




**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Tesi Doctoral**

**Hepatoencefalopatia deguda a mutacions en *GFM1*:  
obtenció d'un model de ratolí modificat genèticament i  
estudi preclínic de teràpia gènica amb vectors  
adenoassociats**

**Miguel Molina Berenguer**

Tesi adscrita al **Programa de Doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina**

Treball realitzat al **Grup de Recerca de Patologia Neuromuscular i Mitocondrial**  
de l'Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR)

Directors

**Dr. Javier Torres Torronteras**

**Dr. Ramon Martí Seves**

Tutora

**Dra. Assumpció Bosch Merino**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**2023**







## AGRAÏMENTS

Tot i que el temps m'ha passat volant, ja fa prop de 5 anys que vaig començar aquesta aventura. Una etapa plena d'emocions que m'ha format professionalment, però sobretot m'ha ajudat molt a créixer a nivell personal. Tot això ha sigut possible gràcies a vosaltres: la gent que sempre heu estat al meu costat, així com els qui he tingut la sort de conèixer i m'heu donat suport.

En primer lloc, vull donar les gràcies al grup Patologia Neuromuscular i Mitocondrial, així com els companys/es del VHIR amb qui he compartit dia a dia:

**Ramon**, per obrir-me la porta del grup, creure en les meues capacitats, transmetre'm part del teus coneixements i fer possible aquesta tesi. **Javi Torres**, perquè fent recerca colze amb colze m'has ensenyat que amb resiliència i bon humor sempre és més fàcil superar obstacles i tirar endavant projectes com aquest. **Yoli i Tomàs**, per les contínues mostres d'interès, saber escoltar, donar suport i tenir la capacitat per treure'm més d'un somriure. **M<sup>a</sup> Jesús**, per la teua paciència i organització per tal que mai ens faltés res. **Ferran**, per estar sempre predisposat a tirar-me una maneta i aconsellar-me, fent que fora molt agradable treballar i aprendre amb tu. **Cora, David, Alberto i Guille**, per la bona acollida que em vau donar als meus inicis, la vostra simpatia i les cervesetes compartides. **Javi R, Sandra, Toni, Sergi, Aitana, Monica, Antoni, Andrea, Pau, Bernat** i la resta de gent que heu anat passant pel laboratori, per cada granet de sorra que cadascú heu aportat, així com per haver contribuït a que hi haguessin moments dolços i bon ambient al grup.

**Núria, Marina, Alba, Joan, Galiano, Anabel, Thais** i la resta de companyes del grup de Malalties Neurodegeneratives, gràcies per les converses compartides i per comptar amb mi per a moltes de les vostres celebracions.

A **Raquel** i la resta de personal de l'estabulari, **Teresa** d'anatomia patològica, personal de la UAT, personal de neteja, coordinació de laboratoris i celadors, perquè la vostra feina i el tracte rebut han sigut magnífics.

D'altra banda, quan estàs lluny de casa és important sentir-se acompanyat, i jo sempre he tingut la sensació d'estar-ho. Bona part de culpa l'heu tingut vosaltres:

**Ismael i Moisès**, gràcies per els soparets, tertúlies, nits de futbol i intents de pelis que van fer que la nostra convivència i confinament foren tan agradables. **Juan i Jose**, em quede amb les vostres anècdotes que tants moments de riure ens han donat. Junt amb la resta de Kiwis (**Macarena, Loli, Esther, Nuria, Mireia, Celia, Fer, Lázaro, Piedad i Laura**), gràcies per treure una proposta diferent per cada cap de setmana, compartir les nostres penes i alegries, així com les famoses cases rurals, entre d'altres moments inoblidables.

Evidentment, gràcies a tu **Miriam**, perquè cada dia has estat al meu costat, m'has ajudat a valorar-me i a superar cada obstacle que se m'ha presentat, donant-me ànims i regalant-me innumerables moments de felicitat. També és d'agrair l'acollida per part de la teua família i amistats, ja que m'heu fet sentir molt afortunat.

També he tingut sort amb **Joan** a les classes de pilates, així com amb els companys de **muixeranga** que durant els últims mesos m'heu ajudat a desconnectar.

**Fran, Camil, Anna, Cris** i la resta de "**Limonos**", malgrat la distància em trobat moments per retrobar-nos, posar-nos al dia i riure recordant moltes de les nostres anècdotes.

Per últim, gràcies als de casa, per fer que siga complicat oblidar-me d'on vinc:

Als meus **amics de sempre** i als **amics levantins**, amb qui és un plaer trobar-se quan torne al poble, organitzar combois i viure junts tants moments especials.

A la meua **família**, per estimar-me, preocupar-se per mi i mostrar-se orgullosos pel que faig. En especial a tu **pare**, per respectar i recolzar les meues decisions. **Eva**, per donar-me suport en els moments més difícils. I sobretot gràcies a tu **mare**, perquè sempre has confiat en mi, i cada dia m'has escoltat i animat per seguir endavant. Eres la meua referent i l'orgull és meu per tenir-te al costat.

**laia i iaio**, sempre m'acompanyarà el vostre somriure, així com la satisfacció i felicitat que despreníeu quan vos contava el que feia a Barcelona. Aquesta tesi va per vosaltres.

## ENTITATS FINANÇADORES

Els projectes de recerca que han permès el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral han estat promoguts en gran mesura per part de la **Fundación Mencía**, que, liderada per Isabel Lavín, s'encarrega d'impulsar la recerca translacional de malalties minoritàries amb origen genètic, greus i incurables actualment. Aquesta entitat, junt amb la **Fundació La Caixa** i la **Fundación Mutua Madrileña** han donat el suport econòmic necessari per dur a terme aquest treball.



La meua contractació laboral durant aquests anys ha estat efectuada per part del propi **grup de recerca de Patologia Neuromuscular i Mitocondrial**, primerament a través del **CIBER** (Centro de Investigación Biomédica en Red, Instituto de Salud Carlos III) i més tard per mitjà del **VHIR** (Institut de Recerca Vall d'Hebron).







## RESUM

L'hepatoencefalopatia deguda a mutacions en *GFM1*, també coneguda com a deficiència combinada de la fosforilació oxidativa de tipus 1 (COXPD1), és una malaltia mitocondrial recessiva causada per mutacions al gen nuclear que codifica el factor d'elongació de la traducció mitocondrial G1 (EFG1). Els pacients solen manifestar una greu encefalopatia lligada sovint a insuficiència hepàtica, d'aparició neonatal i progressió ràpida, que normalment desencadena la mort durant les primeres setmanes o anys de vida.

Fins ara, l'estudi de la COXPD1 s'ha dut a terme principalment sobre models *in vitro* (línies cel·lulars i biòpsies derivades de pacients). Tot i que aquests són altament útils, la manca d'un model animal apropiat ha representat fins l'actualitat una limitació important per tal d'aprofundir en la fisiopatologia de la malaltia i testar potencials aproximacions terapèutiques.

En aquest treball s'han generat dos al·lels mutants per a el gen *Gfm1* murí: un al·lel *knock-in* (KI) amb la mutació antisentit p.R671C, identificada en almenys 10 pacients que han sobreviscut més d'un any, i un al·lel *knock-out* (KO). Aquests han permès obtenir el model de ratolí homozigot KI (*Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*) i l'heterozigot compost KI/KO (*Gfm1<sup>R671C/-</sup>*).

La mutació KO en homozigosi va resultar letal durant el desenvolupament embrionari, mentre que els ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* van ser viables i mostraren un creixement normal. La mutació p.R671C va comportar una reducció dràstica de la quantitat de proteïna EFG1 mitocondrial a tots els teixits estudiats, causant als ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* una reducció de la taxa de traducció mitocondrial i de l'activitat del complex IV (CIV) de la cadena respiratòria (RC) en fetge a les 6 setmanes d'edat. L'afectació de la traducció mitocondrial es va mantenir a les 50 setmanes d'edat, però va deixar d'observar-se l'afectació del CIV.

El model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*, amb supervivència normal almenys fins les 80 setmanes d'edat, va manifestar una reducció d'EFG1 més pronunciada en mitocondris de fetge i cervell en comparació amb els ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*. En conseqüència, els animals *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* de 8 i 30 setmanes d'edat van experimentar una disminució

significativa de la traducció mitocondrial *de novo* als dos teixits diana que, al seu torn, va donar lloc a una disfunció clara del sistema OXPHOS: nivells inferiors dels complexos I i IV acoblats, amb la reducció subsegüent de les seues activitats enzimàtiques. Malgrat això, als ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* no es va detectar cap alteració patològica a nivell hepàtic o neuromuscular associada al fenotip COXPD molecular. A més a més, es van observar increments dels nivells de mitoriboproteïnes i d'ARNmt al fetge i cervell d'aquest model murí, que podrien ser indicatius de mecanismes moleculars de resposta possiblement compensatoris davant el dèficit d'EFG1.

D'altra banda, actualment no existeix una cura per a la COXPD1, i la naturalesa de la malaltia (monogènica, autosòmica i recessiva) situa la teràpia gènica com a una possible estratègia apropiada per al seu tractament. Al segon bloc de la tesi es va iniciar un estudi preclínic de teràpia gènica utilitzant vectors adenoassociats (rAAV) per introduir una còpia correcta del gen *GFM1* humà als ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*. Una única injecció intravenosa d'un vector AAV9 amb la seqüència codificant de *GFM1* sota el control del promotor de l'alfa-1-antitripsina humana, d'expressió hepàtica, (ssAAV9-hAAT-GFM1) en ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* de 6 setmanes d'edat ( $5 \cdot 10^{12}$  gv/kg), va donar lloc a una recuperació parcial de la quantitat d'EFG1 mitocondrial al fetge a les 4 setmanes del tractament. Addicionalment, va restituir els nivells dels complexos I i IV acoblats i de les seues activitats enzimàtiques al teixit diana, demostrant la funcionalitat de l'EFG1 codificada pel gen terapèutic.

Per tant, a partir del treball realitzat en aquesta tesi s'ha obtingut el ratolí *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* amb un fenotip molecular disfuncional (afectació de la traducció mitocondrial i deficiència combinada del sistema OXPHOS). Tot i que el model no reproduïx el fenotip clínic de la malaltia, les clares disfuncions moleculars que presenta el situen com a un bon model animal de la COXPD1. A més a més, els resultats de l'estratègia preclínica investigada mostren que l'ús de rAAV per proveir de la versió correcta del gen *GFM1* aconsegueix recuperar la funció d'EFG1 de forma eficaç, apuntant a la teràpia gènica com a una estratègia factible i prometedora per al tractament de la COXPD1.

## RESUMEN

La hepatoncefalopatía debida a mutaciones en *GFM1*, también conocida como deficiencia combinada de la fosforilación oxidativa de tipo I (COXPD1), es una enfermedad mitocondrial recesiva causada por mutaciones en el gen nuclear que codifica el factor de elongación de la traducción mitocondrial G1 (EFG1). Los pacientes suelen manifestar una encefalopatía grave, combinada a menudo con insuficiencia hepática, de aparición neonatal y progresión rápida, que normalmente desencadena la muerte durante las primeras semanas o años de vida.

Hasta la fecha, el estudio de la COXPD1 se ha llevado a cabo principalmente sobre modelos *in vitro* (líneas celulares y biopsias derivadas de pacientes). Aunque estos son de gran utilidad, la falta de un modelo animal apropiado ha representado hasta ahora una limitación importante para poder profundizar en la fisiopatología de la enfermedad y testar potenciales aproximaciones terapéuticas.

En este trabajo se han generado dos alelos mutantes para el gen *Gfm1* murino: un alelo *knock-in* (KI) con la mutación antisentido p.R671C, identificada al menos en 10 pacientes que han sobrevivido más de un año, y un alelo *knock-out* (KO). Estos han permitido obtener el modelo de ratón homocigoto KI (*Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*) y el heterocigoto compuesto KI/KO (*Gfm1<sup>R671C/-</sup>*).

La mutación KO en homocigosis resultó letal durante el desarrollo embrionario, mientras que los ratones *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* fueron viables y mostraron un crecimiento normal. La mutación p.R671C dio lugar a una reducción drástica de la cantidad de proteína EFG1 mitocondrial en todos los tejidos estudiados, causando en los ratones *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* una reducción de la tasa de traducción mitocondrial y de la actividad del complejo IV (CIV) de la cadena respiratoria (RC) en hígado a las 6 semanas de edad. La afectación de la traducción mitocondrial se mantuvo a las 50 semanas de edad, pero dejó de observarse la afectación del CIV.

El modelo *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*, con supervivencia normal al menos hasta las 80 semanas de edad, manifestó una reducción de EFG1 más pronunciada en mitocondrias de hígado y cerebro en comparación con los ratones *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*. En consecuencia, los animales *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* de 8 y 30 semanas de edad experimentaron una

disminución significativa de la traducción mitocondrial *de novo* en los tejidos diana, que, a su vez, dio lugar a una disfunción clara del sistema OXPHOS: niveles inferiores de los complejos I y IV ensamblados, junto con la reducción consiguiente de sus actividades enzimáticas. A pesar de esto, en los ratones *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* no se detectó ninguna alteración patológica a nivel hepático o neuromuscular asociada al fenotipo COXPD molecular. Además, se observaron incrementos de los niveles de mitoriboproteínas y de ARNmt en el hígado y cerebro de este modelo de ratón, los cuales podrían ser indicativos de mecanismos moleculares de respuesta posiblemente compensatorios ante el déficit de EFG1.

Por otra parte, actualmente no existe una cura para la COXPD1, y la naturaleza de la enfermedad (monogénica, autosómica y recesiva) sitúa la terapia génica como una posible estrategia apropiada para su tratamiento. En el segundo bloque de la tesis se inició un estudio preclínico de terapia génica utilizando vectores adenoasociados (rAAV) para introducir una copia correcta del gen *GFM1* humano en los ratones *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*. Una única inyección intravenosa de un AAV9 con la secuencia de *GFM1* bajo el control del promotor de la alfa-1-antitripsina humana, de expresión hepática, (ssAAV9-hAAT-GFM1) en ratones *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* de 6 semanas de edad ( $5 \cdot 10^{12}$  gv/kg), dio lugar a una recuperación parcial de la cantidad de EFG1 mitocondrial en el hígado a las 4 semanas del tratamiento. Asimismo, se restituyeron los niveles de los complejos I y IV ensamblados y de sus actividades enzimáticas en el tejido diana, demostrando la funcionalidad de la proteína EFG1 codificada por el gen terapéutico.

Por lo tanto, a partir del trabajo realizado en esta tesis se ha obtenido el ratón *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* con un fenotipo molecular disfuncional (afectación de la traducción mitocondrial y deficiencia combinada del sistema OXPHOS). Aunque el modelo no reproduce el fenotipo clínico de la enfermedad, las claras alteraciones moleculares que presenta lo sitúan como un buen modelo animal de la COXPD1. Además, los resultados de la estrategia preclínica investigada muestran que el uso de rAAV para proveer de la versión correcta del gen *GFM1* consigue recuperar la función de EFG1 de forma eficaz, apuntando a la terapia génica como una estrategia factible y prometedora para el tratamiento de la COXPD1.

## ABSTRACT

The hepatoencephalopathy due to mutations in *GFM1*, also known as combined oxidative phosphorylation deficiency type I (COXPD1) is a recessive mitochondrial disease caused by mutations in the nuclear gene encoding the mitochondrial translation elongation factor G1 (EFG1). Patients with COXPD1 usually develop a severe encephalopathy, sometimes combined with liver failure, with neonatal onset and rapid progression that normally leads to death during the first weeks or years of life.

The study of COXPD1 has been so far performed mainly using *in vitro* models (cell lines and patient-derived biopsies). Although these experimental tools are useful, the lack of a suitable animal model has represented an important limitation to delve into the disease physiopathology and test potential therapeutic approaches.

We have generated two mutant alleles for the *Gfm1* murine gene: a knock-in allele (KI) harbouring the missense mutation p.R671C found in at least ten patients that survived more than one year, and a *Gfm1* knock-out allele (KO). These alleles allowed us to obtain homozygous KI (*Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>) and compound heterozygous KI/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>) mice.

The homozygous KO mutation was embryonically lethal, whereas *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> mice were viable and showed normal growth. The p.R671C mutation entailed a drastic reduction of EFG1 mitochondrial protein levels in every analysed tissue, causing a decrease of the mitochondrial translation rate and the respiratory chain (RC) complex IV (CIV) enzyme activity in liver of 6-week-old *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> mice. At 50 weeks of age, the mitochondrial translation was similarly reduced but CIV deficiency was no longer observed.

The *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> mouse model, which showed normal survival at least until 80 weeks of age, experienced a more pronounced decrease of EFG1 protein levels in liver and brain mitochondria, as compared with the *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> mice. Consequently, 8 and 30-week-old *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> animals developed a significant reduction of the mitochondrial translation rate in both tissues which, in turn, caused a clear OXPHOS system dysfunction: reduced levels of the assembled complexes I and IV, together

with the consequent decrease of their enzymatic activities. Nevertheless, no neuromuscular or hepatic alterations were detected in association with the molecular COXPD phenotype in *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* mice. Moreover, the increase of mitoriboproteins and mtARN levels in liver and brain from this mouse model could be part of molecular response mechanisms promoted to compensate the EFG1 depletion.

On the other hand, there is no currently available cure for COXPD1, and the nature of the disease (monogenic, autosomal and recessive) makes it a good candidate to be treated with gene therapy. In the second part of the thesis we initiated a preclinical gene therapy study using adeno-associated viral vectors (rAAV) to introduce the correct copy of the human *GFM1* gene into *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* mice. A single intravenous injection of an AAV9 carrying the *GFM1* coding sequence under the control of the human alpha-1-antitripsin hepatic promoter (ssAAV9-ApoE-hAAT-GFM1) on 6-week-old *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* mice ( $5 \cdot 10^{12}$  vg/kg) partially recovered the mitochondrial EFG1 levels four weeks after treatment. Additionally, the treatment restored the levels of assembled complexes I and IV and their enzymatic activities in the target tissue, demonstrating the functionality of the EFG1 encoded by the therapeutic gene.

Therefore, from the work performed in this thesis we obtained the *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* mouse showing a dysfunctional molecular phenotype (impaired mitochondrial translation and combined OXPHOS deficiency). Although our model does not recapitulate the clinical phenotype of the disease, the clear molecular alterations observed in the *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* mouse make it a suitable animal model for COXPD1. Moreover, the results of our gene therapy study show that using rAAV to provide the correct version of the *GFM1* gene results in the restoration of the EFG1 function, pointing to gene therapy as a feasible and promising strategy for the treatment of COXPD1.

# ÍNDEX

<b>1. ABREVIACIONS</b> .....	<b>29</b>
<b>2. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>35</b>
<b>2.1. Malalties mitocondrials</b> .....	<b>37</b>
2.1.1. El mitocondri i el sistema OXPHOS .....	37
2.1.2. Genètica de les malalties mitocondrials .....	39
2.1.3. Import de les proteïnes mitocondrials codificades a l'ADNn .....	42
2.1.4. Replicació i manteniment de l'ADNmt .....	43
2.1.5. Transcripció de l'ADNmt .....	44
2.1.6. Traducció mitocondrial .....	45
2.1.7. Malalties causades per defectes en la traducció mitocondrial .....	47
2.1.7.1. Defectes de traducció mitocondrial deguts a mutacions a l'ADNmt .....	48
2.1.7.2. Defectes de traducció mitocondrial deguts a mutacions a l'ADNn .....	48
<b>2.2. Hepatoencefalopatia deguda a mutacions en <i>GFM1</i></b> .....	<b>50</b>
2.2.1. Expressió i funció d'EFG1 a la traducció mitocondrial .....	50
2.2.2. Mutacions patogèniques en <i>GFM1</i> .....	52
2.2.3. Quadre clínic dels pacients amb COXPD1 .....	54
2.2.4. Models d'estudi de la COXPD1 .....	57
2.2.4.1. Fibroblasts i biòpsies de pacients amb COXPD1 .....	57
2.2.4.1.1. Estudis de complementació i cerca de compostos terapèutics sobre fibroblasts de pacients .....	59
2.2.4.2. Cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSCs) .....	61
2.2.4.3. Models per a estudis <i>in vivo</i> .....	61
<b>2.3. El ratolí com a model per a estudis <i>in vivo</i> de malalties mitocondrials</b> ...	<b>64</b>
2.3.1. Generació de ratolins modificats genèticament .....	64
2.3.1.1. Estratègies de mutagènesi aleatòria .....	65
2.3.1.2. Edició gènica basada en la recombinació homòloga .....	65
2.3.1.3. Edició gènica per CRISPR/Cas9 .....	66
2.3.2. Models de ratolí per l'estudi de la traducció mitocondrial .....	68
2.3.2.1. Ratolins modificats genèticament a <i>Gfm1</i> .....	71
<b>2.4. Teràpia gènica per al tractament de malalties mitocondrials</b> .....	<b>72</b>



2.4.1. Introducció a la teràpia gènica .....	72
2.4.1.1. Sistemes de transferència gènica.....	73
2.4.2. Virus adenoassociats (AAV).....	75
2.4.2.1. Característiques moleculars dels AAV.....	76
2.4.2.2. Cicle víric dels AAV .....	77
2.4.2.3. Serotips i tropisme dels AAV .....	80
2.4.3. Vectors AAV recombinants (rAAV).....	81
2.4.3.1. Opcions de millora i avantatges dels rAAV.....	82
2.4.3.2. Assajos clínics i productes terapèutics basats en rAAV .....	83
2.4.3.3. El fetge com a diana per a la teràpia gènica amb rAAV .....	84
2.4.3.4. Teràpia gènica sobre malalties mitocondrials causades per mutacions a l'ADNn .....	85
<b>3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS .....</b>	<b>89</b>
<b>3.1. Hipòtesis.....</b>	<b>91</b>
<b>3.2. Objectius .....</b>	<b>92</b>
<b>4. MATERIAL I MÈTODES .....</b>	<b>93</b>
<b>4.1. Disseny experimental.....</b>	<b>95</b>
4.1.1. Generació i caracterització del model <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> .....	96
4.1.2. Generació i caracterització del model <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> .....	97
4.1.3. Teràpia gènica amb rAAV per a la COXPD1 .....	99
<b>4.2. Generació dels models de ratolí .....</b>	<b>100</b>
<b>4.3. Procediments d'experimentació animal.....</b>	<b>103</b>
4.3.1. Condicions d'estabulació.....	103
4.3.2. Genotipatge .....	104
4.3.2.1. Detecció de l'al·lel <i>knock-in Gfm1<sup>R671C</sup></i> .....	104
4.3.2.2. Detecció de l'al·lel <i>knock-out Gfm1<sup>-</sup></i> .....	106
4.3.3. Avaluació de la condició física i el fenotip neuromuscular .....	107
4.3.3.1. Test <i>weight-lift</i> .....	107
4.3.3.2. Test <i>hanging wire</i> .....	108
4.3.3.3. <i>Treadmill running</i> .....	108
4.3.3.4. Test <i>rotarod</i> .....	109
4.3.4. Injecció intravenosa dels rAAV.....	109

4.3.5. Sacrifici i obtenció de mostres.....	109
4.3.5.1. Sang.....	110
4.3.5.2. Teixits.....	110
<b>4.4. Metodologia general.....</b>	<b>111</b>
4.4.1. Extracció d'ADN .....	111
4.4.1.1. Extracció d'ADN total pel mètode de fenol-cloroform.....	111
4.4.1.2. Extracció d'ADN total pel mètode de fenol-cloroform simplificat .....	112
4.4.1.3. Extracció d'ADN total mitjançant un kit comercial .....	113
4.4.1.4. Extracció d'ADN plasmídic per Miniprep .....	113
4.4.1.5. Extracció d'ADN plasmídic per Maxiprep .....	113
4.4.2. Extracció d'ARN mitjançant el reactiu <i>TRizol</i> .....	114
4.4.3. Quantificació de la concentració d'àcids nucleics .....	114
4.4.4. Anàlisi de qualitat de l'ARN .....	115
4.4.5. Electroforesi en gels d'agarosa .....	115
4.4.6. Quantificació de la concentració proteica .....	116
<b>4.5. Obtenció d'extractes mitocondrials de teixits .....</b>	<b>116</b>
<b>4.6. Western blot SDS-PAGE .....</b>	<b>118</b>
4.6.1. Solubilització de proteïnes .....	118
4.6.1.1. Solubilització de proteïnes mitocondrials .....	118
4.6.1.2. Solubilització de proteïnes totals de teixit .....	118
4.6.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS .....	119
4.6.3. Transferència.....	120
4.6.4. Immunodetecció i revelat .....	121
<b>4.7. Western blot BN-PAGE .....</b>	<b>123</b>
4.7.1. Solubilització d'extractes mitocondrials.....	123
4.7.2. Electroforesi BN-PAGE .....	123
4.7.3. Transferència i immunodetecció .....	124
<b>4.8. Estudis de co-migració en gradients de sacarosa .....</b>	<b>125</b>
4.8.1. Obtenció dels extractes ribosòmics .....	125
4.8.2. Preparació dels gradients de sacarosa .....	126
4.8.3. Subfraccionament en gradient de sacarosa.....	126
4.8.4. Recol·lecció de les fraccions i precipitació proteica .....	127

4.8.5. Anàlisi de les fraccions del gradient per western blot SDS-PAGE.....	127
<b>4.9. Traducció mitocondrial <i>in organello</i> .....</b>	<b>128</b>
4.9.1. Experiments <i>pulse</i> .....	128
4.9.2. Experiments <i>pulse-chase</i> .....	129
4.9.3. SDS-PAGE, tinció del gel, exposició i revelat dels films .....	130
4.9.4. Quantificació del marcatge radioactiu i anàlisi .....	131
<b>4.10. Anàlisi de número de còpies d'ADN per qPCR .....</b>	<b>132</b>
4.10.1. Número de còpies d'ADNmt .....	132
4.10.2. Número de còpies de vector adenoassociat .....	134
<b>4.11. Estudis d'expressió gènica .....</b>	<b>134</b>
4.11.1. Tractament amb DNasa .....	135
4.11.2. Transcripció inversa .....	135
4.11.3. RT-qPCR per l'anàlisi dels nivells d'ARN de gens diana .....	136
4.11.3.1. Gens codificats a l'ADNn .....	136
4.11.3.2. Gens codificats a l'ADNmt .....	137
4.11.4. Anàlisi de l'ARNm <i>Gfm1 knock-out</i> amb gels d'agarosa.....	137
<b>4.12. Determinacions bioquímiques .....</b>	<b>139</b>
4.12.1. Activitats enzimàtiques dels complexos de la CTE .....	139
4.12.1.1. Preparació d'homogenats proteics en tampó manitol .....	139
4.12.1.2. Determinació de les activitats enzimàtiques .....	140
4.12.1.3. Càlcul de les activitats enzimàtiques específiques .....	142
4.12.2. Determinació de marcadors bioquímics en plasma .....	143
4.12.2.1. Activitat alanina aminotransferasa .....	143
4.12.2.2. Altres marcadors bioquímics .....	144
<b>4.13. Anàlisi histoquímica de fetge.....</b>	<b>144</b>
4.13.1. Tinció tricròmica de Masson.....	145
4.13.2. Immunohistoquímica Ki-67 .....	146
<b>4.14. Construcció del vector ssAAV9-hAAT-GFM1 .....</b>	<b>147</b>
4.14.1. Digestió dels plasmidis amb enzims de restricció .....	148
4.14.1.1. Digestió de pMK-RQ-GFM1-Insert.....	149
4.14.1.2. Digestió de pSMD2-hAAT-UGT1A1.....	149
4.14.2. Purificació d'un fragment d'ADN a partir del gel d'agarosa.....	150

4.14.3. Desfosforilació i lligació de fragments d'ADN .....	150
4.14.3.1. Desfosforilació .....	150
4.14.3.2. Lligació.....	151
4.14.4. Producció i transformació de cèl·lules quimiocompetents .....	151
4.14.5. Cultiu de bacteris.....	152
4.14.6. Comprovació del clonatge per digestions enzimàtiques .....	153
4.14.7. Seqüenciació .....	154
4.14.8. Producció, purificació i titulació dels rAAV .....	154
<b>4.15. Anàlisis estadístiques.....</b>	<b>155</b>
<b>5. RESULTATS .....</b>	<b>157</b>
<b>5.1. Model de ratolí homozigot knock-in <i>Gfm1</i><sup>R671C/R671C</sup> .....</b>	<b>159</b>
5.1.1. Generació del ratolí <i>Gfm1</i> <sup>R671C/R671C</sup> .....	159
5.1.2. Seguiment de pes i estudi de supervivència .....	160
5.1.3. Efecte de la mutació p.R671C sobre els nivells d'EFG1 .....	161
5.1.4. Avaluació del perfil COXPD molecular al fetge.....	163
5.1.4.1. Disfunció de la traducció mitocondrial.....	163
5.1.4.2. Afectació de la CTE i el sistema OXPHOS al fetge .....	164
5.1.5. Interacció d'EFG1 <sup>R671C</sup> amb les subunitats del mitoribosoma.....	168
5.1.6. Avaluació de la condició física i fenotip hepàtic .....	171
5.1.6.1. Tests d'exercici físic.....	171
5.1.6.2. Estudi de l'afectació hepàtica.....	172
5.1.7. Cerca de mecanismes moleculars de resposta .....	174
5.1.7.1. Expressió de factors implicats a la traducció mitocondrial .....	174
5.1.7.2. Número de còpies d'ADNmt.....	176
5.1.7.3. Nivells d'ARN mitocondrials .....	176
<b>5.2. Model de ratolí heterozigot compost <i>Gfm1</i><sup>R671C/-</sup> .....</b>	<b>178</b>
5.2.1. Generació del ratolí <i>Gfm1</i> <sup>R671C/-</sup> .....	178
5.2.2. Anàlisi de pes i supervivència .....	179
5.2.3. Quantificació dels nivells mitocondrials d'EFG1 .....	181
5.2.4. Afectació de la traducció mitocondrial.....	184
5.2.5. Anàlisi del fenotip COXPD molecular al fetge i cervell .....	186

5.2.5.1. Reducció dels nivells de subunitats dels complexos CI i CIV .....	186
5.2.5.2. Alteració dels nivells de complexos OXPHOS .....	188
5.2.5.3. Afectació de les activitats enzimàtiques de la CTE.....	189
5.2.6. Anàlisi de marcadors bioquímics en plasma .....	191
5.2.7. Estudi histològic del fenotip hepàtic .....	193
5.2.8. Avaluació de l'exercici físic i fenotip neuromuscular .....	195
5.2.9. Cerca de mecanismes moleculars de resposta al fetge i cervell .....	196
5.2.9.1. Estat basal d'altres factors d'elongació de la traducció mitocondrial .....	197
5.2.9.2. Massa mitocondrial.....	197
5.2.9.3. Número de còpies d'ADNmt .....	198
5.2.9.4. Nivells d'ARN mitocondrials.....	199
5.2.9.5. Quantitat mitocondrial de MRPs .....	200
<b>5.3. Teràpia gènica amb rAAV sobre el model de ratolí <i>Gfm1</i><sup>R671C/-</sup> .....</b>	<b>202</b>
5.3.1. Generació del vector ssAAV9-hAAT-GFM1 .....	202
5.3.2. Anàlisi de l'efecte de la teràpia.....	204
5.3.2.1. Determinació de la transducció del rAAV en fetge i cervell .....	205
5.3.2.2. Avaluació de l'eficàcia de la teràpia sobre el fetge .....	206
5.3.2.2.1. Expressió del gen terapèutic .....	206
5.3.2.2.2. Efecte sobre el sistema OXPHOS .....	208
<b>6. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>215</b>
<b>6.1. Models de ratolí amb fenotip COXPD1 molecular.....</b>	<b>218</b>
6.1.1. Efecte dels al·lels mutants de <i>Gfm1</i> sobre la proteïna EFG1 .....	218
6.1.2. Disfunció de la traducció mitocondrial i del sistema OXPHOS .....	222
6.1.3. Absència de fenotip neuromuscular i hepàtic COXPD1.....	227
6.1.4. Estimulació de mecanismes moleculars de resposta .....	230
6.1.5. Alternatives i perspectives de futur del model <i>Gfm1</i> <sup>R671C/-</sup> .....	233
<b>6.2. Teràpia gènica amb rAAV sobre el model <i>Gfm1</i><sup>R671C/-</sup> .....</b>	<b>235</b>
6.2.1. Estratègia preclínica plantejada .....	235
6.2.2. Transducció dels teixits diana i expressió hepàtica del gen terapèutic ...	237
6.2.3. Correcció del perfil COXPD molecular del fetge .....	239
6.2.4. Translació de la teràpia gènica als pacients amb COXPD1 .....	242

<b>7. CONCLUSIONS .....</b>	<b>245</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>249</b>
<b>9. ANNEX 1: FIGURES SUPLEMENTÀRIES .....</b>	<b>271</b>
<b>10. ANNEX 2: PUBLICACIÓ DERIVADA DE LA TESI .....</b>	<b>281</b>



## ÍNDIX DE FIGURES

<b>Figura 2.1.</b> Sistema OXPPOS i ADNmt.....	38
<b>Figura 2.2.</b> Processos implicats en la traducció mitocondrial i la biogènesi del sistema OXPPOS.....	41
<b>Figura 2.3.</b> Traducció mitocondrial en humans. ....	47
<b>Figura 2.4.</b> Model estructural i interaccions d'EFG1. ....	51
<b>Figura 2.5.</b> Funció d'EFG1 a la fase d'elongació de la traducció mitocondrial. ....	52
<b>Figura 2.6.</b> Mapa de les mutacions patogèniques identificades a la proteïna EFG1. ....	53
<b>Figura 2.7.</b> Manifestacions clíniques identificades en pacients amb COXPD1.....	55
<b>Figura 2.8.</b> Arbre filogenètic del factor EFG1 mitocondrial humà, de ratolí i d'altres espècies procariotes i eucariotes. ....	62
<b>Figura 2.9.</b> Sistemes de generació de ratolins modificats genèticament. ....	67
<b>Figura 2.10.</b> Malalties que consten d'assaigs clínics amb productes basats en teràpia gènica. ....	73
<b>Figura 2.11.</b> Vectors de teràpia gènica utilitzats en assaigs clínics. ....	73
<b>Figura 2.12.</b> Esquema del genoma dels AAV.....	77
<b>Figura 2.13.</b> Transducció i cicle viral dels AAV. ....	79
<b>Figura 2.14.</b> Biologia dels vectors adenoassociats. ....	81
<b>Figura 4.1.</b> Disseny experimental. ....	95
<b>Figura 4.2.</b> Línia temporal de la caracterització del model <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> .....	96
<b>Figura 4.3.</b> Línia temporal de la caracterització del model <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> . ....	97
<b>Figura 4.4.</b> Línia temporal de l'estratègia de teràpia gènica amb ssAAV9-hAAT-GFM1 sobre el model <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> . ....	99
<b>Figura 4.5.</b> Aparellaments i fons genètic dels models <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> i <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> . ....	102
<b>Figura 4.6.</b> Canvi de fons genètic del model <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> utilitzat a la teràpia gènica. ....	103
<b>Figura 4.7.</b> PCRs per analitzar l'ARNm de l'al·lel <i>Gfm1</i> en fetge i cervell. ....	138
<b>Figura 4.8.</b> Reaccions enzimàtiques per la determinació de l'activitat ALT. ....	143
<b>Figura 4.9.</b> Esquema del vector ssAAV9-hAAT-GFM1. ....	147
<b>Figura 4.10.</b> Obtenció del plasmidi pSMD2-hAAT-GFM1 .....	148



<b>Figura 5.1.</b> Generació del ratolí <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> .....	159
<b>Figura 5.2.</b> Seguiment de pes i estudi de supervivència del ratolí <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> .....	160
<b>Figura 5.3.</b> Expressió de <i>Gfm1</i> als ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> a les 6 setmanes d'edat. ....	161
<b>Figura 5.4.</b> Nivells d'EFG1 en homogenats totals de fetge i cervell als ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Figura 5.5.</b> Traducció mitocondrial al fetge del model <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> .....	164
<b>Figura 5.6.</b> Activitats enzimàtiques dels complexos de la CTE en fetge de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> .....	165
<b>Figura 5.7.</b> Nivells de subunitats del CIV en mitocondris de fetge de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> .....	166
<b>Figura 5.8.</b> Complexos OXPHOS en mitocondris de fetges de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> .....	168
<b>Figura 5.9.</b> Efecte de la mutació p.R671C sobre la interacció EFG1-mitoribosoma. ....	170
<b>Figura 5.10.</b> Tests d'exercici físic sobre ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> .....	172
<b>Figura 5.11.</b> Avaluació de l'afectació hepàtica als ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> .....	173
<b>Figura 5.12.</b> Expressió de factors de traducció mitocondrial en fetge i cervell de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> .....	175
<b>Figura 5.13.</b> Número de còpies d'ADNmt en fetge i cervell de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> .....	176
<b>Figura 5.14.</b> Nivells d'ARN mitocondrials en fetge i cervell de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> .....	177
<b>Figura 5.15.</b> Generació de l'al·lel <i>knock-out</i> de <i>Gfm1</i> . ....	178
<b>Figura 5.16.</b> Pes corporal total, de fetge i cervell al model <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> .....	180
<b>Figura 5.17.</b> Estudi de supervivència del ratolí <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> .....	181
<b>Figura 5.18.</b> Expressió d'EFG1 en fetge i cervell de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> de 8 setmanes d'edat. ....	182
<b>Figura 5.19.</b> Anàlisi de l'ARNm <i>Gfm1</i> en fetge i cervell. ....	183
<b>Figura 5.20.</b> Traducció mitocondrial en fetge i cervell de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> de 8 setmanes d'edat. ....	184
<b>Figura 5.21.</b> Experiments <i>pulse-chase</i> en mitocondris de fetge de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> .....	186

