

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

orsai, un nuevo regulador del metabolismo basal en Drosophila melanogaster

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Magdalena Fernandez Acosta

Directora de tesis: Dra. María Fernanda Ceriani Consejera de Estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir; Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires, CONICET.

Buenos Aires, 2019

orsai, un nuevo regulador del metabolismo en Drosophila melanogaster

orsai (osi), un gen hasta ahora no caracterizado de *Drosophila melanogaster*, codifica una pequeña proteína con un solo dominio reconocible, el LYR. Las proteínas que poseen un dominio LYR se caracterizan por ser parte estructural de los complejos mitocondriales o reguladores del funcionamiento de dichas organelas. En humanos, el mal funcionamiento de estas proteínas provoca serios problemas metabólicos con consecuencias que van desde retraso en el crecimiento e incapacidad de procesar lípidos hasta la muerte prematura.

Esta tesis está enfocada en caracterizar la función de *orsai*, cuyo mutante posee menor tamaño que un individuo control, sufre arresto en el desarrollo y muerte en etapas tempranas del desarrollo larval. La disfunción de *orsai* provoca defectos estructurales mitocondriales y metabólicos diversos, que culminan en células incapaces de crecer apropiadamente. OSI posee una localización nuclear en la mayor parte de los tejidos analizados, y su disfunción no afecta el ensamblado de los complejos mitocondriales, por lo que proponemos que la función de *orsai* está asociada a la regulación del funcionamiento de la cadena respiratoria. A través de experimentos de complementación génica, se ha logrado rescatar parte de los fenotipos provocados por la falta de *orsai* tanto a nivel celular como del organismo mediante la sobreexpresión de la proteína humana ETFRF1 (LYR5m).

Proponemos así que la deficiencia de *orsai* en *Drosophila melanogaster* sería un buen modelo de estudio para las enfermedades asociadas a la desregulación de proteínas LYR en humanos.

Palabras clave: Drosophila melanogaster, mitocondria, metabolismo, LYR, arresto en el desarrollo

orsai, a new regulator of basal metabolism in Drosophila melanogaster

orsai (osi), an uncharacterized gene of *Drosophila melanogaster*, encodes a small protein with a LYR domain. Proteins carrying this domain are often a structural part of the mitochondrial complexes (particularly, Complex I) or regulators of mitochondrial function. In humans, mutations in these proteins are associated to severe metabolic defects, ranging from impaired growth and inability to process lipids to death at an early age. *osi*'s mutants, on the other hand, are smaller than controls; its development is arrested at first instar larva and die at that stage. *osi* downregulation generates mitochondrial fragmentation and metabolic stress, all of which prevents cells growth, eventually causing organismal death. OSI is located in the nucleus and its downregulation does not prevent the ensemble of mitochondrial function. Through experiments of genetic complementation, we rescued some of the phenotypes associated to *osi* dysfunction, both at a cellular level and an organismal level, through overexpression of human protein ETFRF1 (LYR5). As a result, we propose that osi mutant described herein may be a useful model to study metabolic diseases triggered by defective LYR protein function in humans.

Keywords: Drosophila melanogaster, mitochondria, metabolism, LYR, developmental arrest

Agradezco a la FCEN por prepararme; al CONICET por el apoyo económico; a la FIL por alojarme; a MFC por enseñarme y a todo el 109/224/flyroom por trabajar y crecer conmigo. A RC por las ideas y la microscopía electrónica. A SP por el R y a JIR por el ATR.

A ella, por llenarme las manos de flores y a él, por llenarme la cabeza de estrellas

A todxs aquellxs que me dan herramientas para irme y razones para volver

<u>Índice</u>

"Pero, ¿qué es la traición? Traición significa abandonar las propias filas. Traición significa abandonar las propias filas e ir hacia lo desconocido. Sabina no conoce nada más bello que ir hacia lo desconocido."

Milan Kundera (originalmente en checo)

Índice	6
Introducción	. 10
Manejo de Drosophila melanogaster	. 11
Nomenclatura genética de Drosophila melanogaster	. 11
Cromosomas balanceadores	. 11
El sistema Gal4/UAS	. 12
Figura 1	. 13
Los RNAi	. 13
Ciclo de vida	. 13
Figura 2:	. 14
Figura 3	. 15
Procesos hormonales de interés	. 15
Regulación de la muda	. 15
Figura 4	. 16
Nutrición y desarrollo	. 17
Figura 5	. 18
Procesos celulares de interés	. 19
La vía de AKT/TOR, el control canónico del crecimiento celular	. 19
Figura 6	. 20
La endorreplicación	. 21
Funcionamiento mitocondrial	. 21
Figura 7	. 23
Antecedentes	. 24
Figura 8	. 25
Las proteínas LYRm	. 25
Figura 9	. 27
El metabolismo del acetato, la beta oxidación de los ácidos grasos y su relación con las proteínas LYR	. 27
Figura 10	. 28
Electron transfer flavoproteins, su papel en el metabolismo y consecuencias de su falta	. 29
Figura 11	. 30

Comunicación núcleo-mitocondria: señalización directa y retrógrada	
Figura 12	
Figura 13	
Figura 14	
D. melanogaster como modelo de estudio de enfermedades humanas	
Objetivo general	
Objetivos particulares	
Materiales y métodos	
Líneas utilizadas	
Mantenimiento de las líneas	
Tipos de comida empleada	
Mediciones de tamaño larval	
Determinación del estadio larval por morfología de los ganchos bucales	
Morfología de tráqueas	40
Complementación de la dieta con 20-hidroxi-ecdisona	40
Complementación de la dieta con hierro	40
Tinciones de inmunohistoquímica	
Tinciones de inmunohistoquímica Soluciones utilizadas	41 41
Tinciones de inmunohistoquímica Soluciones utilizadas Anticuerpos utilizados	
Tinciones de inmunohistoquímica Soluciones utilizadas Anticuerpos utilizados Tinción con MitoTracker™ Red	
Tinciones de inmunohistoquímica Soluciones utilizadas Anticuerpos utilizados Tinción con MitoTracker™ Red Extracción de mitocondrias para la medición de ATP	
Tinciones de inmunohistoquímica Soluciones utilizadas Anticuerpos utilizados Tinción con MitoTracker™ Red Extracción de mitocondrias para la medición de ATP Medidas de concentración de proteínas	
Tinciones de inmunohistoquímica Soluciones utilizadas Anticuerpos utilizados Tinción con MitoTracker™ Red Extracción de mitocondrias para la medición de ATP Medidas de concentración de proteínas Medición del ATP mitocondrial	
Tinciones de inmunohistoquímica Soluciones utilizadas Anticuerpos utilizados Tinción con MitoTracker™ Red Extracción de mitocondrias para la medición de ATP Medidas de concentración de proteínas Medición del ATP mitocondrial Medición de los niveles de ROS	
Tinciones de inmunohistoquímica Soluciones utilizadas Anticuerpos utilizados Tinción con MitoTracker™ Red Extracción de mitocondrias para la medición de ATP Medidas de concentración de proteínas Medición del ATP mitocondrial Medición de los niveles de ROS Medición de tamaño de organelas	
Tinciones de inmunohistoquímica Soluciones utilizadas Anticuerpos utilizados Tinción con MitoTracker™ Red Extracción de mitocondrias para la medición de ATP Medidas de concentración de proteínas Medición del ATP mitocondrial Medición de los niveles de ROS Medición de los niveles de ROS Cuantificación de tamaño de organelas	
Tinciones de inmunohistoquímica Soluciones utilizadas Anticuerpos utilizados Tinción con MitoTracker™ Red Extracción de mitocondrias para la medición de ATP Medidas de concentración de proteínas Medición del ATP mitocondrial Medición de los niveles de ROS Medición de los niveles de ROS Cuantificación de tamaño de organelas Cuantificación de tamaño y número de células a partir del disco de ala Generación de clones mitóticos	41 41 41 42 42 42 42 42 42 42 42 42 42 43 43 43
Tinciones de inmunohistoquímica Soluciones utilizadas Anticuerpos utilizados Tinción con MitoTracker™ Red Extracción de mitocondrias para la medición de ATP Medidas de concentración de proteínas Medición del ATP mitocondrial Medición de los niveles de ROS Medición de tamaño de organelas Cuantificación de tamaño y número de células a partir del disco de ala Generación de clones mitóticos Figura 15	41 41 41 42 42 42 42 42 42 42 42 42 42 43 43 43 43 43 44
Tinciones de inmunohistoquímica	41 41 41 42 42 42 42 42 42 42 42 42 42 43 43 43 43 43 43 43
Tinciones de inmunohistoquímica	41 41 41 42 42 42 42 42 42 42 42 42 42 43 43 43 43 43 43 43 43 43 43
Tinciones de inmunohistoquímica	41 41 41 42 42 42 42 42 42 42 42 42 42 42 43 43 43 43 43 43 43 43 43 43 50

Figura 19	57
Figura 20	59
Figura 21	63
Figura 22	64
Figura 23	66
Figura 24	67
Figura 25	68
Figura 26	71
Figura 27	72
Figura 28	73
Discusión	74
Orsai, una nueva proteína nuclear fundamental para la supervivencia celular	75
El modelo	75
Figura 29	78
Figura 30	79
Figura 31	80
Puesta a prueba del modelo	81
Análisis de los fenotipos asociados a la disfunción de orsai en distintos tejidos	82
La función bioquímica de Orsai, aún un enigma	86
Orsai y las enfermedades metabólicas	87
Apéndice	89
Análisis estadístico	90
Figuras suplementarias	104
Figura Suplementaria 1	104
Figura Suplementaria 2	105
Figura Suplementaria 3	106
Referencias	107
Agradecimientos	128

Introducción

"Larva quiere decir máscara, pero también fantasma"

Julio Cortázar

Manejo de Drosophila melanogaster

Nomenclatura genética de Drosophila melanogaster

D. melanogaster posee 4 cromosomas, tres autosomas y un par de cromosomas sexual. El par 4 normalmente es ignorado por ser pequeño y contener pocos genes. La forma de escribir los genotipos de *D. melanogaster* se encuentra estandarizada. Cada cromosoma se separa con punto y coma ";" enumerando los pares cromosómicos del 1 al 4. Los cromosomas homólogos se separan con una barra "/". Si el genotipo para un cromosoma corresponde a lo esperado en una mosca silvestre se indica con un "+". Si algún cromosoma presenta sólo alelos salvajes, se suele ignorar esos cromosomas. A continuación, se transcribe un ejemplo de genotipo extendido y resumido:

Cromosoma						
Х	II	III	IV			
+/+	actina Gal4/actina Gal4	UAS-GFP/UAS-GFP	+/+	genotipo extendido		
actina Gal4/UAS-GFP				genotipo resumido		

Por otra parte, si lo que se quiere dejar de manifiesto es que una línea directora está dirigiendo la expresión de una determinada construcción, puede ponerse de manifiesto utilizando el símbolo ">" como en el siguiente ejemplo:

actinaGal4>osi^{RNAi}

donde el (UAS) osi^{RNAi} se expresa bajo el patrón de actina.

Cromosomas balanceadores

Los cromosomas balanceadores son cromosomas que poseen múltiples inversiones, lo que provoca una muy baja tasa de recombinación homóloga, permitiendo así saber exactamente qué elemento ocupa cada cromosoma, y facilitar el seguimiento de las combinaciones al generar nuevas líneas de interés. Además, cuentan con marcadores fenotípicos que los hacen fácilmente reconocibles. Algunas versiones incluso poseen marcadores fluorescentes, lo cual permite distinguir diferentes genotipos en estadío larval a través de una lupa de fluorescencia. Estos cromosomas poseen mutaciones recesivas letales, evitando que se formen homocigotas para el balanceador. Esto trae la ventaja de que permite la construcción y mantenimiento de nuevas líneas que portan mutaciones letales, tal como la línea mutante P[UAS]100B/CyO°GFP, la cual permite mantener una línea que sería de otra forma letal (P[UAS]100B / P[UAS]100B). En el transcurso de esta tesis se utilizaron principalmente los balanceadores CyOGFP (II), TM3GFP (III) y los marcadores Sp (II) y Dr (III).

El sistema Gal4/UAS

Una de las herramientas genéticas fundamentales para la realización de trabajos en *Drosophila* es el sistema UAS/Gal4 para la expresión diferencial de genes de forma tejidoespecífica ¹. Gal4 es un factor de transcripción de levaduras, el cual actúa como un regulador de genes tales como gal10 y gal1 inducido por galactosa ^{2 3 4}. Gal4 regula la transcripción de estos genes mediante unión directa a 4 sitios localizados

entre esos loci ⁵. Estos sitios definen elementos de secuencias de activación (promotores) río arriba (UAS, *Upstream Activating Sequences*) análogos a elementos *enhancers* definidos en múltiples eucariotas, los cuales son esenciales para la activación transcripcional de los genes regulados por Gal4.

La expresión génica dirigida en un patrón espaciotemporal específico ha resultado ser una de las técnicas más poderosas para caracterizar la función génica *in vivo*.

Debido a que la transcripción de un gen blanco o *target* requiere de la presencia de Gal4, su ausencia en dichas líneas las mantiene en un estado de silencio transcripcional. Para activar su transcripción, las líneas con el gen target se cruzan con moscas que expresan Gal4 en un patrón particular de acuerdo al promotor que dirige su expresión. La progenie resultante expresará el gen blanco en un patrón transcripcional que refleje el patrón de Gal4 dado por su promotor específico (**Figura. 1**).

Esta estrategia, en la cual los dos componentes del sistema, el gen blanco y la línea directora de expresión se mantienen como líneas parentales separadas, posee numerosas ventajas. En primer lugar, la inactividad transcripcional de la línea parental que porta el gen target permite que se generen líneas transgénicas para productos génicos que pueden ser desde completamente inocuos hasta letales, o que provoquen cualquier grado de reducción de la viabilidad.

Una ventaja adicional es la posibilidad de dirigir la expresión de cualquier gen target en patrones espaciales y temporales diferentes poniendo en contexto de distintas fuentes de Gal4. Teniendo en cuenta que la expresión del gen blanco es dependiente del patrón de expresión espacial y temporal del promotor que controla la expresión de Gal4, la diversidad de secuencias regulatorias genómicas y trampas de potenciadores (*enhancer*

traps) de Gal4 generados por la comunidad de *Drosophila* representa otro beneficio del sistema.



<u>Figura 1:</u> Sistema UAS-Gal4. Se muestra un esquema del funcionamiento del sistema de expresión heteróloga por excelencia de Drosophila. Dos líneas transgénicas, una portando una construcción que alberga un promotor particular controlando la expresión del factor de transcripción Gal4, y otra cuya construcción porta la secuencia UAS controlando un gen de interés, se cruzan para obtener en la progenie moscas que expresen el gen de interés en el patrón espacial y temporal del promotor utilizado. (Modelo de Brand y Perrimon¹)

Los RNAi

En esta tesis se utilizará un RNAi (ARN de interferencia, por su sigla en inglés) para disminuir la expresión del gen *orsai*. El RNAi es una molécula de RNA que inhibe la expresión génica de un gen de interés mediante la neutralización de su mRNA ⁶. Para incrementar el efecto del mecanismo de silenciamiento mediante RNAi se lo suele expresar junto con la enzima *dicer* II (*dcr*) que aumenta su efectividad.

Ciclo de vida

Una de las mayores ventajas de *Drosophila melanogaster* es el ciclo de vida corto y ampliamente caracterizado que posee. 24 horas después de la puesta de huevos u ovipuesta (*after egg lying* o AEL) los huevos eclosionan en forma de larvas de estadio 1. A partir de este momento los tiempos del desarrollo variaran en función de la microbiota ⁷ presente en la dieta, la temperatura ⁸ y de la calidad de la comida, especialmente de la concentración de aminoácidos ⁹. En el caso de los stocks criados a 25°C en comida incluyendo azúcares y proteínas tal como la utilizada para mantener las líneas en el laboratorio (ver Materiales y Métodos) el estadio larval 1 dura alrededor de 24 horas,

luego de lo cual ocurre la primera muda, y 24 horas después ocurre la segunda. El tercer estadio larval es el más largo y dura alrededor de 2 días para convertirse en pupa. Previo a pupar, las larvas de estadio 3 comienzan dejan de comer y pasan a un comportamiento de "*wandering*", que implica que se alejan de la comida y comienzan a moverse por las paredes del recipiente en el que se encuentren buscando un lugar para pupar ¹⁰.

Durante el estadio de pupa ocurre la metamorfosis completa del individuo, que emerge como adulto reproductivamente activo.



Figura 2: Ciclo de vida de Drosophila melanogaster, tomado de Ong et al.¹¹

Es importante tener en cuenta en las sucesivas mudas los individuos van modificando sus características físicas, lo cual permite distinguir en que estadio se encuentra un organismo más allá de su tamaño corporal. Por ejemplo, a lo largo del desarrollo, las larvas van desarrollando su sistema traqueal, y en estadío 3 evierten sus espiráculos y los esclerotizan, volviéndolos naranjas. Sin embargo, para distinguir especialmente una larva de estadio 1 de una de estadio 2 la forma inequívoca consiste en describir sus ganchos bucales. Estas estructuras esclerotizadas crecen con cada muda y varían su cantidad y forma de dientes. Esto se muestra en la **Figura 3**.



<u>Figura 3:</u> Fotografias representativas de ganchos bucales de larvas de estadio 1, 2 y 3 respectivamente. Tomado de Pérez-Chiesa et al.¹²

Procesos hormonales de interés

Regulación de la muda

La duración de los diferentes estadios de vida de D. melanogaster está regulada por las llamadas hormonas de la muda. La hormona encargada de disparar las mudas es la ecdisona, la cual se produce en la glándula protorácica ¹³ y está regulada por la hormona juvenil (JH) y la hormona protoracicotrópica (PTTH). Los pulsos de hormona ecdisona no solamente regulan las mudas sino los cambios de comportamiento, como por ejemplo, abandonar el alimento y comenzar el comportamiento de "vagabundeo" (wandering) es decir alejarse de la comida en busca de un lugar para pupar ¹⁴. Las variaciones temporales de las diferentes hormonas están mostradas en la Figura 3. El proceso de muda comienza con la secreción de la hormona protoracicotrófica (PTTH) en respuesta a estímulos ambientales. La PTTH estimula la producción de ecdisona por la glándula protorácica. Esta hormona no se libera en su forma activa, sino que debe ser activada por una hemo-oxigenasa de las mitocondrias de los tejidos periféricos, tal como el intestino y el cuerpo graso ¹⁵. En este proceso la ecdisona cambia a su forma fisiológicamente activa, la 20-hidroxiecdisona. Por otro lado, los niveles de hormona juvenil (JH) controlan el tipo de muda que se realiza, mientras los niveles de JH sean altos los individuos mudan a estadios juveniles, y sólo cuando los niveles de JH sean lo bastante bajos comenzará la pupación ¹⁶. Esta bajada de niveles se consigue liberando a la hemolinfa una esterasa degradadora de JH una vez que se ha alcanzado el peso ¹⁷ crítico.



Figura 4: La glándula del anillo o "ring gland" está formada por la corpora allata, responsable de la producción de hormona juvenil, y la glándula protorácica, encargada de la producción de ecdisona. Las variaciones en el tiempo del peso corporal, los niveles en hemolinfa de ecdisona y las hormonas reguladoras JH y PTTH se muestran en el gráfico inferior.

Debido a que los insectos adultos no crecen, y que las mudas son eventos metabólicamente demandantes, cada evento tiene un peso mínimo viable necesario para ocurrir y prevenir que los animales muden cuando aún no pueden afrontar el gasto metabólico asociado ^{18 19}.

La actividad de la vía de TOR (*target of rapamycine*) y de la versión de *Drosophila* de la insulina (Dilps, *Drosophila like peptides*) en la glándula protorácica regulan la liberación de la ecdisona ²⁰. Estas vías están a su vez reguladas por las condiciones nutricionales del organismo. La ecdisona reduce la velocidad de crecimiento celular y promueve la metamorfosis, lo cual significa que un individuo que tiene un pico de ecdisona prematuro será más pequeño que uno con el pico en el momento correcto.

Nutrición y desarrollo

La via de la insulina (IIS) en *D. melanogaster* regula el tiempo de crecimiento en un diálogo con el sistema endócrino ^{21 22 23 24 25}. La liberación de insulina por las células productoras de insulina (IPC) está regulada por la disponibilidad de nutrientes en el organismo. El cuerpo graso actúa como regulador de la secreción de insulina a través de las Señales Derivadas del Cuerpo Graso (FDS, *fat body derived signals*) ^{26–29}. En el cuerpo graso, a su vez, la vía de TOR actúa como sensor de los nutrientes que ingresan desde el intestino y responde, principalmente, a los valores de ATP y aminoácidos a tal punto que la deprivación de únicamente aminoácidos alcanza para retrasar el desarrollo ²⁶. En el cuerpo graso la ecdisona es convertida a su forma activa, la 20HE. Si los niveles de aminoácidos no son lo bastante altos, no se activan los genes que la convierten (*shade*, es lo que ocurre cuando se baja la expresión de *slimfast*, el transportador de aminoácidos). Esto muestra que no solo la liberación de ecdisona sino su activación están reguladas directamente por el estado nutricional del individuo ³⁰.

El hecho de que la insulina regula la liberación de ecdisona desde la PG ^{21,22} completa la relación entre el sensado del estado nutricional del individuo y los tiempos del desarrollo. La vía de TOR/insulina a su vez regula la producción de insulina a través de la regulación del tamaño de las células de la PG.

Algo interesante a mencionar es que un estudio de la expresión de *dilp2* demostró que no solo se expresa en las neuronas IPC (*insulin producing cells*) sino también en las tráqueas. La perturbación de la señalización de la 20HE en las tráqueas genera un fenotipo de hambreado, inhibiendo las señales de insulina de las IPC y generando defectos de crecimiento y de acumulación de reservas ³⁰.



<u>Figura 5: Panel superior:</u> La concentración de aminoácidos y azúcares en la hemolinfa regulan el crecimiento celular y organísmico a través de la vía de TOR/insulina. Tomado de Danielsen et al. ³¹. Los dilps circulantes activan la vía de TOR y promueven el crecimiento celular a través de sus efectores (en gris) que incluyen AKT/Pi3K que activan la transcripción de FOXO. La rama de TOR (efectores, en verde) es activada por los aminoácidos que se importan a través de slimfast, un transportador de membrana. La vía de la insulina regula TOR a través de la regulación de AKT. Los efectores finales de

ambas vías se encuentran en naranja. <u>Panel inferior:</u> Esquema de la convergencia de señales humorales que coordinan el crecimiento sistémico. Tomado de Buhler et al. ³⁰. La ecdisona y la insulina funcionan en un doble bucle de regulación para modular el crecimiento normal del organismo y los tiempos de desarrollo. La ecdisona se produce en la PG y es convertida a 20HE a través de SHADE en el cuerpo graso, cuya expresión solo ocurre en presencia de un umbral de aminoácidos provenientes del intestino. 20HE contribuye a la regulación de la IIS a través de la acción de diversos tejidos periféricos, tales como el cuerpo graso y la tráquea. A su vez, IIS promueve la producción de ecdisona en la PG.

Procesos celulares de interés

La vía de AKT/TOR, el control canónico del crecimiento celular

La vía de AKT/TOR es una de las vías más importantes de control del metabolismo, el crecimiento y la supervivencia.

Esta vía responde a los niveles de aminoácidos, ATP e insulina, ligando el estado nutricional del individuo a procesos de crecimiento y desarrollo. Inicialmente, la insulina se une a su receptor, provocando el reclutamiento de Pi3K, que convierte el PIP₂ (phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate) a PIP₃ (phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate); AKT se une a PIP₃ y es fosforilado por primera vez y por tanto activado parcialmente ^{32 33} ³⁴. La fosforilación de AKT es esencial para la activación de TOR ^{35 36}. Luego de esta primera activación, AKT es traslocado a la membrana plasmática, donde es fosforilado por mTOR2. AKT activado activa a su vez a mTOR1, que luego activa a S6K (ribosomal protein S6 kinase 1) e inactiva a 4EBP (eIF4E-binding proteins). Al activarse, mTOR1 inicia un loop negativo sobre AKT(Revisado por 37). mTOR es la única subunidad funcional compartida por mTOR1 y mTOR2, lo que hace suponer que hay un equilibrio a la vez que una competencia entre ambos complejos por dicha subunidad ³⁸. mTOR1 funciona como sensor de nutrición/energía/niveles de ROS y controla la síntesis proteica ^{39,40}. Su actividad es regulada por insulina, distintos factores de crecimiento, niveles de aminoácidos, estrés oxidativo y estímulos mecánicos ⁴¹. mTOR2 es un regulador del citoesqueleto en respuesta a los estímulos de crecimiento 42,43. A su vez, fosforila a AKT impactando sobre el crecimiento y la supervivencia 44.

S6K promueve la síntesis lipídica y proteica ^{45,46} mientras que 4EBP es un inhibidor de la síntesis proteica dependiente de *cap* ⁴⁷. Se considera que S6K controla el tamaño celular pero no la progresión del ciclo celular⁴⁸ ; mientras que 4EBP controla la proliferación

celular pero no el tamaño celular 49.

Teleman et al. ⁵⁰ demostró que los niveles de transcripto de 4EBP están fuertemente elevados bajo condiciones de estrés ambiental, particularmente ante la falta de aminoácidos o hambreado. En estas condiciones, los individuos con bajos niveles de 4EBP mueren más rápido que los controles debido a que queman con gran velocidad sus reservas de lípidos, remarcando la importancia de 4EBP en este metabolismo. Por otro lado, PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) es uno de los principales puntos de control de la vía de TOR. PTEN es una fosfatasa que convierte PIP₃ a PIP₂, inhibiendo la activación de los efectores de Pi3K (como AKT). La depleción de PTEN lleva a la activación constitutiva de la vía de TOR, y se ha demostrado su papel en el desarrollo de tumores y desórdenes metabólicos ^{51,52}.



<u>Figura 6:</u> Panel izquierdo: Diagrama simplificado de la vía de AKT/TOR. Esta vía es regulada por la concentración de aminoácidos, glucosa/ATP e insulina. La unión de glucosa a su receptor activa Pi3K, que media la fosforilación de AKT. Estos dos son los principales activadores de la vía de TOR, que regula el crecimiento y proliferación celular. PTEN es el principal regulador negativo de la vía ya que evita la fosforilación de AKT. Los factores de la vía de la insulina se encuentran en azul, los componentes de la vía de TOR, en rojo y los componentes de la vía de respuesta a AMPK, en verde. Tomado de Edgar²⁰. **Panel derecho:** Tomado de Ohanna et al. ⁴⁸. Representación esquemática de las vías dependientes e independientes de TOR regulando el tamaño celular y la progresión del ciclo celular. Las vías que regulan el ciclo celular se representan en verde, aquellas que regulan el tamaño celular, en rojo. El ancho de las flechas representa la contribución relativa de cada vía.

La endorreplicación

La endorreplicación es una forma de poliploidía programada. Es uno de los mecanismos que permiten a la célula crecer en funcionalidad y tamaño sin completar el ciclo celular. Este proceso es común a varios organismos, aunque suele presentarse sólo en ciertos tejidos (Revisado en ⁵³). En *Drosophila*, este mecanismo se utiliza para incrementar el volumen celular y es responsable de buena parte del crecimiento larval. Es especialmente importante en tejidos tales como el cuerpo graso, las glándulas salivales, la epidermis, el intestino y los túbulos de Malpighi, las tráqueas y la glía perineural ^{54 55}.

