



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA

AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

# Caracterización de un modelo *knock-out* en *Drosophila melanogaster* para el gen *Gdap1* relacionado con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

Curso 2016-2017

Valencia, junio de 2017

**Autora:** Pilar Puig Serra

**Tutor:** Máximo Ibo Galindo Orozco

**Co-tutor externo:** Víctor López del Amo





# Caracterización de un modelo *knock-out* en *Drosophila melanogaster* para el gen *Gdap1* relacionado con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth

**Autora:** Pilar Puig Serra

**Tutor:** Máximo Ibo Galindo Orozco

**Co-tutor externo:** Víctor López del Amo

Valencia, junio de 2017

## RESUMEN

Charcot-Marie-Tooth (CMT) es una neuropatía periférica rara hereditaria para la que no hay un tratamiento específico, y se trata de una patología clínicamente y genéticamente muy heterogénea. Hasta la fecha, se conocen más de 60 genes cuyas mutaciones son causantes de CMT, uno de ellos es el gen *GDAP1*. Este gen codifica para una proteína de membrana mitocondrial externa que participa en la morfología y la distribución de las mitocondrias, la homeostasis del calcio y el estrés oxidativo; aunque no se conoce la función exacta de dicha proteína. Para contribuir en la elucidación de las bases moleculares de *GDAP1*, se han publicado dos modelos animales en *Drosophila melanogaster*, que a través de la sobreexpresión y el silenciamiento del ortólogo de *GDAP1*, recapitulan algunos de los fenotipos observados en pacientes (degeneración neuronal y muscular) además de cambios en el tamaño, morfología y distribución de las mitocondrias. Asimismo mediante metabolómica y análisis de la expresión génica se detectaron en estos modelos fallos en el metabolismo energético.

Con todo lo anterior, se puso de manifiesto que *D. melanogaster* es un modelo útil para entender la patofisiología de las mutaciones de *GDAP1* que dan lugar a CMT. Por este motivo, se decidió generar un modelo *knock-out* (KO) para *Gdap1* en *D. melanogaster* mediante recombinación homóloga, y la subsecuente modificación del genoma. Este trabajo se centra en la validación y la caracterización del modelo KO para *Gdap1* mediante diferentes aproximaciones: ensayos de viabilidad, ensayos biofísicos para el estudio de la capacidad locomotora, caracterización histológica de los tejidos de interés y análisis de expresión para los genes involucrados en las rutas metabólicas que se han visto alteradas en los anteriores modelos de *Gdap1* en *D. melanogaster*.

Con la caracterización del modelo se ha revelado que el KO generado tiene una mayor esperanza de vida respecto a la de las moscas control, modificaciones en la red mitocondrial de la retina y el músculo y alteraciones relevantes en la expresión de genes relacionados con la ruta de la insulina.

**PALABRAS CLAVE:** *knock-out*, *Gdap1*, Charcot-Marie-Tooth, *Drosophila melanogaster*, dinámica mitocondrial, ruta de la insulina.

# Characterization of a *Drosophila melanogaster* knock-out model for the *Gdap1* gene related with Charcot-Marie-Tooth disease

**Author:** Pilar Puig Serra

**Tutor:** Máximo Ibo Galindo Orozco

**External co-tutor:** Víctor López del Amo

Valencia, June 2017

## ABSTRACT

Charcot-Marie-Tooth (CMT) is an inherited rare peripheral neuropathy for which there is no specific treatment, and it is a clinically and genetically heterogeneous pathology. To date, more than 60 genes whose mutations cause CMT are known, *GDAP1* being one of them. This gene encodes for a mitochondrial outer membrane protein that participates in mitochondrial morphology and distribution, calcium homeostasis and oxidative stress; but the specific function of this protein is unknown. In order to decipher the molecular basis of *GDAP1*, two *Drosophila melanogaster* models have been published, and they recapitulate some phenotypes observed in patients (neuronal and muscular degeneration) after *Gdap1* over-expression or silencing; moreover these models have aberrant mitochondrial size, morphology and distribution. Using metabolomics and gene expression analysis, energy metabolism failures were detected in these models also.

Then, it has been revealed that *D. melanogaster* is a useful model to study CMT associated with *GDAP1* mutations. For this reason, a knock-out (KO) model of *Gdap1* in *D. melanogaster* has been generated by homologous recombination and the subsequent genome modification. This work is focused on the validation and characterization of the *Gdap1* KO model through different approaches: viability test, biophysical tests to study the locomotor capacity, histological characterization of tissues of interest and analysis of gene expression for genes involved in the metabolic pathways that were altered in the previous *D. melanogaster Gdap1* models.

The characterization of this KO model has shown an increase in lifespan compared to control flies, changes in the mitochondrial network of the retina and muscle and relevant alterations in the gene expression levels of genes involved in the insulin signaling.

**KEY WORDS:** *knock-out*, *Gdap1*, Charcot-Marie-Tooth, *Drosophila melanogaster*, mitochondrial dynamics, insulin signaling.

## AGRADECIMIENTOS

A Ibo Galindo, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio para la realización de este TFG y sobre todo por estar siempre dispuesto a escuchar y ayudar.

A toda la gente del laboratorio, gracias por crear un ambiente de trabajo tan bueno en el laboratorio, prestar vuestra ayuda cada día y hacerlo todo más llevadero. Gracias Andrés por las risas, los consejos y el buen rollo, me ha gustado mucho conocerte. Gràcies Andrea per les xarles i consells sobre el futur, així com per la teua incondicional ajuda. Y gracias Tamara por ayudarme sin pensarlo por muy ocupada que estuvieras. Os deseo a todos lo mejor en el futuro.

A Víctor López especialmente, un tutor inmillorable, gràcies a tu tot el relacionat amb este TFG ha sigut molt més fàcil. Gràcies per transmetre'm la teua passió per la ciència i per ajudar-me cada volta que ho necessitava sense dubtar-ho ni un segon. Eres i seràs el meu referent i mentor científic.

Gràcies papis per haver fet de mi la persona que sóc, per haver-me inculcat valors tan importants como són la responsabilitat, la família i el respecte; si sé que és l'amor és per vosaltres. Gràcies mami per sempre vetlar pel meu bienestar i futur i per preocupar-te per que tot estiga en ordre sense que ningú se n'adone, passe el que passe. Gràcies papi per haver aportat a la meua vida tants moments de felicitat, mai oblidaré el teu somriure.

Gràcies tete, eres un pilar fonamental en la meua vida, gràcies per preocupar-te tant per mi, voler escoltar els meus problemes i les innumerables ajudes prestades des de fa 22 anys i sobretot els últims anys.

Gràcies a la meua família materna, gràcies a tots per suportar-me quan ni siquiera jo me podia suportar. Sobretot he de donar-li les gràcies a la millor uela que podria tindre, per criar-me i ser l'ànima d'esta família, la persona més forta que conec, juntes podem en tot!

Gràcies a la gran família Puig, gràcies *torpedos* perquè m'heu donat l'alegria i la diversió necessàries cada dissabte, ja que les setmanes estaven plenes d'estrés i frustració. Gràcies cosina-germana-amiga per ser la meua companya de vida.

Gràcies ties Lourdes, Amparo i Mari, m'heu aportat l'ajuda, el suport, l'amor i la comprensió que necessitava ens els moments difícils.

Gràcies *Princess* i Carles, per preocupar-vos per mi i fer aquest últims 4 anys més divertits.

Gràcies als amics que esta carrera m'ha regalat, que són molts i meravellosos; per les risas, les festes, però també pels consells, la compressió infinita i el suport diari. Especialment a les meues xiques, Olga, Laura i Carla, és increïble tot el que signifiquen per a mi, ja que fa menys de 4 anys que formeu part de la meua vida, però estic més que segura de que formareu part d'ella molts més anys.

Gràcies a tots vosaltres he aconseguit finalitzar esta apassionant carrera i realitzar este TFG.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT).....	1
1.2. <i>GDAP1</i> y CMT.....	3
1.3. Dinámica mitocondrial y neurodegeneración en CMT.....	4
1.4. <i>Drosophila melanogaster</i> para el estudio de CMT.....	5
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	7
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	8
3.1. Cepas utilizadas y mantenimiento de estas.....	8
3.2. Métodos moleculares.....	9
3.2.1. PCR (reacción en cadena de la polimerasa).....	9
3.2.2. Digestión.....	9
3.2.3. Extracción de ARN.....	10
3.2.4. RT-PCR (PCR con transcriptasa inversa).....	10
3.2.5. PCR cuantitativa (PCRc).....	11
3.3. Métodos histológicos.....	12
3.4. Curva de supervivencia.....	12
3.5. Ensayo de geotaxis negativa.....	12
3.6. Representaciones gráficas y métodos estadísticos empleados.....	12
<b>4. RESULTADOS</b> .....	14
4.1. Validación del modelo KO para <i>Gdap1</i> en <i>D. melanogaster</i> .....	14
4.2. Supervivencia y capacidad locomotora del modelo KO.....	16
4.3. La ausencia de expresión del gen <i>Gdap1</i> altera la red mitocondrial en la retina de <i>D. melanogaster</i> .....	17
4.4. La ausencia del gen <i>Gdap1</i> provoca cambios en la bioenergética mitocondrial del músculo de <i>D. melanogaster</i> .....	19
4.5. Alteraciones de la ruta de la insulina en el modelo KO para <i>Gdap1</i> en <i>D. melanogaster</i> .....	21
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	23
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	26
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	27

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fenotipos característicos de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth.....	2
<b>Figura 2.</b> Esquema sobre la dinámica mitocondrial .....	4
<b>Figura 3.</b> Validación del modelo KO para <i>Gdap1</i> en <i>D. melanogaster</i> .....	15
<b>Figura 4.</b> Estado físico del modelo KO comparado con el Ctrl .....	16
<b>Figura 5.</b> Secciones transversales de retina del modelo KO comparados con los del Ctrl y niveles de expresión de genes de autofagia en este tejido de moscas de 1 semana .....	18
<b>Figura 6.</b> Secciones transversales de retina del modelo KO comparados con los del Ctrl y niveles de expresión de genes de autofagia en este tejido a 5 semanas de vida .....	19
<b>Figura 7.</b> Cortes longitudinales de los músculos indirectos del vuelo en los que se evalúa la morfología mitocondrial de moscas de las cepas Ctrl y KO de 5 semanas de vida.....	20
<b>Figura 8.</b> Niveles de expresión de los genes <i>PDP</i> , <i>PDK</i> , <i>4ebp</i> y <i>InR</i> de las cepas Ctrl y KO a 1 y 5 semanas de vida .....	22

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Genes cuyas mutaciones provocan la enfermedad de CMT, sus funciones, localización celular y tipo de CMT al que dan lugar .....	1
<b>Tabla 2.</b> Características de las cepas de <i>D. melanogaster</i> usadas en el trabajo.....	8
<b>Tabla 3.</b> Reactivos empleados en la PCR.....	9
<b>Tabla 4.</b> Reactivos de la digestión.....	9
<b>Tabla 5.</b> Componentes y sus respectivos volúmenes para la RT-PCR.....	10
<b>Tabla 6.</b> Volúmenes de los reactivos usados en las PCRs cuantitativas.....	11
<b>Tabla 7.</b> Secuencia de los cebadores usados en las PCRs cuantitativas.....	11

## ABREVIATURAS

**ADNc:** ADN complementario

**ARNi:** ARN interferente

**CMT:** Charcot-Marie-Tooth

**dNTPs:** desoxirribonucleótidos trifosfato

**EEUU:** Estados Unidos

**kb:** kilobases

**KO:** *knock-out*

**N:** número de réplicas biológicas

**pb:** pares de bases

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PCRc:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**RE:** retículo endoplasmático

**RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

**VCN:** velocidad de conducción nerviosa

# 1. INTRODUCCIÓN

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT)

Charcot-Marie-Tooth (CMT) es una neuropatía periférica genéticamente y clínicamente muy heterogénea. En esta enfermedad se ven afectados los nervios periféricos sensitivos y motores (Pareyson y Marchesi, 2009). CMT es el trastorno neuromuscular hereditario más común, aunque su prevalencia es baja, por lo que se considera una enfermedad rara, 1–4 de cada 10.000 habitantes la padecen (Braathen et al., 2011).

La enfermedad de CMT se divide en dos grupos según la velocidad de conducción nerviosa (VCN): CMT1 se caracteriza por tener una VCN disminuida (<38m/s) y en las biopsias de nervio sural de los pacientes se observa desmielinización y remielinización que da lugar a estructuras llamadas bulbos de cebolla; mientras que los pacientes con CMT2 tienen una VCN normal (>42m/s) o ligeramente reducida y en las biopsias de nervio sural no se observan rasgos de desmielinización, pero sí un menor número de axones. Cabe comentar que hay presentaciones clínicas intermedias entre CMT1 y CMT2 (Barisic et al., 2008).

