos, y su uso en el laboratorio está más aceptado socialmente que el de otros animales. Los distintos estadios de vida de la mosca se utilizan como modelos para diferentes estudios, siendo estos embrión, larva, pupa y mosca adulta representados en la figura 2 (Pandey and Nichols, 2011).

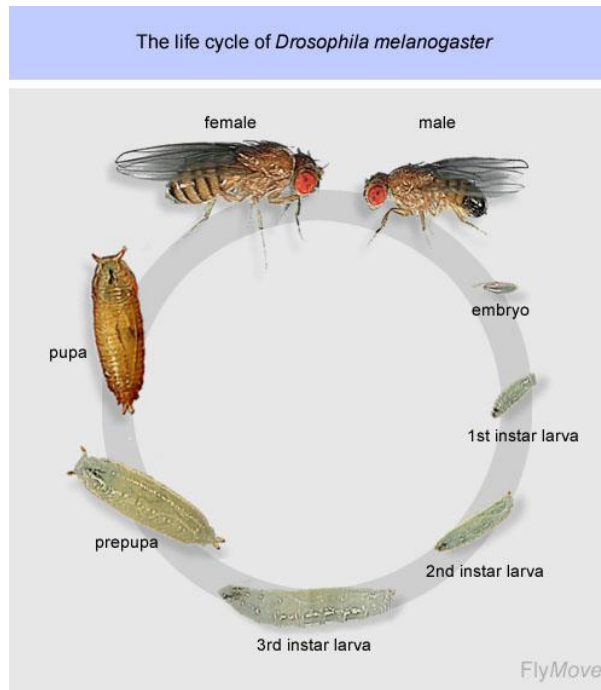


Figura 2. Estadios de vida de la mosca de la fruta. Extraída de la web <http://flymove.uni-muenster.de>

A pesar de que hay muchas diferencias entre moscas y humanos, la mosca adulta es un organismo complejo con estructuras que tienen funciones equivalentes a órganos de mamíferos como el corazón, pulmón, estómago, tracto reproductivo, riñón y cerebro. El grado de conservación en la biología y fisiología posiciona a *D. melanogaster* como una buena herramienta de estudio (Pandey and Nichols, 2011). Por todo ello están altamente desarrolladas numerosas estrategias para su manipulación como herramienta genética. Los cribados genéticos en *Drosophila* se empezaron a llevar a cabo cuando aparecieron mejores formas de generar mutaciones, el modo más eficiente era alimentar a las moscas con etilmetanosulfonato (EMS), un agente que induce mutaciones puntuales con gran frecuencia, lo que permite la disrupción génica causando mutaciones sin sentido. El inconveniente de este método es que había mosaicismos en la descendencia y esta no heredaba las mutaciones generadas a no ser que se hayan producido en los gametos de los progenitores. Para solucionarlo, los screenings de la descendencia se realizaban usando rayos X como mutágeno ya que produce en su mayoría mutaciones cromosómicas detectables a nivel citológico en larva (Johnston, 2002).

Posteriormente, han sido aprovechados los elementos móviles del genoma de la mosca de la fruta. Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) ha desarrollado numerosas estrategias que utilizan un elemento P transponible para llevar a cabo mutagénesis y cuenta con una colección que contiene inserciones en más del 25% de los genes esenciales. Desde el descubrimiento de los elementos P transponibles uno de sus usos más importante ha sido la transformación de la línea germinal, aprovechando que estos elementos solo se transponen en

las células germinales y que un elemento P que transporta un gen exógeno puede ser movilizado en trans usando transposasas. (Majumdar and Rio, 2015). *D. melanogaster* alberga esta familia de transposones que contiene la secuencia de la transposasa y cuenta con repeticiones invertidas en sus extremos como sitio de corte. A pesar de que la inserción de elementos P no logra la interrupción génica sí que permite generar mutaciones de pérdida de función a causa de la excisión imprecisa del elemento P y ha sido de provecho tanto para experimentos de mutagénesis como para generar animales transgénicos. (Hummel and Klämbt, 2008).

Otra estrategia desarrollada se lleva a cabo con el activador transcripcional de levadura Gal4 que permite regular la expresión génica en *Drosophila* insertando la secuencia activadora UAS, aguas arriba del gen de interés. El gen Gal4 precedido por un promotor específico de tejido, se inserta de forma aleatoria en el genoma de *D. melanogaster*. El cruce de la línea apropiada Gal4 con líneas que llevan el transgén que contiene la secuencia UAS y el gen de interés permiten manipular la expresión de dicho gen en la descendencia como se muestra en la figura 3 ya que en los tejidos donde se exprese Gal4 estará la secuencia UAS y se unirá a ella activando la transcripción de la secuencia diana (Johnston, 2002).

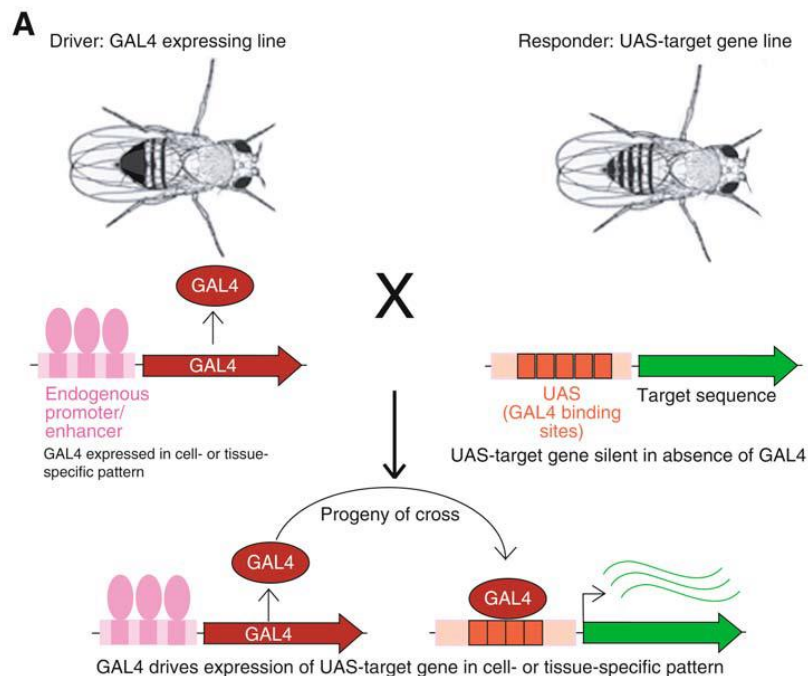


Figura 3. Cruce de líneas para alterar la expresión génica de un gen de interés utilizando el sistema UAS-Gal4. (Elliot and Brand, 2008)

Este sistema es particularmente utilizado para sobreexpresar proteínas, expresar proteínas mutantes de otras especies o para generar pérdida de función utilizando RNA de interferencia (RNAi). Se trata de una secuencia complementaria al mRNA del gen de interés que, bajo el promotor UAS, es transcrita en la progenie del cruce anterior en los tejidos donde se exprese la proteína Gal4. El RNAi se une al mRNA del gen diana, generando un RNA de doble cadena que no es traducido por los ribosomas y por tanto la expresión del gen se ve disminuida ya sea en un tejido específico o de forma ubicua utilizando un promotor que se active en todo el organismo como el de actina.

1.3 TMBIM6 en *D. melanogaster*

Los mismos ensayos realizados para conocer la función citoprotectora de TMBIM6 o BI-1 se llevaron a cabo con proteínas de otras especies para descubrir proteínas homologas, entre ellas *Drosophila melanogaster*. De medio millón de levaduras transformadas, cuatro rescataron la levadura sin interferir en la expresión de Bax, los cDNA que contenían presentaban la secuencia completa del homólogo del gen TMBIM6 en *Drosophila melanogaster*, el gen CG7188, siendo CG el nombre de serie para genes en *Drosophila*.

Se comparó la función de los homólogos en diferentes especies probando su habilidad de rescate de la levadura contra la letalidad provocada por Bax mediante ensayos de formación de colonias. Se observó que tanto la proteína de mosca y la humana rescataban el fenotipo. Para comparar la función y estructura de los homólogos se provocaron dos mutaciones en el gen de TMBIM6 tanto humano como de *Drosophila*, una delección de los últimos nueve aminoácidos (BI-1 Δ), y otra en la que estos aminoácidos se cambian por alaninas (BI-1 C9A). Solo las levaduras que contenían el plásmido con la secuencia WT fueron capaces de rescatar el fenotipo, mientras que en el caso de las mutantes disminuyó notablemente el número de colonias, datos representados en la Figura 4. Con todo ello se concluyó que los homólogos tienen estructura y función muy cercanas.

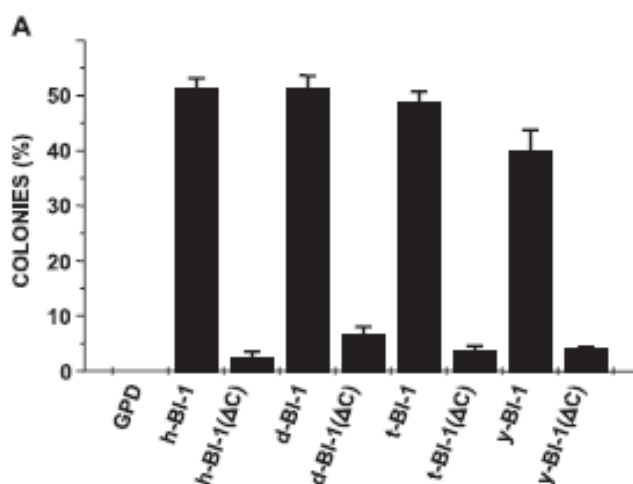


Figura 4. Comparación del porcentaje de colonias formadas para la proteína BI-1 WT o mutante en distintas especies.