En cuanto al cuerpo graso y su funcionamiento, se considera que sus células sensan el número de endorreplicaciones como una medida del tamaño alcanzado. Una vez más, el nivel de aminoácidos presentes en la dieta parece jugar un papel importante: bajos niveles pueden arrestar los ciclos de endorreplicación ⁵⁶. Sin embargo, y a pesar de esto, la detención de los ciclos de endorreplicacion en el cuerpo graso no alcanza para frenar el tiempo del desarrollo, y los individuos llegan a mudar correctamente. Esto podría indicar que el número de endociclos es un factor de control importante pero no determinante de la regulación del tamaño corporal ²⁶.

Funcionamiento mitocondrial

Las mitocondrias son las encargadas de generar la mayor parte del ATP que consumen las células y por tanto su "salud" juega un papel fundamental en la viabilidad de la célula y del organismo. Las mitocondrias son organelas altamente dinámicas, las cuales atraviesan constantes ciclos de fusión y fisión para acomodarse a las demandas metabólicas de la célula ^{57–59} así como para hacer revisiones de su potencial de membrana y eliminar aquellas que no cumplan con los estándares de calidad necesarios ⁶⁰. En Westermann ⁶¹ se discute que la bibliografía disponible apunta a sostener la idea de una relación funcional fuerte entre las adaptaciones de la morfología mitocondrial y los cambios en la demanda del metabolismo energético incluso en células de mamífero. Se considera que las redes de mitocondrias interconectadas son más frecuentes en células respiratoriamente activas mientras que las pequeñas y fragmentadas son típicas de células quiescentes.

Un correcto equilibrio entre los mecanismos de fusión y fisión son fundamentales para el correcto funcionamiento mitocondrial. La fusión permite la mezcla del contenido mitocondrial y genera redes de mitocondrias, lo cual es utilizado como respuesta a una demanda energética mayor o como mecanismo regular de control de calidad del potencial de membrana. Una falla en los mecanismos de fusión resulta en una pérdida de la capacidad respiratoria de la mitocondria, ya que no serán eliminadas las mitocondrias dañadas ⁶². En Rambold *et al.* 2011 ⁶³ se muestra que la fisión está inhibida durante el hambreado. Esto promueve la elongación de la mitocondria, lo que las protege de la degradación. Esto permitiría maximizar la producción de energía durante la privación de nutrientes ⁶⁴.

En cuanto a la fisión, genera nuevas organelas a ser heredadas por células hijas, permite la liberación de factores proapoptóticos ⁶⁵ ⁶⁶ etc. Además, la fisión permite eliminar organelas con bajo potencial de membrana vía mitofagia. Este mecanismo permite un punto de control de la salud de las organelas y el mantenimiento de la capacidad respiratoria ^{67,68}.

En la mitocondria el ATP es producido a través de la cadena de transporte de electrones (ETC). En un momento de óptimo funcionamiento como se muestra en la **Figura 7** los electrones provenientes del NADH y el FADH2 son transportados desde el complejo mitocondrial 1 (CMI) y el complejo mitocondrial 2 (CMII), respectivamente, hacia el complejo Q, de allí al CMIII y finalmente al CMIV a través del Criptocromo C. El CMV también conocido como ATPasa utiliza el gradiente de electrones generado por la ETC para generar ATP. Lo electrones son cooptados por los grupos H+ y O- para generar agua y el ciclo recomienza.

Sin embargo, en una situación de estrés en la cual la cadena deba producir ATP con una velocidad mayor a la normal, como ser la hiperoxia/ hipoxia/ reoxigenación ^{69 70} provoca que sólo un electrón sea tomado por el grupo O⁻, generando especies reactivas de oxígeno o ROS (por sus siglas en inglés). Estos se generan por el goteo de electrones principalmente a través de los complejos I y III. Estos grupos oxidantes son muy dañinos para la célula debido a su alta reactividad. Atacan las membranas y pueden llegar a comprometer la integridad mitocondrial ⁷⁰. Por estos motivos la célula cuenta con distintos mecanismos de acción frente a los ROS. Existen diversas enzimas encargadas de convertir a los ROS en especies menos reactivas y por tanto que puedan ser eliminadas sin riesgo. La principal de estas enzimas se la conoce como SODII (*superóxido dismutasa*) la cual convierte el HO- en H2O2 y la glutatión peroxidasa (GPX), la cual convierte esta molécula en agua ^{71,72}.

Si bien es cierto que en condiciones normales se producen cantidades basales de ROS, e

22

incluso llegan a ser beneficiosas como moléculas de señalización ⁷³, un exceso de ROS puede llegar a comprometer la integridad de la célula.



<u>Figura 7: Panel superior:</u> Modelo de las adaptaciones morfológicas de las mitocondrias a la actividad respiratoria. Bajo condiciones de baja actividad, las mitocondrias tienden a estar fisionadas. Además, mediante la fisión se eliminan los fragmentos con bajo potencial de membrana. En un contexto de alta demanda metabólica o durante el hambreado, las mitocondrias se fusionan para optimizar su función. Tomado de Westermann ⁶¹. <u>Panel inferior:</u> Flujo de electrones y formación de ROS por la cadena respiratoria. Las ROS se producen por el goteo de electrones que forman superóxido. En

la matriz el superóxido es convertido a peróxido de hidrógeno por la SODI y la SODII. Luego, la GPX transforma estas especies en agua inocua. Tomado de Xinyuan et al.⁷¹.

Antecedentes

Anteriormente en el laboratorio ⁷⁴ se realizó un *screen* de actividad locomotora para encontrar nuevos genes cuya desregulación confiriera susceptibilidad a la neurodegeneración. Los genes considerados *hits* del screen fueron aquellos cuya bajada de función provocó un desmejoramiento de los perfiles de actividad locomotora sólo en individuos envejecidos (no así en jóvenes) Este screen se realizó mediante la inserción al azar de un elemento P en el genoma de *D. melanogaster*.

Uno de los hits positivos del screen fue el llamado mutante 100B, de cuya caracterización parte esta tesis.

Una vez obtenidos los hits positivos se procedió a identificar los genes afectados. Esto se realizó mediante un rescate plasmídico y posterior secuenciación. De esta manera, la inserción P[UAS]100B fue localizada en el cromosoma 2L (ver **Figura 8A**) entre el gen *tweek*⁷⁵ y el *CG6115*.

Una vez ubicado el elemento P se procedió a realizar una PCR para dilucidar si el fenotipo observado se debía a una bajada de los niveles de *tweek* o del *CG6115*. Como se muestra en las **Figuras 8D-E**, la inserción del elemento P[UAS]100B provoca la caída de los niveles del mRNA de CG6115, no afectando los niveles de *tweek*. Concluimos entonces que los fenotipos observados se deben a la desregulación de la expresión del CG6115.

Una vez confirmado que la inserción en estudio afectaba los niveles del CG6115, se procedió a realizar una búsqueda bioinformática para averiguar más acerca de este gen, el cual aún no había sido caracterizado. Este gen codifica para una proteína de 85 aminoácidos en cuya secuencia se identifica un motivo LYR (más información sobre proteínas LYR en la sección correspondiente). Al realizar un alineamiento de secuencia con proteínas de otras especies, se observa una gran conservación en varias especies modelo, incluyendo *Mus musculus, Saccharomyces cerevisiae* e incluso *Homo sapiens* (**Figura 8B, C**). De estas proteínas no hay mucha información disponible, tal como se observa por sus notaciones "*uncharacterized protein*", "*LYR motif containing protein*" pero

todas poseen un dominio LYR y según se predice, una función en el metabolismo energético, tal como es lo usual para este grupo de proteínas (ver sección siguiente).



Figura 8: Mutante P[UAS]100B. A: Diagrama del locus mutante. El elemento P se insertó en el cromosoma 2, brazo L. Uno de los extremos del elemento P se encuentra a 218pb del +1 del CG6115 y el otro extremo a 1323pb del gen tweek. En el diagrama se muestra la localización del elemento P, así como la localización del gen tweek y el CG6115. En violeta se muestra la sección de la secuencia que corresponde a la secuencia atacada por el RNA de interferencia utilizado en esta tesis. B: Alineamiento del CG6115 con proteínas de otras especies. Se observa una gran conservación en diversos organismos modelo incluyendo al ser humano. C: Análisis de las proteínas relacionadas con el CG6115 en distintas especies. Se observa el porcentaje de identidad de secuencia (Identity) y la anotación correspondiente a cada proteína según Uniprot para una identificación inequívoca de las mismas.

Las proteínas LYRm

Las proteínas que contienen el dominio LYR (leucina, tirosina, arginina) son llamadas LYRm por las siglas en inglés "LYR motif" ⁷⁶. Esta superfamilia de proteínas está asociada a diversas funciones de regulación metabólica y gracias a las predicciones de estructura secundaria obtenidas hasta ahora se conoce que poseen una estructura pequeña de hélice alfa hidrofílica.

Como se discute en Angerer 2015⁷⁷ en humanos se han encontrado al menos 10 proteínas LYRm. Algunas de ellas funcionan como subunidades extras (LYRm3/LYRm6) o factores de ensamblaje (LYR7, LYR8) de la cadena de fosforilación oxidativa en los complejos mitocondriales I, II, III y V. También se conoce que juegan un papel en el metabolismo del acetato. Sin embargo, algunas se han encontrado en el citosol o incluso en el núcleo (LYRm1/LYRm4).

De éstas se ha descripto que LYRm1 permite la proliferación de pre-adipocitos e inhibe la apoptosis ⁷⁸ mientras que LYRm4 (*moco* en humanos ⁷⁹) está involucrada en la generación de *clusters* hierro-azufre (cofactores que facilitan el transporte en la ETC, diversas reacciones de catalización y la reparación del ADN ⁸⁰ y el mantenimiento de la homeostasis del hierro) ⁸¹. Dentro de esta familia, es de especial interés la LYRm5 debido a que es la que mayor relación tiene con *orsai* (**Figura 8C**). Muestra, como se vio en la sección anterior, 94% de cobertura y 53% de identidad. LYRm5 forma parte de un grupo de proteínas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y lípidos ramificados (*complex 1 phylogenetic profile protein* -COPP-) ⁸². En *C. elegans* una de estas proteínas está involucrada en el crecimiento post embrionario ^{83 84}. En *Neurospora crassa* se ha encontrado que también está involucrada en la biosíntesis de ácidos grasos específicos mitocondriales ⁸⁵. En humanos, se ha descubierto que esta proteína puede desencadenar apoptosis mediada por mitocondrias en células cancerígenas mediante la regulación de la vía de AKT/PKB ⁸⁶.



<u>Figura 9:</u> Resumen de la localización de las proteínas LYRm descriptas en humanos y eucariotas superiores hasta ahora. Muchas de estas son subunidades o factores de ensamblaje de los complejos mitocondriales. LYRm1 y LYRm4 se encontraron también en el núcleo. LYRm5 es una proteína relacionada al complejo I mitocondrial. La función de algunas de estas proteínas (LYRm1, LYRm2, LYRm9) en mitocondrias aún no ha sido descripta. Los complejos Fe-S están simbolizados por conjuntos de esferas amarillas y naranjas; AF: factor de ensamblaje (assembly factor). Tomado de Angerer⁸⁷.

Finalmente cabe destacar que la falla de muchas de estas proteínas ha sido asociada a diversas enfermedades, tales como la resistencia a insulina ⁸⁸ (LYRm1), hipotonía muscular ⁸⁹ (LYRm3), deficiencias en la cadena de fosforilación oxidativa ⁹⁰ (LYRm4), encefalopatías ⁹¹ (LYRm7), leucoencefalopatia infantil ⁹² (LYRm8), etc.

El metabolismo del acetato, la beta oxidación de los ácidos grasos y su relación con las proteínas LYR

Durante el proceso de beta oxidación en la matriz mitocondrial, las largas cadenas carbonadas de los ácidos grasos (asociados a Coenzima A, es decir, Acil-CoA) son cortadas en cadenas cortas de dos carbonos (acetatos) las cuales, aún unidas a la CoenzimaA forman el AcetilCoA. Este metabolito se une al oxal-acetato para formar citrato e incorporarse al inicio del ciclo de Krebs. El acetilCoA además de degradarse en el ciclo de Krebs puede ingresar a núcleo y participar de la acetilación de la cromatina, mientras que e acetilCoA citosólico participa de la biosíntesis de todo tipo de lípidos. El acetato ligado a la coenzimaA es un metabolito central. Puede ser generado por la oxidación de glucosa, glutamina y ácidos grasos; y es usado para la biosíntesis de nucleótidos, aminoácidos y dos de los principales componentes de las membranas celulares (ácidos grasos y colesterol). Contribuye a la regulación génica al adicionarse a las histonas ⁹³ y numerosos estudios muestran la importancia de este metabolito en el control del crecimiento celular y los procesos proliferativos ⁹⁴.



<u>Figura 10</u>: el acetato es un nodo central del metabolismo del carbono. El acetilCoA tiene numerosas funciones tanto regulatorias como biosintéticas. Puede ser adicionado a las histonas para regular la expresión génica o a otras proteínas para dictar su actividad. El acetilCoA funciona también como intermediario para la generación de ácidos grasos, esteroides y nucleótidos. El acetilCoA es primariamente generado en la mitocondria a través del catabolismo de la glucosa, lípidos y aminoácidos. Tomado de Lyssiotis y Cantley⁹⁵

Dentro de las posibles enfermedades asociadas a la beta oxidación de ácidos grasos y el metabolismo del acetato, se encuentran al menos 22 desordenes diferentes. La mayoría de ellas se caracteriza por hipotonía, miopatías, neuropatías periféricas e hipoglicemia (revisado en ⁹⁶).

Dentro de las proteínas LYRm2, la proteína ACN9 de *S. cerevisiae* está localizada en la intermembrana mitocondrial ⁹⁷. Mutantes con bajos niveles de esta proteína presentan defectos típicos de metabolismo del acetato, sugiriendo que la proteína es esencial para la conversión de acetato y etanol en carbohidratos.

Electron transfer flavoproteins, su papel en el metabolismo y consecuencias de su falta

Los ácidos grasos son metabolizados en la mitocondria por las flavoproteínas de transferencia de electrones (*electron transfer flavoproteins*, ETF) y las enzimas de la betaoxidación (ver **Figura 11**). Una falla en la actividad de las ETF puede desbalancear el funcionamiento de las acilCoAdeshidrogenasas y traer graves consecuencias. Cambios en estas proteínas pueden provocar miopatías lipídicas, las cuales se caracterizan por intolerancia al ejercicio, rabdomiolisis (ruptura de fibras musculares y liberación del contenido celular al torrente sanguíneo) y mioglobinuria (eliminación de hemoglobulina por la orina), atrofia muscular, acidosis metabólica y finalmente fallas de órganos (hígado, corazón, SNC). Este tipo de enfermedades también se genera por problemas en el funcionamiento de la acil-coenzimaA-deshidrogenasa ⁹⁸.



<u>Figura 11</u>: Vía metabólica del metabolismo lipídico en músculo humano con énfasis en la beta oxidación de los ácidos grasos y el papel de las proteínas ETF. ACS: Acetil-CoA sintetasa; ATGL: lipasa de triglicéridos (Adipose triglyceride lipase); DG: Digliceridos; ETF: Electron transport flavoprotein; FABP: proteína de unión a los ácidos grasos (Fatty acid binding protein) ; FFA: ácidos grasos libres (Free fatty acid); LCFAT: ácido graso de cadena larga (Long chain fatty acid); LD: gota de lípido (Lipid droplet); Lipin1-Lipin 1; Q: Coenzima Q; VLCAD: acilCoA deshidrogenasa de cadena muy larga (Very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase); TCA: ácido tricarboxílico (tricarboxylic acid). Tomado de Pennisi et al. ⁹⁹

Dentro de las proteínas LYR, la LYRm5, como ya fue mencionado, es una ETFdeflavinasa, esto es, que desactiva a la ETF. Se la considera parte del grupo de las COPP, proteínas de perfil filogenético de complejo I (Complex I Phylogenetic Profile). A pesar de que estas proteínas son usualmente descriptas como factores de ensamblado y regulación del complejo I mitocondrial, la bajada de función de esta proteína en fibroblastos humanos sólo resulta en una reducción del 20% de la función del CMI ⁸². Es interesante recalcar que tanto las proteínas que se encargan de la degradación de los ácidos grasos ramificados como de los aminoácidos ramificados son también proteínas COPP asociadas a funciones del CMI.

Comunicación núcleo-mitocondria: señalización directa y retrógrada

Las mitocondrias cumplen un papel fundamental en la célula. No solamente son las encargadas de producir la mayor parte del ATP que se requiere para la vida, sino, como ya se ha mencionado, cumplen diversas funciones que abarcan desde la generación de diversos metabolitos intermedios, hasta regular la homeostasis celular de Ca²⁺, señalizar la muerte celular y tomar parte en diversas vías metabólicas.

Por un lado, las mitocondrias, en una situación estándar, cambian su tamaño, número y actividad en función de las demandas metabólicas del organismo; a la vez que la señalización mitocondrial provoca cambios en la expresión génica nuclear ¹⁰⁰. Por otro lado, se sabe que las mitocondrias tienen un genoma propio pero reducido, y que la mayor parte de sus proteínas son producidas en el núcleo y luego importadas, junto con la maquinaria transcripcional necesaria para la expresión de los genes codificados en el genoma mitocondrial ¹⁰¹.Todo esto hace que la comunicación entre el núcleo y la mitocondria deba ser fluida y funcionar correctamente para mantener la salud del organismo. Esta comunicación incluye la señalización anterógrada (del núcleo hacia la mitocondria) y retrógrada (de la mitocondria al núcleo).

Respecto a la primera, se conoce que la expresión de factores nucleares regula la biogénesis y función mitocondrial, la fosforilación oxidativa, la beta oxidación de ácidos grasos y producción de ROS, entre otros ¹⁰². Parte de la red de señalización nuclear incluye a los factores respiratorios nucleares (*nuclear respiratory factor*, NRF) 1 y 2, que se unen a componentes de la cadena respiratoria, y regulan, además, la transcripción de factores mitocondriales, la síntesis de grupos hemo y la síntesis y traslocación de canales iónicos ^{103–105}. Otros factores de transcripción nucleares incluyen a ERR (*estrogen related receptor*) el cual regula la betaoxidacion de ácidos grasos; y Sp1, que regula la transcripción de parte de los complejos respiratorios ¹⁰⁶. Además de ERR, PPAR (*peroxisome proliferation activated receptors*) regula la beta oxidación de ácidos grasos, aunque no la transcripción de proteínas respiratorias ¹⁰².



<u>Figura 12</u>: Esquema del control mitocondrial ejercido por NRF 1 y 2. Estas proteínas contribuyen a la expresión de genes requeridos para la mantención y función de la cadena respiratoria mitocondrial, citocromo C, las subunidades nucleares de los complejos mitocondriales I-V, y la biosíntesis de las enzimas formadoras de grupos hemo. También promueve la expresión de la maquinaria de transcripción y traducción necesarias para producir las subunidades de los complejos mitocondriales codificados en el genoma mitocondrial. Tomado de Whelan y Zuckerbraun¹⁰⁷.

En cuanto a la señalización retrógrada, es la que permite que el núcleo cambie el perfil de expresión de ciertas proteínas en concordancia con el estado bioenergético de las mitocondrias, y es especialmente importante en casos de estrés (revisado por ¹⁰⁸) especialmente en respuesta a bajos niveles de ATP.

Esta vía ha sido principalmente estudiada en levaduras, donde se encuentran los factores RTG 1, 2 y 3 (*ReTroGrade*) que se activan ante la pérdida o daño de DNA mitocondrial

¹⁰⁹. Estas proteínas activan el ciclo del glioxilato y aumentan la beta oxidación de ácidos grasos. Esto cambia al metabolismo de la célula permitiéndole aprovechar una mayor variedad de fuentes de carbono, tal como el acetato, frente a un caso de reducción de la fosforilación oxidativa. Por otra parte la señalización retrógrada inactiva a TOR ¹¹⁰. La vía de TOR regula negativamente los componentes de la vía de señalización retrograda, mientras que el reclutamiento de las proteínas RTG inhibe la vía de TOR (es decir, existe una regulación cruzada).



<u>Figura 13</u>: Esquema de la señalización retrograda. Se muestran las casacadas de señalización posibles en levadura, de izquierda a derecha: grupos hemo, comunicación mediada por péptios, señales de apoptosis, señalización de hierro, respuesta a aminoácidos, traducción mitocondrial, señalización entre genomas, respuesta a drogas, dos vías canónicas de señalización retrógrada y vía de respuesta a hipoxia. Los signos de pregunta representan proteínas aún no descriptas. Tomado de Eisenberg-Bord y Schuldiner¹¹¹

Finalmente se puede mencionar que ciertos metabolitos viajan de la mitocondria hasta el núcleo como una forma de señalización directa entre ambas organelas. Un ejemplo de esto es el AcetilCoA, molécula clave para el ciclo de Krebs y para la síntesis de biomoléculas (ver sección metabolismo del acetato). Se propone que el hecho de que el AcetilCoA se utilice como fuente de acetilación de las histonas nucleares es una forma de mantener el equilibrio entre las funciones anteriormente explicadas ^{93,112}. De esta forma, los promotores acetilados y por tanto activos durante una situación de alta nutrición (correspondiente a altos niveles de AcetilCoA) serán aquellos relacionados con el crecimiento celular ^{111,113}.



<u>Figura 14</u>: Productos mitocondriales que afectan la actividad nuclear de forma directa. Los grupos hemo y Fe-S son utilizados como cofactores por parte de las proteínas nucleares. Una escasa actividad mitocondrial impactará en la función de dichas proteínas. El AcetilCoA y el NAD+ son utilizados por las histona-acetil-transferasas (HAT) y por las Sirtuinas. Las HAT inducen la acetilación de las histonas mientras que las Sirtuinas promueven el silenciamiento. Tomado de Eisenberg-Bord y Schuldiner¹¹¹.

D. melanogaster como modelo de estudio de

enfermedades humanas

D. melanogaster se ha consolidado como un gran modelo de estudios de diversa índole desde hace tiempo. Las ventajas que presenta son numerosas y claras. Para

comenzar, su pequeño tamaño y su ciclo de vida corto permite la manipulación de gran cantidad de individuos en un tiempo mínimo comparado a otros modelos genéticos, como por ejemplo *Mus musculus*.

Por otra parte, su genoma completamente secuenciado ¹¹⁴ ¹¹⁵ y la fecunda comunidad internacional que abona los centros repositores (Bloomington Drosophila Repository Center y Drosophila Genomics Resource Center en EEUU, Vienna Drosophila Resource Center en Austria y Drosophila Genetic Resourse Center en Japón) con herramientas genéticas de todo tipo la vuelve versátil y poderosa. Las herramientas genéticas con que la comunidad de *Drosophila* cuenta y crea continuamente abarcan no solamente todo tipo de mutantes, sino una gran variedad de líneas que cuentan con construcciones del tipo Gal4/ UAS cuya utilidad ha sido explicada en la sección correspondiente, y una base de datos confiable (*flybase.org*).

Respecto al estudio de enfermedades en este modelo, un punto clave es el hecho de que la mayor parte de genes y familias de genes asociadas a enfermedades metabólicas y de origen mitocondrial tienen un correlato en *Drosophila*¹¹⁶¹¹⁷¹¹⁸. Además, los órganos y sistemas de órganos de órganos afectados por diversas enfermedades tales como el músculo esquelético, el músculo cardíaco, el sistema nervioso y glial, etc. tienen su contraparte en *Drosophila*. Además, al ser estos órganos más sencillos que los de un ser humano, se puede analizar la progresión de ciertos aspectos de una enfermedad en gran detalle.

Algunas de las enfermedades que cuentan con aspectos exitosamente modeladas en *D. melanogaster* son por ejemplo la epilepsia mioclónica (MERRF) y la encefalomiopatía (MELAS), en la cual se logró reproducir la sensibilidad a los movimientos bruscos, la parálisis y las convulsiones ^{119 120}. Otro caso de estudio fue la reproducción de la dilatación cardíaca provocada por la baja de función de ciertos componentes del complejo 1 mitocondrial (NDUFS2, NDUFS7, y NDUFC2) ¹²¹. A través del sistema Gal4/UAS combinado con RNAi específicos se ha logrado bajar diversas proteínas del ETC ¹²² y se ha asociado ciertas proteínas a desórdenes en seres humanos, como el caso de *tko25t* (*technical knockout*) una proteína mitocondrial codificada en el núcleo cuya desregulación provoca convulsiones ¹²³.

Las enfermedades mitocondriales se calcula que afectan a 1 de cada 5000 personas y muchas veces no hay tratamientos apropiados ¹²⁴ ¹²⁵. Las fallas mitocondriales no sólo afectan la producción de ATP, sino el metabolismo general de la célula, la producción de

ciertos metabolitos y la señalización celular. Debido a sus necesidades energéticas, los músculos y las neuronas suelen estar particularmente afectadas por las alteraciones mitocondriales. Estas alteraciones pueden llegar a causar cardiomiopatías y enfermedades neurodegenerativas ¹¹⁸.

Debido a las similitudes entre el funcionamiento mitocondrial de *D. melanogaster* y del ser humano, y gracias a las ventajas que han sido explicadas, *D. melanogaster* se ha convertido en un modelo central para el estudio del funcionamiento de estas enfermedades y en la búsqueda de tratamientos para las mismas.

Objetivo general

Desentrañar la función del CG6115, re-nombrado *orsai*, y aportar al estudio de las enfermedades metabólicas en *Drosophila melanogaster*

Objetivos particulares

Caracterizar el mutante de orsai: crecimiento, desarrollo y estado metabólico

Esclarecer la función de *orsai* dentro del organismo: patrón de expresión y fenotipos causados por su desregulación tejido-específica

Esclarecer la función de *orsai* en el metabolismo basal de la célula: ubicación subcelular, autonomía de célula, función bioquímica

Establecer un modelo de estudio de la disfunción de las proteínas LYR en Drosophila melanogaster a partir del mutante de orsai
Materiales y métodos

"Que de lejos parecen moscas"

Kike Ferrari

Líneas utilizadas

Genotipo	Procedencia	n⁰stock	
100b/CyOºGFP	Ceriani Lab	-	
white1118	bloomington	5905	
actina5DGal4	bloomington	4414	
<i>OSÍ^{RNAi}</i>	vienna	29711	
mef2Gal4	bloomington	27390	
<i>btl</i> Gal4	Shilo Lab	-	
<i>p0206</i> Gal4	Eward Lab	-	
UAS- <i>lam</i> GFP	bloomington	7376	
UAS-mitoGFP	bloomington	8442	
<i>MS1096</i> Gal4	bloomington	8860	
hs- <i>flp</i> (x)	bloomington	6	
actina(STOP)Gal4	bloomington	4779	
UAS-GFP	bloomington	5430	
UAS- <i>pten</i> ^{RNAi}	bloomington	8549	
UAS-akt	bloomington	8191	
UAS-SODII	bloomington	24494	
UAS- <i>osi</i> ^{≲™}	-	-	
UAS-LYRm5	-	-	

Mantenimiento de las líneas

Las moscas fueron mantenidas en medio estándar de polenta a 25°C y ciclos de luz:oscuridad de 12:12 horas.

