



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

NUEVOS MODELOS Y MECANISMOS
MOLECULARES EN LA ENFERMEDAD
DE CHARCOT-MARIE-TOOTH
CAUSADA POR MUTACIONES EN
GDAP1

Víctor López del Amo

TESIS DOCTORAL

2017

Programa de doctorado en Biomedicina y Biotecnología

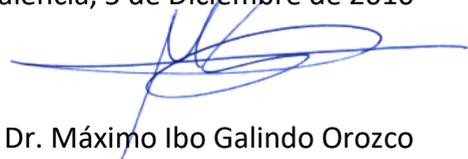
Director: Dr. Máximo Ibo Galindo Orozco

Máximo Ibo Galindo Orozco, Doctor en Ciencias Biológicas, Investigador Jefe del grupo de investigación Modelos de Enfermedades Raras en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (Unidad Mixta Mecanismos de Enfermedad y Nanomedicina, CIPF/UPV) y Profesor Contratado Doctor en la Universidad Politécnica de Valencia.

CERTIFICA:

Que D. Víctor López del Amo, licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección, la Tesis Doctoral titulada “Nuevos modelos y mecanismos moleculares en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth causada por mutaciones en *GDAP1*”

En Valencia, 5 de Diciembre de 2016



Dr. Máximo Ibo Galindo Orozco

Durante la realización de la Tesis Doctoral, el autor ha desarrollado su trabajo en el Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC) y en el Centro de Investigación Príncipe Felipe. La financiación proviene del Instituto de Salud Carlos III y el International Rare Diseases Research Consortium (IRDiRC) en el CIBER de Enfermedades Raras, y de la Asociación Francesa contra las Miopatías (AFM-Téléthon).

El trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos: “TREAT-CMT: Translational Research, Experimental Medicine and Therapeutics on Charcot-Marie-Tooth disease” (IR11/TREAT-CMT) y “Metabolic and functional characterization of clinically relevant Charcot-Marie-Tooth genotypes in a *Drosophila* model” (AFM-18540).

AGRADECIMIENTOS

Lo primero que me viene a la cabeza son las frases de mis padres, no han escrito canciones ni libros para la historia pero sí han creado una historia, mi historia. Sus valores son los míos, y me quedo con dos frases sencillas pero con mucho significado para mí.

“Lo primero son las personas” y “Si piensas en algo, es porque puedes cumplirlo”

Dar las gracias por inculcarme esos valores que son y serán la base de mi hacer. Porque la admiración es mutua, me han enseñado cómo valorarse a uno mismo, y a su vez, valorar a los que nos rodean y compartir alegrías con las personas de verdad. A ellos les debo todo, mi forma de ser es la educación que me han dado y lo que me permite avanzar cada día hacia mis propósitos.

La etapa de la tesis doctoral es una fase de aprendizaje científico, pero es más una etapa de maduración personal, y en eso han sido los más influyentes.

“Si un hombre ha perdido una pierna o un ojo, sabe que ha perdido una pierna o un ojo; pero si ha perdido el yo, si se ha perdido a sí mismo, no puede saberlo, porque no está allí ya para saberlo”

Oliver Sacks

Por supuesto, dar las gracias a Ibo, mi director de tesis, uno descubre que la ciencia es un trabajo difícil por muchos motivos y contigo ha sido más fácil. Me has enseñado como no perderse entre la divagación y que detrás de una respuesta siempre hay otra cuestión, cuanto más precisas y cortas sean ambas mejor. Tengo muchas anécdotas pero me quedo con el primer fenotipo que tenía delante de mis ojos y no fui capaz de ver hasta que te enseñé las imágenes, es por ello la razón de la cita al final de los agradecimientos hacia ti.

Gracias también por dejarme pensar, ser independiente y aportar mucho en este trabajo. Estoy muy orgulloso de ser el primer estudiante de doctorado de tu carrera como investigador Jefe. Pero sobretodo, gracias por tener siempre la puerta del despacho abierta para hablar sobre cualquier tema.

Como decía al principio, lo primero son las personas, todos sabemos que la tesis doctoral por sí misma te trae momentos de agobio y tensión. Pero en todo momento he notado la confianza y sinceridad de tu persona, las horas de leer *papers* y de experimentos son importantes, pero el trato cercano, pienso ha sido la clave de esta bonita experiencia. De verdad, muchas gracias Ibo.

*“La ausencia de evidencia no es
la evidencia de la ausencia”*

Konstantín Tsiolkovski

Hay muchas más personas que saben de su importancia para mí, pero hay dos de ellas que merecen mi pequeño homenaje.

Me siento un privilegiado por haber compartido mis años de tesis con Edu. Has sido la persona dentro del laboratorio que más me ha aportado a nivel científico, he podido ver mi pequeño crecimiento como investigador a través de todos los problemas que me han podido surgir, y siempre has estado disponible para pensarlos y solucionarlos conmigo.

Nunca olvidaremos esas horas donde los experimentos estaban parados pero nuestras cabezas seguían dando vueltas, solo dos sillas, uno enfrente del otro, y venga a generar hipótesis.

Pero fuera del territorio científico, donde quien te conoce sabe que eres brillante y no hace falta decir más, también he aprendido mucho, eres un ejemplo de transparencia personal. Gracias por ser como eres y por saber que siempre estás ahí 😊

Y también a la hermana que nunca tuve, Laura 😊

Ambos estamos de acuerdo que es un acierto vivir estos años de tesis bajo el mismo techo, ambos hemos compartido nuestros proyectos de tesis, aunque bien pensado, creo que lo que menos hemos hablado es de ciencia pura. Nos hemos escuchado en los momentos de bajón y guardamos nuestros mejores secretos, gracias que las paredes no hablan 😊

Nos quedan muchas horas de convivencia y muchos momentos de debate en el sofá. Pero lo mejor, nos queda toda una vida de gran amistad 😊

“Mientras se tenga al menos un amigo, nadie es inútil”

Robert Louis Stevenson

Gracias a la mitocondria por ser un orgánulo tan dinámico y permitirme horas y horas de pensar y aprender. Gracias a mi tesis he podido saber un poco más sobre su biología y también espero haber ayudado con mi contribución a la enfermedad. Sé muy bien que es un camino largo, pero me enorgullece pensar que esta tesis es un granito de arena más al entendimiento de la enfermedad. Aquí me acuerdo de algunos Congresos donde coincidimos con pacientes, y donde pude entender que los estudios moleculares tienen muchas personas con problemas detrás. Esto me ha llevado a involucrarme más y plantearme mejor mi trabajo.

Y sin duda, la fase que más he pensado en el terreno personal ha sido durante mi escritura. También he podido descubrir la música en mis oídos, música que me acompañará siempre. Estos años de tesis me han permitido desarrollarme como persona y descubrir muchas cosas de mí mismo. Gracias a todas las situaciones que han ido haciéndome un poquito mejor, y gracias a las personas que he conocido y espero seguir conociendo.

Nos pasamos la vida pensando en el futuro, sin pararnos a pensar en lo que está ocurriendo ahora mismo. Es por eso que ahora mismo solo puedo sentir felicidad por haber disfrutado de estos años formándome como investigador y persona.

*“Come out upon my seas
Cursed missed opportunities
Am I a part of the cure
Or am I part of the disease?
Singing”*

Coldplay (Clocks)

ÍNDICE

ABSTRACT/RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
1. NEUROPATÍA DE CHARCOT-MARIE-TOOTH.....	7
2. DINÁMICA MITOCONDRIAL Y CMT.....	13
3. DINÁMICA MITOCONDRIAL, NEURODEGENERACIÓN Y METABOLISMO	16
4. GDAP1: ASPECTOS CLÍNICOS Y GENÉTICOS	19
5. GDAP1: ASPECTOS MOLECULARES.....	21
OBJETIVOS	27
CAPÍTULO I: DEFECTOS MITOCONDRIALES Y DEGENERACIÓN NEUROMUSCULAR CAUSADOS POR LA ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE GDAP1 EN DROSOPHILA.....	31
1. INTRODUCCIÓN.....	33
2. RESULTADOS	35
2.1. <i>El gen CG4623 de Drosophila melanogaster es el gen ortólogo de los genes GDAP1 y GDAP1L1 humanos.....</i>	<i>35</i>
2.2. <i>Diseño experimental para la alteración de los niveles de Gdap1 en nuestro modelo.....</i>	<i>41</i>
2.3. <i>La alteración de los niveles de Gdap1 compromete la integridad neuronal de la retina de Drosophila melanogaster</i>	<i>43</i>
2.4. <i>Los niveles de Gdap1 son importantes para una correcta sinapsis neuronal.....</i>	<i>48</i>
2.5. <i>Los niveles alterados de Gdap1 causan pérdida muscular y cambios en la morfología mitocondrial</i>	<i>51</i>
2.6. <i>Los niveles de Gdap1 se relacionan con el estrés oxidativo a largo plazo.</i>	<i>54</i>
3. DISCUSIÓN.....	59

CAPÍTULO II: GDAP1, ENTRE EL METABOLISMO Y LA NEURODEGENERACIÓN	65
1. INTRODUCCIÓN	67
2. RESULTADOS	69
2.1. <i>Los niveles de Gdap1 influyen en la viabilidad y competencia neuromuscular relacionada con la edad.....</i>	<i>69</i>
2.2. <i>La alteración de los niveles de Gdap1 provocan cambios en el metaboloma</i>	<i>70</i>
2.3. <i>Los niveles de Gdap1 son importantes para la homeostasis de los aminoácidos y los hidratos de carbono</i>	<i>76</i>
2.4. <i>Los niveles de Gdap1 son importantes para un uso apropiado de los sustratos energéticos.....</i>	<i>80</i>
2.5. <i>Defectos en la ruta de insulina por la alteración en los niveles de Gdap1</i>	<i>83</i>
3. DISCUSIÓN.....	89
CAPÍTULO III: LA RUTA DE LA INSULINA, NUEVA RUTA MOLECULAR PARA EL ESTUDIO DE CMT CAUSADO POR MUTACIONES EN GDAP1	95
1. INTRODUCCIÓN	97
2. RESULTADOS	101
2.1. <i>Aproximación para el estudio de la ruta de la insulina en células SH-SY5Y mutantes para GDAP1</i>	<i>101</i>
2.2. <i>La localización de la proteína FOXO está alterada en las líneas OE y las líneas mutantes</i>	<i>103</i>
2.3. <i>Las mutaciones en GDAP1 alteran las proteínas relacionadas con la ruta de la insulina en condiciones basales.....</i>	<i>105</i>
2.4. <i>La proteína AKT no responde al tratamiento con insulina en las líneas mutantes de GDAP1</i>	<i>109</i>
2.5. <i>Las líneas mutantes de GDAP1 no son capaces de captar más glucosa tras el tratamiento con insulina.....</i>	<i>115</i>
3. DISCUSIÓN.....	117
CONCLUSIONES.....	121
MATERIAL Y MÉTODOS	127
1. CEPAS DE MOSCAS, MANTENIMIENTO Y GENERACIÓN DE TRANSGÉNICOS	129
2. VECTORES.....	133
3. CEPAS BACTERIANAS	134
4. LÍNEAS CELULARES INMORTALIZADAS DE MAMÍFEROS.....	134
5. MICROSCOPIA.	136
5.1. <i>Microscopía de campo claro, electrónica y de barrido</i>	<i>136</i>

5.2. <i>Microscopía confocal</i>	137
6. MÉTODOS MOLECULARES.....	138
6.1. <i>Extracción de ADN</i>	138
6.2. <i>Extracción de RNA</i>	139
6.3. <i>Amplificación de los ácidos nucleicos</i>	140
6.4. <i>Clonaciones y subclonaciones</i>	140
7. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	141
8. ESTRÉS OXIDATIVO.....	143
8.1. <i>Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)</i>	143
8.2. <i>Aislamiento mitocondrias y niveles de ATP</i>	144
8.3. <i>Ensayo glutatión</i>	145
9. WESTERN BLOTTING (WB)	146
9.1. <i>WB modificaciones post-traduccionales</i>	146
9.2. <i>WB y ruta de la insulina</i>	147
10. VIABILIDAD, COMPETENCIA NEUROMUSCULAR Y PESO	148
11. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).	149
11.1. <i>Extracción de metabolitos</i>	149
11.2. <i>Preparación de la muestra de extractos para la medición por RMN</i>	150
11.3. <i>Preparación de muestras de mosca entera para HR-MAS</i>	150
11.4. <i>Adquisición de los experimentos de RMN</i>	151
11.5. <i>Asignación de los metabolitos y cuantificación metabolitos</i>	152
11.6. <i>Análisis multivariante</i>	153
BIBLIOGRAFÍA	155
ANEXOS	179

ABSTRACT/RESUMEN

One of the genes involved in Charcot Marie Tooth disease, an inherited peripheral neuropathy, is *GDAP1*, which encodes a protein anchored to the mitochondrial outer membrane. The *Drosophila CG4623* gene is the true ortholog of human *GDAP1*, and we have renamed it *Gdap1*. By up- and down-regulation of *Gdap1* in a tissue-specific manner, we show changes in mitochondrial size, morphology and distribution; and neuronal and muscular degeneration. The study of different molecular aspects indicates that changes in oxidative stress happen only in the long term and are not a primary cause.

A metabolomic study using nuclear magnetic resonance (NMR), reveals that up- and down-regulation of *Gdap1* result in accumulation of carbohydrates and an increase in the β -oxidation of lipids. This metabolic shift is explained by a systemic attenuation of the insulin pathway, which is probably caused by abnormal mitochondria-ER contact as the result of too much or too little *Gdap1* activity.

We translate our *Drosophila* results to a neuronal mammalian cell culture and demonstrate that over-expression of *GDAP1* mutated forms cause an imbalance of insulin related proteins in basal conditions. Furthermore, we show that *GDAP1* mutations trigger a blockage of the insulin response based in the inability to take glucose from the media after insulin treatment.

Uno de los genes implicados en la enfermedad de Charcot Marie Tooth, una neuropatía periférica hereditaria, es *GDAP1*, que codifica para una proteína anclada a la membrana mitocondrial externa. El gen de *Drosophila CG4623* es el ortólogo de *GDAP1* humano, y lo hemos renombrado como *Gdap1*. La sobreexpresión y silenciamiento de *Gdap1*, de manera tejido específica, provoca una degeneración neuronal y muscular. Además, se observan alteraciones en el tamaño, morfología y distribución mitocondrial. El estudio de diferentes aspectos moleculares indica que los cambios en el estrés oxidativo sólo ocurren a largo plazo y no son una causa primaria.

El estudio metabólico a través de la resonancia magnética nuclear (RMN), revela que la sobreexpresión y silenciamiento de *Gdap1* desencadenan una acumulación de carbohidratos y un aumento en la β -oxidación lipídica. Este cambio metabólico se explica por una atenuación sistémica de la vía de la insulina, que es probablemente causada por el contacto anormal de las mitocondrias y el retículo endoplasmático.

Trasladamos nuestros resultados de *Drosophila* a cultivo neuronal de células de mamífero, y demostramos que la sobreexpresión de las formas mutadas de *GDAP1* causa un desequilibrio de las proteínas relacionadas con la ruta de la insulina en condiciones basales. Además, demostramos que las proteínas mutadas de *GDAP1* desencadenan un bloqueo de la respuesta a la insulina basada en la incapacidad de tomar la glucosa del medio después del tratamiento con insulina.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Neuropatía de Charcot-Marie-Tooth

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es una neuropatía periférica hereditaria con una gran variabilidad clínica y genética, que se agrupa dentro de las enfermedades hereditarias mendelianas. A pesar de ser una enfermedad importante dentro de las neuropatías periféricas hereditarias, está considerada como una enfermedad rara por su baja prevalencia (1 caso por cada 2500 nacimientos).

Las neuropatías hereditarias se clasifican en función de los tipos de nervios afectados (Dyck and Lambert, 1968): neuropatías motoras hereditarias (NMH), neuropatías sensitivas hereditarias (NSH), neuropatías sensitivas y autonómicas hereditarias (NSAH) y neuropatías sensitivo-motoras hereditarias (NSMH). Nosotros nos vamos a centrar en estas últimas, ya que es dentro de este subgrupo donde se ubica la enfermedad de CMT.

Las NSMH afectan a los nervios sensitivos y motores como su propio nombre indica, y dentro de esta clase se encuentran el síndrome de Dejerine-Sottas hereditario (DS), la neuropatía hipomielinizante congénita (NHC), la neuropatía con susceptibilidad a la parálisis por presión (NHPP) y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) (Lupski and García, 1992). De todas ellas, CMT es la más prevalente y también tiene su propia clasificación.

CMT afecta a 1 de 2500 personas, por lo tanto se considera una enfermedad rara. Fue descrita de forma independiente en 1886 por Charcot y Marie en Francia y por Tooth en Inglaterra como una neuropatía periférica hereditaria con un fenotipo de debilidad distal progresiva, atrofia muscular y pérdida sensorial. Unos años más tarde, Dejerine y Sottas describen una

forma más severa infantil de la neuropatía hereditaria. (Dejerine and Sottas, 1893). En las siguientes décadas, se observó la superposición en el aspecto clínico y la heterogeneidad en las formas de herencia, fue entonces cuando se planteó la necesidad de un mejor sistema de clasificación. A partir de 1950, el uso clínico de los estudios de conducción nerviosa combinada con la información patológica permitió dividir a los pacientes en 2 grupos principales: el grupo 1 se caracterizaba por velocidades de conducción nerviosa lenta y neuropatía desmielinizante hipertrófica. En cambio, el grupo 2 se caracterizaba por velocidades relativamente normales de conducción nerviosa y degeneración axonal. Además, la mayoría de las familias presentaron una herencia autosómica dominante (Thomas and Calne, 1974). Ya en 1981, Dyck amplió la clasificación de lo que hoy conocemos como NSMH para añadir formas con características adicionales (Dyck et al., 1981).

Actualmente, la electrofisiología y las biopsias de los pacientes han servido para establecer una clasificación más concisa. Según la velocidad de conducción nerviosa (VCN) los estudios muestran que hay dos formas clínicas de la CMT: CMT1, que se caracteriza por una VCN de (<38 m/s) y CMT2, que presenta una VCN normal (> 42 m/s) o ligeramente reducida y una disminución del potencial de acción muscular. Las biopsias de nervio sural de pacientes CMT1 muestran desmielinización y procesos de remielinización que conlleva a la formación de los llamados bulbos de cebolla (Dubourg et al., 2006) (Fig. I1B). Por el contrario, los pacientes CMT2 muestran una pérdida en el número de axones (Fig. I1C) y no hay evidencia de desmielinización (Barisic et al., 2008).

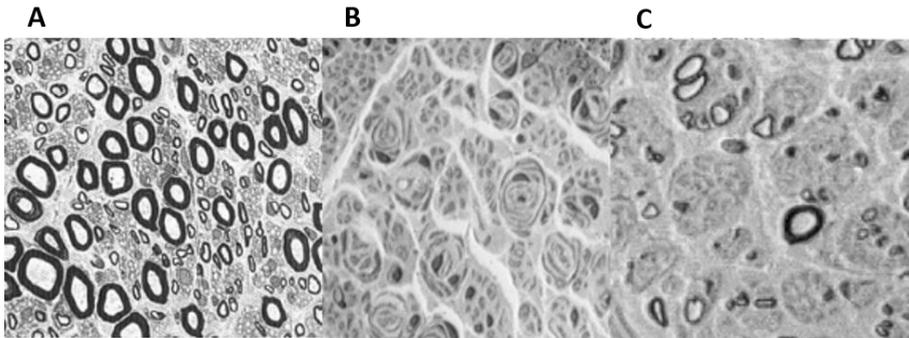


Fig. 11. Se muestran tres imágenes representativas procedentes del nervio sural. (A) Sección de un individuo sano con ocupación total de axones mielinizados. (B) Paciente CMT1, se observan los bulbos de cebolla. (C) Se observa la pérdida masiva de axones en un paciente de CMT axonal con mutación en GDAP1. Imágenes cedidas por el Dr. Rafael Sivera.

El fenotipo clásico CMT presenta una afectación predominantemente distal, con atrofia muscular en las extremidades (Fig. 12A) y pérdida sensorial progresiva. Los síntomas motores empiezan desde los pies, en lo que se denomina pies arqueados (Fig. 12B) y dedos de martillo, con atrofia muscular, que provocan dificultad para andar. Lo mismo ocurre en las extremidades superiores, los defectos empiezan por las manos (se desarrolla lo que llamamos manos en garra) y a continuación los antebrazos, provocando también una importante pérdida sensorial. Por lo que se refiere a la edad de aparición de la enfermedad, el debut suele ocurrir en los primeros 20 años de vida, y muestra un empeoramiento con la edad durante algunas décadas (Pareyson and Marchesi, 2009). Cabe destacar que la gravedad de los síntomas es muy variable, así como la edad de debut y la progresión de la enfermedad, haciendo de la enfermedad de CMT una enfermedad clínicamente muy compleja (Cornett et al., 2016). Por ello, se han establecido unos parámetros de medida característicos de la enfermedad, y la asignación de una puntuación para cada parámetro. Así, se

obtiene una valoración global del paciente atendiendo a todos los síntomas, y permite la clasificación por grado de severidad (Burns et al., 2012; Murphy et al., 2011; Piscoquito et al., 2015; Sadjadi et al., 2014).



Fig. 12. Imágenes de un paciente con CMT1A. (A) Se observa una fuerte pérdida de la masa muscular a lo largo de las extremidades inferiores, sobre todo en los gemelos. (B) Deformación del pie con un arco muy acusado y dedos de martillo. Imágenes cedidas por el Dr. Rafael Sivera.

Además de la complejidad clínica, también podemos encontrar una gran variabilidad genética, por la multitud de genes distintos provocando la misma enfermedad, y por el patrón de herencia tan diverso. Hasta la fecha se han descrito más de 60 genes implicados en la enfermedad de CMT (Neuromuscular Disease Center; <http://neuromuscular.wustl.edu/>). Por lo que se refiere al patrón de herencia puede ser autosómico dominante (Manganelli et al., 2012), autosómico recesivo (Birouk et al., 2003) y ligado al X (Kennerson et al., 2013). Además, se han publicado mutaciones en el gen mitocondrial *MT-ATP6A* (Pitceathly et al., 2012).

También, hay una gran variabilidad por la localización organular de las distintas proteínas mutadas, pero todas ellas están involucradas en el sostén y biología de los nervios periféricos (Fig. I3) (Rossor et al., 2013), desde la relación mielina-axón, transporte axonal, problemas con el citoesqueleto y también íntimamente relacionado con la función mitocondrial (Azzedine et al., 2012; Harel and Lupski, 2014; Rossor et al., 2013).

Por todo lo comentado, la clasificación actual se centra en la electrofisiología, genes implicados y patrón de herencia. Toda esta dificultad actual, se ve aumentada por los continuos avances tecnológicos que amplían los subtipos de la enfermedad. Este dilema requiere una aproximación mucho más colaborativa e interdisciplinar que se traduzca en registros que centralicen la información de una manera estandarizada y también teniendo en cuenta la progresión de la enfermedad (McCorquodale et al., 2016). Asimismo, dos genes distintos pueden dar una misma sintomatología clínica y por lo tanto un mismo tipo de CMT, por ejemplo, mutaciones en *MFN2* y *DNM2* causan CMT2 (Lin et al., 2011).

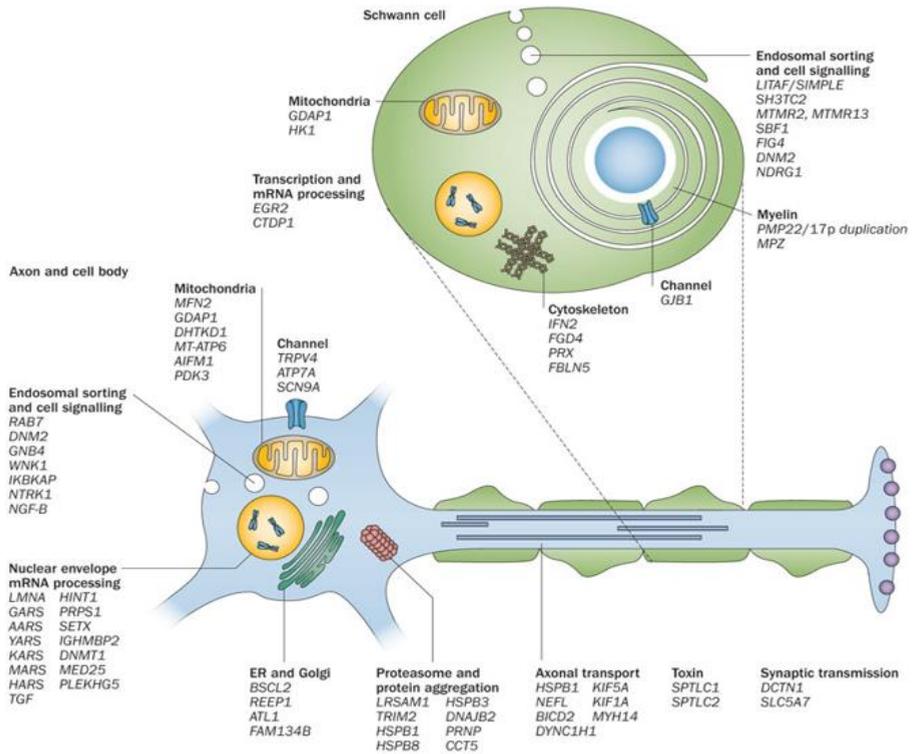


Fig. 13. Genes conocidos y relacionados con CMT. Se muestran las distintas proteínas relacionadas con CMT, indicando su localización y relación con los distintos procesos celulares (Rossor et al., 2013)

Y también tenemos el caso contrario, mutaciones en un mismo gen, que pueden causar distintos tipos de CMT en cuanto a clínica y herencia. Es el caso de *GDAP1*, mutaciones en nuestro gen de estudio causan distintos tipos de CMT, como son CMT axonal autosómica dominante y recesiva (CMT2K y AR-CMT2K respectivamente) (Nadia-Nelis et al., 2003; Zimón et al., 2011), CMT intermedia recesiva (RI-CMTA) (Senderek et al., 2003) y CMT desmielinizante autosómica recesiva (CMT4A) (Baxter et al., 2001).

2. Dinámica mitocondrial y CMT

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que sufren procesos de fisión y fusión, un mecanismo que está estrechamente regulado, extremadamente importante para la función mitocondrial, y cuya alteración puede ser una causa de enfermedad (Itoh et al., 2013). La maquinaria básica de la dinámica mitocondrial se conserva en gran parte de los eucariotas (Zhao et al., 2013). El proceso de fusión está controlado por tres GTPasas, Mitofusina 1 y 2 (MFN1, MFN2), que se encuentra en la membrana externa, y OPA1 en la membrana interna (Fig. I4). La fisión se controla por DRP1 y FIS1, a través de la formación de un anillo contráctil que constriñe y divide la mitocondria (Fig. I4).

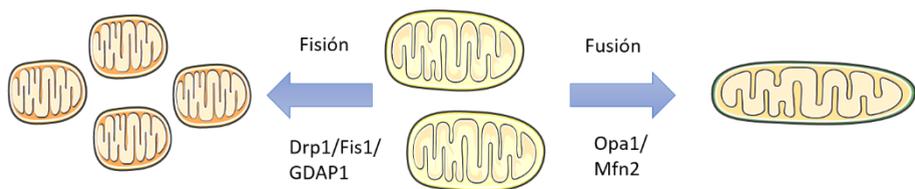


Fig. I4. Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que se someten a procesos de fragmentación (fisión) y acreción (fusión) mitocondrial. Las proteínas que median el proceso de fisión son Drp1 y Fis1, mientras que la fusión mitocondrial es regulada por Opa1 y Mfn2.

Todas estas proteínas están presentes en todos los eucariotas, poniendo de relieve la importancia del control de la morfología mitocondrial en el buen funcionamiento de este orgánulo. La dinámica mitocondrial determina la morfología y la estructura de la red mitocondrial, pero su papel es mucho más que el mero control del tamaño y forma de la mitocondrias. Un equilibrio apropiado entre la fusión y la fisión es fundamental en la

biogénesis de la mitocondrias, lo que permite la incorporación de material recién formado en la red (Sanchis-Gomar et al., 2014). También se requiere en el control de calidad, lo que permite el aislamiento y la destrucción de mitocondrias dañadas por autofagia (Gomes and Scorrano, 2013). Por último, las mitocondrias tienen que alcanzar una localización sub-celular precisa para llevar a cabo su función, por ejemplo, en el transporte axonal para proporcionar energía en la sinapsis (Verstreken et al., 2005), o en las proximidades del retículo endoplásmico (RE) para participar en la homeostasis de calcio (Pla-Martin et al., 2013) y diferentes aspectos del metabolismo (Theurey and Rieusset, 2016).

Dos de los genes CMT están relacionados con la dinámica mitocondrial, *MFN2* y nuestro gen de estudio, *GDAP1*. El primero de ellos, está muy conservado en todas las especies (Zuchner et al., 2004) y regula directamente el proceso de fusión mitocondrial (Santel and Fuller, 2001). Además, participa en otros procesos importantes como el estrés de retículo (Muñoz et al., 2013); metabolismo (Sebastian et al., 2012) y mitofagia (Sebastian et al., 2016).

Por lo que se refiere a *GDAP1*, no está tan conservado a lo largo de la evolución, siendo imposible encontrar un homólogo en *Caenorhabditis elegans* o *Saccharomyces cerevisiae* (Marco et al., 2004). A pesar de ello, lo aceptado por toda la comunidad científica, aunque no se conoce el mecanismo exacto, es que la sobreexpresión de *GDAP1* conlleva una red mitocondrial más fragmentada (Niemann et al., 2005; Pla-Martin et al., 2013), mientras que la falta de *GDAP1* provoca una elongación mitocondrial (Barneo-Munoz et al., 2015; Niemann et al., 2014; Niemann et al., 2005). *GDAP1* también se ha relacionado con distintos procesos que implican a la mitocondria, demostrándose su importancia en el manejo del calcio (Pla-

Martin et al., 2013), hipoxia (Dong et al., 2014) y estrés oxidativo (Noack et al., 2012), aspectos que profundizaremos más a continuación.

Es cierto que MFN2 y GDAP1 presentan sus particularidades respecto a la morfología mitocondrial, pero podemos encontrar numerosos ejemplos en la literatura que nos indican que ambas proteínas también comparten ciertos aspectos, poniendo de manifiesto que un desbalance en la dinámica mitocondrial en un sentido u otro conllevaría a defectos similares. Tanto MFN2 como GDAP1 presentan estructuras características de proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial, ambas presentan tramos hidrofóbicos en el extremo C-terminal y se localizan en la membrana mitocondrial externa (Konstanze et al., 2009). La correcta asociación entre la mitocondria y el RE es decisiva para distintos procesos celulares (Marchi et al., 2014). La ausencia de ambas proteínas, MFN2 y GDAP1, provoca una disminución en los contactos entre los orgánulos mencionados (Naon et al., 2016; Pla-Martin et al., 2013).

A nivel clínico, las mutaciones dominantes de *MFN2* y *GDAP1*, presentan un fenotipo CMT con una penetrancia muy variable de leve a moderado (Casasnovas et al., 2010; Kabzinska et al., 2010; Sivera et al., 2010). En cambio, se han descrito casos de pacientes donde las mutaciones de *MFN2* y *GDAP1* conviven en heterocigosis, y esto resulta en un fenotipo CMT mucho más severo por lo que se refiere a edad de debut y agresividad de los síntomas (Kostera-Pruszczyk et al., 2014; Vital et al., 2012).

Por todo ello, la homeostasis en la dinámica mitocondrial es trascendental para el correcto funcionamiento del organismo, y en este caso, *MFN2* y *GDAP1* participan en dicho proceso, con sus particularidades y similitudes, y mutaciones en ambos genes provocan la enfermedad de CMT.

3. Dinámica mitocondrial, neurodegeneración y metabolismo

Como hemos explicado anteriormente, la morfología mitocondrial es controlada a través de una serie de proteínas especializadas en dicha función. Pero no solo eso, las mitocondrias son sensores excepcionales y responden a los distintos procesos fisiológicos celulares, siendo indispensable la relación bidireccional y adecuada entre la dinámica mitocondrial y el metabolismo celular (Mishra and Chan, 2016).

Por este motivo, la homeostasis del metabolismo celular es muy importante, y una desregulación puede ser causa de algunas enfermedades neurodegenerativas (Procaccini et al., 2016). Diferentes trabajos trazan un nuevo puente que conecta los defectos metabólicos con el riesgo a padecer alguna enfermedad neurodegenerativa. De esta manera, se ha establecido que el sobrepeso aumenta el riesgo a padecer la enfermedad de Alzheimer (Hassing et al., 2009). Existe también una correlación significativa entre los niveles de grasas y la posibilidad de sufrir la enfermedad de Parkinson (Abbott et al., 2002). Por último, se demostró que el índice de masa corporal antes de los 20 años está relacionado con el riesgo a padecer Esclerosis Múltiple (Hedstrom et al., 2012). Incluso, en algunos casos, se habla de una patología neurometabólica relacionando el metabolismo de lípidos y la glucosa con la enfermedad de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Ngo and Steyn, 2015).

Como hemos dicho, la mitocondria tiene una estrecha relación con el metabolismo. Se ha demostrado la cadena de eventos existente entre fisión mitocondrial, desregulación del ciclo de Krebs y la enfermedad de Alzheimer (Salminen et al., 2015). Además, la cadena respiratoria,

concretamente el complejo I, está afectado en enfermos de Parkinson (Keeney et al., 2006). Asimismo, encontramos lazos estrechos entre proteínas dinámicas mitocondriales y el metabolismo. Se ha demostrado que la insulina regula el metabolismo mitocondrial a través de la sobreexpresión de Opa1, que a su vez activa la vía AKT-mTOR-NFkB (Parra et al., 2014). La fosforilación de DRP1 es dependiente de GSK3 β , desencadenando cambios en la morfología mitocondrial y ejerciendo efectos neuroprotectores (Yan et al., 2015). Además, DRP1 y FIS1 son importantes para la homeostasis de la glucosa en células beta pancreáticas (Reinhardt et al., 2016; Schultz et al., 2016).

También tenemos ejemplos de MFN2 y GDAP1 en conexión con el metabolismo. MFN2, se ha relacionado con el control de la energía mitocondrial a través de la expresión de los complejos de la cadena de transporte electrónico (Pich et al., 2005). La falta de MFN2 induce resistencia a la leptina y un desajuste energético en neuronas del hipotálamo (Schneeberger et al., 2013). Y al igual que DRP1 y FIS1, MFN2 es crucial para una correcta señalización de la ruta de la insulina y el control de la glucosa (Sebastian et al., 2012).

Se sabe mucho menos de la relación entre GDAP1 y metabolismo, pero en un modelo knock out (KO) para dicho gen, se observó una desregulación en la expresión del perfil proteico relacionado con procesos como la β -oxidación y la glucólisis (Barneo-Munoz et al., 2015). Por otra parte, un estudio proteómico en células β -pancreáticas, que han sido tratadas con vitamina-D, revela la sobreexpresión de GDAP1 tras dicho tratamiento (Pepaj et al., 2015). Esto incita a pensar en una posible relación entre la secreción de insulina, que mejora tras el tratamiento con vitamina

D, y los niveles de GDAP1. La relación entre GDAP1 y metabolismo es novedosa e inexplorada, y abordaremos dicho aspecto en este trabajo.

En resumen, la mitocondria es clave porque modifica su arquitectura en función de las necesidades energéticas del organismo (Liesa and Shirihai, 2013), por ello, será de vital importancia relacionar los cambios morfológicos inherentes a dicho orgánulo con otros ocasionados por el entorno fisiológico.

4. GDAP1: Aspectos clínicos y genéticos

Como hemos dicho anteriormente, las mutaciones en *GDAP1* pueden causar 4 tipos de CMT distintos. Por lo que se refiere a las formas axonales, podemos encontrar mutaciones en *GDAP1* con herencia dominante y recesiva (CMT2K y AR-CMT2K), siendo las recesivas más agresivas, ya que un gran número de pacientes necesitan la silla de ruedas a los 30 años (Cassereau et al., 2011). Todos ellos presentan pérdida sensitivo-motora, con pies deformados y con incapacidad de utilizar las manos para tareas diarias (Azzedine et al., 2003; Nazha Birouk, 2003). En cambio, las formas axonales dominantes de *GDAP1*, muestran un fenotipo muy variable y más moderado (Auranen et al., 2013; Manganelli et al., 2012).

Las formas desmielinizantes de *GDAP1* (CMT4A) solo las encontramos en su modo de herencia recesiva (Baxter et al., 2001), se trata de una neuropatía severa con una VCN entre 25 y 35 m/s. Los síntomas empiezan en los primeros 5 años de vida y progresa rápido hacia una pérdida muscular que impide la marcha normal (Dubourg et al., 2006).

Por último, también encontramos pacientes con CMT intermedio, herencia recesiva (IR-CMTA). Dicha forma de CMT es de nuevo agresiva, como todas las recesivas de *GDAP1*, los síntomas empiezan en los primeros años de vida y no pueden caminar sin asistencia. Además, presentan una VCN entre 25 y 45 m/s y la histopatología muestra defectos axonales y de mielinización (Chung et al., 2011).

A principios de este mismo siglo, fue la primera vez que se relacionaron mutaciones en *GDAP1* con la enfermedad de CMT (Baxter et al., 2001; Cuesta et al., 2001), con estos trabajos ya se podía presagiar la

heterogeneidad comentada anteriormente, ambos trabajos mostraban mutaciones en *GDAP1*, ambos autosómicos recesivos, pero en un caso con CMT axonal y en el otro CMT desmielinizante. Poco después se describieron casos de herencia autosómica recesiva pero en este caso CMT intermedio (Senderek et al., 2003). También se han descrito formas autosómica dominante axonales (Zimón et al., 2011), normalmente se trata de un tipo de CMT menos agresivo y más cambiante, ya que existe una penetrancia incompleta y expresión variable. En este apartado los modificadores genéticos juegan un papel muy importante, ya que pueden modular el fenotipo. Es el caso del gen *juntofilina (Jp)*, un polimorfismo en dicho gen en combinación con una mutación dominante de *GDAP1*, causan un fenotipo más agresivo que el de sus progenitores (Pla-Martin et al., 2015). Además, las mutaciones en *GDAP1* como causa de la enfermedad de CMT, presentan un alto índice de prevalencia en población española. Un estudio de distribución genética y correlación fenotípica con 439 pacientes de la región mediterránea, desveló que las mutaciones en *GDAP1* suponían un 11.1% (Sivera et al., 2013), siendo el tercer gen más prevalente de la serie clínica, esto demuestra la importancia de *GDAP1* en la enfermedad de CMT en España y más concretamente en el área mediterránea.

5. GDAP1: Aspectos moleculares

GDAP1 fue identificado como uno de 10 cDNAs distintos cuya expresión aumentaba significativamente tras la diferenciación colinérgica en células de neuroblastoma de ratón (Neuro2a). Estos genes fueron nombrados *GDAP* del 1 al 10 (*GDAP1-10*), de ahí *GDAP1* o *ganglioside-induced differentiation-associated protein 1* (Liu et al., 1999).

GDAP1 se expresa en neuronas y células de Schwann, y se localiza en la mitocondria con un papel importante en la morfología mitocondrial (Niemann et al., 2005; Pedrola et al., 2005). Aportaciones más precisas sobre la localización, mostraron la expresión de *GDAP1* en neuronas motoras y sensitivas de la médula espinal, neuronas de Purkinje, neuronas piramidales del hipocampo, neuronas mitrales del bulbo olfatorio y neuronas corticales piramidales (Pedrola et al., 2008). Además de su localización mitocondrial, se ha visto su presencia en otro orgánulo con importantes funciones metabólicas como son los peroxisomas (Huber et al., 2013).

GDAP1 es una proteína de 358 aminoácidos y 41 kDa con dos dominios hidrofóbicos en posición C-terminal, uno es esencial para la fisión mitocondrial, y el otro dominio transmembrana, también C-terminal, dirige su localización a la membrana mitocondrial externa (Konstanze et al., 2009). Por otra parte, *GDAP1* posee dos dominios clásicos de proteínas glutatión transferasas (GST), un dominio tiorredoxina en N-terminal y otro de unión a sustratos en C-terminal. Además, presenta un dominio intermedio de α -hélices entre los dos dominios clásicos de las proteínas GST comentados (Marco et al., 2004).

Hasta la fecha, las mutaciones encontradas en pacientes se extienden a lo largo de todos los dominios de la proteína, y el modo de herencia no parece correlacionar con un patrón de localización específico (Fig. I5), aunque algún trabajo habla de diversas mutaciones en los dominios clásicos de proteínas GST, con un patrón de herencia dominante (Crimella et al., 2010).

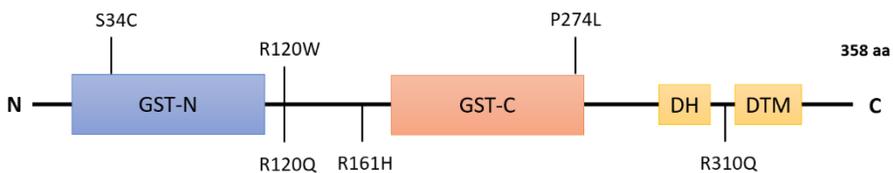


Fig. I5. Esquema de los dominios más importantes de la proteína GDAP1 con un tamaño de 358 aminoácidos (aa). Los dominios más representativos son los dos dominios GST; un dominio hidrofóbico (DH) y un dominio transmembrana (DTM). En la parte de arriba, se indican las mutaciones dominantes más características, y en la parte de abajo, las mutaciones recesivas más estudiadas.