Se estudió también la función citoprotectora de los homólogos frente a otros tipos de estrés como el shock térmico y el estrés oxidativo. Las células que incorporaban TMBIM6 de *Drosophila* o humano eran notablemente más resistentes a la muerte inducida por H₂O₂ y dos veces más resistentes al tratamiento térmico (50°C, 30 min) que las células control. Así se extiende el efecto protector de esta proteína no solo a la muerte inducida por la expresión de Bax sino también al estrés térmico y oxidativo (Chae et al., 2003).

La existencia del homólogo en *Drosophila melanogaster* permitió usar este organismo como modelo para estudiar TMBIM6 y los diferentes procesos en los que participa. Para validar el posible rol de TMBIM6 en la autofagia in vivo se llevaron a cabo ensayos de pérdida y ganancia de función en *D. melanogaster*. Por un lado, se dirigió el silenciamiento de la expresión de la proteína endógena dBI-1 con un RNAi específico que se expresó ubicuamente produciendo un eficiente knockdown de dBI-1 que supuso un aumento masivo de los niveles basales de LC3-II,

un marcador de autofagia, en larva bajo condiciones de inanición. La visualización de vacuolas positivas para LC3-GFP en larvas KO indicó un aumento en el número de autofagosomas y lisosomas. Por otro lado, la degradación de la glándula salivar durante el desarrollo de la pupa es un modelo de autofagia in vivo. Para conocer el impacto de la expresión de dBI-1 en este proceso fisiológico se evaluó el nivel de LC3-GFP tanto en moscas control como dBI-1 KO así como la estructura del citoesqueleto de actina y la degradación tisular durante el desarrollo de las glándulas salivares. Se observó una marcada acumulación de LC3-GFP en las pupas dBI-1 KO 6 horas tras la formación de las pupas con un 75% de las células mostrando acumulaciones frente a un 5% de células control. Además se observó un aumento considerable de la esperanza de vida bajo condiciones de inanición en moscas KO, datos mostrados en la figura 5. En cambio, el tratamiento con tunicamicina, que aumenta el estrés del RE, supuso una disminución de la supervivencia en estos animales en comparación con las cepas control. Todos estos datos contribuyeron a la demostración del rol de TMBIM6 esencial en el control de la autofagia in vivo (Castillo et al., 2011).

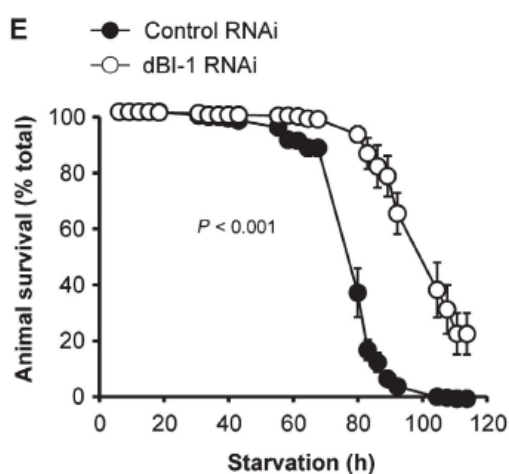


Figura 5. Supervivencia bajo condiciones de inanición

La autofagia y la apoptosis son procesos interconectados esenciales para mantener la homeostasia durante el desarrollo y en tejido adulto. La desregulación de estos procesos supone diversas condiciones patológicas como cáncer, neurodegeneración y otras enfermedades. Las proteínas reguladoras de la apoptosis son parte de distintos complejos proteicos con componentes de la maquinaria de autofagia en células de mamífero. Concretamente, la proteína antiapoptótica TMBIM6 es un regulador negativo de la autofagia, proceso que, en muchos casos, tiene un efecto adaptativo y de prosupervivencia que se ve bloqueado por proteínas antiapoptóticas. Este proceso es un camino emergente y relevante para la fisiología de diferentes órganos ya que las alteraciones en este proceso contribuyen al desarrollo de numerosas enfermedades (Castillo et al., 2011). Dada la importancia de TMBIM6 en numerosos procesos de la fisiología celular y su papel en enfermedades tan relevantes como es el cáncer o enfermedades neurológicas queda pendiente profundizar el estudio de esta proteína. Puesto que *Drosophila melanogaster* es una buena herramienta para el estudio de genes humanos y enfermedades neuromusculares, como se ha demostrado con el estudio de la proteína GDAP1 involucrada en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (Del Amo et al., 2015), se propone el estudio de la deficiencia de TMBIM6 en este organismo modelo.

2. Objetivos

En este trabajo se va a realizar la interferencia de *TMBIM6* o *BI-1* en *D. melanogaster* de forma ubicua mediante RNAi utilizando el sistema UAS-Gal4 y promotores específicos. Con las moscas experimentales se analizará:

1. La capacidad de interferencia de las líneas interferentes CG7188 [3235] y CG7188 [37108].
2. Si la interferencia afecta al desarrollo del organismo y en ese caso que defectos provoca en la supervivencia y motilidad de la mosca.
3. Si se han observado problemas determinar a qué órgano o tejido afectan y que problemas causan en él.

3. Material y métodos

3.1. Cepas del stock y mantenimiento

En la tabla 1 se adjuntan el origen, nombre y genotipo completo de las moscas utilizadas durante todo el trabajo. El signo de puntuación “;” del genotipo, separa los cromosomas.

Tabla 1. Cepas empleadas en los experimentos de este trabajo. VDRC corresponde a las siglas de Vienna Drosophila Resource Center. BDSC corresponde a las siglas de Bloomington Drosophila Stock Center.

| ORIGEN | NOMBRE | GENOTIPO |
|----------------------------|--------------------|---|
| BDSC (B#3605) | w ¹¹¹⁸ | w ¹¹¹⁸ |
| VDRC | UAS-CG7188[37108] | w ¹¹¹⁸ ; P{GD1660}v37108 |
| VDRC | UAS-CG7188[3235] | w ¹¹¹⁸ ; P{GD1660}v3235/CyO |
| BDSC (B#3954) | Act-Gal4 | +/+; Act-Gal4/TM6B |
| Generada en el laboratorio | Mhc-Gal4; UAS-Dcr | Mhc-Gal4/Mhc-Gal4; UAS-Dcr/ UAS- Dcr |
| Generada en el laboratorio | twi- Gal4 Mef-Gal4 | w; twi-Gal4; ap-NLS-DsRed, Mef-Gal4 /TM6B |

En algunos casos las inserciones Gal4 en homocigosis no son viables, por ello se mantienen sobre cromosomas equilibrados para que estén en heterocigosis. Los equilibradores portan al menos una mutación dominante con efecto fenotípico de forma que en la descendencia se puede distinguir el individuo que hereda el cromosoma equilibrado del que hereda el cromosoma con la inserción de interés. En este caso se ha utilizado la cepa de actina con un equilibrador TM6B en el tercer cromosoma que se identifica por un fenotipo Hu: Humeral (quetas humerales extra) y Tb: Tubby (larvas y pupas más cortas). Las moscas con la inserción RNAi CG7188 [3235] están anotadas con un genotipo que incluye el cromosoma equilibrado CyO el cual tiene un fenotipo Cu: Curly (alas dobladas hacia arriba), pero hay que destacar que las moscas utilizadas han perdido el equilibrador y son homocigóticas para el inserto UAS. Las moscas con el inserto twi-Gal4 Mef-Gal4 tienen el cromosoma TM6B pero han perdido el inserto Tubby, por lo que no se pueden identificar por tener las pupas más pequeñas.

Las cepas son almacenadas en bandejas a 25°C en tubos con medio de cultivo e identificados con etiquetas.

3.2. Sistema UAS-Gal4

Aprovechando el sistema UAS-Gal4 se va a expresar el RNAi del gen *TMBIM6* en todo el organismo y en el músculo de *D. melanogaster*. Para la expresión ubicua se van a cruzar moscas hembra que contienen una inserción del promotor de actina (Act) seguido de la secuencia Gal4

con moscas machos que contienen la secuencia UAS seguido de la secuencia del RNAi. La descendencia incorporará las dos inserciones y por tanto expresará el RNAi en los tejidos donde el promotor que precede al Gal4 esté activado. Los cruces se utilizarán para las dos secuencias de RNAi, CG7188 [37108] y CG7188 [3235] y para los controles con w^{1118} . Un ejemplo de cruce y descendencia se muestran en la figura 6.

$$\begin{array}{l}
 \text{CG7188 [37108]:} \quad \text{♀ Act-gal4} \quad \times \quad \text{♂ CG7188[37108]} \\
 \\
 \frac{+}{+} ; \frac{\text{Act-gal4}}{\text{TM6B}} \quad \times \quad \frac{\text{RNAi - CG7188[37108]}}{\text{RNAi - CG7188[37108]}} ; \frac{+}{+} \\
 \\
 \text{F1: } \frac{\text{RNAi - CG7188[37108]}}{+} ; \frac{\text{TM6B}}{+} \quad / \quad \boxed{\frac{\text{RNAi - CG7188[37108]}}{+} ; \frac{\text{Act-gal4}}{+}}
 \end{array}$$

Figura 6. Cruce para expresar el RNAi CG7188 [37108] ubicuamente

En el caso del músculo se utilizarán hembras que tienen el promotor de la cadena pesada de la miosina (Mhc). Los cruces se utilizarán para las dos secuencias de RNAi, CG7188 [37108] y CG7188 [3235] y para los controles con w^{1118} . En las figura 7 y 8 se adjuntan un ejemplo de cada cruce con su descendencia; para ver los cruces completos véase el anexo II.

$$\begin{array}{l}
 \text{CG7188 [3235]:} \quad \text{♀ Mhc-gal4} \quad \times \quad \text{♂ CG7188 [3235]} \\
 \\
 \frac{\text{Mhc-gal4}}{\text{Mhc-gal4}} ; \frac{\text{UAS-dcr2}}{\text{UAS-dcr2}} \quad \times \quad \frac{\text{RNAi - CG7188[3235]}}{\text{RNAi - CG7188[3235]}} ; \frac{+}{+} \\
 \\
 \text{F1: } \boxed{\frac{\text{Mhc-gal4}}{\text{RNAi - CG7188[3235]}} ; \frac{\text{UAS-dcr2}}{+}}
 \end{array}$$

Figura 7. Cruce para expresar el RNAi CG7188 [3235] en músculo con el promotor Mhc

También se utilizan hembras que tienen los promotores del factor activador de miocitos (mef) y twist (twi) seguidos cada uno de una secuencia Gal4, a partir de ahora estarán mencionadas como twi-Mef que también incorpora un cromosoma balanceador TM6B. Los cruces se utilizarán para las dos secuencias de RNAi, CG7188 [37108] y CG7188 [3235] y para los controles con w^{1118} . El esquema del cruce es igual al de actina.