Tipos de comida empleada

Para la realización de los cruzamientos o crecimiento normal de *stocks* las moscas fueron colocadas en comida preparada según indica la **Tabla 1**.

	por litro
Polenta (gramos)	66.5
Levadura (gramos)	20
Nipagen (ml) (solución 185g en 1000ml EtOH 100%)	6.5
Ac. Propiónico (ml)	4
Agar (gramos)	10
Sacarosa (gramos)	40

<u>**Tabla 1:**</u> ingredientes para preparar comida estándar de cría y mantenimiento para Drosophila melanogaster.

Por otra parte, las ovipuestas y los experimentos de sobrevida que requirieron evaluación en comida con bajo contenido proteico fueron realizadas en placas de agar preparada según se indica en la **Tabla 2**.

	por litro
sacarosa (gramos)	30
agar (gramos)	20
nipagin (gramos)	2

Tabla 2: ingredientes para preparar placas de ovipuesta.

En el caso de los experimentos que requirieron evaluar crecimiento en comida con alto contenido proteico, se utilizó la receta de las placas de agar y se les adicionó 20 gr de levadura por litro.

Mediciones de tamaño larval

Para comparar los tamaños larvales hicimos ovipuestas controladas (4-6 horas) y luego permitimos que los individuos crecieran en comida con baja o alta cantidad de proteínas según correspondiera. El área fue medida utilizando el programa ImageJ. Las mediciones fueron tomadas cada 24 horas.

Determinación del estadio larval por morfología de los ganchos bucales

Para determinar el estadio larval, los ganchos bucales de las larvas de interés fueron removidos con una pinza, los cuales fueron colocados en una gota de glicerol 80% y montados en un portaobjetos. Luego, fueron fotografiados con una cámara asociada a un microscopio Olympus BX60.

Se colocaron 25 larvas de cada genotipo en placas de agar conteniendo en el centro un parche de levadura coloreada con colorante alimenticio. La pasta de levadura es preparada mezclando levadura seca comercial (Levex) con un poco de agua. El colorante utilizado es colorante azul brillante Santana, apto para consumo humano. Luego de una hora, las placas fueron fotografiadas utilizando una cámara asociada a una lupa Olympus BMX10. Se cuantificó la cantidad de larvas encontradas dentro y fuera del parche de levadura coloreada. A su vez, se fotografiaron larvas individuales y se midió su área total junto con el área coloreada como medida de ingesta de colorante, utilizando el programa ImageJ. Las larvas que no ingirieron colorante fueron clasificadas como "de intestino transparente" y no fueron consideradas para esta cuantificación.

Morfología de tráqueas

Las larvas fueron colocadas en una gota de glicerol 80% y montadas en un portaobjetos. Luego fueron fotografiadas con una cámara asociada a un microscopio Olympus BX60. Se cuantificó la cantidad de veces que un determinado defecto estructural apareció por genotipo.

Complementación de la dieta con 20-hidroxi-ecdisona

Se utilizó el protocolo de Llorens et al. 2015¹²⁶. La 20-hidroxiecdisona utilizada fue comprada a Sigma-Aldrich y disuelta en 100% etanol obteniendo una solución de 7mM. La 20HE fue adicionada a la comida estándar para alcanzar concentraciones finales de 0.33 mg/ml (0.7 mM). Esta concentración fue elegida basándose en un trabajo anterior (Huang X, 2005¹²⁷). Como control, se disolvió el mismo volumen de etanol en comida estándar. Se colocaron 20 huevos de cada genotipo en un vial conteniendo etanol o la solución de 20-HE. Se realizaron dos réplicas de cada vial y se realizaron dos experimentos independientes.

Complementación de la dieta con hierro

Las concentraciones de hierro elevadas fueron logradas adicionando 0.8 mg/ml de citrato férrico de amonio (FAC, Sigma), que corresponde a un aumento de hierro de 2.5 mM diluído en 100% etanol (Llorenz, 2015¹²⁶). Como control, se diluyó en comida estándar la misma cantidad de etanol. Se colocaron 20 huevos de cada genotipo en viales conteniendo la solución de hierro o etanol. Se realizaron dos réplicas de cada vial y dos experimentos independientes.

Tinciones de inmunohistoquímica

Las larvas fueron disectadas en una gota de solución PB 0,1 M. Luego se fijó el tejido por 60 minutos en hielo en solución 4% formaldehido en 100mM de PBS 1x. Pasado ese tiempo se realizaron 3 lavados de 15 minutos con PT (PBS 0,3% Tritón X-100). Las larvas pasaron por un proceso de bloqueo de 30 minutos en una solución 10% suero de cabra/PT y acto seguido incubadas dos noches a 4°C con anticuerpo primario. Al día siguiente las muestras fueron lavadas 3 veces con PT 0.3% 15 minutos por vez e incubadas con el anticuerpo secundario por 3 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados finales de 15 minutos y luego se colocaron las muestras en medio de montaje (*Vectashield*® *Antifade Mounting Medium for Fluorescence*). En el caso de ser necesario, las muestras se incubaron con DAPI 1x (marcador de núcleos) o Faloidina 1x (marcador de membrana celular) al mismo tiempo que el anticuerpo secundario. Las imágenes fueron obtenidas utilizando confocales Zeiss (Carl Zeiss, Thornwood, NJ) y, en particular, se usaron los microscopios Meta 510 y Meta 710.

Soluciones utilizadas

PB (buffer fosfato) 10 x: 70mM Na2HPO4, 30mM Na2HPO4, pH 7,4

PBS (buffer fosfato salino) 10x: PB 1x, 0,15 M NaCl, pH 7,4

PT: PBS 1x 0,3% Tritón X-100

Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Especie	Dilucion	Procedencia	Catálogo	
anti actinina	conejo	1:500	Aviva Systems Biology, USA	ARP419114_P050	
antiGFP	IntiGFP gallina 1:500 AVES labs, USA		1010		
antiOSI	rata	1:50	GenScript	producido a pedido	

Tabla 3: anticuerpos primarios utilizados

Marcadores	Dilucion	Procedencia	Catálogo
DAPI	1:100	CHEMICON, USA	S7113
Faloidina	1:100	Sigma Aldrich, USA	P5282

Tabla 4: marcadores de núcleo (DAPI) y membrana celular (Faloidina) utilizados

Secundarios	Fluorescencia	Dilución	Procedencia	Código	Especie
anti conejo	Cy3	1:250	Jackson Immuno Research, USA	711-165-152	Donkey
anti gallina	DyLight 488	1:250	Jackson Immuno Research, USA	703-485-155	Donkey
anti rata	Cy5	1:250	Jackson Immuno Research, USA	712-175-153	Donkey
Table Constitutions and a second strate of the state					

Tabla 5: anticuerpos secundarios utilizados

Tinción con MitoTracker™ Red

Para evaluar la localización de *orsai* respecto de las mitocondrias se realizó una tinción específica para mitocondrias utilizando MitoTracker™ Red CMXRos (Thermo Fischer). Se disectan las larvas en una gota de MitoTracker:DMSO:PT 1:10000. Se incuba en la solución de MitoTracker a temperatura ambiente 15 minutos. Se coloca las muestras en PT. Se fija con formaldehido 4% durante 30 minutos. Se realizan 3 lavados de 10 minutos con PT 0.3%. Luego se continúa el protocolo de inmunohistoquímica como explica la sección anterior.

Extracción de mitocondrias para la medición de ATP

Se utilizó el kit Mitochondria Isolation Kit for Tissue (Thermo Scientific, Prod#89801) y se siguió el protocolo de homogenización para tejido duro y pre-tratamiento con tripsina (*Dounce Homogenization for Hard Tissue protocol and the pre-treatment with tripsin*) tal como indica el protocolo. La modificación introducida fue que se utilizó la mitad del volumen de la solución de extracción debido a la escasa masa de las larvas. El experimento se realizó 3 veces independientes. Para la cuantificación de las proteínas utilizamos el protocolo de lisis de mitocondrias del mismo manual.

Medidas de concentración de proteínas

Se utilizó el kit Pierce BCA Protein Assay para cuantificar la cantidad de proteína obtenida. Las mediciones fueron realizadas utilizando un lector de placas Elisa.

Medición del ATP mitocondrial

La producción de ATP mitocondrial fue medida utilizando el kit comercial Sigma Aldrich Adenosine 5`triphosphate (ATO) bioluminescent assay kit y siguiendo las indicaciones del protocolo correspondiente. El experimento fue realizado 3 veces independientes.

Medición de los niveles de ROS

Se utilizó el protocolo correspondiente a la tincion con dihidroetidio (DHE) de Owusu-Ansah and Banerjee, 2009¹²⁸ con la modificación introducida por Hui-Ying Lim, 2014¹²⁹. Brevemente, las larvas fueron disectadas en PBS, incubadas en 30 µM DHE:DMSO:PBS por 10 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS y se las fijó con formaldehído 7%. En lugar del medio de montaje *ProLong Gold antifade* se utilizó glicerol 60%. Las imágenes se tomaron utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 710.

Medición de tamaño de organelas

El tamaño de las organelas fue medido utilizando las imágenes correspondientes y el programa ImageJ que permite hacer mediciones de área y longitud.

Cuantificación de tamaño y número de células a partir del disco de ala

Las alas de los individuos adultos son retiradas con una pinza y montadas sobre un portaobjetos en una gota de glicerol 60%. Se las fotografía en lupa y se utiliza el programa ImageJ para cuantificar el área de la sección dorsal y ventral del ala.

Generación de clones mitóticos

El experimento de clones se utiliza para generar parches de tejido que expresen una construcción de interés en un contexto control. Para esto se cuenta con la línea HS*flip;act*(STOP)Gal4;UAS-GFP. Esta línea posee una flipasa activable por calor (HS-flip), un driver actina interrumpido por una *cassette* de *stop* (*act*STOP) y un UAS-GFP como marcador fluorescente. Una larva con esta construcción, luego de ser sometida a un pulso de alta, activará en algunas de sus células la flipasa y en otras no, al azar. En aquellas que la flipasa se active, se eliminará la *cassette* de *stop* y la actina iniciará la expresión del marcador GFP y de cualquier otro elemento activable por Gal4. De esta forma, se consideran células activas aquellas que expresan GFP e inactivas aquellas que no activaron la flipasa y por tanto no expresan el GFP, tal como se ve en la **Figura 15**. En nuestro caso, encontramos óptimo un pulso a 37°C por 5 minutos en un baño termostatizado.

Los cuerpos grasos de las larvas tratadas fueron disectados 24, 48, 72 o 96 horas después del pulso de calor según se indique, y se utilizó el protocolo de inmunohistoquímica como fue descripto en secciones anteriores. Luego de eso, se obtuvieron imágenes utilizando el confocal Meta 710 y se analizó el área de las células con el programa ImageJ. Luego de eso normalizamos las mediciones al promedio de tamaño de una célula control porque el interés no se centraba en las variaciones de tamaño absoluto de las células sino en la diferencia relativa entre las células activas e inactivas. Utilizamos el programa Rstudio para generar gráficos de distribución de frecuencias para cada genotipo y también para generar gráficos de interacción.



<u>Figura 15:</u> clones en cuerpo graso. Se utilizó el sistema heat shock flipase para generar parches de tejido con el driver activado (células en amarillo) dentro de un tejido con el driver inactivo (células en blanco).

Resultados

"And If I FLY or if I fall, least I can say I gave it all" _{Ru Paul} Al comenzar la caracterización del mutante P[UAS]100B/ P[UAS]100B, la primera característica que llamó la atención fue la incapacidad de producir adultos viables homocigotas para la mutación. Todos los individuos que poseen la mutación llevan a su vez un *balancer*. De esta forma, el primer paso para entender la función de la proteína cuya función está interrumpida en el mutante fue estudiar las caracteristicas de la larva homocigota.

En la **Figura 16 A-B** se muestran dos curvas de crecimiento, la primera correspondiente a larvas creciendo en un medio de agar-sacarosa y la segunda correspondiente a un medio de agar-levadura-sacarosa, lo que representa un enriquecimiento proteico en la dieta. En ambos casos las larvas homocigotas mutantes mueren a las 72 horas post ovipuesta y, si bien en el medio rico en proteinas alcanzan un tamaño mayor hacia el final de su vida, en ambos casos quedan muy por debajo del tamaño de las larvas controles. Para saber en que estadío larval mueren estas larvas, se procedió a retirar los ganchos larvales (**Figura 16D**) y compararlos con los ganchos larvales del control (**Figura 16C**) y los encontrados en literatura (**Figura 16E-F**). Los controles muestran ganchos correspondientes a larva de estadío 2, con la dentición múltiple característica, mientras que los homocigotas mutantes mantienen el diente único de la larva de estadío 1.

Para evaluar si la muerte prematura, el pequeño tamano y el arresto del desarrollo se explicaban por una reducción en la ingesta, se realizó el experimento de la **Figura 16F-J**. En la **Figura 16F** se muestran tres fotografias correspondientes a un experimento de localización larval. Larvas de diferente genotipo (en este caso, homocigota control, heterocigota mutante y homocigota mutante) fueron colocadas en placas de agar en presencia de un parche de levadura coloreada de azul. Luego de una hora, tanto las placas como las larvas individuales fueron fotografiadas. El objetivo de este experimento fue evaluar si las larvas mutantes se encontraban dentro de la comida, como es de esperar para una larva cuya principal actividad es ingerir alimentos para almacenar energía y convertirse finalmente en adulto ^{130,131}. Tal como se observa en las fotografías (**Figura 16F**) y en la cuantificación correspondiente (**Figura 16G**) el porcentaje de larvas encontradas fuera de la comida para las homocigotas mutantes es muy superior a lo esperado para un control.

Es debido a este fenotipo en el cual las larvas fueron encontradas fuera del área esperada que decidimos nombrar al CG6115 *orsai* (*osi*) y se utilizará esa nomenclatura de ahora en adelante.

46

Por otro lado, al fotografiar las larvas individuales (**Figura 16H**), y tal como se observa en la cuantificación correspondiente (**Figura 16I**), las larvas de los tres genotipos evaluados fueron capaces de ingerir una cantidad similar de colorante y, por tanto, de levadura. Esto muestra que no se trata de un defecto a nivel estructural del aparato de alimentacion ¹³² o a la integridad del intestino ¹³³ que justifique la letalidad de las larvas mutantes. Sin embargo, la diferencia es marcada a nivel poblacional, ya que a la totalidad de las larvas control se las encuentra con colorante en el intestino, mientras que las larvas homocigotas mutantes llegan al 60% de individuos sin colorante. Esta observación, teniendo en cuenta por un lado los resultados mostrados en la **Figura 16F**, y por otro un resultado previo de nuestro laboratorio (*Bernabó, tesis doctoral*) de que las larvas homocigotas mutantes son capaces de reaccionar ante estimulos olfatorios atractantes y movilizarse hacia ellos, nos hace pensar que las larvas homocigotas mutantes no ingieren comida no porque no puedan reconocerla o no puedan movilizarse sino por otro motivo.

Un aspecto a considerar es que las larvas al moverse lo hacen con un movimiento de fijación al sustrato con los ganchos bucales ¹³² ¹³⁴ seguido de un movimiento de arrastre del resto del cuerpo. Este movimiento lleva aparejado que las larvas ingieran el sustrato por fuerza, sólo para moverse. En otras palabras, es posible que la mitad de la población que azarozamente pasó por sobre el parche de levadura haya ingerido comida mientras que la mitad que no lo hizo no la ingirió, es decir las larvas homocigotas mutantes podrian no mostrar un interés por la comida comparable a los controles.



Figura 16: Las larvas homocigotas mutantes para osi sufren de arresto en el desarrollo y no se alimentan. A. Las larvas mutantes para osi sufren una drástica reducción de su crecimiento. El gráfico muestra el área de larvas crecidas en una placa estándar de agar a 24, 48 y 72 horas, luego de lo cual las mutantes mueren. Las larvas P[UAS]100B/ P[UAS]100B no llegan a aumentar su tamaño a lo largo del experimento. B. Las larvas P[UAS]100B/ P[UAS]100B crecidas en un medio rico en proteínas mueren al mismo tiempo que las crecidas en un medio sin proteínas. El gráfico muestra el área de larvas crecidas en placas ricas en proteína para 24, 48 y 72 horas luego de lo cual las larvas mutantes mueren. En este caso las larvas mutantes alcanzan un tamaño final mayor que en un medio sin proteínas, pero mueren al mismo tiempo. C-F. Las larvas P[UAS]100B/ P[UAS]100B mueren es estadio L1. C. Fotografía representativa de los ganchos bucales de una larva control a las 72 horas crecida en placa de agar. D. Fotografía representativa de los ganchos bucales de una larva P[UAS]100B/ P[UAS]100B a las 72 horas crecida en placa de agar. E. Esquema de ganchos bucales de larva estadio 2, mostrando 4 dientes medios. F. Esquema de ganchos bucales de larva estadio 1, mostrando un único diente medio. G. Imágenes representativas de larvas de 24 horas en una placa de agar complementada con un parche de comida coloreada. H. Porcentaje de la población dentro (color liso) o fuera (patrón) del parche de levadura coloreada. I. Fotografías representativas de larvas individuales presentando un intestino coloreado luego de ingerir pasta de levadura coloreada, mostrando que los tres genotipos estudiados son igualmente capaces de ingerir comida, y que por tanto no existe un impedimento relacionado a las estructuras de alimentación o a la integridad del intestino que justifique la letalidad. J. Cuantificación del área coloreada sobre el área total muestra que los tres genotipos son capaces de ingerir la misma cantidad de comida. Las larvas que no ingirieron comida (intestino transparente) no fueron consideradas para la cuantificación. K. Cuantificación de larvas que no ingirieron comida como porcentaje de larvas no coloreadas sobre total de larvas. En todos los paneles las barras naranjas representan controles (+/+), las barras grises P[UAS]100B/+ (+/-) y las azules P[UAS]100B/ P[UAS]100B (-/-). En todos los paneles los gráficos representan media ± error estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas, p>0.05.

Una vez establecidas las características básicas del desarrollo del mutante evaluamos si el RNAi expresado en un patrón ubicuo, en este caso utilizando la línea directora *actina*Gal4, es capaz de reproducir los fenotipos de tamaño y sobrevida. En la **Figura 17** se muestran las curvas de crecimiento para individuos que expresan el RNAi de *osi* en un patrón ubicuo creciendo en placas de alimento sin proteína (agar-sacarosa) y en alimento proteico (agar-levadura-sacarosa). Junto a cada gráfico se muestran fotografías de larvas control (*actina*Gal4/+) y experimental (*actina*Gal4>*osi*^{RNAi}) en el primer punto de medición, a las 24hs post ovipuesta, y en el último punto de la medición, a las 96 hs post ovipuesta. Luego de ese punto todas las larvas que expresan el *osi*^{RNAi} mueren. En los gráficos podemos observar que los fenotipos esperados para el mutante se repiten: las larvas

mueren habiendo aumentado muy poco de tamaño incluso en una dieta rica en proteínas, y antes de completar su desarrollo. La principal diferencia es que algunos individuos logran sobrevivir hasta 24 hs más que el mutante homocigota, aunque esto puede adjudicarse a diferencias técnicas, debido a que es esperable que los mutantes posean fenotipos más potentes que los generados por la expresión de un RNAi específico. De este experimento concluimos que el *osi*^{RNAi} es capaz de fenocopiar al mutante y, sumado al conocimiento previo del laboratorio de que esta construcción es capaz de disminuir efectivamente los niveles de *osi* (ver **Figura 8D**), podemos afirmar que este RNAi es una herramienta válida para continuar el estudio de la función de *orsai*.



<u>Figura 17:</u> La disminución de los niveles de osi generada por la utilización de un RNAi en un patrón ubicuo fenocopia al mutante. A, F. Curvas de crecimiento para larvas control (act/+) y tratadas (act>osi^{RNAi}) en placas de bajo contenido proteico (A) o alto contenido proteico (F). Las mediciones fueron hechas a 24, 48, 72 y 96 horas post ovipuesta, luego de lo cual las larvas tratadas mueren. **B-E.** Fotografías representativas de lavas controles (B, D) o tratadas (C, E) 24 horas post ovipuesta (B, C) o a tiempo final, a 96 horas post ovipuesta (D, E); crecidas en placas de agar-sacarosa. **G-J.** Fotografías representativas de lavas controles (G, I) o tratadas (H, J) 24 horas post ovipuesta (G, H) o a tiempo final, a 96 horas post ovipuesta (I, J); crecidas en placas de agar-sacarosa-levadura. Las barras de escala representan 1mm. En todos los paneles las barras celestes representan controles (línea driver actinaGal4/+) y las barras violetas representan las larvas con niveles disminuidos de osi en el patrón de actina (act>osi^{RNAi}). En todos los paneles los gráficos representan la media ± error estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas, p>0.05.

Una vez descriptas las características básicas del mutante de *orsai* el siguiente paso para la caracterización de su función fue intentar encontrar el tejido más restringido en el cual la disfunción de *osi* logra fenocopiar al mutante.

Esto es especialmente importante debido a que al tratarse de fenotipos tan fuertes y pleiotrópicos como la muerte, necesitábamos un escenario más acotado para poder resolver la verdadera función de la proteína.

Constitutive	Nervous system	Muscle	Tracheal system	Ring gland	Fat body
actin	elav	Mef2	btl	P0203	pumpless
heat shock	npf	MHC	SRF		
8185	8816	8182			
	8764	Twist			
		2702			

<u>Tabla 6</u>: Líneas drivers utilizados para evaluar los fenotipos provocados por la baja de función de osi en diversos tejidos. Al bajar la función de orsai en el patrón correspondiente a los drivers que se encuentran en negrita, se generó un fenotipo explicado en las siguientes secciones.

Este estudio se resume en la **Tabla 6**, la cual será explicada a lo largo de las próximas secciones. En primer lugar, cabe destacar que los tres drivers ubicuos que fueron probados, tanto *actina* como *heat shock* y 8185 causaron muerte del 100% de las larvas. El primer tejido específico probado fue el sistema nervioso central, para descartar que la muerte de los animales se debiera a un alejamiento de la comida provocado por una falla en la comunicación neuronal, por ejemplo una disminución de las señales metabólicas o fisiológicas que regulan el hambre ¹³⁵, o una disfunción de los circuitos neuronales que integran las señales de hambre ¹³⁶. Sin embargo, ninguno de los drivers utilizados

fenocopiaron al mutante, a partir de lo cual se concluye que los fenotipos de alejamiento de la comida y posterior muerte observados en el mutante no son consecuencia de la disfunción de *orsai* en el sistema nervioso central.

En segundo lugar, utilizamos drivers de diferente tipo de músculo. Aquellos tales como MHC o *twist*, que se expresan en músculo esquelético o se expresan sólo en embrión no lograron fenocopiar al mutante. Sin embargo, los drivers *mef*2, 8182 y 2702 sí lo hicieron. Continuamos la caracterización de los fenotipos provocados por la bajada de función de *osi* en músculo utilizando el driver *mef*2 debido a que los otros *drivers* utilizados son *enhancer trap*s y por tanto son construcciones menos caracterizadas.

El interés particular de utilizar drivers de músculo, especialmente de músculo involucrado en la movilidad estructural, está dado porque los fenotipos del mutante podrían explicarse por una falta de capacidad de absorción de alimentos, o por una falla estructural que impidiera que los músculos crecieran apropiadamente. A partir del experimento anterior (*Bernabó, tesis doctoral, experimento de olfación y respuesta a estímulos olfativos atractantes*) lo que sí sabemos es que los mutantes no tienen, al menos durante las primeras 24 hs de vida, problemas de movilidad, con lo cual no es ese el origen de su muerte.

El driver *mef2* se expresa principalmente en músculo visceral y somático post embrionario (principalmente el musculo contráctil del intestino y de la pared corporal), aunque también se ha descripto en cuerpo graso y algunas poblaciones neuronales (*de acuerdo a flybase*). Al utilizar el RNAi de *osi* en este contexto, se observa que la letalidad de las larvas es completa, pero logran sobrevivir dos días más que las larvas que expresaban el RNAi de *osi* en un patrón ubicuo. Este experimento no fue realizado las veces necesarias como para realizar una estadística correcta, pero observando la progresión del área y las fotos representativas de la **Figura 17B** podemos concluir que las larvas llegan a crecer hasta un tamaño mayor que las mutantes homocigotas, sin embargo, no alcanzan los niveles del control y no logran sobrevivir.

Para profundizar el estudio del fenotipo provocado en intestino se analizaron imágenes de microscopía electrónica que se realizaron en larvas heterocigotas y homocigotas mutantes de 72 horas de vida. El objetivo de la serie de imágenes de microscopia electrónica con los genotipos mencionados que serán mostradas a lo largo de esta tesis fue comparar un individuo afectado pero que sobrevive (heterocigota mutante) respecto del individuo afectado al punto de morir a causa de su deficiencia (homocigota mutante). En el panel C se muestra una fotografía de una larva heterocigota en la cual se señala en

azul la sección del músculo correspondiente a la mayor parte del citoplasma y las organelas, mientras que en rojo aparece la sección de la célula correspondiente a las fibras contráctiles. En los paneles D y E se puede comparar la estructura de los músculos de un individuo mutante, la cual es únicamente fibras contráctiles. Se observa en el mutante los músculos hipotrofiados y el aparato contráctil reducido. Por otra parte, los músculos no están correctamente apoyados en la membrana basal intestinal y poseen una forma más irregular que los músculos de individuos heterocigotas.

Esto nos permite señalar una diferencia clara entre los músculos de los individuos, tanto con respecto a la morfología de la célula muscular en sí como en cuanto a su adhesión a la membrana basal, todo lo cual es plausible de tener consecuencias negativas para la función intestinal, provocando al menos parte de los fenotipos observados. Ahora, si esto es la causa o una consecuencia de un problema subyacente, en este punto aún no puede ser dilucidado.

Todas las imágenes de microscopía electrónica fueron tomadas por Rafael Cantera, Universidad de la República, Montevideo.







Figura 18: La reducción de función de osi en músculo esquelético provoca defectos de tamaño y crecimiento en larvas y atrofia muscular. A. Curva de crecimiento para larvas control (mef2/+) y tratadas (mef2>osi^{RNAi}). Las mediciones fueron hechas cada 24 horas hasta las 144 horas, tiempo en el que todas las larvas mutantes murieron y se completó la pupación de todas las larvas control. Las barras celestes representan las larvas control (mef2/+) y las violetas representan las larvas tratadas (mef2>osi^{RNAi}). **B.** Fotografía representativa de una larva control (izquierda, mef2/+) y tratada (derecha, mef2>osi^{RNAi}) a punto final donde se manifiesta la diferencia de tamaño alcanzada. El experimento fue realizado en placa de agar-sacarosa. La barra de escala representa 1mm. C. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de la morfología esperada para el músculo asociado al epitelio intestinal de una larva de Drosophila. En azul, la sección citoplasmática donde se encuentra la mayor parte de las organelas. En rojo, la sección correspondiente a las fibras contráctiles. Mi: mitocondrias. My: miofibrillas contráctiles. ECM: matriz extracelular (lámina basal intestinal). D. Imagen de MEB del músculo asociado al epitelio intestinal de una larva P[UAS]100B/+. Se observan los sectores celulares citoplasmático (flecha azul) y contráctil (flecha roja). E. Imagen de MET del músculo asociado al epitelio intestinal de una larva P[UAS]100B/ P[UAS]100B. Se observa la sección contráctil del músculo reducida respecto del control (flecha roja) y no se distingue la sección citoplasmática. Se observa deficiente adhesión a la lámina basal intestinal.