Hasta la fecha, se conocen más de 60 genes cuyas mutaciones son causantes de esta neuropatía sensitiva y motora (NEUROMUSCULAR DISEASE CENTER, 2017). Estos genes codifican para proteínas con diferentes localizaciones y funciones celulares (compactación y mantenimiento de la mielina, formación del citoesqueleto, transporte axonal, metabolismo y dinámica mitocondrial...), estando todas ellas relacionadas con la mielina y la estructura y el funcionamiento de los axones de los nervios periféricos (Pareyson et al., 2006). En la Tabla 1 se intenta poner de manifiesto la heterogeneidad de los genes cuyas alteraciones causan CMT; en ella se muestran algunos de estos genes, funciones, localización celular de las proteínas para las que codifican y tipo de CMT que causan.

**Tabla 1.** Genes cuyas mutaciones provocan la enfermedad de CMT, sus funciones, localización celular y tipo de CMT al que dan lugar.

Gen	Funciones de la proteína	Localización celular de la proteína	Tipo(s) de CMT asociado(s)
<b>PMP22</b> ( <i>peripheral myelin protein 22</i> )	Mielinización, crecimiento y diferenciación celular	Membrana plasmática	CMT1
<b>MPZ</b> ( <i>myelin protein zero</i> )	Adhesión	Membrana plasmática	CMT1 y CMT2
<b>GJB1</b> ( <i>gap-junction beta 1</i> )	Forma uniones gap en la mielina no compacta	Membrana plasmática	CMT1
<b>MFN2</b> ( <i>mitofusina 2</i> )	Fusión mitocondrial e interacción mitocondria-retículo endoplasmático	Membrana mitocondrial externa y retículo endoplasmático	CMT2
<b>NEFL</b> ( <i>neurofilament light chain</i> )	Organización de los neurofilamentos y transporte axonal	Citoplasma	CMT1 y CMT2
<b>GDAP1</b> ( <i>ganglioside-induced differentiation-associated protein 1</i> )	Mantenimiento de la red mitocondrial,	Membrana mitocondrial externa	CMT1, CMT2 y CMT intermedio

<b>RAB7</b>	Regulador del transporte vesicular y del tráfico de la membrana plasmática	Membrana endosomal	CMT2
<b>GlyRS</b> ( <i>glycyl-tRNA synthetase</i> )	Participa en la síntesis de proteínas	Citoplasma	CMT2
<b>LMNA</b> (lamina A/C)	Forma parte de la estructura de la lámina nuclear y participa en la transcripción génica	Membrana nuclear	CMT2

Se han descrito todos los modos de herencia mendeliana en la enfermedad de CMT: autosómico dominante, que es el más común (Manganelli et al., 2012); ligada al X (Kennerson et al., 2013); y autosómico recesivo (Birouk et al., 2003), este último modo de herencia es el menos común, solo frecuente en comunidades con más endogamia.

Las manifestaciones clínicas resultantes de la degeneración axonal son: debilidad, atrofia muscular y pérdida sensorial; todo en las extremidades de forma progresiva. Estas manifestaciones clínicas dan lugar a fenotipos característicos en las extremidades que se pueden observar en la Figura 1: pies arqueados y dedos de martillo en los pies que dificultan la marcha (Figura 1.A y B); y en estadíos más graves de la enfermedad manos en garra y gran pérdida de la masa muscular de antebrazos y piernas (Figura 1.C y D), entre otros. Otros síntomas y signos comunes son los temblores en las manos, calambres musculares, pies fríos, callosidades en los pies, acrocianosis, dolor en las extremidades, etc. (Barisic et al., 2008).



**Figura 1.** Fenotipos característicos de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. A) Pies arqueados con dedos de martillo. B) Pies altamente deformados con dedos de martillo. C) Manos en garra. D) Piernas con una gran pérdida de la masa muscular. (Adaptada de Pareyson y Marchesi, 2009)

La edad de aparición de CMT, la gravedad de los síntomas y la progresión de la enfermedad son muy variables; siendo lo más frecuente que la enfermedad aparezca en las dos primeras décadas de vida. La enfermedad se puede complicar provocando una disminución progresiva de la capacidad de caminar, lesiones en las zonas que han sufrido una disminución de la sensibilidad, entumecimiento y dolor en ciertas partes del cuerpo, etc.; causando a la larga una discapacidad en algunos casos (Cornett et al., 2016). En la actualidad no hay ninguna terapia farmacológica

específica ni efectiva contra CMT; solo la rehabilitación junto con las intervenciones quirúrgicas para tratar las deformidades esqueléticas y de los tejidos blandos constituyen los tratamientos de apoyo (Young et al., 2008).

Por todo lo anterior y destacando la gran heterogeneidad y complejidad de la enfermedad, la elucidación de los mecanismos moleculares que dan lugar a la enfermedad de CMT, así como un enfoque multidisciplinar de la enfermedad con una estrecha colaboración entre neurólogos e investigadores son necesarios para mejorar los tratamientos, biomarcadores y sistemas de diagnóstico y pronóstico existentes (Jani-Acsadi et al., 2008).

## 1.2. *GDAP1* y CMT

Parte de la complejidad clínica y genética de la enfermedad de CMT reside en que mutaciones en genes distintos dan lugar a una misma sintomatología, es decir, a un mismo tipo de CMT; por ejemplo mutaciones en los genes *MFN2* (mitofusina 2), *DNM2* (*dynamain 2*) y *NEFL* (*neurofilament light*) dan lugar a CMT2 (Lin et al., 2011). A esto se suma que un mismo gen puede dar lugar a diferentes tipos de CMT, mutaciones en *GDAP1* (*ganglioside-induced differentiation-associated protein 1*) pueden dar lugar a 4 tipos de CMT diferentes. Ciertas mutaciones de *GDAP1* dan lugar a CMT2 autosómico dominante (Cassereau et al., 2009) y otras a CMT2 de herencia autosómica recesiva (Ammar et al., 2003); siendo las formas recesivas de *GDAP1* más agresivas, los pacientes tienen serias dificultades para caminar que aumentan con el tiempo, entre otros síntomas. También hay mutaciones de este gen que dan lugar a CMT1 de herencia autosómica recesiva, estas mutaciones dan lugar a manifestaciones clínicas más severas, que empiezan antes de los 5 años de vida y progresan muy rápidamente impidiendo la movilidad de los enfermos (Dubourg et al., 2006). Por último, hay mutaciones de *GDAP1* que causan CMT con manifestaciones clínicas intermedias de herencia recesiva y al igual que las demás mutaciones de herencia recesiva, dan lugar a una neuropatía severa en la que los pacientes necesitan asistencia para moverse (Chung et al., 2011).

*GDAP1* fue identificado como uno de los 10 genes que tras la diferenciación colinérgica en células del neuroblastoma de ratón, aumentaban su expresión, siendo nombrados como *GDAP* del 1 al 10 (Liu et al., 1999).

La proteína para la que codifica este gen tiene 358 aminoácidos y pertenece a la familia de enzimas glutatión S-transferasas (Marco et al., 2004). *GDAP1* se expresa en neuronas (Pedrola et al., 2008) y células de Schwann (Niemann et al., 2005). Este gen codifica para una proteína de membrana mitocondrial externa, que es un factor de fisión mitocondrial, es decir, participa en la morfología y la distribución de las mitocondrias (Niemann et al., 2005); esta función de *GDAP1* es importante ya que las mitocondrias sufren procesos de fisión y fusión, que son altamente regulados para el mantenimiento de la homeostasis del organismo, ya que fallos en estos eventos pueden dar lugar a un mal funcionamiento de las mitocondrias que daría lugar a un proceso patológico (Itoh et al., 2013).

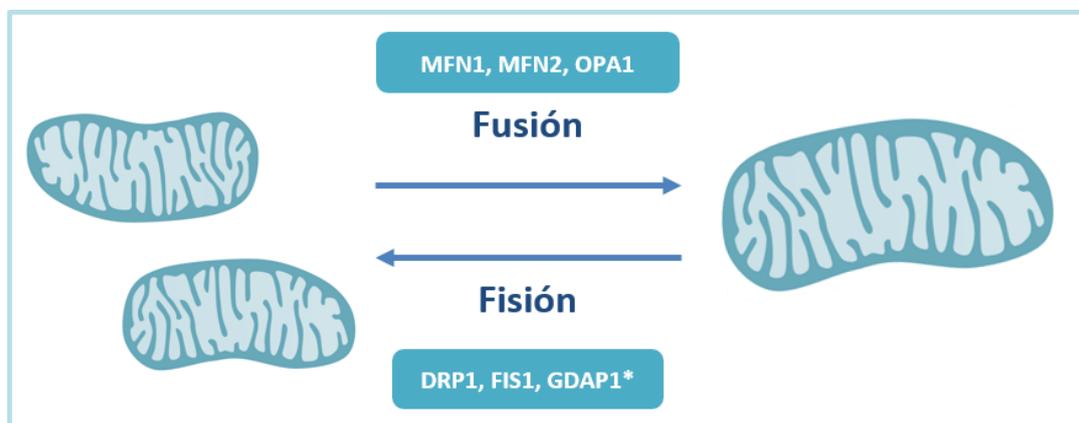
Además, *GDAP1* también está relacionada con la morfología de los peroxisomas, orgánulos muy importantes en el metabolismo de los lípidos (Huber et al., 2013); y está involucrada en el SOCE (*store-operated calcium entry*) dependiente de los contactos mitocondria-RE (retículo endoplasmático) (Pla-Martín et al., 2013).

### 1.3. Dinámica mitocondrial y neurodegeneración en CMT

El balance entre fusión y fisión mitocondrial es crucial para la correcta morfología de las mitocondrias y la estructuración de la red mitocondrial, además de la correcta localización de estos orgánulos dentro de la célula; de esta última dependen diferentes procesos celulares importantes: fosforilación oxidativa, autofagia, homeostasis del calcio, transporte axonal para el aporte de energía necesaria para la sinapsis, diferenciación celular y muerte celular (Kasahara y Scorrano, 2014). Es por esto que, dada la importancia de la función de las mitocondrias en el sistema nervioso, alteraciones en los genes relacionados con la dinámica mitocondrial dan lugar a neuropatías como son las enfermedades de Parkinson, de Alzheimer y de Huntington (Schon y Manfredi, 2003).

CMT es otra neuropatía con genes causantes relacionados con la dinámica mitocondrial como son *GDAP1* y *MFN2*, dos genes cuyas mutaciones más comúnmente dan lugar a CMT2 concretamente (Kostera-Pruszczyk et al., 2014).

La fusión mitocondrial está controlada por las proteínas MFN1 y MFN2 que están localizadas en la membrana externa de las mitocondrias y la proteína codificada por el gen *OPA1* en la membrana interna mitocondrial, siendo estas tres proteínas GTPasas (*guanosine triphosphate*). Por otra parte, la fisión mitocondrial está gobernada, mayormente, por las proteínas DRP1 (*dynamin related protein 1*) y FIS1 (*mitochondrial fission*) que forman un anillo contráctil que provoca la división de las mitocondrias (Lu, 2009) como se esquematiza en la Figura 2. *GDAP1* en cambio no es una proteína de fisión mitocondrial canónica, aunque participa en el proceso. La función de *GDAP1* parece antagonista a la de *MFN2* (Niemman et al., 2005; López del Amo et al. 2015), aunque ambas están relacionados en un mismo tipo de patología, incluso se han encontrado pacientes con mutaciones en ambos genes que cursan con un tipo de CMT severa (Vital et al., 2012).



**Figura 2.** Esquema sobre la dinámica mitocondrial. Se muestran las principales proteínas que intervienen en los procesos de fusión y fisión mitocondrial. \**GDAP1* no es una proteína canónica de fisión mitocondrial pero participa en el proceso.

## 1.4. *Drosophila melanogaster* para el estudio de CMT

*Drosophila melanogaster* es un buen modelo animal para el estudio de los mecanismos de las enfermedades neurodegenerativas dadas las numerosas herramientas genéticas disponibles (cromosomas equilibradores, transgénesis por elementos P, sistema Gal4/UAS [*upstream activation sequence*], etc.) (Casso et al., 1999), las ventajas experimentales que ofrece (modelo eficiente y barato, ciclo de vida corto, gran número de descendientes a partir de una pareja fértil, etc.) (Letsou y Bohmann, 2005) y la homología de su genoma con el humano (se ha estimado que casi el 75% de los genes relacionados con enfermedades en humanos tienen ortólogos funcionales en la mosca) (Lloyd y Taylor, 2010).

Es por esto que hay numerosos estudios en los que se han modelizado en *D. melanogaster* enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer (Pandey y Nichols, 2011).