3.3. Supervivencia y viabilidad

Para estudiar la supervivencia se recogieron 600 pupas de los cruces de cada genotipo, siendo estos los dos RNAi y el control, con *Act-Gal4* pero sin RNAi. Se comparó el número de pupas experimentales con el número de pupas que tenían el equilibrador para comprobar tanto la viabilidad en estado de larva, como las proporciones esperadas de cada genotipo en la descendencia. Además se comparó el número de pupas eclosionadas para evaluar la capacidad de eclosión y por último se comparó el número de moscas que nacían viables.

Para controlar la supervivencia de las moscas viables se recogieron un mínimo de 130 moscas viables de cada genotipo expresado con *Act-Gal4* y se mantuvieron en tubos, cambiando la comida cada dos días y anotando el número de moscas muertas cada día.

3.4. Geotaxis negativa: *climbing*

El experimento de *climbing* se basa en la tendencia natural de las moscas a moverse en contra de la gravedad cuando son agitadas.

Para llevarlo a cabo se anestesiaron 10 moscas de cada genotipo y se pasaron a sus respectivos tubos sin comida y marcados con una línea por encima de la mitad de su altura. Tras 15 minutos para que despertaran y se habituaran se ponen los tubos delante de un panel blanco y una cámara de video delante. Cuando la cámara comienza a grabar se golpean los tubos hacia abajo para que las moscas caigan, una vez transcurridos 10 segundos desde que las moscas están abajo se deja de grabar. Se repite el proceso cinco veces dejando un tiempo de descanso de 5 minutos entre vídeos. Después se analizan los videos para ver el porcentaje de moscas de cada genotipo que han sido capaces de superar la línea. El ensayo de *climbing* se hace a los 10, 20 y 30 días de vida para cada genotipo de expresión tanto en músculo como ubicua y se repite tres veces cada uno.

3.5. Alteraciones metabólicas: Peso

Para pesar las moscas se durmieron con CO₂ 10 moscas de 4 días de edad de cada genotipo expresado bajo el promotor de actina. Se pasan a un eppendorf tarado en la balanza analítica AB204-S (Mettler Toledo Intl Inc, Suiza) y se pesan. Se repitió el experimento con moscas de 10 días. Cada proceso se hizo tres veces.

3.6. Histología

Para realizar el estudio histológico se utilizaron moscas con expresión de los genotipos bajo el promotor de actina, por lo que se diseccionó la mosca y se escogió el tórax para analizarlo. En la preparación de las muestras histológicas se siguió el siguiente protocolo en campana de extracción:

1. Meter en un eppendorf 6 tórax diseccionados de cada uno de los tres genotipos.

2. Preparar la disolución 1 con 1 mL de tampón fosfato (PB), 0,5 mL de para formaldehído PFA y 0,5 mL de glutaraldehído (GAD) y añadir 500 μ L en cada tubo. Meter en hielo y dejar toda la noche.
3. Preparar la disolución 2 con 2 ml de PB y 2 ml de osmio, una tinción para microscopía electrónica y añadir 500 μ L en cada tubo. Dejar 20 minutos en hielo.
4. Eliminar con una pipeta las disoluciones del eppendorf y añadir 500 μ L de la disolución 2 en cada tubo. Dejar dos horas en hielo.
5. Eliminar con una pipeta la disolución y deshidratar con etanol a distintas concentraciones (30%, 50%, 70% y 90%) en hielo. Para ello se añaden 500 μ L de etanol al 30% en cada tubo y se deja reposar 5 minutos. Después se elimina y se añade el siguiente en concentraciones crecientes y así sucesivamente. Sacar del hielo y realizar dos veces un lavado de 5 minutos con etanol puro.
6. Añadir 500 μ L en cada tubo de óxido de propileno. Este paso se repite dos veces.
7. Preparar la disolución 3 con 2 ml de óxido de propileno, utilizado como disolvente, y 2 ml de resina y añadir 500 μ L en cada tubo y dejar toda la noche.
8. Eliminar la disolución y añadir 500 μ L de resina. Reposar durante 5 horas.
9. Verter resina en una placa de pocillos y añadir en cada uno un tórax orientando la mitad longitudinalmente y el resto transversalmente para cada genotipo. Dejar a 70°C toda la noche.
10. Cortar con el micrótopo.

Se hacen cortes ultrafinos de las muestras para observarlas con el microscopio electrónico FEI Tecnai Spirit G2 y cortes semifinos para analizarlas con el microscopio vertical Leica SP2. En ambos casos se tomaron imágenes de las muestras.

3.7. Metabolómica

Para llevar a cabo la metabolómica por resonancia magnética nuclear (RMN) el primer paso es la extracción del material, para ello se sigue el protocolo:

1. Se ponen tanto los solventes (metanol, cloroformo y agua miliQ) como las muestras en hielo.
2. Preenfriar la centrífuga a 4°C.
3. Transferir 15 moscas a un eppendorf de 1-5 mL previamente pesado, pesar y anotar el peso de las moscas.
4. Añadir 240 μ L de metanol y 48 μ L de agua.
5. Homogeneizar con un mortero o realizar dos ciclos de congelación-descongelación.
6. Pasar la muestra por el vórtex. Añadir 120 μ L de cloroformo y 120 μ L de agua miliQ y volver a vortear durante 10 segundos.
7. Centrifugar a 10000g durante 15 minutos a 4°C para obtener una fase superior con metanol y metabolitos polares y otra inferior con cloroformo y metabolitos lipofílicos.
8. Separar las dos fases en dos viales eppendorf distintos con el tapón agujereado para liofilizar.
9. Liofilizar la fase de metanol y realizar "speed vac" y liofilizar la fase del cloroformo.
10. Congelar las muestras a -80°C.

3.8. Gráficas y métodos estadísticos empleados

Para representar gráficamente los resultados se ha utilizado el programa informático GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, Inc, California). El análisis estadístico realizado fue el Test T de Student utilizando como parámetros distribución de 2 colas, p-value 0,05 y varianza igual de las muestras con el programa Microsoft Excel 2013.

4. Resultados y discusión

4.1 Viabilidad y supervivencia

En primer lugar se quiere comprobar el papel que tiene TMBIM6 en el desarrollo del organismo, para ello se va a analizar la viabilidad de las moscas en las que se interfiere esta proteína de forma ubicua. Se utilizan un control y dos cepas con la secuencia RNAi, se trata de la misma construcción contra una región del gen pero insertadas en loci distintos y por tanto, una puede ser más fuerte que la otra.

En el cruce de cada genotipo y la línea *Act-Gal4* se espera que la mitad de la descendencia herede el cromosoma equilibrador y la otra mitad el promotor de actina seguido de la secuencia Gal4 (véase Anexo II), por tanto se espera ver un 50% de pupas TM6B que presentarán el fenotipo Tubby (pupas pequeñas) y un 50% de moscas no TM6B, que serán las moscas experimentales, en cada caso. Los datos se reflejan en la figura 8 donde se marca en rojo el porcentaje esperado: 50% de pupas en todos los casos.

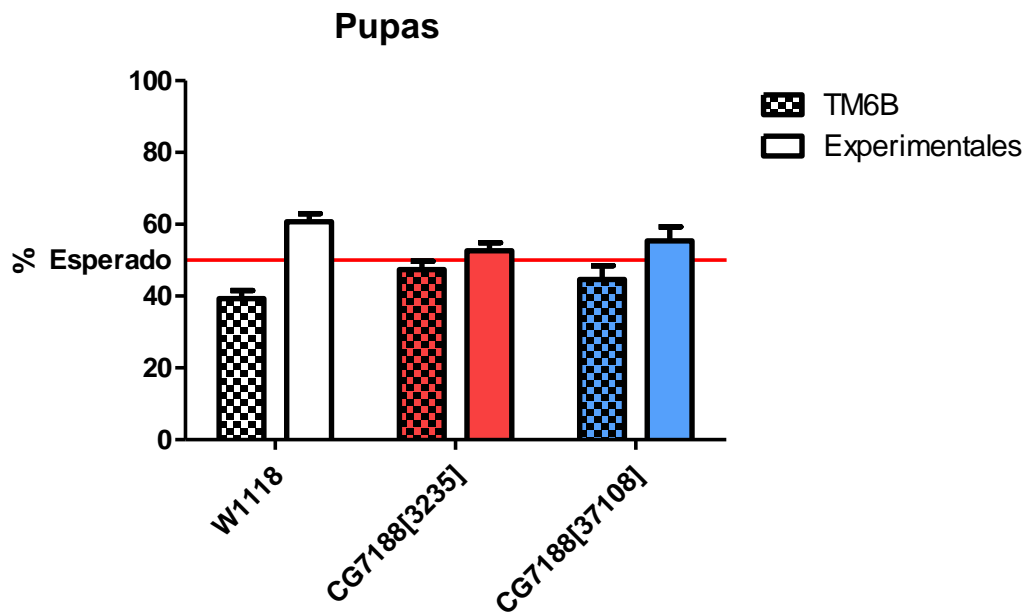


Figura 8. Proporción de larvas observadas en la descendencia con interferencia ubicua. La línea roja marca el 50% del porcentaje esperado

En todos los casos encontramos proporciones de pupas en un rango cercano al 50% excepto el control que hay un 10% más de pupas experimentales. Esto indica que la interferencia no afecta a la viabilidad de estadios previos a la pupa, ya que si lo hiciese habría una menor proporción de pupas experimentales que TM6B porque no llegarían a desarrollarse. De aquí se deduce que TMBIM6 no es imprescindible en el desarrollo de *D. melanogaster* al menos hasta este punto.