<b>Figura 5.22.</b> Nivells de subunitats dels complexos I i IV en fetge i cervell dels ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> de 8 setmanes d'edat. ....	187
<b>Figura 5.23.</b> Complexos OXPHOS en mitocondris de fetge i cervell de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> a les 8 setmanes d'edat. ....	189
<b>Figura 5.24.</b> Activitats enzimàtiques dels complexos de la CTE en fetge i cervell de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> a les 8 setmanes d'edat. ....	190
<b>Figura 5.25.</b> Activitats ALT i AST al plasma de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> . ....	191
<b>Figura 5.26.</b> Seguiment de la concentració de TGs al plasma de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> . ....	192
<b>Figura 5.27.</b> Histologia de fetge en ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> de 8 setmanes d'edat. ....	193
<b>Figura 5.28.</b> Histologia de fetge en ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> de 30 setmanes d'edat. ....	194
<b>Figura 5.29.</b> Immunohistoquímica Ki-67 sobre fetges de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> . ....	195
<b>Figura 5.30.</b> Tests d'exercici físic i neuromusculars sobre el model <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> . ....	196
<b>Figura 5.31.</b> Factors de traducció mitocondrial en fetge i cervell de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> . ....	197
<b>Figura 5.32.</b> Anàlisi de proteïnes indicadores de massa mitocondrial al fetge i cervell del model <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> . ....	198
<b>Figura 5.33.</b> Número de còpies d'ADNmt en fetge i cervell de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> joves. ....	199
<b>Figura 5.34.</b> Nivells d'ARN mitocondrials en fetge i cervell de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> . ....	199
<b>Figura 5.35.</b> Nivells de les MRPs en mitocondris de fetge i cervell als ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> joves. ....	200
<b>Figura 5.36.</b> Obtenció del plasmidi pSMD2-hAAT i l'insert <i>GFM1</i> . ....	202
<b>Figura 5.37.</b> Comprovació del clonatge de pSMD2-hAAT-GFM1 per digestions enzimàtiques. ....	203
<b>Figura 5.38.</b> Pes corporal total i de fetge dels ratolins de l'estudi de teràpia gènica 4 setmanes post-tractament. ....	204
<b>Figura 5.39.</b> Número de còpies de vector al fetge dels ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> tractats amb ssAAV9-hAAT-GFM1. ....	206
<b>Figura 5.40.</b> Nivells d'EFG1 en mitocondris de fetge de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> tractats amb ssAAV9-hAAT-GFM1. ....	207

<b>Figura 5.41.</b> Correlació entre el grau de transducció de ssAAV9-hAAT-GFM1 i l'EFG1 mitocondrial al fetge de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> .....	208
<b>Figura 5.42.</b> Nivells de subunitats del CI i CIV en mitocondris de fetge de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> tractats amb ssAAV9-hAAT-GFM1. ....	209
<b>Figura 5.43.</b> Estat dels complexos OXPHOS al fetge de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> tractats amb ssAAV9-hAAT-GFM1.....	211
<b>Figura 5.44.</b> Activitats enzimàtiques de CI i CIV al fetge de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> tractats amb ssAAV9-hAAT-GFM1.....	212
<b>Figura 6.1.</b> Conservació dels aminoàcids R671 i D695 d'EFG1 entre espècies.....	219
<b>Figura 6.2.</b> Efecte de l'estratègia preclínica de teràpia gènica sobre el model de ratolí <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> .....	240
<b>Figura suplementària 1.</b> Nivells d'EFG1 en homogenats de gastrocnemi de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/R671C</sup></i> a les 6 setmanes d'edat. ....	273
<b>Figura suplementària 2.</b> Nivells d'EFG1 en mitocondris de fetge i cervell de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> a les 30 setmanes d'edat. ....	273
<b>Figura suplementària 3.</b> Traducció mitocondrial en fetge i cervell de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> de 30 setmanes d'edat.....	274
<b>Figura suplementària 4.</b> Nivells de subunitats dels complexos I i IV en fetge i cervell dels ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> de 30 setmanes d'edat. ....	275
<b>Figura suplementària 5.</b> Complexos OXPHOS en mitocondris de fetge i cervell de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> a les 30 setmanes d'edat.....	276
<b>Figura suplementària 6.</b> Activitats enzimàtiques dels complexos de la CTE en fetge i cervell de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> a les 30 setmanes d'edat. <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
<b>Figura suplementària 7.</b> Nivells d'EFG1 i activitats de CTE en cor als ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> de 8 setmanes d'edat. ....	277
<b>Figura suplementària 8.</b> Anàlisi de les concentracions de lactat, amoni i fosfatasa alcalina al plasma de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> .....	278
<b>Figura suplementària 9.</b> Nivells de MRPs al fetge i cervell de ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> de 30 setmanes d'edat. ....	278
<b>Figura suplementària 10.</b> Correlació entre els nivells mitocondrials d'EFG1 i els de COXI al fetge dels ratolins <i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i> tractats amb el rAAV. ....	279
<b>Figura suplementària 11.</b> Comparació dels nivells basals d'EFG1 mitocondrial entre teixits de ratolins WT.....	279

## ÍNDEX DE TAULES

<b>Taula 2.1.</b> Classificació dels tipus d'alteracions genètiques causants de malalties mitocondrials amb alteració del sistema OXPHOS.....	42
<b>Taula 2.2.</b> Models de ratolí amb defectes a la traducció mitocondrial.....	69
<b>Taula 2.3.</b> Receptors, coreceptors i tropisme dels serotips naturals d'AAV .....	80
<b>Taula 2.4.</b> Estudis preclínics de teràpia gènica amb rAAV sobre models de ratolí de malalties mitocondrials degudes a mutacions a l'ADNn .....	86
<b>Taula 4.1.</b> Grups d'animals per l'estudi de teràpia gènica .....	99
<b>Taula 4.2.</b> Composició de la reacció de PCR per detectar l'al·lel <i>Gfm1</i> <sup>R671C</sup> .....	105
<b>Taula 4.3.</b> Condicions d'amplificació de la PCR per al genotipatge .....	105
<b>Taula 4.4.</b> Composició de la digestió amb <i>NcoI</i> per detectar l'al·lel <i>Gfm1</i> <sup>R671C</sup> .....	106
<b>Taula 4.5.</b> Composició de la reacció de PCR per detectar l'al·lel <i>Gfm1</i> <sup>-</sup> .....	107
<b>Taula 4.6.</b> Composició del gel d'electroforesi per western blot SDS-PAGE.....	119
<b>Taula 4.7.</b> Anticossos primaris per immunodetecció per western blot .....	122
<b>Taula 4.8.</b> Subunitats diana per a la detecció dels complexos OXPHOS .....	125
<b>Taula 4.9.</b> Composició del gel d'electroforesi per la traducció mitocondrial .....	131
<b>Taula 4.10.</b> Sonda <i>TaqMan</i> MGB i encebadors per al gen mitocondrial <i>16S</i> .....	132
<b>Taula 4.11.</b> Composició de la reacció d'amplificació per qPCR del <i>16S</i> .....	133
<b>Taula 4.12.</b> Composició de la reacció d'amplificació per qPCR de l' <i>Ang1</i> .....	133
<b>Taula 4.13.</b> Condicions de l'amplificació per qPCR.....	133
<b>Taula 4.14.</b> Composició de la mescla de reacció per al tractament amb DNasa.....	135
<b>Taula 4.15.</b> Composició de la mescla de reacció per a la transcripció inversa .....	136
<b>Taula 4.16.</b> Sondes <i>TaqMan</i> utilitzades en estudis d'expressió gènica .....	136
<b>Taula 4.17.</b> Sondes <i>TaqMan</i> MGB i encebadors per als gens mitocondrials <i>16S</i> i <i>ND4</i> .....	137
<b>Taula 4.18.</b> Encebadors per analitzar l'ARNm provinent de l'al·lel <i>Gfm1</i> <sup>-</sup> .....	138
<b>Taula 4.19.</b> Composició de la mescla de reacció per la determinació de l'activitat ALT .....	143
<b>Taula 4.20.</b> Composició de la reacció de digestió de pMK-RQ-GFM1-Insert amb <i>Sall</i> , <i>XbaI</i> i <i>ApaLI</i> .....	149

<b>Taula 4.21.</b> Composició de la reacció de digestió de pSMD2-hAAT-UGT1A1 amb <i>NheI</i> i <i>Sall</i> .....	149
<b>Taula 4.22.</b> Composició de la reacció de desforforilació .....	150
<b>Taula 4.23.</b> Composició de la reacció de lligació .....	151
<b>Taula 4.24.</b> Digestions per comprovar la presència de pSMD2-hAAT-GFM1 .....	153
<b>Taula 4.25.</b> Composició de les digestions per comprovar la presència de pSMD2-hAAT-GFM1 .....	153
<b>Taula 4.26.</b> Encebadors per seqüenciar pSMD2-AAT-GFM1 .....	154
<b>Taula 5.1.</b> Freqüència de genotips als aparellaments de ratolins .....	179

## 1. ABREVIACIONES

---



AAV	Virus adenoassociat
Ad	Adenovirus
ADNc	ADN codificant
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
ADP	Adenosina difosfat
ALT	Alanina aminotransferasa
ApoE	Apolipoproteïna E
ARNcr	ARN de CRISPR
ARNg	ARN guia
ARNm	ARN missatger
ARNmt	ARN mitocondrial
ARNr	ARN ribosòmic
ARNt	ARN de transferència
ARNtracr	ARN trans-activador de CRISPR
AST	Aspartat aminotransferasa
ATP	Adenosina trifosfat
BN-PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida de tipus <i>Blue Native</i>
BSA	Albúmina sèrica bovina
CI	Complex I de la CTE (NADH deshidrogenasa)
CII	Complex II de la CTE (succinat deshidrogenasa)
CIII	Complex III de la CTE (coenzim Q/citocrom c reductasa)
CIV	Complex IV de la CTE (citocrom c oxidasa, COX)
CNS	Sistema nerviós central
COXPD	Deficiència combinada de la fosforilació oxidativa
COXPD1	Deficiència combinada de la fosforilació oxidativa de tipus I (hepatoencefalopatia deguda a mutacions en <i>GFM1</i> )
CS	Citrat sintasa
CTE	Cadena de transport d'electrons
CV	Complex V (ATP sintasa)
dsADN	ADN bicatenari
EFG1	Factor d'elongació de la traducció mitocondrial G1



EFG2	Factor 2 de reciclatge del mitoribosoma depenent de GTP
EFTs	Factor d'elongació de la traducció mitocondrial Ts
EFTu	Factor d'elongació de la traducció mitocondrial Tu
EMA	Agència europea del medicament
EMMA	Arxiu europeu de ratolins mutants
FDA	Agència americana del medicament
GDP	Guanosina difosfat
<i>Gfm1</i>	Gen de ratolí que codifica a EFG1
<i>GFM1</i>	Gen humà que codifica a EFG1
GTP	Guanosina trifosfat
gv	Genomes de vector AAV
hAAT	Promotor de l' $\alpha$ -1-antitripsina humana
HBB2	Subunitat beta-2 de l'hemoglobina
HDR	Reparació dirigida per homologia
HE	Tinció hematoxilina eosina
HET	Ratolí heterozigot <i>knock-in</i> ( <i>Gfm1</i> <sup>R671C/+</sup> )
iPSCs	Cèl·lules mare pluripotents induïdes
ISR	Resposta integrada a l'estrès
ITR	Repeticions terminals invertides
i.v.	Administració intravenosa
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
KI	<i>Knock-in</i>
KI/KO	Ratolí heterozigot compost <i>knock-in knock-out</i> ( <i>Gfm1</i> <sup>R671C/-</sup> )
KO	<i>Knock-out</i>
LDH	Lactat deshidrogenasa
LSU	Subunitat gran del mitoribosoma (39S)
LV	Lentivirus
MRPL	Mitoriboproteïna de la LSU
MRPs	Mitoriboproteïnes
MRPS	Mitoriboproteïna de la SSU
NAbs	Anticossos neutralitzants

NADH	Coenzim dinucleòtid de nicotinamida i adenina reduït
NHEJ	Unió d'extrems no homòlegs
NMD	<i>Non-Sense Mediated mRNA Decay</i>
O/N	Durant la nit
ORF	Pauta oberta de lectura
OXPPOS	Fosforilació oxidativa
PAS	Tinció d'àcid periòdic de Schiff
pb	Parells de bases
PBS	Tampó fosfat salí
qPCR	PCR quantitativa a temps real
rAAV	Vector adenoassociat recombinant
RC	Cadena respiratòria
RFLP	Fragments de restricció de longitud polimòrfica
RMN	Ressonància magnètica nuclear
ROS	Espècies reactives d'oxigen
RQ	Quantitat relativa
scAAV	AAV amb genoma autocomplementari
SDHA	Subunitat flavoproteïna A del complex succinat deshidrogenasa
SDS-PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic
ssAAV	AAV amb genoma de simple cadena
ssADN	ADN de cadena simple
SSU	Subunitat petita del mitoribosoma (28S)
st	Setmanes d'edat
T/A	Temperatura ambient
TGs	Triglicèrids
UPR	Resposta a proteïnes plegades erròniament
VCN	Número de còpies de vector
VDAC1	Proteïna 1 del canal d'anions dependent de voltatge
WT	<i>Wild-type</i>



## 2. INTRODUCCIÓ

---



## 2.1. Malalties mitocondrials

Les malalties mitocondrials constitueixen un grup important de desordres causats per la disfunció de la cadena de transport d'electrons (CTE) (o cadena respiratòria, RC) i de la fosforilació oxidativa (OXPHOS) dels mitocondris. Presenten associat un fenotip clínic altament heterogeni, tot i que els teixits i òrgans més afectats solen ser aquells que tenen un major requeriment energètic. La simptomatologia pot manifestar-se aviat durant l'etapa post natal, la infantesa o en edats més avançades, amb afectació aïllada d'un teixit o alteració multisistèmica<sup>1</sup>. Es tracta d'un grup de malalties minoritàries amb una prevalença mitjana en nens de ~4,7 per cada 100.000 i en adults de ~12,5 per cada 100.000<sup>2,3</sup>.

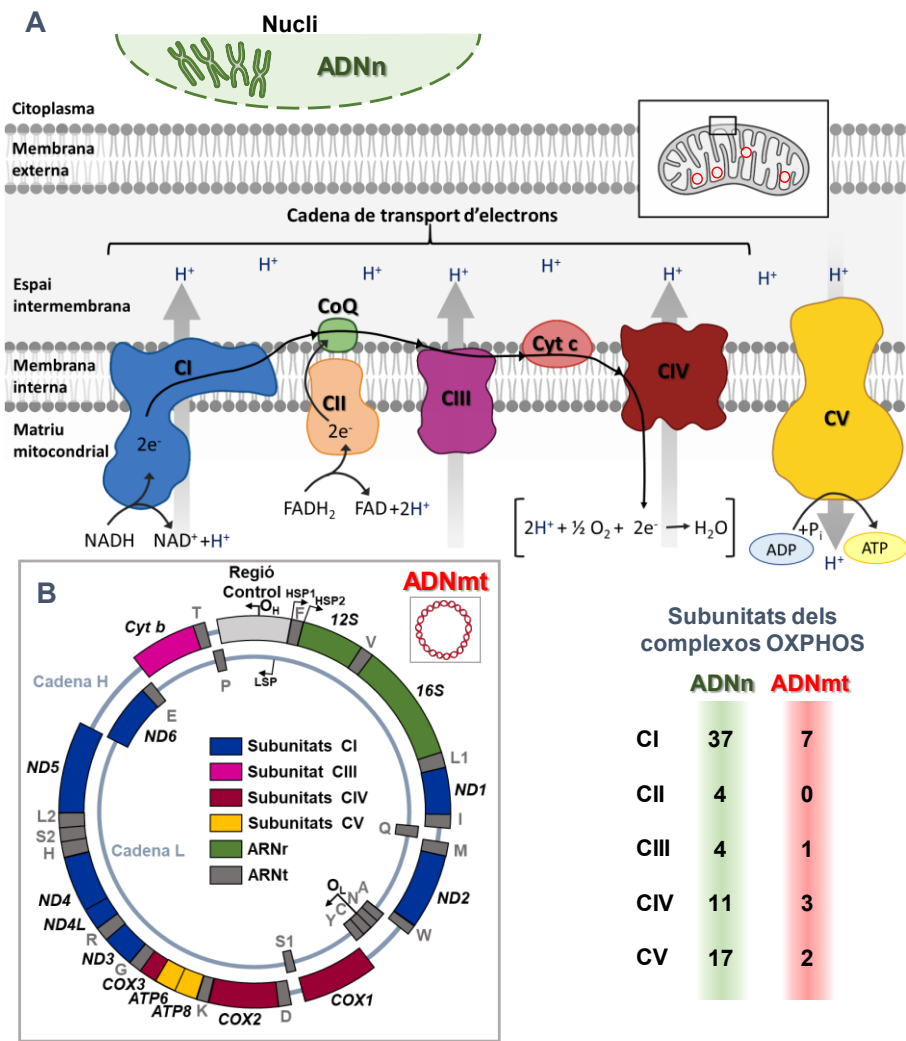
### 2.1.1. El mitocondri i el sistema OXPHOS

El mitocondri és un orgànul clau en la producció d'energia que està present al citoplasma de pràcticament totes les cèl·lules eucariotes. A nivell estructural consta de quatre compartiments: la membrana externa, l'espai intermembrana, la membrana interna i la matriu mitocondrial. Està implicat en diferents funcions cel·lulars, com l'oxidació del piruvat, el cicle de *Krebs*, el metabolisme d'aminoàcids, l'oxidació dels àcids grassos, l'homeòstasi del calci, la biosíntesi de grups hemo i centres Fe-S, l'apoptosi i el més important: la generació d'energia en forma d'ATP (adenosina trifosfat) a través de la CTE i l'OXPHOS<sup>4</sup>.

El sistema OXPHOS es localitza a la membrana mitocondrial interna i el conformen cinc complexos multiproteics: el complex I (CI, NADH deshidrogenasa), el complex II (CII, succinat deshidrogenasa), el complex III (CIII, coenzim Q/citocrom c-reductasa), el complex IV (CIV, citocrom c oxidasa) i el complex V (CV, ATP sintasa).

La síntesi d'ATP requereix de la coordinació de dos processos. D'una banda, els complexos I, II, III i IV de la CTE catalitzen la transferència d'electrons provinents del NADH i FADH<sub>2</sub> a través d'una sèrie de reaccions d'oxido-reducció fins combinar-se amb l'oxigen molecular i donar lloc a aigua. D'altra banda, aquest flux d'electrons s'acobla al bombeig de protons a través de la membrana interna des de la matriu mitocondrial fins l'espai intermembrana en contra del gradient electroquímico. El

gradient de protons generat entre els dos compartiments és aprofitat per part de l'ATP sintasa (CV), que produeix ATP mitjançant la fosforilació de l'ADP en una reacció acoblada al retorn de protons a favor de gradient cap a la matriu mitocondrial<sup>4</sup> (Figura 2.1A).



**Figura 2.1. Sistema OXPHOS i ADNmt.** (A) Els complexos del sistema de fosforilació oxidativa (sistema OXPHOS) es localitzen a la membrana mitocondrial interna on conformen la cadena de transport d'electrons (CTE), més el complex V. Aquesta genera un gradient electroquímic de protons utilitzat per la síntesi d'ATP. Quatre dels cinc complexos multiproteics (CI, CIII, CIV i CV) estan compostos per subunitats codificades a l'ADNn i a l'ADNmt, mentre que el CII consta sols de subunitats codificades a l'ADNn. (B) Les molècules d'ADN mitocondrial (ADNmt), circulars i de doble cadena, contenen 37 gens dels quals: 13 codifiquen subunitats del sistema OXPHOS, 2 codifiquen els ARN ribosòmics mitocondrials (ARNr-mt) i 22 codifiquen els ARN de transferència mitocondrials (ARNt-mt). Figura inspirada en <sup>4,5</sup>.

### 2.1.2. Genètica de les malalties mitocondrials

Les malalties mitocondrials poden ser d'herència materna, autosòmica o associades al cromosoma X. Aquesta variabilitat genètica ve donada pel control dual dels mitocondris per part dels genomes nuclear i mitocondrial.

El mitocondri, fruit del seu origen endosimbiòtic<sup>6</sup>, és l'únic orgànul cel·lular (junt amb els plastos, en cèl·lules vegetals) que, a part del nucli, conté el seu propi material genètic o ADN mitocondrial (ADNmt) i la seua pròpia maquinària per al manteniment i replicació de l'ADNmt, síntesi d'ARN i traducció a proteïnes. El genoma mitocondrial consisteix en un nombre variable de molècules d'ADN circulars de doble cadena que s'agrupen i empaqueten en nucleoids. En humans, cada molècula d'ADNmt té una mida de 16.569 pb i conté 37 gens, dels quals 24 son necessaris per la traducció mitocondrial (2 ARN ribosòmics, ARNr, i 22 ARN de transferència, ARNt) i 13 codifiquen subunitats dels complexos OXPHOS: 7 subunitats del CI, 1 subunitat del CIII, 3 subunitats del CIV i 2 subunitats de l'ATP sintasa<sup>4</sup> (*Figura 2.1B*). El CII és l'únic del sistema OXPHOS compost solament per subunitats codificades a l'ADN<sup>7</sup>. La quantitat de mitocondris per cèl·lula i de còpies d'ADNmt per orgànul varia a cada teixit i depèn del requeriment energètic que aquest presenti<sup>8</sup>. De forma que alguns autors han estimat que cada cèl·lula pot presentar entre centenars i milers de mitocondris i cada mitocondri al seu torn 2-10 còpies d'ADNmt<sup>9</sup>.

Les dues cadenes de l'ADNmt, que es coneixen com la cadena H (*heavy*, pesada) i la cadena L (*light*, lleugera), codifiquen diferents gens mitocondrials i la seua distribució és molt asimètrica entre les dues. La cadena H conté la majoria de gens (12 ARNm, 2 ARNr i 14 ARNt), mentre que la cadena L sols conté els gens que codifiquen ND6 i 8 ARNt<sup>10</sup>. A més, hi ha dues regions no codificants reguladores: el *D-loop* (1.200 pb), que conté l'inici de la replicació per a la cadena pesada ( $O_H$ ) i els promotors de la transcripció per a les dues cadenes, i una segona regió petita (30 pb) que conté l'origen de replicació per a la cadena lleugera ( $O_L$ ).

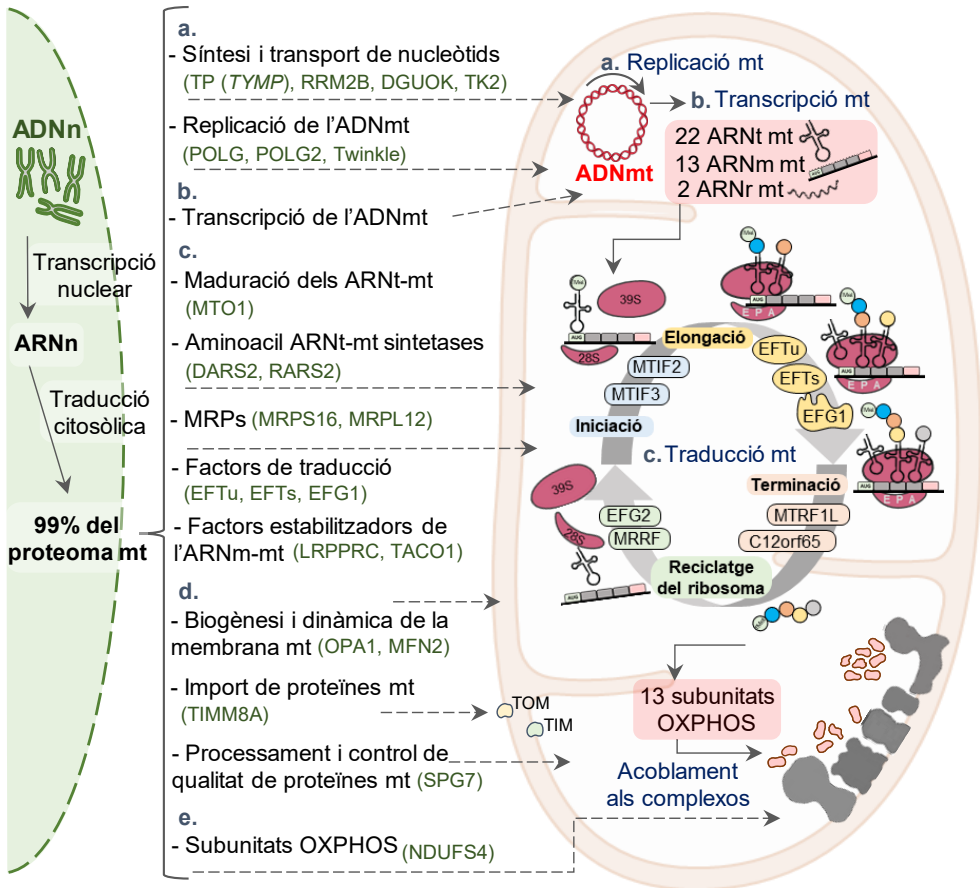
La genètica mitocondrial és diferent de la mendeliana en tres aspectes generals. En primer lloc, l'herència de mitocondris i ADNmt és materna tot i haver-se descrit algunes excepcions on l'ADNmt patern es transmet a la descendència<sup>11</sup>. D'altra



banda, del total de molècules d'ADNmt poden coexistir dintre d'una cèl·lula i/o dintre d'un mitocondri formes mutades i no mutades. Aquesta condició coneguda com a heteroplàsmia pot resultar patogènica si el nombre de molècules amb mutació patogènica supera un cert llindar (que tendeix a ser inferior als teixits amb major dependència del metabolisme oxidatiu). Finalment, la segregació mitòtica dels orgànuls té lloc a l'atzar i pot canviar la proporció de molècules d'ADNmt mutants a les cèl·lules filles; si es supera un llindar de formes mutades en un teixit que prèviament no estava afectat, el seu fenotip es pot alterar. A més a més, un altre tret rellevant, comentat a l'*apartat 2.1.6*, és que el codi genètic mitocondrial presenta variacions respecte del codi genètic universal<sup>12</sup>.

A part dels productes d'expressió de l'ADNmt, la resta de proteïnes mitocondrials que completen els complexos OXPHOS i/o que duen a terme funcions crucials a l'orgànul (~1.500 proteïnes)<sup>13</sup>, estan codificades a l'ADN nuclear (ADNn), es tradueixen al citosol i s'importen als mitocondris<sup>14,15</sup>. Per tant, és essencial que existeixi una coordinació estreta entre les maquinàries d'expressió gènica a nivell nuclear i mitocondrial que asseguri la síntesi, transport, localització i acoblament de totes les proteïnes mitocondrials, possibilitant la correcta biogènesi del sistema OXPHOS<sup>5,16</sup> (*Figura 2.2*). Així doncs, les malalties mitocondrials i més concretament els defectes en el sistema OXPHOS es poden dividir en dos grups segons si les alteracions genètiques es donen a l'ADNmt o en gens nuclears (*Taula 2.1*)<sup>17</sup>.

La majoria de les malalties mitocondrials descrites fins ara venen donades per defectes en gens nuclears i es transmeten a la descendència d'acord amb la seua localització cromosòmica. La patologia pot ser causada per l'afectació aïllada d'un complex del sistema OXPHOS o per la disfunció combinada de diversos complexos. Aquesta segona situació resulta normalment d'alteracions en el manteniment de l'ADNmt, en la traducció mitocondrial o en l'import de proteïnes mitocondrials.



**Figura 2.2. Processos implicats en la traducció mitocondrial i la biogènesi del sistema OXPHOS.** Nombroses proteïnes codificades a l'ADNn s'expressen al citosol i s'importen als mitocondris per participar en: el manteniment i replicació de l'ADNmt, la transcripció de l'ADNmt i la traducció mitocondrial (on s'inclouen proteïnes implicades en la maduració i aminoacilació dels ARNt-mt, subunitats del mitoribosoma, proteïnes estabilitzadores i factors d'iniciació, elongació, terminació i de reciclatge del mitoribosoma). Altres proteïnes intervenen en la biogènesi i dinàmica de la membrana mitocondrial, l'import de proteïnes mitocondrials, el seu processament i control de qualitat. Per la conformació dels complexos OXPHOS les subunitats codificades a l'ADNn s'importen i acoblen junt amb les codificades a l'ADNmt a la membrana interna mitocondrial. Entre parèntesis i en color verd s'esmenten exemples de proteïnes implicades als diferents processos, l'alteració de les quals s'ha associat a malalties mitocondrials. Figura inspirada en <sup>18,19</sup>.

**Taula 2.1. Classificació dels tipus d'alteracions genètiques causants de malalties mitocondrials amb alteració del sistema OXPHOS**

Genoma	Defectes o mutacions
ADNmt	Gens per la síntesi proteica (ARNr i ARNt)
	Gens que codifiquen subunitats OXPHOS
	Delecions grans
ADNn	Gens que codifiquen a subunitats OXPHOS
	Factors d'acoblament dels complexos OXPHOS
	Proteïnes implicades en el manteniment de l'ADNmt
	Gens relacionats amb la traducció mitocondrial
	Enzims implicats en la biosíntesi de lípids o cofactors
	Gens implicats en la dinàmica mitocondrial
	Gens implicats en la biogènesi mitocondrial
	Gens implicats en la detoxificació mitocondrial

Taula adaptada de <sup>17</sup>.

### 2.1.3. Import de les proteïnes mitocondrials codificades a l'ADNn

Les proteïnes codificades a l'ADNn que formen part del sistema OXPHOS o que estan implicades en la seua biosíntesi han de ser importades des del citosol als mitocondris. Aquest procés és essencial per tal que en aquests orgànuls semi-autònoms l'ADNmt pugui replicar-se i expressar-se correctament (transcripció i traducció mitocondrial).

A l'import i selecció de les proteïnes mitocondrials codificades a l'ADNn participen translocases localitzades a les membranes mitocondrials externa i interna<sup>16</sup>. El complex translocasa de la membrana externa (TOM) dona entrada a totes les pre-proteïnes mitocondrials, i aquestes segueixen diferents rutes depenent de la seqüència senyal que presentin: (a) acoblament a la membrana externa (mitjançant el *sorting and assembly machinery complex*, SAM); (b) translocació a l'espai intermembrana per mitjà del complex translocasa de la membrana interna mitocondrial (TIM23) o per components de l'espai intermembrana; (c) import a la matriu mitocondrial a través del canal TIM23; (d) inserció a la membrana interna per mitjà del complex TIM22 o TIM23. Després de la translocació, la seqüència senyal s'elimina i les proteïnes es pleguen per exercir la seua funció<sup>18</sup>.

### 2.1.4. Replicació i manteniment de l'ADNmt

La replicació de l'ADNmt se lloc de forma continua en totes les cèl·lules, estiguin o no en divisió, i es regula per part d'una maquinària conformada per proteïnes codificades a l'ADNn. Per a la replicació del genoma mitocondrial s'han proposat dos models asincrònics (1) l'inicial i més acceptat “desplaçament de la cadena”, (2) *RITOLS*, amb la intervenció de fragments d'ARN, i un sincrònic (3) “acoblat a la cadena”<sup>20</sup>. El mecanisme asincrònic inicial sembla ser el dominant als mitocondris, a partir de dos orígens de replicació unidireccionals i independents situats a les cadenes pesada i lleugera ( $O_H$  i  $O_L$ ). No obstant això, possiblement coexisteix més d'un model a la replicació de l'ADNmt humà i per exemple l'estratègia sincrònica es podria estimular quan es requereix augmentar ràpidament el número de còpies d'ADNmt<sup>20</sup>.

A la maquinària de replicació del genoma mitocondrial destaquen l'ADN polimerasa gamma (POLG), l'helicasa Twinkle i l'ARN polimerasa POLRMT. La proteïna mtSSB estimula aquests enzims i estabilitza la cadena lliure d'ADNmt rica en pirimidines, diferents topoisomerases relaxen i estabilitzen l'ADNmt, i l'ADNmt lligasa III participa en el procés de reparació del material genètic<sup>21</sup>.

Al manteniment del genoma mitocondrial existeixen mecanismes per protegir l'ADNmt, reparar-lo i proveir d'un *pool* de nucleòtids. L'ADNmt es protegeix per empaquetament en nucleoids, on coexisteixen les molècules d'ADNmt amb proteïnes com mtSSB, Twinkle, POLG i el factor de transcripció mitocondrial A (TFAM). Tanmateix, hi ha múltiples processos per reparar l'ADNmt, necessaris per evitar l'acumulació de defectes al genoma mitocondrial derivats de la seua alta taxa de replicació<sup>22,23</sup>. El balanç en els *pools* de deoxinucleòsids trifosfat (dNTPs) mitocondrials es regula a través de transportadors i enzims implicats en la seua biosíntesi, l'alteració dels quals pot afectar l'eficiència i fidelitat de la replicació<sup>24</sup>.

S'han descrit diferents malalties mitocondrials causades per alteracions en gens que afecten directament al mecanisme de replicació (p. ex. *POLG*, *POLG2* i *TWINK* (Twinkle))<sup>25</sup> i altres que estan implicats al metabolisme de dNTPs (p. ex. *DGUOK*, *TK2*, *TYMP* i *RRM2B*)<sup>24</sup>.

### 2.1.5. Transcripció de l'ADNmt

La transcripció mitocondrial és un procés menys conegut que els anteriors, i que també és catalitzat i regulat per proteïnes codificades a l'ADNn. S'inicia a partir de tres regions promotores a l'ADNmt: dues a la cadena H (HSP1 i HSP2) i una a la cadena L (LSP). La transcripció a partir de HSP2 i LSP genera molècules policistròniques que cobreixen pràcticament la totalitat de les dues cadenes H i L; mentre que els ARN derivats del HSP1 contenen principalment els ARNr 12S i 16S.

La maquinària bàsica de transcripció consta de l'ARN polimerasa mitocondrial (POLRMT) i els factors de transcripció TFAM, TFB1M i TFB2M<sup>26</sup>, tots tres requerits per a l'inici del procés. A més, el factor de terminació de la transcripció MTERF1 s'ha vist implicat en diferents punts del procés, podent ser clau per la coordinació de la replicació i transcripció<sup>27</sup>. Junt amb els factors de la mateixa família MTERF2, MTERF3 i MTERF4, participa en la regulació dels nivells d'ARNm mitocondrials per tal de garantir la síntesi proteica<sup>26</sup>. S'han identificat mutacions patogèniques en *TFAM* associades amb insuficiència hepàtica greu d'aparició neonatal i depleció de l'ADNmt<sup>28</sup>.

D'altra banda, existeix un conjunt de proteïnes implicades en la regulació post-transcripcional de l'expressió. La RNasa P i RNasa Z (de *ELAC2*) tallen respectivament els extrems 5' i 3' dels ARN policistrònics. A la maduració dels ARNt, l'ATP(CTP):ARNt nucleotidil transferasa afegeix el triplet CCA a l'extrem 3' i l'aminoacil ARNt sintetasa corresponent uneix l'aminoàcid concret. La poli(A)-ARN polimerasa (*MTPAP*) sintetitza la cua poli(A) als ARNm, es creen codons stop i estableixen els transcrits. Proteïnes com *LRPPRC* exerceixen funció de xaperona sobre l'ARNm relaxant les estructures secundàries per tal de que aquest pugui ser traduït<sup>29</sup>. Tanmateix, mutacions en *ELAC2*, *MTPAP* i *LRPPRC* s'han vist associades a malalties autosòmiques recessives amb quadres clínics heterogenis<sup>28</sup>.

### 2.1.6. Traducció mitocondrial

El procés de síntesi de proteïnes codificades a l'ADNmt requereix d'un conjunt d'elements codificats al propi genoma mitocondrial (ARNr i ARNt) i majoritàriament a l'ADNn: mitoriboproteïnes (MRPs), factors d'acoblament del mitoribosoma, aminoacil-ARNt sintetases, enzims implicats en la maduració d'ARNt, i factors d'iniciació, elongació, terminació de la traducció mitocondrial i reciclatge del mitoribosoma<sup>19,30</sup>. Els elements implicats en la traducció mitocondrial en mamífers són diferents de les formes equivalents a la traducció citosòlica i mantenen un grau de similitud major amb els components de la síntesi proteica bacteriana<sup>31,32</sup>.

La traducció en mitocondris la duen a terme els ribosomes propis d'aquest orgànul, coneguts com a mitoribosomes. La forma acoblada (55S) està formada per una subunitat petita (SSU, 28S) i una subunitat gran (LSU, 39S). La SSU conté l'ARNr 12S i 30 proteïnes ribosòmiques (MRPSs) i la LSU consta de l'ARNr 16S i 48 proteïnes ribosòmiques (MRPLs)<sup>33</sup>. El mitoribosoma acoblat disposa de tres llocs per a la unió dels ARNt: el lloc acceptor o aminoacil (A), el peptidil (P) i el de sortida (E). No es segueix el codi genètic universal i s'utilitzen els codons de terminació AGG i AGA a part dels codons stop UAA i UAG; a més, el codó UGA és de triptòfan en compte de ser codó stop<sup>12</sup>. Altres trets distintius són els ARNm policistronics sense estructura cap 5' o introns, ni regions no traduïdes<sup>34,35</sup>, la participació de 22 ARNt en compte de 31, la N-formilmetionina (fMet) com a primer aminoàcid introduït i un mateix ARNt<sup>Met</sup> per a les fases d'iniciació i elongació<sup>36</sup>.