También existen diferentes modelos en *D. melanogaster* de los genes causantes de CMT. Por ejemplo Chihara et al. (2007) describen que la pérdida del gen *GlyRS* (*glycyl-tRNA synthetase*), causante de CMT2, en las neuronas de *D. melanogaster* afecta a la estructuración y estabilidad de la arborización terminal de axones y dendritas, y que las mutaciones causantes de CMT2 muestran propiedades de pérdida de función. En otro estudio, Storkebaum et al. (2009) recapitulan manifestaciones clínicas de CMT (déficit motor progresivo, disfunción neuronal y degeneración axonal) en diferentes modelos de *D. melanogaster* que expresan mutaciones dominantes del gen *TyrRS* (*tyrosyl-tRNA synthetase*) causantes de CMT. Janssens et al. (2014) desarrollaron un modelo en *D. melanogaster* de una mutación clínica del gen *Rab7* causante de CMT2, la expresión del gen mutante en las neuronas sensoriales provoca que las larvas tengan una temperatura y percepción del dolor reducidas, así como un dificultades para moverse cuando la proteína mutante se expresa en las neuronas motoras.

Para contribuir en la elucidación de las bases moleculares de GDAP1, también se han publicado en los últimos años dos modelos animales en *D. melanogaster*, que a través de la sobreexpresión y el silenciamiento del ortólogo de *GDAP1*, intentan recapitular algunos de los fenotipos observados en pacientes. Mediante técnicas histológicas se demostró que la alteración de los niveles de expresión de *Gdap1*, en estos modelos, produce cambios en el tamaño, morfología y distribución de las mitocondrias, además de degeneración neuronal y muscular. Además se observó que el estrés oxidativo no era una causa primaria de la degeneración neuromuscular, sino una consecuencia a largo plazo de la disfunción mitocondrial subyacente en las moscas modelo (López del Amo et al., 2015).

Por otra parte, se realizó espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) combinada con análisis de expresión génica, para tener una visión del perfil metabólico de estos dos modelos, y buscar nuevas rutas moleculares de interés para la enfermedad. En estos análisis, se observó que tanto la sobreexpresión como el silenciamiento de *Gdap1*, resultaban en una inactivación sistémica de la ruta de la insulina antes del comienzo de la degeneración neuromuscular, seguida por una acumulación de carbohidratos y un aumento de la  $\beta$ -oxidación de los lípidos (López del Amo et al., 2017). Estos resultados están en línea con estudios que relacionan fallos en el metabolismo energético con diferentes tipos de patologías neurológicas causadas por el mal funcionamiento de las mitocondrias.

Con todo lo anterior, se pone de manifiesto que *D. melanogaster* es un modelo útil para el estudio de CMT causada por mutaciones en *GDAP1*. Por este motivo, se decidió generar un modelo *knock-out* (KO) para *Gdap1* en *D. melanogaster* mediante recombinación homóloga

(Baena-López et al., 2013) con la subsecuente modificación del genoma. Dicha modificación permitirá la posterior reintegración de distintos ADN complementarios (ADNc) para el estudio de mutaciones clínicas específicas bajo el promotor basal del gen *Gdap1* de mosca. CMT es una enfermedad muy heterogénea y compleja genéticamente como se ha comentado, en la que un mismo gen puede dar lugar a diferentes tipos de CMT con diferente modo de herencia y diferentes mutaciones dan lugar a un mismo fenotipo; por lo que no hay ningún modelo que represente a todas las mutaciones causantes de CMT. Por esto se decidió generar modelos de mutaciones específicas en *D. melanogaster* a partir de un modelo KO.

Este modelo KO además aportará información más precisa de las consecuencias de la ausencia de *Gdap1* en *D. melanogaster* que el anterior modelo, en el que se silenciaba este gen mediante el sistema Gal4/UAS y ARN interferente (ARNi) en los tejidos de interés. El modelo KO se ha generado en el laboratorio por eliminación de la parte codificante del primer exón del gen, eliminación que se espera que provoque la ausencia total tanto del ARN mensajero como de la proteína en todo el organismo, y no en tejidos concretos como se procedió en el anterior modelo en algunos casos.

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

Este trabajo se centra en el estudio de un modelo KO para *Gdap1* en *D. melanogaster*, y sus objetivos son:

- Validar genéticamente el modelo KO generado.
- Estudiar la viabilidad y la capacidad locomotora del modelo.
- Caracterizar mediante técnicas histológicas los tejidos de interés (retina y músculo).
- Analizar la expresión de genes involucrados en rutas metabólicas que se han visto alteradas en los anteriores modelos de *Gdap1* en *D. melanogaster*.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Cepas utilizadas y mantenimiento de estas

En la Tabla 2 se muestran la abreviatura, el nombre, el origen y descripción de las cepas de moscas empleadas en el trabajo.

**Tabla 2.** Características de las cepas de *D. melanogaster* usadas en el trabajo.

Abreviatura usada en el trabajo	Nombre	Origen	Descripción
Ctrl (Control)	w <sup>1118</sup>	Bloomington <i>Drosophila</i> Stock Center	Cepa salvaje
KO	KO <i>Gdap1</i>	Generada en el laboratorio	Cepa mutante con una deleción en el exón 1 del gen <i>Gdap1</i>

En todos los experimentos solo se utilizaron machos de *D. melanogaster* de estas dos cepas. Las moscas se anestesiaron con un sistema de CO<sub>2</sub> para poder manipularlas.

Las moscas empleadas en los experimentos se mantuvieron a 25°C, mientras que las cepas se conservan a 18°C. Las moscas se cultivan en pequeños tubos de plástico con unos 10mL de comida para la supervivencia de estas, estos tubos se cambian cada 2-3 días en las moscas experimentales.

El método de preparación de 2L de comida o medio de cultivo para las moscas es el siguiente:

- Preparar una mezcla con los siguientes ingredientes:
  - 20g de agar
  - 20g de soja
  - 120g de harina de maíz
  - 100g de azúcar
- Calentar en el microondas 1,2L de agua destilada 5 min a 800W.
- Añadir la mezcla preparada en el punto 1 y 60g de levadura seca al agua calentada y homogenizarlo con la batidora.
- Autoclavar la mezcla homogenizada para esterilizarla.
- Añadir la mezcla autoclavada 800mL de agua destilada calentada en el microondas 5min a 800W.
- Añadir 6g de Nipagin (metil 4-hidroxibenzoato, antibacteriano) disuelto en 20mL de etanol 96° y 10mL ácido propiónico (antifúngico).
- Homogenizar la mezcla autoclavada, el agua caliente, el antifúngico y el antibacteriano con la batidora.
- Dispensar el medio de cultivo en los tubos, 10mL en cada uno, con la máquina Masterflex L/S Easy-Load III (Cole-Parmer; Vernon Hills, Illinois, EEUU [Estados Unidos]).
- Tapar los tubos con una pequeña sábana y dejar reposar durante toda la noche a temperatura ambiente.
- A la mañana siguiente tapar los tubos con tapones especiales antiácidos y guardarlos a 4°C para su mejor conservación.

## 3.2. Métodos moleculares

### 3.2.1. PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Las PCRs convencionales se realizaron a partir de muestras de ADN genómico extraído previamente en el laboratorio de ambas cepas de *D. melanogaster*. En la Tabla 3 se detallan las cantidades de los reactivos empleados en las PCRs realizadas, reacciones con un volumen final de 25µL.

**Tabla 3.** Reactivos empleados en la PCR. El tampón 5x, los dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato) y la ADN polimerasa usadas son de Biotools (Madrid, España).

Reactivo	Volumen (µL)
Cebador directo 10µM	0,5
Cebador reverso 10µM	0,5
Tampón de reacción 5X	5,0
dNTPs 10mM	0,5
ADN polimerasa 1U/µL	0,3
ADN genómico (30-70ng/µL)	1,0
Agua MiliQ	17,2

Los cebadores empleados en ambas cepas para la confirmación del KO (amplicón de 1,2kb [kilobases]) fueron los siguientes:

- Directo: 5'- AAGTCAATCCGGCACGCG-3'
- Reverso: 5'- AGCGATCGATCTAAATGATG-3'
- 

La reacción se llevó a cabo en el termociclador Veriti (Applied Biosystems; Foster City, California, EEUU) con el siguiente programa:

- Inicio: 30s a 95°C
- 35 ciclos de amplificación:
  - Desnaturalización: 15s a 98°C
  - Hibridación de los cebadores: 30s a 57°C (temperatura de fusión de los cebadores)
  - Extensión: 30s a 72°C (30seg/kbp)
- Extensión final: 7min a 72°C
- Enfriamiento: ∞ a 4°C

Los resultados de las PCRs se observaron mediante electroforesis corriendo las muestras en un gel de agarosa al 0,8%.

### 3.2.2. Digestión

La reacción de digestión se llevó a cabo durante 1hora y 30min a 37°C, utilizándose los reactivos que se detallan en la Tabla 4, siendo el volumen final de la reacción 20µL.

**Tabla 4.** Reactivos de la digestión. La enzima KpnI y el tampón 10X son de Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EEUU).

Reactivo	Volumen (µL)
KpnI 10U/µL	1
10X Tampón con BSA	2
1,5µg de ADN	Variable
Agua MiliQ	Variable hasta 20µL

### 3.2.3. Extracción de ARN

El protocolo empleado para la extracción de ARN a partir de 15 moscas o 20 cabezas de mosca es el siguiente:

1. Añadir 800µL de Trizol (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU) a las moscas previamente anestesiadas con CO<sub>2</sub> y homogeneizar con un mortero.
2. Incubar a temperatura ambiente 5min.
3. Añadir 160µL de cloroformo, agitar vigorosamente 15s e incubar 3min a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 12.000rcf 15min a 4°C.
5. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de microcentrífuga y añadir 400µL de isopropanol para hacer precipitar el ARN.
6. Dejar 10min a temperatura ambiente y centrifugar a 12.000rcf 15min a 4°C.
7. Eliminar el sobrenadante, añadir al pellet 500µL de etanol al 75% y centrifugar a 12.000rcf 5min.
8. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet de ARN al aire 25min.
9. Añadir 8µL de agua libre de nucleasas y resuspender el pellet.
10. Incubar durante 10min a 55°C.
11. Eliminar el ADN con DNasa I – *Amplification Grade* (Sigma-Aldrich; Saint Louis, Misuri, EEUU):
  - Añadir 1µL de 10x tampón de reacción, 1µL de DNasa I e incubar 30min a 37°C.
  - Añadir 1µL de *Stop solution* e incubar durante 15' a 70°C.
12. Almacenar las muestras a -80°C.

A continuación se cuantificó la cantidad de ARN obtenido y se evaluó su pureza mediante el espectrofotómetro ND 1000 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, Massachusetts, EEUU).

### 3.2.4. RT-PCR (PCR con transcriptasa reversa)

Para transformar el ARN extraído en ADNc se usó el kit qScript cDNA SuperMix (Quantabio; Beverly, Massachusetts, EEUU), en el cual se indicaba las cantidades de reactivos para llevar a cabo la reacción que se indican en la Tabla 5, en un volumen final de 20µL.

**Tabla 5.** Componentes y sus respectivos volúmenes para la RT-PCR.

Componente	Volumen (µL)
qScript cDNA SuperMix 5X	4
1µg de ARN molde	Variable
Agua libre de nucleasas	Variable hasta 20µL

La reacción se llevó a cabo en termociclador Veriti (Applied Biosystems; Foster City, California, EEUU) siguiendo el siguiente programa:

5min a 25°C  
 30min a 42°C  
 5min a 85°C  
 ∞ a 4°C

### 3.2.5. PCR cuantitativa (PCRc)

Las PCRcs se realizaron utilizando SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU). Los volúmenes de los reactivos empleados en cada reacción de 10µL se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Volúmenes de los reactivos usados en las PCRcs cuantitativas.

Reactivo	Volumen (µL)
Cebador directo 10µM	0,5
Cebador reverso 10µM	0,5
ADNc (dilución 1:5 del producto de la RT-PCR)	1
SYBR Green Master Mix	4
Agua MiliQ	4

El sistema de detección de fluorescencia usado fue LightCycler 480 (Roche; Basilea, Suiza), en el que se llevó a cabo la reacción con el siguiente programa:

1. Pre-incubación: 5min a 95°C
2. 40 ciclos de amplificación:
  - 10s a 95°C
  - 10s a 58°C
  - 10s a 72°C
3. Curva de fusión:
  - 5s a 95°C
  - 1min a 65°C

Los cebadores usados en las PCRcs cuantitativas para los diferentes genes de interés se diseñaron con la herramienta de Roche *Universal Probe Library Assay Design Center* ([https://lifescience.roche.com/en\\_es/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center](https://lifescience.roche.com/en_es/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center)) y se muestran en la Tabla 7. Todas las muestras se analizaron por triplicado y la expresión génica se calculó mediante el método 2DDCt, normalizándose los niveles de expresión a los del gen referencia *Rp49*.