Para conocer si su papel es fundamental en los siguientes estadios se va a comprobar la eclosión pupal. De las pupas formadas, se espera que todas eclosionen, los resultados se muestran en la figura 9.

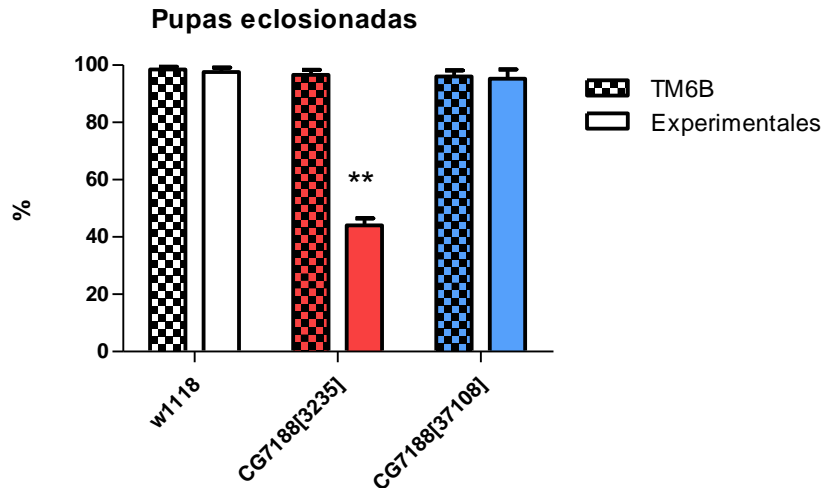


Figura 9. Porcentaje de pupas eclosionadas con interferencia ubicua de TMBIM6

La interferencia con RNAi CG7188 [37108] no muestra problemas en la eclosión, que es de un 95%. En cambio, la interferencia de TMBIM6 mediada por la expresión del RNAi CG7188 [3235] muestra una reducción de la eclosión a un 44% que es estadísticamente significativa en comparación con el control (p -value 5,450E-05). Como se ha explicado, TMBIM6 es una proteína expresada principalmente en el músculo esquelético y además se ha demostrado que los problemas de eclosión en *D. melanogaster* están relacionados con problemas musculares (Hatfield et al., 2015) por lo que la hipótesis es que la deficiencia de TMBIM6 genera problemas como pueden ser degeneración, debilidad o hipertrofia muscular lo que impide eclosionar de la pupa. Aquí observamos también que la línea CG7188 [3235] es más fuerte en la interferencia.

Para continuar con el análisis de la viabilidad se hace un seguimiento 48 horas posteclosión de las moscas que han salido de la pupa para comprobar si son viables. Los resultados se muestran en la figura 10.

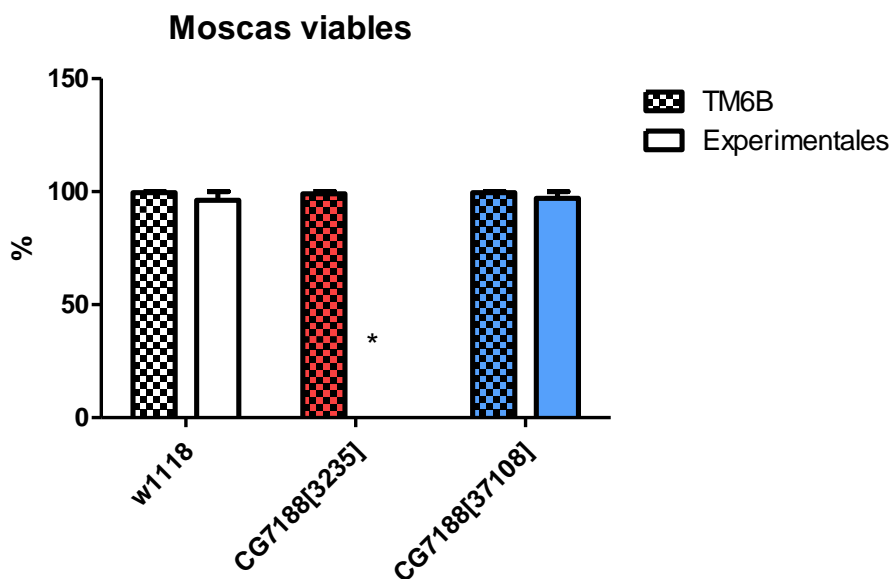


Figura 10. Ratios de viabilidad de las moscas nacidas con interferencia de TMBIM6 ubicua tras 48 horas.

Las moscas control y con la interferencia con CG7188 [37108] tras 48 horas viven y tienen una apariencia normal. En cambio, las moscas experimentales en el caso de CG7188 [3235] no son viables, tienen las alas retorcidas, no pueden trepar y todas aparecen muertas sobre la comida a las 48 horas. De normal, las moscas pueden morir al quedarse pegadas en la comida, para comprobar si esta es la causa se repite el cruce con CG7188 [3235] y las pupas no TM6B, de mayor tamaño, se separan en otro tubo colocado boca abajo para que las moscas al salir de la pupa queden sobre el tapón y la incapacidad de volar no haga que se queden pegadas a la comida. En este caso tras 48 horas algunas moscas aparecen muertas, pero el resto siguen mostrando signos de inviabilidad con las alas débiles y deformes sin inflar y solo sobreviven unas horas más. El problema del inflado de las alas se ha observado en modelos de disfunción mitocondrial en motoneuronas (Cagin et al., 2015) por lo que de nuevo apunta a un problema muscular. Por otro lado, se puede pensar que la muerte se deba a las condiciones de inanición que sufren estas moscas que no tienen acceso a la comida, porque no pueden subir hasta ella, pero en estudios previos se han determinado los ratios de supervivencia celular bajo condiciones de inanición en células deficientes en TMBIM6 observándose una mayor supervivencia en estas células en comparación con el wild type, resultados que se corroboraron con el mismo ensayo realizado en *D. melanogaster* que supuso un aumento considerable de la esperanza de vida en comparación con el control, todo ello debido al papel de TMBIM6 como regulador negativo de la autofagia (Castillo et. al, 2011). Todo ello apoya la hipótesis anterior de que la deficiencia de TMBIM6 causa problemas musculares, que en este caso provocan la muerte del organismo.

Aunque el interferente CG7188 [37108] ha mostrado tener menos fuerza en el silenciamiento que CG7188 [3235] porque no ha causado problemas hasta ahora, se quiere analizar la supervivencia más exhaustivamente para ver si se ve afectada. Para ello se hace un seguimiento de las moscas que han eclosionado a lo largo del tiempo y se registra en una gráfica, reflejada en la figura 11.

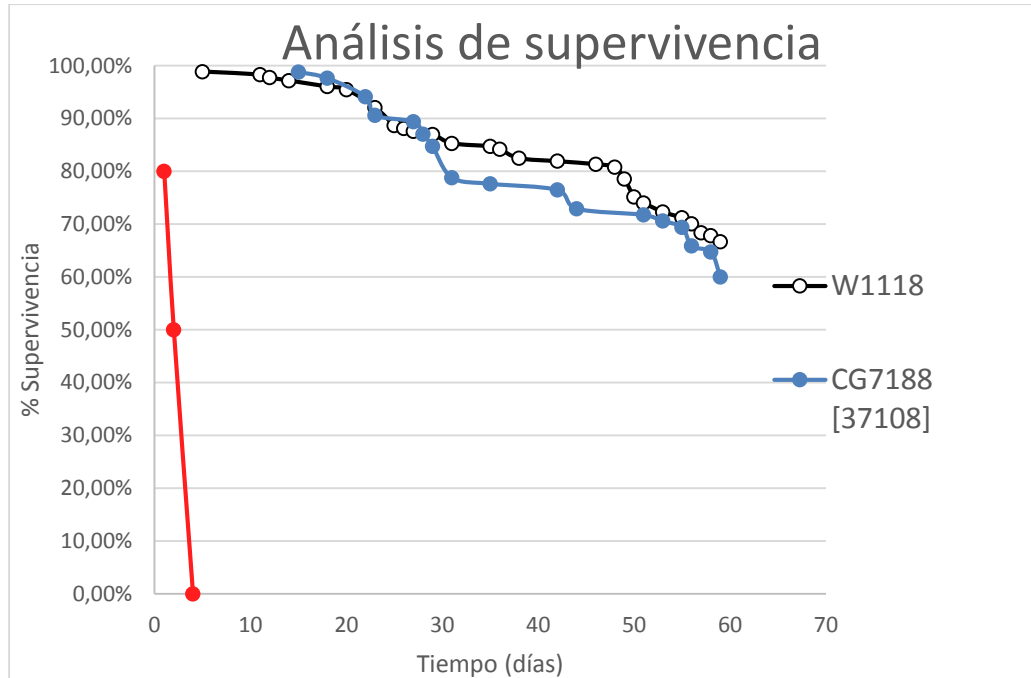


Figura 11. Análisis de supervivencia de las moscas con interferencia de TMBIM6 ubicua

Se ha analizado la supervivencia hasta los 60 días de vida y se observa que la tendencia de las moscas control es a ir muriendo poco a poco conforme pasa el tiempo. En el caso de las moscas que heredan el RNAi CG7188 [37108] la supervivencia es ligeramente menor que en el caso de los controles pero tiende a igualarse sin diferencias significativas. Por último, y como se ha

mencionado anteriormente, la interferencia llevada a cabo con RNAi CG7188 [3235] es letal para el organismo que muere a los 4 días de vida.