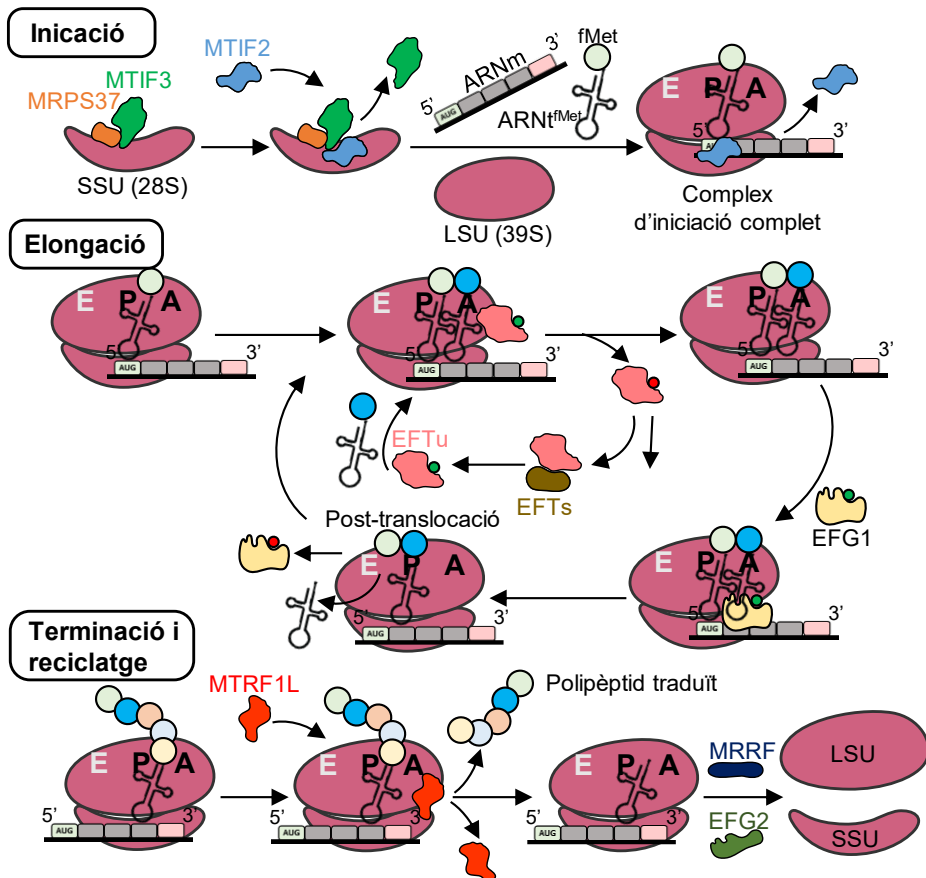
Tot i que resten per resoldre algunes incògnites sobre el procés exacte, el model més acceptat del mecanisme de traducció mitocondrial (*Figura 2.3*) segueix, igual que les traduccions citosòlica i procariota, les fases d'iniciació, elongació, terminació i reciclatge del ribosoma<sup>18,37</sup>, descrites a continuació:

- **Fase d'iniciació.** El primer pas per començar la traducció consisteix en la formació del complex d'iniciació. Les dues subunitats del mitoribosoma (28S i 39S) es separen, permetent que el complex es formi<sup>38</sup>. Aquest consta de la subunitat 28S, l'ARNm que es traduirà, l'ARNt<sup>Met</sup>-fMet (formilmetionina) i els factors d'iniciació MTIF2 i MTIF3<sup>39,40</sup>. A continuació s'incorpora l'ARNm gràcies

a MTIF3 que ajuda al correcte posicionament del codó d'inici al lloc P de la subunitat 28S. Quan el codó d'inici està present, l'ARNt<sup>Met</sup>-fMET s'uneix al primer codó amb l'ajuda de MTIF2. Posteriorment, l'acoblament del mitoribosoma estimula la dissociació dels factors d'iniciació, donant pas a la fase d'elongació.

- **Fase d'elongació.** El factor d'elongació mtEFTu (EFTu, codificat per *TUFM*) unit a GTP (EFTu-GTP) i un ARNt aminoacilat es col·loquen al lloc A del mitoribosoma, catalitzant el correcte aparellament codó-anticodó. Tot seguit, s'hidrolitza el GTP i l'EFTu-GDP surt del mitoribosoma. La SSU catalitza la formació d'un enllaç peptídic al polipeptíd que s'està elongant i que es transfereix al lloc A del ribosoma. A continuació, el factor d'elongació mtEFG1 (EFG1, codificat per *GFM1*) unit a GTP catalitza la translocació del ribosoma, on els ARNt dels llocs A i P es mouen als llocs P i E respectivament, de manera que el peptidil-ARNt passa del lloc A al P, i l'ARNt lliure s'allibera del ribosoma<sup>41</sup>. Mentrestant, el factor mtEFTs (EFTs, codificat per *TSEFM*) intervé en la recuperació de la forma activa de EFTu (EFTu-GTP), que ara ja pot unir un altre aminoacil-ARNt per incorporar-lo al procés d'elongació. Aquests passos de la fase d'elongació es repeteixen fins que el mitoribosoma es troba un codó stop (UAA, UAG, AGA o AGG) al lloc A.
- **Fase de terminació i reciclatge.** El factor de terminació MTRF1L reconeix el codó stop. Llavors, uneix al mitoribosoma i indueix la hidròlisi de l'enllaç peptidil-ARNt en el lloc A, permetent que s'alliberi la proteïna mitocondrial madura recentment sintetitzada. Altres factors com MTRF1 i C12orf65 (MTRFR), implicats en l'alliberament i estabilització del mitoribosoma també són rellevants en la fase de terminació<sup>42</sup>. Per últim, els factors mitocondrials de reciclatge MRRF i MRRF2 (mtEFG2 o EFG2) es transloquen al lloc A, induint l'alliberament de l'ARNm<sup>30</sup>.

A més, existeixen mecanismes que regulen la traducció. L'expressió de les proteïnes mitocondrials està regulada per factors propis d'activació, com LRPPRC, TACO1 i MSS51, i cada ARNm té activador/s propis de traducció<sup>43</sup>. També s'ha descrit que aquests factors activadors sols permeten la traducció si s'assegura que l'acoblament del producte tindrà lloc de forma correcta<sup>43</sup>.



**Figura 2.3. Traducció mitocondrial en humans.** El procés consta de quatre fases: iniciació, elongació, terminació, i reciclatge. A la fase d'iniciació té lloc l'acoblament de dos complexos de pre-iniciació. A la fase d'elongació, un nou aminoacil-ARNt es transfereix al lloc A del mitoribosoma per l'acció d'EFTu-GTP, que passa a EFTu-GDP; i EFTs recupera la forma EFTu-GTP. El peptidil de l'ARNt al lloc P passa al lloc A, EFG1 uneix al mitoribosoma al lloc A i promou la seua translocació sobre l'ARNm, induint el moviment de l'aminoacil-ARNt i peptidil-ARNt als llocs P i E respectivament. L'ARNt al lloc E s'allibera del monòmer i el cicle continua fins que es completa el polipèptid i el codó stop arriba al lloc A. MRRF i EFG2 promouen la separació de les subunitats SSU i LSU del mitoribosoma; MTIF3 es combina amb la SSU evitant la reassociació prematura de les subunitats gran i petita del mitoribosoma. Figura adaptada de <sup>31</sup>.

### 2.1.7. Malalties causades per defectes en la traducció mitocondrial

S'han descrit tant alteracions als gens mitocondrials anteriorment esmentats com mutacions autosòmiques recessives en molts dels factors codificats per gens nuclears, donant lloc a un ampli espectre de malalties i fenotips<sup>19,30</sup>. Normalment, les malalties derivades de defectes en la traducció mitocondrial donen lloc a deficiència



combinada del sistema OXPHOS (COXPD), on almenys dos complexos es presenten afectats. No obstant això, alteracions en factors activadors de la traducció o reguladors post-transcripcionals de l'expressió de l'ADNmt poden desestabilitzar ARN mitocondrials donant lloc a defectes aïllats d'enzims o complexos OXPHOS, tal i com s'ha descrit en pacients amb mutacions en *TACO1* i *LRPPRC*<sup>44,45</sup>.

### **2.1.7.1. Defectes de traducció mitocondrial deguts a mutacions a l'ADNmt**

#### **a. Mutacions als ARNt**

Són 22 els ARNt codificats a l'ADNmt, i s'encarreguen principalment d'entregar els aminoàcids al polipèptid que està sent sintetitzat durant la traducció mitocondrial. La primera mutació patogènica en un ARNt es va descriure al gen que codifica l'ARNt<sup>Leu</sup>(UUR)<sup>46</sup> associat a miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidosi làctica i episodis similars a l'apoplexia (MELAS). Des de llavors, s'han descrit al voltant de 300 mutacions en gens que codifiquen ARNt mitocondrials<sup>47</sup>, la majoria de les quals impedeixen l'aminoacilació dels ARNt. Les dues malalties mitocondrials derivades més conegudes són la MELAS i la mioclònia amb epilèpsia i amb fibres vermelles esquinçades (MERRF). Aquesta segona ve donada majoritàriament per mutacions en *MTTK* (ARNt<sup>Lys</sup>).

#### **b. Mutacions als ARNr**

El gen *MTRNR1* codifica l'ARNr 12S i el gen *MTRNR2* codifica l'ARNr 16S. Mutacions en *MTRNR1* s'associen amb afectació auditiva amb o sense exposició a aminoglicòsids<sup>48</sup>. L'única mutació descrita a *MTRNR2* s'ha vist que causa cardiomiopatia hipertròfica<sup>49</sup>.

### **2.1.7.2. Defectes de traducció mitocondrial deguts a mutacions a l'ADNn**

#### **a. Mutacions en proteïnes del mitoribosoma**

Actualment, s'han identificat mutacions en 9 MRPSs i en 3 MRPLs causants de malalties mitocondrials, com són MRPS16, MRPS22, MRPL3, MRPL12 i MRPL44. Els pacients solen presentar afectació neurològica acompanyada d'altres manifestacions (hepatopatia, disfunció renal, sordesa, miopatia, afectació craniofacial o cardíaca)<sup>47</sup>. D'altra banda, s'han identificat defectes en factors d'acoblament del mitoribosoma associats a malalties. Per exemple, mutacions en

*ERAL1*, que codifica una xaperona implicada a l'acoblament de la SSU, s'han associat amb la síndrome de Perrault<sup>50</sup>.

### **b. Mutacions en aminoacil-ARNt sintetases**

Les aminoacil-ARNt sintetases mitocondrials (mt-ARS) catalitzen la unió dels ARNt amb els aminoàcids corresponents. Les mt-ARS estan codificades en 19 gens nuclears i cadascun s'ha associat amb un ampli espectre de malalties mitocondrials en nens i adults<sup>51</sup>. Algunes manifestacions clíniques freqüents són el retard cognitiu i diferents tipus de neuropaties, miopaties i cardiopaties<sup>28,52</sup>.

### **c. Mutacions en factors modificadors d'ARNt-mt**

Les modificacions als ARNt-mt juguen un paper molt important en la regulació de la producció energètica a nivell cel·lular com a resposta als requeriments locals, i quan aquestes són disfuncionals solen donar lloc a ARNt-mt defectuosos i causar un efecte patològic<sup>53</sup>. S'han identificat mutacions en gens implicats en modificacions sobre ARNt-mt com l'aparellament *wobble* (*TRMU*, *MTO1*, *GTPBP3*, *NSUN3*), en modificacions a la posició 37 d'ARNt (*TRMT5*, *TRIT1*), l'addició del triplet CCA (*TRNT1*), pseudouridilació (*PUS1*) i formilació de l'ARNt mitocondrial de la metionina (*MTFMT*)<sup>28</sup>. Les malalties derivades abracen afectacions molt diverses com retard en el desenvolupament, insuficiència hepàtica, cardiomiopatia, encefalopatia i debilitat muscular<sup>28</sup>.

### **d. Mutacions en factors implicats a les fases de la traducció mitocondrial**

S'han identificat com a patogèniques variants genètiques en gens nuclears que codifiquen proteïnes implicades en les fases d'iniciació, elongació i reciclatge de la traducció mitocondrial. Les malalties mitocondrials resultants són d'aparició neonatal o infantil amb afectació neurològica (*GFM1*, *TUFM*, *TSMF*, *C12orf65*), hepàtica (*GFM1*) o cardíaca (*TSMF*) i s'associen a defectes combinats del sistema OXPHOS. Concretament, tres tipus de deficiències combinades de la fosforilació oxidativa (COXPD4 [MIM:610678], COXPD3 [MIM:610505], i COXPD1 [MIM:609060]) s'han associat a variants patogèniques de *TUFM*, *TSMF* i *GFM1*, respectivament<sup>19</sup>. Pel moment no s'han identificat mutacions patogèniques en gens que codifiquen per a factors de terminació.

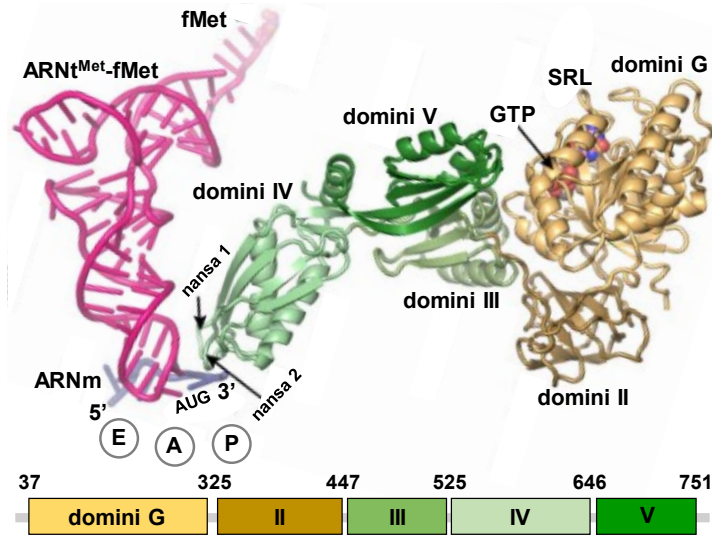
## 2.2. Hepatoencefalopatia deguda a mutacions en *GFM1*

El gen nuclear *GFM1* (NM\_024996) codifica el factor d'elongació de la traducció mitocondrial G1 (mtEFG1 o EFG1). Va ser caracteritzat per primera vegada en humans l'any 2001<sup>32</sup> i des de llavors s'han identificat múltiples alteracions patogèniques que causen l'hepatoencefalopatia deguda a mutacions en *GFM1* (*Figura 2.6*), també coneguda com a deficiència combinada de la fosforilació oxidativa de tipus 1 (COXPD1 [MIM:609060]). Es tracta d'una malaltia minoritària extremadament infreqüent; són 39 els casos de pacients que fins ara s'han reportat i publicat<sup>54–69</sup>, sumant-se almenys tres casos dels quals tenim coneixement al nostre grup de recerca.

### 2.2.1. Expressió i funció d'EFG1 a la traducció mitocondrial

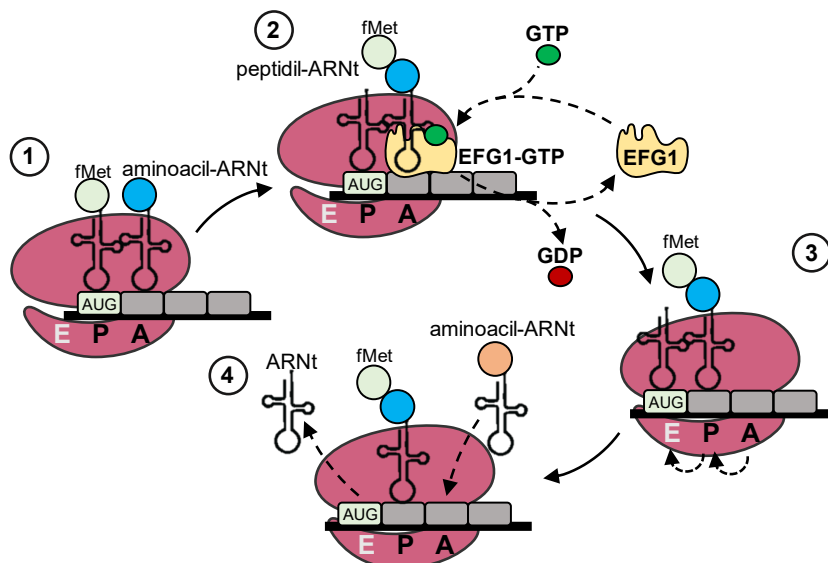
El gen *GFM1* es localitza a la posició cromosòmica 3q25.1-q26.2, i d'acord amb la base de dades *NCBI RefSeq* s'han identificat 14 ARNm resultants de la seua transcripció, quatre dels quals són no codificants<sup>67</sup>. La variant 2 d'ARNm (NM\_024996.7) amb 6.478 pb és la forma consens acceptada i conté 18 exons codificants que donen lloc a la proteïna EFG1 de 751 aminoàcids. Aquesta s'expressa de forma ubiqüa a tots els teixits, sent els nivells d'expressió alts a teixits com cor, múscul esquelètic, ronyó i testicles; moderats en fetge, intestí gros i cervell; i baixos al timus, tiroides i pulmó; patró d'expressió que es manté de forma similar en altres espècies com en ratolí<sup>32</sup>. D'altra banda, s'ha descrit que l'abundància relativa de l'ARNm de *GFM1* correlaciona amb l'expressió dels altres factors d'elongació mtEFTu i mtEFTs, indicant que els tres factors mitocondrials mantenen nivells d'expressió equivalents<sup>32</sup>.

El factor d'elongació EFG1 és una proteïna amb activitat GTPasa que presenta cinc dominis estructurals (domini G, II, III, IV i V) a través dels quals interacciona amb les subunitats del mitoribosoma, l'aminoacil-ARNt i l'ARNm que s'està traduint (*Figura 2.4*)<sup>41</sup>. S'ha descrit que EFG1 té un rol essencial en el procés d'elongació de la traducció mitocondrial i accelera la reacció en més de cinc ordres de magnitud<sup>70</sup>. Com a GTPasa, utilitza l'energia provinent de la hidròlisi de GTP per facilitar la reestructuració del ribosoma abans de translocació i el moviment de l'ARNt<sup>70,71</sup>.



**Figura 2.4. Model estructural i interaccions d'EFG1.** EFG1 s'organitza en cinc dominis: G, II, III, IV i V. El domini G uneix la nansa sarcina-ricina (SRL) de l'ARNr 16S situat a la LSU, el domini II contacta amb la SSU, el domini IV interacciona a través de dues nanses apicals amb la parella ARNm-ARNt codó-anticodó al lloc P del mitoribosoma, el domini V es situa prop del centre d'associació a GTP (GAC) de la LSU, i el domini III serveix com a element de connexió que estabilitza la reorganització d'EFG1 per contacte simultani del domini G amb els dominis II i V. Figura adaptada de <sup>41</sup>.

La proteïna EFG1 catalitza la translocació del peptidil-ARNt des del lloc A al P del mitoribosoma, i simultàniament l'ARNt que es presentava al lloc P i ja ha cedit el seu aminoàcid al polipèptid mitocondrial que s'està elongant passa al lloc E, possibilitant la formació de l'enllaç peptídica i la progressió de l'ARNm en un codó<sup>72</sup> (Figura 2.5). Durant la fase d'elongació, EFG1 interacciona directament amb la LSU del mitoribosoma (39S), en concret amb el domini L7/12 situat al centre d'unió a GTP (GAC). La unió funcional entre EFG1 i el domini L7/12 engega l'activitat GTPasa del factor d'elongació i permet la seua unió al mitoribosoma<sup>73</sup>. Tot apunta a que la forma activa de la proteïna és EFG1-GDP, ja que s'ha demostrat mitjançant experiments de cinètica enzimàtica que la hidròlisi del GTP té lloc immediatament després de la unió al mitoribosoma i abans de la translocació<sup>74</sup>. Un cop s'allibera el grup fosfat del GTP, el dímer EFG1-GDP experimenta un canvi de conformació que comporta la transició del mitoribosoma cap a l'estat de translocació, on els ARNt poden moure's. Quan la translocació ha tingut lloc, el ribosoma torna al seu estat inicial i EFG1-GDP experimenta un nou canvi conformacional que permet la seua dissociació<sup>74</sup>.



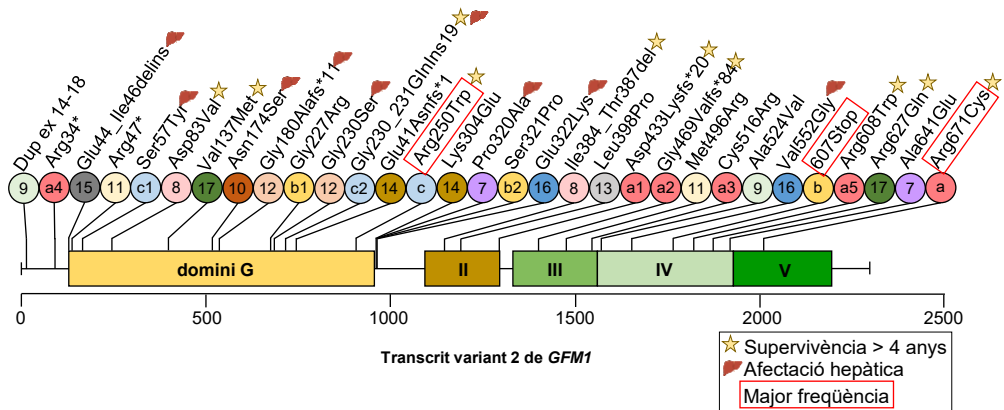
**Figura 2.5. Funció d'EFG1 a la fase d'elongació de la traducció mitocondrial.** Un cop els ARNt aminoacilats es situen als llocs A i P (*pas 1*), EFG1 uneix al ribosoma mitocondrial i, mitjançant la hidròlisi de GTP (*pas 2*), facilita la translocació de l'aminoacil-ARNt del lloc acceptor A al lloc peptidil P (*pas 3*). Simultàniament, l'aminoàcid de l'ARNt que es trobava al lloc P s'incorpora a la cadena polipeptídica que està sent elongada, i tot seguit aquest ARNt passa al lloc de sortida E (*pas 3*). El lloc A queda disponible per la incorporació de l'aminoacil-ARNt corresponent al següent codó de l'ARNm que s'està traduint (*pas 4*). El procés es repeteix fins que apareix un codó de parada i es dona pas a la fase de terminació. Figura adaptada de <sup>18</sup>.

## 2.2.2. Mutacions patogèniques en *GFM1*

La COXPD1 és una malaltia greu d'herència autosòmica recessiva, amb un quadre clínic heterogeni majoritàriament hepatoencefalopàtic associat a una esperança de vida molt reduïda, tal i com es descriu en profunditat a l'*apartat 2.2.3*. La identificació de les alteracions genètiques sobre *GFM1* causants de la malaltia s'ha dut a terme normalment per seqüenciació de l'exoma partint d'ADN total extret a partir de fibroblasts, biòpsies musculars<sup>62</sup>, líquid amniòtic o sang perifèrica de pacients<sup>68,69</sup>.

Entre les mutacions patogèniques identificades (*Figura 2.6*) s'ha observat que la més freqüent és la mutació antisentit c.(2011C>T); p.(Arg671Cys) (NM\_024996.5), localitzada a l'exó 16 de *GFM1* i al domini terminal del factor d'elongació (domini V). S'ha detectat en homozigosi o en heterozigosi en combinació amb altres mutacions en un mínim de 10 pacients que han sobreviscut més d'un any, entre els quals hi ha 5 casos que han sobreviscut entre 4 i 13 anys de vida<sup>60,62,64,65</sup>. Destaquen també dos

germans heterozigots amb p.(Arg671Cys) i una mutació al domini G (no publicada) que sobreviuen als 17 i 19 anys (comunicació personal).



**Figura 2.6.** Mapa de les mutacions patogèniques identificades a la proteïna EFG1. Es recopilen les mutacions publicades a la literatura<sup>54–69</sup>. S'utilitza com a referència el transcrit variant 2 de *GFM1*. Els cercles dels mateix color i número representen la combinació en heterozigosi de dues mutacions en un pacient. Les mutacions marcades amb una estrella s'han identificat en pacients amb major esperança de vida. Les mutacions de pacients amb insuficiència hepàtica es marquen amb la silueta d'un fetge. Les tres mutacions més freqüents s'emmarquen en vermell. Figura adaptada de <sup>67</sup>.

A part d'alguns dels pacients amb la mutació p.(Arg671Cys), altres pacients amb major supervivència són un nen de 5 anys heterozigot per p.(Asp83Val) i p.(Ile384\_Thr387del)<sup>65</sup>; i un nen de 7 anys heterozigot per les mutacions p.(Arg250Trp) i p.(Gly230\_231Glnins19)<sup>63</sup>. A més, recentment s'han identificat 4 germans heterozigots per a les mutacions p.(Val137Met) i p.(Arg627Gln) (NM\_001308164.1) compresos entre els 10 i 17 anys de vida<sup>69</sup>. Així doncs, sembla que els pacients amb mutacions en *GFM1* són més vulnerables a una edat primerenca, podent recuperar-se i estabilitzant-se la progressió de la malaltia a partir d'una certa edat, tal i com s'ha observat en altres trastorns de la traducció mitocondrial<sup>63,75</sup>.

Les altres mutacions que s'han trobat amb major freqüència són: p.(Arg250Trp) identificada un cop en homozigosi<sup>57</sup> i en heterozigosi combinada amb altres dues mutacions<sup>63,66</sup>; i p.((Gly589Profs\*19)607Stop) detectada dos cops en combinació amb altres mutacions<sup>55,67</sup>. En aquests casos les esperances de vida associades han sigut variables.

### 2.2.3. Quadre clínic dels pacients amb COXPD1

Les mutacions en *GFM1* comporten la pèrdua de funcionalitat i/o desestabilització i reducció dels nivells de proteïna EFG1, provocant un defecte en la síntesi de proteïnes codificades a l'ADNmt. En conseqüència, es desencadena una afectació del sistema OXPHOS, podent-se veure compromeses de forma combinada les estructures i activitats enzimàtiques dels complexos CI, CIII, CIV i CV, tal i com s'ha observat en biòpsies de múscul i fetge, i fibroblasts de pacients<sup>55-57</sup>.

El quadre clínic dels pacients es caracteritza per una encefalopatia greu d'aparició neonatal acompanyada d'un increment dels nivells de lactat en sang. Altres manifestacions clíniques associades són la dificultat per alimentar-se, l'endarreriment en el desenvolupament, distonia, híper- o hipotonia, síndrome de West (o dels espasmes epilèptics infantils), anomalies cerebrals a la ressonància magnètica nuclear (RMN), leucoencefalopatia i insuficiència hepàtica. La progressió de la malaltia és molt ràpida i molts dels pacients moren durant el període perinatal o pocs mesos després de néixer, tot i que tal i com ja s'ha esmentat, s'han reportat alguns casos de supervivència més prolongada<sup>60,62,64,65</sup>.

La diversitat de quadres clínics i les limitacions a l'hora de poder explorar a tots els casos les diferents manifestacions clíniques fa que sigui complicat definir un perfil clínic més concret per a la COXPD1. La RMN, normalment a l'abast dels centres mèdics, evidencia la diversitat d'anomalies cerebrals que presenten els pacients, detectant-se afectació del còrtex cerebral, el cos callós i els ganglis basals entre d'altres (*Figura 2.7*).

Pel que fa a l'alteració de paràmetres bioquímics, queda patent l'elevació dels nivells de lactat en plasma i líquid cefalorraquidi<sup>62</sup>. Altres metabòlits alterats en plasma són els nivells de piruvat i glucosa, a conseqüència del bloqueig metabòlic de la malaltia (*Figura 2.7*).

<b>Manifestacions clíniques identificades en pacients amb COXPD1</b>				
<b>Neurològiques</b>	<b>Hepàtiques</b>			
<b>Espàsmes (Síndrome West)</b>	Insuficiència hepàtica			
Dificultats per alimentar-se	Citòlisi hepàtica			
<b>Convulsions</b>	Hepatomegalia transitòria			
Síndrome piramidal	<b>Miopàtiques</b>			
Tetraplegia	<b>Hipotonia</b>			
Polineuropatia	<b>Distonia</b>			
<b>Estrabisme</b>	Rigidesa muscular			
Nistagme	<b>Metabòliques</b>			
Absència de contacte visual	<b>Acidosi làctica</b>			
<b>Irritabilitat</b>	Hipoglicèmia			
<b>Encefalopàtiques (per RMN)</b>	Piruvat elevat			
<b>Microcefàlia</b>	Cetosi			
<b>Anormalitats al cos callós</b>	Acidosi metabòlica			
Anormalitats periventriculars	Transferrina deficient en carbohidrats anormal			
Anormalitats al putamen	<b>Altres</b>			
Anormalitats als ganglis basals	<b>Problemes de creixement</b>			
Anormalitats al globus pallidus	<b>Retard en el desenvolupament</b>			
Atròfia cortical	Creixement intrauterí deficient			
Atròfia/reducció del cortex frontal	Deformacions			
Atròfia cerebral	Llavi leporí			
Atròfia subcortical cerebral	<b>Vòmits</b>			
<b>Hipersenyal T2 al tàlem</b>	Trastorn de coagulació			
Hipersenyal T2 al tronc encefàlic i ganglis basals	Leucodistròfia			
Hipersenyal T2 al putamen i globus pallidus	Leucoencefalopatia			
<b>Fibrosi a la substància blanca</b>	Fibrosi renal			
<b>Percentatge de casos reportats sobre el total de pacients publicats (%)</b>				
3,5-7,5%	7,5-10%	10-15%	15-25%	> 25%

**Figura 2.7. Manifestacions clíniques identificades en pacients amb COXPD1.** Es detallen les alteracions clíniques detectades, identificant-se un conjunt de manifestacions neurològiques derivades de l'encefalopatia que revela la ressonància magnètica nuclear (RMN). Els colors de les cèl·les fan referència a la freqüència amb què s'han reportat cadascuna de les manifestacions sobre el total de pacients publicats; cal tenir en compte que cada diagnòstic clínic és diferent i no sempre es duen a terme les mateixes exploracions davant uns perfils clínics que, tot i tenir trets comuns, tendeixen a ser heterogenis. Figura generada a partir de la informació de <sup>54-69</sup>.

La insuficiència hepàtica es manifesta en aproximadament la quarta part dels pacients i desencadena la mort prematura en pràcticament tots els casos. El seu diagnòstic s'ha efectuat detectant alteracions de marcadors de dany i/o disfunció hepàtica en plasma: bilirubina, albúmina, alanina aminotransferasa (ALT), gamma glutamil transferasa ( $\gamma$ GT), creatina quinasa (CPK), lactat deshidrogenasa (LDH) i



amoni<sup>54,60,61,63,65,66,68</sup>. D'altra banda, en els casos on s'han pogut obtenir mostres de fetge post mortem, la histologia revela alteracions com: desorganització lobular, fibrosi portal, esteatosi micro- i macrovesicular i colèstasi intracanicular<sup>54,55,58,61,68</sup>, excés de ferro en hepatòcits, formació de pseudo-acins hepàtics<sup>55</sup> i necrosi<sup>54</sup>. Altres observacions han estat l'hepatomegalia transitòria<sup>61,63</sup> i episodis de citòlisi hepàtica<sup>65</sup>.

En algun cas s'ha explorat per histologia l'afectació renal sobre mostres post mortem, detectant-se necrosi glomerular i tubular<sup>68</sup>. L'atròfia muscular, característica de moltes malalties mitocondrials, s'ha detectat en molts dels pacients<sup>65,69</sup>. En contraposició, en cap dels pacients estudiats s'ha arribat a detectar cardiomiopatia<sup>62</sup>. Les causes de mort reportades han estat relacionades principalment amb complicacions respiratòries conseqüència de l'afectació neurològica, o disfunció multisistèmica desencadenada per insuficiència hepàtica greu<sup>58-60</sup>.

Pel que fa al grup de pacients amb supervivències més prolongades<sup>60,62-65,69</sup> cal remarcar que, tot i aconseguir superar els primers anys de vida, mantenen una discapacitat intel·lectual i física greu que els comporta una qualitat de vida molt pobre. Fruit principalment de l'afectació encefalopàtica i les seqüeles del desenvolupament endarrerit, mantenen un baix to muscular, dificultats per empassar els aliments, dependència total per incorporar-se, impossibilitat de parlar o seguir directrius i incontinència urinària i fecal, entre d'altres<sup>69</sup>.

El nombre reduït de pacients diagnosticats amb COXPD1, així com l'heterogeneïtat dels seus quadres clínics fan complicat establir correlacions entre el genotip i les manifestacions fenotípiques. Tot i així, amb els avenços en la seqüenciació, alguns autors van plantejar una possible relació entre la localització de les mutacions i la severitat de la malaltia. Així doncs, els casos menys greus, que normalment no presenten signes d'insuficiència hepàtica<sup>56,57,60</sup> i solen tenir major supervivència<sup>62,63</sup>, podrien estar associats a mutacions en regions perifèriques d'EFG1; mentre que els casos més greus, majoritàriament amb afectació hepàtica, s'ha plantejat que podrien venir donats per mutacions localitzades en la part central de la proteïna<sup>61</sup>. No obstant això, estudiant els casos dels pacients diagnosticats més recentment (almenys 18 pacients nous en els darrers 4 anys)<sup>64,65,67-69</sup>, sembla que aquest plantejament perd força<sup>67</sup> (*Figura 2.6*).

## 2.2.4. Models d'estudi de la COXPD1

Actualment existeixen diversos models d'experimentació per a la COXPD1. Per a estudis *in vitro* s'utilitzen principalment fibroblasts i biòpsies de pacients (*apartat 2.2.4.1*), tot i que també s'han fet servir cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSCs) (*apartat 2.2.4.2*). D'altra banda, també s'han reportat estudis *in vivo* sobre organismes genèticament modificats per al gen ortòleg de *GFM1* en diferents espècies: *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* (*apartat 2.2.4.3*) i ratolí (*apartat 2.3.2.1*).

### 2.2.4.1. Fibroblasts i biòpsies de pacients amb COXPD1

Els fibroblasts de pacients són el tipus cel·lular més utilitzat fins ara per tal d'estudiar i caracteritzar les alteracions bioquímiques de la malaltia, sent la raó principal la seua fàcil obtenció de forma poc invasiva a partir d'una biòpsia de pell. Així doncs, des de l'aparició dels primers pacients s'han fet servir cultius de fibroblasts per avaluar el fenotip bioquímic i molecular resultant de les mutacions en *GFM1*. Concretament l'expressió de *GFM1* a nivell d'ARNm i proteïna, la taxa de traducció mitocondrial, els nivells de proteïnes estructurals de l'OXPPOS codificades a l'ADNmt, l'alteració de la CTE (nivells dels complexos acoblats i activitats enzimàtiques dels mateixos) i altres marcadors de la funció mitocondrial o mecanismes moleculars de resposta activats davant una traducció mitocondrial defectuosa.

S'ha vist que les mutacions en *GFM1* provoquen als fibroblasts dels pacients una reducció de proteïna EFG1 fins a nivells difícils de quantificar mitjançant immunodetecció per western-blot<sup>62,63</sup>. En conseqüència, es detecta reducció de la síntesi *de novo* de polipèptids mitocondrials en l'assaig de traducció mitocondrial *in organello*<sup>57,62</sup> i una deficiència combinada de la fosforilació oxidativa, reduint-se de forma clara les activitats enzimàtiques dels complexos I i IV<sup>54,58,60,61</sup>, i en alguns casos les dels complexos III i V, de forma menys accentuada<sup>55-57</sup>. Aquest dèficit és coherent amb les observacions de reducció de les subunitats dels complexos quan s'analitzen per western blot SDS-PAGE, i dels complexos acoblats (amb les subunitats correctament acoblades entre elles), quan s'analitzen per western blot BN-PAGE en extractes mitocondrials.

Tot i constituir un model útil per al diagnòstic i estudi de la COXPD1, el comportament de les cèl·lules sol ser diferent segons el llinatge a què pertanyen. Això, sumat a que el quadre clínic de la malaltia mostra afectació heterogènia entre òrgans, fa que sovint sigui un error extrapolar els resultats dels fibroblasts a altres teixits i el més convenient sigui dur a terme estudis paral·lels i independents amb altres mostres. Quan s'ha pogut, s'ha accedit a mostres de múscul esquelètic, fetge i fins i tot cor i ronyó per replicar molta de la caracterització efectuada sobre fibroblasts<sup>54,55,61,62</sup>.

Les biòpsies de múscul (per exemple quàdriceps) de pacients s'han utilitzat en repetides ocasions per detectar per histoquímica la reducció de l'activitat COX (citocrom c oxidasa - CIV) a les fibres musculars, acompanyada algun cop d'un increment de l'activitat SDH (succinat deshidrogenasa - CII). A més, la tinció resultant de les activitats COX i SDH simultànies evidencia el defecte del CIV<sup>56,60,62</sup>. També s'ha detectat l'increment de la mida de gotes lipídiques intracel·lulars tenyides amb negre Sudan<sup>62</sup> o augment del contingut de glicogen<sup>56</sup>.

En condicions normals s'ha descrit que els nivells basals de complexos OXPHOS acoblats CI, CIII, CIV i CV estan per sota del 20-30% en mitocondris de fetge en comparació amb múscul esquelètic i cor; i estan més reduïts encara en fibroblasts<sup>55</sup>. Les anàlisis dutes a terme sobre mostres de dos pacients bessons<sup>55</sup> van revelar que el teixit més afectat era el fetge, amb menys del 10% de CI i CIV acoblats i una reducció del 50% en l'acoblament del CV. El múscul esquelètic mostrava una reducció del 50% del CI i del 80% dels complexos IV i V. En fibroblasts es va observar una reducció similar del 80% de CI i CIV, i reducció del 40-60% de CIII i CV. En el cas de cor, exceptuant la reducció del 50% del CIV, la resta de complexos estaven dintre de la normalitat. Per tant, tot i que EFG1 s'expressa de forma ubíqua, el patró de COXPD és únic i específic per a cada teixit i tipus cel·lular examinat<sup>55</sup>. Cal destacar que en tots els pacients l'activitat del CII es conserva (pel fet d'estar compost sols per subunitats codificades a l'ADNn) i no es detecta cap alteració qualitativa o quantitativa a l'ADNmt<sup>60</sup>.

També s'ha descrit la possibilitat de reducció de les activitats enzimàtiques de CI, CIII i CIV en fibroblasts de pacient i manca d'afectació de les activitats en múscul esquelètic del mateix subjecte<sup>57</sup>, sent més comú trobar-se amb la situació oposada<sup>58</sup>.

Aquest fet reforça la importància d'analitzar rigorosament el perfil bioquímic almenys en fibroblasts i biòpsia muscular de pacients sospitosos de patir una malaltia mitocondrial com la COXPD1, ja que els defectes dels sistema OXPHOS no sempre són evidents als diferents teixits<sup>57</sup>.

La diferent afectació dels teixits davant la mateixa mutació en EFG1 suggereix que l'estabilitat de la proteïna mutada pot diferir entre teixits, o que els mecanismes moleculars de resposta compensatoris que pugin haver tingut lloc poden ser diferents. A més, la gravetat del defecte OXPHOS correlaciona amb els nivells residuals de la forma mutada d'EFG1, i això pot explicar l'afectació selectiva dels diferents teixits al fenotip clínic<sup>55,58</sup>. També s'han analitzat en teixits control els nivells dels diferents factors d'elongació (EFTu, EFTs i EFG1) comprovant que els ratios entre ells són diferents segons la mostra estudiada. Paral·lelament, en cor s'ha associat la forma mutada d'EFG1 amb un increment dels nivells d'EFTu com a possible mecanisme compensatori, i lleugera reducció d'EFTs. Tot plegat, es reforça la idea que la maquinària de traducció i la seua regulació és diferent entre teixits<sup>55</sup>.