Los estudios filogenéticos han sido de gran relevancia, se descubrió que *GDAP1* tiene un parálogo en humanos denominado *GDAP1L1*, y se consiguió enclavar a *GDAP1* dentro de una nueva clase de proteínas denominadas *GST-like*, ya que posee cierta similitud con las proteínas GST pero con algunos dominios diferenciales (Marco et al., 2004). Igualmente, sirvió para predecir su posible ortólogo en insectos, plantas y eubacterias (Marco et al., 2004), dejando una ventana abierta para generar nuevos modelos en distintos organismos.

El hecho que *GDAP1* presente una estructura similar a las proteínas GST resulta muy llamativo, por ello, algunos trabajos han dirigido sus esfuerzos hacia un intento de conocer si dichos dominios tienen actividad GST. Para ello, en todos los casos han utilizado una proteína truncada sin el

dominio C-terminal debido a problemas de solubilidad. Los estudios se realizaron en bacterias, y en ningún caso encontraron que GDAP1 tuviese capacidad de unir GSH ni ninguna actividad dependiente de glutatión (Pedrola et al., 2005; Shield et al., 2006). Otros investigadores observaron una regulación al alza de GDAP1 en células con altos niveles de glutatión reducido (GSH), estableciendo así una posible relación entre GDAP1 y estrés oxidativo (Noack et al., 2012). Y recientemente, se ha demostrado que GDAP1 posee actividad GST, pero en este caso han utilizado un sistema de expresión en insectos (Huber et al., 2016). También demuestran como GDAP1 es capaz de dimerizar y la importancia del dominio hidrofóbico en C-terminal para el remodelado de membranas liposomales (Huber et al., 2016).

Por otra parte, se ha observado GDAP1 sobreexpresado en cerdos que están adaptados a entornos con una gran altitud (Dong et al., 2014), con bajas presiones y altas demandas de oxígeno. Además, un modelo KO para GDAP1 ha demostrado que GDAP1L1 (solo se expresa en sistema nervioso central (SNC)) presenta una localización citosólica, y es solo ante altos niveles de glutatión oxidado (GSSG), cuando se trasloca a la mitocondria (Niemann et al., 2014). Esto lo haría para suplir la falta de GDAP1 en el SNC, y explicaría la carencia de fenotipo en los tejidos neuronales procedentes del SNC.

Todos estos resultados invitan a pensar en una posible relación entre GDAP1 y/o GDAP1L1 y la homeostasis fisiológica del organismo, aunque el mecanismo concreto no se conoce. GDAP1 y/o GDAP1L1 podrían conferir cierta adaptación y flexibilidad al organismo ante situaciones de desajustes fisiológicos.

Por lo que se refiere a la morfología mitocondrial, muchos trabajos muestran que la falta de GDAP1 origina una red mitocondrial más elongada (Barneo-Munoz et al., 2015; Niemann et al., 2014; Niemann et al., 2005),

mientras que la sobreexpresión provoca una fragmentación mitocondrial muy evidente (Niemann et al., 2005; Pla-Martin et al., 2013). Está claro que la alteración de los niveles de GDAP1 modifica la forma de las mitocondrias, pero se ha demostrado que dicha alteración no ocurre cuando se silencian los genes de fisión mitocondrial *DRP1* y *FIS1*, indicando que la acción de GDAP1 sobre la morfología mitocondrial es dependiente de *DRP1* y *FIS1* (Niemann et al., 2009). Además, se ha observado un patrón diferencial entre las mutaciones dominantes y recesivas sobre la morfología mitocondrial, las primeras tienen la fisión mitocondrial reducida, mientras que las dominantes interfieren con la fusión mitocondrial y disparan el estrés oxidativo (Niemann et al., 2009).

Se ha demostrado que GDAP1 juega un papel importante en el vínculo entre la mitocondria y otros orgánulos. GDAP1 interacciona con proteínas del citoesqueleto y transporte de vesículas (Pla-Martin et al., 2013). De esta manera, la falta de GDAP1 ocasiona una reducción en los contactos entre la mitocondria y el RE, y sería este posicionamiento anómalo de la mitocondria, lo que desencadenaría problemas en el rellenado del RE a través del proceso denominado *store-operated calcium entry* (SOCE) (Pla-Martin et al., 2013). En línea con dicho resultado, se ha observado que una mutación dominante de *GDAP1* (R120W), impide la asociación entre Jp y STIM1, proceso necesario para la liberación del calcio durante el mecanismo del SOCE (Pla-Martin et al., 2015). Esto nos indica que la relación correcta entre las proteínas Jp y STIM1 es dependiente de GDAP1.

Además de los trabajos en cultivo celular, los últimos 3 años se han generado algunos modelos KO en ratón, para mimetizar la enfermedad y aportar nuevo conocimiento de interés. Ambos poseen un fenotipo CMT, aunque encontramos una gran diferencia entre ellos. El primer trabajo

describe el modelo como un fenotipo de neuropatía periférica hipomielinizante (Niemann et al., 2014). En cambio, el otro modelo muestra un modelo con un fenotipo axonal que es más severo con la edad (Barneo-Munoz et al., 2015). Estas diferencias pueden venir dadas porque están generados de distinta forma, mientras el primer modelo se trata de un KO por delección del quinto exón, Barneo y colaboradores delecionan el primer exón.

Por lo que se refiere a aspectos moleculares, el primer modelo KO muestra un fenotipo diferencial entre el SNC y periférico. Se observó un incremento de la biogénesis mitocondrial en nervio ciático pero en ningún tejido relacionado con el SNC (Niemann et al., 2014). El segundo modelo se centra en los defectos locomotores del ratón, y muestra defectos de morfología mitocondrial y alteraciones en el mecanismo del SOCE en cultivo primario de motoneuronas (Barneo-Munoz et al., 2015), en línea con resultados previos (Pla-Martin et al., 2013).

OBJETIVOS

- 1.** Demostrar la homología funcional entre el gen *CG4623 (Gdap1)* de *Drosophila melanogaster* y el gen *GDAP1* humano.
- 2.** Conocer la función del gen *Gdap1* en *Drosophila*, y definir la relación entre *Gdap1* y el estrés oxidativo en la enfermedad de CMT.
- 3.** Identificar nuevos biomarcadores y rutas moleculares de interés para la enfermedad de CMT en nuestro modelo de *Drosophila*.
- 4.** Trasladar las nuevas rutas moleculares identificadas en *Drosophila* a líneas celulares humanas para su validación como nuevas vías de estudio en la enfermedad de CMT.

CAPÍTULO I:

DEFECTOS MITOCONDRIALES Y DEGENERACIÓN NEUROMUSCULAR CAUSADOS POR LA ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE *Gdap1* en *DROSOPHILA*

1. Introducción

Hemos avanzado mucho en la comprensión de los mecanismos moleculares de las proteínas relacionadas con la dinámica mitocondrial, pero todavía no hay una idea clara de estas proteínas y su biología mitocondrial en un contexto de organismo completo. Por ejemplo, no sabemos porque GDAP1 y MFN2 están involucrados en procesos opuestos de la dinámica mitocondrial y causan una patología similar. Otra cuestión sin resolver es la relación de mutaciones particulares con su presentación clínica. En la enfermedad de CMT las mutaciones recesivas son mucho más severas que las dominantes, en relación con la edad de inicio y la agresividad del fenotipo (Cassereau et al., 2011). A nivel celular, suprimen o reducen el efecto de GDAP1 sobre la fragmentación mitocondrial y la protección del estrés oxidativo, (Niemann et al., 2005; Niemann et al., 2009; Noack et al., 2012; Pedrola et al., 2008), y su comportamiento general es compatible con una pérdida de la función. Las mutaciones dominantes son menos agresivas, y cualitativamente diferentes de las mutaciones recesivas, ya que muestran pérdida de función, ganancia de función o dominancia negativa, dependiendo del contexto experimental (Niemann et al., 2009). Además, hay un caso reportado en los que una mutación dominante común para GDAP1, R120W, se comporta como una mutación recesiva cuando está en heterocigosis con otra mutación recesiva (Nadia-Nelis et al., 2003). Esto revela que el paisaje funcional de mutaciones dominantes puede ser muy complejo.

Drosophila melanogaster es un modelo muy útil para profundizar en estas cuestiones, dada sus posibilidades experimentales, sobre todo en el campo del análisis genético, y también debido a su alta conservación de la maquinaria celular básica (Letsou and Bohmann, 2005). No sólo están los genes importantes para la viabilidad de un organismo, también encontramos los genes relacionados con dinámica mitocondrial y esto permite utilizar este modelo para estudiar dichos procesos (Debattisti and Scorrano, 2013). Muchas enfermedades neurodegenerativas se han modelizado con éxito en *Drosophila*, reproduciendo las principales características clínicas de la enfermedad, lo cual facilita la búsqueda del mecanismo de la enfermedad, biomarcadores de interés y en última instancia, los posibles fármacos (Pandey and Nichols, 2011). Además, también contamos con la existencia de distintos modelos relacionados con las proteínas presentadas (Debattisti et al., 2014; Yarosh et al., 2008). Y no solo existen modelos para las proteínas de dinámica mitocondrial, podemos encontrar también multitud de trabajos para los genes implicados en la enfermedad de CMT (Chihara et al., 2007; Janssens et al., 2014; Storkebaum et al., 2009).

2. Resultados

2.1. El gen *CG4623* de *Drosophila melanogaster* es el gen ortólogo de los genes *GDAP1* y *GDAP1L1* humanos

En una reconstrucción filogenética de la evolución de la familia de las proteínas glutatión-S-transferasa (GST), la proteína codificada por el gen *CG4623* de *Drosophila* se agrupó con las proteínas *GDAP1* y *GDAP1L1* de vertebrados (Marco et al., 2004). Además de la homología de secuencia, dos características comunes adicionales son la presencia de un tramo de aminoácidos entre alfa-hélices 4 y 5 (el bucle $\alpha4-\alpha5$) y un dominio transmembrana C-terminal, que es el anclaje a la membrana mitocondrial externa (Niemann et al., 2005; Pedrola et al., 2005). Además, hay otra pista de su origen evolutivo común, el gen *CG4623* está al lado del *CG10671*, y en orientación opuesta, con la superposición de las regiones 3'UTR (Fig. R1A). *GDAP1L1* y uno de los dos homólogos humanos del *CG10671*, *FITM2*, tienen las mismas posiciones relativas en el cromosoma 20 humano. Esta sintenia implica que el gen *CG4623* puede ser el ortólogo del gen ancestral del que se originaron *GDAP1* y *GDAP1L1*. Aunque el análisis bioinformático y la sintenia sugieren que el gen *CG4623* es el ortólogo de *GDAP1* y *GDAP1L1*, no existen estudios funcionales que aborden este aspecto.

La hibridación in situ en embriones de *Drosophila* realizadas por el Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP, <http://insitu.fruitfly.org/>), como parte de su esfuerzo por caracterizar la expresión de todos los genes de *Drosophila*, revelan una expresión de los transcritos de *CG4623* en embriones tardíos. Concretamente, se detecta la expresión en epifaringe,

hipofaringe, túbulos de Malpighi e intestino medio. Del mismo modo, el análisis transcriptómico realizado por FlyAtlas (<http://flyatlas.org/>) y por el proyecto modENCODE (<http://www.modencode.org/>) mostraron expresión detectable en el intestino medio y posterior y túbulos de Malpighi. Con el fin de confirmar si ocurre lo mismo con la proteína, y también para estudiar la localización sub-celular, se sintetizó una versión etiquetada de la proteína en el mismo locus genómico para conservar el control transcripcional endógeno. Para ello, hemos clonado un fragmento genómico que abarca todo el locus, solapando con los genes *CG10672* y *CG10671* que flanquean al gen *CG4623* (Fig. R1A), además introducimos la secuencia codificante para la proteína roja fluorescente (DsRed) justo después del codón de inicio del gen *CG4623*. Estamos seguros que dicha etiqueta no afectará a la localización o funcionalidad de la proteína, ya que otros estudios demostraron que la adición de la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo N-terminal de GDAP1 permite preservar la localización sub-celular y la funcionalidad de la proteína (Pedrola et al., 2005). Este fragmento se clonó en un vector flanqueado por *gypsy insulators* para evitar la influencia de potenciadores cercanos. Además, contiene la región 5' *upstream* de genómico y los intrones, con lo cual nos aseguramos de que los elementos de control de transcripción relevantes estarán presentes. Con esta aproximación se consiguen transgénicos que contienen dicho fragmento insertado aleatoriamente en el genoma. Para confirmar que el patrón expresado es el correcto y no está alterado dependiendo del lugar de la inserción, se observaron distintos transformantes estables con esta construcción y se detectó que 8 líneas diferentes, con inserciones aleatorias independientes, presentaban el mismo patrón de expresión (datos no mostrados).

La fluorescencia de la proteína DsRed estuvo ausente durante todo el desarrollo embrionario, y sólo fue detectable, claramente, en el primer estadio larvario (Figura. R1B, B'). De esta forma, detectamos expresión en el intestino medio, intestino grueso, túbulos de Malpighi, *anal pads* y órganos de las antenas (Fig. R1B, B'). Este patrón de expresión es una reminiscencia de los genes implicados en reacciones de defensa contra estrés oxidativo, como la tiorredoxina reductasa (TrxR-1), la superóxido dismutasa1 (SOD1) y catalasa (CAT): los tres genes se expresan de una manera notable en el intestino, y la catalasa se expresa también en el aparato excretor (Missirlis et al., 2001). Esto podría indicar una posible función de *CG4623* en la respuesta al estrés oxidativo.

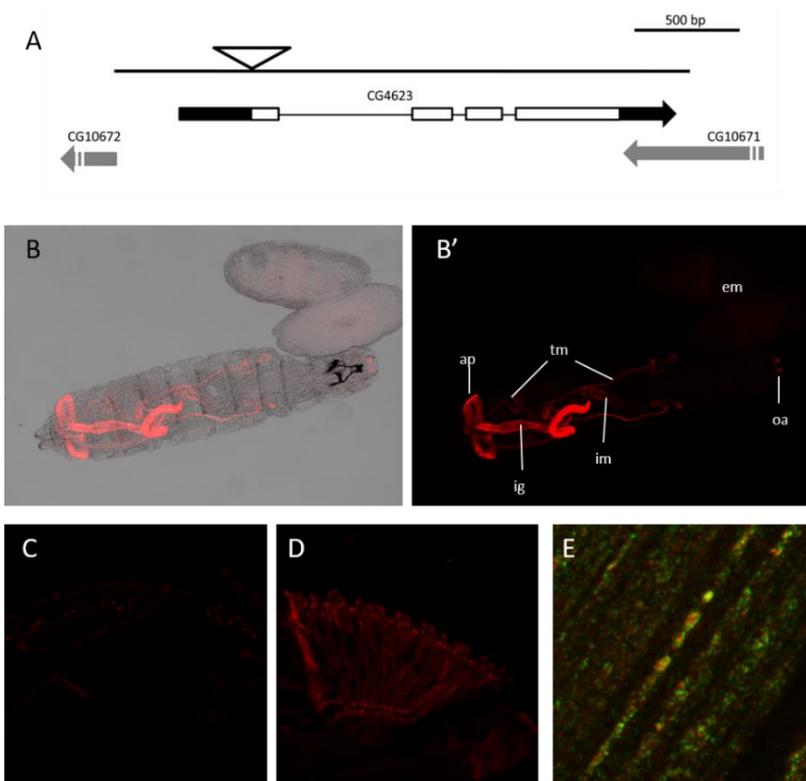


Fig. R1. Expresión del gen CG4623. (A) Mapa del gen CG4623 con indicación de los exones (cajas, región codificante en blanco), intrones (líneas) y genes flanqueantes (flechas en gris). El triángulo invertido indica el sitio de inserción de la etiqueta DsRed para generar la fusión DsRed-Gdap1. (B, B') Expresión en rojo de la proteína en estadio de embrión y estadio larvario resaltando los órganos donde se expresa. Aparato excretor (ap), ig (intestino grueso), intestino medio (im), túbulos de Malpighi (tm), órganos antenas (oa), embrión (em). (C) Sección longitudinal de retina adulta en moscas control con autofluorescencia residual tras tratar con Negro Sudán. (D) Fluorescencia en la retina de los transgénicos DsRed-Gdap1 tras tratamiento con Negro Sudán. (E) Corte transversal músculo *Drosophila*, co-expresión del transgénico DsRed-Gdap1 con mito-GFP (en verde), se observa solapamiento rojo-verde en la mitocondria.

Todos los experimentos posteriores se llevaron a cabo en las moscas adultas, ya que es la etapa más relevante de la enfermedad para estudiar la degeneración neuromuscular a lo largo del tiempo. Para ello, comprobamos la expresión de la proteína en los tejidos de interés para la enfermedad, el sistema nervioso adulto y músculos indirectos del vuelo. En adultos, todas las moscas presentan una fuerte expresión que sólo se observa en el intestino bajo la lupa de fluorescencia (no mostrado). Además, realizamos disección e inmunofluorescencia de los tejidos nombrados (Fig. R1C-E), la retina *Drosophila* es parte del sistema nervioso periférico (PNS), y es un tejido modelo típico para estudiar la neurodegeneración en *Drosophila*. La retina de una mosca no transgénica contiene pigmentos visuales por lo que teníamos problemas con la autofluorescencia, para salvar dicho obstáculo se trataron las secciones de la retina con Negro Sudán (Oliveira et al., 2010), y se detectó la etiqueta DsRed mediante técnicas de inmunofluorescencia con un anticuerpo contra la proteína roja fluorescente (anti-RFP). Las moscas tipo salvaje o control, solo muestran una pequeña fluorescencia residual que no pudimos eliminar con el Negro Sudán (Fig. R1C), pero en las secciones de retina de adultos, con la proteína DsRed fusionada al gen CG4623, observamos la presencia de la fluorescencia roja y por tanto de expresión

proteica (Fig. R1D). Por lo tanto, *CG4623* sólo se expresa en células nerviosas diferenciadas, lo que es coherente con la identificación del gen ortólogo de ratón como un gen que se activa con/tras la diferenciación neuronal (Liu et al., 1999). Por otra parte, el músculo es un sistema ideal para estudiar la morfología mitocondrial y localización de la proteína debido a la presencia abundante y disposición estereotípica de la mitocondria. En las secciones de tórax también detectamos la expresión de la proteína de fusión en las mitocondrias de los músculos indirectos del vuelo (Fig. R1E). La expresión mitocondrial somos capaces de confirmarla por la localización entre el rojo (debido a la expresión del gen *CG4623* etiquetado) y el verde, ya que dichos individuos llevan la mitocondria marcada con GFP. Estos resultados correlacionan con la expresión mitocondrial del gen *GDAP1* humano. Además, clonamos la fusión de la proteína fluorescente azul cyan con *GDAP1* (CFP-*GDAP1*), utilizada anteriormente en cultivo celular para mostrar localización mitocondrial (Pedrola et al., 2005), en el vector pUAS. De esta manera, se obtuvieron moscas transgénicas que podían expresar CFP-*GDAP1* bajo el promotor UAS (*UAS-CFP-GDAP1*). La expresión de CFP-*GDAP1* en el músculo también mostró una localización mitocondrial (datos no mostrados).

Para demostrar que el gen *CG4623* es el equivalente funcional de *GDAP1*, comprobamos que su sobreexpresión era capaz de contrarrestar la de *mitofusina* (*Mfn*). Se ha demostrado que la sobreexpresión de *GDAP1* se traduce en una red mitocondrial más fragmentada, y este efecto se equilibró por la sobreexpresión simultánea de *MFN1* o de *MFN2* (Niemann et al., 2005), sugiriendo que estas dos proteínas tienen efectos opuestos sobre la morfología mitocondrial. Esto se verificó mediante microscopía electrónica de barrido del ojo de la mosca, usando el aspecto externo como una medida

indirecta de daño neuronal, el llamado fenotipo de ojo rugoso. Para expresar *CG4623*, clonamos un cDNA de *Drosophila* en el vector *pUAS* que contiene el promotor inducible *UAS*, y se obtuvieron moscas transgénicas (*UAS-CG4623*). La sobreexpresión del gen *CG4623* en el ojo utilizando el *GMR-Gal4* no produce defectos morfológicos externos, así que no podemos buscar la modificación de este fenotipo (Fig. R2B). En cambio, la sobreexpresión de *Mfn* produjo un fenotipo de ojo muy rugoso y reducción del tamaño del ojo, con ausencia de omatidios bien diferenciados (ojo plano) y quetas interomatidiales (Fig. R2C). La co-expresión de *CG4623* provoca un rescate parcial de este fenotipo anormal, pudiendo apreciar la forma de algunos omatidios y la presencia de quetas interomatidiales, así como un mayor tamaño del ojo (Fig. R2D).

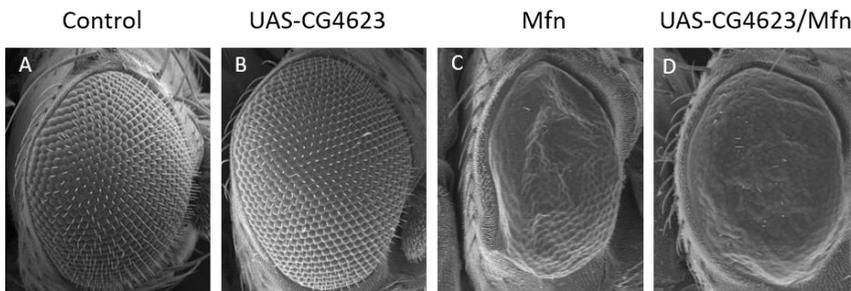


Fig. R2. Interacción génica entre *Gdap1* y *Mfn* en *Drosophila melanogaster*. (A) Ojo de una mosca control con todos los omatidios organizados y con las quetas interomatidiales presentes y ordenadas. (B) La sobreexpresión de *Gdap1* no provoca ningún defecto neuronal a nivel externo. (C) La sobreexpresión de *Mfn* causa un fenotipo neuronal de ojo rugoso y reduce el tamaño del ojo. (D) La co-expresión de *Gdap1* con la *Mfn* provoca un rescate parcial por lo que se refiere a organización de omatidios, presencia de quetas y tamaño de ojo.

Estos datos, junto con los resultados que presentamos a continuación, demuestran que el gen *CG4623* de *Drosophila* es el ortólogo del gen *GDAP1* en mamíferos. Por lo tanto, proponemos renombrar el gen *CG4623* y llamarlo *Gdap1*, siguiendo las normas aceptadas para la nomenclatura de los genes en esta especie. Si visitamos la base de datos para *Drosophila melanogaster* (www.flybase.org) podemos comprobar que el gen *CG4623* ha sido renombrado como *Gdap1*, por ello vamos a utilizar esta denominación a lo largo del trabajo.

2.2. Diseño experimental para la alteración de los niveles de *Gdap1* en nuestro modelo

Dado que los genes humanos y de la mosca parecen ser verdaderos ortólogos, queremos utilizar la maleabilidad genética de *Drosophila* para estudiar el efecto de la sobreexpresión y el silenciamiento de *Gdap1*. Debido a la naturaleza molecular de GDAP1 y la posible participación en la dinámica mitocondrial, el primer objetivo será determinar si la alteración de la expresión de *Gdap1* tiene como consecuencia la degeneración neuromuscular, alteraciones en la estructura y/o función mitocondrial; y si es así, si estos cambios están relacionados con el estrés oxidativo.

Para probar los efectos de la alteración de los niveles de expresión de *Gdap1* se utilizó el sistema UAS-Gal4 que permite la expresión del transgén de una manera dirigida (Brand and Perrimon, 1993). Para la sobreexpresión (*over-expression, OE*), se utilizaron las líneas *UAS-Gdap1* que generamos (ver material y métodos). Para el silenciamiento (*knock-down, KD*) se utilizó una línea de ARN de interferencia (v21624) del Vienna *Drosophila* Resource Center (VDRC), que llamaremos *UAS-Gdap1^{RNAi}*. Las

características de dicha cepa confirman una alta especificidad basado en un algoritmo publicado (Dietzl et al., 2007), nuestra línea tiene una puntuación de especificidad (s_{19}) de 1, lo que descarta que el ARN de doble cadena provoque efectos inespecíficos del ARN de interferencia. Por otra parte, el ARN de doble cadena de *Gdap1* contiene sólo 3 repeticiones CAN. Un alto número de repeticiones CAN es una causa común de efectos inespecíficos de ARN de interferencia. Tener un $s_{19} = 1$ y el bajo número de repeticiones de la CAN (<6) es el escenario más deseable para asegurar que solamente el gen objetivo deseado será silenciado. Para los experimentos de ARN de interferencia (ARNi), se co-expresa la nucleasa Dicer que aumenta la eficiencia del silenciamiento (Dietzl et al., 2007).

Para comprobar que nuestras cepas OE y KD producen la sobreexpresión y silenciamiento de *Gdap1* respectivamente, cruzamos la línea *Ac5C-Gal4* que contiene el promotor de un gen de actina y permite la expresión ubicua. A continuación, cuantificamos por PCR cuantitativa los niveles de transcrito de *Gdap1* tras extracción de ARN a partir de mosca entera. Para la sobreexpresión conseguimos un aumento de 60 veces en la expresión de *Gdap1*, mientras que para las moscas KD los niveles se redujeron en un 96% (Anexo 2). Por otra parte, descartamos que los efectos causados por el ARNi se debieran a una inespecificidad fuera del gen deseado, ya que los defectos fueron corregidos por la co-expresión del gen GDAP1 humano (véase más adelante).

Las líneas Gal4 que utilizaremos para dirigir la expresión de las cepas comentadas serán específicas de tejido. Para estudiar el efecto en el ojo utilizaremos la línea *GMR-Gal4* que contiene el promotor *Glass Multiple Reporter* que dirige la expresión solo en las células post-mitóticas de la retina de *Drosophila*. Para el estudio de los músculos indirectos del vuelo,

utilizaremos la línea *Mhc-Gal4* que utiliza el promotor del gen *Myosin heavy chain*. Las moscas control utilizadas son moscas que llevan el *Gal4* en heterocigosis, como las experimentales pero sin ninguna secuencia *UAS*, es una manera de tener en cuenta un posible efecto tóxico de la proteína Gal4 de levadura que se expresa constitutivamente en el tejido específico de interés.

Dado que queremos determinar si las alteraciones observadas se deben a un proceso degenerativo, más que a un defecto en el desarrollo, hemos llevado a cabo los experimentos en dos puntos de la vida de la mosca, una semana y cinco semanas, lo que representa moscas jóvenes y viejas, respectivamente.

2.3. La alteración de los niveles de *Gdap1* compromete la integridad neuronal de la retina de *Drosophila melanogaster*

El ojo compuesto de *Drosophila* está formado por ojos simples u omatidios, cada uno de los cuales tiene ocho neuronas fotorreceptoras (R1 a R8) y un conjunto de células accesorias. Los cuerpos de las neuronas de R1 a R6 se extienden por todo el grosor de la retina, mientras que R7 y R8 ocupan sólo las mitades externas e internas de la retina, respectivamente (Anexo 1). Por lo tanto, en una sección transversal del ojo siempre hay siete cuerpos neuronales, que son claramente identificables por la presencia del rabdómero, el órgano de recogida de luz de la neurona. La disposición de los rabdómeros es estereotipada, con R7 o R8 en el centro (dependiendo de la profundidad de la sección) y R1 a R6 alrededor de ellos formando un trapecoide (Anexo 1). La degeneración neuronal se detecta claramente por

la disrupción de la morfología y, en última instancia, la desaparición de las neuronas individuales

Para conducir la expresión de nuestras construcciones utilizamos una línea *Gal4* específica de retina, *GMR-Gal4*, que se expresa en todas las células post-mitóticas del ojo (Freeman, 1996). En todas las condiciones ensayadas se contaron el número de omatidios en el que hubo una pérdida de al menos uno de los rabdómeros (para más detalles ver materiales y métodos). Esto puede ser una subestimación de la muerte neuronal, ya que no estamos diferenciando entre omatidios que han perdido dos neuronas y otras que han perdido una sola; y no tiene en cuenta la degeneración incipiente (es decir, defectos morfológicos), de esta manera, nos aseguramos que las diferencias entre las condiciones son robustas.

En la condición control, la pérdida neuronal en las moscas jóvenes es insignificante, pero hay un cierto nivel de muerte a cinco semanas, alrededor del 10% de omatidios (Fig. R3A, A', E). Tanto la sobreexpresión como el silenciamiento de *Gdap1* inducen la pérdida neuronal de una manera dependiente de la edad (Fig. R3B, B', C, C', E), lo que sugiere que se requiere un nivel adecuado de *Gdap1* para la supervivencia neuronal. Y lo más importante, la co-expresión de *GDAP1* humano con la el *ARNi* de *Gdap1* puede corregir el fenotipo de neurodegeneración observado (Fig. R3D, D', E), con niveles de pérdida de rabdómeros que son intermedias entre el control y las otras dos condiciones experimentales. Este resultado demuestra, que en este contexto, el *GDAP1* humano puede sustituir a la función de su homólogo en *Drosophila*.

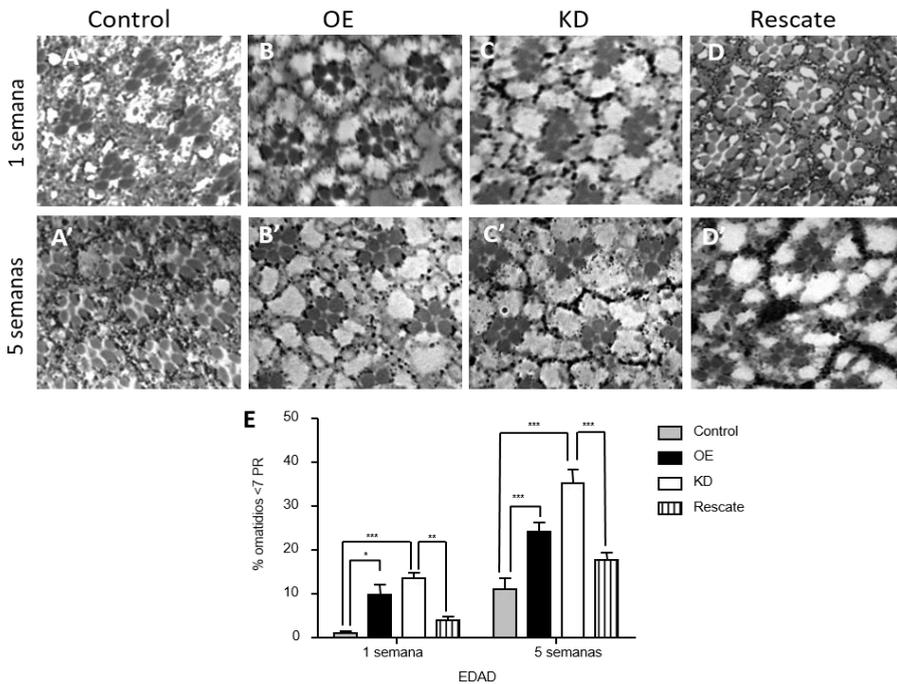


Fig. R3. Degeneración neuronal debida a la alteración de los niveles de Gdap1. (A, A') Secciones de las moscas control, se observa la presencia de 7 rabdómeros en ambas edades de estudio. (B, B') Las moscas de OE presentan una pérdida superior a las moscas control en ambas edades. (C, C') La falta de Gdap1 causa una pérdida neuronal dependiente de la edad. (D, D') La co-expresión de GDAP1 humano sobre las moscas KD permite rescatar el fenotipo de pérdida neuronal. (E) Todas las diferencias relevantes, OE y KD frente al control, y el rescate frente al KD son significativas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Para el análisis se utilizó el test estadístico *two-way* ANOVA y el post-test Bonferroni.

Las secciones semifinas se utilizaron para el recuento, pero no permiten una caracterización exhaustiva de la morfología de las células, por lo que se realizó un análisis por microscopía electrónica de secciones ultrafinas de la retina, donde podemos apreciar los resultados del conteo y otros aspectos importantes (Fig. R4). Las moscas control jóvenes, mostraron la típica estructura de una ommatidio, con los siete rabdómeros en el centro, conectados al cuerpo de la célula neuronal (Fig. R4A, A', A'').

En el control de moscas viejas, había una cierta neurodegeneración, con un ligero desorden de la estructura rabdomérica, pero no hubo defectos importantes (Fig. R.4 A', A''). Por lo que se refiere a las moscas OE, podemos observar un inicio temprano de neurodegeneración a 1 semana (Fig. R4B, flecha amarilla). Este defecto fue más evidente en moscas viejas (Fig. R4B'), donde pudimos observar un defecto adicional, la presencia de grupos mitocondriales agregados en la periferia del cuerpo de la célula y la presencia de mitocondrias más pequeñas (Fig. R4B', 4B'').

En las moscas KD, también se observó una degeneración que se incrementa con la edad (Fig. R4C, C'). Además, las mitocondrias tienden a perder su localización periférica y se acercan a la zona terminal de los rabdomeros (RTW), es decir, hacia el centro del omatidio. Un defecto que fue más evidente en los rabdomeros más degenerados (Fig. R4C''). El tamaño de las mitocondrias también se modificó con respecto a las moscas control, pero en este caso las mitocondrias eran más grandes y alargadas (Fig R4. C'', flecha amarilla).

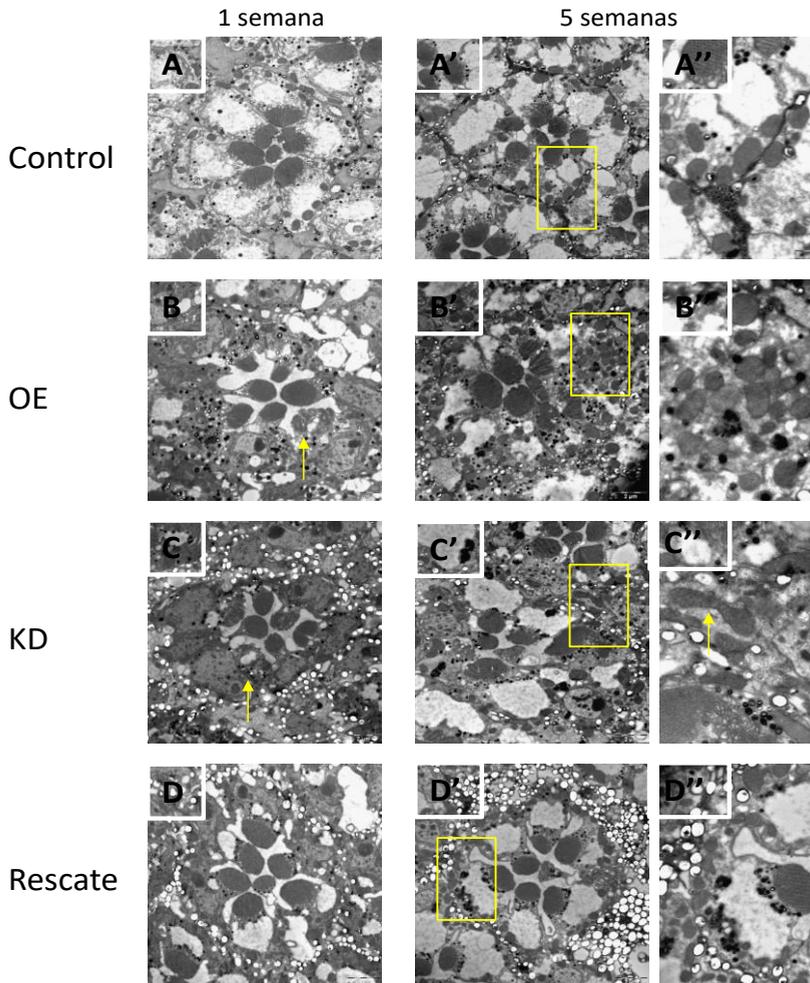


Fig. R4. Estructura fina de secciones de retina. (A, A'', A) Las moscas control presentan la típica estructura trapezoide de un omatidio normal con las mitocondrias en una localización periférica y una distribución homogénea a lo largo de todo el omatidio. (B, B', B'') Las moscas OE presentan una pérdida neuronal más acusada con la edad, además las mitocondrias forman agregados. (C, C', C'') Las moscas KD presentan un fenotipo de pérdida neuronal más agresivo, las mitocondrias pierden su organización habitual y migran hacia el rabdómero. (D, D', D'') La co-expresión del GDAP1 humano sobre las moscas KD reduce la pérdida neuronal y recupera la localización mitocondrial normal.

Por lo tanto, las dos condiciones de expresión mostraron degeneración dependiente de la edad. Además, hubo cambios en el tamaño y la distribución mitocondrial, pero los efectos en estos orgánulos fueron diferentes para cada genotipo. Y lo más importante, los efectos del silenciamiento de *Gdap1*, fueron corregidos por la sobreexpresión del GDAP1 humano a todos los niveles, integridad neuronal, distribución y morfología mitocondrial (Fig. R4D, D', D'').

2.4. Los niveles de *Gdap1* son importantes para una correcta sinapsis neuronal

La muerte neuronal puede ser causada por el fracaso para establecer una sinapsis correcta. Los fotorreceptores extienden sus axones hacia dos regiones del sistema nervioso central (SNC), R1 a R6 forman sinapsis con el primer neurópilo óptico, la lámina; y R7 y R8 con el segundo neurópilo, la médula. Las sinapsis en la lámina se organizan en estructuras llamadas cartuchos. Los elementos postsinápticos de la lámina corresponden principalmente a tres neuronas monopolares (*Large Monopolar Cells*), L1 a L3, con L1 y L2 en una posición central rodeadas por los axones de R1 a R6 (Fig. R5A). Los axones aparecen más densos debido a que contienen numerosas vesículas sinápticas. Las moscas control jóvenes y envejecidas no muestran diferencias significativas entre ellas (Fig. R5A). En las moscas con sobreexpresión y silenciamiento de *Gdap1*, ya en la primera semana, apreciamos claramente que los cartuchos son más pequeños y desorganizados (figura R5B, C). En las moscas normales los axones de R1 a R6 están siempre en contacto con las células L1 o L2, pero en los otros dos genotipos, algunos de los axones no siempre están en contacto con las dos células centrales. En las moscas de 5 semanas, la estructura de los cartuchos

fue más aberrante, con menos perfiles axonales y predominio de perfiles postsinápticos de la lámina (Fig. R5B', C').

Además de las vesículas sinápticas, los perfiles axonales tienen estructuras más grandes denominadas *capitate projections* (CP) (Fig. R5D), vesículas revestidas de clatrina conectados a la membrana plasmática por un tallo, que contienen evaginaciones de células gliales vecinas (William and Carlson, 1986). El papel de estas vesículas todavía no se conoce por completo pero se han propuesto para mediar en la recuperación de la membrana de la vesícula sináptica y / o neurotransmisor, por lo que sería de alguna manera relacionado con la comunicación sináptica (Curtin et al., 2007; Fabian-Fine et al., 2003). Otra diferencia fue que las CP parecen ser más grandes en ambos genotipos modificados por la sobreexpresión y silenciamiento de *Gdap1* (Fig. R5E, F), respecto al control (Fig. R5E). Tras dicha observación, estimamos su superficie media en distintas secciones (Fig. R5G).

Hicimos la cuantificación en moscas jóvenes, ya que la degeneración de los cartuchos es muy acusada en moscas viejas, y eso dificultaría el análisis. De esta manera, podemos decir que ambos genotipos presentan un tamaño en las CP mayor respecto al control, siendo más notable en las moscas con *Gdap1* silenciado.

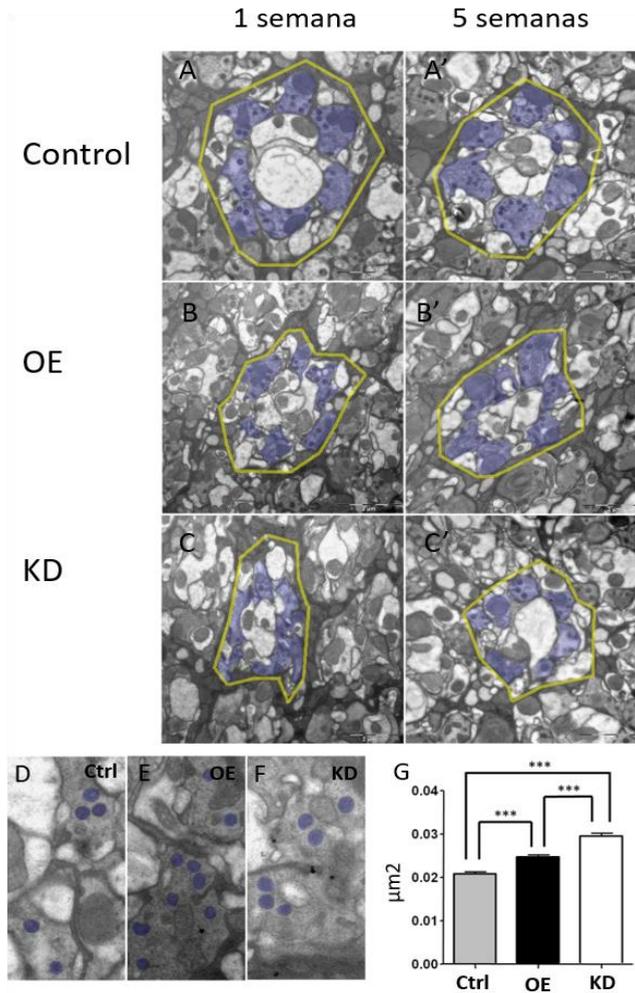


Fig. R5. Defectos sinápticos en la lámina. En amarillo se indica la unidad estructural de la lámina llamado cartucho. En morado, las neuronas que forman cada cartucho. (A, A') Sección de una mosca control, con 6 cuerpos neuronales y dos células postsinápticas (L1 y L2) en el centro, esta estructura se mantiene en moscas viejas. (B, B') Las moscas OE presentan una estructura aberrante y un cartucho de menor tamaño. (C, C') Los defectos son más severos tras el silenciamiento de Gdap1. (D, E, F) Se muestran las *capitate projections* (CP, en morado) en secciones de moscas de una semana. (G) La cuantificación del área de las CP es estadísticamente significativa en los genotipos OE y KD respecto al control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Se utilizó el test estadístico prueba *t* de Student o test-T.