4.2 Geotaxis negativa: *climbing*

El siguiente paso es analizar los efectos de este silenciamiento ubicuo en la motilidad de *D. melanogaster*, para ello se utilizan las moscas viables, es decir, el control y la línea interferente CG7188 [37108]. Es común evaluar los problemas musculares utilizando el ensayo de geotaxis negativa para valorar su capacidad de trepar. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 12.

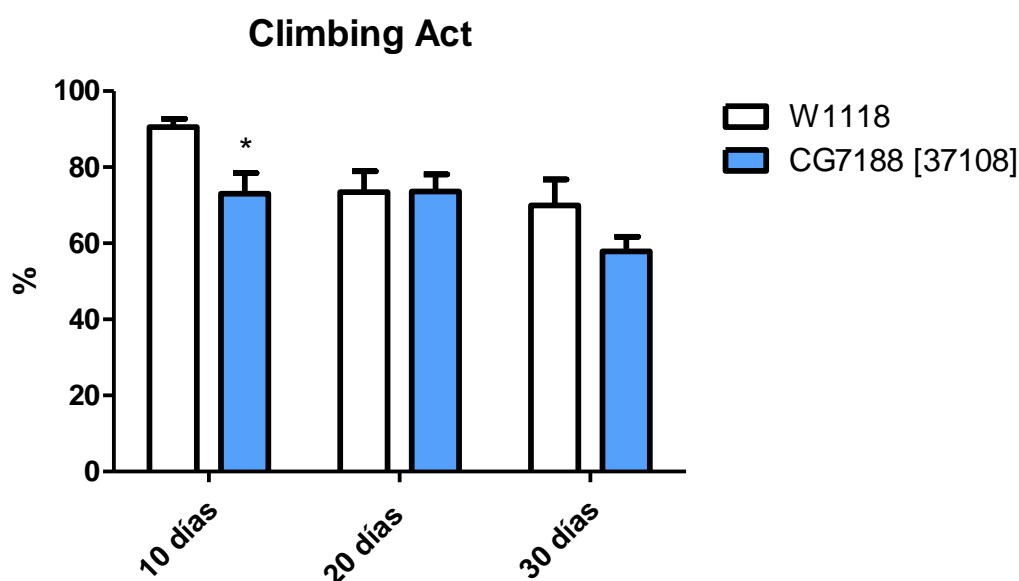


Figura 12. Resultados de geotaxis negativa a los 10, 20 y 30 días en moscas experimentales con *Act-Gal4*.

Se observa una disminución en las moscas con interferencia del 17% en la motilidad a los 10 días respecto al control, que es estadísticamente significativa (p-value 0,004). A los 20 días no hay diferencias apreciables, solo una disminución en ambas líneas que acompaña a la edad del organismo. A los 30 días se observa una disminución del 12% en comparación con el control, que en este caso no es significativa estadísticamente (p-value 0,134). El hecho de que las moscas jóvenes tengan capacidad motora diferente y las más adultas no, puede deberse a que las moscas más perjudicadas y con menos capacidad para trepar han muerto durante los días del ensayo, las que quedan a los 20 y 30 días son más hábiles y presentan menos diferencias respecto al control.

4.3 Peso

Se conoce que TMBIM6 interviene en los mecanismos del metabolismo glucosídico, por lo que se quiere comprobar cómo influye su deficiencia ubicua en el organismo. Para ello se comprueba el peso de las moscas a los cuatro días de vida. En la figura 13 se puede observar el peso individual de las moscas en mg.

Peso individual a los 4 días

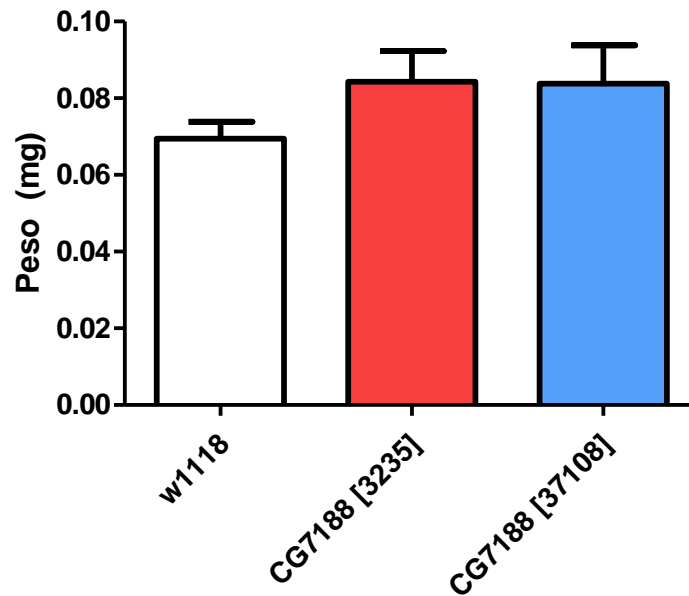


Figura 13. Peso individual de las moscas con interferencia de TMBIM6 ubicada tras 4 días de vida expresado en mg.

Se observa que las moscas que sufren la deficiencia de TMBIM6 tienen un peso mayor que las moscas controles. A pesar de que no es un aumento significativo ($p\text{-value} > 0,05$), esta tendencia se ha visto en ensayos anteriores con ratones donde se ha observado como ratones deficientes en TMBIM6 son significativamente más obesos con tres meses de vida que los controles (Lisak et al., 2016). Todo ello concuerda con el papel que juega TMBIM6 en el metabolismo de la glucosa, que aumenta el ratio de glicólisis debido a una menor cantidad de enzima piruvato deshidrogenasa activado y por tanto de ATP. De esta forma se alteran los procesos bioenergéticos a nivel mitocondrial y por ello las células viran el metabolismo energético hacia un proceso glicolítico para tener un aporte de ATP (Lee et al., 2010).

El objetivo de analizar el peso en moscas de más edad es ver si siguen aumentando de peso, por ello se pesan a los 10 días de vidas, a pesar de que no es posible el análisis de la interferencia mediada por CG7188 [3235] porque no sobreviven. En la figura 14 se adjunta el peso en mg de las moscas a los 10 días de vida.

Peso individual a los 10 días

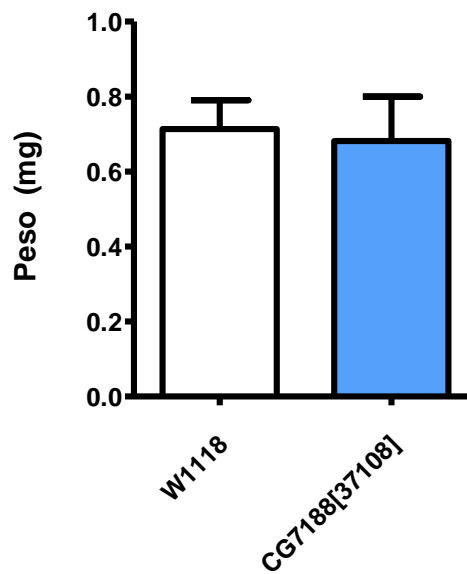


Figura 14. Peso por mosca con interferencia de TMBIM6 ubicua tras 10 días de vida, expresado en mg

En este caso se observa un mayor peso de las moscas control que de las moscas con interferencia CG7188 [37108] no significativo ($p\text{-value} > 0,05$). No hay datos previos que apoyen estos resultados, pero como ninguna de las variaciones observadas es significativas no se puede concluir nada.

4.4 Interferencia muscular

Los datos obtenidos en los ensayos de viabilidad, supervivencia y *climbing* sugerían que la falta de TMBIM6 causaba problemas a nivel muscular. Para comprobarlo se realiza la interferencia exclusiva en tejido muscular utilizando para ello la línea *Mhc-Gal4*. En primer lugar se comprueba si la letalidad previa a la eclosión se debe a un problema muscular, para ello se analiza el ratio de eclosión de las pupas. En la figura 15 se adjuntan los datos observados.

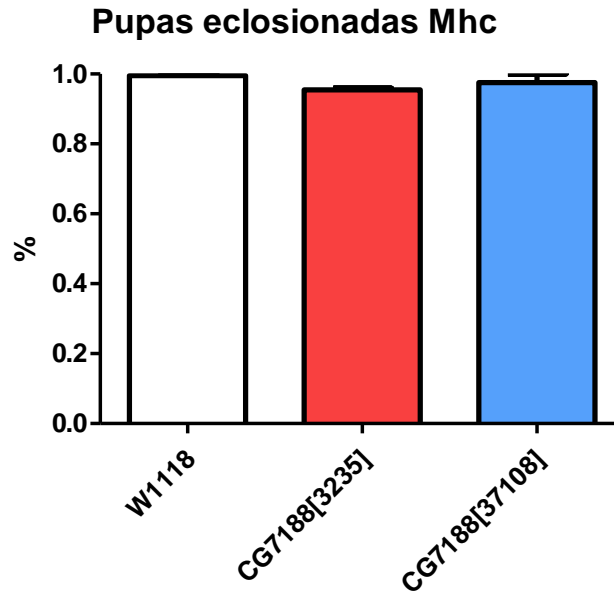


Figura 15. Ratios de eclosión de pupas con interferencia muscular

Se observa como el porcentaje de eclosión es superior al 95% en todos los casos, por lo que esta interferencia no tiene efectos musculares que impidan la eclosión de las pupas, además se ve que las moscas de los tres genotipos tienen las alas correctamente formadas y pueden trepar por el tubo. Esto sugiere que no se trata de un problema muscular, pero ya que a cadena pesada de la miosina se expresa de forma tardía en el desarrollo de *D. melanogaster* y puede ser esta la causa de que no haya defectos en las moscas se hace otra vez la interferencia en músculo. En este caso usando dos promotores de activación más temprana: el promotor twist que se expresa en el embrión temprano y el promotor del factor potenciador de miocitos. Se compara de nuevo la cantidad de pupas eclosionadas, mostrado en la figura 16.