**Tabla 7.** Secuencia de los cebadores usados en las PCRcs cuantitativas.

Gen	Secuencia de los cebadores
<i>Rp49</i>	5'-CGTTTACTGCGGCGAGAT-3' 5'-GCGCTCGACAATCTCCTT-3'
<i>Gdap1</i>	5'-TACAACTTCCATGCGCAAAA-3' 5'-GGTCCACCACATAGGGAAAG-3'
<i>Atg6</i>	5'-GGTGCCTTCGCCTGTCAG-3' 5'-ATGTATTGCCATTGTCTCCGTAG-3'
<i>Atg8</i>	5'-CCCTGTACCAGGAACATCACG-3' 5'-GGCCATGCCGTAACATTCTC-3'
<i>PDP</i>	5'-CCGAGTCGGTGAATCAG-3' 5'-GGGGAGGAGTAGGCAAAGAA-3'
<i>PDK</i>	5'-AAAGCAGTTCATGGACTTTGG-3' 5'-CTTACGGATCTGGTGTGCAA-3'
<i>4ebp</i>	5'-CCAGATGCCCCGAGGTGA-3' 5'-AGCCCGCTCGTAGATAAGTTT-3'
<i>InR</i>	5'-CCGGGATTACTGTACTGAACCT-3' 5'-CGCCTGCTAAAGGATCTGA-3'

### 3.3. Métodos histológicos

Las moscas se diseccionaron seleccionándose los ojos y los tórax que fueron tratados con el siguiente procedimiento:

1. Fijar de las muestras introduciéndolas en tampón de fijación (tampón fosfato con 2% de paraformaldehído y 2% de glutaraldehído) durante la noche a 4°C.
2. Post-fijar las muestras en una dilución 1:1 de tampón de fijación: tetraóxido de osmio, 20min en hielo.
3. Post-fijar las muestras en tetraóxido de osmio 2 horas en hielo.
4. Deshidratar las muestras con una serie de etanoles al 30%, 50%, 70%, 90% (hielo), 100% y 100% (temperatura ambiente); dejando las muestras unos 5-10min en cada disolución.
5. Lavar dos veces las muestras en óxido de propileno 10min a temperatura ambiente.
6. Sumergir las muestras en una dilución 1:1 de óxido de propileno: resina epoxi durante toda la noche a temperatura ambiente.
7. Embeber las muestras en resina epoxi durante 2-4horas.
8. Montar las muestras en pocillos para histología con la resina epoxi en la que están embebidas.

Para la visualización de las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión se realizaron cortes de 80nm de grosor, que se tiñeron con acetato de uranilo. Las muestras fueron examinadas con el microscopio Tecnai G<sup>2</sup> 20 (FEI Company; Hillsboro, Oregon, EEUU).

### 3.4. Curva de supervivencia

Para cuantificar la supervivencia se mantuvieron 50 moscas procedentes de 2 tubos diferentes para cada uno de los genotipos, cuantificándose cada día cuantas moscas habían muerto.

### 3.5. Ensayo de geotaxis negativa

Para evaluar la capacidad locomotora de las moscas se realizó un ensayo de escalada, ya que las moscas presentan geotaxis negativa, tienden a ascender por las paredes de los tubos cuando se les da un pequeño golpe para precipitarlas a la base del tubo.

Las moscas se transfirieron a un tubo sin alimentos y se esperaron 10 minutos para que estas se aclimataran. El ensayo se graba en video, este se inicia con una serie de golpes que hacen caer las moscas a la base del tubo y con la ayuda de los videos se cuantifica el porcentaje de moscas que llegan a la parte superior del tubo (9 cm) a los 20 segundos.

Este ensayo se realizó a 10, 20 y 30 días de vida de las moscas, utilizándose 2 tubos de 20 moscas de cada una de las cepas y repitiéndose el proceso 5 veces para cada uno de los tubos cada 5 minutos.

### 3.6. Representaciones gráficas y métodos estadísticos empleados

Los gráficos utilizados para representar los diferentes datos se realizaron con el programa Excel 2013 (Microsoft; Albuquerque, Nuevo México, EEUU) y con el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software; La Jolla, California, EEUU), con los que también se realizaron los test estadísticos pertinentes según lo que se quería analizar:

- Prueba T de Student para las PCRs cuantitativas.
- Prueba de Mantel-Cox para la prueba de supervivencia.

## **4. RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Validación del modelo KO para *Gdap1* en *D. melanogaster*

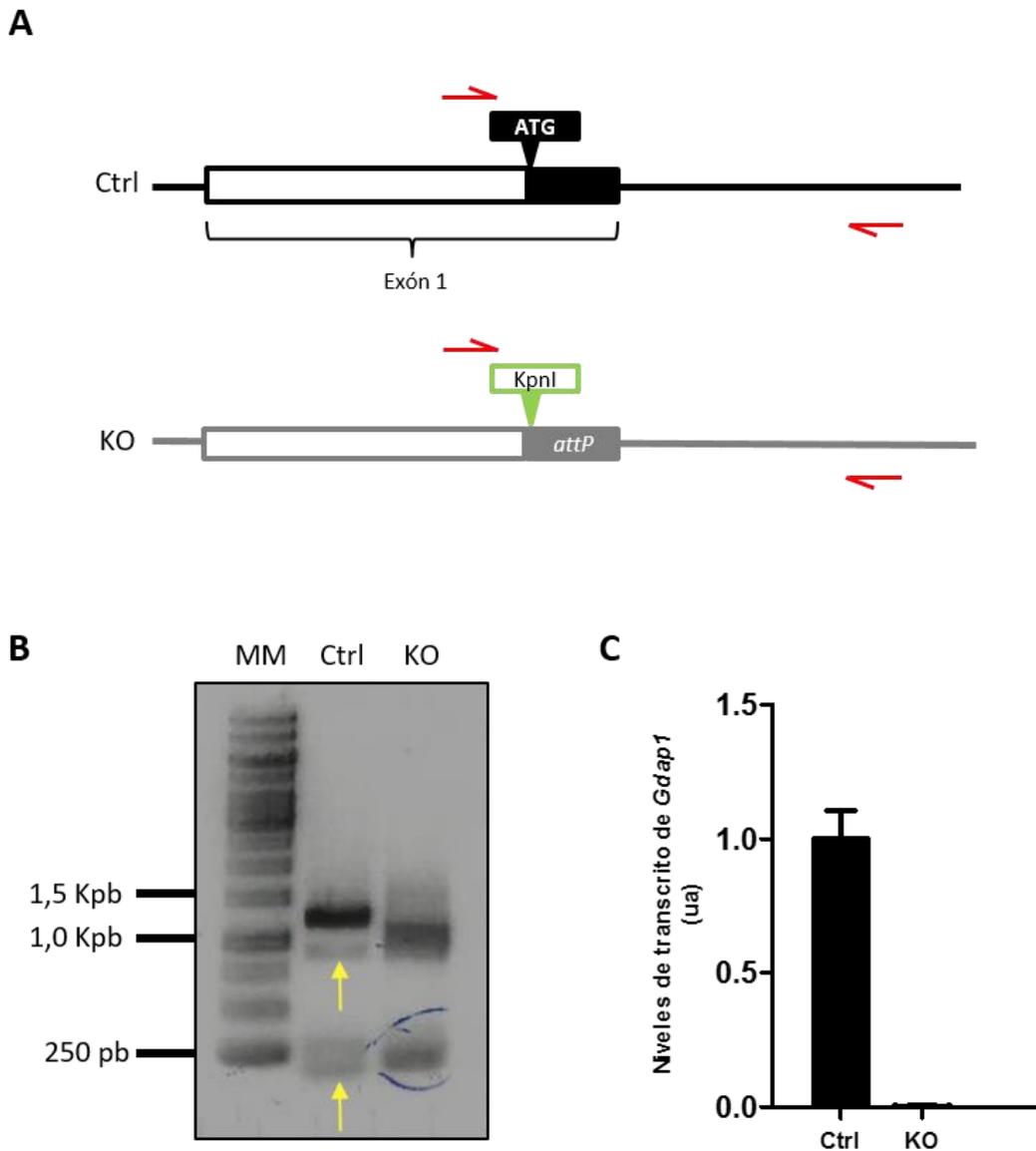
El modelo KO para *Gdap1* en *D. melanogaster* fue generado en el laboratorio modificando el genoma de la mosca mediante recombinación homóloga según se explica en Baena-López et al. (2013). Esta modificación conlleva la escisión de la parte codificante del exón 1 del gen *Gdap1*, introduciéndose un sitio *attP* (*attachment Phage*) que permitirá la posterior reintegración de distintos ADNc de *GDAP1* con mutaciones clínicas para su estudio. De esta manera, se conseguirán expresar mutaciones clínicas bajo el promotor basal del gen *Gdap1* de mosca, obteniendo un modelo de moscas “humanizadas” más cercanas al paciente.

Para confirmar la eliminación de la parte codificante del exón 1 y la inserción del sitio *attP* en su lugar, se realizaron dos aproximaciones que permitieron asegurar la correcta generación del modelo KO. En primer lugar, se realizó una PCR a partir de ADN genómico de las cepas Control (Ctrl) y KO, con los mismos cebadores para ambas cepas, en esta PCR se amplificó un fragmento genómico de 1,2kb que incluía la parte codificante del exón 1 de *Gdap1* en la cepa Ctrl y el sitio *attP* en la cepa KO (sin la parte codificante del exón 1, ya que fue eliminada por recombinación homóloga). El exón 1 de *Gdap1* presenta un tamaño similar al sitio *attP*, por ello, los amplicones obtenidos mediante esta PCR eran indistinguibles en el gel de agarosa. En cambio, la escisión del exón 1 y posterior integración del sitio *attP* en la cepa KO, había generado un sitio de corte KpnI (liberando un fragmento de 160pb [pares de bases] del fragmento amplificado), mientras que la cepa Ctrl no contenía dicho sitio de restricción. Por ello, si se corren en un gel los productos de PCR digeridos con esta enzima, se debería poner de manifiesto las diferencias entre ambos genotipos. Los fragmentos genómicos amplificados mediante PCR de las cepas Ctrl y KO, así como los diferentes componentes de estos fragmentos se esquematizan en la Figura 3.A.

En la Figura 3.B se muestra un gel de electroforesis en el que se observan los productos de la digestión comentada, la primera columna se corresponde con el marcador molecular (MM). La segunda carrera corresponde al producto de la digestión del fragmento genómico amplificado de la cepa Ctrl, y en la tercera se observa el producto de PCR de la cepa KO digerida también con KpnI. En el caso de la cepa Ctrl, se observa el amplicón de 1,2kb, y se comprobó que la digestión no modificaba el tamaño de dicho amplicón. En cambio, el amplicón para la cepa KO redujo su tamaño tras la digestión (1,04kb), y se ve una banda más pequeña de 160pb, que corresponde al fragmento liberado por la digestión con KpnI. Cabe mencionar que las bandas menos densas que se observan en el Ctrl corresponden a amplificaciones inespecíficas y dimerización de cebadores durante la PCR (señaladas con flechas amarillas en la Figura 3.B).

Por otra parte, se espera que la escisión de la parte codificante exón 1 del gen *Gdap1* en la cepa KO bloquee la transcripción de este gen. Para confirmar la ausencia de expresión del gen *Gdap1* en la cepa KO, se llevó a cabo una PCRC para el transcrito del gen *Gdap1* en las cepas Ctrl y KO. Los valores de los niveles de transcrito de la cepa Ctrl se relativizaron a 1. En la Figura 3.C se muestran los niveles relativos de transcrito de *Gdap1* en las cepas Ctrl y KO. Se puede observar que la cepa KO no presenta expresión para el gen *Gdap1* comparado con el Ctrl. Al no observarse expresión génica de *Gdap1* en la cepa KO mediante PCRC, se confirmó que la ausencia de la parte codificante del exón 1 de este gen, evita su expresión, con la consecuente ausencia de la proteína para la que codifica.

De esta manera, se confirmó que la cepa KO contiene el sitio *attP* necesario para la reintegración de las mutaciones clínicas y que dicha cepa presenta valores de expresión nulos para el gen *Gdap1*.