2.5. Los niveles alterados de *Gdap1* causan pérdida muscular y cambios en la morfología mitocondrial

A continuación, se estudiaron los efectos de la desregulación de *Gdap1* en el músculo, lo hemos considerado interesante por dos razones. En primer lugar, una característica común de todos los pacientes CMT es la pérdida de masa muscular. Se supone que es debido a la pérdida de inervación, pero en nuestro modelo, se mostró la expresión de *Gdap1* en el músculo, esto sugiere un posible papel en dicho tejido. Es posible que la disfunción mitocondrial pueda producirse también en el músculo intrínsecamente, por lo que es más propenso a la degeneración cuando se pierden las conexiones nerviosas. En segundo lugar, el músculo es un buen sistema para estudiar la morfología mitocondrial, ya que las fibras musculares contienen un gran número de mitocondrias en hileras entre las miofibrillas, para proporcionar las altas demandas energéticas de estos órganos.

La estrategia utilizada fue similar a la sección anterior, en este caso se utiliza la línea *Mhc-Gal4*, que conduce la expresión en el músculo bajo el control transcripcional del gen de la cadena pesada de la miosina. Se observó el fenotipo de alas hacia arriba o *held up*, las alas de las moscas pierden su posición paralela al eje del cuerpo, como una indicación preliminar de la degeneración muscular (datos no mostrados). Un corte con orientación transversal en el tórax de la mosca, nos permite ver la estructura característica de los seis pares de músculos indirectos del vuelo (Fig. R6A). Estos músculos están muy juntos y apenas existen huecos entre ellos en moscas control jóvenes (Fig. R6A). Si nos fijamos en las moscas de 5 semanas, todos los músculos estaban presentes, aunque hay algunos pequeños huecos

entre ellos debido a la edad (Fig. R6A'). En las moscas OE, los músculos de los individuos jóvenes no eran muy diferentes del control (Fig. R6B), pero se pueden observar defectos en las moscas de 5 semanas, con un espacio entre los paquetes más acusado que los controles (Fig. R6B'). De manera similar a lo que hemos observado con la degeneración de la retina, en las imágenes representativas, se observa que la pérdida de los músculos era más grave en las moscas KD. Las moscas jóvenes ya muestran grandes diferencias entre los músculos (Fig. R6C), observándose una pérdida de paquetes musculares ya que solo se pueden distinguir 4 pares de paquetes, y no 6 como las moscas control. En las moscas envejecidas, la degeneración muscular fue más grave, con la falta de músculos más evidente que a una semana (Fig. R6C').

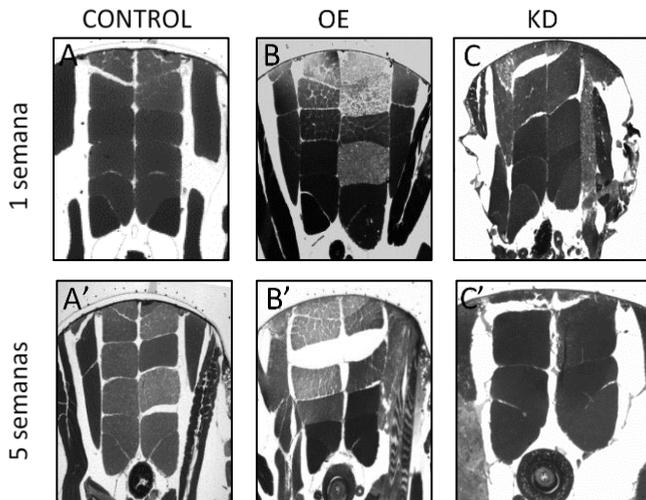


Fig. R6. Estructura de los músculos indirectos del vuelo. (A, A') Las moscas control presentan seis pares de paquetes musculares bien compactados entre ellos. (B, B') Las moscas OE provocan una pérdida de compactación a 5 semanas de edad. (C, C') La falta de Gdap1 dispara un fenotipo más agresivo con una reducción en el número de paquetes.

Para evaluar la ultraestructura de las miofibrillas y mitocondrias, realizamos secciones ultrafinas para microscopía electrónica de transmisión. En las moscas control, las mitocondrias forman hileras entre las miofibrillas y tienen una morfología ligeramente alargada u ovalada (Fig. R7A', A'), que se incrementa con la edad (Oda et al., 2012). En cambio, observamos unas mitocondrias más redondeadas en las moscas OE a una semana (Fig. R7B), y esto fue mucho más evidente a las 5 semanas, con un gran número de fibras rotas y mitocondrias con crestas desorganizadas (Fig. R7B'). Por lo que se refiere al genotipo KD, vimos algunos eventos de fusión y mitocondrias más alargadas a una semana (Fig. R7C), pero de nuevo, esto fue mucho más evidente cuando nos fijamos en las moscas de 5 semanas, con una red mitocondrial muy elongada, como podemos observar por la presencia de mitocondrias extremadamente alargadas (Fig. R7C').

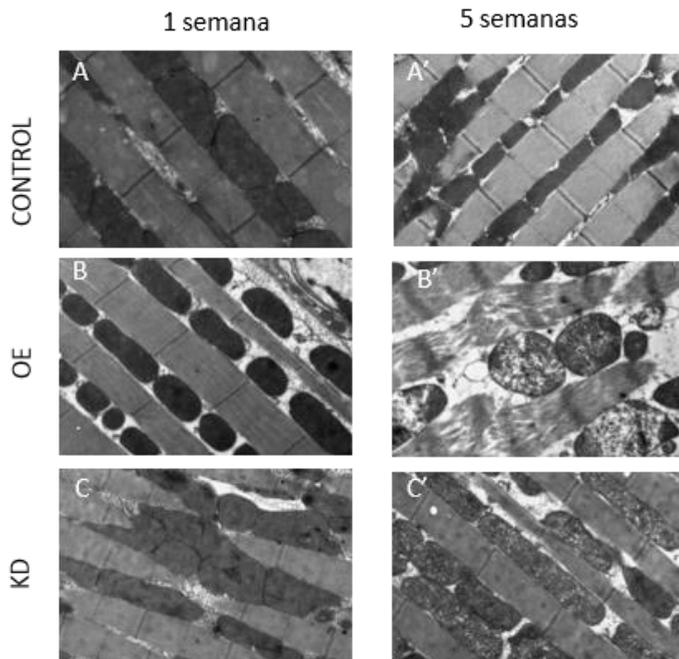


Fig. R7. Cortes longitudinales de músculo indirecto del vuelo para el estudio de la morfología mitocondrial. (A, A') Morfología mitocondrial a 1 y 5 semanas respectivamente, se observan las mitocondrias con forma ovalada entre las fibras musculares. (B, B') La sobreexpresión de *Gdap1* produce una fragmentación de la red mitocondrial, con rotura de las crestas mitocondriales a las 5 semanas. (C, C') El silenciamiento de *Gdap1* desencadena la formación de mitocondrias extremadamente elongadas.

2.6. Los niveles de *Gdap1* se relacionan con el estrés oxidativo a largo plazo.

Está bien establecido que las alteraciones mitocondriales afectan a su capacidad de producir ATP (Brookes et al., 2004). Para saber si este es el caso en nuestras condiciones experimentales, se estimó la cantidad total de ATP mitocondrial. Para este estudio, y los posteriores estudios sobre el estrés oxidativo y glutatión, se utilizó la línea *Mhc-Gal4*, que dirige la expresión en músculo. De esta manera, los experimentos se realizaron tomando el tórax de las moscas como tejido de estudio.

En las moscas jóvenes, la alteración de los niveles *GDAP1* en los dos sentidos, causó una alteración en los niveles de ATP (Figura. R8A). Por lo que se refiere a las moscas de 5 semanas, las moscas KD también presentaron unos menores niveles ATP, pero, sorprendentemente, las moscas que sobreexpresan *Gdap1* mostraron unos niveles de ATP mayores respecto al control (Fig. R8A). Por lo tanto, es posible que la sobreexpresión de *Gdap1* confiera una adaptación metabólica a las mitocondrias para aumentar su eficiencia durante el envejecimiento, pero hay otras alternativas que se discuten a continuación.

El glutatión reducido (GSH) es un antioxidante fisiológico en la protección de la célula contra un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Maher, 2006). Las proteínas GST conjugan GSH a compuestos

electrófilos, evitando así el estrés oxidativo. GDAP1 pertenece a una familia especial de GST's (Marco et al., 2004), por lo que podría formar parte de los sistemas de maquinaria de detoxificación y protección ante xenobióticos. Además, su sobreexpresión se ha relacionado con un aumento en los niveles de glutatión en células en cultivo (Noack et al., 2012). Por lo tanto, queríamos averiguar si los niveles de GSH y sus rutas biosintéticas estaban alterados en nuestras condiciones experimentales.

En primer lugar, determinamos los niveles de GSH libre (Fig. R8B) y la relación GSH/GSSG (Fig. R8B). En las moscas jóvenes, ninguno de estos dos parámetros presentó cambios significativos tras la desregulación de los niveles de *Gdap1*. Por el contrario, en las moscas viejas, se observaron niveles de GSH y una relación GSH/GSSG más alta, unos cambios más pronunciados cuando sobreexpresamos *Gdap1*, y un poco menos en el silenciamiento, se puede ver una mayor variabilidad en este genotipo con una significancia menos clara. Para buscar una explicación a los niveles de GSH, se determinó por PCR cuantitativa la expresión de tres enzimas implicadas en el metabolismo de GSH, *TrxR-1* (tiorredoxina reductasa 1), necesaria durante el mecanismo de reducción de GSSG a GSH mediada por la glutatión reductasa (Kanzok SM et al., 2001); y *GCLC* y *GCLM*, las subunidades catalítica y moduladora de la ligasa glutamato-cisteinil respectivamente, y directamente implicados en la síntesis de GSH.

El análisis de los niveles de expresión reveló ligeras diferencias en las moscas jóvenes, y un aumento general con la edad de dicha expresión para los 3 genotipos (Fig. R8C). En las moscas de 5 semanas, encontramos algunas diferencias en la expresión de genes para la síntesis de GSH. Concretamente, observamos una bajada en la expresión de GCLC y GCLM en comparación con las moscas control (Fig. R8C). *TrxR-1* mostró el mismo patrón general de expresión, pero no se encontraron diferencias significativas en este caso (Fig. R8C).

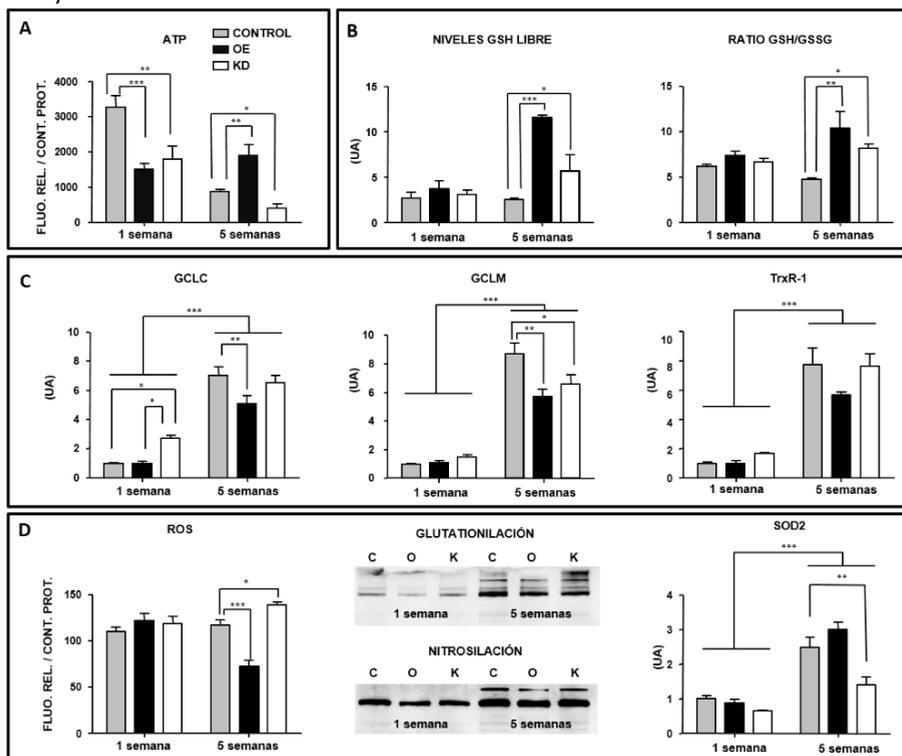


Fig. R8. Perfil de estrés oxidativo causado por la alteración de los niveles de Gdap1. (A) Niveles de ATP en mitocondria aislada de tórax, las moscas OE y KD presentan alteraciones respecto las moscas control a 1 y 5 semanas. (B) Niveles de GSH libre y ratio GSH/GSSG, se observan cambios significativos a las 5 semanas de edad. (C) Perfil de transcritos para los genes relacionados con la síntesis de GSH. (D) Determinación de los niveles de ROS, modificaciones post-traduccionales y niveles de transcrito del gen SOD2. Para el estudio de los posibles cambios significativos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) se utilizó el test estadístico *two-way* ANOVA y el post-test Bonferroni.

Por tanto, no existe una correlación directa entre los niveles de *Gdap1* y la generación de GSH, ya que la sobreexpresión y el silenciamiento de *Gdap1* causan un aumento en los niveles de GSH y el ratio GSH/GSSG, siendo muy evidente en sobreexpresión y menos claro en el silenciamiento. Además, las diferencias en los niveles de GSH libres y relación GSH/GSSG observados en moscas viejas no son el resultado de la expresión diferencial de la GCLC, GCLM o TrxR-1 al alza, una posibilidad sería que su tasa de expresión es más baja para equilibrar los niveles más altos de GSH. Dado que la disfunción mitocondrial puede conducir a un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Melo A et al., 2011), nos preguntamos si este estrés podría ser uno de los efectos de la desregulación de *Gdap1* y por lo tanto uno de los principales contribuyentes de la degeneración neuromuscular observada. Para la estimación de las ROS se utilizó la fluorescencia como medida, gracias al producto 2,7-diacetato diclorofluorisceína (DCF). En las moscas jóvenes, no se observan diferencias significativas entre los controles y las moscas con los niveles alterados de *Gdap1* (Fig. R8D). Sin embargo, en las moscas viejas se observó una disminución significativa en la producción de ROS cuando se sobreexpresa *Gdap1*, y un aumento de la producción de ROS en las moscas KD (Fig. R8D). Como medida adicional de estrés oxidativo, se analizaron los niveles de modificaciones oxidativas relacionadas con el estrés post-traduccionales de las proteínas, glutationilación y nitrosilación. Se muestran niveles ligeramente más bajos de proteínas glutationiladas en las moscas que sobreexpresaban *Gdap1*, tanto en moscas jóvenes como de 5 semanas de vida (Fig. R8D). En cambio, no se observaron grandes diferencias entre las moscas control y las KD (Fig. R8D). Del mismo modo, las moscas OE, mostraron niveles

ligeramente más bajos de proteínas nitrosiladas en comparación con las control y las moscas KD (Fig. R8D). La conclusión general es que la sobreexpresión de *Gdap1* puede ofrecer cierta protección sobre modificaciones oxidativas posteriores a la traducción, pero los efectos son moderados y ciertamente insignificantes en comparación con los cambios relacionados con la edad.

Se ha descrito previamente en muchos organismos, incluyendo seres humanos, *Drosophila* y ratones, que el proceso de envejecimiento produce estrés oxidativo, que induce la expresión de algunas enzimas antioxidantes (Wozniak et al., 2004; Zou et al., 2000). Analizamos en nuestras condiciones experimentales los niveles transcripcionales del gen *manganeso superóxido dismutasa 2 (SOD2)*. De nuevo, no observamos ningún cambio en las moscas jóvenes, y un incremento en la expresión general (en los 3 genotipos) de esta enzima antioxidante en las moscas de 5 semanas (Fig. R8D). Sin embargo, las comparaciones intragrupo mostraron un aumento leve con la sobreexpresión de *Gdap1*, mientras que la expresión de *SOD2* se redujo significativamente en las moscas KD de 5 semanas (Fig. R8D).

En resumen, no hay grandes cambios en las moscas jóvenes, donde algunos defectos mitocondriales, como morfología y niveles de ATP, pueden ser fácilmente observados. Por lo tanto, la generación de estrés oxidativo no parece ser la principal contribución de GDAP1 a la patología de la CMT, al menos en el modelo de *Drosophila*. A largo plazo, GDAP1 puede tener algún efecto protector sobre ROS, mientras que la falta de GDAP1 confiere una defensa antioxidante menor en moscas envejecidas, lo que se correlaciona con el aumento de los niveles de ROS.

3. Discusión

Nuestros resultados muestran que el gen *Gdap1* de *Drosophila* es el ortólogo de los genes *GDAP1* y *GDAP1L1* de los humanos, basándonos en sus efectos sobre la morfología y función mitocondrial, y en el rescate del fenotipo neural con la sobreexpresión del gen humano *GDAP1* al mismo tiempo que silenciamos el *Gdap1* de mosca. Además, se muestra un claro efecto de *Gdap1* en la morfología y la distribución de las mitocondrias. La sobreexpresión se traduce en la presencia de mitocondrias más pequeñas en la retina y, más evidentemente, en el músculo, lo cual es consistente con el aumento fisión y/o fusión reducida. En cambio, el silenciamiento produce mitocondrias más alargadas en el ojo y la agregación progresiva de la mitocondrias en el músculo con una forma más elongada.

También comprobamos que la distribución de las mitocondrias en la retina está alterada. Cuando expresamos al alza los niveles de *Gdap1*, las mitocondrias forman agregados, perdiendo la homogeneidad periférica que se observa en las moscas control. Por el contrario, las moscas KD presentan mitocondrias que tienden a perder su localización periférica y migran hacia el centro de la neurona fotorreceptora, invadiendo el RTW. Estas alteraciones en la dinámica mitocondrial están relacionadas con varias de las funciones de los orgánulos, tales como transporte y SOCE (Pla-Martin et al., 2013). Un fenotipo similar, al observado por nosotros, también aparece tras el silenciamiento de una proteína que tiene un papel en el tamponamiento de calcio en el fotorreceptor de *Drosophila* (Weiss et al., 2012).

La función principal de las mitocondrias es la síntesis de ATP, *GDAP1* es una proteína mitocondrial y podría tener una relación, directa o indirecta, en dicho proceso. De hecho, se ha descrito que las mutaciones clínicas de *GDAP1* provocan una deficiencia del complejo I de la cadena de transporte de electrones (Cassereau et al., 2009). En nuestro caso, las moscas OE y KD presentan bajos niveles de ATP a 7 días de vida, pero sorprende que en moscas viejas veamos un aumento cuando regulamos al alza los niveles de *Gdap1*. Podría ser debido a una contribución beneficiosa de *Gdap1* frente al estrés oxidativo, haciendo de la mitocondria un orgánulo más eficiente, aunque es cierto que no podemos descartar otros efectos, como por ejemplo, un menor consumo de ATP debido a la pérdida de funcionalidad de las miofibrillas que parecen estar rotas en su mayoría. Otra opción es que estamos perdiendo información sobre el efecto sistémico de *Gdap1*, como hemos visto, *Gdap1* también se expresa en cabeza y abdomen (intestino), en este caso solo estudiamos el músculo porque era nuestro tejido de interés. En cualquier caso, estas diferencias entre jóvenes y envejecidas deberíamos tenerlas en cuenta en el futuro.

Concomitante con los defectos en la mitocondria, la alteración específica de tejido para los niveles de *Gdap1* induce la degeneración en la retina y en el músculo. En la retina, la pérdida de rabdómeros es evidente a partir de 1 semana de vida, y este deterioro, se incrementa con la edad.

También hemos comprobado la existencia de una morfología aberrante en el extremo opuesto de la célula, allá donde las neuronas proyectan sus axones, la lámina. En esta región, los cartuchos están desorganizados, ven reducido su tamaño, y lo más interesante, contienen CP más grandes. El papel exacto de dichas estructuras no se conoce, pero probablemente están implicadas en el reciclaje de la membrana sináptica, y

neurotransmisores de las células gliales adyacentes mediado por clatrina (Fabian-Fine et al., 2003; William and Carlson, 1986). Es improbable que *Gdap1* esté directamente involucrado en la formación de las CP, pero el tamaño anormal de estas estructuras podría ser una consecuencia de una transmisión sináptica alterada. Nuestra observación, correlaciona con otros trabajos, por ejemplo la proteína *DLin-7* es importante para la neurotransmisión y su deficiencia también produce CP más grandes (Soukup et al., 2013). Otro trabajo muestra que la proteína *Basigin* también es clave para una buena función sináptica, ya que los mutantes para este gen dispara un aumento de tamaño en las CP (Curtin et al., 2007).

Nuestros resultados también revelan un papel autónomo de *Gdap1* en la degeneración muscular. Los pacientes de CMT sufren degeneración muscular distal en las extremidades, que es dependiente de una pérdida de inervación por los axones largos de las extremidades. En nuestro modelo, cuando alteramos los niveles de *Gdap1* exclusivamente en el músculo, existe una degeneración muy evidente. Esto podría significar que los músculos de los pacientes con mutaciones en *Gdap1* tienen cierta susceptibilidad para la degeneración, haciendo de este tejido una posible diana terapéutica. Alternativamente, es posible que *GDAP1L1* lleve a cabo en el músculo las funciones que *GDAP1* hace en el nervio, una distinción que no podemos explorar en la mosca.

GDAP1 se ha relacionado con el estrés oxidativo en cultivo de células y modelos murinos (Niemann et al., 2014; Noack et al., 2012), y parece ser el caso de *Drosophila* también. En larvas de primer estadio, la expresión se detecta en órganos donde el control del estrés oxidativo es de gran importancia (Missirlis et al., 2001). En el intestino *Drosophila*, la producción de ROS es un mecanismo de defensa contra la infección microbiana (Ha et

al., 2005). Con el fin de proteger las células epiteliales de este alto estrés, se producen ráfagas cortas de ROS, y el nivel de expresión de genes antioxidantes se incrementa. También se detectó la expresión en los *anal pads*, órganos epiteliales que son objeto de un considerable estrés salino, ya que su función principal es el transporte de iones y osmorregulación (Jarial, 1987). Curiosamente, las células del aparato excretor contienen numerosas mitocondrias con una morfología altamente organizada, principalmente adyacente a las diferentes regiones de la membrana plasmática. Los túbulos de Malpighi llevan a cabo funciones similares al hígado y los riñones de los vertebrados. Estos órganos también contienen numerosas mitocondrias con una morfología y distribución definida (Davies et al., 2012), y su alteración, compromete la función renal y confiere más susceptibilidad al estrés oxidativo (Terhzaz et al., 2010). Además, las moscas viejas que sobreexpresan *Gdap1*, contienen más GSH reducido y han disminuido los niveles de ROS cuando tomamos el tórax como tejido referencia. Aún así, la producción de ROS no es el efecto primario que conduce a la degeneración en las moscas porque los individuos jóvenes, que ya muestran degeneración neuronal y muscular, no presentan ningún cambio en los niveles de ROS. Es sólo a largo plazo cuando los niveles de *Gdap1* inciden en el estrés oxidativo. Esto es consistente con el hallazgo en células N1E-115, la deficiencia a corto plazo de GDAP1 no causa diferencias en GSH o ROS (Huber et al., 2013). También se ha visto que GDAP1 aumenta el contenido de GSH en las células expuestas al glutamato (Noack et al., 2012), pero los autores también concluyen que GDAP1 podría tener un rol protector independiente de GSH. Además, no solo en el tórax con sobreexpresión de *Gdap1* se detectó aumento de los niveles de GSH, también en las moscas KD.

Por otra parte, la expresión de enzimas antioxidantes mostró una regulación a la baja en ambos genotipos, sugiriendo un desequilibrio en las moscas OE y KD. Destacar que los niveles de una enzima mitocondrial como *SOD2*, responsable para la desintoxicación de superóxido mitocondrial (Celotto et al., 2012), mostró unos niveles muy bajos de expresión en las moscas KD, correlacionando con una mayor producción de ROS en dicho genotipo.

En nuestra opinión, estos resultados y los de otros grupos, que hemos discutido anteriormente, son compatibles con una situación en la que *GDAP1* contribuye a la plasticidad mitocondrial y la adaptación a la fisiología celular. En este sentido, *GDAP1* sería un factor que contribuye a la solidez de los sistemas de protección contra el estrés. Por la interrupción de la expresión de *GDAP1*, varios eventos mitocondriales pueden ser perturbados y la célula no es capaz de ejercer un control sobre desafíos a la homeostasis fisiológica. Los efectos sobre los niveles de glutatión, el estrés oxidativo o regulación del calcio puede tener diferentes lecturas subyacentes sobre la disfunción mitocondrial primaria, cuya naturaleza exacta sigue siendo desconocida.

CAPÍTULO II:

GDAP1, ENTRE EL METABOLISMO Y LA NEURODEGENERACIÓN

1. Introducción

Hasta la fecha no existe ningún tratamiento específico para la enfermedad de CMT. Además de la heterogeneidad genética y variabilidad fenotípica que complica la comprensión de los mecanismos de esta enfermedad rara, hay otro motivo social y económico, al tratarse de enfermedades poco prevalentes no existe demasiada inversión para las enfermedades minoritarias, ya que no suponen una alta rentabilidad.

Solo existe un ensayo clínico para la enfermedad de CMT1A, un subtipo causado por una duplicación en el gen PMP22 y que es el más prevalente dentro de la enfermedad de CMT (Attarian et al., 2014). Lo destacable es que se ha llegado hasta ahí gracias a la generación de un modelo murino que reveló rutas moleculares relacionadas con la remielinización (Fledrich et al., 2014). Por ello, la Fundación de Neuropatías Hereditarias establece una serie de prioridades para la investigación en la enfermedad de CMT, entre las que se encuentra la generación de nuevos modelos animales y la exploración de nuevos biomarcadores interesantes para la búsqueda de algún tratamiento (Ekins et al., 2015). Nos encontramos en la era de las “ómicas”, es decir, el estudio del conjunto para tener una concepción general y después ir a lo más particular.

La metabolómica es uno de los escalones dentro de todas las disciplinas “ómicas”, y concretamente se centra en el estudio de todos los metabolitos del organismo para vislumbrar alteraciones metabólicas que nos permitan generar hipótesis hacia nuevas rutas moleculares de estudio. De esta manera, la metabolómica puede servir para detectar metabolitos útiles en el diagnóstico temprano o para la monitorización en la progresión de cierta enfermedad. Por lo que se refiere a su éxito relacionado con las enfermedades neurodegenerativas podemos encontrar numerosos ejemplos en la bibliografía. Se ha demostrado que los fosfolípidos tienen una importancia crucial en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Mapstone et al., 2014). En la enfermedad de Huntington también se han trazado nuevas líneas de estudio, se ha demostrado que el ciclo de Krebs ocupa un rol importante en dicha patología (Verwaest et al., 2011). También destacamos un estudio metabolómico con plasma de pacientes de ELA, en él son capaces de discriminar metabolómicamente los casos control de los pacientes y encuentran diferencias en metabolitos tales como la glucosa o el lactato (Blasco et al., 2013).

En este capítulo, nos planteamos utilizar la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) para estudiar las posibles alteraciones metabólicas causadas por la alteración de los niveles de Gdap1, utilizando el modelo que hemos presentado anteriormente. De esta manera, esperamos conocer la relación entre GDAP1 y el metabolismo, el cual no ha sido estudiado hasta la fecha.

2. Resultados

2.1. Los niveles de *Gdap1* influyen en la viabilidad y competencia neuromuscular relacionada con la edad

Con el fin de encontrar alteraciones sistémicas relacionadas con la fisiopatología de CMT causada por mutaciones en *GDAP1*, alteramos de nuevo los niveles de *Gdap1*, en este caso la expresión se verá alterada en todo el organismo. Para ello, empleamos una línea Gal4 que nos permita una expresión ubicua, *Ac5C-Gal4*. Así, tendremos dos situaciones como anteriormente, sobreexpresión (OE) y silenciamiento (KD). Ambos genotipos, OE y KD, comprometen la viabilidad de los animales (Fig. R9A), ya que viven 40 y 20 días menos que el control respectivamente. Además, ambos genotipos también tienen una competencia neuromuscular reducida medida en un ensayo de geotaxis negativa (Fig. R9B y vídeo S1.); sufren un deterioro progresivo de la capacidad para escalar la pared del vial, y este defecto es más acusado en las moscas KD. Por lo tanto, la reducción de la viabilidad de las moscas OE no se debe a una competencia neuromuscular inferior, otros factores deben contribuir a ello. También se calculó el peso promedio por individuo como una indicación de las alteraciones metabólicas generales, observamos en moscas viejas una reducción del peso para ambos genotipos, siendo más significativo en las moscas de OE (Fig. R9C).

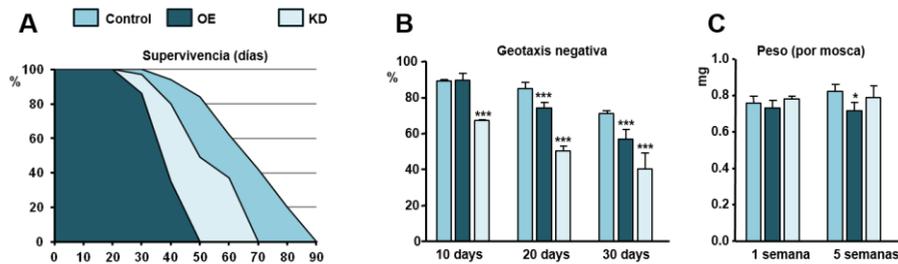


Figura R9. *Fitness* de las moscas OE y KD respecto al control. (A) Curva de supervivencia de los tres genotipos representados como porcentaje de moscas supervivientes. (B) Ensayo geotaxis negativa para analizar la capacidad locomotora. Se muestran los resultados a 10, 20 y 30 días de edad. (C) Media del peso corporal a 1 y 5 semanas. Para el análisis estadístico se compararon los genotipos OE y KD respecto al control. En todos los casos se utilizó el test-*One way ANOVA* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2.2. La alteración de los niveles de *Gdap1* provocan cambios en el metaboloma

Los defectos mitocondriales pueden tener un impacto en las rutas metabólicas, por ello se decidió analizar las alteraciones en el metaboloma de los genotipos OE y KD, frente al genotipo control, por RMN. Para ello se hizo un abordaje similar al primer capítulo, se analizaron moscas a dos edades, moscas jóvenes para detectar alteraciones tempranas que pueden estar relacionadas con una causa más primaria, y moscas envejecidas, que podrían reflejar la progresión del fenotipo y las alteraciones como consecuencia del fallo mitocondrial. Ya en el primer capítulo, se ha observado que las alteraciones en la morfología y distribución mitocondrial pueden ser detectados en moscas de una semana, por lo que son las primeras consecuencias por los niveles de *Gdap1* alterados, y muy probablemente relacionadas con el origen de la patología. En cambio, otras alteraciones relacionadas con el estrés oxidativo solo son evidentes en las moscas con 5 semanas de vida (Lopez Del Amo et al., 2015).

El perfil metabolómico de los extractos de moscas nos permite mostrar los metabolitos polares y no polares por RMN de alta resolución (Fig. R10). Otra aproximación realizada es la que nos permite el *High Resolution Magic Angle Spinning* o HR-MAS (Fig. R10), con esta técnica utilizamos la mosca entera sin ninguna manipulación, tejido intacto. La mayor diversidad de metabolitos los encontramos en la fase acuosa (metabolitos polares), dicho perfil incluye azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y nucleótidos entre otros. En la fase orgánica podemos encontrar metabolitos lipídicos (saturados, insaturados, etc.), si bien es cierto que los picos son anchos y de calidad limitada debido al alto grado de solapamiento. Es por eso que realizamos el estudio por HR-MAS, con dicha aproximación podemos observar metabolitos polares y no polares, serán los segundos los que más nos interesan, gracias a que estudiamos el animal intacto podemos estudiar con más precisión el perfil lipídico, sobre todo de las moléculas móviles, que será de gran ayuda para mejorar y/o complementar el estudio por RMN de la fase orgánica. Los espectros representativos de los tres tipos de espectros se muestran en la figura R10. Un análisis detallado de los metabolitos identificados en el estudio, así como sus niveles en todos los tres genotipos, se muestran en el apartado de Anexos (Anexo 5 y Anexo 6).

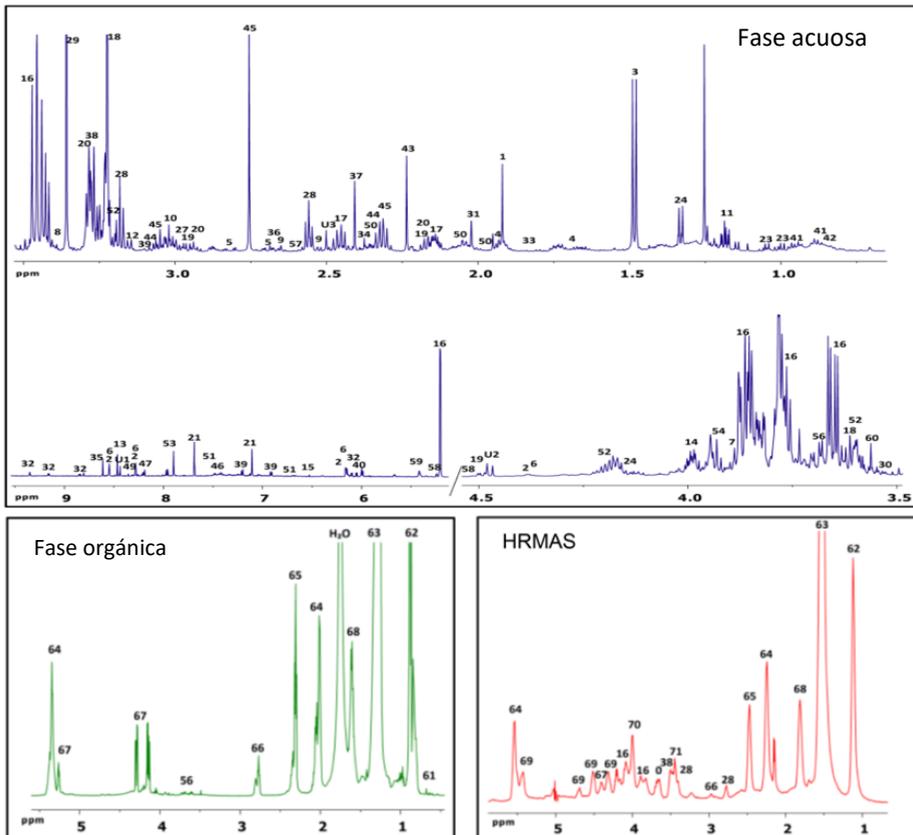


Fig. R10. Espectros representativos de RMN sobre los extractos de moscas. Se muestran los espectros para la fase acuosa (morado), la fase orgánica (verde) y HR-MAS (rojo) de una muestra de control. Los números encima de los picos corresponden a los metabolitos identificados, consultar Anexo 5. La mayor diversidad de metabolitos se detectó en la fase acuosa, que incluye azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos y otros metabolitos. El espectro de la fase orgánica presenta principalmente lípidos. Además de la espectroscopía de RMN convencional, se obtuvo el perfil HR-MAS que contiene metabolitos tanto polares y no polares. Esta técnica permite el análisis de toda la mosca sin ningún tipo de procesamiento del tejido y permite una mejor detección de las moléculas lipídicas más móviles.

En primer lugar, se llevó a cabo la construcción de un modelo basado en las diferencias metabólicas de los genotipos OE y KD en comparación con las moscas control, dicha aproximación se denomina OPLS-DA (orthogonal projection on latent structure-discriminant analysis). Además, quisimos saber cuáles eran los metabolitos que estarían contribuyendo a esta supuesta diferencia entre genotipos, para detectar dichos cambios se realizó un análisis estadístico multivariante, de esta manera podremos ver cuáles son los metabolitos discriminantes, en lo que llamamos gráficos-S.

En el caso de las moscas jóvenes, no fue posible obtener un modelo que separe ambos genotipos, OE y KD, frente a las moscas control. Sin embargo, conseguimos buenos modelos para la discriminación de moscas viejas, con valores de R^2 cercanos a 1, y los valores del $Q^2 > 0,5$. (Fig. R11A, B). Dicho resultado está de nuevo de acuerdo con nuestros resultados anteriores, donde no pudimos detectar diferencias fisiológicas significativas en las moscas jóvenes (Lopez Del Amo et al., 2015). Cabe mencionar que el modelo fue más preciso para KD frente al control que para OE frente al control, donde se podía detectar un ligero *overfitting*. En moscas con 5 semanas de edad, los gráficos-S muestran los metabolitos más importantes implicados en la discriminación entre genotipos (Fig. R11A, B).

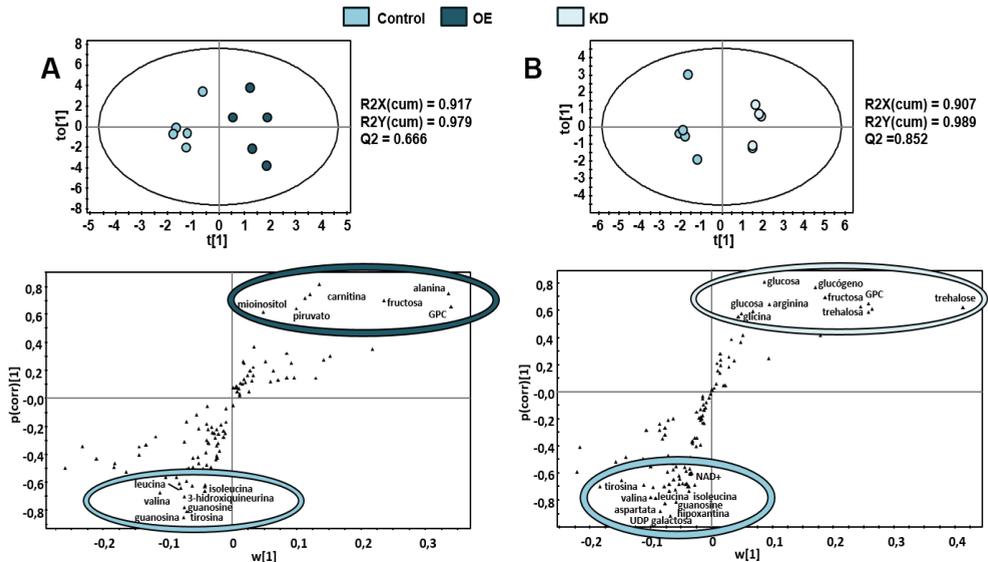


Fig. R11. Gráfico OPLS-DA y gráfico-S resultantes de las comparaciones OE y KD respecto a las moscas control, a 5 semanas. Los distintos puntos hacen referencia a los replicados dentro de cada genotipo ($n=5$), siendo cada replicado experimental un *pool* de 15-20 moscas (A) Las moscas OE se separan de las control, también podemos comprobar los metabolitos que contribuyen a dicha separación. (B) Las moscas KD son distintas desde un punto de vista metabólico.

Los cambios más evidentes son en hidratos de carbono, algunos de los cuales están elevados en OE (mioinositol), KD (glucosa, glucógeno, trehalosa) o en ambos (fructosa). Además, los aminoácidos, cuyos niveles se reducen generalmente en ambos genotipos, con la excepción de alanina (elevado en OE) y arginina (elevado en KD). Ambos modelos muestran un aumento de glicerolfosfolina (GPC), un metabolito que se acumula en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes de Alzheimer, como resultado de la degradación de fosfolípidos de la membrana durante la neurodegeneración (Walter et al., 2004). Es importante mencionar, que aunque ambos genotipos tienen las mismas tendencias en algunos metabolitos, también pudimos obtener un modelo donde separamos las moscas OE frente las KD (Anexo 7),

esto significa que a pesar de que rutas metabólicas afectadas puedan ser comunes, los dos genotipos tienen dos perfiles metabólicos distintos.

En resumen, la naturaleza de los metabolitos cambiantes más significativos en los genotipos OE y KD, frente al control, apuntan a alteraciones en los niveles de aminoácidos y metabolismo de los hidratos de carbono. Estos metabolitos constituyen un punto de partida para identificar nuevas rutas moleculares que puedan ser importantes para la enfermedad. Además, estudiaremos aquellos metabolitos adicionales cuyos niveles tienen una diferencia estadísticamente significativa y la expresión de genes relacionados con dichos metabolitos, con el objetivo de identificar nuevas rutas que nos ayuden a entender el impacto de la función de *Gdap1* en el metabolismo celular.

El análisis más detallado lo hemos hecho en moscas con 5 semanas de vida, ya que es dicho grupo de moscas el que más cambios sufre a nivel de metabolitos, no obstante comentaremos algunos metabolitos significativos en moscas jóvenes. Dos son los metabolitos a destacar en el grupo de moscas jóvenes, en primer lugar, vemos una disminución de la β -alanina para las moscas OE y KD, esto nos está indicando que empieza a notarse una cierta degeneración muscular, ya que dicho metabolito es un marcador de degeneración muscular en *Drosophila melanogaster* (Sarou-Kanian et al., 2015). Por otra parte, observamos un aumento significativo de los niveles de glucógeno en las moscas que tienen la expresión de *Gdap1* reducida.