El siguiente patrón de expresión puesto a prueba fue el de *breathless*Gal4 (*btl*Gal4), el cual se expresa principalmente en tráqueas, tanto durante el desarrollo como durante la madurez de las mismas, aunque también se ha reportado su expresión en ciertos precursores neuronales y gliales de la línea media (*flybase.org*).

El interés por este patrón surgió de que es sabido que las larvas sometidas a hipoxia (niveles de oxígeno debajo de los normales) inician un comportamiento de tipo "*wandering*" ignorando la comida en busca de mayores niveles de oxígeno ¹³⁷. La hipótesis en este caso es que al disminuir los niveles de *osi* en las tráqueas utilizando *btl*Gal4, si el fenotipo del mutante fuera ocasionado por un problema en la recepción de oxígeno ambiental, en ese caso las larvas mutantes estarían en condiciones de hipoxia fisiológica, y por tanto se esperaría que incurran en comportamientos de ignorar la comida, y la muerte se asociara a la falta de alimentación. Siguiendo esta línea de razonamiento se realizó el mismo tipo de curva de crecimiento y encontramos que los individuos con niveles disminuidos de *osi* en las tráqueas lograban sobrevivir más que los mutantes y más que los individuos con *osi* disminuido en un patrón ubicuo; sin embargo, no llegan a crecer suficientemente en tamaño y finalmente mueren (**Figura 19 A, B**). La diferencia en cuanto al tiempo de supervivencia podría atribuirse en principio a que el patrón de expresión del RNAi es más restringido/acotado, y por tanto también lo será su

efecto sistémico.

La confirmación de que la disminución de expresión de *osi* en el patrón de *btl*Gal4 provoca disminución de tamaño corporal seguido de muerte es alentadora para pensar que ese es un posible origen de los fenotipos observados. Sin embargo, para ahondar un poco en esa posibilidad, se realizó un estudio de la morfología de las tráqueas. Es sabido ¹³⁸ que las larvas mantenidas en hipoxia ramifican las terminales de sus tráqueas para intentar maximizar la incorporación de oxígeno ambiental. En la **Figura 19 C** se muestra la fotografía de un individuo control con tráqueas normales en normoxia, esto es, con ramificaciones definidas y troncos dorsales macizos; mientras que en la **Figura 19 D** se muestra un ejemplo ¹³⁸ de un individuo control sometido a hipoxia, en el cual se numeraron todas las ramificaciones extras de las ramas traqueales típicas de la exposición a este tipo de condiciones ambientales.

Haciendo un análisis de imágenes de las tráqueas, según se muestra en las fotografías 4 E, G, I, K, y sus respectivas cuantificaciones F, H, J, L, se puede observar que los individuos tratados poseen una serie de defectos en su entramado de tráqueas: los troncos dorsales o caudales se encuentran interrumpidos, las ramas dorsales aparecen únicas o triples cuando lo normal es encontrar dos; varias secciones se encuentran colapsadas tanto de los troncos dorsales como del tronco caudal; las ramas dorsales no llegan a tocarse y giran sobre sí mismas al crecer sin contacto con la rama lateral correspondiente. En este experimento se utilizaron no sólo individuos controles portando únicamente el driver, sino también individuos *mef2*>osi^{RNAi}. Estos individuos fueron incorporados al experimento debido a que el patrón de mef2 se describió en ciertos grupos de tráqueas, y ya hemos comprobado que la disfunción de osi en el patrón de mef2 provoca letalidad. Si esta última es provocada por los defectos traqueales, es de esperar que los individuos mef2>osi^{RNAi} posean el mismo tipo de defectos que aquellos *btl>osl*^{RNAi}. Sin embargo, esto no es así. Tal y como se observa en las cuantificaciones correspondientes (Figura 19 E, G, I, K) estos individuos tienen defectos traqueales en proporciones similares al control. Eso significa que la letalidad provocada por la bajada de función de orsai en estos patrones de expresión no está provocada por el mismo efecto a nivel de tejido.

Por otra parte, a pesar de los defectos estructurales encontrados en los individuos *btl>ost*^{RNAi}, no se encontraron terminales dorsales ramificadas como se espera de un individuo en hipoxia, lo que sugiere que o bien los individuos con disfunción de *orsai* no se encuentran en estado de hipoxia fisiológica o bien son incapaces de sensar o de

55

responder a la reducción de oxígeno.

Para dilucidar este último punto, utilizamos un driver de *tip cells* para desregular la función de *osi* exclusivamente en las células encargadas de sensar la falta de oxígeno y responder iniciando la cascada de ramificación dependiente de *btl*. Al utilizar este driver los animales sobrevivieron y llegaron a adultos normalmente (datos no mostrados). Con estos resultados concluimos que los efectos de letalidad de la bajada de función de *osi* en el patrón de tráqueas no están provocados por una situación de hipoxia fisiológica.



<u>Figura 19:</u> La bajada de función de osi en tráqueas provoca fenotipos estructurales, pero no hipoxia fisiológica. A. Curva de crecimiento de larvas control (btl/+) y tratadas (btl>osi^{RNAi}). Las mediciones fueron hechas cada 24 horas hasta las 120 horas, tiempo en el que todas las larvas con niveles reducidos de osi murieron. Las larvas control completaron su pupariación antes de este punto. **B.** Fotografía representativa de

una larva control (izquierda, btl/+) y tratada (derecha, btl>osi^{RNAi}) a punto final donde se manifiesta la diferencia de tamaño alcanzada. El experimento fue realizado en placa de agar-sacarosa. Las barras celestes representan las larvas control (btl/+) y las barras violetas las tratadas (btl>osi^{RNAi}). La barra de escala representa 1mm. **C.** Imagen representativa de una larva control en normoxia, presentando troncos dorsales sólidos y ramificaciones normales. **D.** Imagen tomada de Centanin et al. 2008 ¹³⁸ mostrando dos ramas laterales ramificadas según lo esperado en hipoxia (5%O2). **E, F.** Porcentaje alcanzado de interrupciones en el tronco dorsal para cada uno de los genotipos analizados (E) y fotografía representativa (F). **G, H.** Porcentaje alcanzado de ramas dorsales únicas o triples (cuando lo esperado es una por lado, es decir, dos totales) para cada uno de los genotipos analizados (G) y fotografía representativa (H). **I, J.** Porcentaje alcanzado de colapso del lumen para cada uno de los genotipos analizados (I) y fotografía representativa (J). **K, L.** Porcentaje alcanzado de ramas dorsales no conectadas para cada uno de los genotipos analizados (K) y fotografía representativa (L).

Continuando con la caracterización de los fenotipos provocados por la disminución de osi en tejidos acotados, se desreguló su expresión en la glándula del anillo utlizando el driver p0206Gal4, el cual se expresa en glándula protorácica y corpus allatum tal como se muestra en el esquema de la Figura 20 A (de acuerdo a flybase). Este patrón de expresión fue considerado debido a la característica de las larvas homocigotas mutantes de no mudar. Esto llevó a pensar que la disfunción de orsai estaba afectando la producción de hormonas de la muda. Para evaluar esta posibilidad utilizamos el RNAi de osi bajo la dirección de la línea p0206Gal4 esperando encontrar el fenotipo del mutante de larvas pequeñas y letalidad temprana. Sin embargo, las larvas con orsai disminuido en el patrón de p0206 llegan a vivir hasta 13 días en estadío larval 1, luego de lo cual mueren, habiendo alcanzado el tamaño esperado de una larva 3. En la Figura 20 B se muestra una larva L3 control, la cual luego de alrededor de 10 días ya ha pupado y convertido en adulto; mientras que a su lado vemos una larva L1 de tamaño comparable. Como experimento complementario planteamos la posibilidad de complementar con ecdisona la comida de las larvas y así evitar cualquier posible bloqueo que esas vías pudieran tener. Para esto realizamos un experimento de complementacion con 20hidroxiecdisona, la forma fisiológicamente activa de la ecdisona, en una concentración que según la literatura es suficiente para revertir fenotipos de muda causados por insuficiencia hormonal ¹²⁶. En el transcurso del experimento (datos no mostrados) los animales controles mudaron y puparon antes de lo esperado (7 dias hasta el final de la pupariación respecto de 10 días esperados sin complementacón hormonal) mientras que los individuos mutantes homocigotas no sobrevivieron ni mudaron. De esta forma descartamos que la ausencia de muda se debiera al menos exclusivamente a una

incapacidad de producir el pico hormonal necesario.

Al mismo tiempo, considerando el papel que el hierro juega en la síntesis de las hormonas de la glándula protorácica ^{126 139} y el hecho de que las proteínas LYR pueden estar involucradas en la biogénesis de los cofactores Fe-S ^{81,140–143} los cuales, cuando fallan, bloquean la producción de ecdisona y con ella la muda, evaluamos si la adición de hierro a la comida en una concentración que se ha probado útil para revertir este tipo de deficiencias ¹²⁶, para averiguar si una deficiencia en su absorción o utilización era la responsable de la falta de muda y sobrevida. Sin embargo la adición de hierro a la dieta no fue suficiente para revertir el fenotipo observado.

Teniendo en cuenta estos datos concluimos que la función primordial de *orsai* no parece asociarse a la fabricación de hormonas de la muda.



<u>Figura 20:</u> La disfunción de orsai en la glándula del anillo se asocia a larvas de estadio 1 de gran tamaño. A. Esquema de la glándula del anillo mostrando sus divisiones principales y las hormonas que produce cada una. **B.** Fotografía representativa de una larva control estadio 3 (izquierda, p0206/+) y tratada de estadio 1 (derecha, p0206>osi^{RNAi}).

Por último, se utilizó el driver *ppl*Gal4para disminuir la función de *osi* en cuerpo graso (de acuerdo a *flybase*). Teniendo en cuenta el posible papel de *osi* en la regulación metabólica, y que el crecimiento larval, así como la muda, están fuertemente regulados por la función del cuerpo graso, se intentó estudiar si disfunción de *orsai* en este órgano (equivalente al hígado de mamíferos) era suficiente para recapitular los fenotipos del mutante. En este caso se obtuvo letalidad en el 100% de los individuos en una condición

de funcionamiento exacerbado de la maquinaria de silenciamiento (por coexpresión de Dicer2, la enzima limitante) y del 80% en ausencia de *dcr*II. En ambos casos las larvas llegaron a mudar e incluso algunas iniciaron la pupariación, pero no pudieron completarla (datos no mostrados).

Tomando estas caracterizaciones en conjunto, concluimos que alterar la función de ORSAI en distintos tipos celulares y tejidos se asocia a fenotipos relacionados con la función de cada uno de ellos, lo cual sugiere una expresión ubicua y una función muy básica.

Para comenzar la caracterización de la función celular de *orsai* comenzamos por realizar tinciones de inmunohistoquimica para definir su localización tanto a nivel de tejido como subcelular. Para esto utilizamos dos variantes de anticuerpos realizados en el laboratorio, uno que reconoce la región C-terminal de la proteína y otro que reconoce la región N-terminal de la proteína. En todos los casos evaluados, ambos anticuerpos reportaron el mismo patrón de expresión.

La **Figura 21 A** representa un corte longitudinal de una larva, señalando la ubicación anatómica de las fotografías expuestas en **B-G**.

En el primer panel (**Figura 21B**) se observa una foto de la pared corporal de la larva. En el canal blanco se observa OSI y en el canal rojo anti-ACTININA, el cual es un marcador de líneas Z musculares. En esta foto se puede observar que OSI se expresa en músculos con un patrón bandeado similar pero no coincidente con el patrón para ACTININA. En el panel C se muestra la localización nuclear de la proteína OSI (blanco) en el sistema digestivo, específicamente en intestino y túbulos de Malpighi.

En el panel D se muestra la localización de OSI (en blanco) en contexto de la expresión de *lam*GFP, la cual es una proteína de la membrana nuclear fusionada a GFP. En este caso se observa que la señal del canal blanco se encuentra contenida por la señal verde (la envoltura nuclear) corroborando así la localización nuclear descripta anteriormente. Por otro lado, en el cuerpo graso de la larva, OSI muestra una localización ubicua y se la detecta tanto en el nucleo como en el citoplasma (panel E).

En el panel F se muestra un detalle del intestino de la larva, donde se puede apreciar que OSI localiza en los núcleos de las células epiteliales y de las células madre intestinales. En el panel G se muestra el detalle de una célula mostrando en el canal blanco OSI nuclear y en el canal verde *mito*GFP, la cual es una proteína mitocondrial marcada con GFP, en donde se ve que OSI no colocaliza en mitocondrias. Teniendo en cuenta estos resultados proponemos que ORSAles una proteína con función principalmente nuclear, si bien no hemos explorado la posibilidad de que su localización esté regulada específicamente (fenómeno conocido como *shuttling*¹⁴⁴). Alternativamente, OSI podría cumplir distintas funciones dependiendo del compartimiento celular donde se localiza, el cual a su vez puede estar regulado por condiciones externas (fenómeno conocido como *moonligthing*^{145–147}.

Teniendo en cuenta la variedad de tejidos en la cual la disfunción de *orsai* generó un fenotipo de magnitud, era de esperar que la proteína fuera hallada en numerosos tejidos. Por otra parte, debido a lo que se sabe de las proteínas LYR, era lo más esperable encontrar a OSI en las mitocondrias. Sin embargo, se la encontró principalmente en núcleo, y si bien en algunos tejidos se la encontró también en citoplasma, en ningun caso pareció localizar en mitocondrias. Para verificar esta observación, se empleó Mitotraker Red, el cual tiñe mitocondrias y se acumula en función del potencial de membrana. En la **Figura 21 H** se observa la disposición del Mitotraker Red en cuerpo graso y en la 6-l el patrón de OSI, tanto en núcleo como en citoplasma, excluyendo la señal de Mitotraker Red. Este resultado permite concluir que *orsai* no se encuentra en mitocondrias a pesar de ser parte del complejo de proteínas con dominio LYR.





Figura 21: la localización subcelular de OSI es regulada de forma tejido específica. A. Esquema de un corte sagital de una larva. Las letras muestran la localización anatómica de las imágenes correspondientes. B. OSI localiza en el citoplasma de los músculos esqueléticos de la pared corporal, pero su patrón (canal blanco) no co-localiza con el patrón de banda Z (canal rojo, anti-ACTININA). C. En el tracto digestivo, OSI es nuclear. Se muestra una imagen de la localización en epitelio intestinal y túbulos de Malpighi (canal blanco). D. Imagen muestra lamGFP (una proteína de membrana nuclear marcada con GFP) en verde. La señal de OSI (canal blanco) está localizada dentro de la señal verde, esto es, dentro del núcleo. E. En el cuerpo graso, OSI es encontrado en el núcleo y en el citoplasma formando un patrón reticulado (canal blanco). F. Detalle de una fotografía del epitelio intestinal donde se observa que OSI (canal blanco) localiza en el núcleo de las células y también en las células madre del intestino. G. Imagen del tracto digestivo mostrando mitoGFP (una versión marcada con GFP de una proteína mitocondrial) en verde. No se encontró co-localización con OSI. Las barras de escala representan 10μm (B), 50 μm (B, C, D, E) o 5 μm (G). H-I. Tinción con Mitotraker Red muestra que la señal de OSI es excluyente de las mitocondrias. H. señal de Mitotraker Red. I. señal de OSI. J. señal de faloidina, marcando los límites celulares. K. unión de los canales H, I y J. La barra de escala representa 50 µm.

Sin embargo, existen proteínas LYR nucleares están relacionadas a programas metabólicos, principalmente como reguladores de las funciones mitocondriales y de control de flujo de determinados metabolitos a la cadena respiratoria ^{77,82,87}. Teniendo en cuenta esta posibilidad analizamos las fotografías de microscopia electrónica, esta vez para analizar potenciales fenotipos mitocondriales. Si la falta de OSI redunda en una deficiente regulación, es esperable que las mitocondrias tengan ciertos defectos estructurales o morfológicos. Efectivamente, en la **Figura 22 A-B** se puede comparar en la misma escala la fotografía de mitocondrias heterocigotas respecto de mitocondrias homocigotas (mutantes). Las cuantificaciones de tamaño en cuanto a largo, ancho y área mostradas en la **Figura 22 C-E** verifican que, como era esperado, las mitocondrias de los animales mutantes homocigotas son más pequeñas y más ramificadas que las heterocigotas, lo cual sugiere un desbalance en la tasa fisión/fusión hacia la fusión (los datos colectados como imágenes estáticas no permite definir en forma categórica si uno de los procesos está más afectado que el otro).

Paralelamente, se realizaron ensayos de medición de ATP mitocondrial y de especies reactivas de oxigeno (ROS). Estos experimentos arrojaron que los animales homocigotas mutantes tienen fuertemente reducidos sus niveles de ATP mitocondrial y elevados los ROS a más del doble respecto de un individuo control. Tomados todos estos resultados en conjunto podemos concluir que los mutantes para OSI tienen un funcionamiento mitocondrial deficiente y problemas morfológicos de dichas organelas. En este punto aún

falta definir si la bajada de función de OSI provoca una incapacidad de las mitocondrias de llegar a sus dimensiones esperadas y esto provoca un funcionamiento deficiente o si, en cambio, el funcionamiento deficiente y los altos niveles de oxidación provocan como respuesta fisiológica un aumento de la fisión mitocondrial como un intento de compensación. Cabe destacar que no se encontraron mitocondrias hinchadas¹⁴⁸, que es algo que suele ocurrir en casos de mal funcionamiento mitocondrial y que puede señalar muerte celular por apoptosis. Otro aporte interesante es que en el laboratorio se ha demostrado (datos no mostrados) que la disfucnión de orsai no afecta los complejos mitocondriales en cuanto a masa o ensamblado, debido a que en geles nativos se encuentran todos los complejos, en cantidades comparables a los controles.



<u>Figura 22:</u> Los niveles reducidos de orsai se asocian con alteraciones mitocondriales de forma y función. A, B: Imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión de larvas de 72 horas AEL heterocigotas y mutantes homocigotas. Ambas imágenes fueron tomadas del mismo tejido: células epiteliales del intestino. Las barras de escala representan 100nm. Las larvas homocigotas mutantes poseen mitocondrias más pequeñas, tal como se muestra en C, D y E. C-E. Cuantificación del diámetro (C), área (D) y número de ramificaciones (E) mitocondriales para larvas heterocigotas y mutantes homocigotas. Las ramificaciones indican procesos de fisión/fusión. G. Producción mitocondrial de ATP normalizada por unidad de proteína y relativa al promedio del control. Los individuos homocigotas mutantes producen menos de la mitad del ATP mitocondrial por unidad de proteína que los controles. H. Niveles de ROS detectados por fluorescencia utilizando DHE en larvas de 24 horas AEL. Mediciones normalizadas al promedio del control. Las larvas homocigotas mutante tienen un nivel de

ROS de hasta 3 veces el control. En todos los paneles las barras naranjas representan los controles (+/+), las barras grises P[UAS]100B/+ (+/-) y las azules P[UAS]100B/P[UAS]100B (-/-). En todos los paneles los gráficos representan la media \pm error estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas, p>0.05

Dada la localización de ORSAI principalmente nuclear, decidimos analizar los núcleos de las células mutantes utilizando las fotografías de microscopía electrónica. En la **Figura 23 A-B** se comparan a igual escala los núcleos de células de epitelio intestinal de individuos heterocigotas y homocigotas mutantes. Como puede apreciarse en las cuantificaciones ubicadas en los paneles C-F, tanto los núcleos como los nucleolos de las células homocigotas mutantes son más pequeños que sus controles, lo cual podría sugerir un arresto en la endorreplicación a causa de la deficiencia metabólica ^{149–153}.

Para ahondar en esta posibilidad se evaluó si los fenotipos observados en el tamaño del núcleo se repiten a nivel de célula, para distinguir entre defectos estructurales puntuales de ciertas organelas o un impedimento del crecimiento general de la célula, que podría asociarse a un defecto de crecimiento o de un arresto del mismo provocado por el desbalance metabólico.

Debido a que el aumento utilizado en microscopia electrónica no permite evaluar el contorno celular, se empleó el RNAi de *osi* para bajar su función en el cuerpo graso, utilizando el driver *ppl*Gal4, que se expresa en este órgano. Este tejido fue elegido debido a que conocíamos que la disfunción de *orsai* en este tejido afecta la viabilidad, y porque el cuerpo graso está formado por una monocapa de células de morfología fuertemente regular lo cual lo convierte en el modelo de elección para el estudio de modificaciones al tamaño o forma de la célula.

En el panel G, H (**Figura 23**) podemos comparar el cuerpo graso de un individuo control (expresando únicamente el *driver*) y un individuo con *osi* disminuido específicamente en cuerpo graso. Las cuantificaciones de los paneles I – K nos muestran que los núcleos son más pequeños, repitiendo lo observado por microscopia electrónica, como así también la célula toda; pero la relación entre ambos compartimentos se mantiene, lo cual hace pensar que los fenotipos observados no se deben a un problema de una organela en particular sino a que la célula se encuentra comprometida.



Figura 23: Niveles reducidos de osi provocan defectos en el tamaño nuclear y celular. A, B. Imágenes representativas de MET de células epiteliales del intestino de larvas de 72 horas AEL heterocigotas (A) y homocigotas mutantes (B). Las larvas homocigotas muestran un núcleo de morfología interna normal y organización subcelular normal. Las barras de escala representan 2 µm. C, D. cuantificación del diámetro (C) y área (D) nuclear. Ambos se ven reducidos en individuos homocigotas mutantes. E, F. cuantificación del diámetro (E) y área (F) nucleolar. Ambos se encuentran reducidos en los individuos homocigotas mutantes. G, H. Imágenes representativas del cuerpo graso de larvas de estadio 3 expresando únicamente el driver ppl/+ (G) y expresando el RNAi de osi bajo el promotor de ppl (H). Las barras de escala representan 10 µm. I. cuantificación del tamaño nuclear muestra que las larvas expresando osi^{RNAi} poseen núcleos más pequeños que el control. J. cuantificación del tamaño celular. Larvas expresando el osi^{RNAI} muestran un tamaño celular reducido. K. La relación núcleo/célula muestra que no hay diferencias entre los genotipos. En los paneles A-F las barras grises representan larvas P[UAS]100B/+ (-/+) y las azules P[UAS]100B/ P[UAS]100B (-/-). En los paneles G-K las barras celestes representan larvas expresando únicamente el driver ppl/+ y en violeta las larvas expresando el osi^{RNAi} en patrón de pplGal4. En todos los paneles los gráficos representan la media ± error estándar de la media. Las letras distintas indican diferencias significativas, p>0.05.

Una posible interpretación para las observaciones descriptas es que la disfunción de *orsai* afectara a su vez el número de células, lo cual podría contribuir a un defecto de tamaño.

Para analizarlo en profundidad se redujeron los niveles de OSI en el ala, otro de los modelos de elección para el estudio de tamaño y número celular. Utilizamos el driver *MS1096*Gal4 que dirige la expresión a la sección dorsal del disco de ala. El objetivo de utilizar este driver es que permite comparar el número y forma de las células de la sección dorsal con la sección ventral que permanece inalterada. Sin embargo, la expresión del

RNAi de *osi* disparó efectos tan penetrantes que impidieron obtener imágenes que permitieran la cuantificación. En la **Figura 24** pueden observarse las alas control (izquierda) y expresando el RNAI de *osi* (derecha). La magnitud del fenotipo impidió continuar con este modelo celular.



<u>Figura 24:</u> La expresión de osi^{RNAi} en la región dorsal del disco de ala provoca un fenotipo aberrante. Derecha. Individuo adulto expresando únicamente el driver MS1096/+. Izquierda. Individuo adulto expresando MS1096>osi^{RNAi}. Las alas se encuentran totalmente plegadas haciendo imposible cualquier comparación.

Para caracterizar en profundidad el rol celular de *osi* nos enfocamos, finalmente, en el cuerpo graso.

Para esta etapa se emplearon clones mitóticos (ver materiales y métodos). Esta técnica permite estudiar fenotipos celulares en contexto del tejido funcional. Luego de una puesta a punto que requirió principalmente definir la ventana temporal (etapa del desarrollo) y duración de la inducción por calor se seleccionó la inducción por 5 minutos, que permite evaluar suficientes clonesen un contexto donde la mayor parte del tejido continúa siendo *wild type*. En la **Figura 25** se observan imágenes representativas de disecciones realizadas cada 24 hs donde queda en evidencia el avance del fenotipo celular de las células con bajos niveles de *orsai*. Tanto a 24 hs (**Figura 25A**) como a 48 hs (**Figura 25B**) las células que expresan el RNAi de *osi* siguen siendo similares a las células controles tanto en forma como en tamaño. Sin embargo, a las 72 horas (**Figura 25C**) las células con bajos niveles de *osi* son incapaces de mantener la estructura hexagonal típica de las células de cuerpo graso, y al llegar a las 96 hs (**Figura 25D**) éstas ya tienen forma ahusada y un tamaño reducido. Más allá de este punto horario, los animales comienzan a

pupar, y no fue posible encontrar clones que sobrevivieran hasta estadios adultos (datos no mostrados).

Con este experimento se pudo concluir que la función de *orsai* es autónoma de célula, debido a que sólo las células que expresaban el RNAi de *osi* mostraban un fenotipo deletéreo. Adicionalmente, el modelo de cuerpo graso puede ser considerado un buen modelo para ahondar en la función celular de *orsai*. A partir de este momento, todas las figuras de cuerpo graso mostradas corresponden a disecciones hechas a las 72 horas post inducción por temperatura por 5´a 37°C.



<u>Figura 25:</u> El crecimiento celular deficiente provocado por la bajada de función de orsai es autónomo de célula. Las imágenes muestran la progresión del crecimiento de las células de cuerpo graso en células expresando (amarillas) y no expresando el osi^{RNAi}. Estas imágenes fueron tomadas cada 24 horas luego del pulso de calor y hasta la pupariacion. En violeta, faloidina marca los limites celulares. Las barras de escala representan 20 μm.

Una vez determinado el modelo para continuar el análisis, se combinó la desregulación de *osi* en contexto de la de dos de los principales reguladores de la via de TOR, PTEN y AKT, para evaluar el aporte de la vía más canónica de control de

crecimiento celular sobre el fenotipo provocado por la falta de función de *osi*. Utilizamos un RNAi para disminuir los niveles de *pten* y un *akt^{UAS}* para aumentar la expresión de AKT. En ambos casos, el objetivo es forzar la vía de TOR a promover el crecimiento celular (revisado en ¹⁵⁴).

A su vez, testeamos la coexpresión del osi^{RNAI} junto con SODII^{UAS}, superóxido dismutasa para evaluar si el tamaño reducido de las células con baja función de *osi* puede ser al menos parcialmente rescatado por la función quelante de oxidantes de la SODII. En la **Figura 26 B-H** se representan fotografías representativas del cuerpo graso de individuos que expresan las distintas construcciones junto al correspondiente gráfico de distribución de frecuencias de tamaños (en color se indican los clones "activos", en gris, los inactivos). En el panel B se observa la imagen y cuantificación correspondiente para individuos expresando las construcciones indicadas.