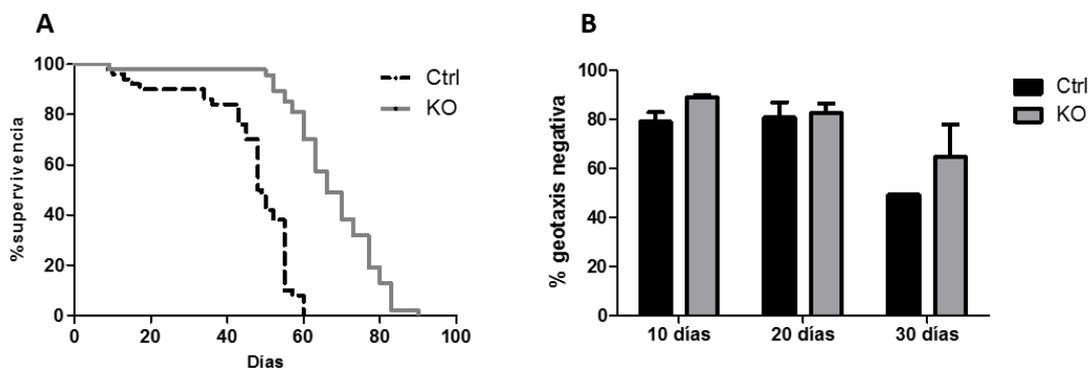
**Figura 3.** Validación del modelo KO para *Gdap1* en *D. melanogaster*. A) Representación gráfica de los fragmentos genómicos del gen *Gdap1* de las cepas Ctrl y KO amplificados por PCR, en rojo se representan los cebadores usados en esta PCR. En el Ctrl se representa con un rectángulo blanco con el borde negro la parte del exón 1 correspondiente a la región 5'UTR (*untranslated region*) y con un rectángulo negro la parte del exón 1 en la que empieza la secuencia codificante. En el fragmento genómico del KO sin embargo la parte codificante del exón 1 es inexistente, ya que fue eliminada por recombinación homóloga, insertándose en su lugar un sitio *attP* (representado con un rectángulo gris) de un tamaño similar al de esta región codificante; además la secuencia del sitio *attP* tiene un sitio de corte de KpnI representado en verde. En el genoma del KO la región 5'UTR del exón 1 permanece intacta y se representa con un rectángulo blanco con el borde gris. B) Gel de electroforesis en el que se observan de izquierda a derecha: el marcador molecular (MM) y los productos de la digestión con KpnI del fragmento de ADN genómico amplificado mediante PCR de los genotipos Ctrl (carrera 2) y KO (carrera 3). Con flechas amarillas se señalan bandas debidas a amplificaciones inespecíficas. C) Media de los niveles de transcrito de *Gdap1* en las cepas Ctrl y KO con sus respectivos errores estándar (comparados con el gen referencia), siendo relativizados a 1 los valores del Ctrl. Datos obtenidos a partir de 15 moscas de cuatro tubos distintos de cada una de las cepas usadas, N[número de réplicas]=4.

## 4.2. Supervivencia y capacidad locomotora del modelo KO

Una vez validado el modelo KO para *Gdap1*, se decidió evaluar el estado físico del modelo comparado con el de la cepa Ctrl a través de distintas pruebas.

En primer lugar se estudió la viabilidad del KO mediante una curva de supervivencia. En esta curva se representa el porcentaje de supervivencia frente a los días para ambos genotipos (Figura 4.A). La vida máxima de los genotipos Ctrl y KO es 60 y 90 días respectivamente; siendo la vida media del Ctrl 48,5 días y la del KO 66 días. Por tanto la ausencia de *Gdap1* no compromete la viabilidad de las moscas KO, al contrario, las moscas KO viven más que las moscas Ctrl. Se aplicó a los datos de supervivencia la prueba Mantel-Cox, obteniéndose un p-valor < 0,0001 que indica que las curvas de supervivencia de los genotipos de estudio son significativamente diferentes.

También se analizó la capacidad locomotora de las moscas KO comparada con la de las moscas Ctrl; para ello se realizaron ensayos de geotaxis negativa a 10, 20 y 30 días. En la Figura 4.B se muestra el porcentaje de geotaxis negativa de ambas cepas a los días en los que se realizó el experimento. Como el número de réplicas biológicas es bajo (N=2), no se realizó ningún test estadístico con los datos, los ensayos se realizaron para evaluar si existía alguna tendencia diferencial en la capacidad locomotora entre las cepas Ctrl y KO. No se observan diferencias en la capacidad locomotora entre las cepas Ctrl y KO, en cambio, sí se observa un deterioro de la capacidad locomotora de las moscas para escalar la pared del vial a los 30 días, tanto para el Ctrl como en el KO. Por todo lo anterior, el KO parece no tener afectada la capacidad locomotora aunque sería necesario realizar más ensayos de geotaxis negativa que lleven a conclusiones claras.



**Figura 4.** Estado físico del modelo KO comparado con el Ctrl. A) Curva de supervivencia de las cepas Ctrl y KO, los datos se representan como % de moscas supervivientes con el tiempo, el análisis de la supervivencia se realizó con la prueba de Mantel-Cox, obteniéndose un p-valor < 0,0001. B) Ensayo de geotaxis negativa a 10, 20 y 30 días de vida de las cepas experimentales, se representan las medias del % de geotaxis negativa de las moscas de las cepas Ctrl y KO con sus respectivos errores estándar.

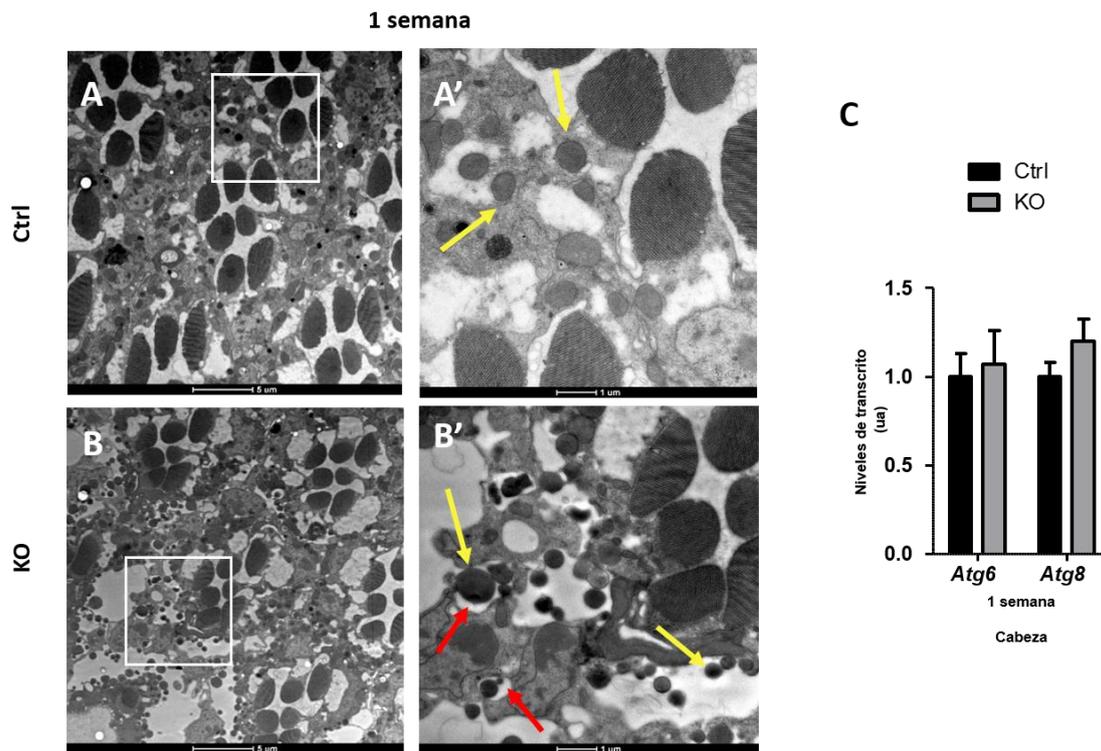
### 4.3. La ausencia de expresión del gen *Gdap1* altera la red mitocondrial en la retina de *D. melanogaster*

Como se ha comentado anteriormente, CMT es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a los nervios periféricos. El tejido modelo para el estudio de la neurodegeneración en *D. melanogaster* es el ojo, por ello, se decidió realizar un análisis histológico de la retina por microscopía electrónica. Así, se estudiarán los posibles defectos provocados por la falta de *Gdap1*, además el estudio se hará a dos edades (1 y 5 semanas) para tener en cuenta el componente temporal que tan importante es en las enfermedades degenerativas.

*D. melanogaster* tiene un ojo compuesto, formado por ojos simples, también llamados omatidios. En cada omatidio hay ocho neuronas fotorreceptoras (R1 a R8) y células accesorias de estas; los cuerpos neuronales de R1 a R6 se extienden a lo largo de toda la retina, mientras que R7 y R8 están respectivamente en la mitad externa e interna de la retina. Por tanto, si se visualiza una sección transversal de la retina se observan en cada omatidio siete cuerpos neuronales que se pueden identificar por el rabdómero (órgano de la neurona que recoge la luz). Los rabdómeros siempre se disponen de la misma forma en todos los omatidios, los rabdómeros de R7 o R8 en el centro (según la profundidad de la sección de retina que se esté observando), estando los de R1 a R6 alrededor de el de R7 o R8, formando un trapecoide. Alrededor de esta estructura trapecoidal se encuentran los cuerpos neuronales de cada uno de los rabdómeros y las mitocondrias se encuentran en la periferia de los cuerpos neuronales. La degeneración neuronal se puede detectar con la disrupción de la morfología explicada y cuando es muy acusada con la desaparición de neuronas individuales (Katz y Minke, 2009).

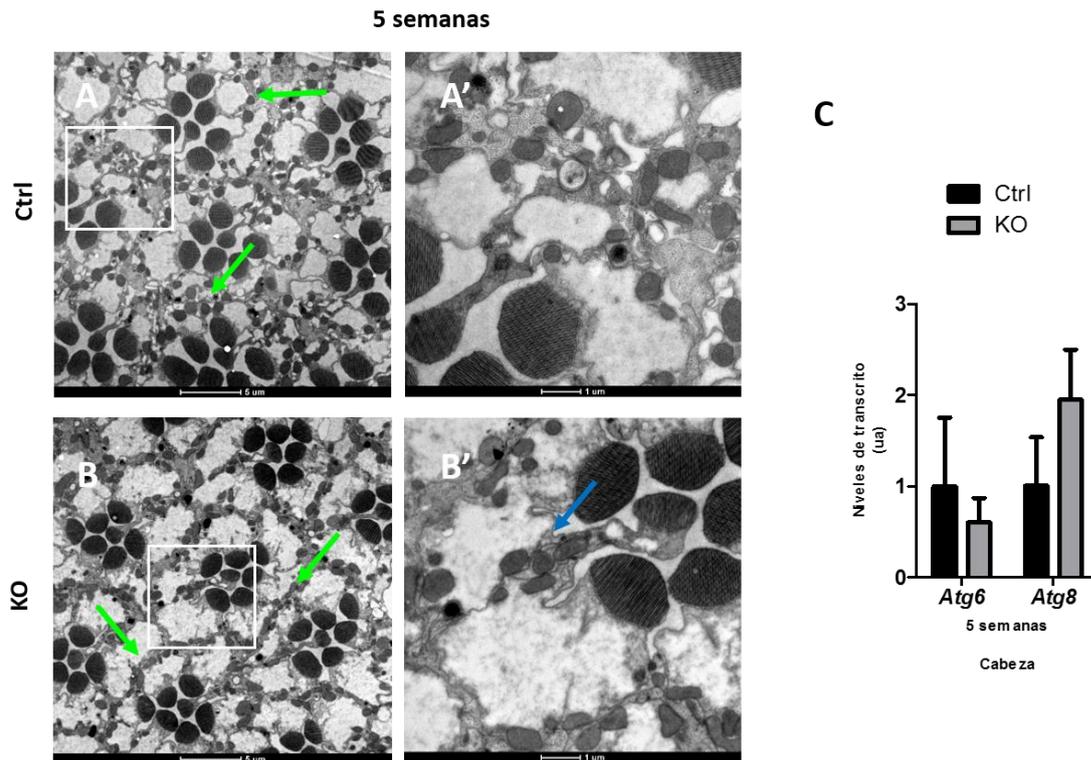
En la Figura 5 se presentan estas secciones transversales ultrafinas de retina de moscas de 1 semana de vida de las dos cepas analizadas. En las Figuras 5.A y 5' se observa que las moscas Ctrl muestran la estructura típica del omatidio explicada, 7 rabdómeros en el centro conectados a sus respectivos cuerpos neuronales, con las mitocondrias en la periferia de los cuerpos neuronales señaladas con flechas amarillas en la Figura 5.A'. En las moscas KO (Figura 5.B y B') esta estructura también se conserva, pero se observan un mayor número de mitocondrias y con tamaños extremos, ya sean más pequeños o más grandes, comparado con las moscas Ctrl (flechas amarillas). Además de esta alteración del tamaño, en las moscas KO se observan numerosos eventos de mitofagia (señalados con flechas rojas en la Figura 5.B'), en los que las mitocondrias están envueltas por vesículas de doble membrana (lisosomas).