#### **2.2.4.1.1. Estudis de complementació i cerca de compostos terapèutics sobre fibroblasts de pacients**

Els estudis de complementació sobre fibroblasts de pacients s'han dut a terme en repetides ocasions per tal de confirmar la patogenicitat de noves mutacions descrites en *GFM1* i la seua repercussió sobre la funcionalitat del sistema OXPHOS<sup>56,57</sup>. Aquests consisteixen a expressar una forma recombinant *wild-type* d'EFG1 en els fibroblasts immortalitzats per tal d'analitzar l'efecte resultant sobre el perfil bioquímic inicial. Sovint s'ha revertit el perfil COXPD1 molecular a les cèl·lules transfectades, recuperant l'activitat COX a nivell histoquímic o les activitats enzimàtiques de CI i CIV, així com els nivells dels complexos CI, CIII, CIV i CV acoblats<sup>54,57</sup>. Aquest efecte, acompanyat d'una recuperació de la traducció mitocondrial, ha estat molt important en el diagnòstic dels pacients i una prova inicial que recolza la teràpia gènica com abordatge per tractar la malaltia.

La sobreexpressió del factor d'iniciació MTIF3 o el factor EFG2 en fibroblasts d'un pacient amb COXPD1 es va veure que no comportava cap increment de traducció

mitocondrial; i malgrat que l'increment d'EFG2 va augmentar lleugerament els nivells de CI, CIII i CV, no va tenir cap efecte sobre el CIV<sup>54</sup>. Inicialment es creia que EFG2 era un factor d'elongació que podria suplir la funcionalitat d'EFG1, tenint en compte que tots dos són homòlegs del factor d'elongació G procariota i mantenen un 35% d'identitat entre ells. No obstant això, s'ha comprovat posteriorment que els dos factors duen a terme funcions independents i EFG2 actua com a factor de reciclatge un cop finalitza la traducció mitocondrial<sup>76,77</sup>.

Per tal d'aprofundir en els possibles mecanismes compensatoris davant el defecte a la traducció mitocondrial, alguns investigadors van optar per sobreexpressar els factors EFG1, EFTu i EFTs en fibroblasts controls i de pacients amb COXPD1. L'increment dels nivells d'EFG1 es va relacionar amb un increment d'EFTu i EFTs als fibroblasts de pacients. Contràriament, en fibroblasts controls, un increment dels nivells d'EFTu i EFTs, individual o combinada, va reduir de forma significativa la traducció mitocondrial i en conseqüència els nivells de CI, CIII, CIV i CV, així com l'activitat COX. El mateix experiment sobre fibroblasts de pacients no va comportar variacions als nivells dels complexos OXPHOS acoblats. Aquests resultats suggereixen que l'eficiència de la traducció mitocondrial depèn dels ratios relatius entre els factors d'elongació, específics i diferents per a cada teixit<sup>55</sup>.

Recentment s'ha considerat els fibroblasts amb mutacions en *GFM1*<sup>61</sup> un bon model d'estudi de malalties mitocondrials, de gran utilitat per diverses raons: (1) l'alteració de *GFM1* comporta una reducció dels nivells de proteïnes mitocondrials fàcilment quantificable i que compromet la funció mitocondrial; (2) les cèl·lules mutants creixen bé en medi ric amb glucosa i el cultiu durant 3 dies en un medi amb galactosa es suficient per conèixer l'eficàcia d'un tractament; i (3) ofereixen una elevada reproductibilitat dels experiments<sup>78</sup>. És per això, que ja s'han començat a utilitzar per a testar i seleccionar composts que puguin millorar la funció mitocondrial. Un exemple ha estat l'ús de la tetraciclina sobre els fibroblasts de *GFM1* mutants per promoure un fenomen biològic conegut com a mitohormesi (inducció d'un estrès mitocondrial suau per activar una resposta amb efectes beneficiosos) i revertir el fenotip d'aquest model cel·lular. Concretament, s'ha comprovat com l'ús d'aquest antibiòtic activa la UPR<sup>mt</sup> (resposta mitocondrial a proteïnes mal plegades) i aquesta

redueix els efectes de les mutacions patogèniques en *GFM1*, millorant la funcionalitat dels fibroblasts dels pacients<sup>78</sup>.

#### 2.2.4.2. Cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSCs)

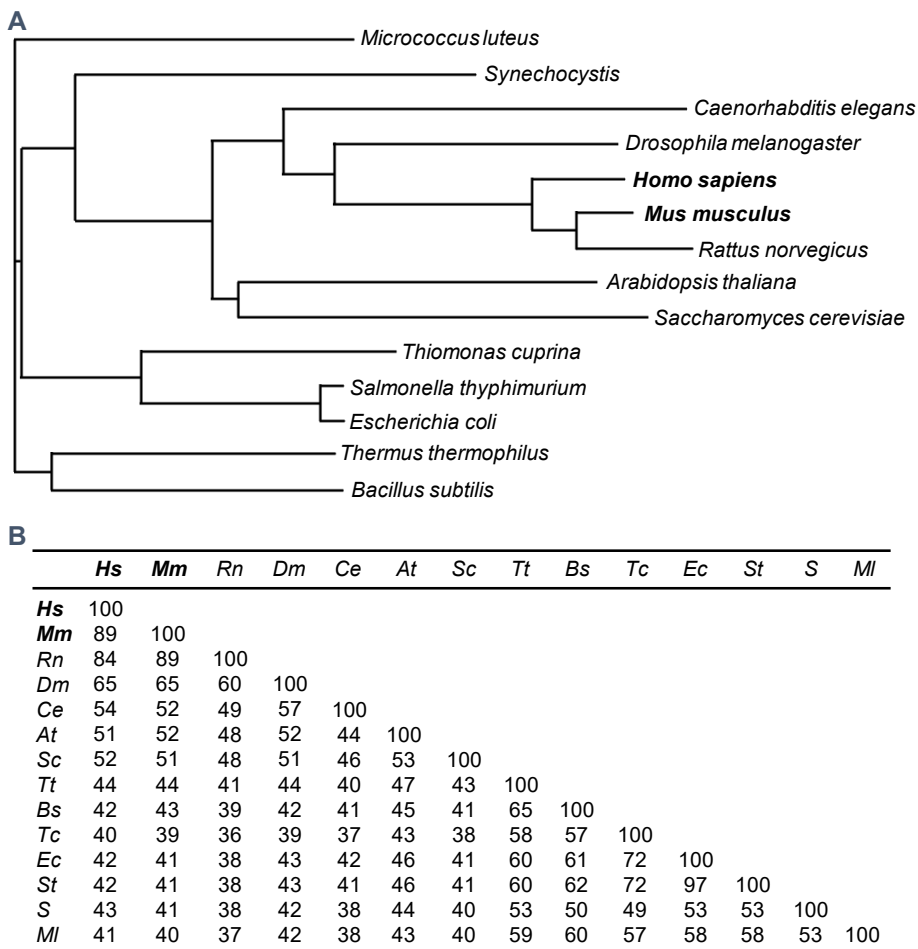
Una característica important de les malalties mitocondrials és l'heterogeneïtat fenotípica entre els diferents teixits de pacients. Tenint en compte que l'accés a tipus específics cel·lulars o biòpsies rellevants per la malaltia sovint està limitat, diversos grups de recerca han donat un pas endavant desenvolupant iPSCs que es puguin derivar cap als tipus cel·lulars d'interès<sup>79</sup>.

En el cas de la COXPD1, es disposa de la línia *GFM1SV.25*<sup>80</sup> que conté les mutacions p.G469Vfs\*84 i p.R671C en heterozigosi. Aquesta línia es va generar partint de fibroblasts d'una pacient, utilitzant un virus Sendai no integratiu amb els factors de reprogramació *OCT3/4*, *SOX2*, *CMYC*, *KLF4*<sup>62,80,81</sup>. Actualment, es té coneixement de que es treballa en la caracterització de diferents tipus cel·lulars derivats de les iPSCs (hepatòcits i neurones) i el seu ús per testar potencials teràpies, tot i que pel moment no s'han publicat resultats (comunicació personal).

D'altra banda, altres investigadors han optat per la reprogramació directa de fibroblasts de pacients amb COXPD1, com a tecnologia alternativa a les iPSCs, generant neurones induïdes (iNs)<sup>78</sup>. És interessant destacar que aquestes iNs responien al tractament amb tetraciclina, revertint-se parcialment el fenotip COXPD1 molecular, tal i com s'havia observat amb fibroblasts de pacients<sup>78</sup>.

#### 2.2.4.3. Models per a estudis *in vivo*

La proteïna EFG1 humana conserva una alta homologia amb les proteïnes ortòlogues d'altres organismes eucariotes i procariotes (*Figura 2.8*). Així doncs, alguns d'aquests s'han utilitzat com a models *in vivo* per tal d'entendre millor la funció d'EFG1, fisiopatologia de la malaltia i tenir més opcions per testar potencials teràpies<sup>56,77,82</sup>.



**Figura 2.8. Arbre filogenètic del factor EFG1 mitocondrial humà, de ratolí i d'altres espècies procarïotes i eucariotes. (A)** Arbre filogenètic obtingut amb el programa *ClustalX* partint de les seqüències proteïques d'EFG1 ortòlogues procedents de diferents organismes. **(B)** La taula mostra els percentatges d'identitat de les seqüències entre les diferents espècies. Hs: *Homo sapiens* (GenBank Accession No. AF309777); Mm: *Mus musculus* (AF315511); Rn: *Rattus norvegicus* (Q07803); Dm: *Drosophila melanogaster* (AAF52495); Ce: *Caenorhabditis elegans* (T21534); At: *Arabidopsis thaliana* (AAD32833); Sc: *Saccharomyces cerevisiae* (CAA41267); Tt: *Thermus thermophilus* (P13551); Bs: *Bacillus subtilis* (BAA11003); Tc: *Thiomonas cuprina* (AAB87733); St: *Salmonella typhimurium* (CAA45880); Ec: *Escherichia coli* (CAA25120); S: *Synecho-cystis* (CAA46277); Ml: *Micrococcus luteus* (P09952). Figura adaptada de <sup>32</sup>.

Els assaigs de complementació sobre soques recombinants de **Saccharomyces cerevisiae** s'han fet servir per comprovar la patogenicitat de mutacions antisentit en EFG1; en aquest cas sobre la proteïna ortòloga MEF1. Per exemple, amb la mutació p.M496R en EFG1, que es correspon amb p.M516R en MEF1, es va avaluar la funció

OXPHOS per creixement en medis amb glicerol, etanol o altres composts com a fonts de carboni després de transformar soques *knock-out* per a MEF1 ( $\Delta mef1$ ) amb els al·lels *wild-type* ( $MEF1^{wt}$ ) o mutant ( $mef1^{M516R}$ ). En comprovar que el comportament de  $mef1^{M516R}$  era pràcticament igual que el de  $\Delta mef1$  i es va concloure que la mutació humana també era deletèria en llevat<sup>56</sup>.

A *Drosophila melanogaster* el locus *ico* codifica la proteïna ortòloga de l'EFG1 humana (hEFG1), que es manté conservada i amb un rol similar<sup>77</sup>. En aquest organisme es va observar que les mutacions antisentit en EFG1 causaven la mort embrionària mentre que les nul·les permetien sobreviure fins l'estat larval. A més a més, es va estudiar l'import de l'EFG1 mutada a mitocondris. Les isoformes de hEFG1 p.N174S i p.S321P expressades en mosques eren estables i funcionals, i es va suggerir que als pacients amb COXPD1, la quantitat d'EFG1 residual en mitocondris podria explicar el grau d'afectació de cada teixit<sup>77</sup>.

D'altra banda, es va generar un model de *C.elegans* amb mutacions en *gfm-1* (gen ortòleg a *GFM1*)<sup>82</sup>. Els cucs mutants presentaven un desenvolupament endarrerit i es van utilitzar per testar el potencial terapèutic d'AP39 com a molècula proveïdora de H<sub>2</sub>S a mitocondris (font d'electrons per a la cadena respiratòria). AP39 va poder restituir els nivells d'ATP reduïts de la soca mutant, però no va poder revertir el consum d'oxigen deficient, els defectes de moviment i la menor supervivència dels cucs mutants<sup>82</sup>.

*Drosophila melanogaster*, *C.elegans* o *Danio rerio* (peix zebra) s'han utilitzat per l'estudi de molts processos mitocondrials i malalties humanes, però malgrat els seus avantatges i similituds amb humans<sup>83,84</sup> són molt diferents sobretot a nivell fisiològic. Això fa que siguin organismes menys apropiats per a situacions on es requereix major rigor, com en l'avaluació preclínica de tractaments o teràpies on la farmacocinètica, eficàcia i toxicitat poden veure's alterades. Tot i això, no existeix un model experimental perfecte, i aquestes espècies poden ser importants per complementar models murins a l'hora d'estudiar tractaments i mecanismes moleculars implicats a les malalties humanes i concretament als desordres mitocondrials.



## 2.3. El ratolí com a model per a estudis *in vivo* de malalties mitocondrials

El ratolí es considera una espècie molt apropiada per a la recerca biomèdica gràcies a l'alta similitud genètica i fisiològica amb humans, la seua mida petita (que facilita el seu manteniment) i el cicle reproductiu relativament curt amb nombroses ventrades, sumant-se l'existència de diverses aproximacions per generar soques modificades genèticament (*apartat 2.3.1*)<sup>85–87</sup>. A més, en el cas de les malalties mitocondrials, que afecten de forma important a teixits post-mitòtics, l'ús del ratolí com a model és preferible al de línies cel·lulars, ja que aquestes requereixen divisió i no tenen el mateix grau de diferenciació. Per últim, és una de les espècies més utilitzades a la recerca preclínica per testar potencials aproximacions terapèutiques.

Tot i això, cal tenir en compte possibles punts febles: malgrat la seua alta similitud amb humans, les manifestacions fenotípiques derivades de modificacions genètiques poden ser diferents a les esperades o fins i tot nul·les, i la generació i manteniment del model és laboriós i car<sup>85</sup>.

### 2.3.1. Generació de ratolins modificats genèticament

La possibilitat d'introduir seqüències d'ADN d'interès al genoma de la línia germinal o cèl·lules mare embrionàries ha convertit el ratolí en un model experimental potent i indispensable en recerca. Les seqüències d'ADN poden integrar-se al genoma a l'atzar, o en un locus específic per recombinació homòloga, permetent entre moltes altres opcions: eliminar o introduir mutacions dintre de gens d'interès per estudiar la seua funció, introduir gens humans dintre del genoma murí generant models animals dirigits a estudiar gens i malalties humanes, o introduir gens reporters per monitoritzar *in vivo* o *ex vivo* l'expressió de gens d'interès<sup>88</sup>.

Els models murins per l'estudi de malalties mitocondrials han consistit tradicionalment en ratolins **knock-out** (KO) constitutius o condicionals per a un gen d'interès, utilitzant l'aproximació de *gene-trapping* a l'atzar o de forma més dirigida el sistema de recombinació homòloga combinat amb el sistema *Cre-loxP* que comporten la inactivació completa d'un gen o el seu silenciament parcial. D'altra banda, durant els darrers anys s'han utilitzat amb més freqüència ratolins **knock-in**

(KI), incorporant en alguns casos mutacions en gens ortòlegs que s'han relacionat amb malalties en humans<sup>85</sup>.

### 2.3.1.1. Estratègies de mutagènesi aleatòria

Les aproximacions de *gene-trapping* i mutagènesi induïda amb N-etil-N-nitrosurea (ENU), basades en mutagènesi a l'atzar seguida de la identificació dels gens afectats, han donat lloc a ratolins modificats genèticament que també s'han utilitzat com a models de malalties mitocondrials<sup>89,90</sup>. Ha estat una estratègia utilitzada per consorcis internacionals creats amb l'objectiu generar al·lels *knock-out* condicionals per a tots els gens codificants del genoma de ratolí<sup>91</sup>, permetent estudiar els efectes associats a la manca del gen diana i incloure els animals en un repositori públic a disposició de la comunitat científica. Tot i això, cal tenir en compte que el *gene-trapping* pot donar lloc a una reducció de l'expressió del gen diana en compte del seu silenciament complet, mantenint uns nivells de proteïna romanents que poden afectar el fenotip del ratolí.

### 2.3.1.2. Edició gènica basada en la recombinació homòloga

L'estratègia d'edició gènica basada en el sistema de recombinació homòloga utilitza vectors que inclouen construccions extenses amb una regió gènica modificada. A la *Figura 2.9A* es representa de forma general el procés seguit per generar un ratolí modificat genèticament condicional, que pot ser utilitzat per obtenir ratolins KO condicionals constitutius o específics de teixit. Les estratègies per generar al·lels *knock-out* i *knock-in* constitutius utilitzen la mateixa aproximació general<sup>85</sup>.

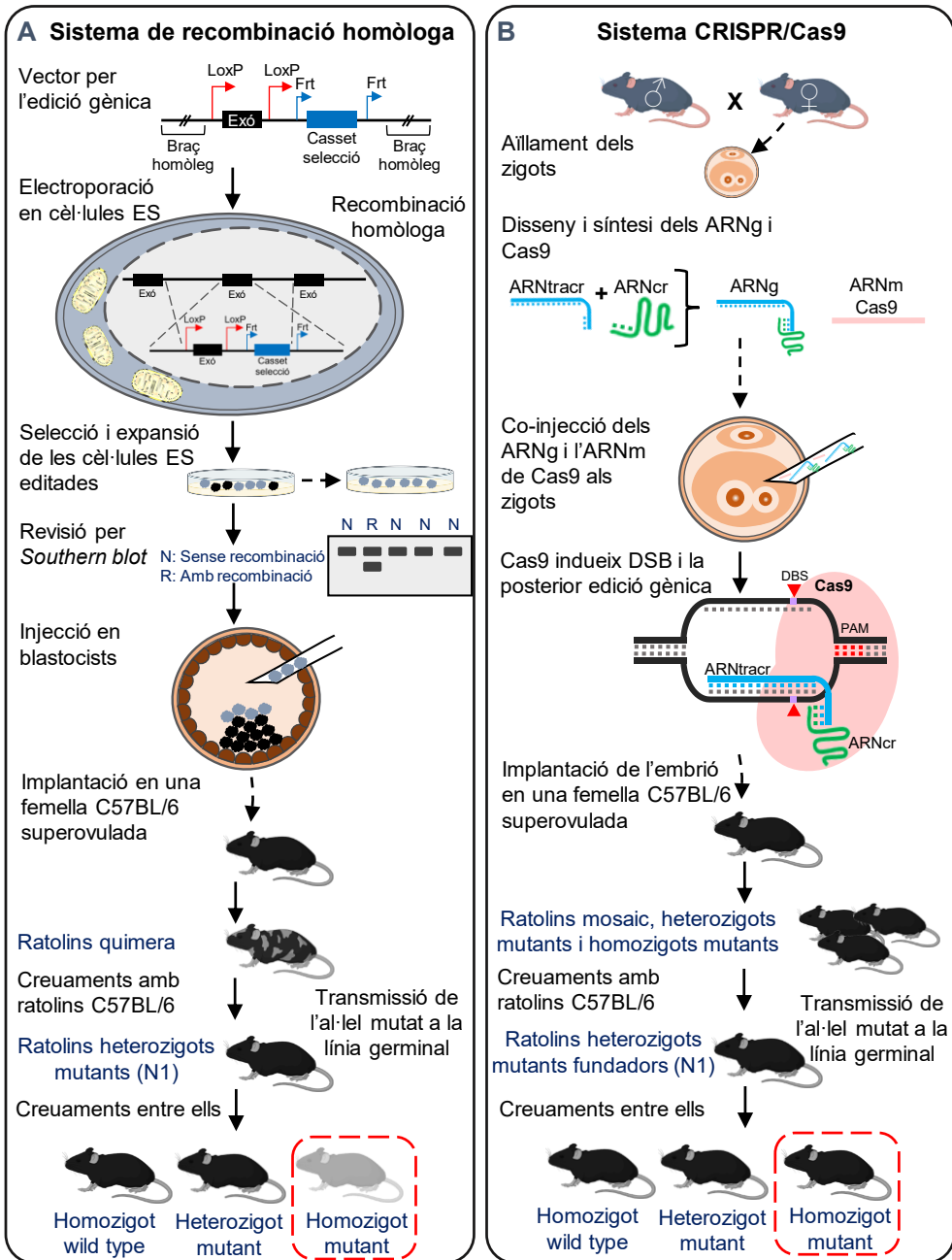
S'utilitzen vectors amb seqüències 5' i 3' homòlogues flanquejant un exó amb llocs *LoxP*, i un casset de selecció delimitat per llocs *Frt*. L'acció de les recombinases *Cre* i *Frt* extreu l'exó diana o el casset de selecció respectivament. El vector és electroporat en cèl·lules mare embrionàries (ES), amb fons genètic diferent del C57BL/6, i la construcció s'integra per recombinació homòloga al locus diana. Es seleccionen els clons de cèl·lules ES modificades (resistents a neomicina), s'injecten en blastocists de ratolins C57BL/6 (que també contenen cèl·lules ES del donant) i s'implanten en una femella superovulada. S'obtenen ratolins quimera que es creuen amb ratolins C57BL/6 fins aconseguir la transmissió de l'al·lel editat a través de la

línea germinal. Els aparellaments de ratolins heteozigots mutants (N1) acaben permeten obtenir ratolins homozigots mutants (*Figura 2.9A*). En conjunt el procés pot trigar al voltant de 16 mesos.

### 2.3.1.3. Edició gènica per CRISPR/Cas9

L'estratègia d'edició gènica per CRISPR/Cas9 (*Figura 2.9B*), altament utilitzada durant la darrera dècada, permet reduir el temps de generació de ratolins modificats genèticament i en la majoria dels casos també el cost, pel fet de no necessitar construccions gèniques complexes ni selecció de cèl·lules ES<sup>92</sup>. Aquest sistema es basa en la utilització d'ARN guia (ARNg), que són seqüències curtes d'ARN (ARNcr) fusionades a ARN transactivadors (ARNtracr), per dirigir la nucleasa Cas9 a un locus genòmic específic on provocarà un tall de la doble cadena d'ADN (DSB). El DSB es repara per la unió d'extrems no homòlegs (NHEJ) o la reparació dirigida per homologia (HDR). La NHEJ és ràpida, però pot crear insercions o delecions de longituds variables que poden inactivar el gen diana<sup>93,94</sup>. La HDR necessita d'un motlle d'ADN per dur a terme la reparació, de forma que la tècnica CRISPR/Cas9 combinada amb una seqüència motlle mutada, es pot utilitzar per inserir mutacions o fer marcatge de gens.

La tecnologia CRISPR/Cas9 presenta els següents avantatges: (a) requereix tan sols el disseny d'encebadors (de 20 nucleòtids) complementaris a la seqüència genòmica diana seguida d'un motiu adjacent protoespaiador (PAM) i el seu clonatge en un vector d'expressió, podent dirigir Cas9 a pràcticament qualsevol regió del genoma; (b) els ARN guia (ARNg), ARNm de Cas9 i ADN motlle poden introduir-se directament als zigots que, després de ser transferits a una femella superovulada, donaran lloc als ratolins mutants<sup>95,96</sup>. Com que existeix la possibilitat que els ratolins generats siguin mosaic, aquests s'aparellen amb ratolins *wild-type* del mateix fons genètic perquè, si hi ha transmissió a la línia germinal, s'obtingui la primera generació de ratolins genèticament homogenis. Com a desavantatges cal tenir en compte que: (a) l'ARNcr pot dirigir Cas9 a més d'un locus diferent al genoma i s'han de descartar les mutacions no desitjades o fora de l'objectiu (*off-targets*) i (b) la NHEJ també pot introduir mutacions no desitjades dins o fora de la regió diana, tot i que s'han anat desenvolupant mètodes per millorar la reparació per HDR<sup>97</sup>. (*Figura 2.9B*).



**Figura 2.9. Sistemes de generació de ratolins modificats genèticament.** Es presenten de forma esquemàtica els passos a seguir per la generació de ratolins modificats genèticament a l'estratègia basada en la recombinació homòloga (A) i a l'aproximació basada en l'edició gènica amb la tecnologia CRISPR/Cas9 (B). Figura adaptada de <sup>85,92</sup>.

### 2.3.2. Models de ratolí per l'estudi de la traducció mitocondrial

Existeix un nombre important de models de ratolins amb alteracions del sistema OXPHOS, la majoria dels quals contenen mutacions a l'ADNn, tot i que també s'han generat ratolins transmitocondrials (amb alteracions a l'ADNmt)<sup>98</sup>. Els models es poden agrupar segons si la disfunció ve donada per defectes en subunitats individuals dels complexos CI-CV o factors d'acoblament dels mateixos<sup>87</sup>, o per defectes en factors de regulació i altres components requerits per a la funció mitocondrial<sup>86</sup>. Dintre d'aquest segon grup, destaca un conjunt de models murins amb defectes en gens nuclears que estan implicats de forma directa o indirecta en el mecanisme de traducció mitocondrial (*Taula 2.2*). Entre aquests n'hi ha que reproduïen mutacions descrites com a patogèniques en humans (*Slirp*<sup>99</sup>, *Lrpprc*<sup>100-102</sup>, *Clpp*<sup>103</sup>, *Mrps34*<sup>104</sup>, *Dars2*<sup>105,106</sup> i *Wars2*<sup>107</sup>), mentre que altres no s'han vinculat amb malalties mitocondrials en humans (*Mterf4*<sup>108</sup>, *Nsun4*<sup>109</sup>, *Ptcd1*<sup>110,111</sup>, *Mrps5*<sup>112</sup>, *Mrps12*<sup>113</sup>).

Els models de ratolí recopilats a la *Taula 2.2* han ampliat el coneixement sobre la funcionalitat de diferents proteïnes i les conseqüències derivades de la seua manca o alteració sobre traducció mitocondrial i el fenotip dels animals. Es tracta de ratolins KO (constitutius o condicionals específics de teixit) i KI constitutius per a proteïnes relacionades amb: la maduració i estabilització de l'ARNm (*LRPPRC*<sup>100-102</sup>, *SLIRP*<sup>99</sup>) i de l'ARNr (*TFB1M*<sup>114</sup>, *NSUN4*<sup>109</sup>, *PTCD1*<sup>110,111</sup>), la biogènesi i acoblament dels mitoribosomes (*MTERF4*<sup>108</sup>, *CLPP*<sup>103</sup>), la càrrega d'ARNt amb aminoàcids (*DARS2*<sup>105,106</sup>, *WARS2*<sup>107</sup>), la conformació estructural de les subunitats 28S i 39S del mitoribosoma (*MRPS5*<sup>112</sup>, *MRPS12*<sup>113</sup>, *MRPS34*<sup>104</sup>), i la fase d'iniciació de la síntesi proteica mitocondrial (*MTIF3*<sup>115</sup>).

Taula 2.2. Models de ratolí amb defectes a la traducció mitocondrial.

Gen	Funció mitocondrial	Modificació genètica	Fenotip	Ref.
<b>Lrpprc</b>	Poliadenilació i estabilització de l'ARNm-mt formant un complex amb SLIRP	KO constitutiu (RH)	Letalitat embrionària (E8.5).	100
		KO específic de cor i múscul esquelètic ( <i>Ckmm-cre</i> )	Esperança de vida de 16 st. Cardiomiopatia derivada de traducció mt desregulada (proteïnes sobre- i sub- expressades) i afectació del CIV que s'accentua amb l'edat.	102
		KO específic de fetge ( <i>Alb-cre</i> )	Esperança de vida normal amb retard del desenvolupament i hepatopatia mitocondrial. Defecte de CIV i CV i alteració del metabolisme dels àcids grassos.	101
<b>Slirp</b>	Estabilització de l'ARNm-mt. Acoblament del mitoribosoma i presentació dels ARNm madurs.	KO constitutiu (RH)	Esperança de vida normal, aparentment sans i amb lleugera disminució de pes. Reducció dels ARNm-mt. Reducció de la traducció mitocondrial en fetge i ronyó. Manca d'afectació dels complexos OXPHOS. Promoció de la biogènesi del mitoribosoma.	99
<b>Tfb1m</b>	Dimetiltransferasa mitocondrial, actua sobre l'ARNr 12S i estabilitza la subunitat 28S.	KO constitutiu (RH)	Letalitat embrionària (E8.5).	114
		KO específic de cor i múscul esquelètic ( <i>Ckmm-cre</i> )	Esperança de vida de 24 st. Cardiomiopatia derivada de traducció mt reduïda i COXPD.	
<b>Nsun4</b>	Metilació de l'ARNr 12S. Forma un complex amb MTERF4 requerit per l'acoblament del mitoribosoma.	KO constitutiu (RH)	Letalitat embrionària (E8.5).	109
		KO específic de cor i múscul esquelètic ( <i>Ckmm-cre</i> )	Esperança de vida de 25 st. Cardiomiopatia progressiva. Traducció mitocondrial reduïda i afectació de CI, CIII, CIV i CIV. Increment de la transcripció mitocondrial, estabilització dels ARN-mt i augment de les proteïnes del mitoribosoma.	
<b>Ptcd1</b>	Maduració de l'ARNr, unió a l'ARNtLeu i regulació de la traducció mitocondrial	KO constitutiu (RH)	Letalitat embrionària en homozigosi. El model <i>Ptcd1<sup>+/-</sup></i> és haploinsucient però viable. Obesitat en l'estat adult amb esteatosi hepàtica i hipertròfia cardíaca. Reducció de la traducció mitocondrial i afectació del processament de l'ARN, afectació de la RC, desacoblament i alteració de la morfologia mitocondrial. Fenotip hepàtic més clar que en cor, tot i que amb l'edat s'accentua en ambdós teixits.	110,111
		KO constitutiu (RH)	Letalitat embrionària (E8.5).	108
<b>Mterf4</b>	Control de la biogènesi del mitoribosoma i regulació de la traducció mitocondrial.	KO constitutiu (RH)	Letalitat embrionària (E8.5).	
		KO específic de cor i múscul esquelètic ( <i>Ckmm-cre</i> )	Esperança de vida de 21 st. Manifesten cardiomiopatia. Reducció de la traducció mitocondrial i afectació combinada de l'OXPHOS. Increment d'elements del mitoribosoma.	
<b>Cipp</b>	Proteasa mitocondrial implicada en la biogènesi del mitoribosoma.	KO constitutiu (RH)	Viables en homozigosi, amb certa mortalitat prenatal. Deficiència de la RC moderada conseqüència d'una traducció mitocondrial ineficient que ve donada per la reducció de la quantitat de mitoribosomes acoblats (55S). Fenotip clar en cor i múscul esquelètic, i en menor mesura en fetge; accentuat amb l'edat.	103
<b>Wars2</b>	Triptofanil-ARNt sintetasa mitocondrial	KI constitutiu. Introducció de la mutació hipomòrfica recessiva p.V117L per mutagènesi induïda amb ENU.	Fenotip heterogeni que inclou pèrdua d'oïda, disminució i afectació del teixit adipós i cardiomiopatia hipertròfica. Defecte de la traducció mitocondrial, deficiències de la RC i increment de la biogènesi mitocondrial específiques de teixit. Activació de ISR i canvis metabòlics dependents de grau d'afectació de la traducció mitocondrial.	107

Taula 2.2. Continuació.

Gen	Funció mitocondrial	Manipulació genètica	Fenotip	Ref.
<b>Dars2</b>	Aspartil-ARNt sintetasa mitocondrial	KO constitutiu (RH)	Letalitat embrionària (E8.5).	105
		KO específic de cor i múscul esquelètic ( <i>Ckmm-cre</i> )	Esperança de vida de 6 st. Cardiomiopatia greu i fibrosi muscular. Reducció general de la traducció mitocondrial en cor i múscul esquelètic, afectació de CI, CIII i CIV i activació de mecanismes resposta específics de teixit.	106
<b>Dars2</b>	Aspartil-ARNt sintetasa mitocondrial	KO específic de neurones de l'àrea frontal cerebral i l'hipocampus ( <i>CaMKIIa-cre<sup>ERT</sup></i> ) i de cèl·lules productores de mielina ( <i>Pip1-cre<sup>ERT</sup></i> ).	Supressió induïda de l'expressió de <i>Dars2</i> a partir de les 4 st. Les neurones adultes KO pateixen una forta disfunció mitocondrial i mort cel·lular progressiva. Les cèl·lules productores de mielina tenen un defecte a la RC, però resisteixen millor la mort cel·lular que les neurones de l'àrea frontal i l'hipocampus. S'identifica un procés inflamatori.	106
		KI constitutiu. Introducció de la mutació recessiva p.V338Y. (RH)	Esperança de vida i aparença física normals. Susceptibles al dany de l'oïda induït per sorolls, i alteracions del comportament relacionades amb ansietat. Els mitocondris de còrtex cerebral mostren reducció de l'OCR, menor activitat del CIV, nivells d'ATP inferiors i increment de les ROS-mt.	112
<b>Mrps12</b>	Proteïna estructural de la subunitat petita (28S) del mitoribosoma	KI constitutiu. Introducció de la mutació recessiva p.K711 ( <i>error-prone</i> ). (CRISPR + RH).	Esperança de vida normal. Traducció mitocondrial més accelerada però poc acurada que comporta un defecte d'acoblament de l'OXPPOS. S'activen mecanismes resposta dirigits a estabilitzar les proteïnes traduïdes i promoure el cicle de Krebs; s'activa la biogènesi mitocondrial, expressió de la telomerasa i proliferació cel·lular hepàtica (poliploïdia), normalitzant així el metabolisme.	113
		KI constitutiu. Introducció de la mutació recessiva p.K71T ( <i>hyper-accurated</i> ). (CRISPR + RH).	Esperança de vida normal. Desenvolupen cardiomiopatia. L'alta fidelitat de traducció mitocondrial fa que aquesta sigui lenta i no promou resposta d'estrès mitocondrial, donant lloc a l'afectació cardíaca.	113
<b>Mrps34</b>	Proteïna estructural de la subunitat petita (28S) del mitoribosoma. Estabilització de l'ARNr 12S.	KI constitutiu. Introducció de la mutació recessiva p.T203C per mutagènesi induïda amb ENU.	Esperança de vida normal. Fenotip heterogeni que inclou afectació cardíaca i disfunció hepàtica que s'accentuen amb l'edat. Es desestabilitza la SSU del mitoribosoma. La traducció mitocondrial es redueix de forma global reduint les proteïnes codificades per l'ADNmt i els complexos OXPPOS acoblats; i disminuint l'OCR i les activitats de la RC.	104
<b>Mtif3</b>	Factor d'iniciació de la traducció mitocondrial	KO constitutiu (RH)	Letalitat embrionària (E8.5).	115
		KO específic de cor i múscul esquelètic ( <i>Ckmm-cre</i> )	Esperança de vida de 25 st. Cardiomiopatia severa i pes inferior. Increment de la velocitat d'iniciació de la traducció mitocondrial i disminució de la fidelitat del procés, baixa estabilitat dels complexos OXPPOS i supercomplexos, i menor OCR.	115

Taula generada a partir de les dades de les referències (Ref.) indicades. KO: *knock-out*; KI: *knock-in*; st: setmanes d'edat; RH: recombinació homòloga; *Ckmm*: promotor creatina quinasa específic de múscul; *Cre*: recombinasa *Cre*; *CreERT*: recombinasa *Cre* amb receptor ERT induïble per tamoxifè; *Alb*: promotor de l'albumina; *CaMKIIa*: promotor de la proteïna quinasa II dependent de calci/calmodulina; *Pip1*: promotor de proteïna proteolípida 1; E8.5: dia 8,5 post-coit; RC: cadena respiratòria; ISR: resposta integrada d'estrès; OCR: velocitat de consum d'oxigen; ROS: espècies reactives d'oxigen; ENU: N-etil-N-nitrosurea.

### 2.3.2.1. Ratolins modificats genèticament a *Gfm1*

Al repositori de la EMMA (arxiu europeu de ratolins mutants) es troba el ratolí *C57BL/6NTac-Gfm1<sup>tm1a(EUCOMM)Wtsi/WtsiBiat</sup>*. Aquest conté un al·lel *knock-out* (KO) de *Gfm1* (*Gfm1<sup>-/-</sup>*) dissenyat segons l'estratègia *knockout-first*, amb el gen *LacZ* inserit com a reporter i potencial per convertir-se en *knock-out* condicional (llocs *LoxP* flanquejant l'exó 4 de *Gfm1*). El genotip de l'homozigot KO de *Gfm1* (*Gfm1<sup>-/-</sup>*) s'ha descrit com a letal abans del deslletament, sense concretar si la mort dels animals té lloc en estadis embrionaris. Als ratolins heterozigots *Gfm1<sup>+/-</sup>* tan sols s'ha reportat l'increment dels nivells d'àcids grassos lliures circulants en plasma<sup>116,117</sup>.

Recentment, altres investigadors van generar un ratolí KO de *Gfm1* específic de limfòcits T (CD4<sup>+</sup>) i induïble amb tamoxifè (*T-Gfm1<sup>-/-</sup>*). Aquest model es va obtenir aparellant el ratolí *Gfm1<sup>+/-</sup>* de la EMMA<sup>116</sup> amb ratolins expressant la recombinasa *Cre* induïble per tamoxifè de forma específica en limfòcits T (*Cd4-Cre<sup>ERT2/WT</sup>*). Exceptuant un augment modest en la proporció de la població de cèl·lules T individuals CD8<sup>+</sup> al timus, l'homeòstasi del sistema immunitari no es va veure compromesa al model *T-Gfm1<sup>-/-</sup>*. Els ratolins *T-Gfm1<sup>-/-</sup>* foren viables, i després del tractament amb 4-hidroxitamoxifè l'expressió de COX1 va disminuir als limfòcits T CD4<sup>+</sup>. A més, la diferenciació de limfòcits Th17 es va veure afectada, detectant una menor freqüència de cèl·lules productores de IL-17 i IFN-gamma al sistema nerviós central, i associant-se a major protecció per desenvolupar encefalomièlitis autoimmunitària experimental (EAE). Amb tot, els autors van concloure que l'afectació de la traducció mitocondrial als limfòcits T reduïa la funcionalitat de les cèl·lules Th17, demostrant-se la importància d'aquest procés en mecanismes patogènics on intervenen aquestes cèl·lules i representant una potencial diana terapèutica per bloquejar respostes aberrants dels limfòcits Th<sup>118</sup>.