La primera observación que llama la atención es que ni la sobreexpresión de AKT ni la reducción de niveles de PTEN, que se asocian a la activación de la vía de TOR, dieron origen a células de mayor tamaño que los controles. Sin embargo, las cuantificaciones revelan que, salvo una pequeña tendencia en las células que tienen activo el RNAi de *pten*, son indistinguibles de los controles. Nuevamente, al considerar las distribuciones de frecuencias para las células co-expresantes, vemos que tanto aquellas que poseen el RNAi de *osi* únicamente o aquellas que co-expresan el SODII^{UAS} y el akt^{UAS} tienen el mismo rango y disposición de frecuencias. Aquellas que co-expresan el *pten*^{RNAi} junto con el osi^{RNAi} tienen una distribución más homogénea de frecuencias, con un pico máximo más cercano a la frecuencia máxima del control, pero no llega a verse un rescate del fenotipo sino mayor variabilidad en el tamaño celular de la población.

En la **Figura 26 A** se presenta el promedio de las medias de las células activas e inactivas para cada fenotipo. Lo primero a destacar es que la media de las células inactivas de todos los genotipos coincide, y es a su vez estadísticamente igual que la media de las formas activas de los individuos sin RNAi de *osi.* En segundo lugar, la media de las células que expresan co-expresan akt^{UAS}, pten^{RNAi} o SODII^{UAS} junto con el osi^{RNAi} son equivalentes a la media de las células que expresan únicamente osi^{RNAi}. Esto nos muestra que, a pesar de las diferencias observadas en la distribución de frecuencias, estadísticamente no se observa la suficiente separación entre los grupos. Esto puede deberse a que, por un lado, la vía de TOR está fuertemente regulada por las células para evitar un crecimiento anormal. Por otro lado, puede deberse a que la fuerza de las construcciones no sea equivalente a nivel biológico, y que la desregulación de *orsai* no pueda ser compensada únicamente por la bajada de *pten* o la subida de *akt,* y requiera la desregulación de un factor adicional.

Una posibilidad relacionada con esta última es que no funcionará intentar forzar a crecer a un sistema tal como la célula con *osi* disminuido que metabólicamente no está en condiciones de afrontar el gasto.



<u>Figura 26:</u> la activación de la vía de TOR no es suficiente para revertir el fenotipo de tamaño reducido de los clones con osi disminuído. A: Gráfico mostrando el promedio de área normalizada para células de cuerpo graso en clones inactivos (in) o activos (act) para los genotipos indicados. Se muestra media ± error estándar de la media. Las letras distintas indican diferencias significativas, p>0.05. **B-H paneles izquierdos:** distribución de frecuencias de tamaño de células de cuerpo graso en los cuales la flipasa se encontraba activa (color) o inactiva (gris) para el genotipo indicado. **B-H paneles derechos:** fotografías representativas de células de cuerpo graso de individuos correspondientes a los genotipos indicados. Todas las fotos muestran faloidina (canal violeta) marcando limites celulares. Los clones expresando las construcciones de interés expresan un marcador fluorescente y por tanto aparecen en amarillo. Las barras de escala representan 20 µm.

Teniendo en cuenta las resultados recabados a nivel morfológico y metabólico, y la información bibliográfica disponible respecto de las predicciones de función para *orsai*, junto con la publicación de un paper que echa luz sobre la función de putativo homólogo humano, LYRm5¹⁵⁵; decidimos construir una línea LYRm5^{UAS} que permitiera expresar en *Drosophila* esta construcción (diseñada por el Dr. Juan I Romero).

En la **Figura 27** encontramos fotografías representativas y gráficos de distribución de frecuencias para las células de cuerpo graso activas e inactivas que expresan una serie de construcciones de interés: *osi^{RNAi}* (**Figura 27B**), *osiSM* (**Figura 27C**), *osiSM*; *osi^{RNAi}* (**Figura 27D**), LYRm5^{UAS} (**Figura 27E**) y LYRm5^{UAS}; *osi^{RNAi}* (**Figura 27F**).

La construcción osiSM refiere a "mutación silenciosa" y genera una hebra de mRNA con mutaciones silenciosas que interfieren con el apareamiento/reconocimiento de la maquinaria de RNAi (es, por lo tanto, una versión de *osi* resistente al RNA de interferencia), el cual fue utilizado como control de especificidad. Lo que se observa en la cuantificación de la **Figura 27 A** es que, en primer lugar, las medias de las células inactivas coinciden para todos los genotipos; en segundo lugar, que las medias de las células activas coinciden para todos los genotipos excepto las que expresan únicamente el RNAi de *osi*. Esto significa que, en contraste con los resultados mostrados en la figura anterior, al co-expresar osiSM o LYRm5, el área de las células vuelve a los valores del control. Esto es especialmente importante en el caso de la sobreexpresión de LYRm5, ya que logró revertir el fenotipo causado por la baja de función de *orsai*. Esto podría dar una pista firme acerca de la función concreta de *orsai* a nivel celular.



<u>Figura 27:</u> El tamaño celular reducido asociado a la disfunción de osi es rescatado mediante la expresión de la proteína humana Lyr5m. A: Gráfico mostrando el promedio de área normalizada para células de cuerpo graso en clones inactivos (in) o activos (act) para los genotipos indicados. Se muestra la media ± error estándar de la media. Las letras distintas indican diferencias significativas, p>0.05. B-F paneles izquierdos. Distribución de frecuencias de tamaño de células de cuerpo graso en los cuales la flipasa se encontraba activa (color) o inactiva (gris) para el genotipo indicado. B-F paneles derechos. Fotografías representativas de células de cuerpo graso de individuos correspondientes a los genotipos indicados. Todas las fotos muestran faloidina (canal violeta) delimitando el contorno celular. Los clones expresando las construcciones de interés expresan un marcador fluorescente y por tanto aparecen en amarillo. Las barras de escala representan 20 μm.

Para verificar el alcance del rescate de la función de *osi* por expresión de la proteína humana LYRm5 se expresó LYRm5^{UAS} junto con osi^{RNAi} en el patrón de *ppl*Gal4,
obteniendo los resultados mostrados en la **Figura 28**. Llamativamente LYRm5 revirtió la letalidad causada por la disfunción de *osi* casi al 100%. Cabe destacar que no se realizó el mismo experimento en presencia de dcrII debido a que no logró obtenerse a tiempo la recombinante necesaria.



<u>Figura 28:</u> La expresión de la proteína humana LYRm5 revierte la letalidad provocada por la baja de función de orsai en cuerpo graso. En violeta, porcentaje de sobrevida para individuos expresando el RNAi de osi. En azul, porcentaje de sobrevida para individuos co-expresando LYRm5. Letras diferentes representan diferencias significativas con p<0.05.

<u>Discusión</u>

"Many advances in the history of science occurred when two aspects of nature, hitherto considered separate classes of phenomena, were revealed as different aspects of the same process or entity" Lautaro Gándara

Orsai, una nueva proteína nuclear fundamental para la supervivencia celular

Al comienzo de esta tesis nos encontrábamos frente a un mutante obtenido a partir de un *screen* realizado con el objetivo de encontrar nuevos reguladores de procesos neurodegenerativos. Este mutante demostró tener fallas del desarrollo que provocan la muerte y un comportamiento poco común respecto del alimento.

A lo largo de la caracterización aquí presentada, se encontró que el CG6115, renombrado *orsai*, es el responsable de los fenotipos del mutante, pero su función parece estar lejos de lo que originalmente se esperaba.

Se ha visto que *orsai* es una proteína perteneciente a la superfamilia LYRm pero que no ha sido encontrada en la mitocondria como la mayor parte de las proteínas de esta familia, sino en el núcleo y, al menos en cuerpo graso, también se la encuentra formando un reticulado citoplasmático pero que aun así no coincide con una localización mitocondrial (**Figura 21**).

Se ha mostrado que la disfunción de *orsai* provoca fenotipos complejos en el organismo en función de en qué tejido ocurra dicha desregulación (**Figura 16-20**), y se ha concluido que esto se debe a que la función primordial de *orsai* está involucrada con una función celular clave para la supervivencia y correcto funcionamiento de la célula. Esta afirmación está cimentada particularmente en los experimentos que se realizaron utilizando clones en el cuerpo graso, que muestran que la reducción de niveles de ORSAI dispara fenotipos autónomos de célula que culminan en la inviabilidad de la misma (**Figura 25**). Se ha mostrado, además, que disminución de niveles de *orsai* provoca una disminución de la producción de ATP mitocondrial y un fuerte aumento de los radicales libres, junto con una disminución del tamaño mitocondrial a las 72 horas AEL. Estos fenotipos metabólicos parecen ser sólo la punta del iceberg en lo que respecta a la descripción del problema metabólico que esta disfunción acarrea.

Partiendo de los resultados obtenidos en esta tesis, en esta sección se intentará plantear un modelo coherente con los mismos y luego, contrastar los resultados individuales con el modelo final. Por último, se intentará relacionar esta caracterización con aspectos típicos de las enfermedades metabólicas en humanos.

El modelo

En la célula, los niveles de azúcares en la hemolinfa y de aminoácidos provenientes de la dieta regulan la actividad de la vía de TOR a través de AKT. En una situación de crecimiento celular y del organismo, esta vía se activa y cumple múltiples funciones tales como favorecer la síntesis lipídica y proteica, desfavorecer la autofagia y favorecer la biogénesis mitocondrial ¹⁵⁶.

Dentro de la mitocondria, en una situación fisiológica estándar la síntesis de ATP se mantiene alta y los niveles de ROS, bajos. Los complejos mitocondriales correctamente funcionales utilizan la fuerza eléctrica de los electrones de los dadores NADH y FADH para generar un potencial de membrana que les permita alimentar la bomba de protones y generar ATP.

Una de las vías de entrada de poder reductor a la cadena respiratoria es la beta oxidación de los ácidos grasos. El punto de unión entre los metabolitos de la beta oxidación y la cadena de transporte de electrones son las proteínas conocidas en humanos como *electron transfer flavopritein/electron transfer flavoprotein dehydrogenase* (ETF/ETFQ0). La ETF es una flavoproteína encargada de transmitir los electrones provenientes de varias deshidrogenasas a la ubiquinona/complejo Q ^{157,158}. Son fundamentales a la hora de transportar a la mitocondria alternativas metabólicas a la glucosa. La proteína LYR5m, putativa homóloga de *osi* cuya sobreexpresión es capaz de rescatar parte de los fenotipos causados por la disfunción de *osi* (ver **Figura 27-28**) regula negativamente la función de ETF ¹⁵⁵. La proteína LYR5M humana es una de-flavinasa, con lo cual su actividad, al menos *in vitro*, es inhibir a la ETF.

Teniendo en cuenta los resultados que muestran que la disminución de la función de ORSAI es rescatada por la expresión de la proteína LYRm5 en cuanto a los defectos de crecimiento celular y supervivencia (**Figura 27-28**), consideramos que la función de ORSAI debe ser, al menos en parte, semejante a la función de LYRm5. Esta posibilidad queda refrendada por la alta identidad entre las secuencias (50%), que llega al 75% si se tienen en cuenta los residuos similares (en carga, hidrofobicidad, tamaño) (**Figura 8B-C**).

La función de ETF parece entonces estar regulada por su relación estequiométrica con LYRm5, donde la unión de 4 moléculas de LYRm5 parece inhibir completamente la actividad de ETF, mientras que la falta de LYRm5 lleva a la máxima actividad ETF¹⁵⁵. En este sentido uno podría especular que, si OSI y LYRm5 comparten la misma función, la depleción de *orsai* podría conllevar a un aumento anómalo de la función de ETF en un momento en que debería encontrarse inhibido, con el consiguiente aumento de la función de ETF-Q0 y un aumento de flujo de electrones provenientes del metabolismo lipídico a la cadena mitocondrial. En este sentido cabe destacar que según *flybase* los niveles de RNA

mensajero de *orsai* son particularmente altos en el cuerpo graso, y en estadios larvales son el doble de elevados que en el cuerpo graso adulto. Esto concuerda con la teoría de que OSI podría estar involucrado en la regulación negativa del metabolismo de lípidos, debido a que en el estadío larval el catabolismo de lípidos tiende a estar inhibido, y el metabolismo global está dirigido a su síntesis y reserva, utilizando principalmente azúcares para conseguir energía ¹⁵⁹.

Este desbalanceo en la función de ETF/ETFQ0 traerá aparejado un aumento de los radicales libres provocados por el aumento del flujo de electrones, y por otro lado un aumento en el metabolismo de ácidos grasos provocado por la imposibilidad de detener su utilización. Esto lleva a una disminución de la producción de ATP; primero, a causa de que la beta oxidación de ácidos grasos desacopla la cadena de transporte mitocondrial ^{160–162}, y a su vez porque el metabolismo lipídico modifica la composición de las membranas mitocondriales e inhibe a AKT¹⁶³.

Los bajos niveles de ATP junto con los altos niveles de ROS impactan sobre la vía de control del crecimiento celular (vía de TOR) inhibiendo la endoreplicación y previniendo el crecimiento celular ^{149–153}.Por otra parte, la utilización de ácidos grasos disminuye las reservas energéticas, con lo que se envían señales de estrés nutricional inhibiendo aún más la vía de TOR, y promoviendo la degradación de más ácidos grasos para intentar mantener los niveles de ATP y generando un círculo vicioso que culmina en la muerte celular.



<u>Figura 29</u>: Funcionamiento de una célula en situación metabólica no estresada. Los aminoácidos provenientes de la dieta junto con la glucosa circulante regulan el funcionamiento de la vía de AKT/TOR, que se encarga de acoplar el estado nutricional del individuo al crecimiento celular y proliferación. Uno de los papeles de la vía de TOR es la rgulacion de la biogénesis mitocondrial, la cual está promovida durante una situación de nutrición alta. Las mitcondrias producen grandes cantidades de ATP y ROS como subproducto de señalización en cantidades bajas. Las proteínas ETF/ETFQ0 son las encargadas de transferir los electrones provenientes de la beta oxidación de los acidos grasos a la cadena de transporte de electrones. En humanos, la proteína LYRm5 funciona como regulador negativo de las ETF. ORSAI ha mostrado que al menos una de sus funciones es comparable a la de LYRm5.



<u>Figura 30</u>: resumen de los efectos celulares que hemos medido en un sistema con niveles reducidos de ORSAI. El crecimiento celular está disminuído, aunque aun no hemos explorado molecularmente el estado de la vía de TOR. Hemos mostrado que los niveles de ATP se encuentran disminuídos, al contrario que las especies reactivas de oxígeno. Hay un aumento de la expresión de lip3.Se ha visto, además, que las larvas inician un comportamiento símil "wandering" incluso cuando sólo tienen 24 horas AEL.



<u>Figura 31</u>: Modelo propuesto de posibles vías celulares alteradas como consecuencia de la disminución de los niveles de orsai. Se propone que el estrés nutricional provocado por la disminución de la alimentación, así como el estrés metabólico producido por los altos niveles de ROS y bajos niveles de ATP son señales que regulan negativamente la vía de TOR, provocando un arresto de la endoreplicación y consecuentemente del tamaño celular, lo cual se ve acompañado de una reducción de la biogénesis mitocondrial por la inhibiciónde la via de TOR. Se propone que los altos niveles de lip3 provocan un aumento desmedido de la beta-oxidación, provocando una disminución brusca de las reservas de lípidos que, junto con los bajos niveles de oxígeno generados por la disfunción traqueal provocan el comportamiento de alejamiento de la comida.

Puesta a prueba del modelo

Las larvas homocigotas mutantes para orsai mantienen el tamaño inicial (apenas crecen) y mueren incluso antes de la primera muda (Figura 16). Este fenotipo aparece también al disminuir los niveles de orsai con una herramienta específica en un patrón ubicuo (Figura 17), y se repite de forma menos abrupta cuando la disminución de los niveles de orsai se da en tejidos puntuales como el músculo (Figura 18), las tráqueas (Figura 19). Siguiendo la lógica del modelo, un individuo incapaz de acumular reservas e incluso impedido de utilizar eficientemente el alimento que ingiere, como es el caso de un individuo cuyas reservas lipídicas son quemadas sin freno, será incapaz de crecer. Teniendo en cuenta, además, que los experimentos fueron hechos de forma crónica, esto es, que los individuos mantuvieron sus niveles de orsai bajos desde el comienzo de su desarrollo, podemos hipotetizar que estos individuos nunca alcanzan el peso mínimo ni las reservas de lípidos necesarias para iniciar la muda; adicionalmentela glándula protorácica necesita también alcanzar un tamaño mínimo para sustentar la producción de ecdisona. En ese sentido, el hecho de que el mutante muera tempranamente, y que la adición de ecdisona a la dieta no haya podido revertir este fenotipo, refuerza la idea de que el estado metabólico de los individuos con niveles bajos de orsai no está en condiciones de permitir la muda y de que no se trata de un simple impedimento hormonal.

En segunda instancia cabe analizar el comportamiento que da nombre a la proteína, ORSAI. Este alejamiento de la comida también puede explicarse en el contexto del modelo planteado. La disminución en la absorción de nutrientes, sumados al estrés metabólico desencadenan un comportamiento de símil *wandering*¹⁵³ en el cual los individuos tienen activadas las señales de hambreado y comienzan a buscar comida activamente, pero, como no pueden aprovecharla, continúan buscándola volviéndose "ciegos" a ella. Esta posibilidad explicaría por qué los mutantes en vías de morir de inanición están indistintamente dentro o fuera de la zona de comida nutritiva. Aquellas larvas que, al azar, atraviesen el parche de comida ingerirán una cierta cantidad, pero de todas maneras no serán capaces de aprovecharla y morirán. En el caso de los experimentos realizados en comida con mayor contenido proteico, cierta cantidad de energía puede generarse a través del metabolismo de proteínas, pero aun así el daño celular provocado acaba por matar al organismo.

Como apoyo a esta interpretación, en el laboratorio se ha visto (**Figura Suplementaria 1**) que los niveles de lipasa 3 (*lip3*, medidos como niveles de RNA mensajeo por qPCR)

81

están elevados tanto en los mutantes 100B/100B como en los individuos que expresan el *osl*^{RNAi} en un patrón ubicuo. La lipasa 3 (*lip3*) es homóloga de una lipasa humana ¹⁶⁴ y está involucrada en el metabolismo lipídico ¹⁶⁵. Dentro del modelo planteado, el aumento de los niveles de *lip3* es coherente por dos motivos: el primero, porque es una señal típica de respuesta al hambreado, cuyo objetivo es aumentar la lipólisis para utilizar las reservas de lípidos del organismo en caso de ser necesario ^{132,166}; a su vez, porque proponemos que hay una falta de inhibición del metabolismo de lípidos provocada por la falta de inhibición de ETF. Una forma de corroborar la conexión entre los niveles elevados de *lip3* y la posible función de ORSAI propuesta sería medir los niveles de beta-oxidación de ácidos grasos, que deberían estar elevados, y la concentración de triglicéridos circulantes, que debería estar aumentada también. Ambas mediciones son posibles ^{167,168}. Para completar el análisis del estado del metabolismo de lípidos es necesario medir el flujo de electrones a través de las proteínas ETF para demostrar la falta de su inhibición, tal como se muestra *in vitro* en ¹⁶⁹.

Análisis de los fenotipos asociados a la disfunción de orsai en distintos tejidos:

-En sistema nervioso central

Respecto a las neuronas, es sabido que, en su mayor parte, utilizan glucosa y no lípidos como fuente de energía ^{170,171}. De hecho, los niveles de beta oxidación de ácidos grasos en neuronas es insignificante, aunque con ciertas excepciones ^{172,173}. Una de esas excepciones es en D. melanogaster, donde un mutante para una enzima mitocondrial de las neuronas provoca la acumulación de triglicéridos en el cerebro, fenotipo que es revertido mediante el rescate de la función oxidativa en glía ¹⁷⁴. En este escenario, es consistente considerar que reducción de niveles de orsai no genera un fenotipo o, más precisamente, no provoca un fenotipo de letalidad temprana tal como sí ocurre en otros tejidos.

-En sistema muscular

Dentro de los fenotipos asociados a la disminución de niveles de *orsai* en el músculo se observa hipotrofia muscular (**Figura 18C-E**). Se ha reportado que el daño provocado por los altos niveles de ROS tiene un papel decisivo en la aparición de atrofias musculares en humanos ¹⁷⁵. Incluso, se ha visto que un aumento de la fragmentación mitocondrial es parte de la señalización que da inicio a la expresión de genes pro-atrofia,

la degradación de proteínas y finalmente la atrofia muscular a través de la vía de FoxO¹⁷⁶. Además, la atrofia muscular está fuertemente ligada a la inacción, es decir la falta de ejercicio muscular. Si bien es cierto que a las 24 horas AEL, momento en el que fueron hechos los experimentos de olfacción, los mutantes tienen la misma movilidad que los controles, al momento en el que fueron tomadas las fotografías de TEM, es decir, a las 72 horas AEL, los mutantes prácticamente no se mueven, probablemente fruto de su depleción energética, lo cual solo empeora su debilidad muscular.

Respecto de los fenotipos mitocondriales, a lo largo de esta tesis se ha mostrado que los individuos con bajos niveles de *osi* poseen altos niveles de ROS, bajos niveles de ATP y sus mitocondrias son pequeñas y con tendencia a la ramificación (**Figura 22**). Ya se ha explicado cómo la desregulación de *osi* podría estar afectando la cadena de transporte y generando los cambios en niveles de ATP y ROS.

Ahora bien, respecto al tamaño y forma de las mitocondrias hay datos que a primera vista podrían parecer contradictorios. Por un lado, como fue explicado en la introducción, en un contexto de hambreado la red mitocondrial tiende a fusionarse para optimizar sus recursos, mientras que en los mutantes 100B/100B las mitocondrias son más pequeñas que los controles. Por otro lado, en el laboratorio se ha demostrado (ver Figura Suplementaria 2) que los niveles de RNA mensajero drp1 y fis1 (factores de fisión) no varían en el mutante respecto de los controles, siendo el mismo caso que opa1 (factor de fusión) y que *pink* y *parkin* (factores de dinámica mitocondrial, que envían las mitocondrias dañadas a degradación). Sin embargo, los niveles del factor de fusión marf están significativamente elevados respecto de los controles. Esto puede explicarse de dos maneras: por un lado, las imágenes para el análisis por microscopía electrónica fueron tomadas a 72 horas AEL, momento en que el daño es máximo. Una posibilidad es que realizar las micrografías más tempranamente (24 horas AEL, por ejemplo) permita encontrar mitocondrias fusionadas -esperables en un contexto de hambreado- y al aumento correspondiente de los niveles de marf1. Esta posibilidad permitiría a su vez explicar el aumento de las ramificaciones, que pdrían reflejar el intento de fusión entre las mitocondrias disfuncionales. Por otra parte, las imágenes fueron tomadas en músculos atrofiados y ya se ha explicado (ver introducción) que en esos casos las mitocondrias se encuentran fragmentadas. Adicionalmente, se ha visto ¹⁶⁸ que en modelos de sobreexpresión de *lip3* las mitocondrias tienden a fragmentarse debido a las consecuencias de la disfunción en el metabolismo de lípidos. Teniendo en cuenta nuestros resultados y los de la literatura el estado final de las mitocondrias de los

83

mutantes 100B/100B a 72 horas AEL son el resultado de un conjunto de señales, a veces contradictorias, a lo largo del tiempo y en un momento de daño máximo. Para clarificar este aspecto será necesario hacer un seguimiento más detallado a lo largo del tiempo, tanto respecto a nuevas fotografías de TEM como a corroborar los niveles de proteínas claves para el proceso de fusión y fisión, ya que puede ocurrir que las mediciones a nivel de RNA no reflejen el último paso de regulación de una molécula.

-En el sistema traqueal

Respecto de los fenotipos específicos provocados por la desregulación de *orsai* en el patrón de tráqueas (**Figura 19**) llama la atención que no se generan las ramificaciones traqueales esperadas para casos de hipoxia; en su lugar aparecen distintas fallas morfológicas, principalmente colapsos del lumen y otros defectos estructurales. En Parvy et al. ¹⁷⁷ se describe un estudio de la Acetyl-coenzymeA-carboxylase (ACC), la enzima limitante de la síntesis de ácidos grasos. La ACC se expresa en tejidos con funciones oxidativas (cuerpo graso y oenocitos, con una expresión menor en intestino y discos imaginales) y produce metabolitos que regulan la beta oxidación de ácidos grasos ¹⁷⁸. En este estudio muestran que la reducción de niveles de la ACC provoca letalidad en estadio larval 2. Esta letalidad fue explicada a través del papel impermeabilizante de los ácidos grasos en las tráqueas. Si este proceso no se realiza correctamente, las tráqueas se llenan de líquido y el transporte de oxígeno a los tejidos se ve deteriorado. Estos fenotipos son muy similares a los exhibidos en la **Figura 19**.

Adicionalmente, los fenotipos comportamentales disparados por la disfunción de ACC son sorprendentemente similares a los obtenidos tras la disfunción de *orsai*. Los individuos con bajo niveles de ACC llegan a mudar hasta larva 2, pero luego reducen la locomocióny más del 50% de la población se encuentra *fuera del área* de la comida, lo cual coincide con lo descripto en la **Figura 16** respecto del comportamiento de los mutantes de *orsai*. Este tipo de comportamiento de aversión por la comida se ha mostrado ocasionado por problemas de oxigenación ¹⁷⁹ y de bajo nivel nutricional ¹⁵³, probablemente en el caso de *orsai* ambas vías estén impactando en el mismo sentido. Por otra parte, esto posibilidad permitiría explicar también los fenotipos obtenidos al disminuir los niveles de *osi* en el patrón de *engrailed* (**Figura Suplementaria 3**) en cuyo caso se obtuvieron fenotipos de tráqueas hipóxicas en los segmentos afectados, lo cual permite sugerir que un segmento capaz de responder intenta compensar la hipoxia del segmento adyacente.

La posibilidad que *orsai* juegue un papel clave en el metabolismo del acetato, como se ha descripto para ciertas proteínas LYRm ^{77,87,180}, permitiría ofrecer a través de este trabajo una interpretación más completa de los fenotipos observados tanto en los modelos de perdida de función específicos de tejido (en este caso, las tráqueas), como en el mutante.

-En la glándula del anillo

La disfunción de *osi* exclusivamente en la glándula del anillo se asocia a individuos que crecen continuamente, pero son incapaces de mudar. Estas observaciones puede explicarse sencillamente considerando la incapacidad de mantener el metabolismo celular, seguido del arresto del crecimiento celular provoca (en el caso de una larva donde los niveles de *osi* están bajos únicamente en la glándula del anillo) los fenotipos esperables de arresto en el desarrollo, sobrecrecimiento y muerte en estadio larval ^{139,181,182}.

-En cuanto a su relación con la vía de crecimiento celular de TOR/AKT

Uno de los aspectos comunes al análisis de los fenotipos disparados por la disfunción de *orsai* en distintos tejidos es la vía de TOR. Se sabe que tanto el estrés oxidativo, como el estrés nutricional y los bajos niveles de oxígeno provocan una disminución de la actividad de la vía de TOR, y que esto puede llevar al arresto de la endorreplicación y, en consecuencia, a la disminución del tamaño nuclear y celular¹⁸³. Hemos mostrado que los bajos niveles de *orsai* provocan la reducción del tamaño, tanto a nivel de organismo como de célula única (ver **Figuras 16-19** y **25**). También hemos descripto que los individuos con bajos niveles de *osi* están arrestados en el desarrollo, su tamaño es más pequeño que los controles, tienen altos niveles de ROS y han montado una respuesta de hambreado (equivalente a la de una situación nutricional pobre).