Dadas las implicaciones en el balance energético de la célula que supone una mitofagia aumentada, y la importancia que esto puede tener en enfermedades neurodegenerativas como CMT, se decidió analizar los niveles de expresión de los genes *Atg6* (*autophagy-related*) y *Atg8* en cabezas de moscas de las cepas Ctrl y KO, ya que estos genes han sido usados como marcadores de mitofagia en otros estudios (Kandul et al., 2016). En la Figura 5.C se muestran los niveles relativos de transcrito de los genes *Atg6* y *Atg8*. No se observaron diferencias significativas entre los niveles de expresión de estos genes entre las cepas Ctrl y KO. Por otro lado, no se observa una desestructuración de los rabdómeros ni pérdida de cuerpos neuronales individuales, por lo que no hay indicios de neurodegeneración en el modelo KO.



**Figura 5.** Secciones transversales de retina del modelo KO comparados con los del Ctrl y niveles de expresión de genes de autofagia en este tejido de moscas de 1 semana. A y A') Los omatidios de las moscas Ctrl presentan la típica estructura trapezoide con las mitocondrias en una localización periférica y un mismo tamaño (flechas amarillas). B y B') Los omatidios del modelo KO presentan numerosas mitocondrias con tamaños extremos (flechas amarillas) y frecuentes eventos de mitofagia señalados con flechas rojas. C) Media de los niveles de transcrito de los genes *Atg6* y *Atg8* de autofagia en la cabeza de moscas Ctrl y KO de 1 semana de vida con sus respectivos errores estándar, relativizándose a 1 los valores del Ctrl. Se aplicó la prueba T de Student. N=3 (20 cabezas de moscas de 3 tubos distintos de cada cepa). ua=unidades arbitrarias.

Se llevaron a cabo los mismos estudios de la retina de las moscas KO y Ctrl a 5 semanas de vida. En la Figura 6 se muestran las secciones ultrafinas analizadas en el microscopio electrónico. La retina del modelo KO (Figura 6.B) a 5 semanas presenta también un mayor número de mitocondrias que la retina de las moscas Ctrl (Figura 6.A), además estas mitocondrias se encuentran alineadas en la membrana plasmática de los cuerpos neuronales en el modelo KO (marcadas con flechas verdes en la Figura 6.B), mientras que en el Ctrl las mitocondrias se encuentran en la periferia de las células y distribuidas de manera más aleatoria (marcadas con flechas verdes en la Figura 6.A). También cabe destacar que otras mitocondrias de la retina del modelo KO pierden la localización periférica, encontrándose más cerca de lo habitual del centro del omatidio (marcadas con flechas azules en la Figura 6.B'). También se analizaron los niveles de expresión de los genes *Atg6* y *Atg8*, que se muestran en la Figura 6.C. Al igual que a 1 semana, no se observaron diferencias significativas entre los niveles de transcritos de estos genes en la cepa Ctrl y la KO, aunque sí que se observa una mayor variabilidad en los niveles de expresión de estos a esta edad en ambas cepas.



**Figura 6.** Secciones transversales de retina del modelo KO comparados con los del Ctrl y niveles de expresión de genes de autofagia en este tejido a 5 semanas de vida. A y A') Las moscas Ctrl presentan la típica estructura trapezoide de un omatidio normal, las mitocondrias tienen una localización periférica (flechas verdes). B y B') Los omatidios del modelo KO presentan numerosas mitocondrias alineadas en la membrana plasmática de los cuerpos neuronales (flechas verdes) mientras que otras han perdido la localización periférica, situándose cerca del centro de la estructura formada por los 7 rabdómeros (flecha azul). C) Media de los niveles de transcrito de los genes *Atg6* y *Atg8* de autofagia en la cabeza de moscas Ctrl y KO de 5 semanas de vida con sus respectivos errores estándar, relativizándose a 1 los valores del Ctrl, se aplica la prueba T de Student. N=3 (20 cabezas de moscas de 3 tubos distintos de cada cepa). ua=unidades arbitrarias.

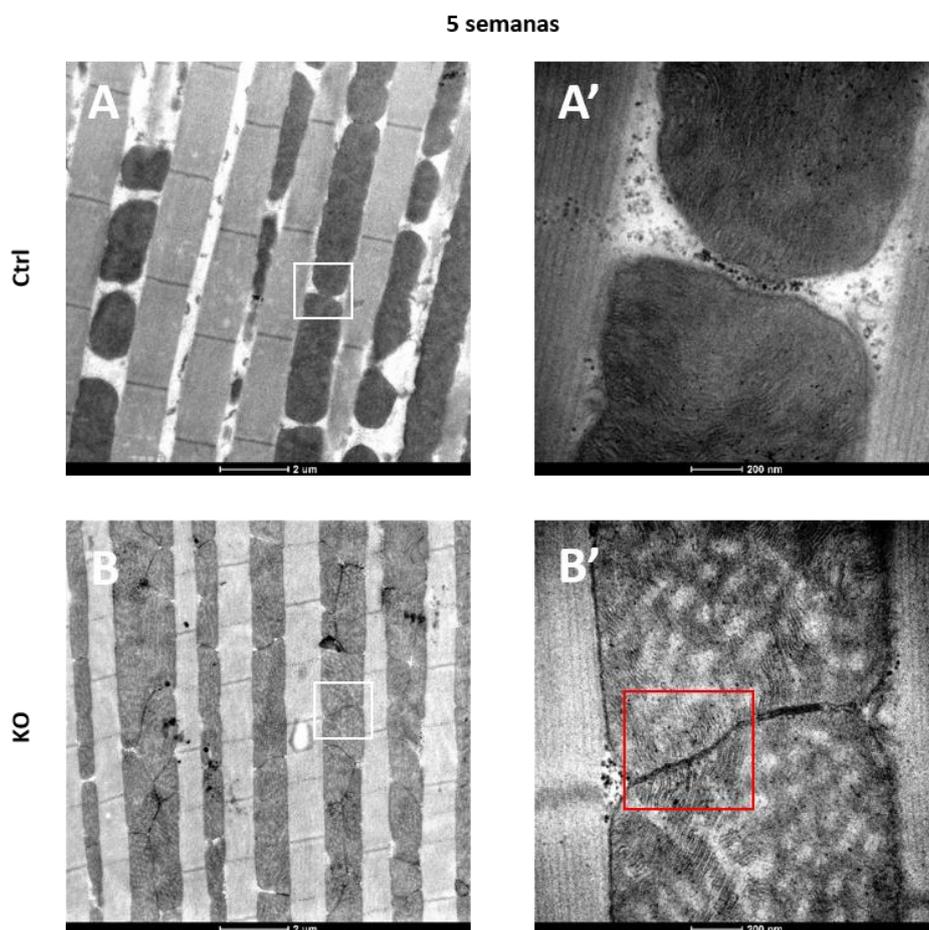
#### 4.4. La ausencia del gen *Gdap1* provoca cambios en la bioenergética mitocondrial del músculo de *D. melanogaster*

A continuación, se exploró el tejido muscular, un tejido excelente para el estudio de la dinámica mitocondrial por distintos motivos. Este tejido tiene una gran cantidad de mitocondrias en hileras entre las miofibrillas musculares, ya que tiene una elevada demanda energética y como otros trabajos han demostrado la implicación de GDAP1 en la dinámica mitocondrial (Niemman 2005; López del Amo, 2015), el tejido muscular es el ideal para observar cambios en la red mitocondrial provocados por la ausencia de *Gdap1*. Para el estudio de este tejido se realizaron cortes longitudinales ultrafinos de los músculos indirectos del vuelo de moscas de 1 y 5 semanas de vida.

A 1 semana se observó que el modelo KO presentaba mitocondrias más elongadas que el Ctrl (imágenes no mostradas), pero a 5 semanas se observaron diferencias más evidentes. En la Figura 7 se muestran las secciones longitudinales de los músculos indirectos del vuelo de moscas de 5 semanas de las cepas Ctrl y KO. Como ya fue descrito por Oda et al. (2012) en las moscas Ctrl las mitocondrias forman hileras entre las miofibrillas y tienen una morfología alargada que se incrementa con la edad (Figura 7.A y A'). En el modelo KO (Figura 7.B y B') se observan las

siguientes diferencias con el Ctrl: las mitocondrias se encuentran más cerca unas de otras, más apelmazadas y se observan numerosas uniones inter-mitocondriales (Figura 7.B') como las descritas por Picard et al. (2015). En estas uniones, las crestas de las mitocondrias adyacentes se alinean de forma perpendicular a la unión inter-mitocondrial, existiendo una coordinación de las membranas internas de las mitocondrias adyacentes (en rojo se enmarca una de estas alineaciones en la Figura 7.B'). Estas uniones se ven dinámicamente moduladas por la bioenergética mitocondrial. Cabe comentar que los pequeños puntos que se observan en los cortes histológicos son precipitados de osmio, reactivo usado para post-fijar las muestras.

Por el gran parecido de las estructuras comentadas con las descritas por Picard et al. (2015), puede que la falta de *Gdap1* provoque cambios en la energética mitocondrial del músculo de *D. melanogaster* y desencadene la reestructuración de la membrana mitocondrial interna para sortear dicha deficiencia energética.



**Figura 7.** Cortes longitudinales de los músculos indirectos del vuelo en los que se evalúa la morfología mitocondrial de moscas de las cepas Ctrl y KO de 5 semanas de vida. A y A') El Ctrl presenta mitocondrias con forma alargada entre las miofibrillas, entre las mitocondrias se observan espacios que respetan la identidad individual de estas. B y B') En el modelo KO se observan mitocondrias más apelmazadas y numerosas uniones inter-mitocondriales en las que las crestas de las membranas internas de las mitocondrias adyacentes se alinean de forma perpendicular a la unión (alineación enmarcada en rojo).

#### 4.5. Alteraciones de la ruta de la insulina en el modelo KO para *Gdap1* en *D. melanogaster*

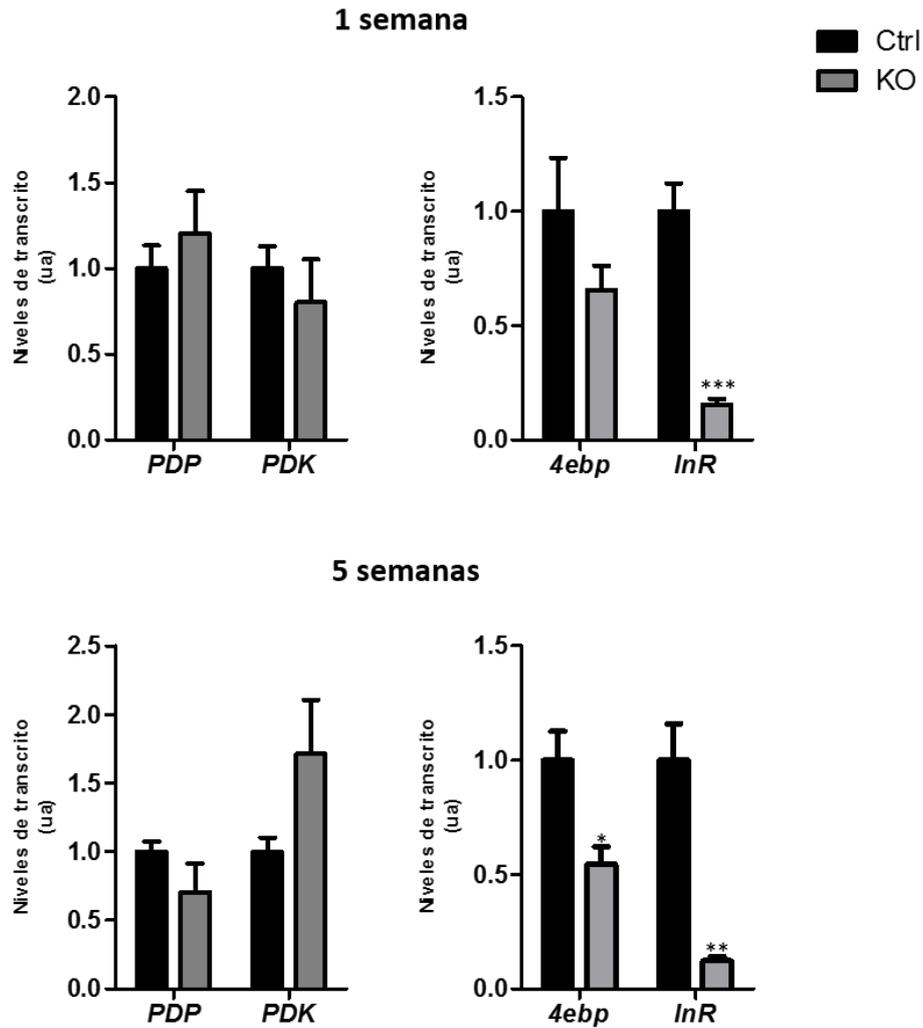
Dadas las alteraciones en el uso apropiado de los sustratos energéticos y en la ruta de la insulina encontradas en los anteriores modelos de *Gdap1* en *D. melanogaster* (López et al., 2017), se analizó la expresión génica de *PDP* (*pyruvate dehydrogenase phosphatase*), *PDK* (*pyruvate dehydrogenase kinase*), *4ebp* (*4e-binding protein*) y el receptor de insulina (*InR*) de moscas de 1 y 5 semanas de vida.