Aquests dos ratolins modificats genèticament per a *Gfm1* poden ser molt útils per aprofundir en el mecanisme d'acció d'EFG1 de forma específica a diferents teixits, sent d'interès en el camp de recerca de les malalties mitocondrials, però també en altres malalties on la traducció mitocondrial juga un paper fonamental. Aquest segon model de ratolí exemplifica un grup de línies de recerca on la inhibició de la traducció mitocondrial es postula com un potencial mecanisme d'actuació per frenar processos



malignes, com poden ser certs tipus de càncer<sup>119</sup>. Malgrat això, es tracta de dos ratolins que fins ara no s'han utilitzat per a l'estudi de la COXPD1, mancant una caracterització enfocada a identificar trets bioquímics i/o clínics comuns als dels pacients. Llavors, actualment no es pot dir que siguin models de la malaltia.

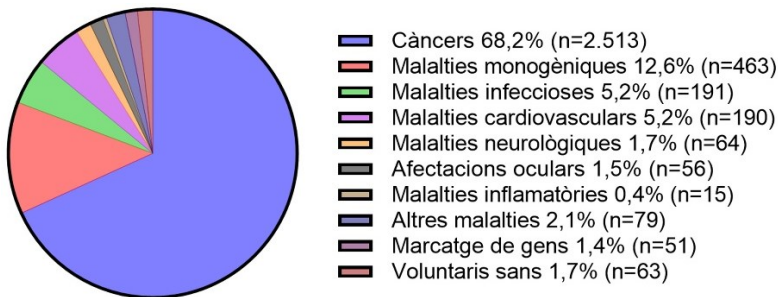
## **2.4. Teràpia gènica per al tractament de malalties mitocondrials**

La manca de tractaments curatius efectius per a les malalties mitocondrials ha fet que fins ara, en la majoria dels casos, les estratègies terapèutiques per a aquestes malalties s'hagin dirigit generalment a pal·liar els símptomes dels pacients (tractaments simptomàtics). A més, com a tractaments per a malalties associades amb alteracions de la CTE s'han proposat diverses teràpies metabòliques com l'administració de substrats habituals del sistema OXPHOS o cofactors, l'estimulació de diferents tipus de piruvat deshidrogenasa, en alguns casos la teràpia de substitució enzimàtica o la prevenció de l'excés d'espècies reactives d'oxigen (ROS)<sup>120,121</sup>. Altres línies de recerca han anat dirigides a desenvolupar drogues per activar la biogènesi mitocondrial i la mitofàgia<sup>122</sup>. En els últims anys, la teràpia basada en l'administració de nucleòsids s'ha mostrat efectiva per a la miopatia deguda a dèficit de TK2<sup>123</sup>, estratègia que s'ha proposat com a ampliable a altres síndromes de depleció i deleccions de l'ADNmt<sup>24,124,125</sup>. Per últim, es presenten les estratègies basades en teràpia gènica com a aproximacions altament prometedores per al tractament de malalties mitocondrials<sup>126</sup>, la majoria de les quals es troben en fases preclíniques d'estudi<sup>127</sup> i en el cas de LHON (Neuropatia òptica hereditària de Leber, causada per mutacions en gens de l'ADNmt), s'ha avançat cap als primers assaigs clínics utilitzant vectors adenoassociats<sup>128</sup>.

### **2.4.1. Introducció a la teràpia gènica**

La teràpia gènica té com a objectiu modificar o manipular l'expressió de gens concrets, o alterar les característiques biològiques de les cèl·lules per un ús terapèutic. La seua aplicació es pot basar en diverses estratègies com són: substituir o editar un gen existent que no funciona de forma adequada per la versió correcta, inactivar un gen que no funciona correctament i resulta patogènic, o introduir una nova còpia funcional del gen causant de la malaltia<sup>102</sup>.

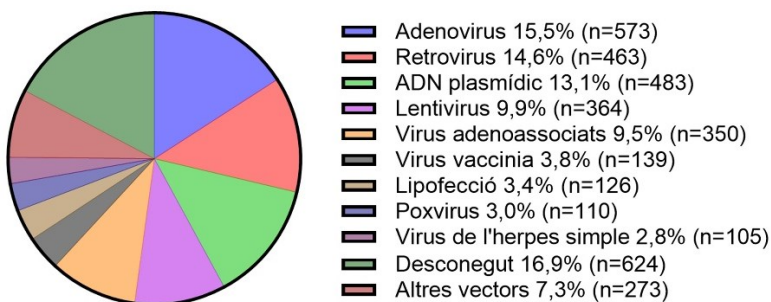
Fins l'actualitat s'han iniciat més de 3.000 assaigs clínics de productes relacionats amb teràpia gènica per a diferents malalties (*Figura 2.10*), destacant la seua aplicació sobre diferents tipus de càncer (68,2%) i malalties monogèniques (12,6%)<sup>129</sup>. Dintre d'aquest segon grup, els assaigs clínics s'han centrat sobretot en desordres metabòlics, alteracions oculars, afectacions en la coagulació de la sang, immunodeficiències, malalties neuromusculars i hemoglobinopaties, seguint administracions *in vivo* en la majoria dels casos. Tot i que s'ha dut a terme un nombre major d'assaigs clínics de teràpia gènica per al càncer, al camp de de les malalties monogèniques la proporció d'assaigs clínics en fases avançades (fases 3 i 4) és més alta (sobre el total d'assaigs iniciats) i el nombre de productes terapèutics aprovats és major<sup>128,129</sup>.



**Figura 2.10. Malalties que consten d'assaigs clínics amb productes basats en teràpia gènica.** Figura adaptada de <sup>130</sup>.

#### 2.4.1.1. Sistemes de transferència gènica

Pel que fa als sistemes de transferència gènica s'han desenvolupat i aplicat aproximacions basades en virus i altres que utilitzen sistemes no virals (*Figura 2.11*).



**Figura 2.11. Vectors de teràpia gènica utilitzats en assaigs clínics.** Figura adaptada de <sup>130</sup>.

Els sistemes de transferència **no virals** estan basats en compostos naturals o sintètics (vectors no virals) en els quals es conformen complexos d'ADN, proteïnes, polímers o lípids, en partícules que poden transferir de forma eficient la construcció terapèutica a les cèl·lules (procés anomenat transfecció), utilitzant diferents mètodes. Dins d'aquest grup s'inclou la vacunació per inserció de fragments d'ADN utilitzant mètodes físics<sup>131,132</sup>; i de forma més efectiva s'utilitzen els mètodes químics fent servir micel·les de surfactants catiónics, nanopartícules de rodamina o liposomes<sup>133,134</sup>. Malgrat que els mètodes no virals reuneixen avantatges com la menor probabilitat de patogenicitat associada al tractament, baix cost i fàcil producció, de moment cap de les aproximacions disponibles s'ajusta als requisits ideals d'un vector, i la transferència viral constitueix l'eina més eficient per la teràpia gènica.

La teràpia gènica basada en **vectors virals** utilitza virus modificats com a sistemes per transduir seqüències de nucleòtids específiques, gens codificants i ARN reguladors (com ARN interferents) a dintre de les cèl·lules. Entre els vectors virals utilitzats destaquen els basats en lentivirus (LV), adenovirus (Ad) i virus adenoassociats (AAV, *apartat 2.4.2*). Cadascun d'aquests sistemes virals ofereix unes característiques que determinen el seu ús en aplicacions específiques.

Els vectors lentivirals són retrovirus recombinants derivats del virus de la immunodeficiència humana (VIH). El seu genoma consisteix en una cadena simple d'ARN, que es retrotranscriu a ADN de doble cadena a dintre de les cèl·lules transduïdes i tot seguit es transporta al nucli cel·lular on s'integra en el genoma hoste. Els LV tenen una capacitat d'empaquetament alta (8-10 kb) i transdueixen de forma eficient cèl·lules en proliferació i post-mitòtiques. La seua capacitat integrativa fa que s'aconsegueixi l'expressió permanent del transgèn a les cèl·lules diana<sup>135</sup>, i al mateix temps comporta el risc de resultar oncogènica per mutació insercional. Els LV s'utilitzen principalment en teràpia gènica *ex vivo* i han mostrat resultats exitosos sobre el tractament d'immunodeficiències<sup>136</sup> i leucodistrofies<sup>137</sup>.

Els Ad són virus no encapsulats d'ADN bicatenari, coneguts pel fet de causar infeccions principalment respiratòries, però també d'altres òrgans com el cervell i la melsa. Els vectors basats en Ad ofereixen avantatges com l'alta eficiència de

transducció, l'ampli tropisme per a diferents teixits i la capacitat d'albergar transgens grans (fins a 36 kb). Malgrat això, tendeixen a donar lloc a expressió transitòria del transgèn i són molt immunogènics. Aquests aspectes limiten el seu ús per teràpia gènica *in vivo* sobre malalties monogèniques<sup>138</sup>, però fan que siguin una opció molt utilitzada per viroteràpia oncolítica<sup>139</sup> i per al desenvolupament de noves vacunes<sup>140,141</sup>.

Els vectors basats en AAV (rAAV, *apartat 2.4.3*) han estat l'opció més utilitzada per dur a terme teràpia gènica *in vivo*, transduint les cèl·lules diana amb una còpia funcional del gen que es troba mutat en el pacient, que no s'integra al genoma sinó que roman al nucli com a episoma. Aquests vectors s'han utilitzat per al tractament de malalties neuromusculars, retinopaties o hemofília<sup>142</sup>. Tenint en compte que prop del 90% de les malalties mitocondrials són malalties monogèniques recessives, es converteixen en candidates ideals per ser abordades mitjançant aproximacions de teràpia gènica amb vectors adenoassociats.

## 2.4.2. Virus adenoassociats (AAV)

Els AAV s'inclouen dintre de la família *Parvoviridae* i van ser descoberts a la dècada del 1960 com a contaminants d'una preparació d'adenovirus<sup>143</sup>. Es tracta de virus petits, sense embolcall i que consten d'un genoma d'ADN de cadena simple lineal amb una mida aproximada de 5 kb. Fins ara s'han aïllat tretze serotips naturals (AAV1-13) en humans i altres primats, a part d'un ampli ventall d'AAV identificats en altres espècies de vertebrats. Els AAV salvatges, que es classifiquen com a dependoparvovirus, requereixen la co-infecció per part d'un virus *helper* (adenovirus, virus de l'herpes simple, *vaccinia* virus o virus del papil·loma humà) que conté els gens essencials per la replicació i expressió del seu material genètic. Malgrat que una gran part de la població humana presenta anticossos contra diferents serotips d'AAV, no s'han associat a cap malaltia en humans o animals<sup>135,144</sup>.

Entre els avantatges que han fet que s'aposti pels AAV com a vectors per teràpia gènica destaquen: (1) el fet que no s'hagin associat a malalties en humans o animals; (2) la seua capacitat per romandre principalment en estat episomal a les cèl·lules

transduïdes, i (3) la possibilitat de transduir diferents tipus cel·lulars. A més, ofereixen una immunogenicitat baixa<sup>145</sup> i expressió gènica prolongada en el temps<sup>146</sup>.

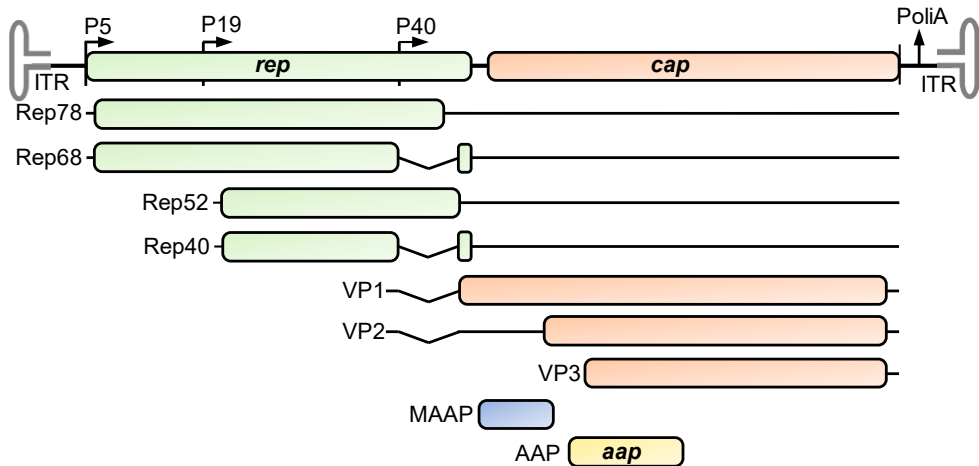
#### **2.4.2.1. Característiques moleculars dels AAV**

El virió dels AAV consta d'una petita càpsida icosaèdrica d'uns 28 nm de diàmetre, que determina el tropisme del virus. A dintre d'aquesta es localitza el genoma viral d'ADN de simple cadena (ssADN), lineal i amb una mida d'unes 4,7 kb.

La càpsida vírica esta conformada per unes 60 unitats estructurals, cadascuna de les quals presenta regions variables exposades a la superfície del virió que determinen el seu tropisme viral. La modificació d'aquestes estructures pot variar tant l'eficiència de transducció de l'AAV, com la capacitat d'unió d'anticossos neutralitzants (NAbs) a la càpsida vírica<sup>147</sup>.

El primer genoma identificat i caracteritzat va ser el de l'AAV2 que té 4.769 pb. Aquest pot ser de cadena d'ADN positiva (codificant) o negativa (complementària) i inclou quatre pautes obertes de lectura (ORFs) que contenen els gens *rep* i *cap* implicats en la replicació de l'ADN i formació de la càpsida, respectivament<sup>148</sup>. El genoma dels AAV està delimitat als extrems 5' i 3' per seqüències ITR (repeticions terminals invertides) de 145 nucleòtids, pràcticament idèntiques. Les ITR tenen una seqüència palindròmica que es plega sobre ella mateixa i fa que funcionin com auto-encebadors a la replicació, inclouen l'origen de replicació i el senyal d'empaquetament, i participen al procés d'integració del genoma viral<sup>149</sup>.

La seqüència *rep* codifica 4 proteïnes importants durant el cicle viral: Rep78, Rep68, Rep52 i Rep40<sup>149</sup>. La regió codificant *cap* codifica les proteïnes de la càpsida viral VP1, VP2 i VP3. El gen *aap*, situat en un marc de lectura diferent dins de la regió codificant de *cap*, codifica la proteïna AAP que intervé en el procés d'acoblament del virió<sup>150,151</sup> (*Figura 2.12*).



**Figura 2.12. Esquema del genoma dels AAV.** El genoma dels AAV conté quatre pautes obertes de lectura (ORF) conegudes: (1) *rep* (verd) codifica les quatre proteïnes de replicació (Rep78, Rep68, Rep52 i Rep40), (2) *cap* (taronja) codifica tres proteïnes de la càpsida (VP1, VP2 i VP3), (3) la proteïna activadora de l'acoblament AAP (groc) i (4) la proteïna accessòria associada a membrana MAAP (blau) sense funció coneguda. La transcripció s'inicia amb els promotors virals P5, P19 i P40 (fletxes). El genoma està delimitat per repeticions terminals invertides (ITR, gris). Figura adaptada de <sup>148</sup>.

#### 2.4.2.2. Cicle víric dels AAV

Els AAV salvatges tenen capacitat per infectar cèl·lules tant en quiescència com en divisió, i la seua capacitat infectiva *in vivo* depèn de la co-infecció d'un virus *helper*; sense la qual queden en estat de latència<sup>152</sup>. El cicle víric consta de diverses etapes descrites més avall i representades a la *Figura 2.13*, on es distingeix algun aspecte dels AAV recombinants (rAAV) (*apartat 2.4.3*).

**1. Unió de l'AAV al receptor.** Les partícules virals uneixen a receptors glicoproteics de superfície i receptors secundaris (ex. AAVR) de les cèl·lules diana. Cada serotip viral presenta un tropisme cel·lular diferent en funció de l'afinitat d'unió de les proteïnes de la càpsida a aquests receptors<sup>153</sup>.

**2. Internalització i transport al nucli.** Un cop l'AAV interacciona amb el seu receptor de superfície, s'activa la seua endocitosis de forma ràpida i eficient<sup>154</sup>. Seguidament, el transport intracel·lular de l'AAV té lloc de forma lenta i poc eficient. Els virions es transporten en vesícules endosomals pel citosol per acció de microtúbuls fins l'aparell de Golgi. En aquest punt, la càpsida viral experimenta canvis

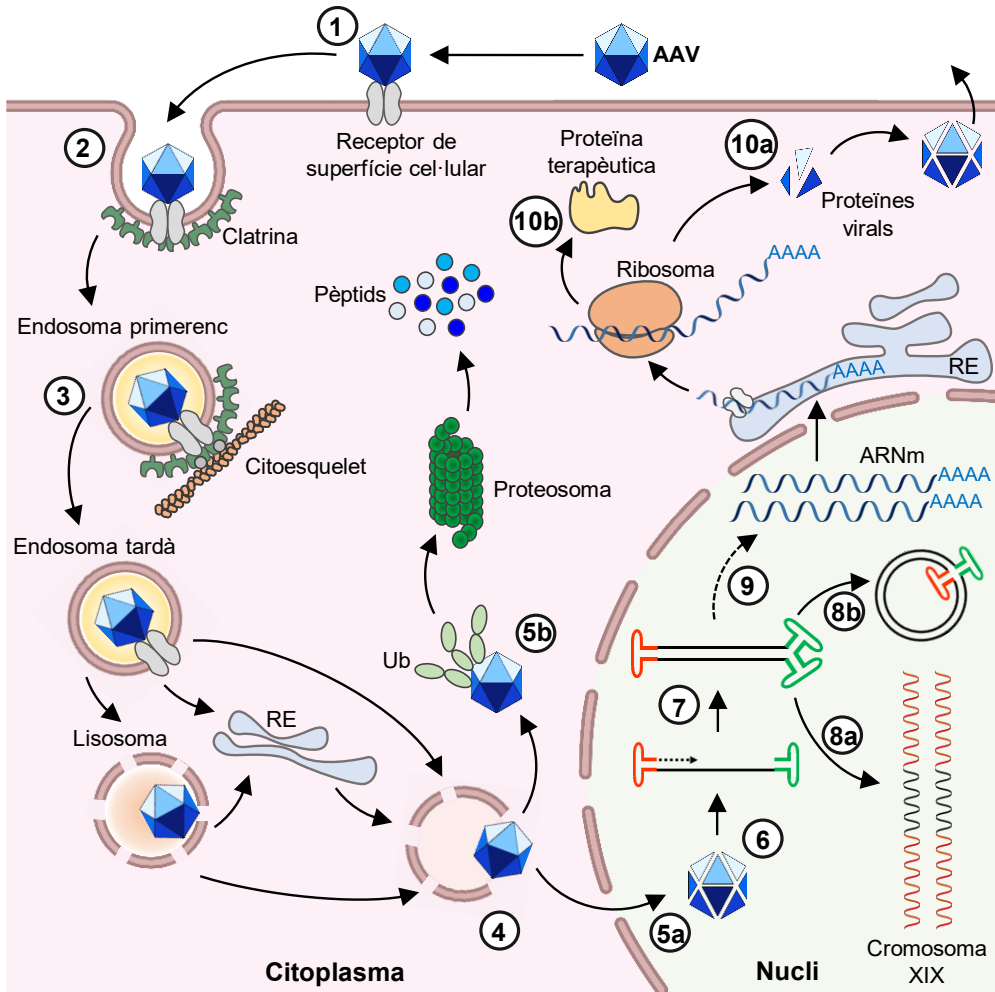
conformacionals, escapa de l'endosoma i seguint senyals de localització nuclear es transporta a l'interior del nucli cel·lular<sup>154</sup>. Els virions poden ser ubiquitinats i degradats al proteosoma o patir un desacoblament de la càpsida i continuar el seu cicle infectiu<sup>154,155</sup>.

**3. Conversió del genoma a ADN de doble cadena (dsADN).** Per tal de poder transcriure el seu genoma, aquest ha de convertir-se a dsADN mitjançant l'acció de l'ADN polimerasa de la cèl·lula hoste o bé l'aparellament d'una cadena positiva i una de negativa de diferents virions que hagin co-infectat la mateixa cèl·lula<sup>153</sup>. La primera opció s'inicia a la ITR 3' on l'ADN polimerasa utilitza el grup hidroxil 3' per començar la replicació, servint la mateixa molècula d'ADN com a encebador i com a motlle. Un cop s'ha obtingut l'ADN bicatenari amb una ITR a un extrem, l'ARN polimerasa II pot iniciar la transcripció i obtenció dels ARNm virals<sup>147</sup>. Tot seguit el dúplex ITR es plega i genera un nou extrem 3' que l'ADN polimerasa pot utilitzar per reiniciar la replicació.

Per sintetitzar nous genomes virals, Rep78/68 talla la cadena original al començament de la ITR 3'. A partir d'aquí es completa la còpia de la cadena i s'empaqueta la cadena desplaçada<sup>156</sup>.

**4. Transcripció i expressió de les proteïnes virals.** Amb la presència del virus *helper* s'inicia l'expressió del genoma viral. El virus *helper*, de forma general, incrementa l'expressió de les proteïnes de l'AAV, i altera l'ambient cel·lular per promoure la replicació i alliberació al medi de l'AAV<sup>156</sup>.

Quan no existeix virus *helper*, el genoma de l'AAV queda en estat latent durant períodes de temps prolongats. Davant d'aquesta situació el genoma viral es pot circularitzar per recombinació homòloga formant monòmers, dímers o concatèmers circulars per interaccions intra- i intermoleculares, o integrar-se al genoma cel·lular (procés en que intervé la proteïna Rep) en la regió q13.4 (AAVS1) del cromosoma 19<sup>157</sup>.



**Figura 2.13. Transducció i cicle viral dels AAV.** Els virions s'uneixen a receptors i coreceptors de superfície de les cèl·lules diana (*pas 1*) i via endocitosis entren en elles (*pas 2*). Els endosomes que contenen virions són transportats pel citoplasma gràcies al citoesquelet (*pas 3*). Un cop els virions són alliberats dels endosomes (*pas 4*), poden ser ubiquitinats i marcats per a ser degradats a través del proteosoma (*pas 5b*) o dirigits al nucli (*pas 5a*). A l'interior del nucli, els virions perden la càpsida i el genoma dels AAV és alliberat (*pas 6*). El genoma en forma d'ADN de simple cadena (ssADN) es transforma a ADN de doble cadena (dsADN) (*pas 7*). El genoma dels AAV salvatges i rAAV es sol mantenir en estat episomal (*pas 8b*), o de forma puntual pot integrar-se al cromosoma 19 (*pas 8a*). En aquest punt ja es pot iniciar la transcripció (*pas 9*) i l'ARNm resultant s'exporta per tal de traduir-se i expressar les proteïnes virals als AAV salvatges (*pas 10a*), o la proteïna terapèutica en el cas dels rAAV (*pas 10b*). Als AAV salvatges, les proteïnes i genomes virals s'acomben finalment per formar nous virions (*pas 10a*) que s'alliberen al medi extracel·lular lisant la cèl·lula hoste. RE: reticle endoplasmàtic; Ub: ubiquitina. Figura adaptada de <sup>147</sup>.



### 2.4.2.3. Serotips i tropisme dels AAV

Fins ara s'han aïllat més d'un centenar de serotips o variants d'AAV que infecten diferents espècies animals<sup>158</sup> i entre tots ells n'hi ha un subgrup que inclou 13 serotips naturals d'AAV identificats en humans i altres primats no humans (AAV1-13)<sup>159</sup>. L'estudi d'aquests serotips sobre diferents organismes ha donat a conèixer els seus tropismes cel·lulars i tissulars<sup>160</sup>, convertint-se en un factor important a considerar a l'hora de desenvolupar estratègies de teràpia gènica basades en AAV. Les proteïnes de la càpsida són les responsables del tropisme tissular<sup>161</sup> i la seua adhesió a la superfície cel·lular té lloc de forma específica per interacció amb receptors primaris i co-receptors (*Taula 2.3*). Tanmateix, la modificació de la seqüència peptídica de la càpsida vírica no sols defineix la unió al receptor, sinó que també determina el mecanisme de tràfic intracel·lular del virus, la capacitat per escapar de la via endosomal, el desacoblament de la càpsida i translocació al nucli de la cèl·lula hoste.

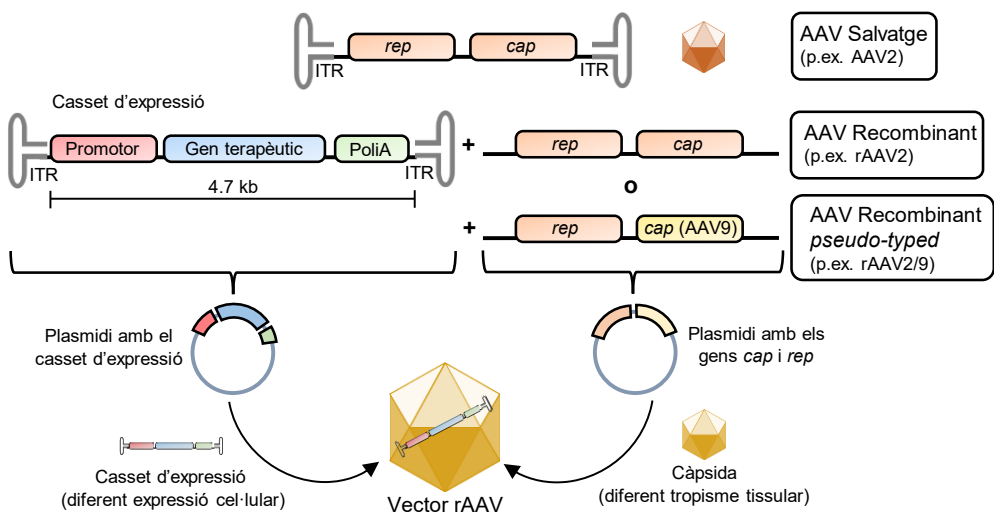
**Taula 2.3. Receptors, coreceptors i tropisme dels serotips naturals d'AAV<sup>159,162</sup>**

Serotip	Receptor	Co-receptor	Tropisme
<b>AAV1</b>	Àcid siàlic	AAVR	Múscul esquelètic, CNS, retina, cor, pulmó i pàncrees
<b>AAV2</b>	HSPG	AAVR, FGFR, HGFR, Integrina, LamR	Múscul llis, múscul esquelètic, fetge, CNS i ronyó
<b>AAV3</b>	HSPG	AAVR, FGFR, HGFR, LamR	Múscul esquelètic, medul·la òssia i fetge
<b>AAV4</b>	Àcid siàlic	Desconegut	CNS i retina
<b>AAV5</b>	Àcid siàlic	AAVR, PDGFR	Múscul esquelètic, CNS, retina, pulmó i fetge
<b>AAV6</b>	HSPG	AAVR, EGFR	Múscul esquelètic, CNS, cor, pulmó i medul·la òssia
<b>AAV7</b>	Desconegut	Desconegut	Múscul esquelètic, CNS i retina
<b>AAV8</b>	Desconegut	AAVR, LamR	Fetge, múscul, cor, pàncrees, CNS i retina
<b>AAV9</b>	Galactosa	AAVR, LamR	Fetge, cor, cervell, múscul esquelètic, pulmó, pàncrees i ronyó
<b>AAV10</b>	Desconegut	Desconegut	Múscul esquelètic i fetge
<b>AAV11</b>	Desconegut	Desconegut	Desconegut
<b>AAV12</b>	Desconegut	Desconegut	Desconegut
<b>AAV13</b>	HSPG	Desconegut	Desconegut

Elaborada a partir de dades de <sup>159,162</sup>. HSPG: heparà sulfat; AAVR: receptor dels AAV; FGFR: receptor del factor de creixement de fibroblasts; HGFR: receptor del factor de creixement dels hepatòcits; LamR: receptor de la laminina; CNS: Sistema nerviós central.

### 2.4.3. Vectors AAV recombinants (rAAV)

Actualment els virus adenoassociats recombinants (rAAV) són els vectors més utilitzats en l'aplicació *in vivo* d'estratègies de teràpia gènica. Aquests es generen substituint les ORFs virals per un casset d'expressió (que conté, entre altres elements, la seqüència que es vol transduir), delimitat per les ITR, que són necessàries per guiar la replicació del genoma i l'empaquetament durant la producció dels virions. Durant el procés de producció dels rAAV, els gens responsables de la replicació viral i l'acoblament de la càpsida (*rep* i *cap*) es subministren en *trans* en plasmidis independents cotransfectats en els cultius cel·lulars productors<sup>163</sup> (Figura 2.14). Com que el genoma dels rAAV manca del gen *rep*, no sol integrar-se al genoma cel·lular i es manté majoritàriament en estat episomal al nucli de les cèl·lules transduïdes<sup>157,164</sup>.



**Figura 2.14. Biologia dels vectors adenoassociats.** Els AAV salvatges contenen els gens *cap* (càpsida) i *rep* (replicació) delimitats per dues seqüències ITR. Als AAV recombinants (rAAV), el genoma viral es substitueix per un casset d'expressió que consta d'un promotor, el gen terapèutic d'interès i una seqüència de terminació com la senyal de poliadenilació (PoliA), flanquejat per les ITR de l'AAV salvatge. Els gens *cap* i *rep* es subministren com a plasmidi en *trans* i donaran lloc a la càpsida viral on s'empaquetarà el casset d'expressió. Per modificar el tropisme d'un vector poden utilitzar-se els gens *cap* d'un serotip (p.ex. AAV9) per empaquetar el genoma recombinant d'un altre serotip (p.ex. AAV2). Als rAAV poden personalitzar-se tant la càpsida (en funció del teixit diana al qual es vulgui dirigir l'AAV) com el promotor (per aconseguir una expressió del gen terapèutic ubiqua o específica de teixit). Figura adaptada de <sup>165</sup>.

El genoma dels rAAV té una capacitat de 4,7 kb per a la incorporació del casset d'expressió, el qual consta generalment de 3 elements principals: un promotor (constitutiü o específic d'un o diversos teixits), la seqüència codificant del gen terapèutic (transgèn) i un senyal de poliadenilació<sup>147,152</sup> (*Figura 2.14*).

#### **2.4.3.1. Opcions de millora i avantatges dels rAAV**

La mida del casset d'expressió condiona el disseny del rAAV. Com a alternativa per expressar transgens grans s'han generat vectors duals fent servir sistemes de *splicing* entre ITR recombinants de vectors amb genomes complementaris<sup>166</sup>. A més a més, com que la conversió del genoma viral a dsADN requereix un temps que és limitant en l'expressió del gen terapèutic, s'han desenvolupat AAV autocomplementaris (scAAV) per optimitzar aquest aspecte. El genoma dels scAAV es plega sobre si mateix passant a dsADN després de transduir les cèl·lules i es transcriu directament. Llavors s'ofereix una expressió més ràpida del gen terapèutic, a canvi de deixar disponible una capacitat d'empaquetament inferior a les 2,5 kb<sup>167</sup>.

La càpsida viral del rAAV s'elegeix en funció del teixit diana on es vulgui dirigir la teràpia, atenent al tropisme natural dels AAV (*Taula 2.3*). Amb l'objectiu de millorar l'eficiència de transducció i alterar el tropisme, les característiques específiques dels diferents serotips d'AAV es poden combinar a través d'un procés de pseudotipatge on les ITR d'un serotip (generalment de l'AAV2) junt amb el casset d'expressió s'empaqueten a dintre de la càpsida d'un serotip diferent<sup>168,169</sup> (*Figura 2.14*). D'altra banda, per tal d'augmentar la taxa de transducció i el transport intracel·lular dels rAAV, s'estan desenvolupant serotips recombinants nous mitjançant la modificació de residus aminoacídics de la càpsida viral per tècniques de disseny racional o evolució dirigida<sup>170</sup>. Altres factors que poden influir en la transducció dels rAAV són la via d'administració, la dosi, l'espècie animal hoste, el sexe, la presència de NAb's i fins i tot el mètode de producció del vector<sup>171–173</sup>.

Els rAAV reuneixen diversos avantatges de cara a l'aplicació clínica de la teràpia gènica. D'una banda, tenen capacitat per transduir cèl·lules en divisió i en quiescència, i existeixen nombrosos serotips amb un ampli ventall de tropismes cel·lulars. El manteniment dels rAAV en estat episomal a les cèl·lules hoste durant

llargs períodes de temps (almenys 10 anys), redueix el risc de mutagènesi per inserció al genoma hoste. Malgrat que s'han descrit casos puntuals de genotoxicitat associada a rAAV sota condicions concretes en models de ratolí<sup>174,175</sup>, fins ara no s'han trobat evidències d'alteracions patològiques en estudis a llarg termini sobre altres models animals com gossos<sup>176</sup> o primats no humans<sup>177</sup>. Tanmateix, multitud d'assaigs clínics sobre pacients tampoc han detectat fins ara casos de genotoxicitat a llarg termini<sup>147,178</sup>, tot i que la possible integració del genoma viral és un punt d'important consideració i diversos estudis s'han centrat a identificar factors que puguin afavorir aquest fenomen<sup>179</sup>.

### 2.4.3.2. Assajos clínics i productes terapèutics basats en rAAV

Des de la utilització al 1984 del primer rAAV per introduir gens exògens a cèl·lules de mamífers<sup>180</sup> aquests vectors no han deixat d'aplicar-se en recerca biomèdica fins arribar a la clínica. Així doncs, el 1996 es va iniciar el primer assaig clínic de teràpia gènica utilitzant un vector adenoassociat, tractant-se d'un rAAV2 amb el gen *CFTR* dirigit al tractament de la fibrosi quística<sup>181</sup>. S'ha anat progressant en el coneixement de la seua virologia, producció, eficàcia i translació<sup>153</sup> i al llarg dels anys els rAAV s'han dirigit al tractament de malalties amb afectació de fetge, cervell, múscul, cor, ulls, i altres teixits<sup>172</sup>. Actualment, els rAAV s'han utilitzat com a vectors de transferència gènica en un 9,5% (350 de 3685) d'assaigs clínics basats en estratègies de teràpia gènica, sent el quart vector viral més utilitzat per darrere d'adenovirus (15,5%), retrovirus (14,6%) i lentivirus (9,9%)<sup>130</sup> (*Figura 2.11*). D'entre els serotips utilitzats, al capdavant es situa l'AAV2, probablement pel fet de ser el més caracteritzat, aplicant-se majoritàriament al tractament de malalties amb afectació ocular i del CNS. L'AAV8 s'ha utilitzat sobretot en desordres hematològics, l'AAV9 en leucodistrofies i els AAV1 i AAV9 en malalties neuromusculars i amb afectació de teixits diversos<sup>165</sup>. L'estratègia terapèutica per la que més s'aposta és la substitució gènica, seguida de l'addició d'un gen, el silenciament gènica i l'edició gènica<sup>165</sup>.

Els assajos clínics utilitzant rAAV s'estan dirigint a diverses malalties, entre les quals hi ha malalties musculars (distròfia muscular de *Duchenne*, la miopatia miotubular lligada al cromosoma X), hemofília, alteracions metabòliques hereditàries

(deficiència de la ornitina transcarbamilasa, acidèmia metilmalònica), desordres neurològics (Parkinson, malaltia de Batten), i afectacions oculars (retinitis pigmentosa, coroideremia, degeneració macular associada a l'edat)<sup>153,172,182</sup>.

En referència a l'aprovació i aplicació a la pràctica clínica de productes basats en rAAV, l'any 2013 l'Agència Europea del Medicament (EMA) va aprovar *Glybera* (*uniQure*), un rAAV1 per al tractament de la deficiència familiar de lipoproteïna lipasa, convertint-se en el primer rAAV comercial per teràpia gènica<sup>183</sup>. Malauradament, *Glybera* es va retirar del mercat l'any 2017 pel seu elevat cost. Precisament aquell mateix any, *Luxturna* (*Spark Therapeutics*), un producte basat en l'AAV2, fou aprovat per la EMA i la FDA (*Food and Drug Administration*) per al tractament de l'amaurosi congènita de Leber de tipus 2, malaltia amb degeneració retinal causada per mutacions al gen *RPE65*<sup>184</sup>. L'any 2019 la FDA va aprovar *Zolgensma* (*AveXis*), un rAAV9 dirigit a tractar l'atrofia espinal muscular de tipus 1 (malaltia neuromuscular causada per mutacions al gen *SMN1*)<sup>171</sup>. Més recentment, entre el 2022 i aquest mateix any, l'EMA ha aprovat *Roctavian* (valoctocogene roxaparvovec)<sup>185</sup> i *Hemgenix* (etranacogene dezaparvovec, també autoritzat per la FDA)<sup>186</sup>, dos rAAV5 per al tractament respectivament de l'hemofília A i l'hemofília B.

#### **2.4.3.3. El fetge com a diana per a la teràpia gènica amb rAAV**

El fetge és un òrgan vital que juga un paper important en el metabolisme i altres funcions fisiològiques clau. El tipus cel·lular més abundant en el fetge són els hepatòcits, que sintetitzen i metabolitzen gran quantitat de proteïnes intracel·lulars i secretades amb funcions com l'ús i emmagatzematge d'hidrats de carboni o el metabolisme lipídic. A més, el fetge està implicat en la detoxificació de metabòlits com l'amoni i la bilirubina.

Hi ha centenars de malalties monogèniques metabòliques d'origen hepàtic, on el transplantament de fetge constitueix l'única cura. Com a alternativa, la teràpia gènica és menys invasiva que el transplantament i no requereix d'un donant. A més a més, el fetge reuneix un seguit de característiques que el converteixen en un teixit diana atractiu per a la teràpia gènica amb rAAV<sup>187</sup>. D'una banda, gràcies a la irrigació sanguínia dual d'aquest òrgan, un fetge humà adult filtra aproximadament el 10-15%

del volum total sanguini per minut; facilitant l'acumulació sistemàtica de nivells alts de partícules virals al fetge. Tanmateix, l'endoteli fenestrat dels sinusoids hepàtics permet el pas de les partícules virals des de la sang als hepatòcits de forma directa, augmentant l'eficiència de transducció respecte dels òrgans amb endoteli continu. Aquests trets anatòmics ajuden a explicar que el fetge sigui l'òrgan on s'ha detectat el nombre de còpies de genomes de rAAV (genomes de vector, gv) més elevat excloent els òrgans immunitaris primaris<sup>188,189</sup>.