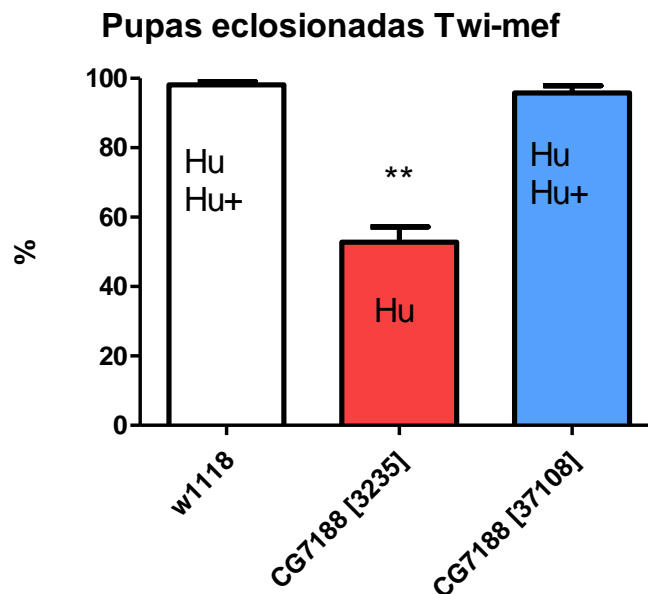


Figura 16. Porcentaje de eclosión en moscas con el promotor twi-Mef

En este caso la eclosión de las moscas cuya interferencia es realizada con CG7188 [3235] se ha visto reducida significativamente (p -value $5,406E-04$) a un 52% en comparación con el control (98%) y la interferencia con CG7188 [237108] (95%). Hay que destacar además que tras observar las moscas que han salido de la pupa se determina que en el control y en la interferencia con CG7188 [37108] la descendencia presenta el fenotipo Hu en aproximadamente la mitad de los casos, lo que concuerda con las proporciones esperadas. En el caso de CG7188 [3235] se observa que todas las moscas que han salido de la pupa muestran el fenotipo Hu, esto significa que las que heredan el cromosoma con los promotores necesarios para la interferencia son las pupas que no eclosionan. Para comprobarlo, se diseccionan 3 pupas no eclosionadas y se confirma que no presentan el fenotipo Hu, con lo que se asume que el 48% de pupas formadas, correspondiente a las que no han eclosionado, son las que sufren la interferencia de CG7188 [3235]. Por tanto, el 100% de las moscas con interferencia CG7188 [3235] mueren antes de eclosionar. Estos datos confirman que la incapacidad de eclosión observada en las pupas de *D. melanogaster* se debe a problemas musculares y que la falta de TMBIM6 desde estadios tempranos lleva a la letalidad del organismo en estado de pupa indicando que es una proteína imprescindible para el desarrollo del músculo.

Se quieren observar los efectos en la motilidad de la mosca haciendo el ensayo de geotaxis negativa, como la interferencia bajo el promotor *twi-Mef* no permite tener moscas experimentales CG7188 [3235] el ensayo se ha de realizar con moscas que expresan el interferente bajo el promotor *Mhc*. Se hace a los 10, 20 y 30 días y se muestran los resultados en la figura 17.

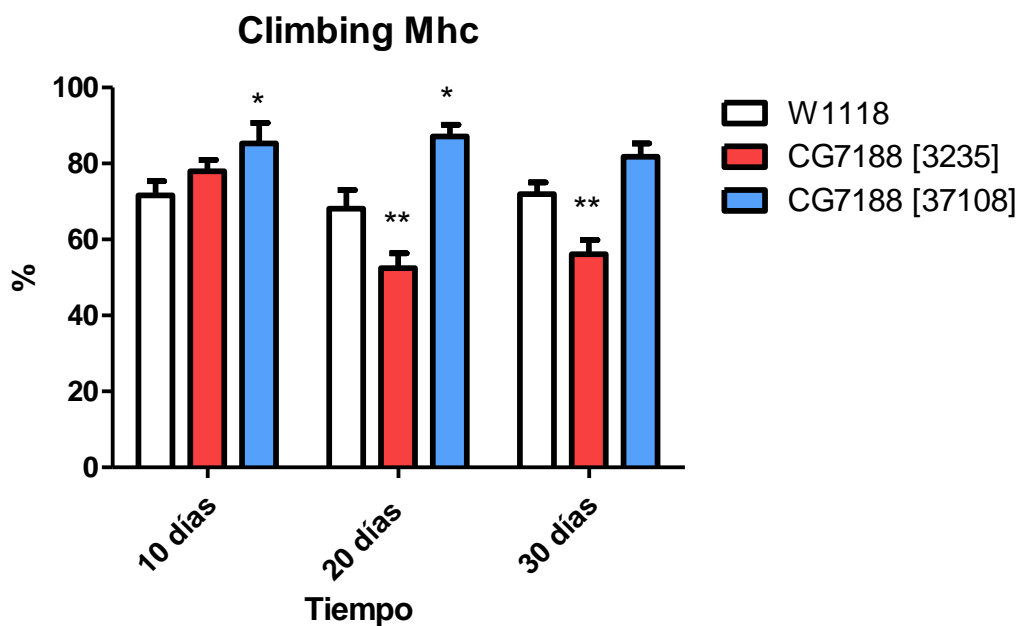


Figura 17. Resultados de geotaxis negativa a los 10, 20 y 30 días en moscas experimentales con *Mhc-Gal4*.

A los 10 días vemos un aumento del 14% de la capacidad de trepar de las moscas con el interferente CG7188 [37108] que es significativo (p -value 0,047) en comparación con el control. A los 20 días se sigue observando ese aumento pero más acusado, del 19%; en cambio la interferencia con CG7188 [3235] muestra una reducción en la motilidad del 16% respecto al control (p -value 0,00001). Por último a los 30 días se sigue la misma tendencia, el aumento causado por CG7188 [37108] ya no es significativo y la pérdida de motilidad que acompaña a

CG7188 [3235] es en este caso de un 15% (p-value 0,0007). Estos resultados acompañan a la serie de problemas causados por defectos musculares que puede sufrir el organismo.

4.5 Histología

En último lugar, se quieren determinar cuáles son los defectos musculares que causa la falta de esta proteína durante el desarrollo. Para ello se ha analizado mediante histología el tórax de moscas que expresaban con *Act-Gal4*, es decir, con silenciamiento ubicuo, ya que este es el promotor más fuerte que permite obtener adultos viables. Los cortes longitudinales ultrafinos observados por microscopía electrónica se muestran en la figura 18 y reflejan los defectos musculares causados por la interferencia a 20, 6 y 2 μm .