*PDP* y *PDK* son dos enzimas que controlan la actividad de *PDC* (*pyruvate dehydrogenase complex*), enzima que transforma el piruvato a acetil-CoA, de manera que regula la entrada de productos glicolíticos al ciclo de Krebs.

*4ebp* y *InR* son marcadores de la supresión de la ruta de la insulina, ya que son genes dianas del factor de transcripción *FOXO* (*forkhead box O*), y su expresión se ve aumentada cuando hay una deficiencia en la señalización de la ruta de insulina (Puig et al., 2003).

En la Figura 8 se muestran los niveles relativos de transcritos de los genes *PDP*, *PDK*, *4ebp* y *InR* de moscas Ctrl y KO de 1 y 5 semanas de vida. No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *PDP* y *PDK* a ninguno de los tiempos. Sin embargo, a 1 semana ya se encuentran diferencias significativas en los niveles de transcritos del gen *InR* (p-valor<0,001), el receptor de insulina se encuentra menos expresado, de manera muy acusada, en el modelo KO respecto al Ctrl; aunque no se encuentran diferencias significativas en los niveles de expresión de *4ebp* a esta edad. A 5 semanas, tanto la expresión de *4ebp* (p-valor<0,05) como de *InR* (p-valor<0,01) están reducidas de una manera significativa, siendo mucho más clara la reducción en el segundo caso.

Por lo tanto, el modelo KO presenta una expresión reducida de los genes *4ebp* y *InR*, algo sorprendente y totalmente opuesto a lo que se conocía (López del Amo et al., 2017). Estos resultados sugieren que la falta de *Gdap1* podría desencadenar una mayor señalización de la ruta de la insulina.



**Figura 8.** Niveles de expresión de los genes *PDP*, *PDK*, *4ebp* y *InR* de las cepas Ctrl y KO a 1 y 5 semanas de vida. Se relativizaron a 1 los valores de expresión del Ctrl y se aplicó la prueba T de Student. N=4 para cada uno de los genes y tiempos (15 moscas de 4 tubos distintos). Se representa la media de los niveles de transcrito con su respectivo error estándar. \*p-valor<0,05. \*\*p-valor<0,01. \*\*\*p-valor<0,001. ua=unidades arbitrarias.

## 5. DISCUSIÓN

## 5. DISCUSIÓN

El modelo KO para *Gdap1* en *D. melanogaster* generado en el laboratorio quedó validado mediante PCR y digestión, y con la ausencia de expresión del transcrito medido por PCRc.

Los estudios realizados revelaron una mayor esperanza de vida en las moscas KO respecto a las moscas Ctrl, ya que las moscas KO vivieron 30 días más que las moscas Ctrl. Se sabe que *Gdap1* es una proteína muy fuertemente expresada en el intestino de *D. melanogaster* (López del Amo et al., 2015), y dicho órgano está muy relacionado con la regulación del tiempo de vida de las moscas (Jasper, 2015). Es por esto que la ausencia de la proteína *Gdap1* en *D. melanogaster* podría disparar la activación de rutas relacionadas con la vida de las moscas en el intestino, lo que podría explicar la mayor esperanza de vida observada en las moscas KO.

En los experimentos para el estudio de la capacidad locomotora, se necesitarían más número de réplicas del ensayo de geotaxis negativa como ya se ha comentado, por lo que no se puede concluir acerca del estado biofísico del modelo. Si bien es cierto, las tendencias parecen indicar que la falta de *Gdap1* no afectaría a la capacidad locomotora en nuestro modelo.

En cuanto a las alteraciones mitocondriales observadas en la retina del modelo KO, algunas están en línea con los anteriores modelos de *Gdap1* en *D. melanogaster* (López et al., 2015) y en el modelo KO para *GDAP1* en *Mus musculus* (Barneo Muñoz et al., 2015). Se observan mitocondrias con tamaños muy variados en moscas jóvenes (1 semana) y deslocalizadas en moscas envejecidas (5 semanas), estas alteraciones en la dinámica mitocondrial están relacionadas con las funciones de estos orgánulos, como son el transporte y el manejo del calcio en el proceso denominado SOCE o *store-operated calcium entry* (Pla-Martin et al., 2013). Sin embargo hay nuevas observaciones, como el elevado número de mitocondrias en la retina de moscas KO jóvenes, esto puede que sea debido a la función indirecta de *Gdap1* en la fisión mitocondrial, de manera que su ausencia altera la dinámica mitocondrial aunque no se puede describir de qué modo. Relacionado con esto, los numerosos eventos de autofagia observados en estas mismas moscas podría deberse a la acumulación de mitocondrias dañadas que necesitan ser eliminadas, estas observaciones también está en línea con las de otros autores (Barneo Muñoz et al., 2015). Cabe comentar que aunque no se han observado niveles elevados de los genes de autofagia *Atg6* y *Atg8* en el modelo KO, puede que la mitofagia observada sea llevada a cabo por otros mecanismos que involucran otras proteínas como algunos de los explicados en Glick et al. (2010).

En cuanto a los contactos entre mitocondrias observados en el tejido muscular de las moscas KO envejecidas, se observaron el mismo tipo de estructuras descritas recientemente por otros autores (Picard et al., 2015), en las que las crestas correspondientes a las membranas internas de las mitocondrias están alineadas. Esto puede ser el inicio de una vía inexplorada en relación con *Gdap1*: la ausencia de *Gdap1* podría alterar la bioenergética mitocondrial con el tiempo, y provocar una reorganización de la membrana mitocondrial interna para intentar compensar dicho defecto.

También cabe destacar que se ve una importante alteración de la ruta de la insulina en el modelo KO estudiado. Los genes marcadores de supresión de la ruta de la insulina, *4ebp* y *InR*, se encuentran significativamente menos expresados en el modelo KO respecto al Ctrl. Estos dos genes son dianas transcripcionales de FOXO, un regulador de la transcripción que es translocado al núcleo para ejercer su función cuando hay deficiencias en la ruta de la insulina (Puig et al., 2003). Relacionado con esto, los contactos mitocondria-RE, a través de las membranas asociadas

a las mitocondrias (MAMs), son un importante modulador de la señalización de la insulina; una reducción de estos contactos causa defectos en la señalización de la insulina (Tubbs et al., 2014). Asimismo, como se ha comentado, la unión mitocondria-RE es precisamente una de las funciones de GDAP1, habiéndose demostrado que la sobreexpresión de esta proteína aumenta los contactos de estos orgánulos, mientras que el silenciamiento del gen mediante ARNi reduce la cantidad de contactos (Pla-Martín et al., 2013; López del Amo et al., 2017).

Sin embargo, en los anteriores modelos de *Gdap1* en *D. melanogaster*, *4ebp* y *InR* estaban significativamente más expresados, tanto cuando se sobreexpresaba como cuando se silenciaba *Gdap1*, lo que indicaba un deficiencia en la señalización de la insulina (López del Amo et al., 2017). En el modelo KO, sin embargo, parece que la ruta de la insulina también está alterada pero en sentido opuesto al de los anteriores modelos de *Gdap1* en *D. melanogaster*, por lo que para comprender la relación entre la ausencia total de *Gdap1* y las alteraciones la ruta de la insulina en este modelo sería necesario el estudio de muchos más genes de esta ruta tan compleja. Pero la alteración de los niveles de expresión de estos dos genes son un buen punto de partida, pues son un indicativo claro, puesto que se observan grandes diferencias en los niveles de transcritos, ya que *InR* se expresa mucho menos en el modelo KO, comparado con el Ctrl.

Es importante comparar los anteriores modelos de *Gdap1* en *D. melanogaster*, en los que se silenciaba y sobreexpresaba *Gdap1* (López del Amo et al., 2015; López del Amo et al., 2017), y el modelo KO para *Gdap1* en *D. melanogaster* que se ha caracterizado en este trabajo; las diferencias observadas entre estos modelos tanto en los ensayos biofísicos, como en los cortes histológicos, como en las alteraciones metabólicas llaman la atención. Cabe resaltar que el modelo publicado silenciaba *Gdap1* de manera inducida (*Gal4/UAS*) y dirigida a tejidos específicos en algunos casos, y en el modelo KO presentado, la expresión es nula en todos los tejidos y desde el inicio del desarrollo. Como ha ocurrido en otros estudios los resultados obtenidos usando diferentes aproximaciones para provocar la pérdida de la función de una proteína, no correlacionan y estas diferencias suelen reflejar aspectos biológicos importantes (Housden et al., 2017).

En el caso del modelo en el que se silencia *Gdap1*, se observa un fenotipo más agresivo de neurodegeneración cuando se silencia específicamente en la retina, degeneración muscular cuando se silencia en el músculo y disminución de la capacidad locomotora cuando se silencia en todo el organismo. Sin embargo en el modelo KO para *Gdap1* no se ha observado neurodegeneración en las secciones de retina y las tendencias de los datos del ensayo de geotaxis negativa parecen indicar que la falta total de *Gdap1* no afecta a la capacidad locomotora en el modelo KO.

Esto pone de manifiesto la necesidad de interpretar cautelosamente los resultados y la importancia de generar distintos modelos (sobre un mismo gen) para concluir de forma más acertada. Por ejemplo, un estudio en pez cebra compara los resultados obtenidos con modelos de silenciamiento respecto a los obtenidos por mutaciones deletéreas, todos relacionados con el gen *egfl7* (Rossi et al., 2015). En este trabajo, los modelos de silenciamiento tenían un fenotipo vascular mucho más agresivo que el observado en los mutantes. En el estudio se demuestra mediante transcriptómica y proteómica que las alteraciones en genes concretos, eran distintas en las diferentes aproximaciones. Estos genes eran capaces de compensar, al menos parcialmente, la pérdida total de la proteína *egfl7* en los modelos mutantes, dando lugar a un fenotipo menos severo en estos. En otro estudio se encuentran diferencias similares entre estos dos tipos de modelos, en el estudio del gen *Ppara* en ratón (De Souza et al., 2006).

Por todo esto, puede que en el modelo KO que se ha estudiado haya mecanismos que compensen la falta total de *Gdap1*, mecanismos que serían inexistentes en el modelo de silenciamiento de este gen previamente comentado (López del Amo et al., 2015); y que estos mecanismos compensatorios resulten en un fenotipo menos severo en el modelo KO y en una modificación distinta de las rutas metabólicas según el modelo. Esto invita a estudiar los modelos en mayor profundidad y desvelar procesos biológicos relevantes en los que *Gdap1* está involucrado.

En resumen, el modelo KO para *Gdap1* en *D. melanogaster* estudiado se puede considerar útil para ayudar al entendimiento de la patofisiología detrás de las mutaciones de *GDAP1*, conocimientos necesarios para el descubrimiento de nuevos biomarcadores y tratamientos para la enfermedad de CMT.

## **6. CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

Tras la validación y caracterización inicial del modelo KO para *Gdap1* en *D. melanogaster*, las conclusiones que se pueden extraer son las siguientes:

- El modelo KO está generado correctamente, esto se comprobó confirmando la inserción específica del *attP* y la expresión nula del gen tras la confirmación por PCRc.
- El modelo KO tiene una mayor esperanza de vida que las moscas Ctrl, y según parecen indicar las tendencias del ensayo de geotaxis negativa, la falta total de *Gdap1* en el modelo no afectaría a su capacidad locomotora.
- La ausencia total de expresión del gen *Gdap1* altera la red mitocondrial de la retina del modelo KO, provocando una alteración del tamaño de las mitocondrias y una deslocalización de las mismas.
- La ausencia de *Gdap1* en el modelo KO altera la bioenergética mitocondrial en el músculo de *D. melanogaster* causando una reorganización de la membrana mitocondrial interna, que intenta sortear los defectos en la homeostasis mitocondrial.
- El modelo KO para *Gdap1* presenta alteraciones en los niveles de expresión de genes involucrados en la ruta de la insulina. La falta de *Gdap1* resulta en niveles reducidos de transcrito para los genes *4ebp* y *InR*, sugiriendo una hiperactivación de la ruta de la insulina.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

AMMAR, N., NELIS, E., MERLINI, L., BARIŠIĆ, N., AMOURI, R., CEUTERICK, C., MARTIN, J.J., TIMMERMAN, V., HENTATI, F. & DE JONGHE, P. (2003). Identification of novel GDAP1 mutations causing autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscular Disorders*, 13(9): 720-728.

BAENA-LÓPEZ, L. A., ALEXANDRE, C., MITCHELL, A., PASAKARNIS, L. & VINCENT, J. P. (2013). Accelerated homologous recombination and subsequent genome modification in *Drosophila*. *Development*, 140(23): 4818-4825.