Com que els rAAV no solen ser integratius, un factor rellevant per la teràpia és la longevitat dels hepatòcits transduïts. En condicions normals, un fetge desenvolupat presenta menys del 1-2% dels hepatòcits reciclant-se, mentre que la resta romanen en estat de quiescència<sup>190</sup>. A més, el reemplaçament dels hepatòcits madurs és relativament lent (200-300 dies)<sup>191</sup>, fent que la teràpia sobre aquestes cèl·lules sigui menys susceptible als efectes de dilució per la divisió cel·lular. A més a més, tots els serotips naturals d'AAV humans presenten cert tropisme hepàtic, a excepció de l'AAV4<sup>192</sup>, i l'expressió del gen terapèutic en hepatòcits induïx una tolerància específica per mitjà de cèl·lules T reguladores<sup>193</sup>.

Per últim, les malalties monogèniques d'origen hepàtic solen presentar associats marcadors bioquímics ben descrits i validats clínicament (ALT i AST entre d'altres). De cara a l'aplicació de teràpia gènica, aquest fet afavoreix la selecció de la dosi, avaluació de l'eficàcia de la teràpia i detecció ràpida de la possible reversió del fenotip clínic.

#### **2.4.3.4. Teràpia gènica sobre malalties mitocondrials causades per mutacions a l'ADNn**

Els tractaments farmacològics o nutricionals aplicats sobre molts dels pacients amb malalties mitocondrials causades per mutacions en gens nuclears, poden arribar a pal·liar alguns dels símptomes, revertir manifestacions clíniques i millorar la qualitat de vida. Malgrat això, aquestes aproximacions no corregeixen la causa principal del problema. Tenint en compte que la majoria d'aquestes malalties són monogèniques recessives, la teràpia gènica representa una estratègia precisa i atractiva per curar els defectes mitocondrials<sup>127,194</sup>.

Actualment la teràpia gènica basada en rAAV s'ha testat en aproximacions preclíniques sobre models de ratolí de malalties mitocondrials (*Taula 2.4*).

**Taula 2.4. Estudis preclínics de teràpia gènica amb rAAV sobre models de ratolí de malalties mitocondrials degudes a mutacions a l'ADNn<sup>127</sup>**

Malaltia	rAAV	Resultat	Ref.
<b>Síndrome de Barth</b>	AAV9-desmin-hTAZ	Millora de la simptomatologia.	195
	AAV9-CAG-hTAZ	L'administració neonatal evita la mort primerenca i el fenotip cardíac. L'administració en adults prevé o reverteix l'afectació cardíaca.	196
<b>Ataxia de Friedreich</b>	AAVrh10-CAG-hFXN	El tractament pre-síntomptomàtic evita el fenotip i post-síntomàtic reverteix el fenotip.	197
	AAV9-CAG-hFXN	L'administració i.v. millora parcialment els símptomes; i.v. + i.c.v. millora els símptomes.	198
	AAV9-CB-hFXN	Allarga la supervivència i redueix els símptomes.	199
<b>Síndrome Leigh (autosòmic recessiu)</b>	AAV9- CMV-hNDUFS4	La combinació i.v. + i.c.v. millora la supervivència i redueix els símptomes. Per separat no es detecta efecte.	200
	AAV-PHP.B-CAG-hNDUFS4	Increment de la supervivència i endarreriment de la progressió dels símptomes.	201,202
	AAV9-CMV-Ndufs3	El tractament de recent nascuts prevé la malaltia, i en adults la corregeix.	203
	scAAV9-CB-hSURF1	Increment de l'activitat del CIV en cervell, múscul i fetge. Reducció del lactat en plasma després d'exercici intens.	204
<b>Encefalopatia etilmalònica</b>	AAV8-TBG-hETHE1	Increment de la supervivència i millora de la funció motora.	205
<b>MNGIE</b>	AAV8-TBG-hTYMP	Reducció prolongada dels nivells de dThd i dUrd en plasma i teixits.	206
	AAV8-AAT-hTYMP AAV8-TBG-hTYMP AAV8-HLP-hTYMP	Reducció prolongada dels nivells de dThd en plasma i teixits. Els promotors, específics de fetge, mantenen reduïts els nivells de dThd durant més temps.	207
	AAV8-AAT-hTYMP AAV8-TBG-hTYMP AAV8-HLP-hTYMP	Reducció prolongada dels nivells de dThd i dUrd en plasma en animals alimentats amb sobrecàrrega de nucleòsids. Millora de la coordinació neuromotora, i reducció del volum ventricular cerebral.	208
	AAV8-TBG-hMPV17	El tractament després de la dieta cetònica millora el fenotip hepàtic, i si s'efectua abans de començar la dieta prevé el dany hepàtic.	209
<b>Defectes en TK2</b>	AAV9- CB-hTK2 AAV2- CB-hTK2	Millora de la supervivència i la funció motora.	210
<b>Defectes en SLC25a46</b>	AAV-PHP.eB-CMV-Slc25a46	Millora de la supervivència i la severitat del fenotip	211

Taula elaborada a partir de les dades de <sup>127</sup>. Desmin: promotor desmina; CB: promotor beta-actina de pollastre; CMV: promotor del citomegalovirus; CAG: constructe *enhancer* del CMV fusionat amb el promotor CB; TBG: promotor de la globulina d'unió a tiroxina ; AAT: promotor de l'alfa-1-antitripsina; HLP: promotor híbrid específic de fetge; h: humà; rh: rhesus; AAV-PHP.B i AAV-PHP.eB: serotips recombinants AAV2/9 amb una càpsida modificada de l'AAV9 que ofereix una millora del tropisme cap al sistema nerviós central; i.v.: administració intravenosa; i.c.v.: administració intracerebral; dThd i dUrd: nucleòsids timidina i desoxiuridina.

D'entre les malalties causades per mutacions a l'ADNn s'han publicat estudis per: la síndrome de Barth, l'ataxia de Friedreich, la síndrome de Leigh causada per defectes en *NDUFS4*, *NDUFS3* i *SURF1*, l'encefalomiopatia etilmalònica, la neuropatia causada per defectes en *SLC25A46* i tres síndromes de depleció i deleccions de l'ADNmt (l'encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial, MNGIE, mutacions en *MPV17* i en *TK2*).

La majoria de malalties mitocondrials són d'afectació multisistèmica, per tant en molts dels casos podria requerir-se una expressió gènica disseminada o ubiqua del gen terapèutic del rAAV. No obstant això, s'ha demostrat que es pot millorar el fenotip clínic seguint estratègies dirigides a un únic òrgan diana, com és el cas de MNGIE, on la funció detoxificadora del producte del gen terapèutic fa que no sigui necessària la seua expressió ubiqua.

Pel que fa als serotips utilitzats, l'AAV9 és la primera opció als estudis on la teràpia es dirigeix a cervell i a altres teixits com cor, múscul o fetge (síndromes de Barth<sup>195,196</sup>, Leigh<sup>203,204</sup> i dèficit de TK2<sup>210</sup>). També s'ha vist que els serotips recombinants AAV-PHP.B<sup>201,202</sup> i AAV-PHP.Eb<sup>211</sup> transdueixen millor cervell. Finalment, quan el teixit diana és el fetge s'utilitza principalment l'AAV8<sup>206-209</sup>.

En la majoria dels estudis s'utilitzen promotors constitutius (CMV<sup>200,203</sup>, CAG<sup>196-198,201,202</sup> i CB<sup>199,204,210</sup>), mentre que els vectors dirigits a l'encefalopatia etilmalònica<sup>205</sup>, MNGIE<sup>206-208</sup> i mutacions en *MPV17*<sup>209</sup> fan ús de promotors hepàtics (TBG, AAT i HLP).

Els rAAV s'administren en la majoria dels casos per via intravenosa, tot i que també s'opta per altres vies (subcutània, retrorbital, intracerebral, intracerebral ventricular i intratecal)<sup>127</sup> i s'utilitzen dosis que oscil·len entre  $6 \cdot 10^9$  gv/kg<sup>199</sup> i  $2 \cdot 10^{14}$  gv/kg<sup>211</sup>. Per últim, l'edat a la qual els ratolins son tractats varia des del moment del naixement fins les 12 setmanes d'edat, en funció del fenotip de cada model animal i l'objectiu de l'estudi sobre cada malaltia.





### 3. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

---



### 3.1. Hipòtesis

L'estudi de la COXPD1 s'ha sostingut fins ara principalment sobre models *in vitro* (fibroblasts o biòpsies de pacients) i no existeix cap model murí apropiat per dur a terme estudis preclínic. Això dificulta entendre bé les conseqüències bioquímiques, moleculars i fisiològiques de les alteracions genètiques en *GFM1*. A més, limita les possibilitats de testar aproximacions terapèutiques, que són urgents ja que la majoria dels pacients moren de forma prematura sense l'opció de rebre cap tractament curatiu.

En aquesta tesi es plantegen **dues hipòtesis** relacionades, a partir de les quals neixen **dos blocs d'objectius**.

En primer lloc, la proteïna EFG1 manté una alta homologia a les espècies humana i murina, conservant-se l'aminoàcid R671 que freqüentment es presenta mutat als pacients. Llavors, la **hipòtesi 1** postula que la generació dels al·lels de *Gfm1 knock-in* causant del canvi p.R671C (KI, *Gfm1<sup>R671C</sup>*) i *knock-out* (KO, *Gfm1<sup>-</sup>*), permetran obtenir un model de ratolí modificat genèticament que presenti alterada l'estabilitat i/o funció d'EFG1, donant lloc a un fenotip similar al que manifesten els pacients.

En segon lloc, la naturalesa de la malaltia (monogènica, autosòmica, recessiva i ultra rara) situa la teràpia gènica basada en AAV com a candidata per tractar la COXPD1, i la disponibilitat d'un model de ratolí permetrà avaluar el potencial d'aquesta estratègia. D'aquí deriva la **hipòtesi 2** segons la qual proposem que l'administració sistèmica d'un rAAV dirigit a fetge possibilitarà introduir una còpia funcional de *GFM1* (forma humana) als hepatòcits del model murí, revertint el perfil COXPD que presumiblement tindrà un dels teixits diana principals.

La confirmació de la primera hipòtesi permetria a la comunitat científica disposar d'un model de ratolí per avançar en la recerca relacionada amb la COXPD1, així com d'altres malalties on la traducció mitocondrial jugui un paper clau. L'èxit de la segona hipòtesi suposaria un pas important en la recerca translacional de la teràpia gènica per tractar la COXPD1 i ens acostaria a un tractament efectiu per a la malaltia, la qual cosa al seu torn demostraria el potencial del model de ratolí generat.

## 3.2. Objectius

Els objectius formulats per tal de testar les hipòtesis plantejades són:

### Objectiu general

Avançar en la recerca translacional de l'hepatoencefalopatia deguda a mutacions en *GFM1* mitjançant la generació i caracterització d'un model de ratolí de la malaltia i l'inici d'una estratègia preclínica de teràpia gènica basada en AAV.

### Objectius per verificar la hipòtesi 1

1. Generar els al·lels mutants *Gfm1*<sup>R671C</sup> (KI) i *Gfm1*<sup>-</sup> (KO), i utilitzar-los per tal d'obtenir ratolins modificats genèticament que constitueixin models animals per a la COXPD1.
2. Caracteritzar el fenotip dels models de ratolí a diferents teixits i edats:
  - Analitzar l'efecte dels al·lels KI i KO sobre l'expressió i estabilitat d'EFG1.
  - Testar l'eficiència de traducció mitocondrial, afectació de la CTE i l'OXPPOS.
  - Avaluar possibles alteracions neuromusculars i hepàtiques.
  - Cercar mecanismes moleculars de resposta que es puguin desencadenar.

### Objectius per verificar la hipòtesi 2

3. Dissenyar i produir un rAAV que contingui una còpia funcional del gen *GFM1* humà, d'expressió hepàtica i tropisme ampli.
4. Testar el potencial de la teràpia gènica amb el rAAV generat, administrant-lo per via intravenosa al model de ratolí de la COXPD1 escollit:
  - Analitzar el grau de transducció als teixits diana principals.
  - Avaluar l'expressió del gen terapèutic, la funcionalitat de la proteïna EFG1 humana i l'efecte sobre el fenotip hepàtic.

## 4. MATERIAL I MÈTODES

---



## 4.1. Disseny experimental

La tesi s'organitza en tres blocs principals (*Figura 4.1*) que es van seguir de forma seqüencial: la generació i caracterització del model *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* (*apartat 4.1.1*), la generació i caracterització del model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* (*apartat 4.1.2*) i la implementació d'una estratègia de teràpia gènica amb rAAV per a la COXPD1 (*apartat 4.1.3*).

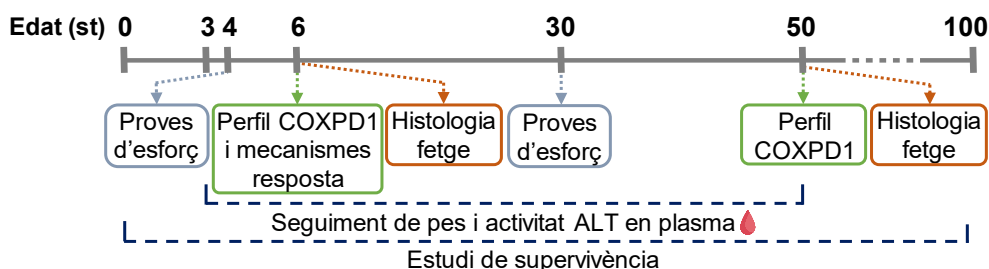


**Figura 4.1. Disseny experimental.** Es representa de forma esquemàtica el disseny experimental de la tesi que es divideix en tres blocs: la generació i caracterització del model *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*, la generació i caracterització del model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* i la implementació d'una estratègia de teràpia gènica amb rAAV per a la COXPD1. Dintre de cada bloc s'organitzen els experiments duts a terme en cada cas, especificant les edats dels ratolins i teixits analitzats. On st: setmanes d'edat; fg: fetge; ce: cervell; co: cor; ry: ronyó; m: múscul esquelètic; mt: mitocondrial; i.v.: intravenosa; gv (genomes de vector AAV).



#### 4.1.1. Generació i caracterització del model *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>

Després de generar el ratolí homozigot *knock-in* per a *Gfm1* (apartat 4.2) es va dur a terme la seua caracterització, comparant-se cadascun dels paràmetres analitzats amb els dels ratolins *Gfm1*<sup>+/+</sup> i *Gfm1*<sup>R671C/+</sup> i incloent-se animals dels dos sexes dintre de cada grup d'estudi. Es va seguir la línia temporal esquematitzada a la *Figura 4.2* i detallada més avall:



**Figura 4.2.** Línia temporal de la caracterització del model *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>. L'eix horitzontal indica l'edat en setmanes (st) dels ratolins, els quadres senyalitzen els aspectes analitzats a cada edat, i les línies blaves discontinües representen seguiments duts a terme durant períodes de temps prolongats.

### I. Anàlisi del fenotip molecular

#### I.1. Sobre ratolins de 6 setmanes d'edat:

- Estudi del perfil COXPD1:
  - Determinació de l'expressió de *Gfm1* a nivell d'ARNm (apartat 4.11.3.1) i de proteïna sobre extractes mitocondrials (en fetge, cervell, cor i ronyó), i homogenats de fetge i múscul esquelètic (gastrocnemi) (apartat 4.6).
  - Anàlisi de la traducció mitocondrial (fetge, cervell, cor i ronyó) (apartat 4.9).
  - Quantificació de subunitats del CIV (en fetge i cervell) (apartat 4.6) i dels complexos OXPHOS acoblats en mitocondris (en fetge) (apartat 4.7).
  - Anàlisi de les activitats enzimàtiques dels complexos de la CTE (en fetge, cervell, cor i múscul esquelètic) (apartat 4.12.1).
- Cerca de mecanismes resposta:
  - Anàlisi del número de còpies d'ADNmt (apartat 4.10.1) i quantificació d'ARN mitocondrials (en fetge i cervell) (apartat 4.11.3.2).
  - Determinació dels nivells d'EFG2, EFTu i EFTs mitocondrials (en fetge, cervell, cor i ronyó) (apartat 4.6).

- Estudi del perfil de co-migració d'EFG1 amb el mitoribosoma i quantificació de l'expressió de MRPS9 i MRPL13 (en fetge) (*apartat 4.8*).

### I.II. Sobre ratolins de 50 setmanes d'edat:

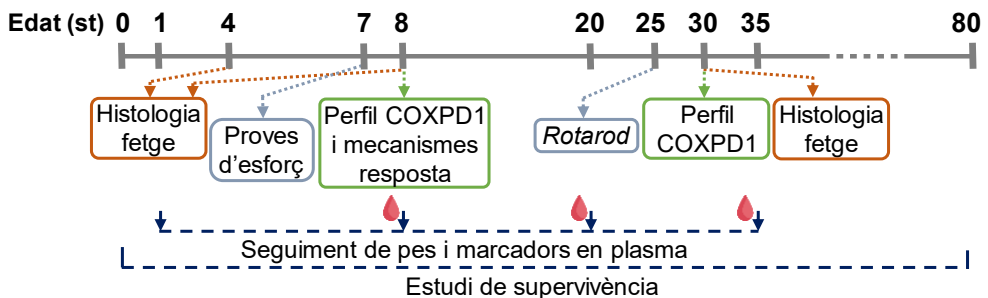
- Estudi del perfil COXPD1:
  - Quantificació d'EFG1 (en mitocondris i homogenats de fetge) i subunitats de CIV (en mitocondris de fetge) (*apartat 4.6*).
  - Anàlisi dels complexos OXPHOS en mitocondris (en fetge) (*apartat 4.7*).
  - Determinació de les activitats enzimàtiques dels complexos de CTE (en fetge) (*apartat 4.12.1*).

### II. Avaluació de la condició física i fenotip hepàtic:

- Seguiment de pes i de l'activitat ALT fins les 50 setmanes d'edat (*apartat 4.12.2.1*).
- Avaluació de l'exercici físic a les 4 i 30 setmanes d'edat (*apartat 4.3.3*).
- Anàlisi histològica de fetge a les 8 i 50 setmanes d'edat (HE) (*apartat 4.13*).

#### 4.1.2. Generació i caracterització del model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*

El segon bloc experimental de la tesi contempla la generació de model de ratolí heterozigot compost *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* (*apartat 4.2*). La seua caracterització es va centrar en l'exploració molecular de fetge i cervell com a teixits diana de la malaltia, comparant cadascun dels paràmetres amb els dels ratolins *Gfm1<sup>+/+</sup>* i *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* i tenint en compte animals dels dos sexes. Es va seguir la línia temporal esquematitzada a la *Figura 4.3* i detallada més avall:



**Figura 4.3.** Línia temporal de la caracterització del model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*. L'eix horitzontal indica l'edat en setmanes (st) dels ratolins, els quadres senyalitzen els aspectes analitzats a cada edat, i les línies blaves discontinues representen seguiments duts a terme durant períodes de temps prolongats. Les fletxes blaves i gotes vermelles indiquen exactament a quina edat es van controlar pes i marcadors bioquímics en plasma respectivament.

## I. Anàlisi del fenotip molecular:

### I.I. Sobre ratolins de 8 setmanes d'edat:

- Estudi del perfil COXPD1
  - Quantificació de l'expressió d'ARNm de *Gfm1* (*apartat 4.11.3.1*) i estudi de l'ARNm provinent de l'al·lel *Gfm1*<sup>-</sup> (en fetge i cervell) (*apartat 4.11.4*).
  - Determinació dels nivells d'EFG1 en mitocondris (fetge i cervell) i homogenats de cor (*apartat 4.6*).
  - Anàlisi de la traducció mitocondrial (fetge i cervell) i experiments *pulse-chase* (fetge) (*apartat 4.9*).
  - Quantificació de subunitats del CI i CIV (*apartat 4.6*) i dels complexos OXPHOS acoblats (en mitocondris de fetge i cervell) (*apartat 4.7*).
  - Determinació de les activitats enzimàtiques dels complexos de CTE (en fetge, cervell i cor) (*apartat 4.12.1*).
- Cerca de mecanismes resposta
  - Anàlisi del número de còpies d'ADNmt (*apartat 4.10.1*) i nivells d'ARN mitocondrials (en fetge i cervell) (*apartat 4.11.3.2*).
  - Quantificació d'EFTu i EFTs en mitocondris de fetge i cervell (*apartat 4.6*).
  - Anàlisi dels nivells de MRPs (MRPS9, MRPS35 i MRPL13) (*apartat 4.6*).

### I.II. Sobre ratolins de 30 setmanes d'edat:

- Estudi del perfil COXPD1
  - Quantificació d'EFG1 en mitocondris (fetge i cervell) (*apartat 4.6*).
  - Anàlisi de la traducció mitocondrial (fetge i cervell) (*apartat 4.9*).
  - Quantificació de subunitats del CI i CIV (*apartat 4.6*) i dels complexos OXPHOS acoblats (en mitocondris de fetge i cervell) (*apartat 4.7*).
  - Determinació de les activitats enzimàtiques dels complexos de CTE (en fetge, cervell) (*apartat 4.12.1*).

## II. Avaluació del fenotip clínic:

- Seguiment de pes (a 1, 8, 20 i 35 setmanes d'edat).
- Anàlisi de marcadors bioquímics en plasma: ALT, AST i TGs (8, 20 i 35 setmanes d'edat), lactat (8 i 20 setmanes d'edat) i amoni (8 setmanes d'edat) (*apartat 4.12.2*).
- Avaluació de l'exercici físic a les 7 setmanes d'edat i test *rotarod* a les 25 setmanes d'edat (*apartat 4.3.3*).

- Anàlisi histoquímica de fetge a les 8 setmanes d'edat (HE i PAS); i a les 30 setmanes d'edat (HE i Masson) (*apartat 4.13*).
- Immunohistoquímica Ki-67 en fetge a les 4 i 30 setmanes d'edat (*apartat 4.13.2*).

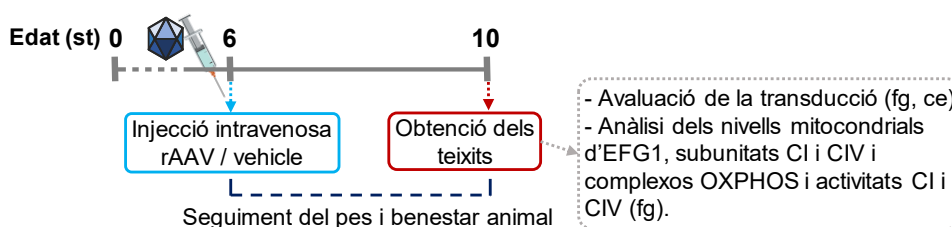
#### 4.1.3. Teràpia gènica amb rAAV per a la COXPD1

Un cop dissenyat i produït el vector ssAAV9-hAAT-GFM1 (*apartat 4.14*) aquest es va administrar per via intravenosa (*apartat 4.3.4*) en ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* de 6 setmanes d'edat (KI/KO AAV) a una dosi de  $5 \cdot 10^{12}$  gv/kg (genomes de vector/kg). Com a grups control es van incloure animals *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* tractats amb la solució vehicle (KI/KO V) i *Gfm1<sup>+/+</sup>* (WT) sense tractar. L'estudi es va dur a terme en paral·lel i de forma independent sobre ratolins dels dos sexes (*Taula 4.1*).

**Taula 4.1. Grups d'animals per l'estudi de teràpia gènica**

Sexe	Grup	Genotip	Tractament
Femelles ♀	WT	<i>Gfm1<sup>+/+</sup></i>	-
	KI/KO V	<i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i>	Vehicle
	KI/KO AAV	<i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i>	ssAAV9-hAAT-GFM1
Mascles ♂	WT	<i>Gfm1<sup>+/+</sup></i>	-
	KI/KO V	<i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i>	Vehicle
	KI/KO AAV	<i>Gfm1<sup>R671C/-</sup></i>	ssAAV9-hAAT-GFM1

Tal i com s'esquematitza a la *Figura 4.4*, durant les 4 setmanes entre l'administració del rAAV i sacrifici es va controlar el pes corporal i benestar dels ratolins. A les 10 setmanes d'edat es van sacrificar els animals. Tot seguit es preservaren els teixits (fetge i cervell) a  $-80^{\circ}\text{C}$  (*apartat 4.3.5*), i un lòbul gran de fetge es va utilitzar per l'obtenció d'extractes mitocondrials (*apartat 4.5*).



**Figura 4.4. Línia temporal de l'estratègia de teràpia gènica amb ssAAV9-hAAT-GFM1 sobre el model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*.** L'eix horitzontal indica l'edat en setmanes (st) a les quals es van injectar els rAAV i obtenir els teixits (fg: fetge; ce: cervell) per analitzar la transducció i eficàcia de l'aproximació terapèutica.

El grau de transducció dels rAAV es va analitzar tant en fetge com en cervell determinant el número de còpies de vector. Seguidament es va avaluar l'eficàcia de l'aproximació terapèutica en fetge quantificant els nivells d'EFG1 i subunitats dels complexos CI i CIV en extractes mitocondrials (*apartat 4.6*), els complexos OXPHOS acoblats en mitocondris (*apartat 4.7*) i les activitats enzimàtiques de CI i CIV (*apartat 4.12.1*).

## 4.2. Generació dels models de ratolí

Es van generar dos models de ratolí modificats genèticament per a *Gfm1*. En primer lloc un ratolí homozigot *knock-in* constitutiu per a la mutació p.R671C (KI, *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*). I més tard, un al·lel *knock-out* constitutiu que va permetre obtenir el model heterozigot compost *knock-in/knock-out* per a *Gfm1* (KI/KO, *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*).

La mutació p.R671C, a part de ser la que la que s'havia trobat en major freqüència en pacients amb COXPD1, estava present en molts dels pacients amb major esperança de vida. Tenint en compte aquest aspecte, vam apostar per generar ratolins amb aquesta mutació pensant principalment en evitar la letalitat dels animals durant l'etapa embrionària.

Els ratolins fundadors heterozigots per als al·lells *knock-in* (*Gfm1<sup>R671C/+</sup>*) i *knock-out* (*Gfm1<sup>+/-</sup>*) es van obtenir mitjançant edició gènica per CRISPR/Cas9 duta a terme per part de la companyia *Taconic Bioscience*.

L'al·lel *knock-in* (KI, *Gfm1<sup>R671C</sup>*) es va generar introduint la mutació antisentit c.2011\_2013delinsTGC a *Gfm1*, causant del canvi d'aminoàcid p.R671C a la seqüència de la proteïna EFG1 (*Figura 5.1B*).

L'al·lel *knock-out* (KO, *Gfm1<sup>-</sup>*) es va obtenir mitjançant la deleció dels exons 2 i 3 del gen (*Figura 5.15A*). Aquesta estratègia provoca una alteració de la pauta de lectura entre els exons 1 i 4 que comporta l'aparició d'un codó stop prematur a l'exó 4, eliminant el domini d'unió a GTP i donant lloc a una forma aberrant de la proteïna.

En tots dos casos l'estratègia d'edició gènica va prendre com a seqüència de referència la variant d'ARNm *NM\_138591* del NCBI, corresponent a la seqüència

ENSMUST00000077271.8 de l'*Ensemb*<sup>212</sup>. Per a cada cas, es va fer una rastreig dels potencials ARNg (ARN guies), i per a cada posició es van seleccionar aquells que tenien el nombre de punts de tall inespecífics (*off-targets*) més baix. Aquesta anàlisi es va dur a terme basant-se en *GRCm38/mm10 (2011)*<sup>213</sup>.

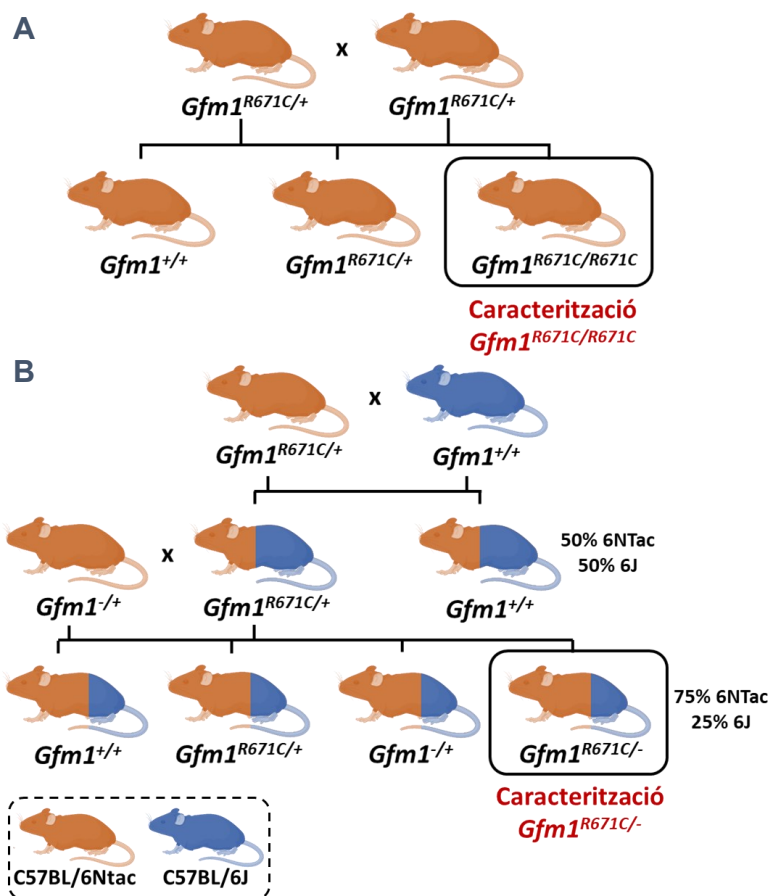
Els ARNg, ARNcr (ARN de crispr), ARNtracr (ARN trans-activador de CRISPR) i ARNm Cas9 es van microinjectar en zigots de ratolins C57BL/6NTac, obtenint la generació F0 d'animals candidats amb les mutacions desitjades. Les cries nascudes van ser incloses en les anàlisis de preselecció que van consistir en:

1. PCR específica de la regió d'interès efectuada sobre ADN genòmic.
2. Clonatge dels productes de PCR amb una mida correcta.
3. Genotipatge per determinar la modificació en *Gfm1* (*apartat 4.2.2*).
4. Seqüenciació per confirmar la presència dels al·lels mutants (almenys 4 clons per animal fundador).

Un cop seleccionats els animals fundadors (F0), aquests es van aparellar amb ratolins amb el fons genètic C57BL/6NTac per tal d'obtenir la generació F1 de ratolins heterozigots per a cadascun dels al·lels mutants.

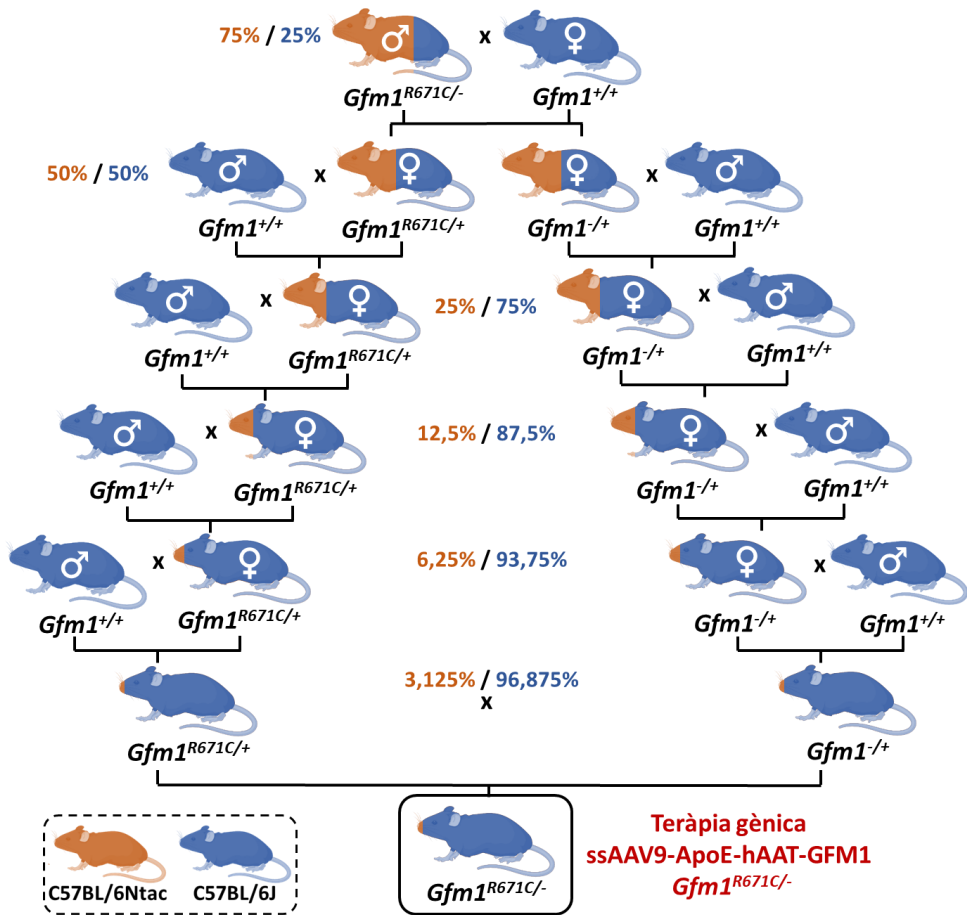
El ratolí *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* mantingut sota el fons genètic C57BL/6NTac es va obtenir aparellant els ratolins heterozigots *Gfm1<sup>R671C/+</sup>* (F1) entre ells. Un cop finalitzada la caracterització d'aquest model es va haver d'efectuar un aparellament excepcional a la colònia *Gfm1 knock-in* amb ratolins C57BL/6J per tal de superar problemes de reproducció. El ratolí *Gfm1<sup>+/-</sup>* mantingut sota el fons genètic C57BL/6NTac es va obtenir aparellant ratolins *Gfm1<sup>+/-</sup>* entre ells. Aquests aparellaments van permetre testar la letalitat del genotip *Gfm1<sup>-/-</sup>*.

Per últim es van fer servir aparellaments entre ratolins *Gfm1<sup>R671C/+</sup>* i *Gfm1<sup>+/-</sup>* per tal de generar el model de ratolí *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*. Els animals resultants d'aquest últim aparellament van resultar tenir un fons genètic mixt entre C57BL/6NTac i C57BL/6J, indicat com a C57BL/6 (*Figura 4.5*).



**Figura 4.5. Aparellaments i fons genètic dels models  $Gfm1^{R671C/R671C}$  i  $Gfm1^{R671C/-}$ .** Els colors taronja i blau representen el fons genètic C57BL/6Ntac i C57BL/6J respectivament. Aquells ratolins de dos colors tenen fons genètic mixt i s'indica el percentatge teòric de cada fons genètic<sup>214</sup>. **(A)** Aparellaments per la generació del model  $Gfm1^{R671C/R671C}$  utilitzat en la caracterització **(B)** Aparellaments per generar model  $Gfm1^{R671C/-}$  caracteritzat posteriorment.

Un cop realitzada la caracterització del model  $Gfm1^{R671C/-}$ , es van efectuar 6 aparellaments consecutius amb ratolins C57BL/6J amb l'objectiu d'homogeneïtzar el fons genètic cap a aquesta línia consanguínia, almenys en un 95%<sup>214</sup>. Aquest procés es va dur en paral·lel per als al·lels KI i KO de  $Gfm1$  i finalment es va obtenir de nou el model  $Gfm1^{R671C/-}$  mitjançant aparellaments  $Gfm1^{R671C/+}$  x  $Gfm1^{-/+}$  (Figura 4.6). Aquests ratolins són els que es van fer servir per testar l'estratègia de teràpia gènica amb rAAV dirigida a fetge.



**Figura 4.6. Canvi de fons genètic del model  $Gfm1^{R671C/-}$  utilitzat a la teràpia gènica.** Els colors taronja i blau representen el fons genètics C57BL/6Ntac i C57BL/6J respectivament. Aquells ratolins de dos colors tenen fons genètic mixt i s'indica el percentatge teòric de cada fons genètic<sup>214</sup>. Es van dur a terme aparellaments en paral·lel de ratolins portadors dels al·lels  $Gfm1^{R671C}$  i  $Gfm1^{-}$  amb animals  $Gfm1^{+/+}$  C57BL6J. Es va homogeneïtzar així el fons genètic dels animals  $Gfm1^{R671C/-}$  abans d'utilitzar-los per testar l'estratègia de teràpia gènica.

### 4.3. Procediments d'experimentació animal

#### 4.3.1. Condicions d'establució

Els animals es van mantenir i aparellar a l'establucari CELLEX de l'Institut de Recerca Vall d'Hebron amb condicions d'humitat i temperatura controlades (20-22°C), cicles de llum-fosc de 12 hores i disposició del menjar i beguda *ad libitum* (amb la dieta Teklad Global 18% Protein Rodent Diet 2018, Harlan).



Les pràctiques animals dutes a terme van ser aprovades per el Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEAA) del Institut de Recerca Vall d'Hebron (número de procediments: 44/17 i 53/18) i autoritzades per part del Departament de Territori i Sostenibilitat de la Generalitat de Catalunya (projecte número 11258).

### 4.3.2. Genotipatge

L'ADN total obtingut a partir de mostres d'orella de ratolí seguint el mètode fenol-cloroform simplificat (*apartat 4.4.1.2*) va ser l'utilitzat per dur a terme el genotipatge dels animals. El gen *Gfm1* (NC\_000069.7; Gene ID: 28030) de ratolí es localitza al cromosoma 3, conté 18 exons i l'ARNm resultant presenta un mida de 4.078 pb (*ENSMUST00000077271.8*). A continuació s'explica com es va dur a terme la detecció dels al·lels *knock-in* i *knock-out* de *Gfm1*.

#### 4.3.2.1. Detecció de l'al·lel *knock-in Gfm1<sup>R671C</sup>*

Aquest al·lel conté la mutació antisentit c.2011\_2013delinsTGC, localitzada a l'exó 16 del gen i que dona lloc al canvi d'aminoàcid p.R671C a la seqüència de la proteïna. Per tal de d'identificar-lo, s'amplifica per PCR un fragment d'ADN que conté la posició c.2011\_2013 i tot seguit es du a terme una digestió enzimàtica específica per identificar l'al·lel mutat (c.2011\_2013delinsTGC):

- **Amplificació per detectar l'al·lel *Gfm1<sup>R671C</sup>***

D'aquesta PCR s'espera obtenir un fragment de 613 pb, independentment de si l'al·lel conté o no la mutació. Els encebadors utilitzats són els següents:

- Encebador directe *PCR KI Fw*: 5' CTG TCT CAT GTA GAG CTG GAG AG 3' (situat a l'intró 15).
- Encebador revers *PCR KI Rv*: 5' AGA TAA GAC AGG TAC AGA TCA GGG 3' (situat a l'intró 16).