2.3. Los niveles de Gdap1 son importantes para la homeostasis de los aminoácidos y los hidratos de carbono

Bien es sabido que los aminoácidos se encuentran en todas nuestras células y son la base necesaria para la síntesis proteica, necesaria a su vez para el funcionamiento de cualquier organismo. Por dicha importancia, no es sorprendente encontramos enfermedades metabólicas asociadas a un desajuste de ciertos aminoácidos, por ejemplo la Acidemia propiónica, con altos niveles de lisina y bajos niveles de isoleucina (Scholl-Burgi et al., 2012). Pero no solo enfermedades metabólicas, también encontramos patologías neurodegenerativas debido a un desequilibrio de aminoácidos, es el caso de la enfermedad de Leigh, con un problema en el metabolismo de la valina que provoca una encefalopatía neonatal (Peters et al., 2014). Anteriormente, avanzábamos que los aminoácidos tenían un papel importante para la separación de los genotipos OE y KD, ahora exploramos con más detalle el perfil aminoacídico en nuestros modelos OE y KD.

En la Fig. R12, se muestra una cuantificación detallada de los aminoácidos que presentaron diferencias significativas. Hay una reducción consistente y general en las cantidades de β -alanina, aspartato, isoleucina, leucina, valina y tirosina. Por otra parte, podemos observar un aumento de la alanina en OE y de la arginina en KD. Estas diferencias nos indican que el balance anabolismo/catabolismo sufre un desajuste importante. Entre los aminoácidos nombrados, se incluyen los tres aminoácidos de cadena ramificada, que promueven la síntesis de proteínas en el músculo (Kimball and Jefferson, 2006).

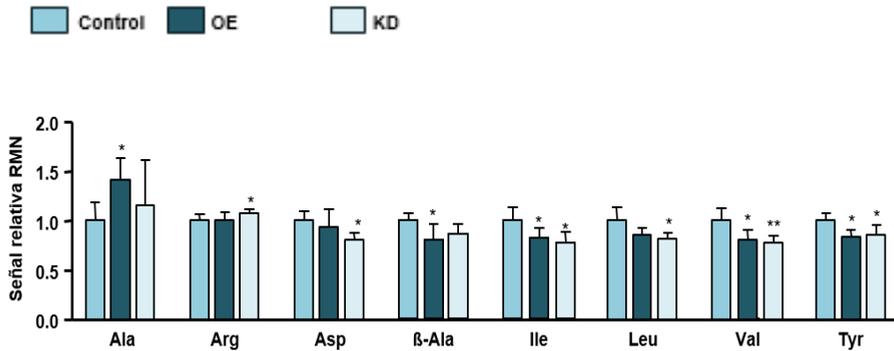


Fig. R12. Señales de RMN relativas de aminoácidos. Se muestran las alteraciones de los aminoácidos en moscas de 5 semanas de vida más importantes. Para el análisis estadístico se compararon los genotipos OE y KD respecto al control. En todos los casos se utilizó el test *One way ANOVA* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Sorprendentemente, nuestro perfil es muy similar al observado en plasma de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (Ilzecka et al., 2003), en comparación con los controles sanos, los pacientes presentaban reducciones en los niveles de aspartato, isoleucina, leucina, valina y tirosina. Además, los niveles altos de alanina están vinculados a un estado clínico avanzado y los niveles más altos de arginina a una progresión más rápida de la enfermedad. Por último, observamos una reducción de la β -alanina, como hemos dicho este metabolito es específico de músculo y los niveles bajos se han relacionado con la degeneración muscular en *Drosophila* (Sarou-Kanian et al., 2015). Estos datos se correlacionan con la pérdida muscular observada en los cortes histológicos del primer capítulo.

Otro grupo de metabolitos con cambios significativos son los carbohidratos. Como se aprecia en las gráficas, el perfil metabólico de las moscas OE y KD señala hacia un incremento general de los hidratos de carbono, siendo muy claro en el genotipo KD (Fig. R14A).

En las moscas con *Gdap1* silenciado, encontramos un aumento significativo de la glucosa, fructosa, trehalosa y glucógeno, además, también vemos un aumento de la fructosa en las moscas OE. En consonancia con esto, los dos genotipos experimentan un aumento de los niveles de transcripción de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), enzima importante en la gluconeogénesis, y también de glucógeno sintasa (GlyS), imprescindible para la síntesis de glucógeno. Por el contrario, los niveles de la enzima glicolítica, piruvato quinasa (PyrK) y la glucógeno fosforilasa (GlyP), necesaria para la degradación del glucógeno, (Fig. R14B, C) presentaron una reducción significativa. Por otra parte, vemos una bajada de un derivado de los azúcares en las moscas KD, la UDP-galactosa (Anexo 6.2), este metabolito y otros UDP-azúcares son importantes como dadores para la síntesis de glucoproteínas y glucolípidos de la superficie celular (Jumbo-Lucioni et al., 2014). Además, se ha relacionado con el estrés oxidativo a largo plazo (Yi and Huh, 2015).

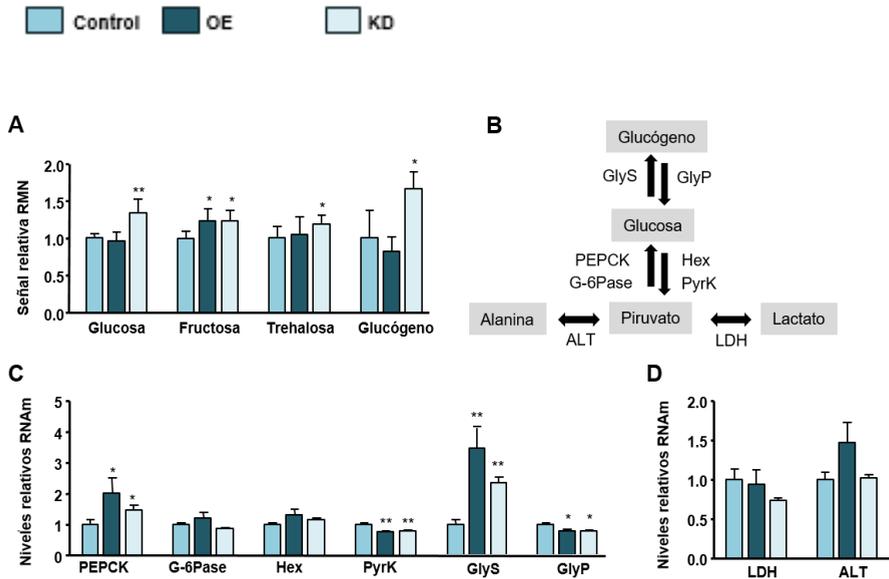


Fig. R14. Estudio de los niveles de los carbohidratos más representativos, así como los niveles de RNAm de los genes relacionados con las distintas rutas de síntesis y degradación. (A) Se muestra un incremento general de los carbohidratos en ambos genotipo, OE y KD, siendo más claro en el segundo. (B) Representación esquemática de las vías metabólicas de carbohidratos y destino del piruvato, con indicación de las enzimas clave cuantificadas en nuestro trabajo. (C) Niveles relativos de transcritos de enzimas del metabolismo de hidratos de carbono. (E) Niveles relativos de transcritos de enzimas del metabolismo del piruvato. Para el análisis estadístico se compararon los genotipos OE y KD respecto al control. En todos los casos se utilizó el test *One way ANOVA* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A pesar de esta acumulación de hidratos de carbono general, los niveles de piruvato no se vieron reducidos (ver más adelante). Además de la ruta glicolítica, también quisimos tener en cuenta otras rutas, para ello nos fijamos en otros metabolitos a los que puede dar lugar el piruvato, alanina y lactato (Fig. R14B). Cuando nos fijamos en ambos metabolitos, solo el primer metabolito experimentó un aumento en las moscas OE.

También medimos la expresión de las enzimas relacionadas con estos dos metabolitos, en este caso, observamos un incremento (no significativo) de la alanina aminotransferasa (ALT) cuando sobreexpresamos *Gdap1* (Fig. R14D), que correlacionaría con los mayores niveles de alanina en el genotipo OE. En cambio, no se apreciaron cambios significativos en los transcritos de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Fig. R14D).

En resumen, la alteración de los niveles de *Gdap1* provoca una acumulación de diferentes hidratos de carbono, siendo muy claro en el KD, y una respuesta transcripcional a favor de la síntesis de carbohidratos. Una reducción de las enzimas glicolíticas, incluyendo a PyrK, es también una característica de uno de los modelos murinos de GDAP1 (Barneo-Munoz et al., 2015).

2.4. Los niveles de *Gdap1* son importantes para un uso apropiado de los sustratos energéticos

El piruvato es el puente entre la glucólisis y el ciclo de Krebs, cuando nos fijamos en los niveles de dicho metabolito lo encontramos aumentado en ambos genotipos (Fig. R15C). Los niveles de piruvato son controlados por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDC), que regula la entrada de productos glicolíticos al ciclo de Krebs, realizando la conversión de piruvato a acetil-CoA (Fig. R15A). A su vez, la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) y la piruvato deshidrogenasa fosfatasa (PDP) controlan la actividad de la PDC (Fig. R15A). Ambas enzimas pueden ser reguladas a nivel transcripcional (Jeong et al., 2012), en nuestro caso comprobamos que las moscas KD presentan los niveles de *PDP* reducidos, y ambos, OE y KD, mostraron niveles elevados de la *PDK* (Fig. R15B). Además de su control transcripcional, la PDK

actúa como un sensor fisiológico para regular la PDC: una alta relación NADH/NAD⁺ y altos niveles de ATP mitocondrial activan la PDK, que a su vez inhibiría la actividad de PDC. En cuanto a estos dos parámetros, ambos genotipos tienen una alta relación NADH/NAD⁺ y también altos niveles de ATP mitocondrial (Fig. R15B). Estos resultados también están apoyados porque ambos genotipos presentan unos menores niveles de NAD⁺ cuando miramos los perfiles de RMN (Anexo 6.2), y por lo tanto tendría sentido la mayor relación piruvato/lactato (NADH/NAD⁺).

Estos datos sugieren que la PDC debería estar funcionando por debajo de su capacidad en la conexión glucólisis y ciclo de Krebs. Sorprendentemente, la abundancia de metabolitos del ciclo de Krebs fueron similares al control (Fig. R15C), lo que sugiere cambios compensatorios en la producción de acetil-CoA para mantener la homeostasis del ciclo de Krebs. Si la glicólisis está bloqueada o funcionando por debajo de sus capacidades habituales, tiene que haber una vía anaplerótica alternativa para alimentar el ciclo de ciclo de Krebs, por ejemplo la oxidación de lípidos. Esto también podría explicar el aumento de NADH/NAD⁺ y los niveles aumentados de ATP, ya que la lipólisis es más energética que la fosforilación oxidativa a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs.

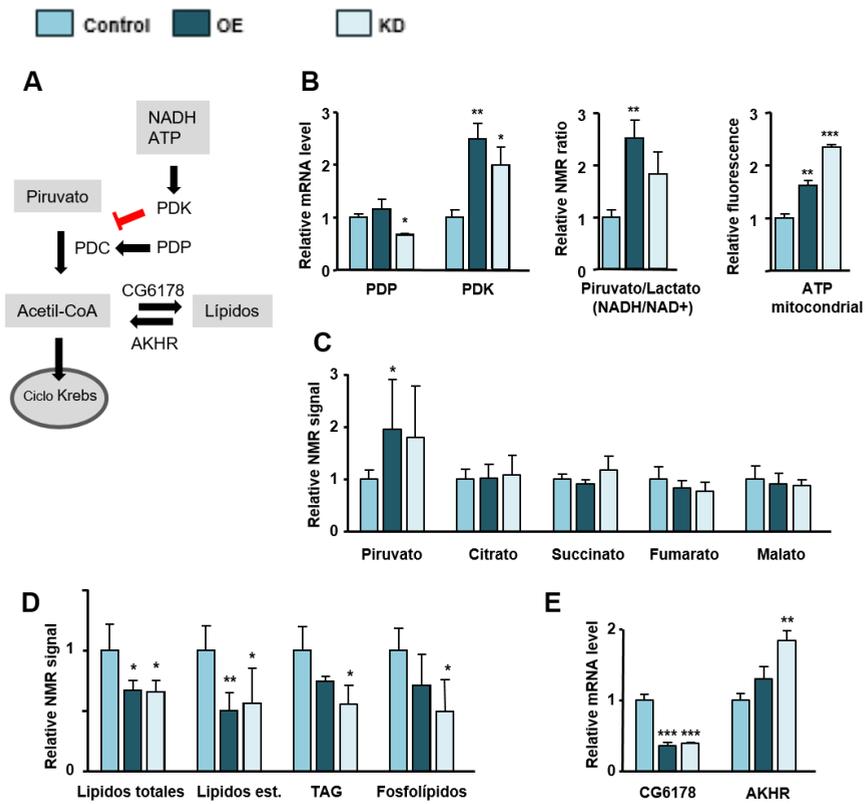


Fig. R15. Uso de los lípidos en detrimento de los hidratos de carbono en moscas de 5 semanas de vida. (A) Representación esquemática de la regulación de la síntesis de acetil-CoA a partir de piruvato mitocondrial y la β -oxidación de los lípidos, con indicación de las enzimas y metabolitos analizados. (B) Estimación de los niveles de PDP y PDK, relación relativa de piruvato / lactato y la abundancia relativa de ATP mitocondrial como una indicación de la activación del PDC. (C) Señal de relativa de los metabolitos clave del ciclo de Krebs. (D) Señales de HR-MAS relativas de lípidos con cambios significativos. (E) Abundancia relativa de los transcritos de las enzimas del metabolismo lipídico. Para el análisis estadístico se compararon los genotipos OE y KD respecto al control. En todos los casos se utilizó el test *One way ANOVA* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Para detectar cambios en el metabolismo de lípidos, exploramos los espectros HR-MAS, ya que proporcionan señales predominantemente a partir de lípidos dinámicos, lo que reduce la interferencia de los lípidos de la membrana más estáticos (Fig. R15D). Se observa una reducción en la cantidad de lípidos totales en OE y KD moscas. Además, llevamos a cabo un análisis más detallado de los tipos específicos de lípidos, lípidos insaturados, lípidos esterificados, triglicéridos y fosfolípidos, y se observó reducción en la mayoría de ellos, especialmente en el genotipo KD. Como una prueba adicional del posible aumento en la oxidación de los lípidos, se cuantificó la expresión de dos genes que reflejan el control transcripcional del metabolismo de los lípidos en *Drosophila* (Fig R15A): los niveles de transcrito de *CG6178*, relacionado con la lipogénesis (Maher, 2006), disminuyó fuertemente; mientras que los transcritos del análogo del glucagón, el receptor de la hormona adipoquinética (*AKHR*), que participa en la movilización de lípidos (Musselman et al., 2013), se incrementaron en ambos genotipos, siendo significativo en el grupo KD (Fig. R15E).

2.5. Defectos en la ruta de insulina por la alteración en los niveles de *Gdap1*

Tanto los genotipos de OE como KD presentan un cambio metabólico en la fuente de energía utilizada como combustible, utilizando los lípidos en lugar de los azúcares, alteraciones similares son características de un déficit en la ruta de la insulina. En condiciones normales, cuando la insulina llega hasta su receptor, se produce una cascada de activación a través de la fosforilación de distintas proteínas. Entre ellas, AKT ocupa una posición central de la ruta y cuando es fosforilado, a su vez fosforila a FOXO que queda

retenido en el citosol y es degradado (Hay, 2011). Ante una afectación de dicha ruta, si la cascada de fosforilación no ocurre de manera correcta, FOXO puede no ser fosforilado debidamente, y entonces migra hasta el núcleo para activar la activación de multitud de genes. Una de las dianas de FOXO es la enzima inhibidora de la PDC, es decir, la PDK (Furuyama et al., 2003), la cual tiene una alta tasa de transcripción en nuestro modelo, y por lo tanto está en la línea de nuestra hipótesis.

Por otra parte, el contacto entre la mitocondria y el retículo endoplásmico es de vital importancia para una correcta señalización de la ruta de la insulina, de hecho, algunos trabajos han demostrado que tanto un exceso como una reducción de dichos contactos desencadenan una alteración en la ruta de la insulina. GDAP1 tiene un papel importante en la asociación mitocondria y retículo endoplasmático (RE) formando lo que llamamos membranas asociadas a mitocondrias (MAMs), de hecho, la sobreexpresión de GDAP1 aumenta el contacto de estos orgánulos, mientras que el silenciamiento tiene el efecto contrario en líneas celulares de neuroblastoma (Pla-Martin et al., 2013). Por otra parte, se ha demostrado que el contacto de la mitocondria y el RE a través de las MAMs es un importante modulador para la señalización de la insulina, por ello, tanto una reducción como exceso de este contacto hace que la señalización de insulina sea defectuosa (Arruda et al., 2014; Tubbs et al., 2014). Nuestra hipótesis es que la desregulación de los niveles de *Gdap1*, en ambos sentidos, altera los contactos mitocondria-RE, y este hecho podría ser el mecanismo causante del déficit en la ruta de la insulina.

En el primer capítulo revelamos, para ambos genotipos, alteraciones en la morfología y localización mitocondrial en la retina de moscas de una

semana (Lopez Del Amo et al., 2015). La retina es un tejido nervioso en el que podemos realizar estudios ultraestructurales cuantitativos. Por ello, quisimos volver a analizar estas secciones ultrafinas, y calcular el número de mitocondrias en contacto con el RE en proporción con el número total de mitocondrias (Fig. R16A, B). Nuestros resultados confirmaron lo que se había visto en líneas celulares de neuroblastoma (Pla-Martin et al., 2013): en comparación con las moscas control, las retinas de OE presentan más contactos y las moscas KD mostraron menos contactos RE-mitocondria. En este punto, tenemos una alteración temprana de los contactos RE-mitocondria en ambos genotipos. Nuestra intención ahora es vislumbrar alguna pista molecular temprana que pueda indicarnos una respuesta defectuosa de la ruta de la insulina, y que podría ser la clave como desencadenante de los defectos metabólicos mostrados a largo plazo. Es por ello, que para la búsqueda de dicha evidencia utilizaremos moscas jóvenes.

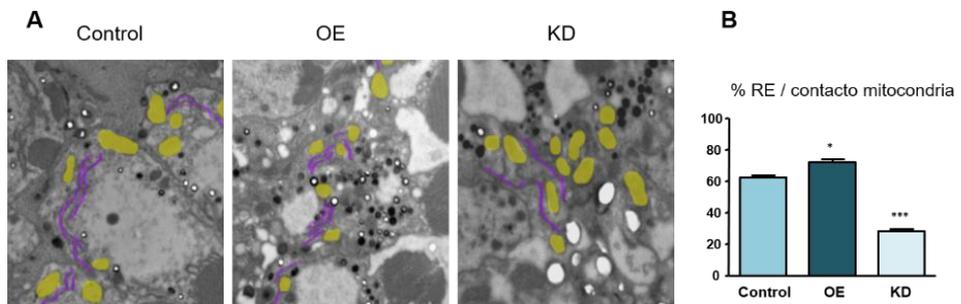


Fig. R16. Alteraciones en los contactos mitocondria-retículo endoplasmático (M-RE). (A) Detalle de las secciones ultrafinas en retinas de mosca de una semana de vida. El retículo en morado y las mitocondrias en amarillo. (B) Cuantificación de los contactos M-RE en porcentaje, se contaron las mitocondrias totales y se analizó cuantas estaban próximas al retículo. Para el análisis estadístico se compararon los genotipos OE y KD respecto al control. Se utilizó el test *One way ANOVA* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

En primer lugar, decidimos cuantificar por PCR cuantitativa (qPCR) la expresión de genes relacionados con la vía de la insulina en *Drosophila*. En primer lugar, hemos medido los niveles de expresión de los genes de los péptidos análogos a la insulina en *Drosophila* (*Dilps*, Fig. R17) en extractos de la cabeza, ya que estos péptidos se producen en células neuroendocrinas situadas en la cabeza (Rulifson et al., 2002). En general, la expresión de *Dilp3*, *Dilp5* y *Dilp6* aparecen elevadas en ambos genotipos, más dramáticamente *Dilp6*. Los niveles altos de transcritos de estos genes podría ser una respuesta para contrarrestar el aumento de la glucemia en los dos genotipos. Además, se comprobó la expresión de dos marcadores de supresión de la insulina, *4ebp* y el receptor de la insulina (*InR*). Estos genes son dianas transcripcionales de FOXO, y en condiciones de deficiencia de insulina, su expresión es regulada al alza (Puig et al., 2003).

La expresión de *4ebp* y el *InR* está fuertemente elevada en la cabeza, el origen de la señal, pero también en el tórax y el abdomen, lo que indica una deficiencia sistémica en la señalización de insulina para ambos genotipos (Fig. R17).

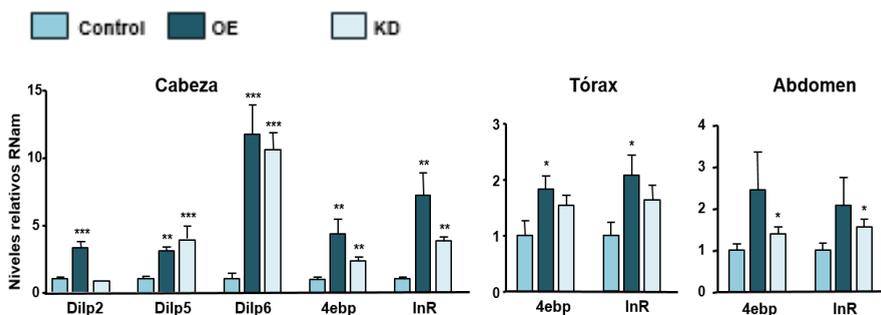


Fig. R17. Estudio de la ruta de la insulina por qPCR. Niveles relativos de transcritos de los *Dilps*, *4ebp* y *InR*. Para el análisis estadístico se compararon los genotipos OE y KD respecto al control. En todos los casos se utilizó el test *One way ANOVA* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

La ruta de señalización PI3K/PTEN/AKT controla muchos aspectos claves en el organismo, entre ellos, participa en metabolismo y en la ruta de la insulina. Cuando la insulina llega su receptor se desencadena una cascada de activación donde la proteína AKT juega un papel esencial como modulador de la ruta. Por ello, quisimos medir por *Western blot* (WB) el estado de la proteína AKT en extractos proteicos de cabezas de mosca, ya que es el origen de la señal y un tejido mayoritariamente nervioso. Para ello medimos los niveles de AKT total y los niveles de AKT fosforilado (p-AKT) (Fig. R18A), además, realizamos el ratio p-AKT/AKT total (Fig. R18B). En primer lugar, mostramos una tendencia al alza de AKT total cuando sobreexpresamos *Gdap1* (Fig. R18A). Por el contrario, observamos una drástica bajada de los niveles de p-AKT en las moscas KD, en este caso no se observaron cambios en las moscas de OE (Fig. R18A). Por último, el ratio p-AKT/AKT total nos dará una idea sobre el equilibrio entre los dos estados de la proteína, y por lo tanto será indicativo del estado de activación de la ruta. En este caso, podemos observar una reducción significativa del ratio p-AKT/AKT total para ambos genotipos (Fig. R18), que estaría indicando un posible déficit en la cascada de señalización y una atenuación en la actividad de la ruta de la insulina.

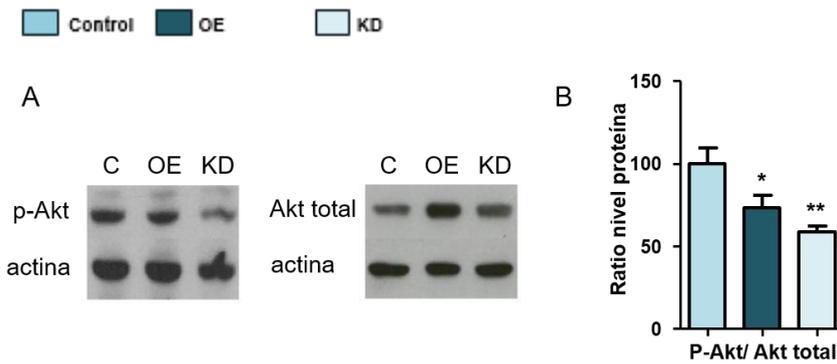


Fig. R18. Estudio de la ruta de la insulina por WB. (A) Se muestran los WB representativos para la forma fosforilada y Akt total en los tres genotipos. (B) Se muestra el ratio entre la proteína fosforilada y el Akt total. Para el análisis estadístico se compararon los genotipos OE y KD respecto al control. Se utilizó el test *One way ANOVA* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Estas características, menor proporción del ratio p-AKT/AKT total, la expresión aumentada de los transcritos de *Dilp's* y marcadores de supresión de insulina (*InR* y *4ebp*), y los diferentes cambios metabólicos mostrados a largo plazo, nos permiten pensar en un desajuste en la ruta de la insulina

3. Discusión

En este segundo capítulo, cabe destacar que hemos realizado el primer estudio metabolómico por RMN en *Drosophila* relacionado con una enfermedad neurodegenerativa. Además, hemos analizado 3 perfiles distintos, la fase acuosa y la fase orgánica por RMN, y lo hemos combinado con el HR-MAS que nos permite tener una información sobre los lípidos *in vivo*. Hemos conseguido identificar más de 60 metabolitos distintos y esto nos ha llevado a vislumbrar nuevas rutas moleculares que pueden ser relevantes para la enfermedad. Hasta la fecha, existen algunos estudios metabolómicos en *Drosophila*, tanto por RMN como por espectrometría de masas, pero en todos los casos abordan los cambios metabólicos relacionados con la edad, sexo o dieta (Hoffman et al., 2014); otros casos estudian la respuesta metabólica tras diferentes tipos de estrés (Kostal et al., 2011) y otros trabajos intentan discernir metabolitos discriminantes entre cepas de moscas que viven más respecto otras que viven menos (Sarup et al., 2012). En todos estos casos no existe ninguna manipulación genética, en nuestro caso, tenemos un modelo de sobreexpresión y silenciamiento para intentar mimetizar algunos aspectos de la enfermedad de CMT relacionada con *GDAP1*. En este capítulo mostramos como los niveles de *Gdap1* comprometen la viabilidad de las moscas, tanto las moscas OE como KD reducen la esperanza de vida de las moscas aunque hay que tener en cuenta un aspecto. Los pacientes con CMT causado por mutaciones en *GDAP1* no presentan una disminución en la esperanza de vida, pero el hecho de sobreexpresar o silenciar de manera ubicua en mosca, significa que también estamos observando el resultado de alterar los niveles de *Gdap1* en músculo

y abdomen, y no solo en el sistema nervioso como ocurre en los pacientes. Además, hemos mostrado que *Gdap1* se expresa de una manera muy fuerte en los órganos del abdomen, dicho tejido se ha demostrado que influye de una manera importante en la longevidad en *Drosophila*, además regulada por FOXO (Hwangbo et al., 2004). También hemos visto un claro fenotipo neuromuscular, gracias al experimento de la geotaxis negativa (vídeo S1), que correlaciona con los defectos neuromusculares observados en pacientes. En cuanto a efectos fisiológicos generales provocados por los niveles de *Gdap1*, apreciamos una pérdida de peso a largo plazo en ambos genotipos (Fig.R9C), esto se puede explicar por la pérdida de masa muscular y lípidos mostrada en ambos genotipos cuando analizamos los espectros por RMN y HR-MAS.

Es importante destacar que en nuestro estudio solo hemos podido generar modelos (OPLS-DA y S-Plot), que permiten diferenciar los 3 genotipos, desde un punto de vista metabólico, en moscas de 5 de semanas de edad. Esto nos indicaría que hay un fallo temprano en la ruta de la insulina que se manifiesta a largo plazo en la descompensación metabólica observada en moscas de 5 semanas de vida. En este estudio hemos conseguido separar los dos genotipos de estudio, OE y KD, frente a las moscas control, pero además también somos capaces de separar las moscas de OE frente a las KD. Esto nos indica que los niveles de *Gdap1*, en una dirección u otra, afectan de manera diferencial en el metaboloma general del animal, otra cuestión es que compartan algunas rutas moleculares como comentaremos más adelante.

En nuestros modelos encontramos una desregulación de los carbohidratos, un claro paralelismo con el gen *MFN2*, que también es un gen CMT (Zuchner et al., 2004). Los estudios en ratones KO de *Mfn2* muestran

defectos en la dinámica mitocondrial y en el contacto RE-mitocondria (Schneeberger et al., 2013), además de su importancia en la señalización de la ruta de la insulina y el metabolismo de los carbohidratos (Sebastian et al., 2012). Dos genes con funciones opuestas sobre la morfología mitocondrial conllevan una misma enfermedad, y estarían causando un desajuste similar en los carbohidratos. Y no son los únicos casos que parecen unir neuropatía y resistencia a la insulina, también se han reportado casos en pacientes de CMT1A donde dicha neuropatía y la diabetes coexisten (Ren et al., 2013). Además, la diabetes también se ha relacionado con neuropatías del sistema nervioso central como la enfermedad de Alzheimer (Rosales-Corral et al., 2015). La enfermedad de Lafora es otra enfermedad rara en la que se ha demostrado la conexión entre el metabolismo de los carbohidratos y la neurodegeneración (Gentry et al., 2007). Todos estos ejemplos, nos invitan a pensar que un desajuste energético puede conllevar una pérdida neuronal.

Podríamos pensar que los defectos metabólicos son causa secundaria debido al efecto primario provocado por los genes mutados, que no tienen estrictamente función metabólica, pero cuyo desenlace final es la convivencia entre la neurodegeneración y el desajuste metabólico. Pero no solo eso, hay casos donde los genes mutados sí tienen función metabólica más estricta y provocan una enfermedad neurodegenerativa como es CMT. Es el caso de la mutación en el gen *PKnox1* como causante de la enfermedad de CMT asociada al cromosoma X. Dicha mutación provoca una ganancia de función tóxica porque se produce una hiperfosforilación del PDC (Kennerson et al., 2013). Además, la proteína PDK es la que proponemos nosotros como interruptor en el cambio metabólico acontecido en nuestro modelo. Por otra parte, también se ha relacionado la enfermedad de CMT con mutaciones en

el gen *hexokinasa*, cuya función está relacionada con la glucólisis (Hantke et al., 2009).

Como vemos, hay pruebas crecientes de alteraciones metabólicas en las enfermedades neurodegenerativas, un cambio metabólico similar a nuestro modelo de *Gdap1* se ha descrito en un modelo de ratón de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), otra enfermedad que afecta a las motoneuronas. Dichos cambios conllevan una glucólisis reducida, el aumento de la lipólisis y la regulación transcripcional al alza de la PDK como interruptor para el cambio metabólico (Palamiuc et al., 2015). Además, la PDK se ha propuesto como regulador metabólico para diversas neuropatologías y se ha planteado como una posible diana terapéutica para el tratamiento o prevención de algunas enfermedades (Jha et al., 2016).

Parece que la acumulación de carbohidratos y la respuesta transcripcional observada a nivel de PDC provocan un cambio en la elección del combustible energético, observamos una bajada general de los lípidos acompañada de una respuesta transcripcional a favor de la lipólisis, esto provocaría el uso de los lípidos, en detrimento de los carbohidratos, como sustrato energético. Otro resultado que apoya esta teoría son los niveles de ATP aumentados y el ratio NADH/NAD⁺, medido de forma indirecta como ratio piruvato/lactato (Sun et al., 2012). Esto se basa en el concepto de que la obtención de energía a través de la lipólisis es mucho más energética que la ruta a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs.

Relacionado directamente con *GDAP1*, no hay líneas trazadas que demuestren una convivencia entre la neuropatía y defectos de los carbohidratos y/o la ruta de la insulina. Podemos citar un modelo KO murino de *GDAP1* donde se observan alteraciones en los niveles proteicos relacionado con metabolismo, pero no profundiza en dichos cambios

(Barneo-Munoz et al., 2015). Y recientemente, un estudio proteómico en células de insulinoma, detectó una correlación positiva entre la expresión de *GDAP1* y la eficiencia en la secreción de insulina (Pepaj et al., 2015). Todos estos resultados indican una posible relación entre neurodegeneración y metabolismo, también por alteraciones en *Gdap1*.

En nuestros resultados, mostramos una respuesta transcripcional en los *Dilp's*, siendo muy marcada para el *Dilp6*. La expresión de dicho péptido se ha visto incrementada en moscas con sobreexpresión de FOXO dirigida en la cabeza (Bai et al., 2012), esto seguiría en la línea de nuestra hipótesis sobre la desregulación de la ruta de la insulina y la acción de FOXO que estaría activando la transcripción de sus genes diana. Se ha mostrado la subida de los niveles de transcritos para dos marcadores de supresión de la ruta de la insulina (*InR* y *4ebp*), los cuales están controlados por FOXO también (Puig et al., 2003). Además, se ha visto un aumento en otros transcritos controlados por FOXO como son la *PDK* y *PEPCK* (Jeong et al., 2012).

A favor de esta hipótesis, mostramos que los niveles proteicos de una proteína central en la regulación del metabolismo, AKT, está alterada en ambos genotipos. AKT es la encargada de fosforilar a FOXO y retenerlo en el citoplasma para su degradación, si esto no ocurre, FOXO migraría al núcleo y activaría la transcripción de los genes comentados entre otros. En ambos genotipos mostramos una reducción del ratio p-AKT/AKT, esto nos indica que efectivamente tenemos un déficit de señalización en la ruta que desencadenaría los efectos observados. Cabe decir que los ratios disminuidos para ambos genotipos ocurren por diferentes causas, en el caso de la OE observamos mayores niveles de AKT total y de p-AKT respecto al control. En cambio, el KD no presenta diferencias en los niveles de AKT total, pero sí vemos una bajada significativa en los niveles de p-AKT frente al

control. Esto nos indica de nuevo que ambos genotipos tienen un final similar pero los mecanismos moleculares subyacentes son distintos y deben ser estudiados con más profundidad.

En resumen, dos situaciones distintas, sobreexpresión y silenciamiento, provocan de manera temprana, dos alteraciones opuestas en el contacto RE-mitocondria, más contacto y menos respectivamente. Esto dispararía una alteración en el metabolismo a largo plazo, pudiendo separar los perfiles de sobreexpresión y silenciamiento metabólicamente, pero presentando la ruta de la insulina como ruta común y de interés, que podría tener un papel importante en la enfermedad de CMT causada por mutaciones en el gen *GDAP1*.

Nuestros resultados sugieren una cadena de acontecimientos que vinculan la dinámica mitocondrial con la señalización de la insulina conectada al metabolismo energético, que puede contribuir a los mecanismos de la enfermedad causada por mutaciones en *GDAP1* y otros genes implicados en la dinámica mitocondrial y la neurodegeneración.

CAPÍTULO III:

LA RUTA DE LA INSULINA, NUEVA RUTA MOLECULAR PARA EL ESTUDIO DE CMT CAUSADO POR MUTACIONES EN *GDAP1*

1. Introducción

La ruta de la insulina es una vía de señalización de vital importancia, ya que participa en múltiples procesos como proliferación, longevidad y metabolismo (Wang et al., 2013; Zhang and Liu, 2014), entre otros. Además, la ruta de la insulina está conservada las especies animales (Gráfico 1), y esto es otra muestra del papel central y vital que ocupa. Dos son las principales rutas de transducción activadas por la acción de la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas). Nosotros nos vamos a centrar en la primera (Gráfico 1), por su relación más directa con el metabolismo.

Drosophila melanogaster no posee insulina propiamente dicha como ocurre en los mamíferos, pero sí cuenta con unos péptidos que desempeñan la misma función y disparan la misma ruta de señalización (Gráfico 1), son los denominados Dilps de los que hablamos en el capítulo anterior. Además, tampoco tiene un órgano especializado como el páncreas, en este caso, los Dilps son producidos por unas células neurosecretoras localizadas en la cabeza (Rulifson et al., 2002). A pesar de esta diferencia, existen multitud de similitudes por lo que se refiere a la ruta de la insulina y su relación con distintos procesos, entre las diferentes especies.

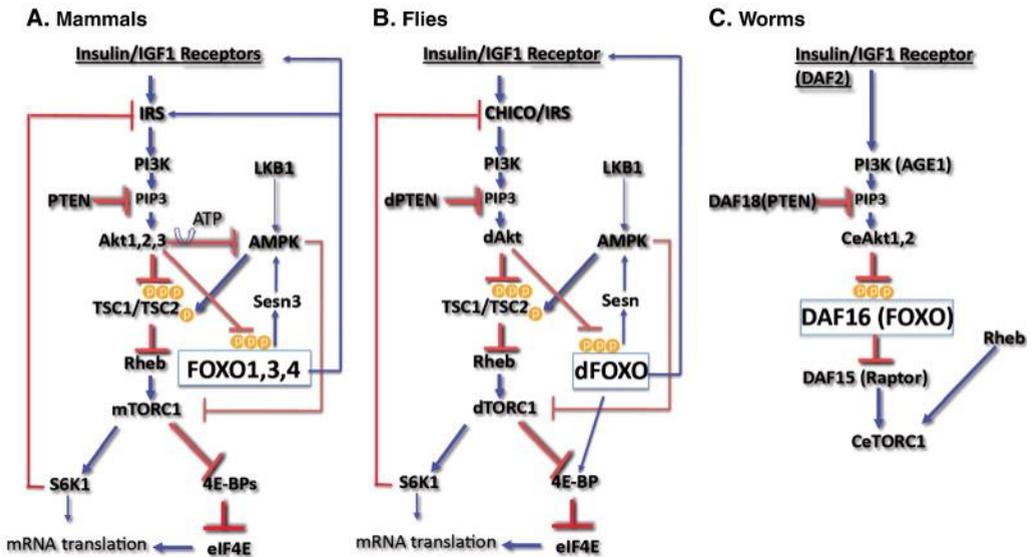


Gráfico 1. Se muestra un esquema resumido de las proteínas implicadas en la ruta de la insulina y cuya función es de nuestro interés. Una vez AKT es fosforilado se suceden una cascada de fosforilaciones en las distintas proteínas indicadas (Hay, 2011).

Por ejemplo, la atenuación de la ruta de la insulina en *Drosophila* y ratones, desencadena una regulación a la baja de la síntesis proteica, que a su vez podría estar relacionado con la longevidad (Essers et al., 2016). Igualmente, existe una conexión entre la ruta de la insulina y el metabolismo en *Drosophila* y ratones, dicha vía se ha relacionado con el metabolismo de los lípidos (Hong et al., 2016; Mei-Zhei et al., 2016) y el manejo de la glucosa (Marinho et al., 2015; Zhang et al., 2016). Además, se ha visto como las proteínas implicadas en la ruta de la insulina gobiernan procesos como la autofagia (Kang et al., 2016; Roberts and Miyamoto, 2015).

Vemos así, como la vía de la insulina se presenta como el núcleo de muchos procesos, aunque en nuestro caso, nos interesa su relación con el metabolismo.

En el capítulo anterior, revelamos la conexión entre *GDAP1*, metabolismo y la ruta de la insulina en nuestro modelo de *Drosophila melanogaster*. Hemos mostrado que los genotipos de OE y KD, presentan ciertos genes con unos niveles de transcritos aumentados respecto el control. Concretamente, nos referimos a los genes *PEPCK* (Fig. R14), *PDK* (Fig. R15) y *4EBP* y el *InR* (Fig. R17), y todos ellos son genes diana de FOXO (Jeong et al., 2012; Puig et al., 2003). También hemos observado que los genotipos OE y KD presentan unos niveles más bajos de AKT fosforilado respecto las moscas control.

Basándonos en la conservación de la ruta entre especies, y en nuestros resultados, pensamos que sería interesante profundizar en la vía de la insulina, y comprobar si puede ser una nueva ruta de estudio para la enfermedad de CMT. Para conseguir dicho propósito, decidimos emplear las células de mamífero SH-SY5Y, dichas células son humanas y de origen neural, se utilizan ampliamente para el estudio de enfermedades neurodegenerativas, y además ya se ha visto que son un buen modelo para el estudio de CMT causado por *GDAP1* (Pla-Martin et al., 2013). Por otra parte, las células nos aportan distintas ventajas sobre nuestro modelo, podremos estudiar el estado de un mayor número de proteínas, ya que la posibilidad de encontrar anticuerpos eficientes y fiables en *Drosophila* es complicado, mientras que en células hay un gran número de posibilidades.

Además, los estudios realizados en *Drosophila* son estudios estáticos, mientras que las células te permiten diseñar estudios más dinámicos. Las células pueden ser sometidas a distintos tratamientos y analizar la respuesta de estas, tras un período de tiempo de una manera más fiable.

Por ello, nuestra intención será trasladar los resultados obtenidos en *Drosophila* a células humanas en cultivo, y ampliar nuestro conocimiento, a

través del estudio de la ruta de la insulina y diferentes procesos relacionados con dicha vía de señalización. De esta manera podemos conocer qué procesos están alterados y buscar proteínas que podrían ser dianas potenciales para el tratamiento de la enfermedad.

2. Resultados

2.1. Aproximación para el estudio de la ruta de la insulina en células SH-SY5Y mutantes para GDAP1

Para el estudio de la relación entre GDAP1 y las posibles alteraciones en la ruta de la insulina, utilizamos 4 condiciones distintas. Las células control y 3 líneas con diferentes alteraciones sobre la proteína GDAP1, todas ellas generadas en el laboratorio del Prof. Axel Methner (<http://lab.methner.com/research.html>).