Si bien muchos de los resultados apuntan a una desregulación de la via de TOR, no fue posible contrarestar los fenotipos celulares forzando genéticamente (a través de ensayos de epístasis o complementación génica) distintos elementos de la vía de TOR. Sin embargo, esto no es necesariamente un resultado negativo. Por un lado, los controles que con niveles reducidos de uno de los principales represores de la via (*pten*) como aquellos con niveles exacerbados de un efector positivo de la misma (*akt*) apenas lograron modificar el tamaño por sí mismos, mostrando que forzar genéticamente la vía no es fácil, y que probablemente sea necesario modificar más de un factor genético conjuntamente. Por otro lado, incluso aunque pudiera activarse efectivamente la vía de TOR, en el caso

de la disfunción de orsai si la célula no cuenta con el metabolismo activo y la nutrición necesarias simplemente la combinación no será viable. Sin embargo, para poder afirmar todo esto es necesario realizar experimentos adicionales.

Una propuesta seria sobreexpresar factores que promueven el crecimiento celular autónomamente , más allá del estado nutricional, como es el caso de dMyc, Ciclina D/CDK4 o Pi3K ^{184,185} y en ese contexto corroborar la activación del ciclo celular, aunque probablemente esto requiera del análisis clonal (como se hizo en contexto de este trabajo de tesis) y a tiempos cortos porque si el sistema no puede sostener el crecimiento, éste llegará rápidamente a un límite ⁵³. Teniendo en cuenta que S6K, efector de la vía de TOR, tiene un papel determinante en el control del tamaño celular (ver introducción), podría sobreexpresarse esta proteína en contexto de la disminución de *osi* con el objetivo de revertir el fenotipo de tamaño celular reducido. Por otro lado, se conoce que 4EBP regula el metabolismo de lípidos y que individuos con bajos niveles de 4EBP queman sus reservas de lípidos con gran velocidad ⁵⁰. En ese contexto, puede intentar sobreexpresarse 4EBP como forma de probar la relación entre los bajos niveles de *orsai* y el metabolismo de lípidos.

El hecho de que la sobreexpresión de SODII no es capaz de rescatar los fenotipos de falta de *osi*, (**Figura 26H**) sugiere que el daño provocado por los radicales libres es demasiado alto para ser compensado por la sobreexpresión de SODII, o que dicho daño aporta al estado del sistema, pero no es el factor clave.

La función bioquímica de Orsai, aún un enigma

Habiendo examinado el posible modelo de disfunción de *orsai*, aun falta esclarecer cual es su función. Hemos demostrado que *orsai* tiene una función clave para la viabilidad celular y, aun más, para el metabolismo energético de la célula. En particular, los resultados obtenidos son coherentes con la posibilidad de que *orsai* es un regulador del metabolismo lipídico. Sin embargo, a diferencia de otros reguladores del metabolismo lipídico no es una proteína mitocondrial sino nuclear, de pequeño tamaño, que adopta una conformación de hélice alfa. Según *flybase*, los niveles de RNA de *orsai* son elevados durante todo el desarrollo, en todos los tejidos, con un pico máximo en el cambio de larva de estadío 2 a estadío 3; a su vez, se ha reportado que los niveles del mensajero de *orsai* aumentan aún más en condiciones de estrés por metales (Zinc, Cadmio, Cobre) así como de exposición a la cafeína y al paraquat (desacoplante mitocondrial) en *Drosophila*¹⁸⁶. Incorporando estos resultados de la literatura proponemos que *orsai* podría actuar como

un regulador de un factor de transcripción que regula el metabolismo lipídico en condiciones basales con especial importancia en situaciones de estrés. Para explorar esta posibilidad se podría realizar un experimento de inmunoprecipitacion de cromatina para verificar su unión al DNA y en tal caso cuáles son los elementos que está regulando. Alternativamente, *orsai* podría ser un tipo de cofactor de respuesta a estrés, lo cual podría abordarse verificando que los sitios de unión se modifican frente a diferentes tipos de estrés. Por otra parte, es difícil congeniar esa idea con un papel tan fundamental en la viabilidad celular, aun en individuos que no son sometidos a un estrés externo (como es el caso de los experimentos de clones en el cuerpo graso), a menos que las demandas metabólicas propias del crecimiento del individuo se consideren una fuente de estrés metabólico, lo cual también es una posibilidad ¹⁸⁷.

Orsai y las enfermedades metabólicas

Las enfermedades que involucran la disfunción mitocondrial pueden comenzar por fallas en proteínas específicamente mitocondriales, pero también nucleares, debido a la cercana relación de regulación mutua que existe entre ambas organelas. Esta interacción debe ser funcional y estar correctamente coordinada para poder responder a las demandas metabólicas de las células y del organismo en un ambiente cambiante, especialmente durante el crecimiento y desarrollo, donde el metabolismo se ve desafiado de forma continua. En consecuencia, el correcto funcionamiento del núcleo y de la mitocondria, así como su relación, son puntos fundamentales para el estudio de las enfermedades metabólicas humanas.

Como ya se ha explicado, las proteínas de tipo LYR, se han descripto hasta el momento como principalmente mitocondriales; sin embargo, algunas tienen localización nuclear, y han sido relacionadas con diferentes enfermedades tales como resistencia a insulina, hipotonía muscular, acidosis láctica, encefalopatías, etc ^{88–92}.

Las fallas en las proteínas ETF o ETFQ0 (que coinciden con cierto tipo de proteínas LYR) también pueden causar graves enfermedades, tales como la aciduria glutámica tipo II, un desorden de la beta oxidación de los ácidos grasos. Las fallas de estas se asocian a problemas en la biogénesis de las mismas, a su plegamiento, estabilidad o ausencia de cofactores necesarios para su función. Un ejemplo de esto es lo ocurrido con mutantes para el CG12140 en *D. melanogaster*, ahora llamado ETFQ0, o en mutantes de ETF (*walrus,* en *D. melanogaster*) que provocan defectos morfológicos durante la embriogénesis hasta que se produce la muerte del embrión a causa de un metabolismo

lipídico ineficiente ¹⁸⁸. Debido a sus fenotipos y al perfil de oxidación de lípidos que presenta, se considera a estas mutaciones como un modelo de estudio de las deficiencias de acilCoA deshidrogenasa en humanos (MADD – *multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency*).

Las fallas en proteínas nucleares de función mitocondrial, como es el caso de la proteína ND23, muestran letalidad temprana, neurodegeneración, bajos niveles de ATP y mitocondrias de morfología aberrante ¹⁸⁹. El funcionamiento de ND23 y las consecuencias de su disfunción hacen que sea considerada un modelo de estudio del síndrome de Leigh, caracterizado por una neurodegenración progresiva, problemas motores y metabolismo energético anormal ¹⁹⁰.

En este contexto, la difuncion de *orsai* parece cumplir todos los requisitos: su disfunción es condición suficiente para provocar defectos que dependen del órgano que se ve afectado, los cuales abarcan desde retrasos en el desarrollo hasta la muerte del organismo. Genera un aumento exacerbado de ROS y una marcada disminución de ATP. En el caso de verificarse el modelo, estas deficiencias se acompañarían por un uso desmesurado de las reservas energéticas del cuerpo. Analizando todo lo expuesto, podemos considerar que la disfunción de *orsai* no sólo es un modelo intrigante para el estudio de la regulación de los procesos de regulación metabólica en *Drosophila melanogaster*, sino la oportunidad de estudiar potenciales patologías humanas en un modelo genético ampliamente validado.

Apéndice

"The generation of random numbers is too important to be left to chance"

Robert Coveyou

Análisis estadístico

Figura 16 - Las larvas homocigotas mutantes para osi sufren de arresto en el desarrollo y no se alimentan

A- Crecimiento larval en comida de bajo contenido proteico

Este experimento fue analizado como un modelo generalizado mixto con medidas repetidas, el modelo elegido fue

Fit: $gls(model = area \sim esp.est, data = larval.area, weights = varldent(form = ~1 |h)$

Luego fue realizado un contraste múltiple de Tukey para comparaciones de múltiples medias, El conjunto completo de resultados se expresa en la tabla siguiente en la cual 24, 48, 72 son horas AEL.

	z value Pr(> z)	
+/24 - +/+.24	-2.693 0.1460	
-/24 - +/+.24	-2.221 0.3824	
+/+.48 - +/+.24	4.889 <0.01 ***	
+/48 - +/+.24	1.979 0.5489	
-/48 - +/+.24	0.000 1.0000	
+/+.72 - +/+.24	9.309 < 0.01 ***	
+/72 - +/+.24	8.759 <0.01 ***	
-/72 - +/+.24	0.000 1.0000	
-/24 - +/24	0.220 1.0000	
+/+.48 - +/24	6.795 <0.01 ***	
+/48 - +/24	3.863 < 0.01 **	
-/48 - +/24	1.805 0.6703	
+/+.72 - +/24	10.951 <0.01 ***	
+/72 - +/24	10.345 < 0.01 ***	
-/72 - +/24	1.990 0.5408	
+/+.48/24	6.155 <0.01 ***	
+/48/24	3.484 0.0139 *	
-/48/24	1.561 0.8196	
+/+.72/24	9.929 <0.01 ***	
+/72/24	9.528 <0.01 ***	
-/72/24	.72/24 1.707 0.7349	
+/48 - +/+.48	48 - +/+.48 -2.010 0.5265	
-/48 - +/+.48	-3.448 0.0155 *	
+/+.72 - +/+.48	3.342 0.0220 *	
+/72 - +/+.48	3.559 0.0106 *	
-/72 - +/+.48	-3.766 <0.01 **	
-/48 - +/48	-1.493 0.8542	
+/+.72 - +/48	5.065 <0.01 ***	
+/72 - +/48	5.162 < 0.01 ***	
-/72 - +/48	-1.609 0.7940	
+/+.72/48	6.265 <0.01 ***	
+/72/48	72/48 6.310 <0.01 ***	
-/72/48	0.000 1.0000	
+/72 - +/+.72	0.560 0.9998	
-/72 - +/+.72	-6.903 <0.01 ***	
-/72 - +/72	-6.864 < 0.01 ***	

B- Crecimiento larval en comida de mayor contenido proteico

Este experimento fue analizado como un modelo generalizado mixto con medidas repetidas, el modelo elegido fue

Luego fue realizado un contraste múltiple de Tukey para comparaciones de múltiples medias. El conjunto completo de resultados se expresa en la tabla siguiente en la cual 24, 48, 72 son horas AEL.

	z value Pr(> z)
+/-24 - +/+24	-2.254 0.3083
-/-24 - +/+24	-2.134 0.3841
+/+48 - +/+24	9.998 < 0.001 ***
+/-48 - +/+24	4.647 < 0.001 ***
-/-48 - +/+24	0.567 0.9996
+/+72 - +/+24	22.208 < 0.001 ***
+/-72 - +/+24	18.178 < 0.001 ***
-/-72 - +/+24	5.218 < 0.001 ***
-/-24 - +/-24	0.120 1.0000
+/+48 - +/-24	11.270 <0.001 ***
+/-48 - +/-24	5.918 < 0.001 ***
-/-48 - +/-24	1.839 0.5918
+/+72 - +/-24	22.688 < 0.001 ***
+/-72 - +/-24	18.658 < 0.001 ***
-/-72 - +/-24	5.698 < 0.001 ***
+/+48/-24	11.202 <0.001 ***
+/-48/-24	5.851 < 0.001 ***
-/-48/-24	1.771 0.6404
+/+72/-24	22.662 <0.001 ***
+/-72/-24	18.632 < 0.001 ***
-/-72/-24	5.672 < 0.001 ***
+/-48 - +/+48	-4.127 <0.001 ***
-/-48 - +/+48	-7.272 <0.001 ***
+/+72 - +/+48	17.601 <0.001 ***
+/-72 - +/+48	13.754 < 0.001 ***
-/-72 - +/+48	1.380 0.8757
-/-48 - +/-48	-3.146 0.0324 *
+/+72 - +/-48	19.529 <0.001 ***
+/-72 - +/-48	15.682 < 0.001 ***
-/-72 - +/-48	3.308 0.0191 *
+/+72/-48	20.999 <0.001 ***
+/-72/-48	17.151 <0.001 ***
-/-72/-48	4.777 <0.001 ***
+/-72 - +/+72	-2.882 0.0699
-/-72 - +/+72	-12.152 <0.001 ***
-/-72 - +/-72	-9.270 <0.001 ***

H-Cuantificaciñon de cantidad de individuos encontrados dentro y fuera de la comida

Cada experimento fue hecho con 15 larvas por genotipo; el experimento se repitió 3 veces en forma independiente. N=porcentaje de larvas por genotipo encontrado dentro o fuera del parche de levadura. Se utilizó un ANOVA de 2 factores F (2, 17) =12.23, p<0.05. Luego de lo cual se realizó un test de Bonferroni. Resultados: *osi* +/+ IN vs. OUT t=7,351, p<0.05; *osi*+/- IN vs. OUT t=3,854 p<0.05; *osi* -/- IN vs. OUT t=0.3576, p>0.05 siendo IN dentro de la comida y OUT fuera.

J-Cuantificación de área coloreada relativa al área larval total

Realizamos un ANOVA de una vía ANOVA F (2, 6) =0.05793; p>0.05. Luego de lo cual realizamos un test de Tukey. Resultados *osi* +/+ vs. *osi*+/-: q=0.4536, p>0.05; *osi*+/+ vs. *osi* -/- q=0.08723, p>0.05; *osi*+/- vs. *osi* -/- q=0.3664, p>0.05. La estadística fue realizada utilizando el promedio de cada genotipo para cada experimento. El experimento fue realizado 3 veces en forma independiente.

K-Porcentaje de arvas de intestino transparente luego de 1 hora en contacto con un parche de levadura coloreada

Realizamos un ANOVA de una vía. F (2, 6) =796.1; p<0.05. Luego de eso se realizó un test de Tukey. Resultados: $osi^{+/+}$ vs. $osi^{+/-}$: q=20.44, p<0.05; $osi^{+/+}$ vs. $osi^{-/-}$ q=55.77, p<0.05; $osi^{+/-}$ vs. $osi^{-/-}$ q=35.33, p<0.05. La estadística fue realizada utilizando el promedio de cada genotipo para cada experimento. El experimento fue realizado 3 veces en forma independiente.

Figura 17-La disminución de los niveles de osi generada por la utilización de un RNAi en un patrón ubicuo fenocopia al mutante

A- Crecimiento larval en comida de bajo contenido proteico

Este experimento fue analizado como un modelo generalizado mixto con medidas repetidas, el modelo elegido fue

Fit:
$$gls(model = area \sim esp.est, data = area.larval, weights = varldent(form = ~1 |h))$$

Luego de esto se realizó un contraste de Tukey para comparaciones múltiples de medias. Los resultados se muestran en la siguiente tabla donde 24, 48, 72, 96

representan las horas AEL.

	z value	Pr(> z)
act/osiRNAi.24 - act.24	-3.805	0.00325 **
act.48 - act.24	2.634	0.13431
act/osiRNAi.48 - act.24	-3.345	0.01729 *
act.72 - act.24	4.000	0.00159 **
act/osiRNAi.72 - act.24	0.548	0.99932
act.96 - act.24	6.230	< 0.001 ***
act/osiRNAi.96 - act.24	1.531	0.77903
act.48 - act/osiRNAi.24	6.421	< 0.001 ***
act/osiRNAi.48 - act/osiRNAi.24	0.568	0.99914
act.72 - act/osiRNAi.24	7.597	< 0.001 ***
act/osiRNAi.72 - act/osiRNAi.24	4.143	< 0.001 ***
act.96 - act/osiRNAi.24	8.621	< 0.001 ***
act/osiRNAi.96 - act/osiRNAi.24	3.848	0.00266 **
act/osiRNAi.48 - act.48	-6.049	< 0.001 ***
act.72 - act.48	1.513	0.78923
act/osiRNAi.72 - act.48	-1.919	0.52042
act.96 - act.48	4.649	< 0.001 ***
act/osiRNAi.96 - act.48	0.006	1.00000
act.72 - act/osiRNAi.48	7.272	< 0.001 ***
act/osiRNAi.72 - act/osiRNAi.48	3.711	0.00465 **
act.96 - act/osiRNAi.48	8.365	< 0.001 ***
act/osiRNAi.96 - act/osiRNAi.48	3.540	0.00873 **
act/osiRNAi.72 - act.72	-3.242	0.02390 *
act.96 - act.72	3.628	0.00653 **
act/osiRNAi.96 - act.72	-0.874	0.98729
act.96 - act/osiRNAi.72	5.720	< 0.001 ***
act/osiRNAi.96 - act/osiRNAi.72	1.161	0.93867
act/osiRNAi.96 - act.96	-3.469	0.01104 *

F- Crecimiento larval en comida de mayor contenido proteico

Este experimento fue analizado como un modelo generalizado mixto con medidas repetidas, el modelo elegido fue

 $gls(model = area \sim esp.est, data = area.larval, weights = varldent(form = ~1 |h))$

Luego de esto se realizó un contraste de Tukey para comparaciones múltiples de medias. Los resultados se muestran en la siguiente tabla donde 24, 48, 72, 96 representan las horas AEL.

act/osiRNAi.24 - act.24	z value	Pr(> z)
act.48 - act.24	-3.819	0.00238 **
act/osiRNAi.48 - act.24	13.401	< 0.001 ***
act.72 - act.24	7.389	< 0.001 ***
act/osiRNAi.72 - act.24	31.711	< 0.001 ***
act.96 - act.24	6.420	< 0.001 ***
act/osiRNAi.96 - act.24	23.876	< 0.001 ***
act.48 - act/osiRNAi.24	5.192	< 0.001 ***
act/osiRNAi.48 - act/osiRNAi.24	15.770	< 0.001 ***
act.72 - act/osiRNAi.24	9.758	< 0.001 ***
act/osiRNAi.72 - act/osiRNAi.24	33.068	< 0.001 ***
act.96 - act/osiRNAi.24	7.777	< 0.001 ***
act/osiRNAi.96 - act/osiRNAi.24	24.481	< 0.001 ***
act/osiRNAi.48 - act.48	5.797	< 0.001 ***
act.72 - act.48	-4.730	< 0.001 ***
act/osiRNAi.72 - act.48	21.929	< 0.001 ***
act.96 - act.48	-1.142	0.92941
act/osiRNAi.96 - act.48	20.055	< 0.001 ***
act.72 - act/osiRNAi.48	1.735	0.60133
act/osiRNAi.72 - act/osiRNAi.48	25.069	< 0.001 ***
act.96 - act/osiRNAi.48	1.998	0.41674
act/osiRNAi.96 - act/osiRNAi.48	21.560	< 0.001 ***
act/osiRNAi.72 - act.72	3.241	0.01909 *
act.96 - act.72	-18.475	< 0.001 ***
act/osiRNAi.96 - act.72	8.980	< 0.001 ***
act.96 - act/osiRNAi.72	-8.264	< 0.001 ***
act/osiRNAi.96 - act/osiRNAi.72	19.393	< 0.001 ***
act/osiRNAi.96 - act.96	2.149	0.32107
	-13.295	< 0.001 ***

Figura 22- Los niveles reducidos de orsai se asocian con alteraciones mitocondriales de forma y función

C- Diámetro mitocondrial

Realizamos un test de t de dos colas y encontramos diferencias significativas en el diámetro mitocondrial entre los mutantes heterocigotas (MEAN=0.3892±SEM=0.017, N=

54) y los mutantes homocigotas (MEAN=0.1909±SEM=0.009, N= 54); t test (106) =10.42, p<0.05.

D- Longitud mitocondrial

Realizamos un test de t de dos colas y encontramos diferencias significativas en el largo mitocondrial entre los mutantes heterocigotas (MEAN= $0.3892\pm$ SEM=0.017, N= 54) y los mutantes homocigotas (MEAN= $0.4015 \pm$ SEM=0.03158 N=54); t test (106) =5.427, p<0.05.

E- Área mitocondrial

Realizamos un test de t de dos colas y encontramos diferencias significativas en el área mitocondrial entre los mutantes heterocigotas (MEAN= $0.2168 \pm SEM=0.02147$, N= 64) y los mutantes homocigotas (MEAN= $0.1193 \pm SEM=0.01326$ N=64); t test (126) =3.861, p<0.05.

F- Promedio de ramificaciones por mitocondria por foto

En este experimento obtuvimos el número promedio de ramificaciones por mitocondria por foto y realizamos un t test (5) =10.55, p<0.05 y encontramos una diferencia significativa entre los heterocigotas mutantes (MEAN=0.015 ±SEM=0.015, N= 4) y los homocigotas mutantes (MEAN=0.2933± SEM=0.02333 N=3)

G- Niveles de ATP relativos a la cantidad de proteína total

Realizamos el experimento 3 veces de manera independiente. En cada experimento se realizaron 3 mediciones y se obtuvo el promedio de actividad por unidad de proteína. Relativizamos esos valores al promedio del control para remarcar la diferencia relativa entre esos valores. Realizamos un test de t pareado y encontramos diferencias significativas entre los valores obtenidos para las larvas control y las mutantes homocigotas t (2) = 4.515; p<0.05.

H- Niveles de especies reactivas de oxígeno relativos al control

Realizamos el experimento 3 veces de forma independiente. Fotografiamos 3 larvas por experimento. Relativizamos al valor del promedio del control para remarcar la diferencia relativa entre fenotipos. Realizamos un test de t pareado y encontramos diferencias significativas entre los valores obtenidos para los controles y para las larvas homocigotas mutantes t (16) =8.725.

Figura 23- Niveles reducidos de osi provocan defectos en el tamaño nuclear y celular

C- Diámetro nuclear

Realizamos un test de t a dos colas y encontramos una diferencia significativa en el diámetro nuclear entre los mutantes heterocigotas (MEAN=8.524±SEM=0.3724, N=14) y homocigotas (MEAN=6.075±SEM=0.2222, N=19); t test (31)=5.964, p<0.05.

D- Área nuclear

Realizamos un test de t a dos colas y encontramos una diferencia significativa en el área nuclear entre los mutantes heterocigotas (MEAN=41.12±SEM=5.221, N= 14) y homocigotas (MEAN=22.43±SEM=1.924, N= 19); t test (31) = 3.744, p<0.05.

E- Diámetro nucleolar

Realizamos un test de t a dos colas y encontramos una diferencia significativa en el diámetro nucleolar entre los mutantes heterocigotas (MEAN=4.245±SEM=0.6022, N= 14) y homocigotas (MEAN=2.709±SEM=0.2462, N= 16); t test (28) =2.474, p<0.05.

F- Área nucleolar

Realizamos un test de t a dos colas y encontramos una diferencia significativa en el área nucleolar entre los mutantes heterocigotas (MEAN=11.19±SEM=2.266, N=14) y homocigotas (MEAN=4.797±SEM=0.5994, N= 16); t test (28) = 2.893, p<0.05.

I- Área nuclear

Realizamos un test de t a dos colas y encontramos una diferencia significativa en el área nuclear entre los controles *ppl*/+ (MEAN=302.7±SEM=48.48, N= 61) y los individuos *ppl>osi*^{RNAi} (MEAN=208.4±SEM=7.903, N=90); t test (149) =2.302, p<0.05.

<u>J- Área celular</u>

Realizamos un test de t a dos colas y encontramos una diferencia significativa en el área celular entre los controles ppl/+ (MEAN=1908±SEM=98.63, N= 61) y los individuos $ppl>osl^{RNAi}$ (MEAN=1588±SEM=66.82, N=50); t test (109) =2.562, p<0.05.

K- Relación área nuclear-celular

Realizamos un test de t a dos colas y no encontramos una diferencia significativa en la relación entre área nuclear y celular entre los controles *ppl*/+ (MEAN=14.61±SEM=1.167, N= 61) y los individuos *ppl>osi*^{RNAi} (MEAN=15.78±SEM=0.6649, N=50); t test (109) =0.8208, p>0.05.