L'amplificació per PCR es fa utilitzant el kit *TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG Plus (R013A, TaKaRa)* (*Taula 4.2* i *Taula 4.3*). Aquest kit inclou desoxiuridina trifosfat (dUTP) en compte de timidina trifosfat (dTTP) com a substrat de la polimerasa. D'altra banda, es fa servir l'enzim uracil-ADN glicosilasa (UNG), que durant el primer

pas de la PCR (10 minuts a 20°C) elimina totes aquelles molècules d'ADN que continguin uracil, evitant així possibles contaminacions amb productes de PCR anteriors.

**Taula 4.2. Composició de la reacció de PCR per detectar l'al·lel *Gfm1*<sup>R671C</sup>**

Reactiu	Volum (µL)	Concentració final
TaKaRa Taq HS (5 U/µL)	0,1	0,025 U/µL
UNG (2 U/µL)	0,2	0,02 U/µL
10X PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> ) <sup>1</sup>	2	1X
Mescla de dNTPs (2,5 mM cadascun) <sup>2</sup>	1,6	0,2 mM
Encebador directe <i>PCR KI Fw</i> (2 µM)	5	0,5 µM
Encebador revers <i>PCR KI Rv</i> (2 µM)	5	0,5 µM
Aigua	5,1	-
ADN	1	100-200 ng

<sup>1</sup>Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM

<sup>2</sup>Conté dATP, dCTP, dGTP i dUTP

**Taula 4.3. Condicions d'amplificació de la PCR per al genotipatge**

Temperatura	Temps	Cicles
25°C	10 minuts	1
95 °C	2 minuts	30
95°C	30 segons	
60°C	30 segons	
72°C	1 minut	
72°C	10 minuts	1

El resultat de la PCR es visualitza mitjançant separació per electroforesi en un gel d'agarosa al 0,5% (*apartat 4.4.5*). Tot seguit el producte d'amplificació es congela a -20°C fins sotmetre'l al pas de digestió amb enzims de restricció.

- **Digestió enzimàtica per detectar l'al·lel *Gfm1*<sup>R671C</sup>**

S'utilitza l'enzim de restricció *NcoI-HF*<sup>®</sup> (*NEB #R3193*) que reconeix el canvi de nucleòtids de l'al·lel *Gfm1*<sup>R671C</sup>. La reacció té lloc durant tota la nit (O/N) a 37°C (*Taula 4.4*) i a continuació es congela a -20°C. El producte de la digestió es separa per electroforesi en gel d'agarosa al 0,5% (*apartat 4.4.5*) donant lloc a una banda de 613 pb (al·lel *Gfm1*<sup>+</sup>) o dues bandes de 432 i 181 pb (al·lel *Gfm1*<sup>R671C</sup>). Cal tenir en compte que l'al·lel *knock-out Gfm1* també dona lloc a la banda de 613 pb (la regió

amplificada no està alterada en aquest al·lel), per tant, en aquells ratolins on sigui possible la presència de l'al·lel *knock-out* el genotipatge inclou una altra PCR (*apartat 4.3.2.2*).

**Taula 4.4. Composició de la digestió amb *NcoI* per detectar l'al·lel *Gfm1<sup>R671C</sup>***

Reactiu	Volum (µL)	Concentració final
<i>NcoI</i> (20.000 U/mL) ( <i>NEB #R3193</i> )	0,5	2.000 U/mL
10X CutSmart Buffer	1	1X
Aigua	3,5	-
ADN producte de PCR	5	-

#### 4.3.2.2. Detecció de l'al·lel *knock-out Gfm1<sup>-</sup>*

Tenint en compte que l'al·lel *Gfm1<sup>-</sup>* manca dels exons 2 i 3 del gen, la seua detecció s'efectua mitjançant una amplificació per PCR que utilitza un encebador directe comú i dos encebadors reversos (un per la detecció de cada al·lel del gen).

- Encebador directe *PCR KO Fw*: 5' TGACCTTTCCAGCACCAGG 3' (situat a l'intró 1, just abans de l'exó 2).
- Encebador revers *PCR KO RvWT*: 5' CACCCGACCAGTTTTTCATCC 3' (situat a l'intró 2, entre els exons 2 i 3).
- Encebador revers *PCR KO RvKO*: 5' CCTGACAGACACATCTGCAGAC 3' (situat a l'intró 3, entre els exons 3 i 4).

S'utilitza el kit *TaKaRa Taq™ HS PCR Kit, UNG Plus* per fer l'amplificació. La composició per a la mescla de reacció es detalla a la *Taula 4.5* i les condicions de la reacció a la *Taula 4.3*.

Després de separar el producte de PCR per electroforesi en gel d'agarosa al 0,5% (*apartat 4.4.5*), el revelat permet confirmar o no la presència d'una banda de 318 pb (al·lel *Gfm1<sup>-</sup>*) i una banda de 548 pb (al·lel *Gfm1<sup>+</sup>* o *Gfm1<sup>R671C</sup>*).

Taula 4.5. Composició de la reacció de PCR per detectar l'al·lel *Gfm1*<sup>-</sup>

Reactiu	Volum (µL)	Concentració final
TaKaRa Taq HS (5 U/µL)	0,1	0,025 U/µL
UNG (2 U/µL)	0,2	0,02 U/µL
10x PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> ) <sup>1</sup>	2	1X
Mescla de dNTPs (2,5 mM cadascun) <sup>2</sup>	1,6	0,2 mM
Encebador directe PCR KO Fw (2 µM)	4	0,4 µM
Encebador revers PCR KO RvWT (2 µM)	2	0,2 µM
Encebador revers PCR KO RvKO (2 µM)	2	0,2 µM
Aigua	7,1	-
ADN	1	100-200 ng

<sup>1</sup>Tris-HCl 100mM, KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM; <sup>2</sup>Conté dATP, dCTP, dGTP i dUTP.

### 4.3.3. Avaluació de la condició física i el fenotip neuromuscular

Ratolins *Gfm1*<sup>+/+</sup>, *Gfm1*<sup>R671C/+</sup> i *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> de 4 i 30 setmanes d'edat i ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> de 7 setmanes d'edat es van sotmetre a les proves físiques *weightlift test*, *hanging wire test* i *treadmill test* per avaluar la resistència física i força muscular. A més, sobre ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> de 25 setmanes d'edat es va efectuar el test *rotarod*. Els tests, detallats als següents subapartats, es van dur a terme sense conèixer el genotip de cada ratolí; sabent únicament la identificació de cada animal s'evitava influir sobre els resultats finals de cada prova.

#### 4.3.3.1. Test *weight-lift*

En aquesta prova adaptada<sup>215</sup>, el ratolí s'agafa de la part mitja de la cua i se li ajuda a que subjecti amb les extremitats anteriors un filferro unit a unes anelles de ferro. La prova consta d'un màxim de 6 nivells, en cadascun de les quals es va incrementant el pes de les anelles (13,2 g; 19,7 g; 25,9 g; 32,1 g; 38,1g; 44,6 g). El criteri seguit per superar cada nivell és que l'animal mantingui subjecte el pes suspès en l'aire durant 5 segons, tenint un màxim de 3 oportunitats. La puntuació final és la suma de segons que l'animal manté el pes en intents correctes (p. ex., si un animal supera 3 nivells i al quart manté el pes durant 3 segons obté una puntuació de 18).

#### 4.3.3.2. Test hanging wire

Seguint el protocol adaptat<sup>216</sup>, l'animal es col·loca en una perxa de metall situada 30 cm per sobre d'una superfície encoixinada. Es cronometra el temps que l'animal és capaç de mantenir-se subjecte de la perxa amb les extremitats anteriors, fins un màxim de 180 segons. Es permeten 3 intents i es compta aquell en què s'hagi aconseguit una millor marca.

#### 4.3.3.3. Treadmill running

Aquest protocol d'exercici en cinta de córrer adaptat<sup>217</sup> utilitza un *treadmill* tancat (*Harvard Aparatus, Panlab*) amb una reixeta electrificada darrere de la cinta que proporciona descàrregues elèctriques de 0,2 mA (1 Hz, 200 ms) cada cop que l'animal té contacte.

El dia abans de la prova es du a terme un entrenament que consisteix a fer córrer l'animal a 5 cm/s durant 5 minuts sense estímuls elèctrics i 5 minuts amb el voltatge engegat. Els passos de la prova són:

1. 5 minuts a 5 cm/s, sense voltatge.
2. 2 minuts a 5 cm/s, amb voltatge (0,2 mA).
3. Cada 2 minuts s'incrementa la velocitat 5 cm/s (mantenint el voltatge aplicat).
4. Punt final: 5 segons seguits en contacte amb la reixeta electrificada, o quan està el 50% del temps entrant i sortint de la zona de corrent i es considera que no pot continuar corrent a la velocitat assolida.

Finalment, s'anota el temps total superat i la velocitat màxima assolida. A partir d'aquestes dades es calcula el treball ( $W$ ) (J) i la potència ( $P$ ) (mW) de cada ratolí aplicant les fórmules:

$$W = m \cdot g \cdot d ; \quad P = (W/t) \cdot 1000$$

On  $m$  és la massa de l'animal (kg);  $g$  és l'acceleració d'un cos sotmès a una força gravitatòria (9,81 m/s<sup>2</sup>);  $d$  és la distància recorreguda (m) i  $t$  és el temps superat (s).

#### 4.3.3.4. Test rotarod

En ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* de 25 setmanes d'edat s'avalua l'equilibri i coordinació motora amb el test *rotarod*<sup>208</sup>.

El ratolí es situa horitzontalment a sobre d'un cilindre rotatori de l'aparell de *rotarod* (*Ugo Basile Mouse Rota-Rod, Cat No. 47600*). El protocol inclou 3 sessions d'entrenament de 2 minuts a una velocitat constant de 4 rpm. A continuació es fa el test que consisteix en 15 segons a 4 rpm i es segueix amb una acceleració constant de 1 rpm/s durant 45 segons. El temps màxim del test són 60 segons. Es duen a terme 3 sessions del test per ratolí, es determinen els temps de latència i es fa la mitjana.

#### 4.3.4. Injecció intravenosa dels rAAV

El tractament amb el vector ssAAV9-hAAT-GFM1 es va dur a terme sobre ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* de 6 setmanes d'edat mitjançant una injecció intravenosa a una de les venes laterals de la cua (*apartat 4.1.3*).

Les preparacions dels rAAV es van diluir en la solució vehicle (sacarosa 5% (p/v) en PBS + àcid plurònic F68 (concentració final 0,001%)) a una concentració de  $7 \cdot 10^{11}$  gv/mL (genomes de vector/mL). Es va administrar una dosi de  $5 \cdot 10^{12}$  gv/kg, de forma que en funció del pes del ratolí es calculava el volum a injectar (sense superar en cap cas els 150  $\mu$ L). Per a les injeccions intravenoses, efectuades a la meitat distal de la cua, es van utilitzar una agulles de 27 G' (0,4 x 40 mm) acoblades a xeringues d'1 mL<sup>218</sup>.

#### 4.3.5. Sacrifici i obtenció de mostres

De forma rutinària, es van controlar els animals per detectar possibles signes de dolor o patiment, i així garantir el seu benestar. En cas de detectar alteracions de comportament, condició corporal, aparença física o pes, el personal veterinari va valorar si convenia iniciar un tractament determinat o aplicar el criteri de punt i final i procedir a l'eutanàsia. Quan els animals no presentaven cap anomalia i s'inclouïen en un estudi, les mostres de sang i teixits es van obtenir tal i com s'indica a continuació.

Les extraccions de sang es van dur a terme amb l'animal conscient, mentre que els teixits es van obtenir després de sacrificar-lo per dislocació cervical.

#### **4.3.5.1. Sang**

Al model *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* les mostres de sang dirigides a monitoritzar periòdicament l'activitat alanina aminotransferasa (ALT) (*apartat 4.12.2.1*) es van extreure a través de la vena safena utilitzant una agulla de 25 G' (0,5 x 16 mm) i depositant-les en un tub amb capil·lar que conté EDTA-K com a anticoagulant (*Microvette® 100/200 K3E, Sarsted*).

Per a la caracterització del model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* es van determinar diferents paràmetres bioquímics en plasma (*apartat 4.12.2.2*) a part de l'ALT. En aquest cas l'extracció de sang es va practicar a través de la vena submandibular per evitar alterar els nivells d'alguns paràmetres bioquímics per possibles danys musculars. Es va utilitzar una agulla de 25 G' (0,5 x 16 mm) per efectuar la punció i recollir la sang en tubs amb capil·lar amb EDTA-K, o en tubs amb capil·lar amb fluorur (inhibidor de la glicòlisi) i heparina (anticoagulant) (*Microvette® 200 Fluoruro/heparina, Sarsted*). La sang d'aquests segons tubs es va destinar a determinacions de lactat.

En acabar les extraccions de sang, es pressionava ràpidament amb una gasa estèril la zona de punció parant l'hemorràgia i es depositava la mostra en gel.

En tots dos casos, la sang obtinguda es va centrifugar durant 5 minuts a  $3.500 \times g$  i 4°C, conservant el plasma en un tub nou. A les determinacions de marcadors bioquímics per a la caracterització del model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* el plasma es va diluir 1:3 en PBS (adquirint un major volum que facilitava les determinacions). Finalment, es van guardar les mostres de plasma a -80°C fins al seu ús.

#### **4.3.5.2. Teixits**

Els següents teixits es van aïllar, depositar en tubs d'1,5 mL i congelar en N<sub>2</sub> líquid a l'instant: cor, pulmó, fetge, melsa, ronyó, múscul esquelètic (soli i gastrocnemi) i cervell. Després es guardaven a -80°C fins polvoritzar-los amb l'ajuda d'un morter de

ceràmica, N<sub>2</sub> líquid i neu carbònica. Els teixits polvoritzats es guardaven a -80°C fins utilitzar-los en futurs anàlisis.

Quan la intenció era aïllar mitocondris, es guardava un tros de teixit abans de congelar en tampó TI (Sacarosa 0,25 M, TES 5 mM (àcid 2-[(2-Hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)amino]etanosulfonic) [pH 7,2 ajustat amb KOH]) fred per continuar amb el seu processament (*apartat 4.5*). D'altra banda, un lòbul de fetge es destinava a fer anàlisis histoquímiques (*apartat 4.13*).

## 4.4. Metodologia general

### 4.4.1. Extracció d'ADN

#### 4.4.1.1. Extracció d'ADN total pel mètode de fenol-cloroform

L'ADN total extret mitjançant aquest mètode es va utilitzar per determinar número de còpies de vector adenoassociat (*apartat 4.10.2*) al fetge i cervell dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* tractats. El protocol adaptat<sup>219</sup> és el següent:

1. Es digereixen aproximadament 20 mg de teixit polvoritzat (*apartat 4.3.5.2*) amb l'addició de 200 µL de tampó de lisi (Tris-HCl 10 mM, [pH 7,8]; EDTA 5 mM; SDS 0,5% (p/v)) i 50 µL de proteïnasa K (concentració inicial 20 mg/ml) i s'incuba 2 hores a 50°C o O/N a 37°C en un bany.
2. S'afegeixen 25 µL de NaCl 5 M i es mescla per inversió.
3. S'addiciona 1 volum (275 µL) de fenol equilibrat amb Tris-HCl 10 mM i s'agita per inversió enèrgicament.
4. Es centrifuga a 20.000 x g durant 10 minuts a 4°C. Es recupera el sobrenedant aquós i es transfereix a un tub nou.
5. S'afegeixen 250 µL de fenol i 250 µL d'una solució d'alcohol isoamílic amb cloroform (1:24) (SEVAG) i es barreja per inversió.
6. Es centrifuga a 20.000 x g durant 10 minuts a 4°C, es recupera el sobrenedant aquós i es deposita en un tub nou.
7. S'afegeixen 500 µL de SEVAG i es barreja per inversió.
8. Es centrifuga a 20.000 x g durant 10 minuts a 4°C, es recupera el sobrenedant aquós i es transfereix a un tub nou.



9. Es precipita l'ADN amb l'addició de 1 mL d'isopropanol fred (-20°C). Es mescla per inversió i incuba en gel durant 10 minuts.
10. Es centrifuga a 20.000 x g durant 20 minuts a 4°C.
11. S'elimina el sobrenedant i es renta el precipitat d'ADN amb 1 mL d'etanol 70% (v/v).
12. Es centrifuga a 20.000 x g durant 20 minuts a 4°C.
13. S'elimina completament el sobrenedant i es deixa assecar amb el tub obert a temperatura ambient (T/A), assegurant-se de que s'evapora tot l'etanol.
14. Finalment, s'afegeixen 50 µL de Tris 10 mM [pH 8] a l'ADN i s'incuba a T/A fins que es dissolgui.
15. Es quantifica la concentració d'ADN obtingut (*apartat 4.4.3*) i es guarda a -20°C fins a la seua utilització.

#### **4.4.1.2. Extracció d'ADN total pel mètode de fenol-cloroform simplificat**

Aquest protocol es va seguir per tal d'extreure l'ADN genòmic a partir de petites mostres d'orella o cua de ratolí i procedir al seu genotipatge (*apartat 4.3.2*). Els passos a seguir són els següents:

1. Sobre les mostres guardades en tubs d'1,5 mL, s'afegeixen 400 µL de tampó de lisi de teixit (NaCl 100 mM, EDTA 2,5 mM, SDS 0,5% (p/v), Tris-HCl 50 mM [pH 8]) i 8 µL de proteïnasa K a 20 mg/mL. Tot seguit es fa vòrtex.
2. Per assegurar la digestió del teixit, les mostres s'incuben O/N en un bany a 55°C.
3. Les mostres s'agiten amb vòrtex, s'afegeixen 75 µL de KAcO 8M i es fa de nou vòrtex.
4. S'afegeixen 500 µL de cloroform i es barreja.
5. Es centrifuga durant 5 minuts a 13.000 x g a T/A. Es traspassen al voltant 450 µL de la fase aquosa superior (on n'hi ha els àcids nucleics) a un nou tub.
6. S'afegeixen 900 µL d'etanol 100% i es barreja. Tot seguit, es centrifuga durant 20 minuts a 13.000 x g i T/A per tal de precipitar l'ADN.
7. S'elimina el sobrenedant per decantació i el precipitat es renta amb 1 mL d'etanol 75%. De nou, es centrifuga durant 10 minuts a 13.000 x g a T/A.
8. S'elimina el sobrenedant i es deixa assecar el precipitat incubant els tubs oberts a 55°C uns 10 minuts.

9. El precipitat es dissol en 50 µL de Tris-HCl 10 mM [pH 8] i s'incuba durant 10 minuts a 55°C. S'agita amb vòrtex i es quantifica la concentració d'ADN (*apartat 4.4.3*).

#### **4.4.1.3. Extracció d'ADN total mitjançant un kit comercial**

Es va utilitzar el kit comercial *QIAmp® DNA Mini Kit (51306, QIAGEN)* amb l'objectiu d'extreure ADN total de fetge i cervell sobre el qual determinar el número de còpies d'ADN mitocondrial (ADNmt) (*apartat 4.10.1*). Aquest kit permet l'extracció de fragments d'ADN nuclear (ADNn), ADNmt i ADN viral (ADNv) de fins 50 kb, fent servir un sistema de membranes de sílice per la seua purificació. Com a material de partida s'utilitzen al voltant de 20 mg de teixit polvoritzat (*apartat 4.3.5.2*) i es segueixen els passos descrits al protocol del propi kit per l'obtenció de l'ADN. Per últim es quantifica la concentració d'ADN (*apartat 4.4.3*) i es guarda a -20°C fins a la seua utilització.

#### **4.4.1.4. Extracció d'ADN plasmídic per Miniprep**

Aquest mètode es va seguir per obtenir ADN plasmídic d'un cultiu bacterià a petita escala i de forma ràpida. El kit comercial utilitzat és el *Illustra™ PlasmidPrep Mini Spin Kit (28-9042-69, GE Healthcare)*.

Com a material de partida s'utilitza un pellet d'un cultiu de 5 mL d'*E. coli* que contingui el plasmidi desitjat, crescut tal i com s'indica a l'*apartat 4.14.5*. Per obtenir l'ADN plasmídic es segueix el protocol descrit al kit comercial aplicant els passos especificats per plasmidis de baix número de còpies. Un cop obtingut l'ADN es quantifica la concentració d'ADN obtingut (*apartat 4.4.3*) i es guarda a -20°C fins a la seua utilització.

#### **4.4.1.5. Extracció d'ADN plasmídic per Maxiprep**

Per tal d'obtenir ADN plasmídic a gran escala a partir d'un cultiu bacterià es va utilitzar el kit comercial *E.Z.N.A.® Endo-Free Plasmid Maxi Kit (D6926-03, Omega Bio-tek®)*.

El pellet bacterià de partida s'obté a partir d'un cultiu de 200 mL d'*E. coli* que conté el plasmidi desitjat (*apartat 4.14.5*). L'obtenció de l'ADN plasmídic es du a terme

seguint els passos indicats al manual del kit comercial per l'obtenció de plasmidis de baix número de còpies. Un cop obtingut l'ADN es quantifica la seua concentració (*apartat 4.4.3*) i es guarda a -20°C fins a la seua utilització.

#### **4.4.2. Extracció d'ARN mitjançant el reactiu TRIZol**

L'extracció d'ARN a partir de mostres de teixit congelat i polvoritzat (*apartat 4.3.5.2*) es va efectuar amb el *TRIZol™ Reagent (Invitrogen, Thermo Scientific)* com es detalla a continuació:

1. S'afegeix 1 mL de reactiu TRIZol (solució monofàsica de fenol i isotiocianat de guanidina) a 50 mg de teixit congelat i polvoritzat i s'homogeneïtza durant 10 segons amb l'aparell *pellet pestles cordless motor* (Sigma-Aldrich) i puntes de plàstic acoblades. Posteriorment, s'incuba 5 minuts a T/A per facilitar la dissociació completa dels complexos de nucleoproteïnes.
2. S'afegeixen 200 µL de cloroform i s'incuba 2 minuts a T/A.
3. Es centrifuga a 12.000 x g durant 15 minuts a 4°C i es transfereix la fase aquosa superior a un tub nou.
4. S'afegeixen 500 µL d'isopropanol i s'incuba 10 minuts en gel.
5. Es centrifuga a 12.000 x g durant 10 minuts a 4°C i es descarta el sobrenedant.
6. El precipitat es renta amb 1 mL d'etanol 75%.
7. Es centrifuga a 7.500 x g durant 5 minuts a 4°C, s'elimina el sobrenedant i es deixa assecar l'ARN durant 5-10 minuts.
8. L'ARN es dissol amb 30-50 µL d'aigua lliure de RNases.
9. Es quantifica la concentració d'ARN obtingut (*apartat 4.4.3*), s'avalua la seua qualitat (*apartat 4.4.4*) i es guarda a -80°C fins el seu ús.

#### **4.4.3. Quantificació de la concentració d'àcids nucleics**

La concentració d'àcids nucleics, tant ADN com ARN, es va determinar espectrofotomètricament amb el *NanoDrop® ND-2000 (NanoDrop Technologies)*. S'utilitzen 2 µL de mostra, es llegeix l'absorbància a 260 nm i es calcula la concentració a partir de la llei de Lambert-Beer:

$$c = A / (b \cdot \epsilon)$$

On la **c** és la concentració d'àcid nucleic en ng/μL; **A** és l'absorbància a 260 nm; **ε** és el coeficient d'extinció molar en μl·ng<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> (en el cas de l'ADN en doble cadena 50 μl·ng<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> i en el cas de l'ARN 40 μl·ng<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>); i **b** és la longitud de la trajectòria de la llum a través de la mostra en cm.

#### 4.4.4. Anàlisi de qualitat de l'ARN

Com que la integritat de l'ARN sovint es pot veure afectada, tant la seua concentració com la qualitat es van analitzar de forma més exacta mitjançant *RNA 6000 nanochips* (Agilent), processant les dades amb el *Bioanalyzer Automated Analysis System*. Breument, l'ARN es separa per electroforesi capil·lar, s'identifiquen les molècules d'ARNr de 18S i 28S i es dona un índex d'integritat de la mostra en funció del ràtio d'aquestes dues espècies d'ARNr.

#### 4.4.5. Electroforesi en gels d'agarosa

L'electroforesi en gels d'agarosa permet separar fragments d'ADN o ARN segons la seua mida, facilitant a més el seu aïllament tallant la zona d'interès (*apartat 4.14.2*). La tinció dels àcids nucleics separats al gel amb bromur d'etidi els fa visibles mitjançant l'exposició a llum ultraviolada i permet avaluar la seua mobilitat.

Per tal de preparar el gel, es pesa la quantitat d'agarosa pertinent (segons el % d'agarosa del gel) i es dissol amb el tampó TBE (Tris-borat 90 mM, EDTA 2 mM, [pH 8]), escalfant la solució al microones sense arribar a l'ebullició. Posteriorment, s'afegeix bromur d'etidi a una concentració final de 0,6 μg/ml, s'aboca al suport del gel, se li col·loquen les pintes i es deixa solidificar.

Les mostres es carreguen amb una dilució 1:10 en el tampó de càrrega 10X (Tris-HCl 50 mM [pH 8], EDTA 20 mM, Glicerol 50% (v/v), Orange G 0,3% (p/v) (08756 Sigma Aldrich)). L'electroforesi es realitza en tampó TBE aplicant un voltatge constant des de 100 V durant el temps necessari per a la separació de les bandes. En aplicar el corrent elèctric, les molècules d'ADN carregades negativament migraran cap al pol positiu. Finalment, es visualitzen les bandes sota una font de llum ultraviolada mitjançant el *Molecular Imager® Gel Doc™ XR System* (Bio-Rad) i

s'interpolen la mida de les bandes amb les del marcador de pes molecular *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder* (*ThermoFisher Scientific*).

#### 4.4.6. Quantificació de la concentració proteica

Les determinacions de les concentracions proteiques, tant d'homogenats de teixit com d'extractes mitocondrials, es van dur a terme seguint un protocol adaptat del mètode clàssic de Bradford<sup>220</sup>.

D'una banda, es prepara una recta patró a partir d'una solució inicial d'albumina bovina (*Albumin Standard, Thermo Scientific*) de concentració 2 mg/mL. Les dilucions de què consta la recta patró s'efectuen en la mateixa solució tampó en que estan dissoltes les mostres.

Cadascuna de les mostres, els punts de la recta patró i el blanc de reacció (solució tampó de les mostres) es mesuren per triplicat en una placa de 96 pous. Es barregen 8 µL de cada mostra amb 200 µL de *Coomassie Protein Assay Reagent (23200, ThermoFisher)*, s'incuba la barreja 5 minuts a T/A i a les fosques, i es determina l'absorbància a 594 nm amb l'equip *BioTek ELX800 Absorbance microplate Reader* (*Thermo Scientific*). Per calcular la concentració, s'interpolen els valors d'absorbància obtinguts per cada mostra amb els valors de la recta patró.

#### 4.5. Obtenció d'extractes mitocondrials de teixits

L'aïllament de mitocondris a partir dels diferents teixits es va basar en un procés de centrifugació diferencial<sup>221</sup>:

Tots els passos detallats a continuació es duen a terme a 4°C. Fins al *punt 7* es fa servir la *Centrífuga Sorvall™ RC 6 Plus* (*Thermo Scientific*) amb el rotor d'angle fix *Fiberlite F21-8x50y* (*Thermo Scientific*) prèviament refredat; i a partir d'aquest punt es fa ús d'una microcentrífuga normal.

1. Immediatament després de la dissecció del ratolí, els teixits es submergeixen en tampó TI fred.

2. Les mostres s'homogeneïtzen amb 8 mL de tampó TI + BSA (albúmina de sèrum boví, *fatty acid free*) 0,1% (p/v) amb un homogeneïtzador de vidre. En el cas del fetge, s'esmicola prèviament amb tisores i es renta amb tampó TI per descartar restes de sang.
3. Els homogenats es filtren a través d'una gasa de cotó i es centrifuguen 10 minuts a  $8.500 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ .
4. La capa de greix que queda a la part superior es treu amb l'ajuda d'una gasa i unes pinces i es descarta el sobrenedant.
5. Els precipitats es resuspenen amb 1 mL de tampó TI + BSA 0,1% (p/v), es transfereixen a tubs nous i es dilueixen de nou amb 3 mL addicionals de tampó.
6. Es centrifuguen els homogenats durant 10 minuts a  $700 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ , es traspassen els sobrenedants a tubs nous i es descarten els precipitats.
7. Es du a terme una nova centrifugació de 10 minuts a  $8.500 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ .
8. Els sobrenedants son descartats, els extractes mitocondrials es renten amb 8 mL de tampó TI + BSA 0,1% (p/v) i es reparteixen en 8 tubs de 1 mL.
9. Les mostres es centrifuguen 2 minuts a  $13.000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  fent servir una microcentrífuga i es descarten els sobrenedants per aspiració.
10. En cada cicle de rentat, la meitat dels extractes mitocondrials es resuspenen amb 1 mL de tampó TI + BSA 0,1% (p/v) i s'agrupen amb l'altra meitat.
11. Els punts 9 i 10 es repeteixen fins que el precipitat mitocondrial queda en un únic tub.
12. S'efectua un últim rentat amb 1 mL de tampó TI sense BSA, es centrifuga a  $13.000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  i es resuspèn el precipitat amb 1 mL de tampó TI.
13. A continuació es quantifica la concentració proteica (*apartat 4.4.6*). Es preparen diferents dilucions dels extractes mitocondrials en funció del teixit de que provenen per tal de procedir a la mesura. Es fa ús de tampó TI (sense BSA) diluït 1:10 per a tal finalitat.
  - a. Mitocondris de fetge: dilució 1:20.
  - b. Mitocondris de cervell: dilució 1:10.
14. Per últim, es preparen alíquotes dels extractes mitocondrials amb diferent quantitat de proteïna mitocondrial, en funció de per a quin ús es destinen. Es du a terme una centrifugació de 2 minuts a  $13.000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  i es conserven els

mitocondris a  $-80^{\circ}\text{C}$ , excepte en el cas de la traducció mitocondrial *in organello* (*apartat 4.9*) on els extractes mitocondrials es fan servir en fresc.

## 4.6. Western blot SDS-PAGE

### 4.6.1. Solubilització de proteïnes

Com a material de partida per es van utilitzar extractes mitocondrials o polvoritzats de teixit total, sobre els quals es van solubilitzar les proteïnes.

#### 4.6.1.1. Solubilització de proteïnes mitocondrials

Els extractes de proteïna mitocondrial (*apartat 4.5*) van permetre determinar de forma més precisa els nivells de proteïnes de localització mitocondrial, que poden estar codificades a l'ADNn o l'ADNmt.

Es descongelen els extractes mitocondrials (precipitats d'entre 100-200  $\mu\text{g}$  de proteïna) i es dissolen amb el volum necessari de tampó de càrrega 2X (Tris-HCl 100 mM [pH 6,8], SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v), DTT 200 mM, blau de bromofenol 0,1% (p/v)) per que quedin a una concentració proteica de 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . S'incuben les mostres durant 5 minuts a  $96^{\circ}\text{C}$  i s'agita intensament amb vòrtex de forma que s'acaben eliminant les estructures secundària i terciària de les proteïnes.

#### 4.6.1.2. Solubilització de proteïnes totals de teixit

Els homogenats de proteïna total d'un teixit determinat es van utilitzar per quantificar els nivells de proteïnes localitzades tant dins com fora dels mitocondris.

En un tub d'1,5 mL es depositen 20-50 mg de teixit polvoritzat (*apartat 4.3.5.2*) i s'afegeixen 150  $\mu\text{L}$  de tampó RIPA (Tris-HCl 50 mM [pH 7,4], NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, SDS 0,1% (p/v), desoxicolat de sodi 0,5% (p/v), IGEPAL<sup>®</sup> CA-630 (Sigma) 1% (v/v), còctel inhibidor de proteases 1X (cOmplete<sup>™</sup>, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Sigma Aldrich, 11873580001). La homogeneïtzació s'efectua durant 10 segons amb puntes de plàstic acoblades a l'aparell *pellet pestles cordless motor* (Sigma-Aldrich). Seguidament es deixen els tubs en un agitador rotatori durant 15

minuts a 4°C. Es centrifuguen les mostres a 20.000 x g durant 10 minuts a 4°C i es recuperen els sobrenedants que es passen a uns tubs nous.

A continuació es determina la concentració de proteïna (*apartat 4.4.6*) i s'ajusta a 6 µg/µL. En aquest cas la matriu utilitzada per preparar la recta patró i les dilucions de les mostres consisteix en una dilució 1:10 de tampó RIPA. Es dilueixen a la meitat les mostres (3 µg/µL) amb tampó de càrrega 2X, s'incuben 5 minuts a 96°C, es fa vòrtex i queden llestes per ser utilitzades.

#### 4.6.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS

El dodecil sulfat sòdic (SDS), present al tampó de càrrega i als gels d'electroforesi, és un detergent aniónic que contribueix a la desnaturalització de les proteïnes i a més els confereix una relació càrrega/massa constant, permetent separar les proteïnes d'una mostra segons el seu pes molecular.

Depenent del nombre de mostres que es desitgen analitzar en un mateix experiment es disposa de dos jocs diferents de gels, cubetes d'electroforesi i transferència.

- a. Per carregar fins un màxim de 15 mostres es preparen gels de poliacrilamida-SDS d'1,5 mm de gruix i es fan servir el sistema *Mini-PROTEAN 3 Cell* (*Bio-Rad*) per dur a terme l'electroforesi i el sistema de transferència *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (*Bio-Rad*). Cada gel consta de dues parts, un gel separador al 12% de poliacrilamida i un gel concentrador al 5% (*Taula 4.6*).

**Taula 4.6. Composició del gel d'electroforesi per western blot SDS-PAGE**

Reactiu	Gel separador (12%)	Gel concentrador (5%)
<b>Aigua</b>	4,3 mL	2,225 mL
<b>Acrilamida/bisacrilamida 40% (p/v) - Mix 37,5:1 (BioRad)</b>	3 mL	375 µL
<b>Tris-HCl 1,5 M [pH 8,8]</b>	2,5 mL	-
<b>Tris-HCl 1,5 M [pH 6,8]</b>	-	380 µL
<b>SDS 10% (p/v)</b>	100 µL	30 µL
<b>APS 10% (v/v)</b>	100 µL	30µL
<b>TEMED</b>	4 µL	3 µL

(SDS: dodecilsulfat sòdic; APS: persulfat d'amoni; TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina)



- b. Per poder analitzar més mostres al mateix temps s'utilitzen gels 4–15% *Criterion™ TGX™ Precast Midi Protein Gel (Bio-Rad)*, on es poden carregar fins a 26 mostres, una cubeta d'electroforesi *Criterion™ Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad)* i la cubeta de transferència *Criterion™ Blotter (Bio-Rad)*.

Es col·loquen els gels a les respectives cubetes d'electroforesi, que s'emplenen amb tampó d'electroforesi (Glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v) i Tris-HCl 25 mM [pH 8,3]). A continuació, es carreguen 30 µg de proteïna per mostra al gel, i als carrils de cada extrem es carreguen 7 µL del marcador de pes molecular *Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (Bio-Rad)*.

Una vegada carregat el gel, acaba d'emplenar-se la cubeta amb el tampó d'electroforesi, es connecta la font d'electroforesi i s'aplica un voltatge constant de 80 V durant els primers 30 minuts o fins que el front d'electroforesi hagi sobrepassat el gel concentrador. Després s'incrementa el voltatge a 120 V fins que desapareix el front de banda d'electroforesi.

#### 4.6.3. Transferència

Es retalla la membrana de polifluorur de vinilidè (PVDF) *Immun-Blot PVDF Membrane (Bio-Rad)* d'una mida una mica més gran que la del gel d'electroforesi, s'activa submergint-la en metanol durant 5 segons i després d'aclarir-la amb aigua destil·lada s'incuba amb el tampó de transferència (Tris-HCl 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,04% (p/v) i metanol 20% (v/v)) durant almenys 30 minuts a 4°C. D'altra banda, es tallen 8 filtres de paper Whatman per cada gel que es vulgui transferir (amb una mida més gran que la de la membrana) i es banyen amb tampó de transferència. Un cop ha acabat l'electroforesi, es treu el gel, s'elimina la part de gel concentrador i s'equilibra durant 15 minuts amb tampó de transferència a 4°C.

A continuació es procedeix al muntatge del sistema sandvitx per fer una transferència humida. Sobre el pol negatiu del casset es depositen per ordre: una esponja, 4 papers Whatman, el gel d'electroforesi, la membrana de PVDF, 4 papers Whatman i la segona esponja que queda en contacte amb el pol negatiu. Aquest ordre permet que les proteïnes amb la càrrega negativa conferida per el SDS es transfereixin del gel a la membrana. És important mantenir humits tots els elements i eliminar totes

les bombolles que puguin quedar entre les diferents capes. Després es col·loca el casset a la cubeta de transferència, es cobreix amb el tampó de transferència fred i s'aplica un corrent elèctric d'intensitat constant de 400 mA durant 1 hora a 4°C.

#### 4.6.4. Immunodetecció i revelat

Es recupera la membrana i es comprova que la transferència ha funcionat correctament detectant que s'hagi transferit el marcador de pes molecular. Es procedeix al bloqueig de la membrana incubant-la en una safata amb solució de bloqueig (llet en pols descremada al 5% (p/v) en TTBS (NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% (v/v), Tris-HCl 20 mM [pH 7.6])) durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació horitzontal. Aquest pas permet que les proteïnes (sobretot caseïna) de la llet uneixin als llocs que quedin lliures a la membrana (no ocupats per proteïnes de les mostres) incrementant la especificitat en la unió dels anticossos primaris i/o secundaris als respectius antígens i reduint el soroll de fons en el revelat.