BARISIC, N., CLAEYS, K. G., SIROTKOVIĆ-SKERLEV, M., LÖFGREN, A., NELIS, E., DE JONGHE, P. & TIMMERMAN, V. (2008). Charcot-Marie-Tooth Disease: A Clinico-genetic Confrontation. *Annals of human genetics*, 72(3): 416-441.

BARNEO-MUÑOZ, M., JUÁREZ, P., CIVERA-TREGÓN, A., YNDRIAGO, L., PLA-MARTIN, D., ZENKER, J., CUEVAS-MARTÍN, C., ESTELA, A., SÁNCHEZ-ARAGÓ, M., FORTEZA-VILA, J., CUEZVA, J. M., CHRAST, R. & PALAU, F. (2015). Lack of GDAP1 induces neuronal calcium and mitochondrial defects in a knockout mouse model of Charcot-Marie-tooth neuropathy. *PLoS Genetics*, 11(4): e1005115.

BIROUK, N., AZZEDINE, H., DUBOURG, O., MURIEL, M. P., BENOMAR, A., HAMADOUCHE, T., MAISONOBE, T., OUAZZANI, R., BRICE, A., YAHYAOU, M., CHKILI, T. & LE GUERN, ERIC. (2003). Phenotypical features of a Moroccan family with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease associated with the S194X mutation in the GDAP1 gene. *Archives of neurology*, 60(4): 598-604.

BRAATHEN, G. J., SAND, J. C., LOBATO, A., HØYER, H. & RUSSELL, M. B. (2011). Genetic epidemiology of Charcot-Marie-Tooth in the general population. *European journal of neurology*, 18(1): 39-48.

CASSEREAU, J., CHEVROLLIER, A., GUEGUEN, N., MALINGE, M. C., LETOURNEL, F., NICOLAS, G., RICHARD, L., FERRE, M., VERNY, C., DUBAS, F., PROCACCIO, V., AMATI-BONNEAU, P., BONNEAU, D. & REYNIER, P. (2009). Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics*, 10(2): 145.

CASSO, D., RAMÍREZ-WEBER, F. A. & KORNBERG, T. B. (1999). GFP-tagged balancer chromosomes for *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of development*, 88(2): 229-232.

CHIHARA, T., LUGINBUHL, D. & LUO, L. (2007). Cytoplasmic and mitochondrial protein translation in axonal and dendritic terminal arborization. *Nature neuroscience*, 10(7): 828-837.

CORNETT, K. M., MENEZES, M. P., BRAY, P., HALAKI, M., SHY, R. R., YUM, S. W., ESTILOW, T., MORONI, I., FOSCAN, M., PAGLIANO, E., PAREYSON, D., LAURÁ, M., BHANDARI, T., MUNTONI, F., REILLY, M.M., FINKEL, R.S., SOWDEN, J. & EICHINGER, K.J. (2016). Phenotypic variability of childhood Charcot-Marie-Tooth disease. *JAMA neurology*, 73(6): 645-651.

CHUNG, K. W., HYUN, Y. S., LEE, H. J., JUNG, H. K., KOO, H., YOO, J. H., KIM, S.B., PARK, C.I., KIM, H.N. & CHOI, B. O. (2011). Two recessive intermediate Charcot-Marie-Tooth patients with GDAP1 mutations. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 16(2): 143-146.

DE SOUZA, A. T., DAI, X., SPENCER, A. G., REPPEN, T., MENZIE, A., ROESCH, P. L., HE, Y., CAGUYONG, M. J., BLOOMER, S., HERWEIJER, H., WOLFF, J. A., HAGSTROM, J. E., LEWIS, D.L., LINSLEY, P. S. & ULRICH, R. G. (2006). Transcriptional and phenotypic comparisons of Ppara knockout and siRNA knockdown mice. *Nucleic acids research*, 34(16): 4486-4494.

- DUBOURG, O., AZZEDINE, H., VERNY, C., DUROSIER, G., BIROUK, N., GOUIDER, R., SALIH, M., BOUHOUCHE, A., THIAM, A., GRID, D., MAYER, M., RUBERG, M., TAZIR, M., BRICE, A. & LEGUERN, E. (2006). Autosomal-recessive forms of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular medicine*, 8(1-2): 75-85.
- GLICK, D., BARTH, S. & MACLEOD, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1): 3-12.
- HOUSDEN, B. E., MUHAR, M., GEMBERLING, M., GERSBACH, C. A., STAINIER, D. Y., SEYDOUX, G., MOHR, S.E., ZUBER, J. & PERRIMON, N. (2017). Loss-of-function genetic tools for animal models: cross-species and cross-platform differences. *Nature Reviews Genetics*, 18(1): 24-40.
- HUBER, N., GUIMARAES, S., SCHRADER, M., SUTER, U. & NIEMANN, A. (2013). Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutants of GDAP1 dissociate its roles in peroxisomal and mitochondrial fission. *EMBO reports*, 14(6): 545-552.
- ITOH, K., NAKAMURA, K., IJIMA, M. & SESAKI, H. (2013). Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends in cell biology*, 23(2): 64-71.
- JANI-ACSADI, A., KRAJEWSKI, K. & SHY, M. E. (2008). Charcot-Marie-Tooth neuropathies: diagnosis and management. *Seminars in neurology*, 28(2): 185-194.
- JANSSENS, K., GOETHALS, S., ATKINSON, D., ERMANOSKA, B., FRANSEN, E., JORDANOVA, A., AUER-GRUMBACH, M., ASSELBERGH, B. & TIMMERMAN, V. (2014). Human Rab7 mutation mimics features of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2B in *Drosophila*. *Neurobiology of disease*, 65: 211-219.
- JASPER, H. (2015). Exploring the physiology and pathology of aging in the intestine of *Drosophila melanogaster*. *Invertebrate reproduction & development*, 59(sup1): 51-58.
- KANDUL, N. P., ZHANG, T., HAY, B. A. & GUO, M. (2016). Selective removal of deletion-bearing mitochondrial DNA in heteroplasmic *Drosophila*. *Nature Communications*, 7: 1-11
- KASAHARA, A. & SCORRANO, L. (2014). Mitochondria: from cell death executioners to regulators of cell differentiation. *Trends in cell biology*, 24(12): 761-770.
- KATZ, B. & MINKE, B. (2009). *Drosophila* photoreceptors and signaling mechanisms. *Frontiers in cellular neuroscience*, 3: 1-17.
- KENNERSON, M. L., YIU, E. M., CHUANG, D. T., KIDAMBI, A., TSO, S. C., LY, C., CHAUDHRY, R., DREW, A. P., RANCE, G., DELATYCKI, M. B., ZÜCHNER, S., RYAN, M. M. & NICHOLSON, G. A. (2013). A new locus for X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX6) is caused by mutations in the pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 3 (PDK3) gene. *Human molecular genetics*, 22(7): 1404-1416.
- KOSTERA-PRUSZCZYK, A., KOSINSKA, J., POLLAK, A., STAWINSKI, P., WALCZAK, A., WASILEWSKA, K., POTULSKA-CHROMIK, A., SZCZUDLIK, P., KAMINSKA, A. & PLOSKI, R. (2014). Exome sequencing reveals mutations in MFN2 and GDAP1 in severe Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 19(3): 242-245.
- LETSOU, A. & BOHMANN, D. (2005). Small flies—big discoveries: nearly a century of *Drosophila* genetics and development. *Developmental dynamics*, 232(3): 526-528.
- LIN, K. P., SOONG, B. W., YANG, C. C., HUANG, L. W., CHANG, M. H., LEE, I. H., ANTONELLIS, A. & LEE, Y. C. (2011). The mutational spectrum in a cohort of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 among the Han Chinese in Taiwan. *PLoS One*, 6(12): e29393.

- LIU, H., NAKAGAWA, T., KANEMATSU, T., UCHIDA, T. & TSUJI, S. (1999). Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene. *Journal of neurochemistry*, 72(5): 1781-1790.
- 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.
- LÓPEZ DEL AMO, V., SECO-CERVERA, M., GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L., WHITWORTH, A. J., PALLARDÓ, F. V. & GALINDO, M. I. (2015). 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.
- LÓPEZ DEL AMO, V., PALOMINO-SCHÄTZLEIN, M., SECO-CERVERA, M., GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L., PALLARDÓ, F. V., PINEDA-LUCENA, A. & GALINDO, M. I. (2017). A *Drosophila* model of GDAP1 function reveals the involvement of insulin signalling in the mitochondria-dependent neuromuscular degeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863(3): 801-809.
- LU, B. (2009). Mitochondrial dynamics and neurodegeneration. *Current neurology and neuroscience reports*, 9(3): 212-219.
- MANGANELLI, F., PISCIOTTA, C., NOLANO, M., CAPPONI, S., GEROLDI, A., TOPA, A., BELLONE, E., SULLS, A., MANDICH, P. & SANTORO, L. (2012). A novel autosomal dominant GDAP1 mutation in an Italian CMT2 family. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 17(3): 351-355.
- MARCO, A., CUESTA, A., PEDROLA, L., PALAU, F. & MARÍN, I. (2004). Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Molecular biology and evolution*, 21(1): 176-187.
- NEUROMUSCULAR DISEASE CENTER, 2017. *Hereditary motor sensory neuropathies: CMT*, visto el 5 de Junio de 2017. <http://neuromuscular.wustl.edu>
- 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. *The Journal of Cell Biology*, 170(7): 1067-1078.
- ODA, Y., YUI, R., SAKAMOTO, K., KITA, K. & MATSUURA, E.T. (2012). Age-related changes in the activities of respiratory chain complexes and mitochondrial morphology in *Drosophila*. *Mitochondrion*, 12(2):345-351.
- 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.
- PAREYSON, D., SCAIOLI, V. & LAURA, M. (2006). Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular medicine*, 8(1-2): 3-22.
- PAREYSON, D. & MARCHESI, C. (2009). Diagnosis, natural history, and management of Charcot–Marie–Tooth disease. *The Lancet Neurology*, 8(7): 654-667.
- PEDROLA, L., ESPERT, A., VALDÉS-SÁNCHEZ, T., SÁNCHEZ-PIRIS, M., SIRKOWSKI, E. E., SCHERER, S. S., FARIÑAS, I. & PALAU, F. (2008). Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(2): 679-689.
- PICARD, M., MCMANUS, M. J., CSORDÁS, G., VÁRNAI, P., DORN II, G. W., WILLIAMS, D., HAJNÓCZKY, G. & WALLACE, D. C. (2015). Trans-mitochondrial coordination of cristae at regulated membrane junctions. *Nature communications*, 6:6259

- PLA-MARTÍN, D., RUEDA, C. B., ESTELA, A., SÁNCHEZ-PIRIS, M., GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, P., TRABA, J., DE LA FUENTE, S., SCORRANO, L., RENAU-PIQUERAS, K., ÁLVAREZ, J., SATRÚSTEGUI, J. & PALAU, F. (2013). Silencing of the Charcot–Marie–Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca<sup>2+</sup> homeostasis by reducing store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Neurobiology of disease*, 55: 140-151.
- PUIG, O., MARR, M.T., RUHF, M.L. & TJIAN, R. (2003). Control of cell number by Drosophila FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes & development*, 17: 2006-2020.
- ROSSI, A., KONTARAKIS, Z., GERRI, C., NOLTE, H., HÖLPER, S., KRÜGER, M. & STAINIER, D. Y. (2015). Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*, 524(7564): 230-233.
- SCHON, E. A. & MANFREDI, G. (2003). Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *The Journal of clinical investigation*, 111(3): 303-312.
- STORKEBAUM, E., LEITÃO-GONÇALVES, R., GODENSCHWEGE, T., NANGLE, L., MEJIA, M., BOSMANS, I., OOMS, T., JACOBS, A., VAN DIJCK, P., YANG, X. L., SCHIMMEL, P., NORGA, K., TIMMERMAN, V., CALLAERTS, P. & JORDANOVA, A. (2009). Dominant mutations in the tyrosyl-tRNA synthetase gene recapitulate in Drosophila features of human Charcot–Marie–Tooth neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28): 11782-11787.
- TUBBS, E., THEUREY, P., VIAL, G., BENDRID, N., BRAVARD, A., CHAUVIN, M. A., JI-CAO, J., ZOULIM, F., BARTOSCH, B., OVIZE, M., VIDAL, H. & RIEUSSET, J. (2014). Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes*, 63(10): 3279-3294.
- VITAL, A., LATOUR, P., SOLE, G., FERRER, X., ROUANET, M., TISON, F., VITAL, C. & GOIZET, C. (2012). A French family with Charcot–Marie–Tooth disease related to simultaneous heterozygous MFN2 and GDAP1 mutations. *Neuromuscular Disorders*, 22(8): 735-741.
- YOUNG, P., DE JONGHE, P., STÖGBAUER, F. & BUTTERFASS-BAHLOUL, T. (2008). Treatment for Charcot-Marie-Tooth disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2: CD006052.