En primer lugar, utilizamos una línea celular que presenta la sobreexpresión de la proteína salvaje. Por otra parte, quisimos añadir dos líneas con la sobreexpresión para dos mutaciones de GDAP1. La primera de las mutaciones es la R310Q, se trata de una mutación clínica con un patrón de herencia recesiva (Azzedine et al., 2003). La otra mutación elegida es la S34A, este es un cambio en el dominio GST de la proteína GDAP1 que produciría la pérdida de función de dicho dominio (Shield et al., 2006). Además, presenta un fenotipo mitocondrial similar a una falta de función, ya que posee una red mitocondrial más elongada (datos no mostrados).

En la figura R19 se muestra la cuantificación mediante WB de los niveles de GDAP1 que expresa cada una de las líneas que se van a estudiar. En primer lugar, en las células SH-SY5Y sin transfectar, podemos observar la expresión endógena de GDAP1. Además, mostramos las células transfectadas con el vector vacío (EV), el mismo que se utilizó para sobreexpresar la proteína salvaje y las dos mutaciones, y donde solo observamos la misma banda perteneciente al GDAP1 endógeno. Las líneas

de sobreexpresión y las mutantes, también presentan una banda correspondiente a la expresión endógena de GDAP1 con niveles similares a las células control. Además, observamos una segunda banda de mayor peso molecular correspondiente a la sobreexpresión de la proteína GDAP1 salvaje y las dos mutantes en las líneas de estudio. Dicha banda es de un tamaño superior a la endógena porque estas proteínas están unidas a la etiqueta hemaglutinina (HA).

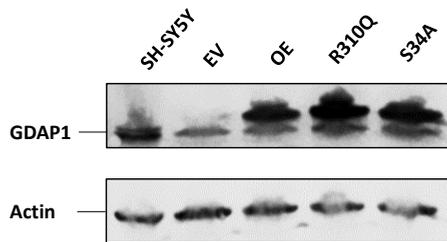


Fig. R19. Western blot representativo para la cuantificación de los niveles de GDAP1 en las diferentes líneas de estudio. (SH-SY5Y) Las células SH-SY5Y expresan la proteína GDAP1. (EV) Células con el vector vacío, el cual se utilizó posteriormente para generar las otras líneas. (OE, R310Q, S34A) Estas líneas presentan la sobreexpresión de la proteína salvaje, y dos mutaciones de GDAP1, R310Q y S34A, respectivamente.

2.2. La localización de la proteína FOXO está alterada en las líneas OE y las líneas mutantes

La activación de la ruta de la insulina provoca la inactivación de FOXO, impidiendo su traslocación al núcleo, y esto ocurre a través de su fosforilación mediada por AKT, un proceso conservado evolutivamente (Hay, 2011). Cuando este proceso no ocurre de manera adecuada, FOXO migra al núcleo para activar la transcripción de sus genes diana. Como hemos dicho anteriormente, observamos un aumento de los transcritos pertenecientes a genes controlados por FOXO, esto nos incita a pensar en una alteración de la localización de la proteína FOXO, y por este motivo, decidimos analizar su localización en nuestras líneas celulares de estudio. Para ello, utilizamos una construcción que permite expresar la proteína FOXO y visualizarla en verde, ya que está fusionada a GFP. Transfectamos las distintas líneas de estudio con dicha construcción y analizamos la fluorescencia por microscopía confocal.

Cuando miramos las células control, nos fue difícil observar fluorescencia en el núcleo, lo más reconocible era un patrón citoplasmático (Fig. R20A). En cambio, cuando miramos a la OE y las líneas mutantes, el patrón citoplasmático era más difuso y se observaba un núcleo con mayor intensidad de fluorescencia (Fig.R20B-D). Para cuantificar las posibles alteraciones, calculamos el ratio entre la intensidad de fluorescencia nuclear por la citoplasmática. Tras realizar dicho análisis, observamos un mayor ratio en las células con la sobreexpresión de la proteína GDAP1 salvaje, y también para los mutantes de GDAP1 (Figura R20B-E).

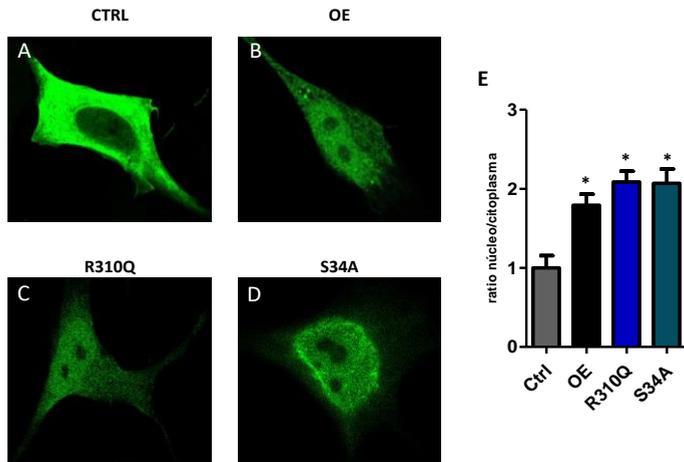


Fig. R20. La línea de OE y las mutantes de GDAP1 presentan una localización más nuclear de la proteína FOXO. Todas las imágenes fueron tomadas con la misma magnificación (63x). (A) Localización citoplasmática predominantemente en las células control. (B, C, D) Se observa un patrón citoplasmático más difuso y una mayor intensidad de verde en el núcleo. (E) Cuantificación del ratio núcleo/citoplasma para la intensidad de señal verde. Para el análisis estadístico se compararon los genotipos OE, R310Q y S34A respecto al control. Se utilizó el test *One way ANOVA* (* $p < 0,05$; ** $< 0,01$; *** $p < 0,001$).

Por lo tanto, tenemos una mayor localización de FOXO nuclear, tanto para la sobreexpresión de GDAP1 salvaje como para las líneas con las mutaciones. Esto indicaría que GDAP1 es importante para un correcto balance en la localización de FOXO, además, este resultado podría ser una explicación a los elevados niveles de transcritos de dianas de FOXO observados en *Drosophila*.

Estos resultados nos sugieren que la ruta de la insulina puede sufrir una regulación a la baja, además, también hemos visto que los genotipos de OE y KD en *Drosophila*, presentan unos niveles de la proteína AKT fosforilada reducidos respecto a las moscas control (Fig. R18).

2.3. Las mutaciones en *GDAP1* alteran las proteínas relacionadas con la ruta de la insulina en condiciones basales

Como hemos dicho, la proteína AKT ocupa una posición central en la ruta de la insulina, y de su estado de activación dependen numerosas proteínas que se encuentran más abajo en la cascada de señalización. Además se encarga de la fosforilación de FOXO para evitar su traslocación al núcleo, lo que explicaría los cambios en la localización de FOXO (Fig. R20). Por tanto, decidimos determinar el estado de fosforilación de AKT.

Como podemos observar, todos los genotipos presentan unos niveles similares de AKT total respecto al control (Fig. R21A). En cambio, todos los genotipos presentan una disminución en los niveles de AKT fosforilado. En la figura se representa el ratio entre AKT fosforilado y AKT total viendo una disminución (Fig. R21A), esto indica una menor activación de dicha proteína y estaría en línea con nuestros resultados observados en *Drosophila*.

Es importante señalar que solo las mutaciones presentan una reducción significativa de los niveles de AKT fosforilado. Este resultado nos invita a pensar que posiblemente podemos encontrar otras proteínas, cuya activación depende directa o indirectamente de AKT, podrían estar alteradas también.

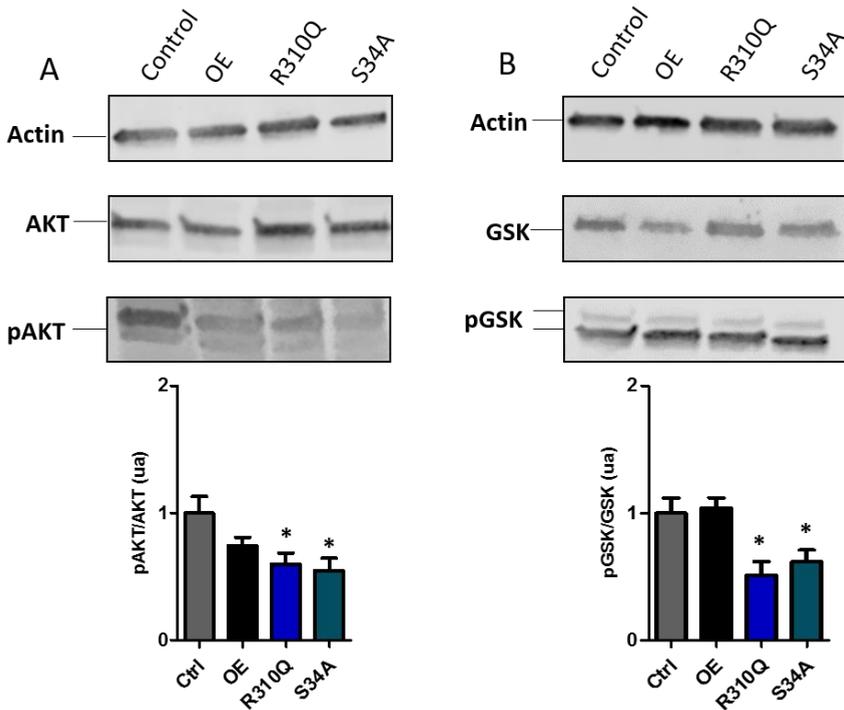


Fig. R21. Se muestra un western blot representativo y su cuantificación para el par de proteínas AKT y GSK3. (A) Los niveles de p-AKT y su ratio disminuyen en las líneas mutantes de GDAP1. (B) Las líneas mutantes de GDAP1 presentan unos niveles reducidos de la proteína GSK33 fosforilada. Para el análisis estadístico se compararon los genotipos OE, R310Q y S34A respecto al control. En todos los casos se utilizó el test *One way ANOVA* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

La proteína GSK33 se encarga de controlar la homeostasis en los niveles de glucógeno, y es fosforilada directamente por AKT. La línea OE no presentó cambios respecto el control, esto correlaciona con los niveles de AKT fosforilado, aunque fueron ligeramente más bajos, no era significativos. En cambio, las líneas mutantes presentaron unos niveles de GSK3 fosforilado reducidos respecto el control (Fig. R21B). Este resultado también estaría en línea con el anterior, menores niveles de AKT fosforilado desencadenan una

menor fosforilación de la proteína GSK3 en condiciones basales, ya que es una de sus dianas directas.

Al igual que la señalización entre AKT y FOXO están conservadas (Gráfico 1), también existe una alta conservación en los dos complejos mTOR existentes (mTORC1 y mTORC2). En nuestro caso, estudiaremos el estado de fosforilación de mTORC1, ya que AKT regula su actividad a través de la fosforilación del complejo TSC1-TSC2, que queda inactivo y permite la activación de mTORC1 (Huang and Manning, 2009).

Como se aprecia en la Figura R22A, los niveles de mTORC1 fosforilado se encuentran elevados en ambos mutantes, pero no para la OE. De nuevo mostramos el ratio, para tener una idea del estado de activación, y podemos comprobar cómo ambos mutantes presentan unos niveles más elevados (Fig. R22A). Esto nos sugiere que ambos mutantes presentan una hiperactivación de mTORC1. Dos proteínas cuya actividad es dependiente de mTORC1 son 4EBP y S6, ambas disparan la síntesis proteica cuando se encuentran en un estado más fosforilado. Cuantificamos los niveles de 4EBP (S6 más adelante), si comparamos los niveles de fosforilación respecto al total, tenemos la misma tendencia que para mTORC1, ambos mutantes presentan unos niveles más elevados del ratio para la proteína 4EBP (Fig. R22B), aunque las diferencias no fueron significativas.

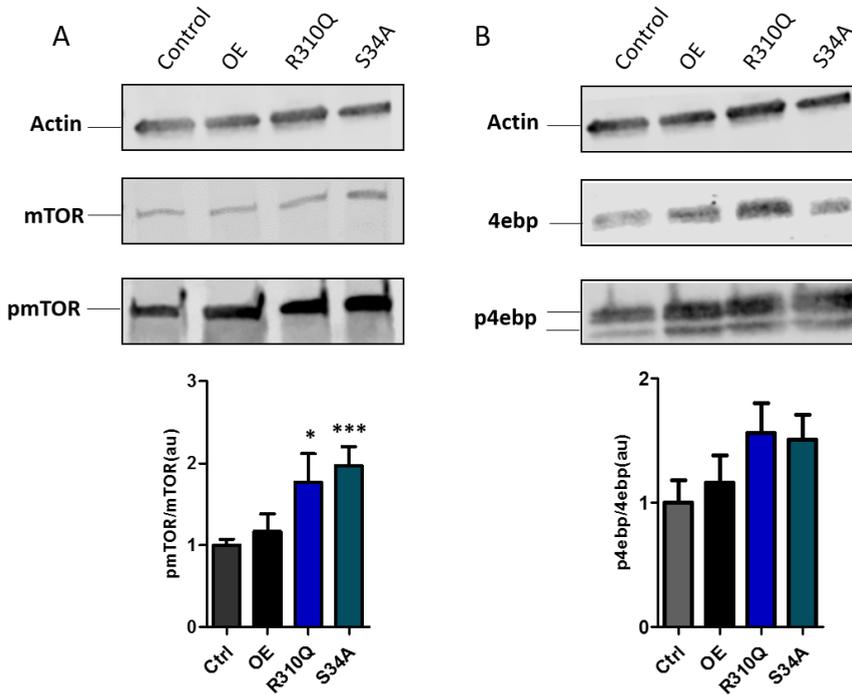


Fig. R22. Se muestra un western blot representativo y su cuantificación para el par de proteínas mTORC1 y 4EBP. (A) Los mutantes de GDAP1 presentan una hiperactivación de la proteína mTORC1. (B) Los niveles de 4EBP fosforilados están aumentados en las líneas celulares que sobreexpresan las mutaciones de GDAP1. Para el análisis estadístico se compararon los genotipos OE, R310Q y S34A respecto al control. En todos los casos se utilizó el test *One way ANOVA* (* $p < 0,05$; ** $< 0,01$; *** $p < 0,001$).

En resumen, las líneas mutantes presentan una reducción en los niveles de fosforilación de proteínas relacionadas con la ruta de la inulina (en condiciones basales). Esto se traduce en varias alteraciones, disminución en los niveles de fosforilación de la proteína AKT, respecto al control. Esta menor activación tiene sentido por los niveles de GSK3 fosforilado reducidos, ya que GSK3 es una proteína *aguas abajo* de AKT. Por otra parte, dicha atenuación correlaciona con una mayor fosforilación de mTORC1, que podría indicar un aumento en la síntesis proteica. A su vez, mTORC1 podría

aumentar los niveles de fosforilación de las proteínas *aguas abajo*, en este caso, 4EBP y S6. Como hemos podido observar, la proteína 4EBP tiene unos niveles de fosforilación superiores a las células control, correlacionando positivamente con nuestro supuesto.

2.4. La proteína AKT no responde al tratamiento con insulina en las líneas mutantes de *GDAP1*

Tras observar defectos en la señalización de la ruta de la insulina, en condiciones basales, decidimos explorar si nuestras líneas de estudio son capaces de responder al tratamiento con insulina. Para un correcto estudio de la ruta de la insulina siempre es recomendable someter las células a privación de nutrientes, antes del tratamiento con insulina, por distintos motivos. Primero, porque es una manera de hacer las células más sensibles al posterior tratamiento con insulina (Corasaniti et al., 2007), y segundo, porque se consigue la sincronización del ciclo celular (Allodi et al., 2012).

Para ello, las células fueron sometidas a privación de nutrientes (-) durante 6 horas, y a continuación, se incubaron 30 minutos con insulina (+). La normalización se realizó dentro de cada genotipo respecto a los niveles de fosforilación tras privación de nutrientes. Por este motivo, todos los genotipos parten del valor 1, y así, podremos analizar la respuesta de cada línea tras el tratamiento con insulina.

Empezamos estudiando la respuesta de la proteína AKT, si nos centramos en las células control, observamos una subida significativa tras el tratamiento con insulina (Fig.R23), una respuesta esperada tal como se ha visto en trabajos anteriores (Corasaniti et al., 2007; Liu et al., 2013). Las líneas que presentan la sobreexpresión de la proteína salvaje, mostraron el mismo

comportamiento respecto el control, más activación con el tratamiento de la insulina, eso sí, de una manera más atenuada (Fig.R23). En cambio, las líneas mutantes no presentan ningún tipo de respuesta ante el tratamiento con insulina, mostrando niveles similares a las propias células tras deprivación de nutrientes (Fig.R23).

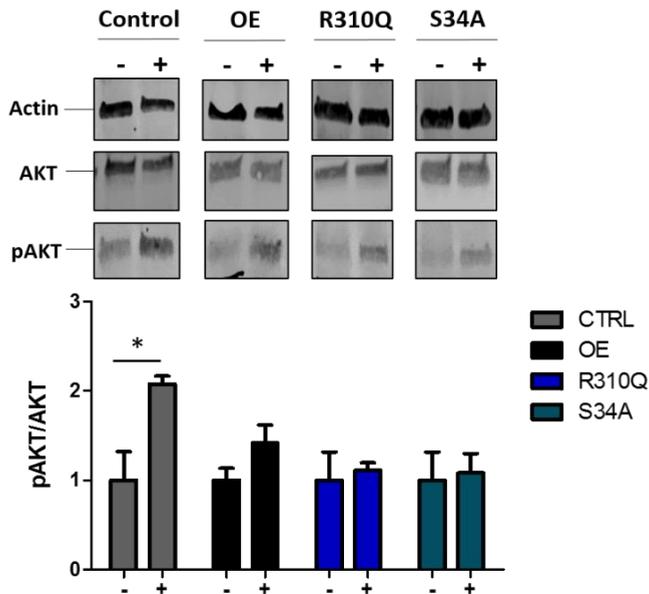


Fig.R23.Respuesta de la proteína AKT después del tratamiento con insulina. Deprivación de nutrientes(-), tratamiento con insulina (+). La deprivación de nutrientes siempre fueron 6 horas y la incubación con insulina 30 minutos. Para el análisis estadístico se compararon los genotipos Control, OE, R310Q y S34A ,tratados con insulina, respecto a las células tras deprivación de nutrientes, dentro de su mismo genotipo. En todos los casos se utilizó el test-t (*p<0,05; **<0,01; ***p<0,001).

También quisimos estudiar el comportamiento de la proteína GSK3 tras el tratamiento con insulina. Al igual que la proteína AKT, las células control experimentan una subida significativa de los niveles de fosforilación tras el tratamiento con insulina. Esto también pone de manifiesto, que los niveles de GSK3 fosforilado, son dependientes de AKT en condiciones

basales, presentando ambas proteínas un perfil de respuesta similar en las células control (Fig.R24).

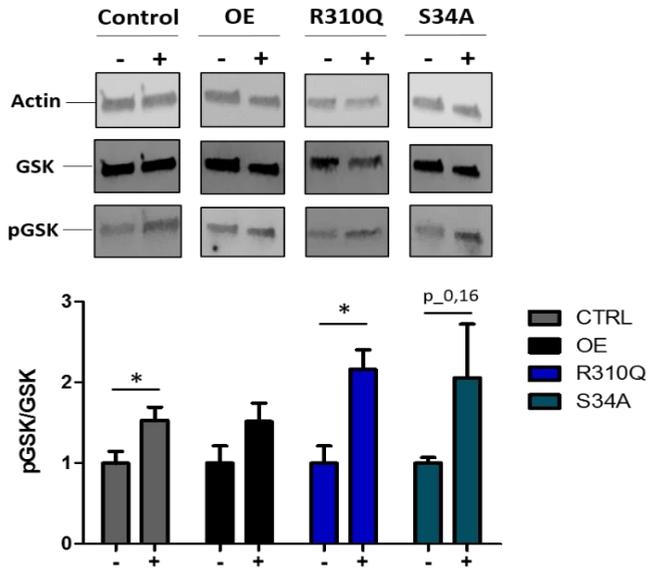


Fig. R24. Respuesta de la proteína GSK3 después del tratamiento con insulina. Deprivación de nutrientes (-) y tratamiento con insulina (+). La deprivación de nutrientes siempre fueron 6 horas y la incubación con insulina 30 minutos. Para el análisis estadístico se compararon los genotipos Control, OE, R310Q y S34A, tratados con insulina, respecto a las células tras deprivación de nutrientes, dentro de su mismo genotipo. En todos los casos se utilizó el test-t (*p<0,05; **<0,01; ***p<0,001).

Cuando nos fijamos en las células OE, mostraron un perfil de respuesta similar al control, indicando una respuesta normal tras el tratamiento con insulina (Fig.R24). Y más sorprendente, las líneas mutantes también responden al tratamiento con insulina, incrementando los niveles de GSK3 fosforilado (Fig.R24), a pesar de que el estado de fosforilación de AKT no varía.

Por tanto, la línea OE, es capaz de responder tras el tratamiento con insulina de una manera más atenuada que las células control (al menos para la proteína AKT); mientras que los mutantes no responden al tratamiento con

insulina por lo que se refiere a la proteína AKT, en cambio, sí que responden por lo que se refiere al aumento en los niveles de fosforilación de la proteína GSK3. Como hemos comentado, la fosforilación de GSK3 es dependiente de AKT, pero hay otras alternativas que discutimos más adelante.

A continuación, decidimos estudiar el perfil de respuesta para la proteína mTORC1. Si nos fijamos en las células control, observamos un aumento en los niveles de activación de mTOR después de tratar las células con insulina (Fig.R25), como ya se ha descrito en otros trabajos (Liu et al., 2013). Por lo que se refiere a las células OE, podemos observar la misma tendencia después del tratamiento con insulina, aunque no es estadísticamente significativo (Fig.R25). Si nos fijamos en los mutantes, también experimentan la misma respuesta que las células control cuando se les somete al tratamiento de insulina (Fig.R25). En resumen, todas las líneas aumentan los niveles de mTORC1 fosforilado cuando se les somete a la insulina, aunque el cambio en la línea OE y las líneas mutantes no es estadísticamente significativo.

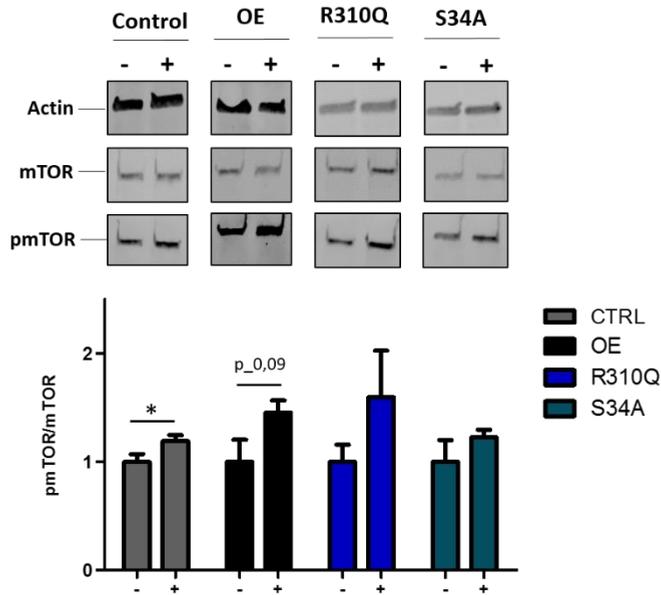


Fig. R25. Respuesta de la proteína mTOR tras el tratamiento con insulina. Deprivación de nutrientes (-) y tratamiento con insulina (+). La deprivación de nutrientes siempre fueron 6 horas y la incubación con insulina 30 minutos. Para el análisis estadístico se compararon los genotipos Control, OE, R310Q y S34A ,tratados con insulina, respecto a las células tras deprivación de nutrientes, dentro de su mismo genotipo. En todos los casos se utilizó el test-t (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

En el estudio de la ruta de la insulina en condiciones basales, estudiamos la proteína 4EBP como indicador de una mayor síntesis proteica, *aguas abajo* de la proteína mTORC1. En este caso, decidimos estudiar la proteína ribosomal S6, componente de la subunidad 40S del ribosoma, implicado en la regulación de la traducción y cuya activación también es dependiente de mTORC1 (Showkat et al., 2014). En la figura R26, se puede observar que las células control experimentan una subida cuando las tratamos con insulina, como se ha visto en otros trabajos (Stefanovic et al., 1986).

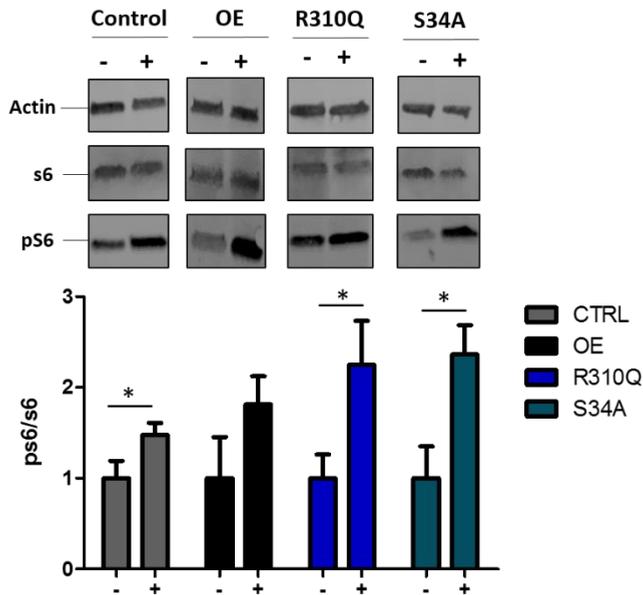


Fig. R26. Respuesta de la proteína S6 tras el tratamiento con insulina. Deprivación de nutrientes (-) y tratamiento con insulina (+). La deprivación de nutrientes siempre fueron 6 horas y la incubación con insulina 30 minutos. Para el análisis estadístico se compararon los genotipos Control, OE, R310Q y S34A ,tratados con insulina, respecto a las células tras deprivación de nutrientes, dentro de su mismo genotipo. En todos los casos se utilizó el test-t (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Además, podemos ver como la OE y las dos líneas mutantes presentan el mismo comportamiento respecto al control, respondiendo de la misma manera tras el tratamiento de insulina (Fig. R26). Lo más destacado en este apartado es que las líneas mutantes y la OE parecen tener una mayor fosforilación de S6, respecto el *shift* de las células control, cuando se realiza el tratamiento con insulina, aunque no es estadísticamente significativo.

En resumen, tanto las líneas que sobreexpresan la proteína GDAP1 salvaje como las que expresan las formas mutantes, responden al tratamiento con insulina en relación a las proteínas mTORC1 y S6. Esto nos hace pensar en una posible vía de activación de manera independiente de AKT cuando las sometemos al tratamiento con insulina, como se ha visto en otros trabajos (Yecies et al., 2011).

2.5. Las líneas mutantes de GDAP1 no son capaces de captar más glucosa tras el tratamiento con insulina

La respuesta de las diferentes líneas nos muestran un bloqueo por lo que se refiere a la fosforilación de la proteína AKT en las líneas mutantes. Por ello, quisimos explorar alguna función que requiera, de manera directa, la activación de AKT, y así confirmar dicho resultado. La traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática es crucial para el correcto transporte de la glucosa dentro de la célula, y además, dicha traslocación es dependiente, exclusivamente, de AKT (Benomar et al., 2006).

Decidimos realizar un ensayo que nos permita conocer la capacidad de nuestras células sobre la captación de glucosa. De esta manera, tenemos células que no reciben ningún tratamiento (-), y otras que se incuban 30 minutos con insulina (+), en el medio habitual. Tras dicha incubación, las células fueron lavadas y se les añadió nuevo medio sin glucosa, esto nos permite estar seguros que las células solo van a captar el análogo de la glucosa que utilizaremos. El análogo de la glucosa utilizado fue el 2-NDBG, se trata de un compuesto que emite fluorescencia cuando es captado por la célula, si cuantificamos la fluorescencia emitida por cada línea celular tendremos una medida de la capacidad para la captación de glucosa.

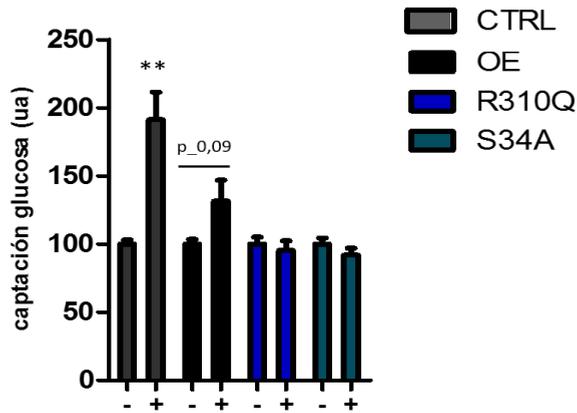


Fig. R27. Ensayo para medir la capacidad de las células para captar glucosa. Se muestra un incremento en las células control tras el tratamiento con insulina. La sobreexpresión presenta una respuesta reducida. Las líneas mutantes no son capaces de responder al tratamiento con insulina, y por ello no observamos un incremento en la captación de glucosa. Para el análisis estadístico se compararon los genotipos Control, OE, R310Q y S34A, tratados con insulina, respecto a las células sin ningún tratamiento, dentro de su mismo genotipo. En todos los casos se utilizó el test-t (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Como se puede observar, las células control captan más glucosa cuando se les somete al tratamiento con insulina (Fig. R27). Por lo que se refiere a la OE, observamos que las células también son capaces de captar glucosa pero de una manera menos eficiente (Fig. R27). Por último, los mutantes no son capaces de aumentar su captación de glucosa tras haber sido tratados con insulina (Fig. R27), confirmando que las líneas mutantes no responden al tratamiento con insulina.

3. Discusión

En el último capítulo, hemos trasladado nuestros resultados en *Drosophila* a líneas celulares de origen humano, confirmamos nuestra hipótesis y hemos profundizado en el estudio de la ruta de la insulina. Las líneas utilizadas son de origen neural, y estudiamos los posibles efectos de la sobreexpresión de la proteína salvaje de GDAP1 y otras dos mutaciones (R310Q y S34A).

En condiciones basales, demostramos que la sobreexpresión de la proteína salvaje no ocasiona cambios significativos en los niveles fosforilados de la proteínas AKT. En cambio, la sobreexpresión de las proteínas mutadas, R310Q y S34A, provocan una reducción significativa de los niveles de fosforilación de la proteína AKT. Esta reducción significativa de la proteína AKT, correlaciona con la mayor fosforilación en mTORC1 y la proteína 4EBP. Esta combinación de sucesos, menos AKT y una mayor fosforilación de mTORC1, han sido relacionadas con procesos neurodegenerativos, ya que mTORC1 hiperactivado provoca una reducción de la autofagia y un aumento de la síntesis proteica que podría ser tóxico (Kassai et al., 2014).

Por otra parte, observamos una reducción de la proteína GSK3 fosforilada, dicha proteína ha sido relacionada con procesos neuronales como la transmisión sináptica (Ochs et al., 2015), correlacionando con los problemas sinápticos que observamos en el primer capítulo en nuestro modelo de *Drosophila* (Fig. R5). Además, la proteína GSK3 es de vital importancia para el control de la síntesis del glucógeno, y una desregulación podría provocar una acumulación de glucógeno, una característica de algunas enfermedades raras como la enfermedad de Lafora (Tagliabracci et

al., 2008). De nuevo podemos establecer otra conexión con nuestro modelo en *Drosophila*, ya que mostramos una acumulación de glucógeno en las moscas KD (Fig. R14).

AKT y mTORC1 están íntimamente relacionados con la proteína FOXO (Hay, 2011). La relación más directa es entre AKT y FOXO, ya que en condiciones normales, AKT fosforila a FOXO para evitar su traslocación al núcleo. Como tuvimos una reducción de AKT fosforilado, quisimos saber si la localización de FOXO estaba alterada, comprobando que efectivamente FOXO presenta una localización más nuclear. Esto se traduce en una atenuación de la ruta de la insulina, provocando la activación de muchas dianas transcripcionales, un factor que podría contribuir al proceso neurodegenerativo.

Para profundizar más en la vía de la insulina, estudiamos la respuesta de las proteínas relacionadas con la ruta tras 30 minutos de tratamiento con insulina. En relación a la proteína mTORC1, hemos observado que todos los genotipos son capaces de incrementar los niveles de fosforilación de dicha proteína tras el tratamiento con insulina. Además, estos resultados están en línea con la respuesta por parte de la proteína S6, que también aumenta sus niveles de fosforilación tras el tratamiento con insulina en todas líneas celulares, observando un mayor incremento en las líneas mutantes. Estos resultados podrían indicar una hiperactivación de la rama mTORC1-p70S6k-pS6, que podría estar inhibiendo el receptor de insulina (Draznin, 2006), y por tanto contribuyendo a una mayor atenuación de la ruta.

Por lo que se refiere a la proteína AKT, observamos un incremento de los niveles de fosforilación en las líneas celulares control y la OE (en menor medida). En cambio, las líneas mutantes no responden a dicho tratamiento.

Sorprendentemente, los niveles fosforilados de la proteína GSK3 presentan el mismo patrón de respuesta en todas las líneas celulares. Esto podría parecer una incongruencia, ya que GSK3 es fosforilado por AKT, pero se ha visto en condiciones de estrés, que GSK3 puede ser fosforilado por S6k1 (quinasa de la proteína S6) (Zhang et al., 2006). Este razonamiento se apoya en los mayores niveles de S6 fosforilado tras el tratamiento con insulina, además, los perfiles de respuesta entre S6 y GSK3 son prácticamente idénticos. Esto indicaría un posible nexo entre ambas proteínas (Fig.R20, Fig.R22), y la activación de GSK3 de una manera independiente de AKT tras el tratamiento con insulina en las líneas mutantes (Zhang et al., 2006).

Confirmamos los defectos de las líneas mutantes para la proteína AKT sobre la respuesta a la insulina. Para ello, estudiamos la captación de glucosa, ya que dicho proceso es dependiente de AKT (Benomar et al., 2006). Medimos la diferencia de captación de glucosa en todas las líneas entre dos situaciones, sin tratamiento y con tratamiento a insulina. De esta manera vemos como las células control y la OE (en menor medida) son capaces de captar más glucosa tras el tratamiento con insulina. En cambio, las líneas mutantes no captan más, indicando una imposibilidad de respuesta ante el tratamiento con insulina.

En resumen, los resultados nos muestran un bloqueo de respuesta por parte de la proteína AKT tras el tratamiento con insulina, en las líneas mutantes. Esto abre una nueva vía de estudio para conectar *Gdap1* y AKT. En el capítulo II confirmamos que los niveles de *Gdap1* son importantes para los contactos mitocondria-RE en nuestro modelo de *Drosophila* (Fig.R16), al igual que se había demostrado en cultivo celular (Pla-Martin et al., 2013).

Se ha revelado que la formación de los contactos mitocondria-RE precisa de la comunión entre mTORC2 y AKT, y este complejo es crucial para

el control del metabolismo (Betza et al., 2013). Además, AKT se trasloca a la mitocondria tras el tratamiento con insulina en condiciones normales (Gautam and Richard, 2003), nosotros hemos visto un defecto en la respuesta de AKT tras el tratamiento con insulina (Fig.R23). Sería interesante realizar fraccionamiento celular y estudiar la traslocación de AKT a la mitocondria tras el tratamiento con insulina en nuestras líneas mutantes. Dicha traslocación es dependiente del potencial de membrana, parámetro alterado en las líneas mutantes (datos no mostrados).

También mostramos una desregulación de la PDC en el capítulo II en nuestro modelo de *Drosophila*. La proteína AKT controla el metabolismo oxidativo a través de la fosforilación de la PDC (Cerniglia et al., 2015). Por ello, todos los resultados apuntan a una posible conexión entre los contactos mitocondria-RE, GDAP1 y la proteína AKT, que convergen en el metabolismo como defecto común, y que podría contribuir a la enfermedad de CMT.

CONCLUSIONES

1. The *CG4623* gene (*Gdap1*) is the ortholog and functional homolog of the *GDAP1* and *GDAP1L1* genes because of its genomic location; expression pattern and effects on mitochondria. In addition, overexpression of human *GDAP1* is able to restore defects caused by *Gdap1* deficiency.

2. Altered levels of *Gdap1* in our OE and KD models, cause neuronal and autonomic muscular degeneration, and aberrant mitochondrial morphology. Overexpression of *Gdap1* triggers a more fragmented mitochondrial network and mitochondrial aggregation in the *Drosophila* retina in a peripheral position. In contrast, the KD model shows extremely elongated mitochondria, but in this case the mitochondria lose their peripheral location and migrate towards the rhabdomere. Furthermore, we observe defects at the level of synaptic transmission. All these alterations recapitulate the observed phenotype in CMT patients.

3. Alteration of *Gdap1* levels causes oxidative stress and changes in the metabolic profile of *Drosophila*. Altered *Gdap1* levels cause an overall increase in carbohydrates and a decrease in amino acids and lipids. Such alterations occur due to a metabolic shift in the use of energy substrates. The most obvious changes occur in the long term, since the most drastic defects are observed in aged flies.

4. *Gdap1* levels are important for a correct functioning of the insulin pathway in *Drosophila melanogaster*. Increased transcript levels from *Dilps* and target genes of FOXO (*InR*, *4ebp*, *PDK* and *PEPCK*), with reduced levels of the

phosphorylated AKT protein, are characteristic of an insulin resistance phenotype. These alterations are detectable in young flies and would be the cause of the metabolic defects observed in the long term.

5. Overexpression of GDAP1 mutations in mammalian cells causes an alteration for proteins related to the insulin pathway under basal conditions. In addition, cells with the GDAP1 mutations had specific blockade at the AKT protein level when they are treated with insulin. In contrast, other proteins are able to respond to such treatment, indicating that there are other additional activation pathways.

6. In general, overexpression of the wild-type protein in the cell lines, present a similar response to the control cells but in a more attenuated manner. The defects caused by GDAP1 mutations were much clear showing a blockage at the AKT protein level that leads to the inability to take glucose after insulin treatment.

1. El gen *CG4623 (Gdap1)* es el ortólogo y homólogo funcional de los genes *GDAP1* y *GDAP1L1* por su localización genómica; patrón de expresión y efectos sobre la mitocondria. Además, la sobreexpresión de *GDAP1* es capaz de restaurar los defectos provocados por el déficit de *Gdap1*.

2. Los niveles alterados de *Gdap1* en nuestros modelos OE y KD, causan degeneración neuronal y muscular autónoma, y morfología mitocondrial aberrante. La sobreexpresión de *Gdap1* desencadena una red mitocondrial más fragmentada y agregación mitocondrial en la retina de *Drosophila* en una posición periférica. En cambio, el modelo KD muestra mitocondrias extremadamente alargadas, pero en este caso las mitocondrias pierden su localización periférica y migran hacia el rabdómero. También observamos defectos morfológicos en la sinapsis. Todas estas alteraciones recapitulan el fenotipo observado en los pacientes CMT.

3. La alteración de los niveles de *Gdap1* causa estrés oxidativo y cambios en el perfil metabolómico de *Drosophila*. Los niveles de *Gdap1* alterados causan un incremento general de los carbohidratos y una disminución de aminoácidos y lípidos. Dichas alteraciones se producen debido a un *shift* metabólico en el uso de los sustratos energéticos. Los cambios metabólicos más evidentes se observan a largo plazo, ya que los defectos más drásticos se observan en moscas envejecidas.

4. Los niveles de *Gdap1* son importantes para un correcto funcionamiento de la ruta de la insulina en *Drosophila melanogaster*. El aumento de los niveles

de transcritos de los Dilps y genes diana de FOXO (InR, 4ebp, PDK y PEPCK), junto con los niveles reducidos de la proteína AKT fosforilada, son característicos de un fenotipo de resistencia a la insulina. Estas alteraciones son detectables en moscas jóvenes y serían la causa de los defectos metabólicos observados a largo plazo.

5. La sobreexpresión de mutaciones de GDAP1 en células de mamífero provoca una alteración en las proteínas relacionadas con la ruta de la insulina en condiciones basales. Además, las células con las mutaciones de GDAP1 presentaron un bloqueo específico a nivel de la proteína AKT cuando son tratadas con insulina. En cambio, otras proteínas sí responden a dicho tratamiento, indicando que hay otras vías de activación adicionales.

6. En general, la sobreexpresión de la proteína salvaje en las líneas celulares presenta una respuesta similar a las células control pero de manera más atenuada. Los defectos ocasionados por las mutaciones de GDAP1 fueron mucho más claros mostrando un bloqueo a nivel de proteína AKT que conlleva a la incapacidad de captar glucosa tras el tratamiento con insulina.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas de moscas, mantenimiento y generación de transgénicos

Todas las cepas se mantuvieron a 25°C, los tubos de las moscas experimentales se cambiaron cada 2-3 días. Los tubos contienen comida (levadura, harina de maíz y soja, azúcar y agar) para la supervivencia de las moscas.

En todos los experimentos se utilizó el sistema UAS/Gal4 (Brand and Perrimon, 1993). El sistema contiene dos partes: la cepa Gal4 presenta la proteína de levadura Gal4 expresada bajo un promotor específico de tejido. Por otro lado, disponemos de la cepa UAS que contiene el gen de interés justo después de lo que llamamos secuencias UAS, y que es la secuencia a la cual se une la proteína Gal4 para activar la expresión de nuestro gen de interés. De esta manera, cuando realizamos cruces entre una línea Gal4 y otra línea UAS, obtenemos la expresión del gen deseado y en el tejido que queremos (Fig. M1).