Figura 26- La activación de la vía de TOR no es suficiente para revertir el fenotipo de tamaño reducido de los clones con osi disminuído

<u>A- Promedio de área normalizada para células de cuerpo graso en clones inactivos (in)</u> <u>o activos (act)</u>

Realizamos un ANOVA de dos vías F (6, 558) = 42.32; p<0.05. Luego de lo cual se realizó un test de Tukey para múltiples comparaciones de medias. Los resultados se muestran en la siguiente tabla. El experimento fue realizado 3 veces en forma independiente.

	p adj	
<i>pten</i> ^{RNAi} : <i>act-osi</i> ^{RNAi} :act	0.0000000	***
<i>pten</i> ^{RNAi} . <i>osi</i> ^{RNAi} : <i>act-osi</i> ^{RNAi} :act	0.4276559	
akt ^{uas} : act-osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
akt ^{uas} .osi ^{RNAi} : act-osi ^{RNAi} :act	0.8757739	
SODII ^{UAS} : act-os/ ^{RNAi} :act	0.0000000	***
SODII ^{UAS} . osi ^{RNAi} : act-osi ^{RNAi} :act	0.9999968	
<i>osi^{RNAi}:in- osi^{RNAi}:act</i>	0.0000000	***
<i>pten</i> ^{RNAi} :in- <i>osi</i> ^{RNAi} :act	0.0000000	***
<i>pten</i> ^{RNAi} . <i>osi</i> ^{RNAi} :in- <i>osi</i> ^{RNAi} :act	0.0000000	***
akt ^{uas} :in- osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
akt ^{uas} . osi ^{RNAi} :in- osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
SODII ^{UAS} :in- osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
SODII ^{UAS} . osi ^{RNAi} :in- osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***

<i>pten</i> ^{RNAi} . <i>osi</i> ^{RNAi} :act- <i>pten</i> ^{RNAi} :act	0.0000000	***
akt ^{UAS} :act- pten ^{RNAi} :act	0.7448765	
akt ^{uas} . osi ^{RNAi} :act- pten ^{RNAi} :act	0.0000000	***
SODII ^{UAS} :act- <i>pten</i> ^{RNAi} :act	1.0000000	
SODII ^{UAS} . osi ^{RNAi} :act- pten ^{RNAi} :act	0.0000000	***
<i>osi^{RNAi}:in- pten^{RNAi} :act</i>	0.8837418	
<i>pten</i> ^{RNAi} :in- <i>pten</i> ^{RNAi} :act	0.9116290	
<i>pten</i> ^{RNAi} . <i>osi</i> ^{RNAi} :in- <i>pten</i> ^{RNAi} :act	0.9685835	
<i>akt</i> ^{UAS} :in- <i>pten</i> ^{RNAi} :act	0.9741602	
akt ^{uas} . osi ^{RNAi} :in- pten ^{RNAi} :act	0.9741604	
SODII ^{UAS} :in- <i>pten</i> ^{RNAi} :act	0.9777474	
SODII ^{UAS} . <i>osi</i> ^{RNAi} :in- <i>pten</i> ^{RNAi} :act	0.9252090	
akt ^{UAS} :act- pten ^{RNAi} . osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
akt ^{UAS} . ost ^{RNAi} :act- pten ^{RNAi} . ost ^{RNAi} :act	1.0000000	
SODII ^{UAS} :act- <i>pten</i> ^{RNAi} .osiRNAi:act	0.0000000	***
SODII ^{UAS} . osi ^{RNAi} :act- pten ^{RNAi} . osi ^{RNAi} :act	0.8858933	
osiRNAi:in- <i>pten</i> ^{RNAi} . <i>osf</i> ^{RNAi} :act	0.0000000	***
<i>pten</i> ^{RNAi} :in- <i>pten</i> ^{RNAi} . <i>osi</i> ^{RNAi} :act	0.0000000	***
<i>pten</i> ^{RNAi} . <i>osl</i> ^{RNAi} :in- <i>pten</i> ^{RNAi} . <i>osl</i> ^{RNAi} :act	0.0000000	***
<i>akt</i> ^{UAS} :in- <i>pten</i> ^{RNAi} . <i>ost</i> ^{RNAi} :act	0.0000000	***
akt ^{uas} . osi ^{RNAi} :in- pten ^{RNAi} . osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
SODII ^{UAS} :in- <i>pten</i> ^{RNAi} .osiRNAi:act	0.0000000	***
SODII ^{UAS} . osi ^{RNAi} :in- pten ^{RNAi} . osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
akt ^{UAS} . osi ^{RNAi} :act- akt ^{UAS} :act	0.0000000	***
SODII ^{UAS} :act- akt ^{UAS} :act	0.4637718	
SODII ^{UAS} . osi ^{RNAi} :act- akt ^{UAS} :act	0.0000000	***
osi ^{RNAi} :in- akt ^{UAS} :act	0.9999827	
<i>pten</i> ^{RNAi} :in- <i>akt</i> ^{UAS} :act	0.9999886	
<i>pten</i> ^{RNAi} . <i>osi</i> ^{RNAi} :in- <i>akt</i> ^{UAS} :act	0.9999973	
akt ^{uas} :in- akt ^{uas} :act	0.9999979	
akt ^{uas} . osi ^{RNAi} :in- akt ^{uas} :act	0.9999979	
SODII ^{UAS} :in- akt ^{UAS} :act	0.9999983	
SODII ^{UAS} . osi ^{RNAi} :in- akt ^{UAS} :act	0.9999911	

SODII ^{UAS} :act- akt ^{UAS} . osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
SODII ^{UAS} . <i>osi</i> ^{RNAi} :act- <i>akt</i> ^{UAS} . <i>osi</i> ^{RNAi} :act	0.9952061	
osi ^{RNAi} :in- akt ^{UAS} . osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
<i>pten</i> ^{RNAi} :in- <i>akt</i> ^{UAS} . <i>ost</i> ^{RNAi} :act	0.0000000	***
<i>pten</i> ^{RNAi} . osi ^{RNAi} :in- akt ^{UAS} . osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
akt ^{uas} :in- akt ^{uas} . osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
<i>akt^{uas} . osi^{RNai}:in- akt^{uas}. osi^{RNai}:act</i>	0.0000000	***
SODII ^{UAS} :in- akt ^{UAS} . osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
SODII ^{UAS} . osi ^{RNAi} :in- akt ^{UAS} . osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
SODII ^{UAS} . osi ^{RNAi} :act- SODII ^{UAS} :act	0.0000000	***
osi ^{RNAi} :in- SODII ^{UAS} :act	0.5648121	
<i>pten</i> ^{RNAi} :in- SODII ^{UAS} :act	0.6381300	
<i>pten</i> ^{RNAi} . <i>osi</i> ^{RNAi} :in- SODII ^{UAS} :act	0.8317781	
akt ^{UAS} :in- SODII ^{UAS} :act	0.8558331	
akt ^{uas} . osi ^{RNai} :in- SODII ^{UAS} :act	0.8558337	
SODII ^{UAS} :in- SODII ^{UAS} :act	0.8720905	
SODII ^{UAS} . osi ^{RNAi} :in- SODII ^{UAS} :act	0.6779830	
osi ^{RNAi} :in- SODII ^{UAS} . osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
<i>pten</i> ^{RNAi} :in- SODII ^{UAS} . <i>osi</i> ^{RNAi} :act	0.0000000	***
<i>pten</i> ^{RNAi} . <i>osi</i> ^{RNAi} :in- SODII ^{UAS} . <i>osi</i> ^{RNAi} :act	0.0000000	***
akt ^{uas} :in- SODII ^{UAS} . <i>osi^{RNAi}:act</i>	0.0000000	***
akt ^{UAS} . osi ^{RNAi} :in- SODII ^{UAS} .osiRNAi:act	0.0000000	***
SODII ^{UAS} :in- SODII ^{UAS} . osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
SODII ^{UAS} . osi ^{RNAi} :in- SODII ^{UAS} . osi ^{RNAi} :act	0.0000000	***
<i>pten</i> ^{RNAi} :in- <i>osi</i> ^{RNAi} :in	1.0000000	
<i>pten</i> ^{RNAi} . <i>osi</i> ^{RNAi} :in- <i>osi</i> ^{RNAi} :in	1.0000000	
akt ^{uas} :in- osi ^{RNAi} :in	1.0000000	
akt ^{uas} . osi ^{RNai} :in- osi ^{RNAi} :in	1.0000000	
SODII ^{UAS} :in- osi ^{RNAi} :in	1.0000000	
SODII ^{UAS} . osi ^{RNAi} :in- osi ^{RNAi} :in	1.0000000	
<i>pten</i> ^{RNAi} . <i>osi</i> ^{RNAi} :in-ptenRNAi :in	1.0000000	
<i>akt</i> ^{UAS} :in- <i>pten</i> ^{RNAi} :in	1.0000000	
akt ^{uas} . osi ^{RNAi} :in- pten ^{RNAi} :in	1.0000000	
	1	

SODII ^{UAS} :in- <i>pten</i> ^{RNAi} :in	1.0000000	
SODII ^{UAS} . <i>osi</i> ^{RNAi} :in- <i>pten</i> ^{RNAi} :in	1.0000000	
akt ^{uas} :in- pten ^{RNAi} . osi ^{RNAi} :in	1.0000000	
akt ^{uas} .osiRNAi:in- pten ^{RNAi} . osi ^{RNAi} :in	1.0000000	
SODII ^{UAS} :in- <i>pten</i> ^{RNAi} .osiRNAi:in	1.0000000	
SODII ^{UAS} . <i>osi</i> ^{RNAi} :in- <i>pten</i> ^{RNAi} . <i>osi</i> ^{RNAi} :in	1.0000000	
akt ^{uas} . osi ^{RNAi} :in- akt ^{uas} :in	1.0000000	
SODII ^{UAS} :in- <i>akt</i> ^{UAS} :in	1.0000000	
SODII ^{UAS} . <i>osi</i> ^{RNAi} :in- <i>akt</i> ^{UAS} :in	1.0000000	
SODII ^{UAS} :in- <i>akt^{UAS} . osi^{RNAi}:in</i>	1.0000000	
SODII ^{UAS} . <i>osi</i> ^{RNAi} :in- <i>akt</i> ^{UAS} .osiRNAi:in	1.0000000	
SODII ^{UAS} . <i>osi</i> ^{RNAi} :in- SODII ^{UAS} :in	1.0000000	

Figura 27- El tamaño celular reducido asociado a la disfunción de *osi* es rescatado mediante la expresión de la proteína humana Lyr5m

<u>A- Promedio de área normalizada para células de cuerpo graso en clones inactivos (in)</u> <u>o activos (act)</u>

Realizamos un ANOVA de dos vías F (4, 444) =39.50; p<0.05. Luego de lo cual se realizó un test de Tukey para múltiples comparaciones de medias. Los resultados se muestran en la siguiente tabla. El experimento fue realizado 3 veces en forma independiente.

	р	
	value	
LYRM5, ost ^{RNAi} :(act)-LYRM5:(act)	0.1578	
osi ^{ŝm} :(act)-LYRM5:(act)	0.9965	
osi SM , osi ^{RNAi} :(act)-LYRM5:(act)	0.0113	*
os/ ^{RNAi} :(act)-LYRM5:(act)	0.0000	***
LYRM5:(in)-LYRM5:(act)	0.9975	
LYRM5, <i>osi^{RNAi}:(in)-LYRM5:(act)</i>	0.9926	
osi SM :(in)-LYRM5:(act)	0.8822	
osi SM , osi ^{RNAi} :(in)-LYRM5:(act)	0.8543	

<i>osi^{RNAi}:(in)-LYRM5:(act)</i>	0.9514	
osi SM :(act)-LYRM5, osi ^{RNA} i:(act)	0.7397	
osi SM , osi ^{RNAi} :(act)-LYRM5, osi ^{RNAi} :(act)	0.9922	
osi ^{RNAi} :(act)-LYRM5, osi ^{RNAi} :(act)	0.0000	***
LYRM5:(in)-LYRM5, osi ^{RNAi} :(act)	0.8053	
LYRM5, osi ^{RNAi} :(in)-LYRM5, osi ^{RNAi} :(act)	0.5454	
osi SM :(in)-LYRM5, osi ^{RNAi} :(act)	0.9118	
osi sm , osi ^{RNAi} :(in)-LYRM5, osi ^{RNAi} :(act)	0.9929	
osiRNAi:(in)-LYRM5, osi ^{RNAi} :(act)	0.6782	
osi SM , osi ^{RNAi} :(act)-osi SM :(act)	0.1747	
osi ^{RNAi} :(act)-osi SM :(act)	0.0000	***
LYRM5:(in)- <i>osi</i> ^{≲M} :(act)	1.0000	
LYRM5, ost ^{RNAi} :(in)-ost SM :(act)	1.0000	
osi SM :(in)-osi SM :(act)	1.0000	
osi SM , osi ^{RNAi} :(in)-osi SM :(act)	0.9994	
osi ^{RNAi} :(in)-osi SM :(act)	1.0000	
osi ^{RNAi} :(act)- osi SM , osi ^{RNAi} :(act)	0.0000	***
LYRM5:(in)- <i>osism, osi^{RNAi}:</i> (act)	0.2420	
LYRM5, ost ^{RNAi} :(in)- ost SM , ost ^{RNAi} :(act)	0.0672	
osi sm :(in)- <i>osism osi</i> R <i>osism, osi^{RNAi}:</i> (act)	0.2980	
osi SM , osi ^{RNAi} :(in)- osi SM , osi ^{RNAi} :(act)	0.6734	
osi ^{RNAi} :(in)- osi SM , osi ^{RNAi} :(act)	0.1005	
LYRM5:(in)- <i>osi</i> ^{RNAi} :(act)	0.0000	***
LYRM5, ost ^{RNAi} :(in)- ost ^{RNAi} :(act)	0.0000	***
osi SM :(in)- osi ^{RNAi} :(act)	0.0000	***
osi SM , osi ^{RNAi} :(in)- osi ^{RNAi} :(act)	0.0000	***
osi ^{RNAi} :(in)- osi ^{RNAi} :(act)	0.0000	***
LYRM5, ost ^{RNAi} :(in)-LYRM5:(in)	1.0000	
osi ^{ŝM} :(in)-LYRM5:(in)	1.0000	
osi SM , osi ^{RNAi} :(in)-LYRM5:(in)	0.9997	
osi ^{RNAi} :(in)-LYRM5:(in)	1.0000	
osi sm :(in)-LYRM5, osi ^{RNAi} :(in)	0.9998	
osi sm , osi ^{RNAi} :(in)-LYRM5, osi ^{RNAi} :(in)	0.9980	

osi ^{RNAi} :(in)-LYRM5, <i>osi^{RNAi}:</i> (in)	1.0000	
osi sm , osi ^{RNAi} :(in)-osi sm :(in)	1.0000	
osi ^{RNAi} :(in)-osi SM :(in)	1.0000	
osi ^{RNAi} :(in)- osi SM , osi ^{RNAi} :(in)	0.9998	

Figura 28- La expresión de la proteína humana LYRm5 revierte la letalidad provocada por la baja de función de orsai en cuerpo graso

Porcentaje de sobrevida

Realizamos un test de t a pareado a dos colas y encontramos una diferencia significativa en el porcentaje de individuos que lograron llegar a adultos entre los controles $ppl>osl^{RNA}$; LYRm5^{UAS}; t (2) = 6.371, p<0.05.

Figuras suplementarias



Figura Suplementaria 1: Los niveles de RNA mensajero de la lipasa3 (lip3) están elevados en los individuos con bajos niveles de orsai. En el panel izquierdo las barras naranjas representan controles (+/+), las barras grises P[UAS]100B/+ (+/-) y las azules P[UAS]100B/P[UAS]100B (-/-). En el panel derecho la barra celeste plana corresponde al control expresando únicamente el driver de activaGal4, la barra celeste con patrón diagonal corresponde al control expresando dcr;osi^{RNAi} sin driver y la barra violeta corresponde al tratamiento actGal4>dcr;osi^{RNAi}. En todos los paneles los gráficos representan media \pm error estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas, p>0.05. Experimentos de qPCR realizados por Juan Ignacio Romero, Fundación Instituto Leloir.



<u>Figura Suplementaria 2</u>: Estudio del estado de la dinámica mitocondrial. Niveles de RNA mensajero medidos por qPCR de los factores clásicos de fusión (marf y opa1), fision (drdp1 y fis1) y dinámica mitocondrial (pink y parkin). El único factor cuyos valores difieren entre las larvas mutantes 100B/100B y los controles es marf, involucrada en el proceso de fusión mitocondrial. En todos los paneles las barras naranjas representan controles (+/+), las barras grises P[UAS]100B/+ (+/-) y las azules P[UAS]100B/ P[UAS]100B (-/-). En todos los paneles los gráficos representan media ± error estándar de la media. Letras distintas indican diferencias significativas, p>0.05. Estos experimentos fueron realizados por Juan Ignacio Romero, Fundación Instituto Leloir.



Figura Suplementaria 3: la disminución de orsai en la sección posterior de los segmentos corporales utilizando el driver engrailedGal4 provoca fenotipos típicos de respuesta a hipoxia.

Referencias

"Quienes aceptan al mundo,

es porque no se ocupan de él.

Quienes se ocupan del mundo,

no lo aceptan tal cual es"

Taoísmo

- Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 1993;118(2):401-415. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8223268. Accessed January 4, 2019.
- Laughon A, Gesteland RF. Primary structure of the Saccharomyces cerevisiae GAL4 gene. *Mol Cell Biol.* 1984;4(2):260-267. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6366516. Accessed January 4, 2019.
- Laughon A, Driscoll R, Wills N, Gesteland RF. Identification of two proteins encoded by the Saccharomyces cerevisiae GAL4 gene. *Mol Cell Biol.* 1984;4(2):268-275. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6366517. Accessed January 4, 2019.
- Oshima Y, Tohe A, Matsumoto K. [Regulatory circuits for gene expression: the metabolism of galactose and phosphate in Saccharomyces cerevisiae]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 1984;29(1):14-28. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6369399. Accessed January 4, 2019.
- Giniger E, Varnum SM, Ptashne M. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell.* 1985;40(4):767-774. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3886158. Accessed January 4, 2019.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature*. 1998;391(6669):806-811. doi:10.1038/35888
- Shin SC, Kim S-H, You H, et al. Drosophila Microbiome Modulates Host Developmental and Metabolic Homeostasis via Insulin Signaling. *Science (80-)*. 2011;334(6056):670-674. doi:10.1126/science.1212782
- Angilletta MJ, Steury TD, Sears MW. Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle. *Integr Comp Biol.* 2004;44(6):498-509. doi:10.1093/icb/44.6.498
- Suzuki Y, Koyama T, Hiruma K, Riddiford LM, Truman JW. A molt timer is involved in the metamorphic molt in Manduca sexta larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(31):12518-12525. doi:10.1073/pnas.1311405110
- 10. Bownes M, Abrahamssen N, Gilman C, Howden R, Martinez A, Slee R. Drosophila:
A Laboratory Handbook. By Michael Ashburner. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989. 1331 pages. Price \$180.00. ISBN 0 87969 321 5.Drosophila: A Laboratory Manual. By Michael Ashburner. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989. 434 pages. Price \$50.00. ISBN 0 97969 322 3. Price for the set: \$230.00. *Genet Res.* 1990;56(01):71. doi:10.1017/S0016672300028895

- Ong C, Yung L-YL, Cai Y, Bay B-H, Baeg G-H. Drosophila melanogaster as a model organism to study nanotoxicity. Nanotoxicology. 2015;9(3):396-403. doi:10.3109/17435390.2014.940405
- Pérez-Chiesa, I. and GRC. Morphology of mouth hooks during larval development of Drosophila dunni from Puerto Rico. *Dros Inf Serv.* 2002;85:28-29. http://www.ou.edu/journals/dis/DIS85/Research/PerezChiesa.htm. Accessed January 15, 2019.
- 13. Hyun S. Body size regulation by maturation steroid hormones: a Drosophila perspective. *Front Zool.* 2018;15:44. doi:10.1186/s12983-018-0290-9
- Andres AJ, Fletcher JC, Karim FD, Thummel CS. Molecular analysis of the initiation of insect metamorphosis: a comparative study of Drosophila ecdysteroid-regulated transcription. *Dev Biol.* 1993;160(2):388-404. doi:10.1006/dbio.1993.1315
- Petryk A, Warren JT, Marques G, et al. Shade is the Drosophila P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20hydroxyecdysone. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(24):13773-13778. doi:10.1073/pnas.2336088100
- Nijhout HF, Williams CM. Control of moulting and metamorphosis in the tobacco hornworm, Manduca sexta (L.): cessation of juvenile hormone secretion as a trigger for pupation. *J Exp Biol.* 1974;61(2):493-501. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4443741. Accessed January 4, 2019.
- Nijhout HF, Williams CM. Control of moulting and metamorphosis in the tobacco hornworm, Manduca sexta (L.): growth of the last-instar larva and the decision to pupate. *J Exp Biol.* 1974;61(2):481-491. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4443740. Accessed January 4, 2019.
- 18. Mirth CK, Riddiford LM. Size assessment and growth control: how adult size is

determined in insects. Bioessays. 2007;29(4):344-355. doi:10.1002/bies.20552

- Mirth CK, Shingleton AW. Integrating Body and Organ Size in Drosophila: Recent Advances and Outstanding Problems. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3. doi:10.3389/fendo.2012.00049
- Edgar BA. How flies get their size: genetics meets physiology. *Nat Rev Genet*. 2006;7(12):907-916. doi:10.1038/nrg1989
- Caldwell PE, Walkiewicz M, Stern M. Ras activity in the Drosophila prothoracic gland regulates body size and developmental rate via ecdysone release. *Curr Biol.* 2005;15(20):1785-1795. doi:10.1016/j.cub.2005.09.011
- Colombani J, Bianchini L, Layalle S, et al. Antagonistic Actions of Ecdysone and Insulins Determine Final Size in Drosophila. *Science (80-)*. 2005;310(5748):667-670. doi:10.1126/science.1119432
- Garelli A, Gontijo AM, Miguela V, Caparros E, Dominguez M. Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science*. 2012;336(6081):579-582. doi:10.1126/science.1216735
- Ou Q, Magico A, King-Jones K. Nuclear receptor DHR4 controls the timing of steroid hormone pulses during Drosophila development. Schneider DS, ed. *PLoS Biol.* 2011;9(9):e1001160. doi:10.1371/journal.pbio.1001160
- Walkiewicz MA, Stern M. Increased insulin/insulin growth factor signaling advances the onset of metamorphosis in Drosophila. Bergmann A, ed. *PLoS One*. 2009;4(4):e5072. doi:10.1371/journal.pone.0005072
- Colombani J, Raisin S, Pantalacci S, Radimerski T, Montagne J, Léopold P. A nutrient sensor mechanism controls Drosophila growth. *Cell*. 2003;114(6):739-749. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14505573. Accessed January 4, 2019.
- 27. Géminard C, Rulifson EJ, Léopold P. Remote control of insulin secretion by fat cells in Drosophila. *Cell Metab.* 2009;10(3):199-207. doi:10.1016/j.cmet.2009.08.002
- Marshall L, Rideout EJ, Grewal SS. Nutrient/TOR-dependent regulation of RNA polymerase III controls tissue and organismal growth in Drosophila. *EMBO J*. 2012;31(8):1916-1930. doi:10.1038/emboj.2012.33

- 29. Rideout EJ, Marshall L, Grewal SS. Drosophila RNA polymerase III repressor Maf1 controls body size and developmental timing by modulating tRNAiMet synthesis and systemic insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(4):1139-1144. doi:10.1073/pnas.1113311109
- Buhler K, Clements J, Winant M, Bolckmans L, Vulsteke V, Callaerts P. Growth control through regulation of insulin signalling by nutrition-activated steroid hormone in Drosophila. *Development*. 2018;145(21):dev.165654. doi:10.1242/dev.165654
- Danielsen ET, Moeller ME, Rewitz KF. Nutrient Signaling and Developmental Timing of Maturation. In: *Current Topics in Developmental Biology*. Vol 105.; 2013:37-67. doi:10.1016/B978-0-12-396968-2.00002-6
- White MF. Insulin signaling in health and disease. *Science*. 2003;302(5651):1710-1711. doi:10.1126/science.1092952
- Kohn AD, Kovacina KS, Roth RA. Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *EMBO J*. 1995;14(17):4288-4295. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7556070. Accessed January 10, 2019.
- 34. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt Pathway. doi:10.1101/cshperspect.a011189
- Guan H, Song L, Cai J, et al. Sphingosine Kinase 1 Regulates the Akt/FOXO3a/Bim Pathway and Contributes to Apoptosis Resistance in Glioma Cells. Castro MG, ed. *PLoS One*. 2011;6(5):e19946. doi:10.1371/journal.pone.0019946
- Rodrik-Outmezguine VS, Chandarlapaty S, Pagano NC, et al. mTOR Kinase Inhibition Causes Feedback-Dependent Biphasic Regulation of AKT Signaling. *Cancer Discov.* 2011;1(3):248-259. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0085
- Bhaskar PT, Hay N. The Two TORCs and Akt. *Dev Cell*. 2007;12(4):487-502.
 doi:10.1016/J.DEVCEL.2007.03.020
- 38. Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell*.2005;8(3):179-183. doi:10.1016/j.ccr.2005.08.008
- 39. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. Genes Dev.

2004;18(16):1926-1945. doi:10.1101/gad.1212704

- Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002;110(2):163-175. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150925. Accessed January 15, 2019.
- Bond P. Regulation of mTORC1 by growth factors, energy status, amino acids and mechanical stimuli at a glance. *J Int Soc Sports Nutr.* 2016;13(1):8.
 doi:10.1186/s12970-016-0118-y
- 42. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004;6(11):1122-1128. doi:10.1038/ncb1183
- Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*. 2002;10(3):457-468. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408816. Accessed January 11, 2019.
- Betz C, Stracka D, Prescianotto-Baschong C, Frieden M, Demaurex N, Hall MN. mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(31):12526-12534. doi:10.1073/pnas.1302455110
- 45. Hannan KM, Brandenburger Y, Jenkins A, et al. mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol.* 2003;23(23):8862-8877. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14612424. Accessed January 11, 2019.
- Düvel K, Yecies JL, Menon S, et al. Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of mTOR Complex 1. *Mol Cell*. 2010;39(2):171-183. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.022
- 47. Pause A, Belsham GJ, Gingras A-C, et al. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*. 1994;371(6500):762-767. doi:10.1038/371762a0

- Ohanna M, Sobering AK, Lapointe T, et al. Atrophy of S6K1 –/– skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol*. 2005;7(3):286-294. doi:10.1038/ncb1231
- Dowling RJO, Topisirovic I, Alain T, et al. mTORC1-Mediated Cell Proliferation, But Not Cell Growth, Controlled by the 4E-BPs. *Science (80-)*. 2010;328(5982):1172-1176. doi:10.1126/science.1187532
- Teleman AA, Chen Y-W, Cohen SM. 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes Dev.* 2005;19(16):1844-1848. doi:10.1101/gad.341505
- 51. Laplante M, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell*. 2012;149(2):274-293. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017
- Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(5):283-296. doi:10.1038/nrm3330
- 53. Zielke N, Edgar BA, DePamphilis ML. Endoreplication. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(1):a012948. doi:10.1101/cshperspect.a012948
- 54. Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ. Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes Dev*. 2009;23(21):2461-2477. doi:10.1101/gad.1829209
- Unhavaithaya Y, Orr-Weaver TL. Polyploidization of glia in neural development links tissue growth to blood-brain barrier integrity. *Genes Dev.* 2012;26(1):31-36. doi:10.1101/gad.177436.111
- Britton JS, Edgar BA. Environmental control of the cell cycle in Drosophila: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development*. 1998;125(11):2149-2158. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570778. Accessed January 4, 2019.
- 57. Visser W, van Spronsen EA, Nanninga N, Pronk JT, Gijs Kuenen J, van Dijken JP.
 Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in Saccharomyces cerevisiae. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1995;67(3):243-253.
 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7778893. Accessed January 4, 2019.