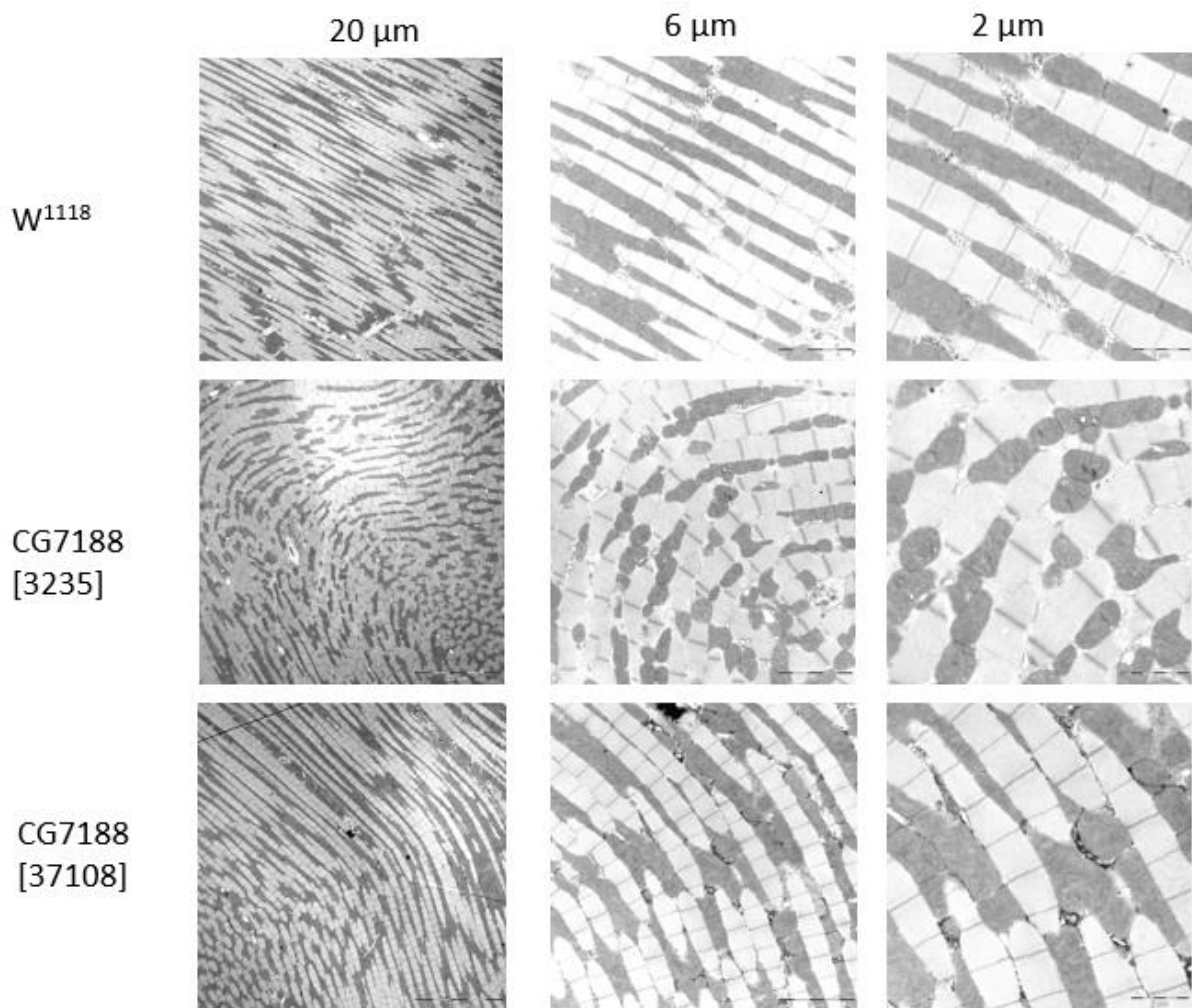


Figura 18. Muestras histológicas del tórax de los tres genotipos expresados con *Act-Gal4* vistas por microscopía electrónica a diferentes aumentos.

En el control se observan unas fibras musculares rectas y ordenadas acompañadas de una morfología mitocondrial correcta. En la interferencia mediante CG7188 [3235], que es la que causaba mayores problemas al organismo, se hace muy evidente el retorcido de las fibras musculares. Además, del aspecto de las mitocondrias se deduce que pueden estar comenzando

un proceso de fusión ya que se muestran más difusas y con unos límites entre membranas menos claros. A pesar de que TMBIM6 se expresa en el retículo endoplasmático, está relacionado con la mitocondria por su implicación en el metabolismo de la glucosa y por su implicación en procesos de liberación de Ca^{2+} , los cuales afectan directamente al calcio mitocondrial. Esto explicaría las consecuencias mitocondriales de la deficiencia de TMBIM6 en las células que ya habían sido observadas anteriormente en células B del sistema inmune (Lisak et al., 2016). Por último, en la interferencia mediada por CG7188 [37108] las fibras están menos curvadas y se empieza a ver el redondeamiento de algunas mitocondrias, pero menos acusado que en el otro caso, esto se debe a que el silenciamiento de este RNAi es más débil que el de CG7188 [3235] como ya se ha mencionado.

Para confirmar cual es realmente el defecto muscular que sufren estas moscas: degeneración, hipertrofia,... y tener una visión más global de lo que ocurre en el músculo, se hacen cortes longitudinales semifinos y se analizan por microscopía vertical a 1 y 40 zoom. Las imágenes obtenidas se adjuntan en la figura 20.

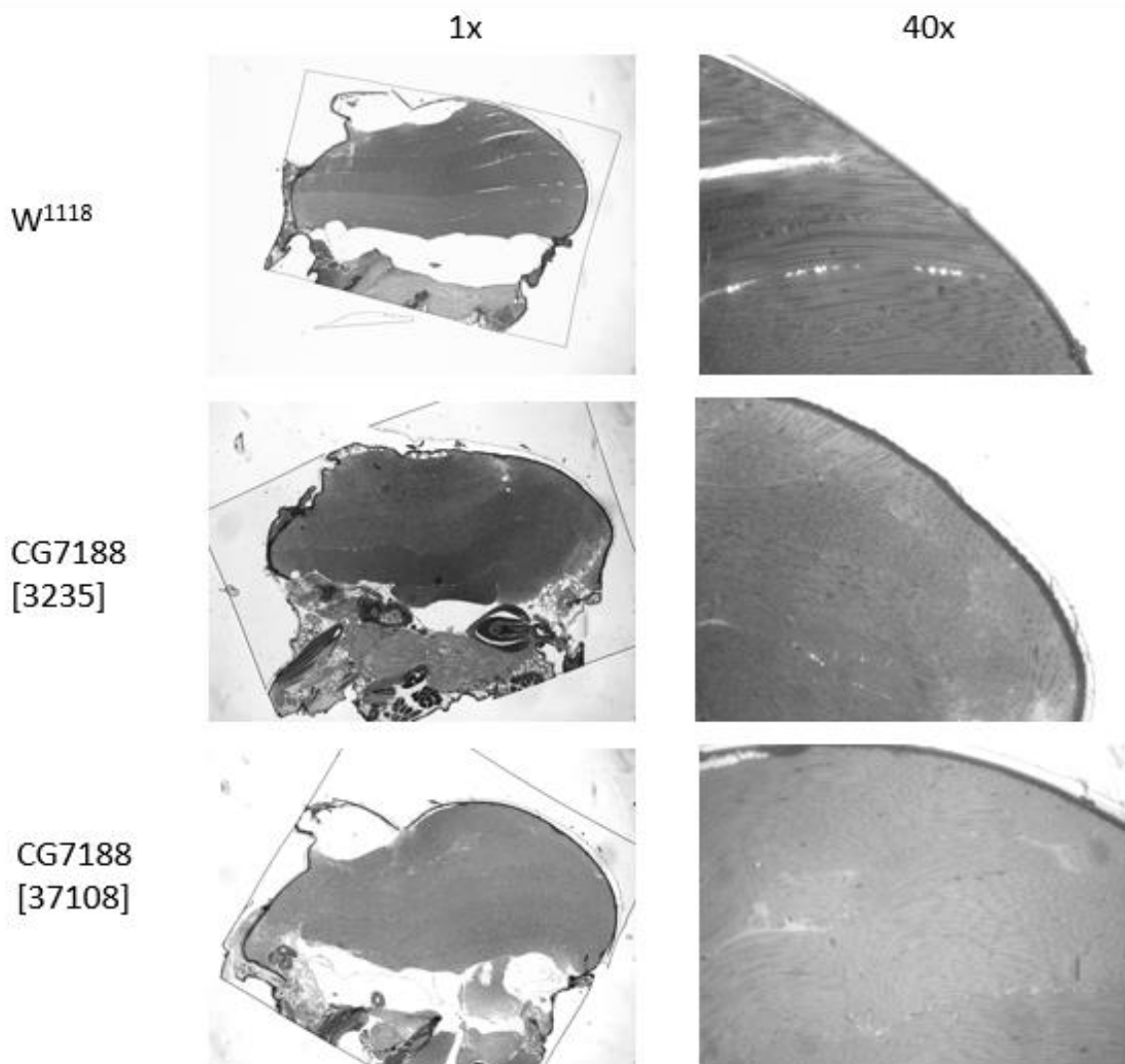


Figura 19. Cortes histológicos del tórax de *D. melanogaster* de los tres genotipos expresados con Act-Gal4 vistos con el microscopio vertical a zoom 1x y 40x.

En el control se observa de nuevo la orientación recta y ordenada de las fibras, además se puede distinguir la separación entre los paquetes musculares de *Drosophila*. La interferencia con CG7188 [3235] muestra las fibras retorcidas anteriormente vistas y en este caso más juntas, sin separación entre los paquetes musculares; además se observa como el músculo ha invadido la parte superior (escutellum) y la parte ventral del tórax donde no ha de haber músculo, claramente el músculo está hipertrofiado. En último lugar la interferencia con CG7188 [37108] rescata en parte el fenotipo mostrando unas fibras menos curvadas y amontonadas y no hay invasión muscular. Por otro lado, en *D. melanogaster* el músculo está unido directamente al epitelio, y llama la atención en este caso la zona de unión: en el caso del control, en la imagen 40x esta unión se ve correcta y sin defectos, en cambio, en las moscas con interferencia se puede observar como en esta zona las fibras están más dispares y no correctamente unidas al epitelio.

4.6 Perspectivas futuras

A partir de los datos observados con todos los experimentos que se han realizado se plantean nuevos análisis para profundizar en el conocimiento de TMBIM6. En primer lugar, sería interesante repetir los ensayos de peso con un tamaño muestral mayor y comprobar si la tendencia en la variación del peso es la misma. Estos estudios metabólicos podrían ir acompañados de ensayos para cuantificar la ingesta de comida y ver así si estas variaciones se ven influidas por la alimentación o es exclusivo del papel de TMBIM6 en el metabolismo de la glucosa. Para acompañar estos datos se han preparado ya los ensayos metabólicos de los cuales ya se ha realizado la extracción en el laboratorio y están congeladas a -80°C para su futuro análisis. Será muy interesante observar las variaciones metabólicas donde se prevén cambios sobre todo en la fase orgánica que contiene lípidos, por la ya comentada alteración del metabolismo energético. De hecho, estudios recientes ya han demostrado niveles mayores de colesterol y triglicéridos en plasma y en hígado de ratones TMBIM6 KO respecto a los controles (Lee et al., 2016) y se esperaría observar también un aumento de estos metabolitos en los futuros estudios metabólicos de *D. melanogaster*. Por otro lado, la observación histológica de las fibras musculares sugiere que están amontonadas y los paquetes musculares no están ordenados, por lo que también se plantea la observación de cortes transversales de tórax para ver su disposición.

5. Conclusiones

Durante este proyecto se han realizado experimentos que han permitido responder todos los objetivos planteados.