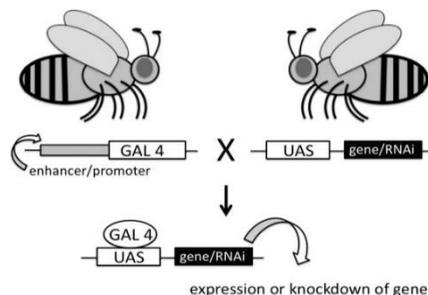


Figura M1. En la figura se esquematiza el funcionamiento del sistema UAS-Gal4, somos capaces de obtener la progenie con la expresión del gen de interés de manera específica de tejido.

A continuación se muestran las líneas de moscas utilizadas en este trabajo:

Abreviatura	Nombre	Origen	Descripción
OrR	Oregon	BDSC	Cepa salvaje
W¹¹¹⁸	white	BDSC	Cepa salvaje
If/CyO;MKRS/TM6B	Equilibrador múltiple	BDSC	Generación de cepas
Act-Gal4	Actina-Gal4	BDSC	Expresión ubicua
GMR-Gal4	Glass-multiple-reporter-Gal4	BDSC	Expresión células postmitóticas del ojo
Mhc-Gal4	Myosin heavy chain-Gal4	Departamento de Genética, UV	Expresión músculo
KD	UAS-RNAi Gdap1	VDRC	Silenciamiento de Gdap1
OE	UAS-Gdap1	Laboratorio Withworth	Sobreexpresión Gdap1
Gdap1-DsRed	Gdap1-DsRed	Generada en nuestro laboratorio	Expresión endógena de Gdap1 en rojo
UAS-CFP-hGDAP1	UAS-CFP-hGDAP1	Generada en nuestro laboratorio	Sobreexpresión GDAP1 humano marcado en cian
UAS-Mfn	UAS-mitofusin	Laboratorio Chung	Sobreexpresión Mfn

Tabla M1. Se muestran las diferentes cepas de moscas utilizadas a lo largo del trabajo. *Bloomington Drosophila Stock Center* (BDSC); *Vienna Drosophila Resource Center* (VDRC).

Para obtener moscas transgénicas se hicieron dos aproximaciones distintas. En un caso queríamos observar la expresión endógena de *Gdap1*, marcada en rojo, bajo el promotor de dicho gen, a esta cepa la llamaremos *Gdap1-DsRed*. En el otro caso queríamos sobreexpresar la proteína humana *GDAP1* de manera ectópica, a esta cepa la llamaremos *UAS-CFP-GDAP1*.

En el primer caso, se amplificó el gen endógeno de *Drosophila*, *Gdap1*, para ello necesitamos distintos cebadores (Anexo 3.1). Además, se añadió la etiqueta *DsRed* amplificada a partir del vector *PhStinger* con otro par de cebadores (Anexo 3.1).

En el segundo caso, se amplificó a partir del vector *pECFP-C1::hGDAP1* (Pedrola et al., 2005) y se subclonó en el vector de transformación *pUAST* para generar la línea de *Drosophila* *UAS-CFP-GDAP1*. Para ello se utilizaron dos cebadores (Anexo3.1)

Las construcciones generadas fueron enviadas a la empresa *BestGene Inc.* (Chino, California) para su microinyección en embriones de *D. melanogaster*. Se obtuvieron al menos 5 líneas para cada transgén. Dado que la inserción del transgén en el genoma de *D. melanogaster* es un proceso aleatorio, es preciso realizar cruces prueba para conocer la localización de la inserción, aprovechando estos cruces para balancear con un cromosoma balanceador.

En la Figura M2 se muestra el esquema de cruces seguidos para conocer la localización de la inserción.

Material y métodos

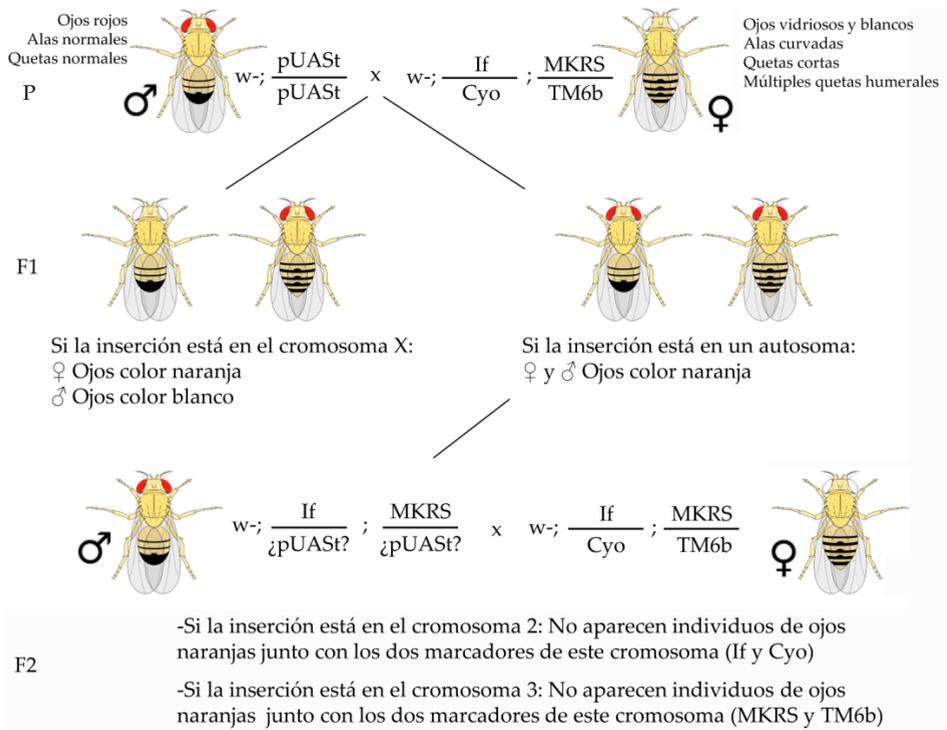


Figura M2. Se muestran los diferentes cruces que se realizaron para la caracterización de las cepas transgénicas. Los puntos y coma separan los diferentes cromosomas (en este caso el I, II y el III). Las siglas If, MKRS y TM6B son balanceadores/marcadores que nos sirven para seguir y mapear la inserción.

2. Vectores

Nombre	Origen	Descripción
pUASt	Dr. Ibo Galindo	Permite clonar secuencias de interés para su posterior sobreexpresión en moscas
PhStinger	Dr. Ibo Galindo	Se utilizó para amplificar la secuencia DsRed
pUAS-CFP-hGDAP1	Generado en nuestro laboratorio	Se utilizó para la obtención de la cepa transgénica para la sobreexpresión de GDAP1
FOXO-GFP	Addgene	Permite la sobreexpresión en líneas celulares de mamífero de la proteína FOXO marcado con GFP
pPB-CAG-Avi-HA-GDAP1-IRES-Venus	Laboratorio Prof. Axel Methner	Se utilizó para generar las líneas estables que sobreexpresan la proteína salvaje y las mutantes

Tabla M2. Vectores utilizados para la generación de las moscas transgénicas y las construcciones utilizadas para las células de mamífero.

3. Cepas bacterianas

Las bacterias utilizadas para llevar a cabo las diferentes clonaciones son las células DH5 α de choque térmico (Thermo Scientific), de Escherichia Coli. Todas las bacterias se han crecido en medio LB (10g/L triptona, 5g/L extracto de levadura, 5g/L NaCl) a 37°C en sólido o líquido con agitación y suplementado con ampicilina 50 μ g/ μ l o kanamicina 50 μ g/ μ l dependiendo de la resistencia que posea el plásmido. Las DH5 α se guardaron a -80°C y se extraían para su utilización inmediata.

Para introducir los plásmidos en las bacterias se transformaron por choque térmico. Se realizó dicho choque a 42°C durante 30 segundos y se crecieron, tras añadir 300 μ l de LB, durante 1 hora a 37°C en agitación. Finalmente, se plaquearon 150 μ l en la placa correspondiente para la obtención de colonias.

4. Líneas celulares inmortalizadas de mamíferos

En el trabajo se han utilizado las células de mamífero SH-SY5Y. Es una línea celular derivada de neuroblastoma procedente de la línea SK-N-SH. Dado su origen y sus características neurales se usa como modelo para el estudio de muchas patologías neurodegenerativas, además es susceptible a diferenciación. Las células SH-SY5Y se crecieron en medio *DMEM F-12* (suplementado con 10% de FBS, glutamina (1%), aminoácidos no esenciales (1%), penicilina y estreptomina (1%). La manipulación de cultivos celulares se realizó en la campana de flujo laminar y el crecimiento de los cultivos

celulares se llevó a cabo en un incubador humidificado con 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C.

Para los experimentos de privación de nutrientes se utilizaron las mismas concentraciones de todos los componentes, excepto el FBS que lo reducimos al 2%. Para los experimentos de captación de glucosa utilizamos medio sin glucosa, evitando así la interferencia de captación con el análogo de la glucosa.

A continuación se enumeran las diferentes líneas SH-SY5Y que se han utilizado en el trabajo:

Nombre	Origen	Descripción
EV	Prof. Axel Methner	<i>Empty vector</i> o células control, contienen el vector vacío que se ha utilizado para sobreexpresar las diferentes construcciones
OE	Prof. Axel Methner	Sobreexpresión de la proteína GDAP1 salvaje
R310Q	Prof. Axel Methner	Sobreexpresión de la proteína GDAP1 mutada con el cambio que se indica en el nombre
S34A	Prof. Axel Methner	Sobreexpresión de la proteína GDAP1 mutada con el cambio que se indica en el nombre

Tabla M3. Líneas celulares de mamífero utilizadas a lo largo del capítulo 3. Se indica el nombre abreviado utilizado; su origen y una breve descripción.

5. Microscopía.

5.1. Microscopía de campo claro, electrónica y de barrido

Para el estudio de los procesos neurodegenerativos, los ojos fueron diseccionados fijados con PFA al 2% y 2% GAD dos horas. Los tórax fueron también diseccionados y fijados con PFA 2%, GAD 2% en NaPO₄. Todas las muestras se post-fijaron en OsO₄ durante dos horas y se deshidrataron con una serie de etanol. Por último, las muestras fueron embebidas en resina epoxi. Para la microscopía de campo claro, se realizaron secciones de 1,5µm de grosor y se tiñeron con azul de toluidina, las imágenes fueron examinadas con un microscopio Leica DM6000. Para la microscopía electrónica se realizaron cortes de 80 nm de grosor y se tiñeron con acetato de uranilo. Las muestras fueron examinadas con el microscopio FEI Tecnai Espiritu G. Para la microscopía de barrido, las moscas se fijaron dos horas con PFA 4%, GAD 8% en PBS, se añadió Triton X-100, y se deshidrataron en una serie de etanol. A continuación, se procedió con el punto crítico de secado y sombreado en una mezcla de oro-paladio. Las imágenes fueron analizadas con el microscopio Hitachi S-4800.

5.2. Microscopía confocal

Para la microscopía confocal, los ojos y tórax se diseccionaron y se fijaron en PFA al 4% durante toda la noche a 4°C, se prosiguió con una incubación en sacarosa al 30% de 48 horas a 4°C. Luego se embeben en OCT y se preparan secciones con un criotomo Leica UC6. Las larvas se fijaron con PFA al 4%. Las larvas se prepararon directamente sobre un porta con medio de montaje especial *Polymount* (Polysciences, Inc). Las imágenes fueron analizadas con el microscopio Leica SP8 (Institut de Biomedicina de Valencia, CSIC).

Para el estudio de la localización de FOXO en cultivo celular se procedió de la con un protocolo distinto. Los cubreobjetos, 12 mm de diámetro, se colocaron en una placa de 24 pocillos. Para esterilizar los cubreobjetos se añadió etanol 100% y se mantuvo toda la noche en el incubador. El etanol se eliminó en el día siguiente y cada pocillo se lavó tres veces con PBS. Para la inmunotinción, las células se recogieron, se contaron con una cámara de recuento de células y se sembraron en los cubreobjetos estériles en una placa de 24 pocillos con un número de células de 75.000 células por pocillo. Para asegurar la adhesión celular, las células se fijaron con PFA al 4% al día siguiente. Después de 20 minutos con PFA a TA, las células se lavaron tres veces con PBS. Las células fijadas se pueden almacenar o se puede iniciar ya con la inmunofluorescencia. Inicialmente, las células se permeabilizaron con Triton X-100 (0,25%) en PBS durante 10 minutos a TA y de nuevo se lavaron tres veces con PBS. Para evitar cualquier marcaje no específico de los anticuerpos primarios, se añadió el bloqueador Roti (1x) durante 30 minutos, a temperatura ambiente, en un agitador. Después de retirar la solución de bloqueo, los anticuerpos primarios, que se diluyeron en 1x Roti-Block + 0,1%

de Triton X-100, se añadieron directamente a las células en un volumen total de 200 μl por pocillo y se incubó durante la noche a 4°C. Como control negativo, se añadió la solución Roti (0,1% de Tritón) a un pocillo, para detectar cualquier unión no específica de los anticuerpos secundarios. Para el análisis de la localización de FOXO, se realizó el ratio entre la intensidad de la fluorescencia nuclear dividido por la nuclear. El experimento se repitió 3 veces ($n=3$). Se contaron 20 células por experimento y se utilizó el programa ImageJ para la cuantificación.

6. Métodos moleculares

6.1. Extracción de ADN

La extracción de DNA plasmídico a partir de cultivos de *E. coli*, se realizó utilizando los kits de extracción *GeneJET Plasmid MiniPrep Kit*.

A continuación se detalla el protocolo seguido para la obtención de DNA genómico (gDNA) a partir de individuos adultos de *D. melanogaster*:

-Se utilizaron 15-30 individuos por replicado biológico, se transfirieron a un tubo de 1,5 mL y se congelaron a -80°C (poniendo en hielo seco) para su posterior extracción.

-Añadimos 200 μL del tampón de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM y SDS al 1%) y homogeneizamos mediante un homogeneizador de tejidos de tamaño acorde con los tubos de 1,5mL.

-Añadimos de nuevo 200 μL del tampón de lisis y continuamos la homogeneización hasta pulverizar todos los individuos.

-Incubamos 30 minutos a 65°C.

-Añadimos 800 μ L de solución LiCl/KAc (1 parte de Acetato de potasio 5 M y 2,5 partes de LiCl 6 M) e incubamos en hielo 10 minutos.

-Centrifugamos a 10000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA).

-Transferimos 1 mL del sobrenadante a un tubo nuevo, evitando coger los restos que permanecen flotando.

-Añadimos 600 μ L de isopropanol, mezclar bien y centrifugar a 10000 xg durante 15 min a TA.

-Eliminamos el sobrenadante y lavamos el precipitado con etanol al 70%.

-Centrifugamos 5 minutos, eliminamos el sobrenadante y dejamos secar el precipitado a TA con el tubo abierto.

-Resuspendemos el precipitado con 150 μ L de Tris 10 mM (pH 7).

6.2. Extracción de RNA

La obtención de RNA de células de mamífero en cultivo, se llevó acabo usando el *kit RNeasy Mini* (Qiagen) de acuerdo con el protocolo dado por la casa comercial.

Para la extracción de RNA de *Drosophila Melanogaster* se siguió el siguiente protocolo:

-Homogeneizamos 4-5 moscas por genotipo en 800 μ L de Trizol

-Incubamos el homogeneizado durante 5 minutos a TA.

-Añadimos 160 μ L de cloroformo, agitamos con fuerza durante 15 segundos e incubamos 3 minutos a TA.

-Centrifugamos a 12000 xg durante 15 min a 4°C.

-Transferimos la fase acuosa a un tubo nuevo y precipitar añadiendo 400 μ L de isopropanol.

-Incubamos 10 minutos a TA.

-Centrifugamos a 12000 xg durante 15 minutos a 4°C.

-Eliminamos sobrenadante y lavar el precipitado de RNA con 1 mL de etanol al 75 %.

-Centrifugamos durante 5 minutos.

-Eliminar el sobrenadante y dejamos secar el precipitado a TA con el tubo abierto.

-Resuspender el RNA con agua libre de RNasas. Incubar a 55°C (10 min) para favorecer la resuspensión.

6.3. Amplificación de los ácidos nucleicos

La amplificación de ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante PCR usando oligonucleótidos específicos. En todas las PCR se utilizó la enzima *Taq DNA polimerasa Phusion* de Thermo Scientific, de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial.

6.4. Clonaciones y subclonaciones

La obtención de los insertos de DNA para su clonación se realizó mediante amplificación por PCR para introducir los sitios de restricción. Se utilizó para ello la *Taq DNA polimerasa Phusion* de Thermo Scientific, y un programa de tiempos y temperaturas adecuados para la extensión y amplificación óptima de los fragmentos.

En el caso de las subclonaciones, siempre se hizo directamente mediante restricción y posterior ligación con la *T4 DNA ligasa* de Thermo Scientific, siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Para la preparación del vector y del inserto, los fragmentos de DNA amplificados por PCR y/o digeridos con la enzima de restricción correspondiente, se purificaron utilizando el *GeneJET Purification PCR kit*. En los casos que necesitamos aislar el fragmento de interés mediante electroforesis en gel de agarosa, se cortó la banda de interés y se purificó mediante el uso del *GeneJET Gel extraction kit*.

7. Análisis de expresión génica

A partir de RNA total de individuos adultos de *D. melanogaster*, se empleó el *kit SuperMix cDNA qScript* (Quanta Bioscience) para la obtención del cDNA, siempre partimos de 1µg de RNA y seguimos el protocolo dado por la casa comercial. Dicho cDNA se empleó como molde para el estudio de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa. En el Anexo 2 y Anexo 3 se muestran todos los cebadores empleados en los análisis de expresión génica de los capítulos 1 y 2 respectivamente.

Para las PCR cuantitativas se utilizaron sondas específicas de la biblioteca universal de Roche. Para las mediciones de los niveles se utilizó el

aparato “*Fast Real-Time PCR*” de Applied Biosystems 7900HT (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Los pares de cebadores y sondas se determinaron utilizando la herramienta de diseño de Roche (<https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?tab=Assay+Design+Center&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1>). Todas las muestras se analizaron por triplicado, y se calculó la expresión de acuerdo con el método 2DDCt. Los niveles de expresión se normalizaron en relación con la expresión de *Gapdh1* y *Rp49*.

8. Estrés oxidativo

8.1. Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se utilizó el método de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), utilizando placas de 96 pocillos. Se utilizó un tampón de lisis estándar (PBS1X con Triton al 1%) y seguimos los siguientes pasos:

- Homogenizamos 5 moscas en 50 μ l de tampón estándar

- Centrifugamos para eliminar el homogeneizado a 1000xg durante 5 minutos.

- Pipeteamos 10 μ l del lisado y los añadimos a 140 μ l de PBS conteniendo 5 μ m de DCFH-DA (Sigma Aldrich).

- Incubamos 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

- Lectura para la medida de DCFH-DA utilizando la opción de fluorescencia (485exc / 590em).

Para el análisis utilizamos el lector *Wallac Victor2 1420* (Perkin Elmer), la fluorescencia se normalizó al contenido de proteína (BCA, Thermo Scientific).

8.2. Aislamiento mitocondrias y niveles de ATP

Las mitocondrias se aislaron a partir de grupos de 30-40 moscas por genotipo y edad. Para ello utilizamos el kit de aislamiento de las mitocondrias, MITOISO1 (Sigma Aldrich):

-Las moscas se homogeneizaron con un mortero de plástico especial durante 1 minuto aproximadamente, siempre en hielo.

-A continuación centrifugamos a 1000xg durante 5 minutos a 4°C

-Transferimos el sobrenadante a un tubo nuevo y realizamos una segunda centrifugación a 7500xg durante 10 minutos a 4 °C.

-Por último, se descarta el sobrenadante y resuspendemos el precipitado que contiene las mitocondrias aisladas para realizar los análisis de ATP en un buffer especial recomendado por el kit.

Para la medición se utilizaron 10µg del aislamiento mitochondrial con un kit de bioluminiscencia (FL-AA, Sigma). La luminiscencia fue medida con el lector Wallac Victor² 1420 (Perkin Elmer). Los niveles de ATP fueron normalizados al contenido de proteína total (BCA, Thermo Scientific).

8.3. Ensayo glutatión

Para este experimento se utilizó el *DetectX kit* de detección de glutatión fluorescente (Ann Arbor, MI, EE.UU). Para la extracción se siguieron los siguientes pasos:

-Se homogeneizaron 20 moscas en tampón fosfato (100 mM, pH 7,0) y el homogeneizado se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

-El sobrenadante se incubó con ácido 5-sulfosalicílico (5%) durante 10 minutos y se utilizó para las medidas.

Medimos el GSH libre y total por la reacción acoplada entre glutatión reductasa y NADPH. Los niveles de GSSG se calcularon utilizando la fórmula $GSSG = (GSH\ total - GSH\ libre) / 2$. Las lecturas de fluorescencia se realizaron mediante la emisión fluorescente (emisión 390/excitación 510). Para ello se utilizó el fluorímetro SPECTRAmax GEMINI.

9. Western Blotting (WB)

9.1. WB modificaciones post-traduccionales

Para el análisis de las modificaciones post-traduccionales se utilizaron los tórax de las moscas. Las proteínas fueron desnaturalizadas utilizando el tampón (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, 0,01% de azul de bromofenol, 40% sacarosa, 4% de SDS, 10% de B-mercaptoetanol) y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. En el caso de las proteínas glutationiladas, el β -mercaptoetanol fue excluido. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles del 12%, y tras la separación fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Whatman GmbH, Dassel, Alemania). Después de la transferencia, la membrana se bloqueó con 5% de leche desnatada en TBS Tween (TBST; Tris 25 mM, NaCl 0,15 M, 0,05% de Tween-20, pH 7,5) durante 1 hora. Se utilizaron los anticuerpos monoclonales primarios anti-Nitrotirosina Were (1: 1000; Upstate Biotechnology, Lake Placid, Nueva York, EE.UU.) y anti-glutación (1: 1000; Virogen, Watertown, MA, EE.UU.). Las membranas se lavaron de nuevo con TBS-Tween y se incubaron adicionalmente durante 1 h con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa. Por último, la membrana se lavó tres veces durante 5 minutos con TBS-Tween. Para la detección se utilizó el reactivo *Luminol ECL* (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) sobre la membrana (1mL), y la quimioluminiscencia se detectó en un *ImageQuant LAS-4000* lector de imágenes (GE Healthcare). Se realizaron tres WB's para cada proteína (n=3). Los resultados fueron entonces analizados con el software ImageJ.

9.2. WB y ruta de la insulina

Los WB para proteínas relacionadas con la ruta de la insulina se realizaron en células de mamífero (SH-SY5Y). Por tratarse de proteínas cuya función depende de su estado de fosforilación, se utilizó un protocolo modificado respecto al anterior. Los anticuerpos utilizados se pueden consultar en el Anexo 6. Para el estudio en condiciones basales se utilizaron placas Petri de 10 cm, en cambio, para el análisis de las proteínas bajo privación de nutrientes y tratamiento con insulina se utilizaron placas de 6 pocillos.

El aislamiento de las proteínas se realizó utilizando la solución RIPA (Thermo Fisher Scientific), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa para lisar las células. Se utilizaron 100-200 μ l de tampón RIPA por placa y se recogieron las células para transferirlas a un tubo de 1,5 ml. A continuación, se centrifugó a velocidad máxima a 4°C durante 30 minutos. Después, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 y se utilizó para los experimentos.

Una vez se cuantificaron las muestras, se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Para la electroforesis, se utilizaron los geles *Mini PROTEAN* (4-15%) de Bio-Rad en cubetas con tampón específico (SDS).

Después de la electroforesis, las proteínas en el gel se pueden transferir a una membrana nitrocelulosa utilizando el *Transblot Turbo* de la compañía Bio-Rad. Mediante la aplicación de un campo eléctrico, las proteínas se unen a la membrana a través de interacciones hidrófobas. Para bloquear los enlaces inespecíficos, se utilizó BSA (5%) en TBST y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, el anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4°C, seguido de tres lavados con TBST para eliminar los

anticuerpos no unidos y los unidos no específicamente. Se añadieron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP) y se detectaron mediante quimioluminiscencia con el aparato *LI-COR Odyssey*. El anticuerpo secundario se incubó durante una hora a TA en oscuridad. Se realizaron entre tres y seis WB's para cada proteína (n=3-6). Los resultados fueron entonces analizados con el software ImageJ.

10. Viabilidad, competencia neuromuscular y peso

Para la prueba de supervivencia, las moscas se mantuvieron a 25 °C, se cambiaron de tubo cada 2-3 días. Este ensayo se realizó por triplicado para cada genotipo y al menos 120 moscas se contaron por genotipo. El ensayo de geotaxis negativa, para estudiar la capacidad locomotora, se realizó a 10, 20 y 30 días. Las moscas se transfirieron a un tubo sin alimentos y se dejaron para la aclimatación durante 10 minutos. El ensayo se inicia con un pequeño golpe para hacer caer las moscas a la base del tubo, se realizaron vídeos y se anotó el porcentaje de moscas que llegaron a la parte superior del vial (9 cm) a los 10 segundos (vídeo en el CD). Este ensayo se realizó por cuadruplicado para cada genotipo; al menos 120 moscas fueron utilizados por genotipo. Para calcular el peso individual, las moscas fueron anestesiadas en grupos de 15 individuos y se pesaron. Este experimento se realizó por quintuplicado para cada genotipo. Para cuantificar el peso, se utilizaron grupos de 15 moscas y se dividió el resultado obtenido entre los individuos, este experimento se repitió 4 veces.

11. Resonancia Magnética nuclear (RMN).

11.1. Extracción de metabolitos

La extracción se realizó con el procedimiento de extracción con cloroformo-metanol-agua que se aplica ampliamente para tejidos y células, y permite cuantificar metabolitos polares y no polares (Beckonert et al., 2007). Se preenfriaron los solventes (metanol, cloroformo y agua mQ) en hielo y la centrifuga a 4°C. Las muestras deben estar en hielo durante todo el procedimiento, y el procedimiento se debe llevar a cabo lo más rápido posible sin interrupciones. Para ello realizamos los siguientes pasos:

-Transferimos 15-20 moscas a un eppendorf de 1.5 ml previamente tarado, pesamos y anotamos el peso.

-Homogenizamos con un mortero pequeño de plástico tras añadir 240 µl de metanol y 120 µl cloroformo.

-Homogeneizamos las muestras y añadimos 120 µl de cloroformo y 120 µl de agua mQ, entonces homogeneizamos de nuevo y dejamos la muestras en hielo o en la nevera 15 minutos.

-Centrifugamos a 10000 xg durante 15 minutos a 4°C. Entonces conseguimos separar dos fases: metanol/agua arriba (metabolitos polares) y el cloroformo en la parte inferior (metabolitos lipofílicos).

-Separamos las dos fases en dos viales distintos. Liofilizamos la fase acuosa del metanol, y evaporamos el chloroformo de la fase orgánica mediante "speed vac" y posterior liofilización.

-Congelamos las muestras a -80°C utilizando nitrógeno líquido para asegurar la congelación rápida.

11.2. Preparación de la muestra de extractos para la medición por RMN.

Para la medición del perfil metabólico se descongelaron las muestras extraídas en hielo y se siguieron los siguientes pasos para proceder con la adquisición de los espectros:

-Los extractos acuosos se disolvieron en 600 μl de tampón de RMN (fosfato 100 mM, en D_2O , pH 7,4, 0,1 mM de 3-(trimetilsilil)-2,2',3,3'-ácido tetra deuteropropionico (TSP)).

-Las muestras se agitaron con vórtex y se centrifugaron a 12.000 xg durante 5 minutos. 550 μl de sobrenadante se transfirió a un tubo de RMN de 5 mm.

-El extracto orgánico se disolvió en 600 μl de cloroformo deuterado con 0,03% v/v tetrametilsilano (TMS) y se centrifugó a 13.000 xg durante 1 minuto.

Para la medición, 550 μl de la solución se transfirieron a un tubo de RMN, y el tubo se cerró herméticamente. Las muestras se almacenaron a 4°C y se midieron el mismo día.

11.3. Preparación de muestras de mosca entera para HR-MAS

Para completar la información obtenida a partir de los extractos polares y apolares, se realizó también un análisis metabólico de las moscas enteras. Para ello aplicamos la técnica de *High Resolution Magic Angle Spinning* (HR-MAS) que mediante un giro de la muestra en el ángulo

mágico (54.74°) permite anular gran parte de las interacciones dipolares entre moléculas. De esta forma se pueden obtener espectros alta resolución de muestras semi-sólidas, como tejidos y células intactas (Beckonert et al., 2010). Una ventaja de esta técnica es que metabolitos polares y apolares se pueden observar en un único espectros. En cuanto a los lípidos observados, solo se verán aquellas señales procedentes de lípidos móviles, principalmente provenientes de gotas lipídicas, que de esta forma se pueden distinguir de los lípidos no móviles, de membranas y cutícula, que están también incluidos en el extracto apolar.

Para las muestras con moscas intactas, las moscas se anestesiaron y se introdujeron en un rotor HR-MAS de 50 μ l (Sarou-Kanian et al., 2015). En la parte superior del rotor, separados por parafina, se colocó 50 μ l de D₂O. Las muestras HR-MAS se midieron inmediatamente después de su preparación.

11.4. Adquisición de los experimentos de RMN

Los espectros de RMN de los extractos polares y apolares de metabolitos se adquieren a 27 °C usando un espectrómetro de 600 MHz (Bruker Biospin) equipado con una crio-sonda de triple resonancia (TCI). Las muestras intactas se midieron en un espectrómetro de 500 MHz (Bruker Biosppin) equipado de una sonda HR-MAS, a 27 °C y con una velocidad de rotación de 3500 Hz. Los espectros monodimensionales se realizaron con 128 *Free Induction Decays* (FID) para la fase orgánica y 256 FIDs para la fase acuosa y las muestras de tejido intacto. La amplitud espectral para los extractos de fase acuosa se estableció en 30 ppm; la amplitud espectral para los extractos de fase orgánica se estableció en 20 ppm; la amplitud espectral para las muestras de tejido intacto es estableció en 14 ppm. Se incluyó un

intervalo de relajación de 3 segundos entre FIDs y se aplicó una presaturación de la señal del agua para muestras de fase acuosa. A la FID resultante se le aplicó la transformada de Fourier, multiplicando por una función exponencial de 0,5 Hz para los extractos y de 1 Hz para tejido intacto. Los experimentos bidimensionales TOCSY y HSQC se llevaron a cabo sólo para muestras representativas. Los retardos de relajación se establecieron a 1,5 s y los experimentos se adquirieron en el modo sensible a la fase. Para los extractos, los espectros TOCSY se realizaron usando una secuencia de pulsos estándar MLEV-17 con tiempos de mezclado de 65 ms. Para los tejidos intactos, el TOCSY se adquirió con una modulación de frecuencia tangencial, empleando una longitud de 285 μ s para el pulso adiabático y un tiempo de mezcla de 60 ms.

11.5. Asignación de los metabolitos y cuantificación metabolitos

La identificación de metabolitos y la asignación se realizó con la ayuda de bases de datos (Amix (Bruker)), HMDB (Wishart et al., 2013) y Resonancia Magnética Biológica Data Bank (Ulrich et al., 2008), valores de la literatura y de la información a partir de experimentos de RMN 2D. Para los metabolitos específicos de interés, la asignación se confirmó por experimentos de adición, esto consiste en la adición del compuesto (que sospechamos podría ser) disolviéndolo en la muestra del extracto medido previamente. Posteriormente, se evaluó la consistencia entre las señales que aparecen tras la adición del compuesto y la reciente asignación propuesta. Para la cuantificación de metabolitos, los espectros se integran automáticamente en regiones seleccionadas con MestReNova 8.1 software (MestRelab Research). Para una mejor comparación entre muestras de extracto, los valores de

integración se normalizaron a la intensidad total para minimizar la variabilidad generada por el procedimiento de extracción. En el caso de las muestras medidas *in vivo*, se utilizó el ERETIC (Bruker Biospin) una señal artificial que previamente se calibró con una muestra de referencia.

11.6. Análisis multivariante

Los análisis de datos multivariante se realizaron con el programa SIMCAP 12.0 (Umetrics, Suecia) con los valores integrados y normalizados de los metabolitos polares. Además, las tablas con los valores integrados se escalaron con el método *Pareto* (cada valor se divide por la raíz cuadrada de la desviación estándar de cada variable) para una más fácil interpretación de los datos y para tener en cuenta la variabilidad de las señales pequeñas. También se aplicó el centrado medio para mejorar la interpretabilidad del modelo.

Para construir los modelos discriminantes, se realizó el análisis de proyección ortogonal de estructuras de discriminante latente (OPLS-DA). El OPLS-DA separa la variación predictiva (entre clases) de la variación no predictiva (dentro de las clases) en un solo componente, por lo tanto, se obtienen claras separaciones entre los genotipos de estudio en caso que existan. Además, el análisis de S-Plot (representación de la magnitud de las variables modeladas por co-variación frente a la fiabilidad de la correlación modelado) permitió definir los metabolitos que eran esenciales para la discriminación.

Para evaluar la calidad de la cada modelo, los parámetros R²X (cum) (varianza de X) y R²Y (cum) (varianza de Y) se ha tenido en cuenta, además el valor Q² (cum) (bondad de predicción) también fue evaluado. Un valor Q²

(cum) $\geq 0,5$ se consideró indicativo de un buen modelo. Por otra parte, los modelos OPLS-DA fueron validados mediante la realización de la prueba de permutación (Abbate et al., 2001). Los coeficientes R^2 y Q^2 generados a partir de la permutación de prueba se compararon con el valor R^2 y Q^2 del modelo real. Si los valores de intercepción R^2 y Q^2 de la permutación de prueba fueron significativamente más pequeños que los del modelo real, el modelo fue considerado como predecible.

BIBLIOGRAFÍA

Abbate, C., Giorgianni, C., Munao, F., Pesarin, F., and Salmaso, L. (2001). Neurobehavioral evaluation in humans exposed to hydrocarbons: a new statistical approach. *Psychotherapy and psychosomatics* 70, 44-49.

Abbott, R.D., Ross, G.W., White, L.R., Nelson, J.S., Masak, K.H., Tanner, C.M., Curb, J.D., Blanchette, P.L., Popper, J.S., and Petrovitch, H. (2002). Midlife adiposity and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology* 59, 1051–1057.

Allodi, S., Chen, M., Huang, J., Yang, X., Liu, B., Zhang, W., Huang, L., Deng, F., Ma, J., Bai, Y., *et al.* (2012). Serum Starvation Induced Cell Cycle Synchronization Facilitates Human Somatic Cells Reprogramming. *PLoS ONE* 7, e28203.

Arruda, A.P., Pers, B.M., Parlakgul, G., Guney, E., Inouye, K., and Hotamisligil, G.S. (2014). Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nature medicine* 20, 1427-1435.

Attarian, S., Vallat, J.M., Magy, L., Funalot, B., Gonnaud, P.M., Lacour, A., Pereon, Y., Dubourg, O., Pouget, J., Micallef, J., *et al.* (2014). An exploratory randomised double-blind and placebo-controlled phase 2 study of a combination of baclofen, naltrexone and sorbitol (PXT3003) in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Orphanet journal of rare diseases* 9, 199.

Auranen, M., Ylikallio, E., Toppila, J., Somer, M., Kiuru-Enari, S., and Tynismaa, H. (2013). Dominant GDAP1 founder mutation is a common cause of axonal Charcot-Marie-Tooth disease in Finland. *Neurogenetics* 14, 123-132.

Azzedine, H., Ruberg, M., Ente, D., Gilardeau, C., Périé, S., Wechsler, B., Brice, A., LeGuern, E., and Dubourg, O. (2003). Variability of disease progression in a family with autosomal recessive CMT associated with a S194X and new R310Q mutation in the GDAP1 gene. *Neuromuscular Disorders* 13, 341-346.

Azzedine, H., Senderek, J., Rivolta, C., and Chrast, R. (2012). Molecular genetics of charcot-marie-tooth disease: from genes to genomes. *Molecular syndromology* 3, 204-214.

Bai, H., Kang, P., and Tatar, M. (2012). *Drosophila* insulin-like peptide-6 (*dilp6*) expression from fat body extends lifespan and represses secretion of *Drosophila* insulin-like peptide-2 from the brain. *Aging Cell* 11: 978–985.

Barisic, N., Claeys, K.G., Sirotkovic-Skerlev, M., Lofgren, A., Nelis, E., De Jonghe, P., and Timmerman, V. (2008). Charcot-Marie-Tooth disease: a clinico-genetic confrontation. *Annals of human genetics* 72, 416-441.

Barneo-Munoz, M., Juarez, P., Civera-Tregon, A., Yndriago, L., Pla-Martin, D., Zenker, J., Cuevas-Martin, C., Estela, A., Sanchez-Arago, M., Forteza-Vila, J., *et al.* (2015). Lack of *GDAP1* induces neuronal calcium and mitochondrial defects in a knockout mouse model of charcot-marie-tooth neuropathy. *PLoS genetics* 11, e1005115.

Baxter, R.V., Othmane, K.B., Julie, M., Stajich, J.E., Hulette, C., Dew-Knight, S., Hentati, F., Hamida, M.B., Bel, S., Stenger, J.E., *et al.* (2001). Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nature genetics*.30, 21-22

Beckonert, O., Coen, M., Keun, H.C., Wang, Y., Ebbels, T.M., Holmes, E., Lindon, J.C., and Nicholson, J.K. (2010). High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nature protocols* 5, 1019-1032.

Beckonert, O., Keun, H.C., Ebbels, T.M., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J.C., and Nicholson, J.K. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature protocols* 2, 2692-2703.

Benomar, Y., Naour, N., Aubourg, A., Bailleux, V., Gertler, A., Djiane, J., Guerre-Millo, M., and Taouis, M. (2006). Insulin and leptin induce *Glut4* plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase- dependent mechanism. *Endocrinology* 147, 2550-2556.

Betza, C., Strackaa, D., Prescianotto-Baschonga, C., Friedenb, M., Demaurexb, N., and Halla, M.N. (2013). mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondriaassociated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *PNAS* *110* 12526–12534.

Blasco, H., Corcia, P., Pradat, P.F., Bocca, C., Gordon, P.H., Veyrat-Durebex, C., Mavel, S., Nadal-Desbarats, L., Moreau, C., Devos, D., *et al.* (2013). Metabolomics in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an untargeted approach via high-resolution mass spectrometry. *J Prot Res* *12*, 3746-3754.

Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* *118*, 401-415

Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J., Anders, M.W., and Sheu, S.S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* *287*: C817–C833.

Burns, J., Ouvrier, R., Estilow, T., Shy, R., Laura, M., Pallant, J.F., Lek, M., Muntoni, F., Reilly, M.M., Pareyson, D., *et al.* (2012). Validation of the Charcot-Marie-Tooth disease pediatric scale as an outcome measure of disability. *Ann Neurol* *71*, 642-652.

Casasnovas, C., Banchs, I., Cassereau, J., Gueguen, N., Chevrollier, A., Martinez-Matos, J.A., Bonneau, D., and Volpini, V. (2010). Phenotypic spectrum of MFN2 mutations in the Spanish population. *J Med Gen* *47*, 249-256.

Cassereau, J., Chevrollier, A., Gueguen, N., Desquiret, V., Verny, C., Nicolas, G., Dubas, F., Amati-Bonneau, P., Reynier, P., Bonneau, D., *et al.* (2011). Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease involving GDAP1 mutations. *Experimental neurology* *227*, 31-41.

Cassereau, J., Chevrollier, A., Gueguen, N., Malinge, M.C., Letournel, F., Nicolas, G., Richard, L., Ferre, M., Verny, C., Dubas, F., *et al.* (2009). Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics* *10*, 145-150.

Celotto, A.M., Liu, Z., Vandemark, A.P., and Palladino, M.J. (2012). A novel *Drosophila* SOD2 mutant demonstrates a role for mitochondrial ROS in neurodevelopment and disease. *Brain and behavior* 2, 424-434.

Cerniglia, G.J., Dey, S., Gallagher-Colombo, S.M., Daurio, N.A., Tuttle, S., Busch, T.M., Lin, A., Sun, R., Esipova, T.V., Vinogradov, S.A., *et al.* (2015). The PI3K/Akt Pathway Regulates Oxygen Metabolism via Pyruvate Dehydrogenase (PDH)-E1alpha Phosphorylation. *Molecular cancer therapeutics* 14, 1928-1938.

Corasaniti, M.T., Maiuolo, J., Maida, S., Fratto, V., Navarra, M., Russo, R., Amantea, D., Morrone, L.A., and Bagetta, G. (2007). Cell signaling pathways in the mechanisms of neuroprotection afforded by bergamot essential oil against NMDA-induced cell death in vitro. *British journal of pharmacology* 151, 518-529.

Cornett, K.M., Menezes, M.P., Bray, P., Halaki, M., Shy, R.R., Yum, S.W., Estilow, T., Moroni, I., Foscan, M., Pagliano, E., *et al.* (2016). Phenotypic Variability of Childhood Charcot-Marie-Tooth Disease. *JAMA neurology* 73, 645-651.

Crimella, C., Tonelli, A., Airoldi, G., Baschiroto, C., D'Angelo, M.G., Bonato, S., Losito, L., Trabacca, A., Bresolin, N., and Bassi, M.T. (2010). The GST domain of GDAP1 is a frequent target of mutations in the dominant form of axonal Charcot Marie Tooth type 2K. *Journal of medical genetics* 47, 712-716.

Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., García-Planells, J., Chumillas, M.J., Mayordomo, F., LeGuern, E., Marín, I., Vílchez, J.J., and Palau, F. (2001). The gene encoding gangliosideinduced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nature genetics*.30, 21-22

Curtin, K.D., Wyman, R.J., and Meinertzhagen, I.A. (2007). Basigin/EMMPRIN/CD147 mediates neuron-glia interactions in the optic lamina of *Drosophila*. *Glia* 55, 1542-1553.

Chihara, T., Luginbuhl, D., and Luo, L. (2007). Cytoplasmic and mitochondrial protein translation in axonal and dendritic terminal arborization. *Nature neuroscience* 10, 828-837.

Chung, K.W., Hyun, Y.S., Lee, H.J., Jung, H.K., Koo, H., Yoo, J.H., Sang-Beom, K., Park, C.I., Kim, H.N., and Choi, B.O. (2011). Two recessive intermediate Charcot-Marie-Tooth patients with GDAP1 mutations. *J Peripher Nerv Syst* 16:143–146.

Davies, S.A., Overend, G., Sebastian, S., Cundall, M., Cabrero, P., Dow, J.A., and Terhzaz, S. (2012). Immune and stress response 'cross-talk' in the *Drosophila* Malpighian tubule. *Journal of insect physiology* 58, 488-497.

Debattisti, V., Pendin, D., Ziviani, E., Daga, A., and Scorrano, L. (2014). Reduction of endoplasmic reticulum stress attenuates the defects caused by *Drosophila* mitofusin depletion. *The Journal of cell biology* 204, 303-312.

Debattisti, V., and Scorrano, L. (2013). *D. melanogaster*, mitochondria and neurodegeneration: small model organism, big discoveries. *Molecular and cellular neurosciences* 55, 77-86.

Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblauer, S., *et al.* (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448, 151-156.

Dong, K., Yao, N., Pu, Y., He, X., Zhao, Q., Luan, Y., Guan, W., Rao, S., and Ma, Y. (2014). Genomic Scan Reveals Loci under Altitude Adaptation in Tibetan and Dahe Pigs. *Plos One* 9(10):e110520.

Draznin, B. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes* 55, 2392-2397.

Dubourg, O., Azzedine, H., Verny, C., Durosier, G., Birouk, N., Gouider, R., Salih, M., Bouhouche, A., Thiam, A., Grid, D., *et al.* (2006). Autosomal-recessive forms of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurol Mol Med* 8, 75-85.

Dyck, P.J., Oviatt, K.F., and L.H., E. (1981). Intensive Evaluation of Referred Unclassified. *Ann Neurol*.

Ekins, S., Litterman, N.K., Arnold, R.J., Burgess, R.W., Freundlich, J.S., Gray, S.J., Higgins, J.J., Langley, B., Willis, D.E., Notterpek, L., *et al.* (2015). A brief review of recent Charcot-Marie-Tooth research and priorities. *F1000Research* 4, 53.

Essers, P., Tain, L.S., Nespital, T., Goncalves, J., Froehlich, J., and Partridge, L. (2016). Reduced insulin/insulin-like growth factor signaling decreases translation in *Drosophila* and mice. *Scientific reports* 6, 30290.

Fabian-Fine, R., Verstreken, P., Hiesinger, R., Horne, J.A., Kostyleva, R., Zhou, Y., Bellen, H.J., and Meinertzhagen, I.A. (2003). Endophilin Promotes a Late Step in Endocytosis at Glial Invaginations in *Drosophila* Photoreceptor Terminals. *Journal of Neuroscience* 23(33):10732–10744.

Fledrich, R., Stassart, R.M., Klink, A., Rasch, L.M., Prukop, T., Haag, L., Czesnik, D., Kungl, T., Abdelaal, T.A., Keric, N., *et al.* (2014). Soluble neuregulin-1 modulates disease pathogenesis in rodent models of Charcot-Marie-Tooth disease 1A. *Nature medicine* 20, 1055-1061.

Freeman, M. (1996). Reiterative Use of the EGF Receptor Triggers Differentiation of All Cell Types in the *Drosophila* Eye. *Cell* 87 651–660.

Furuyama, T., Kitiyama, K., Yamashita, H., and Mori, N. (2003). Forkhead transcription factor FOXO1 (FKHR)-dependent induction of PDK4 gene expression in skeletal muscle during energy deprivation. *Biochem J* (2003) 375, 365–371 375: 365–371.

Gautam, B.N., and Richard, S.J. (2003). Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem* 87, 1427-1435.

Gentry, M.S., Downen, R.H., Worby, C.A., Mattoo, S., Ecker, J.R., and Dixon, J.E. (2007). The phosphatase laforin crosses evolutionary boundaries and links carbohydrate metabolism to neuronal disease. *The Journal of cell biology* 178, 477-488.

Gomes, L.C., and Scorrano, L. (2013). Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 205-212.

Ha, E.M., Oh, C.T., Bae, Y.S., and Won-Jae, L. (2005). A Direct Role for Dual Oxidase in *Drosophila* Gut Immunity. *Science* 310: No. 5749.

Hantke, J., Chandler, D., King, R., Wanders, R.J., Angelicheva, D., Tournev, I., McNamara, E., Kwa, M., Guergueltcheva, V., Kaneva, R., *et al.* (2009). A mutation in an alternative untranslated exon of hexokinase 1 associated with hereditary motor and sensory neuropathy -- Russe (HMSNR). *European journal of human genetics : EJHG* 17, 1606-1614.

Harel, T., and Lupski, J.R. (2014). Charcot-Marie-Tooth disease and pathways to molecular based therapies. *Clinical genetics* 86, 422-431.

Hassing, L.B., Dahl, A.K., Thorvaldsson, V., Berg, S., Gatz, M., Pedersen, N.L., and Johansson, B. (2009). Overweight in midlife and risk of dementia: a 40-year follow-up study. *International journal of obesity* 33, 893-898.

Hay, N. (2011). Interplay between FOXO, TOR, and Akt. *Biochimica et biophysica acta* 1813, 1965-1970.

Hedstrom, A.K., Olsson, T., and Alfredsson, L. (2012). High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women. *Multiple sclerosis* 18, 1334-1336.

Hoffman, J.M., Soltow, Q.A., Li, S., Sidik, A., Jones, D.P., and Promislow, E.L. (2014). Effects of age, sex, and genotype on high-sensitivity metabolomic profiles in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 13: 596-604.

Hong, S.H., Kang, M., Lee, K.S., and Yu, K. (2016). High fat diet-induced TGF-beta/Gbb signaling provokes insulin resistance through the tribbles expression. *Scientific reports* 6, 30265.

Huang, J., and Manning, B.D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochemical Society transactions* 37, 217-222.

Huber, N., Bieniossek, C., Wagner, K.M., Elsasser, H.P., Suter, U., Berger, I., and Niemann, A. (2016). Glutathione-conjugating and membrane-remodeling activity of GDAP1 relies on amphipathic C-terminal domain. *Scientific reports* *6*, 36930.

Huber, N., Guimaraes, S., Schrader, M., Suter, U., and Niemann, A. (2013). Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutants of GDAP1 dissociate its roles in peroxisomal and mitochondrial fission. *EMBO reports* *14*, 545-552.

Hwangbo, D.S., Gersham, B., Tu, M.P., Palmer, M., and Tatar, M. (2004). *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* *429*, 558-562.

Ilzecka, J., Stelmasiak, Z., Solski, J., Wawrzycki, S., and Szpetnar, M. (2003). Plasma amino acids concentration in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amino acids* *25*, 69-73.

Itoh, K., Nakamura, K., Iijima, M., and Sesaki, H. (2013). Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. *Trends in cell biology* *23*, 64-71.

Janssens, K., Goethals, S., Atkinson, D., Ermanoska, B., Fransen, E., Jordanova, A., Auer-Grumbach, M., Asselbergh, B., and Timmerman, V. (2014). Human Rab7 mutation mimics features of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2B in *Drosophila*. *Neurobiology of disease* *65*, 211-219.

Jaral, M.S. (1987). Ultrastructure of the anal organ of *Drosophila* larva with reference to ion transport. *Tissue & Cell* *19*, 559-575

Jeong, J.Y., Jeoung, N.H., Park, K.G., and Lee, I.K. (2012). Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Diabetes & metabolism journal* *36*, 328-335.

Jha, M.K., Lee, I.K., and Suk, K. (2016). Metabolic reprogramming by the pyruvate dehydrogenase kinase-lactic acid axis: Linking metabolism and diverse neuropathophysiology. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 68, 1-19.

Jumbo-Lucioni, P., Parkinson, W., and Broadie, K. (2014). Overelaborated synaptic architecture and reduced synaptomatrix glycosylation in a *Drosophila* classic galactosemia disease model. *Disease models & mechanisms* 7, 1365-1378.

Kabzinska, D., Strugalska-Cynowska, H., Kostera-Pruszczyk, A., Ryniewicz, B., Posmyk, R., Midro, A., Seeman, P., Barankova, L., Zimon, M., Baets, J., *et al.* (2010). L239F founder mutation in *GDAP1* is associated with a mild Charcot-Marie-Tooth type 4C4 (CMT4C4) phenotype. *Neurogenetics* 11, 357-366.

Kang, Y.H., Cho, M.H., Kim, J.Y., Kwon, M.S., Peak, J.J., Kang, S.W., Yoon, S.Y., and Song, Y. (2016). Impaired macrophage autophagy induces systemic insulin resistance in obesity. *Oncotarget* 7, 35577-35591.

Kasai, H., Sugaya, Y., Noda, S., Nakao, K., Maeda, T., Kano, M., and Aiba, A. (2014). Selective activation of mTORC1 signaling recapitulates microcephaly, tuberous sclerosis, and neurodegenerative diseases. *Cell reports* 7, 1626-1639.

Keeney, P.M., Xie, J., Capaldi, R.A., and Bennett, J.P., Jr. (2006). Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 5256-5264.

Kennerson, M.L., Yiu, E.M., Chuang, D.T., Kidambi, A., Tso, S.C., Ly, C., Chaudhry, R., Drew, A.P., Rance, G., Delatycki, M.B., *et al.* (2013). A new locus for X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX6) is caused by mutations in the pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 3 (PDK3) gene. *Human molecular genetics* 22, 1404-1416.

Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2006). Signaling Pathways and Molecular Mechanisms through which Branched-Chain Amino Acids Mediate Translational Control of Protein Synthesis. *J Nutrition* 06: 0022-3166.

Kostal, V., Korbelova, J., Rozsypal, J., Zahradnickova, H., Cimlova, J., Tomcala, A., and Simek, P. (2011). Long-term cold acclimation extends survival time at 0 degrees C and modifies the metabolomic profiles of the larvae of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 6, e25025.

Kostera-Pruszczyk, A., Kosinska, J., Pollak, A., Stawinski, P., Walczak, A., Wasilewska, K., Potulska-Chromik, A., Szczudlik, P., Kaminska, A., and Ploski, R. (2014). Exome sequencing reveals mutations in MFN2 and

GDAP1 in severe Charcot–Marie–Tooth disease. *Journal of Peripheral Nervous System* 19, 242–245.

Letsou, A., and Bohmann, D. (2005). Small flies--big discoveries: nearly a century of *Drosophila* genetics and development. *Developmental dynamics* : an official publication of the American Association of Anatomists 232, 526-528.

Liesa, M., and Shirihai, O.S. (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell metabolism* 17, 491-506.

Lin, K.P., Soong, B.W., Yang, C.C., Huang, L.W., Chang, M.H., Lee, I.H., Antonellis, A., and Lee, Y.C. (2011). The mutational spectrum in a cohort of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 among the Han Chinese in Taiwan. *PLoS One* 6, e29393.

Liu, H., Nakagawa, T., Kanematsu, T., Uchida, T., and S., T. (1999). Isolation of 10 Differentially Expressed cDNAs in Differentiated. *J Neurochem*.
Liu, Y., Yao, Z., Zhang, L., Zhu, H., Deng, W., and Qin, C. (2013). Insulin induces neurite outgrowth via SIRT1 in SH-SY5Y cells. *Neuroscience* 238, 371-380.

Lopez Del Amo, V., Seco-Cervera, M., Garcia-Gimenez, J.L., Whitworth, A.J., Pallardo, F.V., and Galindo, M.I. (2015). Mitochondrial defects and neuromuscular degeneration caused by altered expression of *Drosophila Gdap1*: implications for the Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Human molecular genetics* 24, 21-36.

Lupski, J.R., and C., G. (1992). Molecular Genetics and Neuropathology of CharcotMarie-Tooth.pdf. Brain pathol.

Maher, P. (2006). Redox Control of Neural Function: Background, Mechanisms, and Significance. *Antioxidants & redox signaling* 8:11-12, 2006.

Manganelli, F., Pisciotta, C., Nolano, M., Capponi, S., Geroldi, A., Topa, A., Bellone, A., Suls, A., Mandich, P., and Santoro, L. (2012). A novel autosomal dominant GDAP1 mutation in an Italian CMT2 family. *Journal of the Peripheral Nervous System* 17:351–355.

Mapstone, M., Cheema, A.K., Fiandaca, M.S., Zhong, X., Mhyre, T.R., MacArthur, L.H., Hall, W.J., Fisher, S.G., Peterson, D.R., Haley, J.M., *et al.* (2014). Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nature medicine* 20, 415-418.

Marco, A., Cuesta, A., Pedrola, L., Palau, F., and Marin, I. (2004). Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Molecular biology and evolution* 21, 176-187.

Marchi, S., Patergnani, S., and Pinton, P. (2014). The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions. *Biochimica et biophysica acta* 1837, 461-469.

Marinho, R., Mekary, R.A., Munoz, V.R., Gomes, R.J., Pauli, J.R., and de Moura, L.P. (2015). Regulation of hepatic TRB3/Akt interaction induced by physical exercise and its effect on the hepatic glucose production in an insulin resistance state. *Diabetology & metabolic syndrome* 7, 67.

McCorquodale, D., Pucillo, E.M., and Johnson, N.E. (2016). Management of Charcot-Marie-Tooth disease: improving long-term care with a multidisciplinary approach. *Journal of multidisciplinary healthcare* 9, 7-19.

Mei-Zhei, Z., Yu, M.C., Sun, P., Li, Q., and Yu-Xiu, L. (2016). Expression profiling analysis: Uncoupling protein 2 deficiency improves hepatic glucose, lipid profiles and insulin sensitivity in high-fat diet-fed mice by modulating expression of genes in peroxisome proliferator-activated receptor signaling pathway. *Journal of Diabetes Investigation* 7, 179-189.

Mishra, P., and Chan, D.C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *The Journal of cell biology* 212, 379-387.

Missirlis, F., Phillips, J.P., and Jäckle, H. (2001). Cooperative action of antioxidant defense systems in *Drosophila*. *Current biology : CB Vol 11*

Muñoz, J.P., Ivanova, S., Sánchez-Wandelmer, J., Martínez-Cristobal, P., Noguera, E., Sancho, A., Díaz-Ramos, A., Hernández-Alvarez, M.I., Sebastián, D., Mauvezin, C., *et al.* (2013). Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK. *The EMBO journal* 32: 2348-2361.

Murphy, S.M., Herrmann, D.N., McDermott, M.P., Scherer, S.S., Shy, M., Reilly, M., and Pareyson, D. (2011). Reliability of the CMT neuropathy score (second version) in Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 16, 191–198.

Musselman, L.P., Fink, J.L., Ramachandran, P.V., Patterson, B.W., Okunade, A.L., Maier, E., Brent, M.R., Turk, J., and Baranski, T.J. (2013). Role of fat body lipogenesis in protection against the effects of caloric overload in *Drosophila*. *The Journal of biological chemistry* 288, 8028-8042.

Nadia-Nelis, A., Merlini, E., Barišić, L., Amouri, N., Ceuterick, R., Jean-Jacques, M., Timmerman, V., and De Jonghe, P. (2003). Identification of novel GDAP1 mutations causing autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscular Disorders* 13, 720-728.

Naon, D., Zaninello, M., Giacomello, M., Varanita, T., Grespi, F., Lakshminaranayan, S., Serafini, A., Semenzato, M., Herkenne, S., Hernandez-Alvarez, M.I., *et al.* (2016). Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 11249-11254.

Nazha Birouk, H.A., Odile Dubourg, Marie-Paule Muriel Ali Benomar, Tarik Hamadouche, Thierry Maisonobe, Reda Ouazzani, Alexis Brice, Mohamed Yahyaoui, Taib Chkili, Eric Le Guern (2003). Phenotypical features of a Moroccan family with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease associated with the S194X mutation in the GDAP1 gene. *Arch Neurol* 60: 598-604.

Ngo, S.T., and Steyn, F.J. (2015). The interplay between metabolic homeostasis and neurodegeneration: insights into the neurometabolic nature of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell regeneration* 4, 5.

Niemann, A., Huber, N., Wagner, K.M., Somandin, C., Horn, M., Lebrun-Julien, F., Angst, B., Pereira, J.A., Halfter, H., Welzl, H., *et al.* (2014). The Gdap1 knockout mouse mechanistically links redox control to Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain : a journal of neurology* 137, 668-682.

Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A., and Suter, U. (2005). Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *The Journal of cell biology* 170, 1067-1078.

Niemann, A., Wagner, K.M., Ruegg, M., and Suter, U. (2009). GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiology of disease* 36, 509-520.

Noack, R., Frede, S., Albrecht, P., Henke, N., Pfeiffer, A., Knoll, K., Dehmel, T., Meyer Zu Horste, G., Stettner, M., Kieseier, B.C., *et al.* (2012). Charcot-Marie-Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential. *Human molecular genetics* 21, 150-162.

Ochs, S.M., Dorostkar, M.M., Aramuni, G., Schon, C., Filser, S., Poschl, J., Kremer, A., Van Leuven, F., Ovsepian, S.V., and Herms, J. (2015). Loss of neuronal GSK3beta reduces dendritic spine stability and attenuates excitatory synaptic transmission via beta-catenin. *Molecular psychiatry* 20, 482-489.

Oda, Y., Yui, R., Sakamoto, K., Kita, K., and Matsuura, E.T. (2012). Age-related changes in the activities of respiratory chain complexes and mitochondrial morphology in *Drosophila*. *Mitochondrion* 12, 345-351.

Oliveira, M.W., Carrara, R.C.V., Simoes, D.L.C., Saggiaro, F.P., Carlotti, C.G.J., Covas, D.T., and Neder, L. (2010). Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution of in situ hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histo Histopathology* 25: 1017-1024.

Palamiuc, L., Schlagowski, A., Ngo, S.T., Vernay, A., Dirrig-Grosch, S., Henriques, A., Boutillier, A.L., Zoll, J., Echaniz-Laguna, A., Loeffler, J.P., *et al.* (2015). A metabolic switch toward lipid use in glycolytic muscle is an early pathologic event in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO molecular medicine* 7, 526-546.

Pandey, U.B., and Nichols, C.D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacological reviews* 63, 411-436.

Pareyson, D., and Marchesi, C. (2009). Diagnosis, natural history, and management of Charcot–Marie–Tooth disease. *Lancet Neurol* 8: 654-67.

Parra, V., Verdejo, H.E., Iglewski, M., Del Campo, A., Troncoso, R., Jones, D., Zhu, Y., Kuzmich, J., Pennanen, C., Lopez-Crisosto, C., *et al.* (2014). Insulin Stimulates Mitochondrial Fusion and Function in Cardiomyocytes via the Akt/mTOR- NFKB-OPA-1 Signaling Pathway. *Diabetes Volume* 63.

Pedrola, L., Espert, A., Valdes-Sanchez, T., Sanchez-Piris, M., Sirkowski, E.E., Scherer, S.S., Farinas, I., and Palau, F. (2008). Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Journal of cellular and molecular medicine* 12, 679-689.

Pedrola, L., Espert, A., Wu, X., Claramunt, R., Shy, M.E., and Palau, F. (2005). GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Human molecular genetics* 14, 1087-1094.

Pepaj, M., Bredahl, M.K., Gjerlaugsen, N., Bornstedt, M.E., and Thorsby, P.M. (2015). Discovery of Novel vitamin D-regulated proteins in INS-1 cells: A Proteomic approach. *Diabet Metabol Res* 29, i-i.

Peter James Dyck, a.E.H.L., Rochester, Minn (1968). Lower Motor and Primary Sensory Neuron. *Arch Neurol*.

Peters, H., Buck, N., Wanders, R., Ruiten, J., Waterham, H., Koster, J., Yapliito-Lee, J., Ferdinandusse, S., and Pitt, J. (2014). ECHS1 mutations in Leigh disease: a new inborn error of metabolism affecting valine metabolism. *Brain : a journal of neurology* 137, 2903-2908.

Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacin, M., and Zorzano, A. (2005). The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Human molecular genetics* 14, 1405-1415.

Piscosquito, G., Reilly, M.M., Schenone, A., Fabrizi, G.M., Cavallaro, T., Santoro, L., Manganelli, F., Vita, G., Quattrone, A., Padua, L., *et al.* (2015). Responsiveness of clinical outcome measures in Charcot-Marie-Tooth disease. *European journal of neurology* 22, 1556-1563.

Pitceathly, R.D., Murphy, S.M., Cottenie, E., Chalasani, A., Sweeney, M.G., Woodward, C., Mudanohwo, E.E., Hargreaves, I., Heales, S., Land, J., *et al.* (2012). Genetic dysfunction of MT-ATP6 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 79, 1145-1154.

Pla-Martin, D., Calpena, E., Lupo, V., Marquez, C., Rivas, E., Sivera, R., Sevilla, T., Palau, F., and Espinos, C. (2015). Junctophilin-1 is a modifier gene of GDAP1-related Charcot-Marie-Tooth disease. *Human molecular genetics* 24, 213-229.

Pla-Martin, D., Rueda, C.B., Estela, A., Sanchez-Piris, M., Gonzalez-Sanchez, P., Traba, J., de la Fuente, S., Scorrano, L., Renau-Piqueras, J., Alvarez, J., *et al.* (2013). Silencing of the Charcot-Marie-Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca²⁺ homeostasis by reducing store-operated Ca²⁺ entry. *Neurobiology of disease* 55, 140-151.

Procaccini, C., Santopaolo, M., Faicchia, D., Colamatteo, A., Formisano, L., de Candia, P., Galgani, M., De Rosa, V., and Matarese, G. (2016). Role of metabolism in neurodegenerative disorders. *Metabolism: clinical and experimental* 65, 1376-1390.

Puig, O., Marr, M.T., Ruhf, M.L., and Tjian, R. (2003). Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes & development* 17, 2006-2020.

Reinhardt, F., Schultz, J., Waterstradt, R., and Baltrusch, S. (2016). Drp1 guarding of the mitochondrial network is important for glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. *Biochemical and biophysical research communications* 474, 646-651.

Ren, H., You, C., and Han, C. (2013). A chronic leg ulcer presenting with Charcot-Marie-Tooth disease and type 2 diabetes: a case report. *The international journal of lower extremity wounds* 12, 30-34.

Roberts, D.J., and Miyamoto, S. (2015). Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell death and differentiation* 22, 248-257.

Rosales-Corral, S., Tan, D.X., Manchester, L., and Reiter, R.J. (2015). Diabetes and Alzheimer disease, two overlapping pathologies with the same background: oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015, 985845.

Rossor, A.M., Polke, J.M., Houlden, H., and Reilly, M. (2013). Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nature reviews Neurology* 9, 562-571.

Rulifson, E.J., Kim, S.K., and Nusse, R. (2002). Ablation of Insulin-Producing Neurons in Flies: Growth and Diabetic Phenotypes. *Science* 296.

Sadjadi, R., Reilly, M., Shy, M.E., Pareyson, D., Laura, M., Murphy, S., Feely, M.E., T., G., Bacon, C., Piscoquito, G., *et al.* (2014). Psychometrics evaluation of Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Score (CMTNSv2) second version, using Rasch analysis. *Journal of the Peripheral Nervous System* 19, 192–196.

Salminen, A., Haapasalo, A., Kauppinen, A., Kaarniranta, K., Soininen, H., and Hiltunen, M. (2015). Impaired mitochondrial energy metabolism in Alzheimer's disease: Impact on pathogenesis via disturbed epigenetic regulation of chromatin landscape. *Progress in neurobiology* 131, 1-20.

Sanchis-Gomar, F., Pareja-Galeano, H., Mayero, S., Perez-Quilis, C., and Lucia, A. (2014). New molecular targets and lifestyle interventions to delay aging sarcopenia. *Frontiers in aging neuroscience* 6, 156.

Santel, A., and Fuller, M.T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of cell science* 114: 867-874.

Sarou-Kanian, V., Joudiou, N., Louat, F., Yon, M., Szeremeta, F., Meme, S., Massiot, D., Decoville, M., Fayon, F., and Beloeil, J.C. (2015). Metabolite localization in living drosophila using High Resolution Magic Angle Spinning NMR. *Scientific reports* 5, 9872.

Sarup, P., Pedersen, S.M., Nielsen, N.C., Malmendal, A., and Loeschcke, V. (2012). The metabolic profile of long-lived *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 7, e47461.

Schneeberger, M., Dietrich, M.O., Sebastian, D., Imbernon, M., Castano, C., Garcia, A., Esteban, Y., Gonzalez-Franquesa, A., Rodriguez, I.C., Bortolozzi, A., *et al.* (2013). Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell* 155, 172-187.

Scholl-Burgi, S., Sass, J.O., Zschocke, J., and Karall, D. (2012). Amino acid metabolism in patients with propionic acidaemia. *Journal of inherited metabolic disease* 35, 65-70.

Schultz, J., Waterstradt, R., Kantowski, T., Rickmann, A., Reinhardt, F., Sharoyko, V., Mulder, H., Tiedge, M., and Baltrusch, S. (2016). Precise expression of Fis1 is important for glucose responsiveness 1 of beta cells. *J Endocrinology* (1):81-91.

Sebastian, D., Hernandez-Alvarez, M.I., Segales, J., Sorianello, E., Munoz, J.P., Sala, D., Waget, A., Liesa, M., Paz, J.C., Gopalacharyulu, P., *et al.* (2012). Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 5523-5528.

Sebastian, D., Sorianello, E., Segales, J., Irazoki, A., Ruiz-Bonilla, V., Sala, D., Planet, E., Berenguer-Llargo, A., Munoz, J.P., Sanchez-Feutrie, M., *et al.* (2016). Mfn2 deficiency links age-related sarcopenia and impaired autophagy to activation of an adaptive mitophagy pathway. *The EMBO journal* 35, 1677-1693.

Senderek, J., Bergmann, C., Ramaekers, V.T., Nelis, E., Bernert, G., Makowski, A., Züchner, S., De Jonghe, P., Rudnik-Schöneborn, S., Zerres, K., *et al.* (2003). Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1(GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy.

Shield, A.J., Murray, T.P., and Board, P.G. (2006). Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase. *Biochemical and biophysical research communications* 347, 859-866.

Showkat, M., Beigh, M.A., and Andrabi, K.I. (2014). mTOR Signaling in Protein Translation Regulation: Implications in Cancer Genesis and Therapeutic Interventions. *Molecular biology international* 2014, 686984.

Sivera, R., Espinós, C., Vílchez, J.J., Dolores, F.M., Martínez-Rubio, M.J., Mayordomo, F., Muelas, N., Bataller, L., Palau, F., and Sevilla, T. (2010). Phenotypical features of the p.R120W mutation in the GDAP1 gene causing autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* 15:334–344.

Sivera, R., Sevilla, T., Vílchez, J.J., Martínez-Rubio, D., Chumillas, M.J., Vázquez, J.F., Bataller, L., Millán, J.M., Palau, F., and Espinós, C. (2013). Charcot-Marie-Tooth disease spectrum GDAP1 Spanish population. *Neurology* 81, 1617–1625.

Soukup, S.F., Pocha, S.M., Yuan, M., and Knust, E. (2013). DLin-7 is required in postsynaptic lamina neurons to prevent light-induced photoreceptor degeneration in *Drosophila*. *Current biology : CB* 23, 1349-1354.

Stefanovic, D., Erikson, E., Pike, L.J., and Maller, J.L. (1986). Activation of a ribosomal protein S6 protein kinase in *Xenopus* oocytes by insulin and insulin-receptor kinase. *The EMBO journal* 5, 157-160.

Storkebaum, E., Leitao-Goncalves, R., Godenschwege, T., Nangle, L., Mejia, M., Bosmans, I., Ooms, T., Jacobs, A., Van Dijck, P., Yang, X.L., *et al.* (2009). Dominant mutations in the tyrosyl-tRNA synthetase gene recapitulate in *Drosophila* features of human Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 11782-11787.

Sun, F., Dai, C., Xie, J., and Hu, X. (2012). Biochemical Issues in Estimation of Cytosolic Free NAD/NADH Ratio. *Plos One* 7.e34525

Tagliabracci, V.S., Girard, J.M., Segvich, D., Meyer, C., Turnbull, J., Zhao, X., Minassian, B.A., Depaoli-Roach, A.A., and Roach, P.J. (2008). Abnormal metabolism of glycogen phosphate as a cause for Lafora disease. *The Journal of biological chemistry* 283, 33816-33825.

Terhzaz, S., Cabrero, P., Chintapalli, V.R., Davies, S.A., and Dow, J.A.C. (2010). Mislocalization of mitochondria and compromised renal function and oxidative stress resistance in *Drosophila* SesB mutants. *Physiol Genomics* 41, 33–41.

Theurey, P., and Rieusset, J. (2016). Mitochondria-Associated Membranes Response to Nutrient Availability and Role in Metabolic Diseases. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*.1183, 1-14

Thomas, P.K., and D.B., C. (1974). Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. II. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. *Arch Neurol* 18, 619-625.

Tubbs, E., Theurey, P., Vial, G., Bendridi, N., Bravard, A., Chauvin, M.A., Ji-Cao, J., Zoulim, F., Bartosch, B., Ovize, M., *et al.* (2014). Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane (MAM) Integrity Is Required for Insulin Signaling and Is Implicated in Hepatic Insulin Resistance. *Diabetes* 3:3279–3294.

Ulrich, E.L., Akutsu, H., Doreleijers, J.F., Harano, Y., Ioannidis, Y.E., Lin, J., Livny, M., Mading, S., Maziuk, D., Miller, Z., *et al.* (2008). *BioMagResBank*. *Nucleic acids research* 36, D402-408.

Verstreken, P., Ly, C.V., Venken, K.J., Koh, T.W., Zhou, Y., and Bellen, H.J. (2005). Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* 47, 365-378.

Verwaest, K.A., Vu, T.N., Laukens, K., Clemens, L.E., Nguyen, H.P., Van Gasse, B., Martins, J.C., Van Der Linden, A., and Dommissie, R. (2011). (1)H NMR based metabolomics of CSF and blood serum: a metabolic profile for a transgenic rat model of Huntington disease. *Biochimica et biophysica acta* 1812, 1371-1379.

Vital, A., Latour, P., Sole, G., Ferrer, X., Rouanet, M., Tison, F., Vital, C., and Goizet, C. (2012). A French family with Charcot-Marie-Tooth disease related to simultaneous heterozygous MFN2 and GDAP1 mutations. *Neuromuscular disorders : NMD* 22, 735-741.

Wagner, K.M., Rüegg, M., Niemann, A., and Suter, U. (2009). Targeting and Function of the Mitochondrial Fission Factor GDAP1 Are Dependent on Its Tail-Anchor. *Plos One* 4(4): e5160.

Walter, A., Korth, U., Hilgert, M., Hartmann, J., Weichel, O., Hilgert, M., Fassbender, K., Schmitt, A., and Klein, J. (2004). Glycerophosphocholine is elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Neurobiology of aging* 25, 1299-1303.

Wang, L., Karpac, J., and Jasper, H. (2013). Promoting longevity by maintaining metabolic and proliferative homeostasis. *Journal of Experimental Biology* 217, 109-118.

Weiss, S., Kohn, E., Dadon, D., Katz, B., Peters, M., Lebediker, M., Kosloff, M., Colley, N.J., and Minke, B. (2012). Compartmentalization and Ca²⁺ buffering are essential for prevention of light-induced retinal degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 14696-14708.

William, S.S., and Carlson, S.D. (1986). Ultrastructure of capitate projections in the optic neuropathology of Diptera. *Cell Tissue Res* 246, 481-486

Wishart, D.S., Jewison, T., Guo, A.C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., *et al.* (2013). HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic acids research* 41, D801-807.

Wozniak, A., Drewa, G., Wozniak, B., and Schachtschabel, D.O. (2004). Activity of antioxidant enzymes and concentration of lipid peroxidation products in selected tissues of mice of different ages, both healthy and melanoma-bearing. *Zeitschrift fur Gerontologie und Geriatrie* 37, 184-189.

Yan, J., Liu, X.H., Han, M.Z., Wang, Y.M., Sun, X.L., Yu, N., Li, T., Su, B., and Chen, Z.Y. (2015). Blockage of GSK3 β -mediated Drp1 phosphorylation provides neuroprotection in neuronal and mouse models of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 36, 211-227.

Yarosh, W., Monserrate, J., Tong, J.J., Tse, S., Le, P.K., Nguyen, K., Brachmann, C.B., Wallace, D.C., and Huang, T. (2008). The molecular mechanisms of OPA1-mediated optic atrophy in *Drosophila* model and prospects for antioxidant treatment. *PLoS genetics* 4, e6.

Yecies, J.L., Zhang, H.H., Menon, S., Liu, S., Yecies, D., Lipovsky, A.I., Gorgun, C., Kwiatkowski, D.J., Hotamisligil, G.S., Lee, C.H., *et al.* (2011). Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell metabolism* 14, 21-32.

Yi, D.G., and Huh, W.K. (2015). UDP-glucose pyrophosphorylase Ugp1 is involved in oxidative stress response and long-term survival during stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications* 467, 657-663.

Zhang, H.H., Lipovsky, A.I., Dibble, C.C., Sahin, M., and Manning, B.D. (2006). S6K1 regulates GSK3 under conditions of mTOR-dependent feedback inhibition of Akt. *Molecular cell* 24, 185-197.

Zhang, J., and Liu, F. (2014). Tissue-specific insulin signaling in the regulation of metabolism and aging. *IUBMB life* 66, 485-495.

Zhang, Q., Sun, X., Xiao, X., Zheng, J., Li, M., Yu, M., Ping, F., Wang, Z., Qi, C., Wang, T., *et al.* (2016). Maternal Chromium Restriction Leads to Glucose Metabolism Imbalance in Mice Offspring through Insulin Signaling and Wnt Signaling Pathways. *International journal of molecular sciences* 17.

Zhao, J., Lendahl, U., and Nister, M. (2013). Regulation of mitochondrial dynamics: convergences and divergences between yeast and vertebrates. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 951-976.

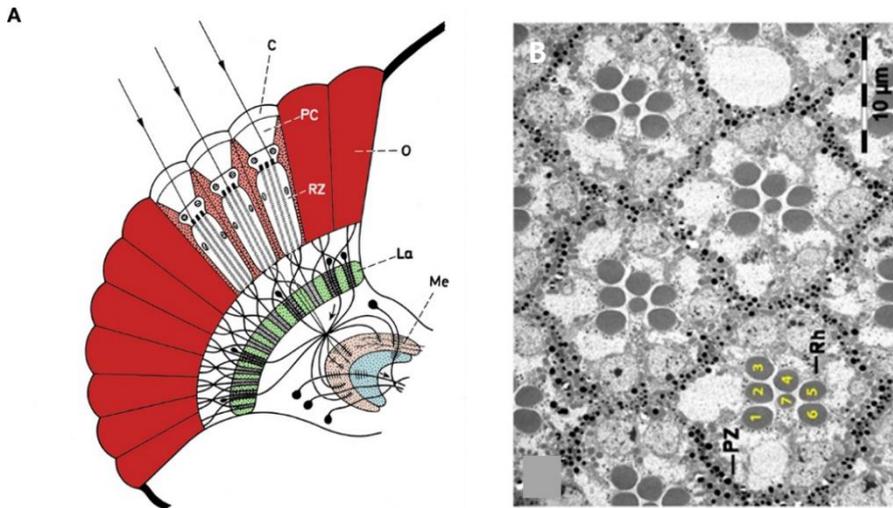
Zimón, M., Baets, J., Fabrizi, G.M., Jaakkola, E., Kabzinska, V., Pilch, J., Schindler, A.B., Cornblath, D.R., Fischbeck, K.H., Auer-Grumbach, M., Guelly, C., *et al.* (2011). Dominant GDAP1 mutations cause predominantly mild CMT phenotypes *Neurology* 77, 540-548

Zou, S., Meadows, S., Sharp, L., Jan, L., and Y.N., J. (2000). Genome-wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13726-13731.

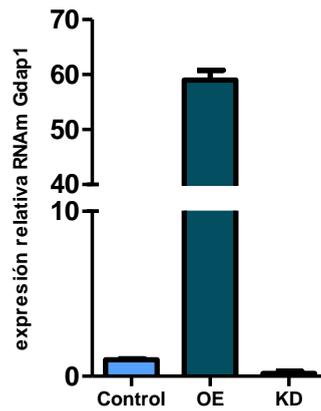
Zuchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., *et al.* (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nature genetics* 36, 449-451.

ANEXOS

Anexo 1. Anatomía del ojo compuesto de *Drosophila melanogaster*. (A) Representación esquemática de una sección horizontal. Lente de la córnea (C); pseudocono (PC); fotorreceptor (RZ); omatidio (O); lámina (La); médula (Me). (B) Sección del ojo de *Drosophila* para microscopía electrónica, se observan los 7 rabdómeros (Rh) y las células pigmentarias (PZ).



Anexo 2. Niveles de transcrito del gen *Gdap1* en extractos de mosca total, los genotipos OE y KD están relativizados frente a las moscas control. Se observan dos tendencias muy claras, una mayor expresión cuando sobreexpresamos *Gdap1* y una bajada cuando silenciamos el gen. De esta forma, demostramos que nuestros genotipos funcionan correctamente.



Anexo 3. Cebadores y sondas (Librería Universal de Roche) utilizadas en las clonaciones y PCR's cuantitativas del capítulo I.

Tabla/Anexo 3.1. Cebadores utilizados para la generación de las distintas cepas transgénicas. Todos los cebadores están representados siempre en dirección 5' a 3'.

Nombre	Cebador
Gdap1-F-5'	CCAAACTGTTTACTAGTTCTTC
Gdap1-R-5'	CCTTTGTCTGCTCGAGCATCTTG
Gdap1-F-3'	AGAGAGGGTACCATGAGCGAGCAGACAAAGGAAAT
Gdap1-R-3'	AGAGAGTCTAGAGCTGAACCCTGGTCAAGTCAAC
DsRed-F-	AGAGAGCTCGAGATGGCCTCCTCCGAGGACGTC
DsRed-R-	AGAGAGGGTACCGTACAGGAACAGGTGGTGGCG
UAS-CFP-F	TTATGATCAGTTATCTAGATCCGGTGG
UAS-CFP-R	GGAAGCGGCCGCTAGCGCTACCGGTCG

Tabla/Anexo 3.2. Se muestran los cebadores para los genes estudiados por PCR cuantitativa. Con ellos se abordaron diferentes aspectos del estrés oxidativo utilizando los tórax de moscas.

Gen	Cebadores	Sonda
<i>Gclc</i>	5' -TTAGCCACCCGGATTACAAG-3' 5' -GAATGATAGTCTTGTCCGAGCA-3'	39
<i>Gclm</i>	5' -AATCGCCACTCCACAGAGTC-3' 5' -CCACGTGCGTCACACTAAGTA-3'	25
<i>Trxr-1</i>	5' -CCCGGTGCTGTCGAGTAT-3' 5' -CGCACTCCAAGCCAATGTA-3'	9
<i>Sod2</i>	5' -AATTTGCAAACTGCAAGC-3' 5' -GACGTAGGTCTGGTGGTGCT-3'	9
<i>Gdap1</i>	5' -TACAACCTCCATGCGCAAAA-3' 5' -GGTCCACCACATAGGGAAAG-3'	143
<i>Gapdh1</i>	5' -GATCGGAATTAACGGATTTGG-3' 5' -ACATCGATGAAGGGATCGTT-3'	49

Anexo 4. Pares de cebadores y sondas (Librería Universal de Roche) utilizadas en las PCR cuantitativas. La siguiente tabla de cebadores fueron utilizados para estudiar distintos aspectos del metabolismo y de la ruta de la insulina, utilizando extractos de mosca completa y también tejidos por separado (cabeza, tórax y abdomen).