- Jakobs S, Martini N, Schauss AC, Egner A, Westermann B, Hell SW. Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 10):2005-2014. doi:10.1242/jcs.00423
- 59. Gorsich SW, Shaw JM. Importance of mitochondrial dynamics during meiosis and sporulation. *Mol Biol Cell*. 2004;15(10):4369-4381. doi:10.1091/mbc.e03-12-0875
- Kotiadis VN, Duchen MR, Osellame LD. Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(4):1254-1265. doi:10.1016/j.bbagen.2013.10.041
- 61. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2012;1817(10):1833-1838.
 doi:10.1016/j.bbabio.2012.02.033
- Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*. 2007;130(3):548-562. doi:10.1016/j.cell.2007.06.026
- Rambold AS, Kostelecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(25):10190-10195. doi:10.1073/pnas.1107402108
- 64. Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol.* 2011;13(5):589-598. doi:10.1038/ncb2220
- 65. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(12):872-884. doi:10.1038/nrm3013
- 66. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(11):870-879. doi:10.1038/nrm2275
- 67. Twig G, Hyde B, Shirihai OS. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: The bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2008;1777(9):1092-1097. doi:10.1016/j.bbabio.2008.05.001

- Twig G, Elorza A, Molina AJA, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 2008;27(2):433-446. doi:10.1038/sj.emboj.7601963
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552(2):335-344. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(1):1-13. doi:10.1042/BJ20081386
- 71. Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang X. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol.* 2013;6(1):19. doi:10.1186/1756-8722-6-19
- Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem*. 1973;248(10):3582-3592. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4702877. Accessed January 4, 2019.
- Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
- Rezával C, Berni J, Gorostiza EA, et al. A functional misexpression screen uncovers a role for enabled in progressive neurodegeneration. Hart AC, ed. *PLoS One*. 2008;3(10):e3332. doi:10.1371/journal.pone.0003332
- Verstreken P, Ohyama T, Haueter C, et al. Tweek, an Evolutionarily Conserved Protein, Is Required for Synaptic Vesicle Recycling. *Neuron*. 2009;63(2):203-215. doi:10.1016/j.neuron.2009.06.017
- Finn RD, Bateman A, Clements J, et al. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(D1):D222-D230. doi:10.1093/nar/gkt1223
- 77. Angerer H. Eukaryotic LYR Proteins Interact with Mitochondrial Protein Complexes. *Biology (Basel)*. 2015;4(1):133-150. doi:10.3390/biology4010133
- Qiu J, Gao C-L, Zhang M, et al. LYRM1, a novel gene promotes proliferation and inhibits apoptosis of preadipocytes. *Eur J Endocrinol.* 2009;160(2):177-184. doi:10.1530/EJE-08-0518

- Marelja Z, Leimkühler S, Missirlis F. Iron Sulfur and Molybdenum Cofactor Enzymes Regulate the Drosophila Life Cycle by Controlling Cell Metabolism. *Front Physiol.* 2018;9:50. doi:10.3389/fphys.2018.00050
- Beinert H, Holm RH, Münck E. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science*. 1997;277(5326):653-659. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9235882. Accessed January 4, 2019.
- Shi Y, Ghosh MC, Tong W-H, Rouault TA. Human ISD11 is essential for both ironsulfur cluster assembly and maintenance of normal cellular iron homeostasis. *Hum Mol Genet.* 2009;18(16):3014-3025. doi:10.1093/hmg/ddp239
- Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, et al. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*. 2008;134(1):112-123. doi:10.1016/j.cell.2008.06.016
- Kniazeva M, Euler T, Han M. A branched-chain fatty acid is involved in postembryonic growth control in parallel to the insulin receptor pathway and its biosynthesis is feedback-regulated in C. elegans. *Genes Dev.* 2008;22(15):2102-2110. doi:10.1101/gad.1692008
- Kniazeva M, Shen H, Euler T, Wang C, Han M. Regulation of maternal phospholipid composition and IP(3)-dependent embryonic membrane dynamics by a specific fatty acid metabolic event in C. elegans. *Genes Dev.* 2012;26(6):554-566. doi:10.1101/gad.187054.112
- Zensen R, Husmann H, Schneider R, Peine T, Weiss H. De novo synthesis and desaturation of fatty acids at the mitochondrial acyl-carrier protein, a subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase in Neurospora crassa. *FEBS Lett*. 1992;310(2):179-181. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1397269. Accessed January 4, 2019.
- Lin T, Yin X, Cai Q, et al. 13-Methyltetradecanoic acid induces mitochondrialmediated apoptosis in human bladder cancer cells. *Urol Oncol.* 2012;30(3):339-345. doi:10.1016/j.urolonc.2010.04.011
- Angerer H. The superfamily of mitochondrial Complex1_LYR motif-containing (LYRM) proteins. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(5):1335-1341.

doi:10.1042/BST20130116

- Zhu G-Z, Zhang M, Kou C-Z, et al. Effects of Lyrm1 knockdown on mitochondrial function in 3 T3-L1 murine adipocytes. *J Bioenerg Biomembr*. 2012;44(1):225-232. doi:10.1007/s10863-012-9404-9
- Haack TB, Madignier F, Herzer M, et al. Mutation screening of 75 candidate genes in 152 complex I deficiency cases identifies pathogenic variants in 16 genes including NDUFB9. *J Med Genet*. 2012;49(2):83-89. doi:10.1136/jmedgenet-2011-100577
- Lim SC, Friemel M, Marum JE, et al. Mutations in LYRM4, encoding iron-sulfur cluster biogenesis factor ISD11, cause deficiency of multiple respiratory chain complexes. *Hum Mol Genet*. 2013;22(22):4460-4473. doi:10.1093/hmg/ddt295
- Invernizzi F, Tigano M, Dallabona C, et al. A homozygous mutation in LYRM7/MZM1L associated with early onset encephalopathy, lactic acidosis, and severe reduction of mitochondrial complex III activity. *Hum Mutat*. 2013;34(12):1619-1622. doi:10.1002/humu.22441
- 92. Ghezzi D, Goffrini P, Uziel G, et al. SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nat Genet.* 2009;41(6):654-656. doi:10.1038/ng.378
- 93. Kaelin WG, McKnight SL. Influence of Metabolism on Epigenetics and Disease. *Cell*. 2013;153(1):56-69. doi:10.1016/j.cell.2013.03.004
- 94. Wellen KE, Thompson CB. A two-way street: reciprocal regulation of metabolism and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(4):270-276. doi:10.1038/nrm3305
- 95. Noia D, Neuberger JM, Keim MS, et al. Acetate Fuels the Cancer Engine. *Cell*. 2014;159:1492-1494. doi:10.1016/j.cell.2014.12.009
- 96. Moczulski D, Majak I, Mamczur D. An Overview of B-Oxidation Disorders Przegląd Zaburzeń b-Oksydacji Kwasów Tłuszczowych. http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=887784. Accessed January 10, 2019.
- 97. Dennis RA, McCammon MT. Acn9 is a novel protein of gluconeogenesis that is located in the mitochondrial intermembrane space. *Eur J Biochem*.

1999;261(1):236-243. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10103055. Accessed January 15, 2019.

- Liang W-C, Nishino I. Lipid Storage Myopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011;11(1):97-103. doi:10.1007/s11910-010-0154-y
- Pennisi EM, Garibaldi M, Antonini G. Lipid Myopathies. J Clin Med. 2018;7(12). doi:10.3390/jcm7120472
- 100. Butow RA, Avadhani NG. Mitochondrial Signaling: The Retrograde Response. *Mol Cell*. 2004;14(1):1-15. doi:10.1016/S1097-2765(04)00179-0
- 101. Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1576(1-2):1-14. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12031478. Accessed January 15, 2019.
- 102. Scarpulla RC. Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function. *Physiol Rev.* 2008;88(2):611-638. doi:10.1152/physrev.00025.2007
- 103. Evans MJ, Scarpulla RC. Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem.* 1989;264(24):14361-14368. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2547796. Accessed January 15, 2019.
- 104. Scarpulla RC. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene.* 2002;286(1):81-89. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943463. Accessed January 15, 2019.
- 105. Evans MJ, Scarpulla RC. NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev.* 1990;4(6):1023-1034. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2166701. Accessed January 15, 2019.
- 106. Zaid A, Li R, Luciakova K, Barath P, Nery S, Nelson BD. On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes. *J Bioenerg Biomembr*. 1999;31(2):129-135. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10449239. Accessed January 15, 2019.
- 107. Whelan SP, Zuckerbraun BS. Mitochondrial signaling: forwards, backwards, and in between. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:351613. doi:10.1155/2013/351613

- da Cunha FM, Torelli NQ, Kowaltowski AJ. Mitochondrial Retrograde Signaling: Triggers, Pathways, and Outcomes. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:1-10. doi:10.1155/2015/482582
- Jazwinski SM. The retrograde response: When mitochondrial quality control is not enough. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013;1833(2):400-409. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.02.010
- 110. Komeili A, Wedaman KP, O'Shea EK, Powers T. Mechanism of metabolic control. Target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. *J Cell Biol.* 2000;151(4):863-878. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076970. Accessed January 15, 2019.
- 111. Eisenberg-Bord M, Schuldiner M. Ground control to major TOM: mitochondrianucleus communication. *FEBS J*. 2017;284(2):196-210. doi:10.1111/febs.13778
- Martínez-Reyes I, Diebold LP, Kong H, et al. TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions. *Mol Cell*. 2016;61(2):199-209. doi:10.1016/j.molcel.2015.12.002
- 113. Friis RMN, Glaves JP, Huan T, Li L, Sykes BD, Schultz MC. Rewiring AMPK and Mitochondrial Retrograde Signaling for Metabolic Control of Aging and Histone Acetylation in Respiratory-Defective Cells. *Cell Rep.* 2014;7(2):565-574. doi:10.1016/j.celrep.2014.03.029
- 114. Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, et al. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*. 2000;287(5461):2204-2215.
 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10731134. Accessed January 4, 2019.
- 115. Adams MD, Celniker SE, Holt RA, et al. The genome sequence of Drosophila melanogaster. *Science*. 2000;287(5461):2185-2195. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10731132. Accessed January 4, 2019.
- Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster. *Genome Res.* 2001;11(6):1114-1125. doi:10.1101/gr.169101
- 117. Musselman LP, Kühnlein RP. Drosophila as a model to study obesity and metabolic

disease. J Exp Biol. 2018;221(Pt Suppl 1):jeb163881. doi:10.1242/jeb.163881

- Sen A, Cox RT. Fly Models of Human Diseases. In: *Current Topics in* Developmental Biology. Vol 121.; 2017:1-27. doi:10.1016/bs.ctdb.2016.07.001
- Engel JE, Wu CF. Altered mechanoreceptor response in Drosophila bang-sensitive mutants. J Comp Physiol A. 1994;175(3):267-278. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7932299. Accessed January 4, 2019.
- Fergestad T, Bostwick B, Ganetzky B. Metabolic disruption in Drosophila bangsensitive seizure mutants. *Genetics*. 2006;173(3):1357-1364. doi:10.1534/genetics.106.057463
- Tricoire H, Palandri A, Bourdais A, Camadro J-M, Monnier V. Methylene blue rescues heart defects in a Drosophila model of Friedreich's ataxia. *Hum Mol Genet*. 2014;23(4):968-979. doi:10.1093/hmg/ddt493
- 122. Foriel S, Willems P, Smeitink J, Schenck A, Beyrath J. Mitochondrial diseases: Drosophila melanogaster as a model to evaluate potential therapeutics. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;63:60-65. doi:10.1016/j.biocel.2015.01.024
- 123. Toivonen JM, O'Dell KM, Petit N, et al. Technical knockout, a Drosophila model of mitochondrial deafness. *Genetics*. 2001;159(1):241-254. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11560901. Accessed January 4, 2019.
- 124. Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol.* 2015;77(5):753-759. doi:10.1002/ana.24362
- Scarpelli M, Todeschini A, Volonghi I, Padovani A, Filosto M. Mitochondrial diseases: advances and issues. *Appl Clin Genet*. 2017;10:21-26. doi:10.2147/TACG.S94267
- 126. Llorens J V, Metzendorf C, Missirlis F, Lind MI. Mitochondrial iron supply is required for the developmental pulse of ecdysone biosynthesis that initiates metamorphosis in Drosophila melanogaster. *J Biol Inorg Chem.* 2015;20(8):1229-1238. doi:10.1007/s00775-015-1302-2
- 127. Huang X, Suyama K, Buchanan J, Zhu AJ, Scott MP. A Drosophila model of the

Niemann-Pick type C lysosome storage disease: dnpc1a is required for molting and sterol homeostasis. *Development*. 2005;132(22):5115-5124. doi:10.1242/dev.02079

- 128. Owusu-Ansah E, Banerjee U. Reactive oxygen species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*. 2009;461(7263):537-541. doi:10.1038/nature08313
- 129. Lim H-Y, Wang W, Chen J, Ocorr K, Bodmer R. ROS Regulate Cardiac Function via a Distinct Paracrine Mechanism. *Cell Rep.* 2014;7(1):35-44. doi:10.1016/j.celrep.2014.02.029
- Boggs CL. Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Funct Ecol.* 2009;23(1):27-37. doi:10.1111/j.1365-2435.2009.01527.x
- 131. Zera AJ, Harshman LG. The Physiology of Life History Trade-Offs in Animals. *Annu Rev Ecol Syst.* 2001;32(1):95-126. doi:10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114006
- 132. Zinke I, Kirchner C, Chao LC, Tetzlaff MT, Pankratz MJ. Suppression of food intake and growth by amino acids in Drosophila: the role of pumpless, a fat body expressed gene with homology to vertebrate glycine cleavage system. *Development*. 1999;126(23):5275-5284. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10556053. Accessed January 4, 2019.
- 133. Vijendravarma RK, Narasimha S, Chakrabarti S, et al. Gut physiology mediates a trade-off between adaptation to malnutrition and susceptibility to food-borne pathogens. Turlings T, ed. *Ecol Lett.* 2015;18(10):1078-1086. doi:10.1111/ele.12490
- Heckscher ES, Lockery SR, Doe CQ. Characterization of Drosophila larval crawling at the level of organism, segment, and somatic body wall musculature. *J Neurosci.* 2012;32(36):12460-12471. doi:10.1523/JNEUROSCI.0222-12.2012
- Wu Q, Zhang Y, Xu J, Shen P. Regulation of hunger-driven behaviors by neural ribosomal S6 kinase in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(37):13289-13294. doi:10.1073/pnas.0501914102
- 136. Yapici N, Cohn R, Schusterreiter C, Ruta V, Vosshall LB. A Taste Circuit that Regulates Ingestion by Integrating Food and Hunger Signals. *Cell*.

2016;165(3):715-729. doi:10.1016/j.cell.2016.02.061

- 137. Vigne P, Frelin C. Hypoxia modifies the feeding preferences of Drosophila.
 Consequences for diet dependent hypoxic survival. *BMC Physiol.* 2010;10(1):8. doi:10.1186/1472-6793-10-8
- Centanin L, Dekanty A, Romero N, Irisarri M, Gorr TA, Wappner P. Cell autonomy of HIF effects in Drosophila: tracheal cells sense hypoxia and induce terminal branch sprouting. *Dev Cell*. 2008;14(4):547-558. doi:10.1016/j.devcel.2008.01.020
- 139. Palandri A, L'hôte D, Cohen-Tannoudji J, Tricoire H, Monnier V. Frataxin inactivation leads to steroid deficiency in flies and human ovarian cells. *Hum Mol Genet.* 2015;24(9):2615-2626. doi:10.1093/hmg/ddv024
- 140. Atkinson A, Smith P, Fox JL, Cui T-Z, Khalimonchuk O, Winge DR. The LYR protein Mzm1 functions in the insertion of the Rieske Fe/S protein in yeast mitochondria. *Mol Cell Biol.* 2011;31(19):3988-3996. doi:10.1128/MCB.05673-11
- Maio N, Rouault TA. Mammalian Fe-S proteins: definition of a consensus motif recognized by the co-chaperone HSC20. *Metallomics*. 2016;8(10):1032-1046. doi:10.1039/c6mt00167j
- Maio N, Singh A, Uhrigshardt H, Saxena N, Tong W-H, Rouault TA. Cochaperone Binding to LYR Motifs Confers Specificity of Iron Sulfur Cluster Delivery. *Cell Metab.* 2014;19(3):445-457. doi:10.1016/j.cmet.2014.01.015
- Lane DJR, Merlot AM, Richardson DR. The Lure of a LYR: The Logistics of Iron Sulfur Cluster Delivery. *Cell Metab.* 2014;19(3):348-350. doi:10.1016/j.cmet.2014.02.011
- 144. Fu X, Liang C, Li F, et al. The Rules and Functions of Nucleocytoplasmic Shuttling Proteins. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5). doi:10.3390/ijms19051445
- 145. Sperber AM, Herman JK. Metabolism Shapes the Cell. Margolin W, ed. J Bacteriol. 2017;199(11). doi:10.1128/JB.00039-17
- 146. Jeffery CJ. An introduction to protein moonlighting: Table 1. *Biochem Soc Trans*. 2014;42(6):1679-1683. doi:10.1042/BST20140226

- 147. Henderson B, Martin ACR. Protein moonlighting: a new factor in biology and medicine. *Biochem Soc Trans*. 2014;42(6):1671-1678. doi:10.1042/BST20140273
- 148. Wakabayashi T. Structural changes of mitochondria related to apoptosis: swelling and megamitochondria formation. *Acta Biochim Pol.* 1999;46(2):223-237. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547024. Accessed January 4, 2019.
- 149. Zielke N, Kim KJ, Tran V, et al. Control of Drosophila endocycles by E2F and CRL4CDT2. *Nature*. 2011;480(7375):123-127. doi:10.1038/nature10579
- Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA. Erratum: Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol.* 2003;5(6):566-571. doi:10.1038/ncb996
- Stocker H, Radimerski T, Schindelholz B, et al. Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in Drosophila. *Nat Cell Biol.* 2003;5(6):559-566. doi:10.1038/ncb995
- 152. Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D. Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat Cell Biol.* 2003;5(6):578-581. doi:10.1038/ncb999
- Britton JS, Lockwood WK, Li L, Cohen SM, Edgar BA. Drosophila's insulin/PI3kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. *Dev Cell*. 2002;2(2):239-249. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832249. Accessed January 17, 2019.
- 154. Paquette M, El-Houjeiri L, Pause A. mTOR Pathways in Cancer and Autophagy. *Cancers (Basel)*. 2018;10(1):18. doi:10.3390/cancers10010018
- 155. Floyd BJ, Wilkerson EM, Veling MT, Kim J-JP, Coon JJ, Pagliarini DJ. Mitochondrial Protein Interaction Mapping Identifies Regulators of Respiratory Chain Function. *Mol Cell*. 2016;63:621-632. doi:10.1016/j.molcel.2016.06.033
- 156. Morita M, Gravel S-P, Chénard V, et al. mTORC1 Controls Mitochondrial Activity and Biogenesis through 4E-BP-Dependent Translational Regulation. *Cell Metab.* 2013;18(5):698-711. doi:10.1016/J.CMET.2013.10.001
- 157. Ruzicka FJ, Beinert H. A new iron-sulfur flavoprotein of the respiratory chain. A

component of the fatty acid beta oxidation pathway. *J Biol Chem*. 1977;252(23):8440-8445. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/925004. Accessed January 15, 2019.

- Beckmann JD, Frerman FE. Reaction of electron-transfer flavoprotein with electrontransfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase. *Biochemistry*. 1985;24(15):3922-3925. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2996585. Accessed January 15, 2019.
- 159. Tennessen JM, Baker KD, Lam G, Evans J, Thummel CS. The Drosophila Estrogen-Related Receptor Directs a Metabolic Switch that Supports Developmental Growth. *Cell Metab.* 2011;13(2):139-148. doi:10.1016/j.cmet.2011.01.005
- BORST P, LOOS JA, CHRIST EJ, SLATER EC. Uncoupling activity of long-chain fatty acids. *Biochim Biophys Acta*. 1962;62:509-518. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13871487. Accessed January 16, 2019.
- WOJTCZAK L, LEHNINGER AL. Formation and disappearance of an endogenous uncoupling factor during swelling and contraction of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1961;51:442-456. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14007889. Accessed January 16, 2019.
- 162. LARDY HA, PRESSMAN BC. Effect of surface active agents on the latent ATPase of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1956;21(3):458-466. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13363952. Accessed January 16, 2019.
- Nowinski SM, Solmonson A, Rundhaug JE, et al. Mitochondrial uncoupling links lipid catabolism to Akt inhibition and resistance to tumorigenesis. *Nat Commun.* 2015;6(1):8137. doi:10.1038/ncomms9137
- 164. Pistillo D, Manzi A, Tino A, Boyl PP, Graziani F, Malva C. The Drosophila melanogaster lipase homologs: a gene family with tissue and developmental specific expression 1 1Edited by M. Yaniv. *J Mol Biol.* 1998;276(5):877-885. doi:10.1006/jmbi.1997.1536
- Warner TG, Dambach LM, Shin JH, O'Brien JS. Purification of the lysosomal acid lipase from human liver and its role in lysosomal lipid hydrolysis. *J Biol Chem*. 1981;256(6):2952-2957. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7204383. Accessed

January 16, 2019.

- 166. Zinke I, Schütz CS, Katzenberger JD, Bauer M, Pankratz MJ. Nutrient control of gene expression in Drosophila: microarray analysis of starvation and sugardependent response. *EMBO J.* 2002;21(22):6162-6173. doi:10.1093/EMBOJ/CDF600
- 167. Tinnikov AA, Boonstra R. Colorimetric micro-determination of free fatty acids in plasma using microplate readers. *Clin Chim Acta*. 1999;281(1-2):159-162. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10217636. Accessed January 16, 2019.
- 168. Bülow MH, Wingen C, Senyilmaz D, et al. Unbalanced lipolysis results in lipotoxicity and mitochondrial damage in peroxisome-deficient Pex19 mutants. Fox TD, ed. *Mol Biol Cell*. 2018;29(4):396-407. doi:10.1091/mbc.E17-08-0535
- Beckmann JD, Frerman FE. Electron-transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase from pig liver: purification and molecular, redox, and catalytic properties. *Biochemistry*. 1985;24(15):3913-3921. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4052375. Accessed January 16, 2019.
- 170. Hu Y, Wilson GS. A temporary local energy pool coupled to neuronal activity: fluctuations of extracellular lactate levels in rat brain monitored with rapid-response enzyme-based sensor. *J Neurochem*. 1997;69(4):1484-1490. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326277. Accessed January 17, 2019.
- 171. Dienel GA. Brain Lactate Metabolism: The Discoveries and the Controversies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(7):1107-1138. doi:10.1038/jcbfm.2011.175
- 172. Chen CT, Trépanier M-O, Hopperton KE, Domenichiello AF, Masoodi M, Bazinet RP. Inhibiting Mitochondrial β -Oxidation Selectively Reduces Levels of Nonenzymatic Oxidative Polyunsaturated Fatty Acid Metabolites in the Brain. J Cereb Blood Flow Metab. 2014;34(3):376-379. doi:10.1038/jcbfm.2013.221
- Panov A, Orynbayeva Z, Vavilin V, Lyakhovich V. Fatty Acids in Energy Metabolism of the Central Nervous System. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1-22. doi:10.1155/2014/472459
- 174. Schulz JG, Laranjeira A, Van Huffel L, et al. Glial β-oxidation regulates Drosophila

energy metabolism. Sci Rep. 2015;5:7805. doi:10.1038/srep07805

- 175. Calvani R, Joseph A-M, Adhihetty PJ, et al. Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. *Biol Chem.* 2013;394(3):393-414. doi:10.1515/hsz-2012-0247
- Powers SK, Wiggs MP, Duarte JA, Zergeroglu AM, Demirel HA. Mitochondrial signaling contributes to disuse muscle atrophy. *Am J Physiol Metab*. 2012;303(1):E31-E39. doi:10.1152/ajpendo.00609.2011
- 177. Parvy J-P, Napal L, Rubin T, Poidevin M, Perrin L. Drosophila melanogaster Acetyl-CoA-Carboxylase Sustains a Fatty Acid-Dependent Remote Signal to Waterproof the Respiratory System. *PLoS Genet.* 2012;8(8):1002925. doi:10.1371/journal.pgen.1002925
- 178. Morillas M, Gómez-Puertas P, Roca R, et al. Structural model of the catalytic core of carnitine palmitoyltransferase I and carnitine octanoyltransferase (COT): mutation of CPT I histidine 473 and alanine 381 and COT alanine 238 impairs the catalytic activity. *J Biol Chem.* 2001;276(48):45001-45008. doi:10.1074/jbc.M106920200
- Wingrove JA, O'Farrell PH. Nitric oxide contributes to behavioral, cellular, and developmental responses to low oxygen in Drosophila. *Cell*. 1999;98(1):105-114. doi:10.1016/S0092-8674(00)80610-8
- Na U, Yu W, Cox J, et al. The LYR factors SDHAF1 and SDHAF3 mediate maturation of the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase. *Cell Metab*. 2014;20(2):253-266. doi:10.1016/j.cmet.2014.05.014
- 181. Valzania L, Ono H, Ignesti M, et al. Drosophila 4EHP is essential for the larvalpupal transition and required in the prothoracic gland for ecdysone biosynthesis. *Dev Biol.* 2016;410(1):14-23. doi:10.1016/J.YDBIO.2015.12.021
- Talamillo A, Sanchez J, Cantera R, et al. Smt3 is required for Drosophila melanogaster metamorphosis. *Development*. 2008;135(9):1659-1668. doi:10.1242/dev.020685
- 183. Ohhara Y, Kobayashi S, Yamanaka N. Nutrient-Dependent Endocycling in Steroidogenic Tissue Dictates Timing of Metamorphosis in Drosophila

melanogaster. Schoofs L, ed. *PLOS Genet*. 2017;13(1):e1006583. doi:10.1371/journal.pgen.1006583

- 184. Galloni M, Edgar BA. Cell-autonomous and non-autonomous growth-defective mutants of Drosophila melanogaster. *Development*. 1999;126(11):2365-2375. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10225996. Accessed January 15, 2019.
- 185. Zhang H, Stallock JP, Ng JC, Reinhard C, Neufeld TP. Regulation of cellular growth by the Drosophila target of rapamycin dTOR. *Genes Dev.* 2000;14(21):2712-2724. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11069888. Accessed January 15, 2019.
- 186. Brown JB, Boley N, Eisman R, et al. Diversity and dynamics of the Drosophila transcriptome. *Nature*. 2014;512(7515):393-399. doi:10.1038/nature12962
- Gándara L, Wappner P. Metabo-Devo: A metabolic perspective of development. Mech Dev. 2018;154:12-23. doi:10.1016/j.mod.2018.02.004
- Alves E, Henriques BJ, Rodrigues J V, et al. Mutations at the flavin binding site of ETF:QO yield a MADD-like severe phenotype in Drosophila. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(8):1284-1292. doi:10.1016/j.bbadis.2012.05.003
- Loewen CA, Ganetzky B. Mito-Nuclear Interactions Affecting Lifespan and Neurodegeneration in a *Drosophila* Model of Leigh Syndrome. *Genetics*. 2018;208(4):1535-1552. doi:10.1534/genetics.118.300818
- 190. Lake NJ, Compton AG, Rahman S, Thorburn DR. Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. *Ann Neurol.* 2016;79(2):190-203. doi:10.1002/ana.24551

Agradecimientos

"You are not two people. And you are not one person. You... are an experience! Make sure you're a good experience" *Garnet* Siempre me pareció que los agradecimientos estaban de más, que la gente que es parte sabe que es parte y a cada cual lo que le toca, aunque también es lindo agradecer. Así que ahí vamos. Indiscutiblemente, en primer lugar, está Fernanda. Con ella he crecido en todo sentido. Me abrió las puertas de su laboratorio cuando apenas era yo un pichón de cosa, y me guió y me apoyó para crecer siempre, aún en contra de mí misma. De ella me llevo la ciencia, la perseverancia, y esas ganas de superarse siempre un poco más. Por supuesto, el team 109/224 y asociades: la gente que transforma todas las frustaciones en risa, y que te asegura que todavía es temprano para tirar todo y empezar el parripollo del que, igual, se habla cada lunes. Siempre dispuestes a acercar un protocolo, a gritarte porque te tocaba guardar y no guardaste, y a llevarte a beber hasta olvidar. Anas, la mujer más fuerte del mundo, votada mejor compañera, dadora de amor. Sofi, compañera de lucha contra la burocracia implacable, tratando de hacer el mundo un lugar más sano, un mantra a la vez, dejando siempre sesiones abiertas en todas las computadoras, cuanto más aburrido hubiera sido todo sin ella; le agradezco especialmente toda su ayuda estadística. Lía, amiga, maestra y compañera, en todo el sentido de la palabra. Jose, el evening boy, vendiendo verduras comunitarias y poniéndose colorado hace del mundo un lugar mejor. De Juan... kedecirteh, si llegué hasta acá sin una crisis nerviosa se debe a él en gran parte, por compartir el proyecto y bancar hasta el final, se volvió un ser invaluable. A la nueva ola: la Gio, que continuará los pasos; Luli, la gue me llena de esperanza y Toto... el buen Toto.

La pandilla del flyroom Rochi, Lauta, Aye, Maxi, Dalmo, LaNanCho, Celes, Bren, Sebas; a Andrew Polenta, por todo. Al equipo del instituto, desde Mary hasta Diego, por hacer de la FIL algo más que un edificio.

A mis amiges, por convertirse en mi familia elegida, por haber llegado con vida (¡que no es poco!), por construirme una oportunidad de vivir plenamente, jamás podré agradecer suficiente. Mis chicas, mis pollas, mis pornxs, mis chochonas, mi grupo de la muerte, ustedes son lo mejor del amor.

A mis compañeres de militancia transfeminista, que me ayudan a ser más como quiero ser.

A Fede, que decidió acompañarme codo a codo el día que empezó todo esto, y hoy lo sigue eligiendo.

A mi sobrine del alma (Lolo? O el nombre que sea que te haya dejado tu madre) por hacerme sentir por primera vez cuánto se puede amar a alguien que aún no existe. A mi hermana, que sólo por ser me hace mejor persona.

A mi abuela y mi abuelo, que siempre serán mis fans nº1.

A mi psicóloga, por alinearme los chakras.

Y finalmente... una vez una sabia persona me dijo "si te pido que nombres a las 10 personas que más amas y no te nombrás, tenés un problema". Así que ahora me agradezco a mí. Porque de vez en cuando también está bueno dejar de torturarse y reconocer un poco todo el esfuerzo realizado. Vamos por más.