1. En primer lugar, se ha determinado que las interferencias llevadas a cabo por CG7188 [3235] y CG7188 [37108] tienen efecto en el organismo, siendo además la línea CG7188 [3235] una línea interferente mejor y más fuerte.
2. Por otro lado, se ha concluido que la interferencia de *TMBIM6* no tiene efectos en el desarrollo embrionario, pero si es una proteína necesaria para el desarrollo de al menos el músculo, generando problemas de motilidad y de supervivencia, llegando a ser letal en edad adulta.
3. Por último, los problemas generados en el músculo se basan en una desorganización de las fibras e hipertrofia muscular, además afecta a la morfología de la mitocondria.

6. Bibliografía

ADAMS, M. D.; CELNIKER, S. E.; HOLT, R. A.; EVANS, C. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P. G.; ... & GEORGE, R. A. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287 (5461): 2185-2195.

BULTYNCK, G.; KIVILUOTO, S. & METHNER, A. (2014). Bax inhibitor-1 is likely a pH-sensitive calcium leak channel, not a H⁺/Ca²⁺ exchanger. *Science Signaling*, 7(343): pe22-pe22.

CAGIN, U.; DUNCAN, O. F.; GATT, A. P.; DIONNE, M. S.; SWEENEY, S. T. & BATEMAN, J. M. (2015). Mitochondrial retrograde signaling regulates neuronal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(44): E6000-E6009.

CASTILLO, K.; ROJAS-RIVERA, D.; LISBONA, F.; CABALLERO, B.; NASSIF, M.; SCHUCK, S.; IBAR C.; WALTER P.; SIERRALTA J.; GLAVIC A. & HETZ, C. (2011). BAX inhibitor-1 regulates autophagy by controlling the IRE1 α branch of the unfolded protein response. *The EMBO journal*, 30(21): 4465-4478.

CHAE, H. J.; KE, N.; KIM, H. R.; CHEN, S.; GODZIK, A.; DICKMAN, M. & REED, J. C. (2003). Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene*, 323: 101-113.

CHANG, Y.; BRUNI, R.; KLOSS, B.; ASSUR, Z.; KLOPPMANN, E.; ROST, B.; HENDRICKSON W.A. & LIU, Q. (2014). Structural basis for a pH-sensitive calcium leak across membranes. *Science*, 344(6188): 1131-1135.

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*, 24(1): 21-36.

ELLIOT, D & BRAND, A.H. (2008) *The GAL4 System: A Versatile System for the Expression of Genes*. En C. Dahmann (editor) *Drosophila Methods and Protocols* (pp 79-96). Nueva York: Humana Press.

HATFIELD, I.; HARVEY, I.; YATES, E. R.; REDD, J. R.; REITER, L. T. & BRIDGES, D. (2015). The role of TORC1 in muscle development in *Drosophila*. *Scientific reports*, 5.

HENKE, N.; LISAK, D. A.; SCHNEIDER, L.; HABICHT, J.; PERGANDE, M. & METHNER, A. (2011). The ancient cell death suppressor BAX inhibitor-1. *Cell calcium*, 50(3): 251-260.

HETZ, C. & GLIMCHER, L.H. (2009) Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1 α interactome. *Molecular Cell*, 35: 551-561

HUMMEL, T. & KLÄMBT, C. (2008) P-Element Mutagenesis. En C. Dahmann (editor) *Drosophila Methods and Protocols* (pp 97-118). Nueva York: Humana Press.

JOHNSTON, D. (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nature reviews genetics*, 3(3): 176-188.

- KORNBERG, T. B. & KRASNOW, M. A. (2000). The Drosophila genome sequence: implications for biology and medicine. *Science*, 287(5461): 2218-2220.
- LEE, G. H.; YAN, C.; SHIN, S. J.; HONG, S. C.; AHN, T.; MOON, A.; ... & KIM, D. S. (2016). BAX inhibitor-1 enhances cancer metastasis by altering glucose metabolism and activating the sodium-hydrogen exchanger: the alteration of mitochondrial function. *Oncogene*, 35(6): 803-804.
- LEE, H. Y.; LEE, G. H.; BHATTARAI, K. R.; PARK, B. H.; KOO, S. H.; KIM, H. R. & CHAE, H. J. (2016). Bax Inhibitor-1 regulates hepatic lipid accumulation via ApoB secretion. *Scientific reports*, 6.
- LISAK, D. A.; SCHACHT, T.; ENDERS, V.; HABICHT, J.; KIVILUOTO, S.; SCHNEIDER, J.; HENKE, N.; BULTYNCK, G. & METHNER, A. (2015). The transmembrane Bax inhibitor motif (TMBIM) containing protein family: Tissue expression, intracellular localization and effects on the ER CA²⁺-filling state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1853(9): 2104-2114.
- LISAK, D.; SCHACHT, T.; GAWLITZA, A.; ALBRECHT, P.; AKTAS, O.; KOOP, B.; ... & PARYS, J. B. (2016). BAX inhibitor-1 is a Ca²⁺ channel critically important for immune cell function and survival. *Cell Death & Differentiation*, 23(2): 358-368.
- LLOYD, T. E. & TAYLOR, J. P. (2010). Flightless flies: Drosophila models of neuromuscular disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1184(1): E1-E20.
- MAJUMDAR, S. & RIO, D. C. (2015). P transposable elements in Drosophila and other eukaryotic organisms. *Microbiology spectrum*, 3(2).
- PANDEY, U. B. & NICHOLS, C. D. (2011). Human disease models in Drosophila melanogaster and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews*, 63(2): 411-436.
- REITER, L. T.; POTOCKI, L.; CHIEN, S.; GRIBSKOV, M. & BIER, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster. *Genome research*, 11(6): 1114-1125.
- XU, Q. & REED, J. C. (1998). Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Molecular cell*, 1(3): 337-346.

ANEXO I

Medio de cultivo

1. Se preparan alícuotas para 2 litros de comida cada una de las cuales contiene:
 - 120g de harina de maíz
 - 20g de harina integral de soja
 - 20g de agar
 - 100g de azúcar
2. Calentar durante 5 minutos 1,2 litros de agua tipo II.
3. Pesar 60g de levadura en fresco.
4. Mezclar el agua calentada con una alícuota y los 60g de levadura ayudándose de una batidora en la cabina.
5. Preparación del autoclave: Rellenar con agua hasta que cubra los agujeros, introducir la bandeja sin agujeros para evitar que la comida manche el autoclave y encenderlo para que vaya calentándose.
6. Tapar la mezcla con papel de aluminio y cinta de autoclavado e introducir en el autoclave durante aproximadamente 40 minutos.
7. Calentar durante 5 minutos 0,8 litros de agua tipo II.
8. Sacar la mezcla autoclavada y llevarla a la cabina.
9. Verter el agua calentada a la mezcla autoclavada.
10. Añadir 10 ml de ácido propiónico (antibacteriano) y 20 ml de nipagin disuelto en etanol (antifúngico). Remover con ayuda de la batidora.
11. Dispensar aproximadamente 9 ml de comida en cada tubo.
12. Tapar los tubos con comida con una sábana o papel y dejar toda la noche.
13. Tapar cada tubo individualmente con un tapón de algodón y guardar en nevera.

ANEXO II

Cruces Actina

Control: ♀ *Act-Gal4* x ♂ *w¹¹⁸*

$$\frac{+}{+}; \frac{Act-gal4}{TM6B} \quad \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$$

F1: $\boxed{\frac{+}{+}; \frac{Act-gal4}{+}}$ / $\frac{+}{+}; \frac{+}{TM6B}$

CG7188 [37108]: ♀ *Act-Gal4* x ♂ *CG7188[37108]*

$$\frac{+}{+}; \frac{Act-gal4}{TM6B} \quad \frac{RNAi-CG7188[37108]}{RNAi-CG7188[37108]}; \frac{+}{+}$$

F1: $\frac{RNAi-CG7188[37108]}{+}; \frac{TM6B}{+}$ / $\boxed{\frac{RNAi-CG7188[37108]}{+}; \frac{Act-gal4}{+}}$

CG7188 [3235]: ♀ *Act-Gal4* x ♂ *CG7188[3235]*

$$\frac{+}{+}; \frac{Act-gal4}{TM6B} \quad \frac{RNAi-CG7188[3235]}{RNAi-CG7188[3235]}; \frac{+}{+}$$

F1: $\frac{RNAi-CG7188[3235]}{+}; \frac{TM6B}{+}$ / $\boxed{\frac{RNAi-CG7188[3235]}{+}; \frac{Act-gal4}{+}}$

Cruces Miosina

Control: ♀ *Mhc-Gal4* x ♂ *w¹¹¹⁸*

$$\frac{Mhc - gal4}{Mhc - gal4} ; \frac{UAS - dcr2}{UAS - dcr2} \quad \frac{+}{+} ; \frac{+}{+}$$

F1:

$$\frac{Mhc - gal4}{+} ; \frac{UAS - dcr2}{+}$$

CG7188 [37108]: ♀ *Mhc-Gal4* x ♂ *CG7188[37108]*

$$\frac{Mhc - gal4}{Mhc - gal4} ; \frac{UAS - dcr2}{UAS - dcr2} \quad \frac{RNAi - CG7188[37108]}{RNAi - CG7188[37108]} ; \frac{+}{+}$$

F1:

$$\frac{Mhc - gal4}{RNAi - CG7188[37108]} ; \frac{UAS - dcr2}{+}$$

CG7188 [3235]: ♀ *Mhc-Gal4* x ♂ *CG7188[3235]*

$$\frac{Mhc - gal4}{Mhc - gal4} ; \frac{UAS - dcr2}{UAS - dcr2} \quad \frac{RNAi - CG7188[3235]}{RNAi - CG7188[3235]} ; \frac{+}{+}$$

F1:

$$\frac{Mhc - gal4}{RNAi - CG7188[3235]} ; \frac{UAS - dcr2}{+}$$