Gen	Cebadores	Sonda
<i>4ebp</i>	5' -CCAGATGCCCCGAGGTGTA-3' 5' -AGCCCGCTCGTAGATAAGTTT-3'	22
<i>Rp49</i>	5' -CGTTTACTGCGGCGAGAT-3' 5' -GCGCTCGACAATCTCCTT-3'	25
<i>Alt</i>	5' -GTTAGACGTCCGCCGTTTC-3' 5' -GTGAGCGCTTTCGACGAC-3'	5
<i>CG6178</i>	5' -GCCACTCTCGACTCACAAATC-3' 5' -GAACCAGGGAATGACAGTGAG-3'	25
<i>Dilp2</i>	5' -ATCCCGTGATTCCACACAAG-3' 5' -GCGGTTCCGATATCGAGTTA-3'	101
<i>Dilp5</i>	5' -GCCTTGATGGACATGCTGA-3' 5' -TCATAATCGAATAGGCCCAAG-3'	123
<i>Dilp6</i>	5' -CCCTTGCGATGTATTTCC-3' 5' -CAGTACTGCAAGAGCTCCCTGT-3'	83
<i>G-6Pase</i>	5' -GATCATTGGAATGGTGGTCTG-3' 5' -GCACTGGTGCAGAACTCG-3'	5
<i>PEPCK</i>	5' -CCAGGACAATTGCGGTCT-3' 5' -GCAAATCCACATTTCCATAGG-3'	5
<i>AKHR</i>	5' -GTCTGCAGCATTCCACAGG-3' 5' -ACTGAAAGTAGCCGGTGACG-3'	25
<i>PyrK</i>	5' -GGTGCCACTCATCTACAAGGA-3' 5' -CTTCTTTCCGACCTGCAGAC-3'	5
<i>Gapdh1</i>	5' -GATCGGAATTAACGGATTTGG-3' 5' -ACATCGATGAAGGGATCGTT-3'	49
<i>GlyP</i>	5' -TGGTCTCCAAGACCTACCAGA-3' 5' -GAGAATTTGCCGCTGGAC-3'	19
<i>GlyS</i>	5' -GCAGCTGTCCAGCTTTATGA-3' 5' -CCCTGGCCTGTCTGTAGTAAA-3'	80
<i>Hex</i>	5' -TGGCATTCTATCTTTTCTCTCCT-3' 5' -AACAAAAATCGAAAATCGATCC-3'	143

<i>InR</i>	5' -CCGGGATTACTGTACTGAACCT-3' 5' -CGCCTGCTAAAGGATCTGA-3'	5
<i>Ldh</i>	5' -ATACACCTCCTGGGCCATT-3' 5' -TCCTTGTCAATGCCATGTTC-3'	39
<i>Pdk</i>	5' -AAAGCAGTTCATGGACTTTGG-3' 5' -CTTACGGATCTGGTGTGCAA-3'	29
<i>Pdp</i>	5' -CCGGAGTCGGTGAATCAG-3' 5' -GGGGAGGAGTAGGCAAAGAA-3'	25

Anexo 5. Se muestran los metabolitos identificados y no identificados (U) por RMN, y sus rangos de integración en los espectros procedentes de los 3 análisis distintos. Se obtuvieron tres perfiles distintos: metabolitos polares (fase acuosa); metabolitos apolares (fase orgánica) y metabolitos polares y apolares (HR-MAS).

Tabla/Anexo 5.1. Se muestran los códigos pertenecientes a los picos representados en la figura R.10. Concretamente, estos picos corresponden a los metabolitos identificados y no identificados en la fase acuosa (perfil en morado) con sus límites de integración de los picos.

Código	Metabolito	Límite derecho	Límite izquierdo
1	Acetato	1,92	1,93
2	ADP	8,537	8,544
3	Alanina	1,47	1,5
4	Arginina	1,63	1,77
4	Arginina	1,94	1,96
4	Arginina	3,24	3,26
4	Arginina	3,77	3,79
5	Aspartato	2,682	2,7
5	Aspartato	2,79	2,84
6	ATP	8,544	8,553
2, 6	ATP/ADP	6,13	6,17
2, 6	ATP/ADP	4,37	4,44
2, 6	ATP/ADP	4,6	4,63
7	Betaína	3,89	3,9
8	Carnitina	3,39	3,41
9	Citrato	2,51	2,54
9	Citrato	2,64	2,67
10	Creatina	3,017	3,025
11	Etanol	1,16	1,21
12	Fenilalanina	3,14	3,16
U1	No identificado	8,43	8,44
14	Fructosa	3,98	4,01

15	Fumarato	6,5	6,55
16	Trehalosa	3,75	3,8
60	Glicina	3,565	3,572
59	Glucógeno	5,4	5,43
58	Glucosa	4,64	4,66
58	Glucosa	5,23	5,25
16	Trehalosa	2,34	2,37
17	Glutamina	2,11	2,17
17	Glutamina	2,43	2,49
18	GPC	3,22	3,23
19	GSH	4,56	4,59
20	GSSG	3,32	3,35
21	Histidina	7,09	7,11
21, 22	Histidina/ Xantina	7,89	7,9
23	Valina	0,98	1,01
24	Lactato	1,31	1,35
24	Lactato	4,09	4,1
25	Leucina	0,96	0,98
26	Lípidos	1,26	1,31
27	Lisina	3	3,01
57	Malato	2,62	2,64
29	Metanol	3,35	3,38
30	Mioinositol	3,52	3,54
31	N- acetilaspártato	2,02	2,03
31	N- acetilaspártato	2,7	2,72
32	NAD ⁺	6,04	6,06
32	NAD ⁺	6,09	6,11
32	NAD ⁺	8,83	8,85
32	NAD ⁺	9,14	9,16
32	NAD ⁺	9,34	9,35
33	Ornitina	1,79	1,81
34	Piruvato	2,37	2,38
35	Purina	8,6	8,62
36	Sarcosina	2,72	2,73
37	Succinato	2,4	2,42

38	Taurina	3,265	3,29
39	Tirosina	3,08	3,09
39	Tirosina	6,9	6,92
39	Tirosina	7,19	7,21
16	Trehalosa	3,84	3,88
16	Trehalosa	3,42	3,47
16	Trehalosa	3,64	3,67
16	Trehalosa	5,18	5,22
40	UDP-galactosa	5,97	6
40	UDP-galactosa	7,95	7,97
23	Valina	1,01	1,03
41, 42	Valerato/2-hidroxitirato	0,81	0,91
53	Guanosina	8	8,01
49	Pterina	8,34	8,36
23	Valina	1,03	1,06
43	Acetona	2,23	2,25
44, 45	GABA/ metionina sulfóxido	2,28	2,34
U2	No identificado	4,46	4,49
48	Isoleucina	0,927	0,934
48	Isoleucina	0,934	9,37
U4	No identificado	1,06	1,08
U5	No identificado	1,248	1,259
50	Glutamato	1,97	2,01
50	Glutamato	2,03	2,11
19, 20	GSH, GSSG	2,17	2,21
U3	No identificado	2,497	2,506
28	β -alanina	2,54	2,58
45	Metionina sulfóxido	2,75	2,77
19, 20	GSH, GSSG	2,91	2,92
19, 20	GSH, GSSG	2,92	2,96
44, 45	GABA/ metionina sulfóxido	3,046	3,054

44, 45	GABA/ metionina sulfóxido	3,054	3,068
44, 45	GABA/ metionina sulfóxido	3,068	3,077
28	β -alanina	3,17	3,2
18, 52	GPC/ Fosfatidilcolina	3,608	3,618
18, 52	GPC/ Fosfatidilcolina	3,618	3,637
56	Glicerol	3,675	3,69
19, 16	Glucosa/ Trehalosa	3,81	3,84
54	Glicolato	3,92	3,93
55, 32	AMP/ NAD ⁺	4,49	4,51
55, 32	AMP/ NAD ⁺	4,51	4,53
53	Guanosina	5,91	5,93
51	3- hidroxikinureni- na	6,69	6,73
46	Ftalato	7,38	7,43
51, 46	3-hidroxikineuri- na	7,47	7,49
47	Hipoxantina	7,94	7,98
47	Hipoxantina	8,17	8,19
47	Hipoxantina	8,19	8,22
2,6	ATP/ ADP	8,27	8,29
13	Formato	8,46	8,47
U9	No identificado	3,025	3,04
U6	No identificado	3,935	3,955
U7	No identificado	4,49	4,51
U8	No identificado	2,864	2,893

Tabla/Anexo 5.2. Se muestran los códigos pertenecientes a los picos indicados en la figura R.10. En este caso, corresponden a los metabolitos identificados en la fase orgánica (perfil en rojo) con sus límites de integración de los picos.

Código	Metabolito	Límite derecho	Límite izquierdo
61	Colesterol	0,620	0,650
62	Lípidos CH ₃	0,780	0,860
62	Lípidos CH ₃	0,860	0,920
63	Lípidos totales	1,220	1,270
63	Lípidos totales	1,270	1,350
64	Lípidos CH=CH	1,970	2,030
64	Lípidos CH=CH	2,030	2,080
65	Lípidos CH ₂ OCO	2,280	2,330
65	Lípidos CH ₂ OCO	2,330	2,380
66	Lípidos CH=CHCH ₂ CH=CH	2,730	2,790
66	Lípidos CH=CHCH ₂ CH=CH	2,790	2,830
67	TAG	4,12	4,18
67	TAG	4,27	4,31
67	TAG	5,23	5,28

Tabla/Anexo 5.3. Se muestran los códigos pertenecientes a los picos indicados en la figura R.10. Estos corresponden a los metabolitos identificados en el espectro realizado por HR-MAS (perfil rojo).

Código	Metabolito	Límite derecho	Límite izquierdo
61	Colesterol	0,620	0,650
62	Lípidos CH ₃	0,780	0,860
62	Lípidos CH ₃	0,860	0,920
63	Lípidos totales	1,220	1,270
63	Lípidos totales	1,270	1,350
64	Lípidos CH=CH	1,970	2,030
64	Lípidos CH=CH	2,030	2,080
65	Lípidos CH ₂ OCO	2,280	2,330
65	Lípidos CH ₂ OCO	2,330	2,380
66	Lípidos CH=CHCH ₂ CH=CH	2,730	2,790
66	Lípidos CH=CHCH ₂ CH=CH	2,790	2,830
67	TAG	4,12	4,18
67	TAG	4,27	4,31
62	Lípidos CH ₃	1,04	1,25
63	Lípidos totales	1,465	1,62
68	Lípidos CH ₂ COO	1,74	1,87
64	Lípidos CH=CH	2,2	2,32
65	Lípidos CH ₂ OCO	2,42	2,54
28	β-alanina	2,73	2,82
66	Lípidos CH=CHCH ₂ CH=CH	2,93	3,02
28	β-alanina	3,37	3,42
71	Fosfatidilcolina	3,42	3,46
38	Taurina	3,46	3,54

38	Taurina/trehalosa	3,61	3,67
16	Trehalosa	3,67	3,74
16	Trehalosa	3,78	3,94
70	Fosfatidiletanolamina	3,94	4,04
16	Trehalosa	4,04	4,13
69	Fosfolípidos	4,28	4,38
67	TAG	4,36	4,46
67	TAG/ Fosfolípidos	4,46	4,57
69	Fosfolípidos	4,62	4,77
69	Fosfolípidos/ trehalosa	5,39	5,44

Anexo 6. Tras la identificación de los picos, se procedió con la integración, para la cuantificación y búsqueda de cambios relevantes entre los distintos genotipos. Se muestra el valor medio correspondiente a 5 replicados por cada genotipo y su error estándar. Para los genotipos OE y KD también se muestra la significancia estadística en comparación al control. Todas las medias aparecen en azul; los valores utilizados en las figuras principales en amarillo y las diferencias significativas ($p < 0.05$) en rojo.

Tabla/Anexo 6.1. Datos pertenecientes a las áreas de los picos de los extractos de la fase acuosa para moscas de una semana.

Código	Metabolito	Control		OE			KD		
		Media	SEM	Media	SEM	p-valor	Mean	SEM	p-valor
1	Acetato	0,392	0,160	0,445	0,199	0,211	0,437	0,195	0,09
2	ADP	0,121	0,049	0,104	0,047	0,215	0,105	0,047	0,194
3	Alanina	1,378	0,563	1,476	0,66	0,745	1,287	0,576	0,762
4	Arginina	1,953	0,797	2,256	1,009	0,184	2,346	1,049	0,148
4	Arginina	0,322	0,132	0,366	0,164	0,224	0,346	0,155	0,331
4	Arginina	1,051	0,429	1,022	0,457	0,754	1,02	0,456	0,729
4	Arginina	5,944	2,427	5,789	2,589	0,568	5,667	2,534	0,466
5	Aspartato	0,127	0,052	0,137	0,061	0,330	0,135	0,06	0,695
5	Aspartato	0,274	0,112	0,295	0,132	0,409	0,276	0,123	0,969
6	ATP	0,118	0,048	0,149	0,067	0,221	0,13	0,058	0,567
2, 6	ATP/ADP	0,389	0,159	0,388	0,174	0,986	0,364	0,163	0,551

2, 6	ATP/ADP	0,821	0,335	0,883	0,395	0,322	0,776	0,347	0,476
2, 6	ATP/ADP	0,272	0,111	0,324	0,145	0,292	0,3	0,134	0,555
7	Betaina	0,391	0,160	0,395	0,177	0,920	0,396	0,177	0,822
8	Carnitina	0,227	0,092	0,372	0,167	0,059	0,194	0,087	0,440
9	Citrato	0,223	0,091	0,248	0,111	0,355	0,263	0,118	0,365
9	Citrato	0,213	0,087	0,236	0,105	0,276	0,246	0,11	0,363
10	Creatina	0,186	0,076	0,162	0,072	0,365	0,168	0,075	0,436
11	Etanol	0,769	0,314	0,91	0,407	0,161	0,876	0,392	0,33
12	Fenilalanina	0,224	0,091	0,214	0,096	0,703	0,221	0,099	0,918
U1	No identificado	0,063	0,026	0,069	0,031	0,276	0,063	0,028	0,945
14	Fructosa	1,203	0,491	1,411	0,631	0,134	1,287	0,575	0,477
15	Fumarato	0,059	0,024	0,075	0,034	0,561	0,076	0,034	0,531
16	Trehalosa	9,819	4,009	9,561	4,276	0,502	9,476	4,238	0,561
60	Glicina	0,108	0,044	0,112	0,050	0,802	0,136	0,061	0,282
59	Glucógeno	0,24	0,098	0,271	0,121	0,497	0,403	0,180	0,011
58	Glucosa	0,172	0,070	0,199	0,089	0,551	0,196	0,088	0,332
58	Glucosa	0,155	0,063	0,180	0,08	0,429	0,190	0,085	0,069
16	Trehalosa	0,526	0,215	0,639	0,286	0,287	0,543	0,243	0,894
17	Glutamina	2,552	1,042	2,473	1,106	0,782	2,235	0,999	0,309
17	Glutamina	2,087	0,852	1,97	0,881	0,623	1,83	0,818	0,311
18	GPC	3,194	1,304	2,954	1,321	0,590	2,579	1,153	0,164
19	GSH	0,172	0,070	0,217	0,097	0,204	0,173	0,077	0,961
20	GSSG	0,236	0,097	0,26	0,116	0,672	0,19	0,085	0,337
21	Histidina	0,268	0,109	0,299	0,134	0,296	0,291	0,13	0,322

21, 22	Histidina/ Xantina	0,218	0,089	0,241	0,108	0,378	0,234	0,105	0,425
23	Valina	0,286	0,117	0,358	0,160	0,081	0,3	0,134	0,703
24	Lactato	1,425	0,582	1,39	0,622	0,850	1,519	0,68	0,823
24	Lactato	0,071	0,029	0,081	0,036	0,290	0,073	0,032	0,845
25	Leucina	0,241	0,098	0,339	0,152	0,075	0,256	0,114	0,657
26	Lípidos	1,726	0,705	1,701	0,761	0,925	1,749	0,782	0,962
27	Lisina	0,151	0,062	0,134	0,060	0,207	0,141	0,063	0,371
57	Malato	0,075	0,031	0,089	0,040	0,262	0,112	0,05	0,295
29	Metanol	1,887	0,77	2,569	1,149	0,279	1,706	0,763	0,718
30	Mioinositol	0,193	0,079	0,198	0,089	0,823	0,176	0,079	0,347
31	N- acetilaspar- tato	0,311	0,127	0,348	0,155	0,151	0,316	0,141	0,886
31	N- acetilaspar- tato	0,123	0,050	0,138	0,062	0,178	0,135	0,06	0,585
32	NAD ⁺	0,054	0,022	0,067	0,030	0,226	0,061	0,027	0,487
32	NAD ⁺	0,076	0,031	0,081	0,036	0,602	0,069	0,031	0,378
32	NAD ⁺	0,07	0,029	0,082	0,037	0,254	0,076	0,034	0,586
32	NAD ⁺	0,074	0,030	0,084	0,038	0,349	0,079	0,035	0,662
32	NAD ⁺	0,061	0,025	0,067	0,030	0,284	0,061	0,027	0,945
33	Ornitina	0,151	0,062	0,175	0,078	0,423	0,189	0,084	0,257
34	Piruvato	0,168	0,068	0,169	0,076	0,956	0,169	0,075	0,984
35	Purina	0,148	0,060	0,116	0,052	0,371	0,119	0,053	0,420
36	Sarcosina	0,033	0,013	0,039	0,018	0,386	0,044	0,020	0,371

37	Succinato	0,541	0,221	0,482	0,216	0,480	0,545	0,244	0,952
38	Taurina	2,29	0,935	2,319	1,037	0,903	2,15	0,961	0,495
39	Tirosina	0,057	0,023	0,051	0,023	0,363	0,054	0,024	0,644
39	Tirosina	0,076	0,031	0,083	0,037	0,532	0,073	0,033	0,779
39	Tirosina	0,142	0,058	0,139	0,062	0,883	0,129	0,058	0,479
16	Trehalosa	9,805	4,003	9,344	4,179	0,608	10,518	4,704	0,498
16	Trehalosa	4,501	1,838	4,38	1,959	0,696	4,659	2,084	0,647
16	Trehalosa	4,901	2,001	4,745	2,122	0,685	5,378	2,405	0,305
16	Trehalosa	3,848	1,571	3,719	1,663	0,749	4,179	1,869	0,51
40	UDP-galactosa	0,102	0,042	0,117	0,052	0,315	0,102	0,046	0,979
40	UDP-galactosa	0,076	0,031	0,085	0,038	0,418	0,079	0,035	0,781
23	Valina	0,127	0,052	0,157	0,070	0,131	0,145	0,065	0,470
41, 42	Valerato/2-hidroxi-butirato	1,315	0,537	1,347	0,602	0,887	1,406	0,629	0,755
53	Guanosina	0,042	0,017	0,026	0,012	0,001	0,025	0,011	0,001
49	Pterina	0,061	0,025	0,054	0,024	0,432	0,049	0,022	0,119
23	Valina	0,32	0,131	0,491	0,219	0,230	0,403	0,18	0,227
43	Acetona	0,219	0,090	0,239	0,107	0,733	0,311	0,139	0,417
44, 45	GABA/metionina sulfóxido	1,258	0,514	1,184	0,529	0,562	1,294	0,579	0,822
U2	No identificado	0,877	0,358	0,933	0,417	0,790	0,773	0,346	0,549
48	Isoleucina	0,085	0,035	0,1	0,045	0,226	0,089	0,04	0,779

48	Isoleucina	0,045	0,018	0,042	0,019	0,613	0,041	0,018	0,502
U4	No identificado	0,117	0,048	0,182	0,081	0,303	0,172	0,077	0,241
U5	No identificado	0,773	0,316	0,79	0,353	0,832	0,822	0,368	0,696
50	Glutamato	0,428	0,175	0,563	0,252	0,040	0,472	0,211	0,625
50	Glutamato	1,264	0,516	1,509	0,675	0,070	1,281	0,573	0,933
19, 20	GSH, GSSG	0,514	0,210	0,664	0,297	0,180	0,633	0,283	0,333
U3	No identificado	0,147	0,060	0,29	0,130	0,010	0,137	0,061	0,785
28	β -alanina	2,253	0,920	1,956	0,875	0,071	1,963	0,878	0,057
45	Metionina sulfóxido	0,996	0,407	0,83	0,371	0,328	0,923	0,413	0,639
19, 20	GSH, GSSG	0,031	0,013	0,033	0,015	0,654	0,033	0,015	0,825
19, 20	GSH, GSSG	0,255	0,104	0,379	0,170	0,028	0,224	0,100	0,481
44, 45	GABA/ metionina sulfóxido	0,138	0,056	0,117	0,052	0,309	0,129	0,057	0,607
44, 45	GABA/ metionina sulfóxido	0,147	0,060	0,126	0,056	0,256	0,137	0,061	0,563
44, 45	GABA/ metionina sulfóxido	0,079	0,032	0,068	0,031	0,289	0,074	0,033	0,578
28	β -alanina	2,259	0,922	1,903	0,851	0,019	1,927	0,862	0,056
18, 52	GPC/Fosfatidilcolina	0,435	0,178	0,426	0,190	0,863	0,403	0,180	0,508

18, 52	GPC/Fosfatidilcolina	0,734	0,300	0,705	0,315	0,737	0,683	0,306	0,534
56	Glicerol	0,733	0,299	0,734	0,328	0,998	0,731	0,327	0,980
19, 16	Glucosa/Trehalosa	4,21	1,719	3,971	1,776	0,474	4,452	1,991	0,553
54	Glicolato	0,301	0,123	0,309	0,138	0,781	0,288	0,129	0,591
55, 32	AMP/ NAD ⁺	0,403	0,164	0,433	0,194	0,706	0,373	0,167	0,674
55, 32	AMP/ NAD ⁺	0,188	0,077	0,193	0,086	0,857	0,171	0,077	0,542
53	Guanosina	0,042	0,017	0,035	0,016	0,411	0,03	0,014	0,154
51	3-hidroxikineurenina	0,08	0,033	0,078	0,035	0,905	0,087	0,039	0,607
46	Ftalato	0,158	0,064	0,177	0,079	0,515	0,185	0,083	0,326
51, 46	3-hidroxikineurina	0,06	0,025	0,065	0,029	0,704	0,069	0,031	0,507
47	Hipoxantina	0,133	0,054	0,15	0,067	0,417	0,141	0,063	0,669
47	Hipoxantina	0,064	0,026	0,073	0,033	0,387	0,072	0,032	0,456
47	Hipoxantina	0,106	0,043	0,119	0,053	0,459	0,109	0,049	0,859
2,6	ATP/ ADP	0,246	0,100	0,251	0,112	0,830	0,237	0,106	0,777
13	Formato	0,035	0,014	0,055	0,025	0,329	0,054	0,024	0,238
U9	No identificado	0,265	0,108	0,234	0,105	0,289	0,242	0,108	0,362
U6	No identificado	1,062	0,433	1,096	0,490	0,812	0,969	0,433	0,438

U7	No identificado	0,403	0,058	0,433	0,057	0,706	0,373	0,039	0,673
U8	No identificado	0,208	0,085	0,218	0,097	0,641	0,218	0,098	0,683

Tabla/Anexo 6.2. Datos pertenecientes a las áreas de los picos de los extractos de la fase acuosa para moscas de cinco semanas.

Código	Metabolito	Control		OE			KD		
		Media	SEM	Media	SEM	p-valor	Media	SEM	p-valor
1	Acetato	0,401	0,018	0,383	0,016	0,454	0,436	0,026	0,299
2	ADP	0,089	0,005	0,082	0,006	0,399	0,085	0,003	0,515
3	Alanina	1,275	0,107	1,800	0,130	0,014	1,475	0,260	0,498
4	Arginina	2,516	0,304	2,251	0,127	0,444	2,560	0,164	0,901
4	Arginina	0,397	0,022	0,363	0,017	0,267	0,402	0,020	0,869
4	Arginina	0,989	0,030	0,996	0,037	0,884	1,067	0,015	0,047
4	Arginina	6,133	0,214	6,383	0,155	0,372	5,963	0,122	0,508
5	Aspartato	0,128	0,006	0,129	0,015	0,921	0,118	0,006	0,337
5	Aspartato	0,305	0,013	0,285	0,025	0,499	0,245	0,010	0,007
6	ATP	0,108	0,010	0,094	0,010	0,345	0,099	0,012	0,560
2, 6	ATP/ADP	0,303	0,017	0,287	0,017	0,539	0,300	0,012	0,908
2, 6	ATP/ADP	0,897	0,042	0,867	0,040	0,621	0,795	0,035	0,101
2, 6	ATP/ADP	0,340	0,010	0,304	0,020	0,142	0,291	0,021	0,072
7	Betaína	0,410	0,012	0,396	0,012	0,460	0,428	0,021	0,478
8	Carnitina	0,174	0,007	0,255	0,021	0,006	0,181	0,010	0,593
9	Citrato	0,243	0,020	0,248	0,029	0,905	0,231	0,011	0,594
9	Citrato	0,225	0,013	0,235	0,031	0,767	0,218	0,010	0,707
10	Creatina	0,212	0,013	0,190	0,009	0,209	0,184	0,010	0,131
11	Etanol	1,184	0,107	1,015	0,107	0,297	0,958	0,096	0,154
12	Fenilalanina	0,217	0,005	0,221	0,004	0,514	0,223	0,007	0,513

U1	No identificado	0,068	0,003	0,066	0,003	0,497	0,056	0,004	0,024
14	Fructosa	1,205	0,065	1,487	0,085	0,030	1,482	0,077	0,025
15	Fumarato	0,099	0,011	0,083	0,006	0,212	0,085	0,006	0,283
16	Trehalosa	9,995	0,323	10,445	0,255	0,305	9,962	0,131	0,927
60	Glicina	0,098	0,007	0,104	0,009	0,610	0,118	0,008	0,097
59	Glucógeno	0,318	0,051	0,260	0,026	0,349	0,525	0,032	0,009
58	Glucosa	0,169	0,015	0,177	0,018	0,742	0,213	0,014	0,071
58	Glucosa	0,153	0,004	0,147	0,009	0,512	0,205	0,013	0,005
16	Trehalosa	0,469	0,030	0,559	0,106	0,440	0,454	0,026	0,719
17	Glutamina	1,833	0,139	1,746	0,211	0,740	1,698	0,173	0,559
17	Glutamina	1,499	0,124	1,392	0,191	0,652	1,386	0,157	0,588
18	GPC	2,843	0,212	3,464	0,154	0,045	3,412	0,105	0,043
19	GSH	0,267	0,011	0,272	0,015	0,798	0,226	0,011	0,031
20	GSSG	0,185	0,010	0,205	0,038	0,622	0,148	0,006	0,017
21	Histidina	0,280	0,013	0,259	0,007	0,194	0,281	0,015	0,976
21, 22	Histidina/ Xantina	0,228	0,014	0,203	0,006	0,136	0,227	0,017	0,970
23	Valina	0,321	0,018	0,258	0,015	0,028	0,250	0,010	0,008
24	Lactato	1,624	0,217	1,170	0,160	0,130	1,397	0,164	0,429
24	Lactato	0,086	0,004	0,080	0,005	0,394	0,086	0,005	0,966
25	Leucina	0,262	0,016	0,224	0,008	0,062	0,214	0,007	0,025
26	Lípidos	2,126	0,449	1,578	0,295	0,337	1,488	0,228	0,241
27	Lisina	0,165	0,007	0,157	0,005	0,389	0,146	0,008	0,094
57	Malato	0,100	0,011	0,091	0,009	0,541	0,088	0,005	0,335
29	Metanol	1,918	0,413	2,056	0,372	0,810	1,979	0,227	0,900

30	Mioinositol	0,166	0,005	0,181	0,006	0,105	0,170	0,007	0,676
31	N-acetilaspartato	0,289	0,016	0,304	0,027	0,630	0,282	0,009	0,715
31	N-acetilaspartato	0,136	0,006	0,132	0,010	0,788	0,127	0,005	0,249
32	NAD ⁺	0,072	0,004	0,066	0,004	0,314	0,061	0,004	0,069
32	NAD ⁺	0,081	0,005	0,075	0,003	0,319	0,068	0,004	0,087
32	NAD ⁺	0,084	0,005	0,078	0,003	0,309	0,072	0,003	0,068
32	NAD ⁺	0,089	0,005	0,080	0,004	0,221	0,074	0,003	0,030
32	NAD ⁺	0,067	0,003	0,062	0,003	0,358	0,056	0,003	0,025
33	Ornitina	0,230	0,035	0,207	0,013	0,536	0,220	0,023	0,800
34	Piruvato	0,059	0,005	0,129	0,024	0,022	0,105	0,026	0,119
35	Purina	0,090	0,009	0,094	0,009	0,757	0,096	0,013	0,703
36	Sarcosina	0,045	0,003	0,042	0,003	0,532	0,040	0,002	0,265
37	Succinato	0,463	0,019	0,419	0,017	0,125	0,466	0,030	0,941
38	Taurina	2,899	0,114	3,011	0,090	0,464	2,778	0,104	0,454
39	Tirosina	0,064	0,003	0,056	0,003	0,117	0,054	0,004	0,067
39	Tirosina	0,083	0,004	0,073	0,003	0,084	0,070	0,003	0,032
39	Tirosina	0,134	0,004	0,112	0,004	0,007	0,115	0,006	0,032
16	Trehalosa	7,592	0,193	8,402	0,845	0,378	9,513	0,407	0,003
16	Trehalosa	3,901	0,198	4,161	0,266	0,455	4,430	0,121	0,052
16	Trehalosa	4,112	0,225	4,286	0,367	0,698	4,746	0,217	0,077
16	Trehalosa	3,138	0,271	3,350	0,407	0,676	3,561	0,180	0,229

40	UDP-galactosa	0,142	0,006	0,146	0,010	0,724	0,098	0,006	0,001
40	UDP-galactosa	0,106	0,003	0,108	0,008	0,8206	0,078	0,003	0,0002
23	Valina	0,168	0,013	0,132	0,008	0,051	0,130	0,005	0,030
41, 42	Valerato/2-hidroxi-butirato	1,863	0,192	1,520	0,146	0,193	1,403	0,111	0,072
53	Guanosina	0,051	0,006	0,027	0,001	0,004	0,028	0,001	0,004
49	Pterina	0,061	0,006	0,049	0,002	0,099	0,056	0,005	0,528
23	Valina	0,357	0,023	0,294	0,022	0,080	0,284	0,012	0,023
43	Acetona	0,553	0,091	0,506	0,120	0,761	0,530	0,132	0,888
44, 45	GABA/metionina sulfóxido	1,506	0,070	1,330	0,069	0,111	1,320	0,029	0,041
U2	No identificado	1,402	0,066	1,424	0,040	0,778	1,135	0,070	0,024
48	Isoleucina	0,119	0,007	0,098	0,005	0,047	0,092	0,006	0,018
48	Isoleucina	0,053	0,003	0,043	0,003	0,033	0,042	0,002	0,016
U4	No identificado	0,164	0,022	0,117	0,013	0,099	0,122	0,010	0,117
U5	No identificado	1,170	0,098	1,010	0,148	0,393	1,028	0,137	0,421
50	Glutamato	0,456	0,041	0,482	0,061	0,731	0,433	0,032	0,679
50	Glutamato	1,349	0,077	1,435	0,162	0,642	1,207	0,045	0,149
19, 20	GSH, GSSG	0,545	0,033	0,506	0,045	0,506	0,484	0,023	0,170

U3	No identificado	0,110	0,013	0,177	0,017	0,012	0,103	0,004	0,630
28	β -alanina	1,577	0,056	1,275	0,107	0,043	1,367	0,068	0,077
45	Metionina sulfóxido	1,329	0,122	1,086	0,103	0,168	1,065	0,095	0,125
19, 20	GSH, GSSG	0,036	0,002	0,034	0,002	0,537	0,030	0,001	0,027
19, 20	GSH, GSSG	0,227	0,013	0,286	0,013	0,012	0,212	0,004	0,299
44, 45	GABA/ metionina sulfóxido	0,174	0,014	0,144	0,012	0,135	0,141	0,011	0,099
44, 45	GABA/ metionina sulfóxido	0,176	0,010	0,146	0,010	0,068	0,142	0,010	0,04
44, 45	GABA/ metionina sulfóxido	0,092	0,006	0,077	0,005	0,106	0,076	0,005	0,076
28	β -alanina	1,532	0,065	1,293	0,135	0,149	1,430	0,085	0,368
18, 52	GPC/Fosfatidilcolina	0,535	0,025	0,545	0,016	0,727	0,528	0,016	0,827
18, 52	GPC/Fosfatidilcolina	0,875	0,038	0,909	0,021	0,452	0,908	0,032	0,517
56	Glicerol	0,909	0,037	0,930	0,025	0,644	0,933	0,028	0,612
19, 16	Glucosa/ Trehalosa	3,496	0,224	3,636	0,322	0,729	4,133	0,192	0,063
54	Glicolato	0,358	0,012	0,367	0,008	0,541	0,350	0,008	0,590
55, 32	AMP/ NAD ⁺	0,608	0,026	0,609	0,019	0,974	0,508	0,027	0,028
55, 32	AMP/ NAD ⁺	0,202	0,010	0,198	0,011	0,800	0,192	0,014	0,602

53	Guanosina	0,062	0,008	0,036	0,002	0,015	0,039	0,003	0,031
51	3-hidroxiki-neurenina	0,102	0,011	0,073	0,005	0,039	0,077	0,003	0,055
46	Ftalato	0,210	0,018	0,173	0,015	0,162	0,171	0,007	0,083
51, 46	3-hidroxiki-neurina	0,081	0,009	0,068	0,006	0,235	0,067	0,003	0,160
47	Hipoxantina	0,178	0,008	0,172	0,011	0,663	0,139	0,005	0,003
47	Hipoxantina	0,077	0,004	0,069	0,003	0,164	0,066	0,003	0,062
47	Hipoxantina	0,136	0,010	0,120	0,005	0,179	0,113	0,002	0,045
2,6	ATP/ ADP	0,188	0,010	0,176	0,013	0,503	0,183	0,010	0,742
13	Formato	0,077	0,015	0,060	0,005	0,320	0,060	0,004	0,295
U9	No identificado	0,159	0,010	0,162	0,009	0,831	0,175	0,009	0,272
U6	No identificado	0,092	0,005	0,103	0,008	0,291	0,115	0,010	0,082
U7	No identificado	0,065	0,002	0,061	0,002	0,167	0,067	0,003	0,568
U8	No identificado	0,066	0,003	0,066	0,002	0,943	0,070	0,004	0,439

Tabla/Anexo 6.3. Datos pertenecientes a las áreas de los picos de los extractos de la fase orgánica para moscas de una semana.

Código	Metabolito	Control		OE			KD		
		Media	SEM	Media	SEM	p-valor	Media	SEM	p-valor
61	Colesterol	0,025	0,007	0,066	0,051	0,432	0,059	0,019	0,131
62	Lípidos CH3	4,114	0,646	5,616	1,705	0,442	6,799	1,482	0,143
62	Lípidos CH3	6,971	0,261	5,618	0,175	0,013	6,306	0,480	0,271
63	Lípidos totales	54,398	6,122	61,384	7,643	0,545	48,816	5,649	0,550
63	Lípidos totales	20,179	2,654	13,468	0,940	0,115	20,669	3,178	0,913
64	Lípidos CH=CH	2,723	0,517	1,139	0,179	0,067	2,584	0,527	0,864
64	Lípidos CH=CH	1,104	0,219	0,607	0,080	0,150	1,337	0,305	0,568
65	Lípidos CH2OCO	2,526	0,527	1,028	0,203	0,085	2,250	0,390	0,709
65	Lípidos CH2OCO	0,610	0,097	0,830	0,334	0,543	0,923	0,120	0,093
66	Lípidos CH=CHCH2C H=CH	0,335	0,063	0,328	0,120	0,966	0,479	0,096	0,265
66	Lípidos CH=CHCH2C H=CH	0,157	0,039	0,179	0,088	0,829	0,236	0,053	0,282

67	TAG	1,026	0,199	0,680	0,134	0,283	1,033	0,146	0,982
67	TAG	0,797	0,174	0,376	0,060	0,129	0,709	0,118	0,712
67	TAG	0,455	0,093	0,304	0,073	0,327	0,465	0,074	0,939

Tabla/Anexo 6.4. Datos pertenecientes a las áreas de los picos de los extractos de la fase orgánica para moscas de cinco semanas.

Código	Metabolito	Control		OE			KD		
		Media	SEM	Media	SEM	p-valor	Media	SEM	p-valor
61	Colesterol	0,053	0,010	0,052	0,008	0,946	0,064	0,010	0,459
62	Lípidos CH3	5,715	1,229	4,381	0,214	0,316	5,036	0,229	0,602
62	Lípidos CH3	6,264	0,386	6,233	0,462	0,960	5,776	0,524	0,474
63	Lípidos totales	37,670	2,040	35,879	2,109	0,559	34,375	2,107	0,294
63	Lípidos totales	22,016	1,204	22,483	1,687	0,827	20,555	2,163	0,571
64	Lípidos CH=CH	3,392	0,182	3,700	0,253	0,353	3,195	0,387	0,658
64	Lípidos CH=CH	1,532	0,061	1,773	0,069	0,031	1,799	0,119	0,081
65	Lípidos CH2OCO	2,371	0,263	2,141	0,409	0,648	1,720	0,338	0,167
65	Lípidos CH2OCO	1,315	0,054	1,445	0,082	0,225	1,445	0,104	0,299

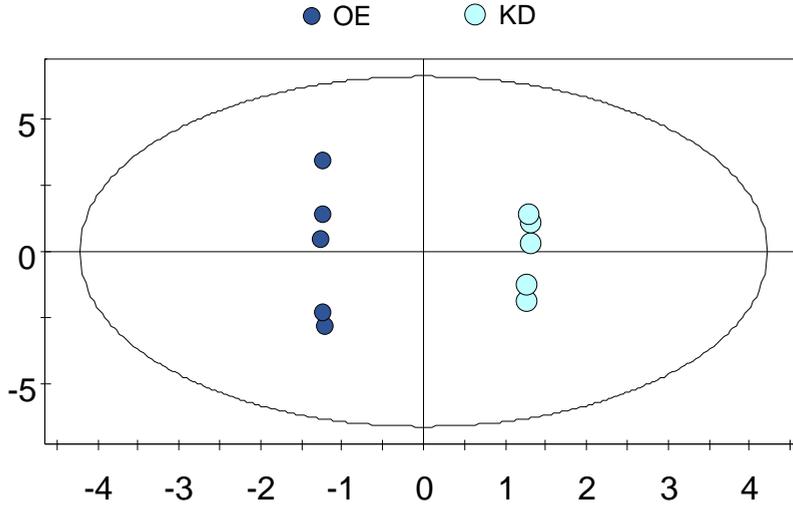
66	Lípidos CH=CHCH ₂ C H=CH	0,470	0,018	0,512	0,019	0,156	0,598	0,050	0,043
66	Lípidos CH=CHCH ₂ C H=CH	0,243	0,010	0,306	0,020	0,023	0,305	0,020	0,024
67	TAG	1,246	0,059	1,276	0,128	0,837	1,089	0,172	0,413
67	TAG	0,666	0,098	0,516	0,121	0,368	0,441	0,074	0,105
67	TAG								

Tabla/Anexo 6.5. Áreas de los picos HR-MAS procedente de moscas de cinco semanas.

Código	Metabolito	Control		OE			KD		
		Media	SEM	Media	SEM	p-valor	Media	SEM	p-valor
62	Lípidos CH3	1,061	0,510	1,183	0,072	0,823	1,283	0,331	0,732
63	Lípidos totales	9,447	0,271	5,477	0,444	0,002	6,447	1,026	0,047
68	Lípidos CH2COO	0,932	0,057	0,488	0,045	0,004	0,557	0,150	0,080
64	Lípidos CH=CH	1,109	0,131	0,802	0,045	0,090	0,778	0,167	0,194
65	Lípidos CH2OCO	0,698	0,057	0,338	0,051	0,009	0,387	0,091	0,044
28	β-alanina	0,128	0,014	0,078	0,007	0,029	0,089	0,026	0,253
66	Lípidos CH=CHCH2C H=CH	0,087	0,006	0,072	0,003	0,102	0,052	0,019	0,158
28	β-alanina	0,115	0,004	0,087	0,003	0,005	0,114	0,020	0,936
71	Fosfatidil-colina	0,232	0,032	0,221	0,038	0,844	0,249	0,051	0,779
38	Taurina	0,349	0,031	0,280	0,018	0,129	0,242	0,042	0,109
38	Taurina/trehalosa	0,166	0,022	0,134	0,020	0,336	0,145	0,031	0,610
16	Trehalosa	0,162	0,014	0,122	0,016	0,132	0,118	0,022	0,161
16	Trehalosa	0,526	0,036	0,416	0,060	0,189	0,437	0,062	0,279
70	Fosfatidil-	0,645	0,060	0,490	0,073	0,176	0,504	0,074	0,214

	etalonami- na								
16	Trehalosa	0,456	0,040	0,348	0,048	0,157	0,406	0,053	0,495
69	Fosfolípidos	0,265	0,038	0,161	0,017	0,066	0,156	0,016	0,056
67	TAG	0,232	0,026	0,173	0,005	0,090	0,129	0,021	0,035
67	TAG/Fosfo- lípidos	0,243	0,037	0,146	0,030	0,112	0,118	0,019	0,040
69	Fosfolípidos	0,168	0,017	0,119	0,025	0,182	0,083	0,025	0,050
69	Fosfolípido/t rehalosa	0,140	0,012	0,098	0,001	0,027	0,126	0,019	0,582
69	Fosfolípidos	0,180	0,030	0,114	0,011	0,109	0,153	0,019	0,497

Anexo 7. Se muestra el OPLS-DA comparativo entre los genotipos OE y KD. Esto nos permite estar seguros que ambos genotipos son distintos desde un punto de vista metabólico.



Anexo 8. Tabla de anticuerpos utilizados en células de mamífero (SH-SY5Y).

Anticuerpo	Dilución	Compañía
β -actina (ratón)	1:2000	Cell Signaling (3700)
AKT (conejo)	1:1000	Cell Signaling (9272)
AKT fosforilado (conejo)	1:1000	Cell Signaling (9271)
GSK (conejo)	1:1000	Cell Signaling (9315)
GSK fosforilado (conejo)	1:1000	Cell Signaling (9331)
mTORC1 (conejo)	1:1000	Cell Signaling (2972)
mTORC1 fosforilado (conejo)	1:1000	Cell Signaling (2971)
4ebp (conejo)	1:1000	Cell Signaling (9452)
4ebp fosforilado (conejo)	1:1000	Cell Signaling (2855)
S6 (ratón)	1:1000	Cell Signaling (2317)
S6 fosforilado (conejo)	1:1000	Cell Signaling (2215)
Anti-ratón IgG (anticuerpo secundario)	1:15000	Cell Signaling (5257)
Anti-conejo IgG (anticuerpo secundario)	1:15000	Cell Signaling (5366)