Tot seguit s'incuba la membrana amb l'anticòs primari específic contra la proteïna que es vol detectar. Per a tal fi, l'anticòs primari (*Taula 4.7*) es dilueix en 10 mL de solució de bloqueig i s'exposa a la membrana a dintre d'un tub de 50 mL a 4°C, en agitació en un rodador horitzontal, O/N.

Posteriorment, es recull la membrana, es deposita en una cubeta i es du a terme una seqüència de quatre rentats (dos de 10 minuts i dos de 5 minuts) amb TTBS, en agitació horitzontal i T/A.

Després, s'incuba la membrana amb un anticòs secundari que va dirigit a les IgGs de l'espècie en que s'ha generat l'anticòs primari. Es fa servir *Rabbit Anti-Mouse P0260 (Agilent)* o *Goat Anti-Rabbit P0448 (Agilent)* per reconèixer anticossos generats en ratolí o conill respectivament. Els anticossos secundaris estan conjugats a l'enzim peroxidasa que permetrà posteriorment la detecció per quimioluminescència. Es fa una dilució 1:5000 de l'anticòs secundari elegit en 10 mL de solució de bloqueig i s'incuba la membrana a dintre d'un tub de 50 ml en agitació en un rodador horitzontal, durant 1 hora a T/A. A continuació es fa una seqüència de

rentats idèntica a l'anterior, però substituint a l'últim rentat de 5 minuts el TTBS per TBS (sense Tween-20 per evitar que interfereixi en el revelat).

**Taula 4.7. Anticossos primaris per immunodetecció per western blot**

Proteïna	Referència	Clonalitat	Dilució
<b>ATP5A1</b>	43-9800, Thermo Fisher Scientific	Monoclonal	1:1000
<b><math>\alpha</math>-tubulina</b>	GT114, GeneTex	Monoclonal	1:5000
<b><math>\beta</math>-actina</b>	ab8227, Abcam	Policlonal	1:5000
<b>CIII Core2</b>	A-11143, Invitrogen - Molecular Probes	Monoclonal	1:1000
<b>COXI</b>	459600, Invitrogen	Monoclonal	1:1000
<b>COXII</b>	GTX33329, GeneTex	Policlonal	1:1000
<b>COXIV</b>	ab16056, Abcam	Policlonal	1:1000
<b>CS</b>	#14309, Cell Signaling	Monoclonal	1:1000
<b>EFG1</b>	ab173529, Abcam	Monoclonal	1:1000
<b>EFTs</b>	ab173528, Abcam	Monoclonal	1:1000
<b>EFTu</b>	ab173300, Abcam	Monoclonal	1:1000
<b>GAPDH</b>	TA802519, OriGene	Monoclonal	1:5000
<b>MRPL13</b>	A13508-1, Boster Bio	Policlonal	1:1000
<b>MRPS9</b>	A14072-1, Boster Bio	Policlonal	1:1000
<b>MRPS35</b>	16457-1-AP, Proteintech	Policlonal	1:1000
<b>NDUFA9</b>	20C11B11B11, Thermo Fisher Scientific	Monoclonal	1:1000
<b>NDUFA10</b>	GTX114572, GeneTex	Policlonal	1:1000
<b>SDHA</b>	ab14715, Abcam	Monoclonal	1:1000
<b>VDAC1</b>	ab15895, Abcam	Policlonal	1:1000

Per últim, es du a terme el revelat de la membrana cobrint-la amb el volum necessari d'una barreja 1:1 recent preparada dels reactius *Immobilon<sup>TM</sup> Western (WBKLS0500, Millipore)*. Les imatges es capten amb el detector de quimioluminescència *ODYSSEY Fc (Li-COR)* amb una exposició mínima de 2 minuts. La quantificació de les bandes te lloc mitjançant una anàlisi densitomètrica que es du a terme amb el propi software del aparell (*Image Studio Lite v5.2*).

Quan es vol detectar una nova proteïna a la membrana, es repeteixen els rentats amb TTBS just després del revelat i es repeteix el protocol des de la incubació de l'anticòs primari d'interès. En cas de voler preservar la membrana durant un temps, aquesta es col·loca en una cubeta tancada amb TBS (sense *Tween-20*) a 4°C.

## 4.7. Western blot BN-PAGE

Per tal de quantificar els complexos del sistema OXPHOS es va fer servir l'electroforesi en gel de poliàcrilamida de tipus *Blue Native* (BN-PAGE). Aquesta aproximació manté unes condicions no desnaturalitzants que permeten separar els complexos OXPHOS acoblats (amb les subunitats unides o acoblades entre si), i visualitzar-los posteriorment per immunodetecció per western.

### 4.7.1. Solubilització d'extractes mitocondrials

S'utilitzen alíquotes d'extractes mitocondrials (de 100-200 µg de proteïna) que s'obtenen tal i com es descriu prèviament (*apartat 4.5*) i es conserven -80°C fins al seu ús. Una vegada descongelats els mitocondris, es mantenen en fred i es dissolen amb tampó MB2 (àcid aminocaproic 1,76 M, Bis-Tris 75 mM, EDTA 3,4 µM) a una concentració de 3 µg/µl. Després s'afegeix lauril maltòsid 10% (v/v) per a que quedi a una concentració final de 1% (v/v), es barreja i es s'incuben les mostres en gel durant 15 minuts.

A continuació es centrifuguen les mostres a 20.000 x g durant 20 minuts a 4°C. Es descarten els precipitats i es guarden els sobrenedants en tubs nous. S'afegeix tampó de càrrega SGB 5% (àcid aminocaproic 750 mM, *Brilliant Blue G* 5% (p/v)) per a que quedi a una concentració de 0,25% (v/v) i es mantenen en fred les mostres fins l'electroforesi.

### 4.7.2. Electroforesi BN-PAGE

La separació dels complexos OXPHOS es du a terme en la cubeta *Mini Gel Tank* (*Invitrogen*) utilitzant els gels *Native PAGE 4-16% BisTris gel 1mm x 10 well* (*Invitrogen*). En aquest cas, son necessaris els següents tampons d'electroforesi:

- Tampó ànode: 50 mL *20X NativePAGE™ Running Buffer* (*Invitrogen*) + 950 mL d'aigua.
- Tampó càtode *Dark blue*: 50 mL *20X NativePAGE™ Running Buffer* (*Invitrogen*) + 50 mL *20X NativePAGE™ Cathode Additive Buffer* (*Invitrogen*) + 900 mL d'aigua.

- Tampó càtode *Light blue*: 50 mL *20X NativePAGE™ Running Buffer (Invitrogen)* + 5 mL *20X NativePAGE™ Cathode Additive Buffer (Invitrogen)* + 945 mL d'aigua.

Es col·loca el gel a un dels tancs de la cubeta i es renten els pous amb el tampó càtode *Dark blue*. De cada mostra es carreguen al voltant de 30 µg de proteïna (10 µL d'extracte solubilitzat) i s'emplena la cambra davantera amb 200 mL de tampó càtode *Dark blue* i la cambra posterior amb 550 mL de tampó ànode.

L'electroforesi es du a terme a 4°C i s'inicia aplicant un voltatge constant de 80 V fins que el front d'electroforesi supera la part del gel concentrador. Després es puja el voltatge a 120 V i es manté fins que el front d'electroforesi ha avançat dos terços del gel. En aquest punt es substitueix el tampó càtode *Dark blue* per el tampó càtode *Light blue* i es continua l'electroforesi a 150 V fins que el front arriba al final del gel. Pel fet d'utilitzar un gel en gradient, en cas de no incrementar-se el voltatge es va reduint l'amperatge conforme les mostres avancen fins que es produeix una parada de l'electroforesi.

#### **4.7.3. Transferència i immunodetecció**

Els passos a seguir en la transferència, incloent l'activació de la membrana de PVDF, muntatge del sandvitx i el tampó de transferència emprat son els mateixos que els descrits a l'*apartat 4.6.3*. La transferència humida es fa a una intensitat constant de 80 mA, O/N a 4°C utilitzant el *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad)*. Quan es treu el gel de la cubeta d'electroforesi s'incuba 30 minuts en tampó de transferència amb agitació suau, ajudant a que es destenyeixi lleugerament al temps que s'equilibra. En aquest punt al gel ja es poden observar bandes corresponents als complexos proteics.

El bloqueig de la membrana, rentats, incubacions dels anticossos primaris i secundaris i revelat s'efectuen seguint l'*apartat 4.6.4*. En aquest cas, la detecció dels complexos OXPPOS es du a terme a través de la immunodetecció de proteïnes concretes que formen part de cadascun d'ells (*Taula 4.8*). Els anticossos primaris utilitzats i les dilucions respectives s'especifiquen a la *Taula 4.7*.

**Taula 4.8. Subunitats diana per a la detecció dels complexos OXPHOS**

Complex	Subunitat detectada
<b>CI</b>	NDUFA9
<b>CII</b>	SDHA
<b>CIII</b>	Core2 subunit CIII
<b>CIV</b>	COXIV
<b>CV</b>	ATP5A1

Al laboratori no es disposa d'un marcador de pes molecular per western BN-PAGE ni d'un còctel d'anticossos primaris que permetin detectar simultàniament els tots els complexos, per tant es procedeix a la immunodetecció de la següent forma:

1. Es revela el CIII (500 kDa) i després es talla la membrana a aquesta alçada. La incubació de l'anticòs primari en aquest cas es fa durant 3 hores a T/A.
2. Es fa la immunodetecció en paral·lel de CI (1.000 kDa) i CIV (200 kDa).
3. Es detecten CII (130 kDa) i CV (750 kDa).

Per últim, esmentar que la quantificació per densitometria dels complexos CI, CIII, CIV i CV es va corregir en aquest cas per els nivells de CII de cada mostra, tenint en compte que totes les proteïnes que conformen aquest complex estan codificades a l'ADN nuclear i que no vam observar diferències en la quantitat de CII als extractes mitocondrials de fetge i cervell dels diferents grups estudiats.

#### 4.8. Estudis de co-migració en gradients de sacarosa

Aquest experiment es va dur a terme per tal d'estudiar la interacció de la forma mutada d'EFG1 (EFG1<sup>R671C</sup>) amb el mitoribosoma acoblat (55S) i amb les subunitats ribosòmiques petita (28S) i gran (39S) lliures. El protocol detallat a continuació es va adaptar a partir d'altres descrits prèviament<sup>114,222</sup>. Per avaluar si la mutació p.R671C alterava el patró d'interacció d'EFG1 amb el ribosoma mitocondrial es van analitzar extractes mitocondrials de fetge de ratolins *Gfm1*<sup>+/+</sup> i *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> en paral·lel.

##### 4.8.1. Obtenció dels extractes ribosòmics

1. Els extractes mitocondrials de fetge s'obtenen per centrifugació diferencial (*apartat 4.5*). En aquest cas es fa ús de tampó A sense EDTA (Sacarosa 320

mM, Tris-HCl 10 mM [pH 7,4]) suplementat amb “*Complete EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail*” (Roche), en compte de tampó TI + BSA 0,1% (p/v).

2. Es determina la concentració proteica (*apartat 4.4.6*) i s'ajusten les mostres a 2 mg/mL en tampó A.
3. Els precipitats mitocondrials es generen per centrifugació a 9.300 x g durant 10 minuts a 4°C. Tot seguit es resuspenen a la concentració de 10 mg/mL en 200 µL de tampó de lisi (sacarosa 260 mM, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, Tris-HCl 10 mM [pH 7,4], β-mercaptoetanol 5 mM, Tritó X-100 1% (v/v) i *Complete EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche)).
4. S'incuben els lisats mitocondrials durant 20 minuts en gel i es centrifuguen durant 45 minuts a 9.300 x g i 4°C. Els sobrenedants, que contenen les partícules subribosòmiques, es transfereixen a tubs nous i es barregen amb 750 µL addicionals de tampó de lisi.

#### **4.8.2. Preparació dels gradients de sacarosa**

1. Es preparen solucions de sacarosa al 30% (p/v), 23,3% (p/v), 16,7% (p/v) i 10% (p/v) en tampó de lisi sense Tritó X-100. Aquestes conformaran les 4 fases del gradient.
2. El gradient de sacarosa es disposa dintre de *Ultra-Clear tubes 13,2 mL, 14x89 mm* (Beranek Laborgerate). Les fases del gradient es congelen de forma seqüencial per immersió del tub en una mescla d'etanol 70% amb neu carbònica. Es disposen progressivament 2,85 mL de cadascuna de les 4 fases al tub, de major a menor concentració de sacarosa, quedant la fase menys concentrada a la superfície. L'última fase pot acabar de solidificar-se a -20°C al congelador.
3. Un dia abans de fer servir el gradient es deixa a 4°C per descongelar-lo lentament. Així es permet que s'acabi de conformar el gradient de sacarosa en difondre les fases conforme es van descongelant.

#### **4.8.3. Subfraccionament en gradient de sacarosa**

Es guarda una alíquota de 65 µL del sobrenedant que conté les partícules subribosòmiques, (control de càrrega) i la resta, aproximadament 850 µL, es carreguen suaument a sobre del gradient de sacarosa descongelat. Es centrifuguen

les mostres a 71.000 x g durant 24 hores a 4°C, sense forçar acceleració ni frenada. S'utilitza la centrífuga *Ultra-Clear™ ultracentrifuge (Beckman Coulter)* amb el rotor *Sorvall TH-641*.

#### 4.8.4. Recol·lecció de les fraccions i precipitació proteica

1. Es recuperen fraccions de 750 µL des de la part superior del tub (15-16 fraccions). Cal anar amb compte i es recomana utilitzar un peu que subjecti el tub del gradient i puntes de 1 mL tallades (per reduir la tensió superficial).
2. A cada fracció se li afegeix 7,5 µL de desoxicolat de sodi 2% (p/v), s'agiten amb vòrtex ràpidament i s'incuben durant 30 minuts en gel.
3. S'afegeixen 112,5 µL d'àcid tricloroacètic 6,1 M a cada mostra, es fa vòrtex i s'incuben a 4°C, O/N.
4. Es centrifuga 30 minuts a 20.000 x g i 4°C.
5. Els sobrenedants es descarten i els precipitats es renten amb 1 mL d'acetona freda (-20°C). Es centrifuga a 20.000 x g durant 10 minuts a 4°C.
6. Es descarten els sobrenedants i es deixen assecar els precipitats a T/A durant 10 minuts.
7. Es resuspenen els precipitats amb 40 µL de tampó de càrrega 2X d'electroforesi SDS-PAGE, quedant a una concentració proteica aproximada de 2,6 µg/µL. S'ajusta el pH de les mostres afegint 0,5 µL de Tris-HCl 1,5 M [pH 8,8] i es guarden a -80°C.
8. Dels 65 µL de control de càrrega que no s'havien passat pel gradient de sacarosa, 15 µL es barregen amb el mateix volum de tampó de càrrega 2X (quedant a una concentració proteica de 1 µg/ µL). Els 50 µL restants es barregen amb sacarosa 20% (p/v) i es sotmeten a la precipitació proteica en paral·lel amb la resta de fraccions.

#### 4.8.5. Anàlisi de les fraccions del gradient per western blot SDS-PAGE

Per poder avaluar el patró de co-migració d'EFG1 amb el mitoribosoma acoblat (55S) i les seues subunitats (28S i 39S), les fraccions i els controls de càrrega de cada mostra es sotmeten a una electroforesi SDS-PAGE i posterior immunodetecció per western blot (*apartat 4.6*).



En aquest cas s'utilitzen gels 4–15% *Criterion™ TGX™ Precast Midi Protein Gel* (Bio-Rad) amb els sistemes d'electroforesi i transferència indicats. A part d'EFG1, es detecten les proteïnes MRPS9 i MRPS35 que formen part de la subunitat ribosòmica 28S, i MRPL13 que pertany a la subunitat gran (39S). Els anticossos primaris i secundaris utilitzats s'indiquen a la *Taula 4.7*.

## 4.9. Traducció mitocondrial *in organello*

L'assaig per testar la traducció mitocondrial es va adaptar a partir de protocols prèviament descrits<sup>223</sup> basats en síntesi *de novo* de proteïnes marcades amb <sup>35</sup>S. La majoria de vegades es van dur a terme experiments *Pulse* (marcatge radioactiu de les noves proteïnes mitocondrials sintetitzades) per testar la taxa de traducció mitocondrial (o síntesi *de novo* dels polipèptids) en mitocondris de diferents teixits dels models de ratolí (*apartat 4.9.1*). A més, en la caracterització del model de ratolí KI/KO, es va testar l'estabilitat de les proteïnes mitocondrials sintetitzades *de novo* mitjançant experiments *Pulse-Chase* (*apartat 4.9.2*).

### 4.9.1. Experiments *pulse*

1. Es parteix d'extractes mitocondrials frescs de 500 µg de proteïna per mostra (*apartat 4.5*). Aquests es resuspenen amb 250 µL de la barreja de traducció que consta de tampó de traducció (sacarosa 25 mM, sorbitol 75 mM, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, Tris-HCl 10 mM [pH 7,4]), L-glutamat 10 mM, malat 2,5 mM, ADP 1 mM, BSA 1 mg/mL, emetina 100 µg/mL (inhibidor de la traducció citosòlica), L-cisteïna a 60 µg/mL, L-tirosina a 60 µg/mL i els 20 L-aminoàcids canònics restants a 60 µg/mL (Ala, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp i Val).
2. S'incuben les mostres en un forn a 37°C durant 5 minuts amb rotació suau.
3. S'afegeix el volum corresponent de barreja de [<sup>35</sup>S]-metionina i [<sup>35</sup>S]-cisteïna (*Easy Tag™ EXPRESS35S Protein labeling mix 1175 Ci/mmol, 11 mCi/mL, PerkinElmer*) per tal de que quedi amb una marca radioactiva de 0,17 mCi/mg de proteïna mitocondrial. És important calcular la caiguda de la radioactivitat en el temps, tenint en compte que la vida mitjana del S<sup>35</sup> és de 87,2 dies. S'incuben les mostres a 37°C durant 20 minuts amb rotació suau. Aquest pas, conegut com

a fase *pulse*, és on s'incorporen els aminoàcids amb la marca radioactiva a les proteïnes mitocondrials que es tradueixin.

4. Es centrifuga cada mostra durant 1 minut a 13.000 x *g* i 4°C. Es descarta el sobrenedant i renta l'extracte mitocondrial amb tampó A (EDTA 1 mM [pH 8], sacarosa 320 mM i Tris-HCl 10 mM [pH 7,4]). Aquest pas es repeteix dues vegades, per tal d'eliminar per complet la barreja de traducció i els aminoàcids radioactius que no s'hagin incorporat a les noves proteïnes traduïdes.
5. Es centrifuga durant 1 minut a 13.000 x *g* i 4°C. Es descarten els sobrenedants i les mostres es resuspenen en 50 µL de tampó de càrrega 2X SDS-PAGE (quedant a una concentració proteica de 10 µg/µL).
6. Tot seguit les mostres poden congelar-se a -20°C durant un màxim de dues setmanes o es pot continuar amb l'electroforesi SDS-PAGE.

#### 4.9.2. Experiments *pulse-chase*

Es duen a terme experiments de tipus *pulse-chase* amb l'objectiu d'estudiar la vida mitjana de les proteïnes sintetitzades durant l'assaig de traducció mitocondrial *in organello*. Aquesta aproximació incorpora petites modificacions sobre la fase *pulse* i passos addicionals sobre el protocol de traducció mitocondrial per tal d'efectuar les fases *chase*:

1. Es parteix d'extractes frescs de 2 mg de proteïna mitocondrial per cada mostra i es sotmeten als passos 1, 2 i 3 de l'*apartat 4.9.1*. Es resuspenen a 2 mg/mL amb la barreja de traducció, s'incuben durant 5 minuts a 37°C i es du a terme la fase *pulse* afegint la quantitat necessària de [<sup>35</sup>S]-metionina i [<sup>35</sup>S]-cisteïna per que quedi amb una marca radioactiva de 0,17 mCi/mg proteïna mitocondrial, i incubant 20 minuts a 37°C.
2. Tot seguit, es centrifuga a 13.000 x *g* i 4°C i es fa un rentat dels mitocondris amb 1 mL de tampó A. A continuació, es divideix cada mostra en cinc alíquotes de 200 µL, es centrifuguen a 13.000 x *g* i 4°C i s'elimina el sobrenedant, de manera que s'obtenen cinc precipitats de 400 µg de proteïna mitocondrial cadascun.
3. Una d'aquestes alíquotes (alíquota *pulse*) es resuspèn amb el tampó de càrrega SDS-PAGE a 10 µg/µL i es deixa a temperatura ambient almenys 30 minuts abans de congelar-la a -20°C.

4. Les quatre alíquotes restants de cada mostra es sotmeten a la fase *chase*. Cada extracte mitocondrial es resuspèn en 200 µL de tampó de traducció (sense [<sup>35</sup>S]-metionina i [<sup>35</sup>S]-cisteïna) i s'incuba a 37°C amb rotació suau durant 1, 3, 5 o 20 hores (fases *chase*).
5. Cada alíquota referent a les fases *chase* es centrifuga a 13.000 x g i 4°C, es renta amb tampó A i després de ser resuspesa amb tampó de càrrega SDS-PAGE a 10 µg/µL i deixar-se temperar es guarda a -20°C.

#### 4.9.3. SDS-PAGE, tinció del gel, exposició i revelat dels films

1. Els extractes proteics de les traduccions mitocondrials es separen per SDS-PAGE mitjançant el sistema *PROTEAN® II xi cell (Bio-Rad)*, utilitzant un gel amb la composició detallada a la *Taula 4.9*. De cada mostra es carreguen 100 µg de proteïna mitocondrial i en l'últim carril lliure es carreguen 15 µL del marcador de pes molecular *Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (Bio-Rad)*. La separació de les proteïnes té lloc en tampó d'electroforesi (Glicina 192 mM, SDS 0,1% (p/v) i Tris 25 mM) amb voltatge constant de 100 V durant 16 hores o fins que el front de banda arriba al final del gel.
2. S'incuba el gel durant 15 minuts amb solució de fixació (metanol 45% (v/v), àcid acètic 10% (v/v)).
3. Es tenyeix durant 45 minuts amb solució Comassie (metanol 45% (v/v), àcid acètic 10% (v/v) i 0,1% Comassie (p/v)).
4. Es destenyeix amb solució de fixació durant 30 minuts.
5. S'incuba amb solució amplificadora *NAMP100 (GE Healthcare)* durant 30 minuts.
6. Es munta el gel sobre un paper Whatman, es recobreix amb plàstic film i s'asseca durant 4 hores amb el *Gel Dryer Model 583 (Bio-Rad)* amb el buit activat.
7. El gel assecat s'exposa durant 5-7 dies a un film d'autoradiografia *LucentBlue X-ray film (Advantia)* a dintre d'un casset a -80°C.
8. Finalment, es du a terme el revelat del film amb la processadora automàtica *Curix60 (Agfa-Gevaert)* que utilitza les solucions de revelat, fixació i aigua pertinents.

Taula 4.9. Composició del gel d'electroforesi per la traducció mitocondrial

Reactiu	Gel separador (17%)	Gel concentrador (5%)
Aigua	10,6 mL	7,2 mL
Acrilamida 40% (p/v) – Mix 29:1 ( <i>PanReac AppliChem</i> )	11,2 mL	1,3 mL
Tris-HCl 1,5 M [pH 8,8]	7,5 mL	-
Tris-HCl 1,5 M [pH 6,8]	-	1,25 mL
SDS 10% (p/v)	300 µL	100 µL
APS 10% (v/v)	300 µL	100 µL
TEMED	12 µL	10 µL

#### 4.9.4. Quantificació del marcatge radioactiu i anàlisi

Es digitalitzen tant el film revelat com el gel tenyit i assecat. A continuació es du a terme la quantificació per densitometria de les bandes resultants a l'autoradiografia de cada mostra. Sobre el gel tenyit, es quantifica per densitometria els nivells de proteïna total carregada al gel i aquest valor s'utilitza per corregir el senyal radioactiu de cada mostra. Les densitometries tant dels films com del gel es fan amb el programa *ImageJ* (*National institutes of Health*). A les fases *pulse*, el senyal del conjunt de les bandes permet valorar la taxa de traducció mitocondrial (indicada també com a traducció *de novo*) i, comparant diferents extractes mitocondrials, detectar els casos en què aquesta es presenta reduïda.

La vida mitjana de cada polipèptid codificat a l'ADNmt es calcula com a  $\ln(2) / K$  utilitzant l'anàlisi de regressió no lineal de decaïment d'una fase amb la fórmula:

$$Y = Y_0 \cdot e^{-K \cdot t}$$

On  $Y$  és la quantitat residual d'una proteïna a un temps  $t$  determinat (fase *chase*) expressada com el percentatge d'aquesta banda a temps zero,  $Y_0$  és la quantitat de proteïna inicial (igual a 100%, a la fase *pulse*) i  $K$  és una constant que determina la velocitat de decaïment del polipèptid.

## 4.10. Anàlisi de número de còpies d'ADN per qPCR

L'anàlisi del número de còpies d'ADNmt i la quantificació del grau de transducció dels rAAV es va dur a terme per PCR a temps real (qPCR) utilitzant plaques de 384 pous i l'aparell *LightCycler® 480 System* (Roche Diagnostics).

### 4.10.1. Número de còpies d'ADNmt

Per analitzar si els teixits presenten depleció o augment de molècules de genoma mitocondrial es quantifica el número de còpies d'ADNmt sobre l'extracte d'ADN total. L'ADN total de partida s'obté mitjançant un kit comercial (*apartat 4.4.1.3*). Concretament, es determina el número de còpies del gen mitocondrial *mt-Rnr2* (16S rRNA) utilitzant la sonda *Taqman™ MGB* (Applied Biosystems) dissenyada per encàrrec i el joc d'encebadors especificats a la *Taula 4.10*<sup>124</sup>.

**Taula 4.10. Sonda *TaqMan* MGB i encebadors per al gen mitocondrial 16S**

Gen	Descripció	Seqüència (5' – 3')
16S	Sonda MGB 16S (FAM)	AAG TCC TAC GTG ATC TGA GGT
	Encebador directe 16S	AAT GGT TCG TTT GTT CAA CGA TT
	Encebador revers 16S	AGA AAC CGA CCT GGA TTG CTC

Com a referència es determina el número de còpies d'*Ang1* (angiogenina 1), gen nuclear de còpia única, utilitzant la sonda predissenyada *Mm00833184\_s1* (*Taqman™ MGB*, Applied Biosystems) amb el fluoròfor FAM. Les dues sondes presenten el mateix fluoròfor, per tant les reaccions es fan per separat en paral·lel (*singleplex*).

Es prepara una corba estàndard a partir de dues solucions amb número de còpies conegut de plasmidis que tenen clonades les regions dels gens 16S o *Ang1*. Els punts estàndards de la recta es realitzen mitjançant dilucions seriades amb Tris-HCl 10mM [pH 8]. Els rangs de les rectes són 45.555-3.690.000 còpies/μL en el cas del 16S i 250-108.000 còpies/μL per a *Ang1*.

Les mescles de reacció per a les sondes 16S i *Ang1* es detallen a la *Taula 4.11* i *Taula 4.12* respectivament.

Taula 4.11. Composició de la reacció d'amplificació per qPCR del 16S

Reactiu	Volum (µl)	Concentració final
<b>2X TaqMan Universal PCR Master Mix with UNG<sup>1</sup></b>	5	1X
<b>Sonda Taqman 16S (5 µM)</b>	0,3	150 nM
<b>Encebador directe 16S (10 µM)</b>	0,3	300 nM
<b>Encebador revers 16S (10 µM)</b>	0,3	300 nM
<b>Aigua</b>	1,6	-
<b>Mostra d'ADN (50 ng/µL o 12,5 ng/µL segons dilució)</b>	2,5	12,5 – 2,5 ng/µL

<sup>1</sup>Referència: 4440045, ThermoFisher

Taula 4.12. Composició de la reacció d'amplificació per qPCR de l'Ang1

Reactiu	Volum (µl)	Concentració final
<b>2X TaqMan<sup>R</sup> Universal PCR Master Mix with UNG<sup>1</sup></b>	5	1X
<b>Sonda Taqman 20X</b>	0,5	1X
<b>Aigua</b>	1,5	-
<b>Mostra d'ADN (100 ng/µL o 20 ng/µL segons dilució)</b>	2,5	25 – 5 ng/µl

<sup>1</sup>Referència: 4440045, ThermoFisher

Cada punt de la recta estàndard es quantifica per triplicat, i de cada mostra es fan dues dilucions diferents (100 ng/µL i 20 ng/µL; dilucions en Tris-HCl 10 mM [pH 8]) que es quantifiquen per duplicat. L'amplificació te lloc amb les condicions de la *Taula 4.13*.

Taula 4.13. Condicions de l'amplificació per qPCR

Temperatura	Temps	Cicles
50°C	2 minuts	1
95 °C	10 segons	
95°C	15 segons	40
60°C	1 minut	

El *LightCycler 480<sup>®</sup> Software 1.5.1.62 (Roche Diagnostics)* utilitzat per l'anàlisi permet determinar el número de còpies interpolant a la recta estàndard el valor de *Ct* (punt on la fluorescència supera el llindar) obtingut per a cada mostra. Quan es vol expressar el número de còpies d'ADNmt per cèl·lula s'aplica el següent càlcul:

$$\frac{\text{Còpies gen d'interés}}{\text{Còpies gen de referència}} \cdot 2$$

El gen de referència (*Ang1*) és diploide i de còpia única, és per això que el resultat de la divisió (quantitat d'ADNmt per quantitat d'ADNn) es multiplica per 2.

#### 4.10.2. Número de còpies de vector adenoassociat

Per a testar el grau de transducció de ssAAV9-hAAT-GFM1 en fetge i cervell dels ratolins KI/KO AAV, s'utilitza com a material de partida l'ADN total d'aquests teixits extret pel mètode fenol-cloroform (*apartat 4.4.1.1*). Per detectar el número de còpies del rAAV s'utilitza la seqüència humana de *GFM1* com a diana de la sonda predissenyada *Hs00227997\_m1* (*Taqman<sup>TM</sup> MGB-FAM, Applied Biosystems*), i com a gen nuclear de referència el gen murí *Ang1* que es detecta utilitzant la sonda descrita prèviament (*apartat 4.10.1*).

Com que totes dues sondes tenen el mateix fluoròfor (FAM), la quantificació es realitza en singleplex. Igual que a l'apartat anterior, es prepara per a cada reacció una recta patró amb número de còpies conegudes de plasmidis que contenen les seqüències *GFM1* i *Ang1* clonades. Les dilucions seriades es realitzen amb Tris-HCl 10mM [pH 8]. La composició de la mescla de reacció per a les dues sondes és la detallada a la *Taula 4.12*.

Les dilucions i rèpliques de les rectes estàndards i mostres, el programa d'amplificació (*Taula 4.13*) i l'anàlisi aplicada per quantificar el número de còpies de ssAAV-hAAT-GFM1 coincideixen amb el que s'ha descrit a l'*apartat 4.10.1*.

#### 4.11. Estudis d'expressió gènica

L'expressió gènica a nivell d'ARN es va determinar mitjançant RT-qPCR utilitzant l'ARN total extret a partir de teixits de ratolí (*apartat 4.4.2*). Breument, es quantifica la concentració total d'ARN (*apartat 4.4.3*) de cada mostra, s'ajusta a una concentració de 200 ng/μL utilitzant aigua lliure de RNases i es continua amb el tractament amb DNasa i transcripció reversa previs a la RT-qPCR.

#### 4.11.1. Tractament amb DNasa

Amb l'objectiu d'eliminar contaminacions amb fragments d'ADN, que podrien competir amb les molècules d'ARN donant lloc a resultats erronis, es du a terme un tractament de les mostres amb DNasa I. S'utilitza el kit comercial *DNA-free™ Kit Procedure* (Invitrogen, Thermo Scientific) per preparar la mescla de reacció (Taula 4.14).

Taula 4.14. Composició de la mescla de reacció per al tractament amb DNasa

Reactiu	Volum (µl)	Concentració final
<b>DNase I buffer 10X<sup>1</sup></b>	5	1X
<b>rDNase I (2 U/µL)</b>	1	0,04 U/µL
<b>Mostra d'ARN</b>	Fins a 10 µg d'ARN	-
<b>Aigua lliure d'ARNases</b>	Fins a 50 µL	-

<sup>1</sup>100 mM Tris-HCl [pH 7,5]; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM CaCl<sub>2</sub>

Un cop feta la barreja es segueixen els següents passos:

1. S'incuba la mescla 30 minuts a 37°C.
2. S'afegeixen 5 µL de *DNase Inactivation Reagent*, es barreja i s'incuba la mescla 2 minuts a TA.
3. Es centrifuga a 10.000 x g durant 1,5 minuts, es recupera el sobrenedant (que conté l'ARN) i es transfereix a un tub nou.

#### 4.11.2. Transcripció inversa

L'ARN tractat amb DNasa I es sotmet a una transcripció inversa o retrotranscripció per tal d'obtenir l'ADNc (ADN complementari). S'utilitza el kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) per preparar la mescla de reacció (Taula 4.15).

La reacció té lloc incubant les mostres en un termociclador 10 minuts a 25°C, 2 hores a 37°C i finalment 5 minuts a 85°C. En aquest punt l'ADNc obtingut es pot guardar a -20°C fins al seu ús a la RT-qPCR.



**Taula 4.15. Composició de la mescla de reacció per a la transcripció inversa**

Reactiu	Volum (µL)	Concentració final
<b>RT Buffer 10X</b>	2	1X
<b>MultiScribe™ Reverse Transcriptase (2U/µL)</b>	1	0,2 U/µL
<b>Mix de dNTPs (100 mM)</b>	0,8	8 mM
<b>RT Random Primers</b>	2	
<b>ARN tractat amb DNasa</b>	10	Fins a 2 µg d'ARN
<b>Aigua lliure d'ARNases</b>	4,2	-

### 4.11.3. RT-qPCR per l'anàlisi dels nivells d'ARN de gens diana

#### 4.11.3.1. Gens codificats a l'ADNn

La RT-qPCR es du a terme amb l'aparell *ABI PRISM 7900HT Fast Real-time PCR System* (Applied Biosystems). L'ADNc obtingut s'utilitza per determinar la quantitat relativa de la transcripció de gens d'interès respecte la transcripció d'un gen que serveix com a control endogen. Aquest control és el gen de ratolí *Ppia*, que codifica la ciclofilina A.

Per testar l'expressió de gens codificats a l'ADNn es fan servir sondes *Taqman™ MGB* (Applied Biosystems) predissenyades que s'especifiquen a la *Taula 4.16*. La mescla de reacció (*Taula 4.12*) i condicions de reacció (*Taula 4.13*) coincideixen amb les detallades a l'*apartat 4.10.1*.

**Taula 4.16. Sondes *TaqMan* utilitzades en estudis d'expressió gènica**

Gen	Referència sonda	Fluoròfor
<b><i>Gfm1</i></b>	Mm00506856_m1	FAM
<b><i>Gfm2</i></b>	Mm00623824_m1	FAM
<b><i>Tufm</i></b>	Mm03012892_g1	FAM
<b><i>Tsfm</i></b>	Mm00508436_m1	FAM
<b><i>Ppia</i></b>	Mm02342430_g1	FAM

On *Ppia* és el gen utilitzat com a control endogen.

S'analitzen per triplicat dues dilucions de cada mostra per cadascuna de les sondes. A més s'inclouen dos controls negatius: (a) un control del tractament amb DNasa, que consisteix en una mostra no retrotranscrita i (b) un control per detectar contaminacions que sols conté l'aigua lliure de RNases amb què s'han fet les dilucions.

Els resultats s'analitzen amb el programa *RQ Manager 3.4*. i els resultats es quantifiquen de forma relativa a una mostra calibradora mitjançant la fórmula:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Tenint en compte que:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ mostra} - \Delta Ct \text{ calibrador}$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen d'interés} - Ct \text{ gen control endogen}$$

#### 4.11.3.2. Gens codificats a l'ADNm

Per la quantificació i anàlisi dels nivells d'ARN de gens mitocondrials es fan servir encebadors i sondes *TaqMan™ MGB* dissenyades per encàrrec que permeten la detecció de l'ARNr de *mt-Rnr2* (16S rRNA) i l'ARNm de *mt-Nd4* (ND4) (*Taula 4.17*).

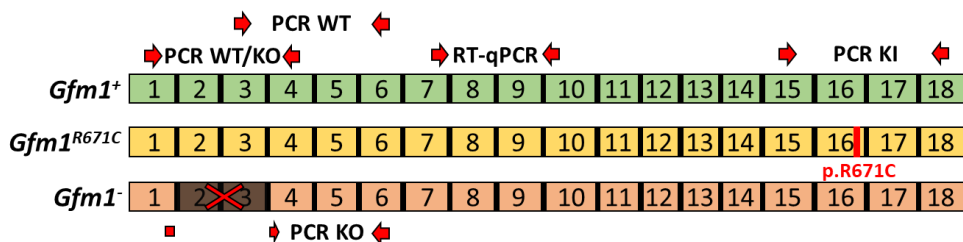
**Taula 4.17. Sondes *TaqMan MGB* i encebadors per als gens mitocondrials 16S i ND4**

Gen	Descripció	Seqüència (5' – 3')
<b>16S</b>	Sonda MGB 16S (FAM)	AAG TCC TAC GTG ATC TGA GGT
	Encebador directe 16S	AAT GGT TCG TTT GTT CAA CGA TT
	Encebador revers 16S	AGA AAC CGA CCT GGA TTG CTC
<b>ND4</b>	Sonda MGB ND4 (FAM)	CCG ACA TCA TTA CCG GGT TTT CCT CTT G
	Encebador directe ND4	TGC ATC AAT CAT AAT CCA AAC TCC ATG A
	Encebador revers ND4	GGC AGA ATA GGA GTG ATG ATG TGA

L'ARNm del gen *Ppia* (sonda Mm02342430\_g1) s'utilitza com a control endogen per normalitzar els valors d'expressió obtinguts per a cada gen. La mescla de reacció és la detallada a la *Taula 4.11*, mentre que l'aparell utilitzat i l'anàlisi de l'expressió relativa son els mateixos que els descrits anteriorment (*apartat 4.11.3.1*).

#### 4.11.4. Anàlisi de l'ARNm *Gfm1 knock-out* amb gels d'agarosa

La deleció dels exons 2-3 a l'al·lel *Gfm1*<sup>-</sup> dona lloc a un codó de parada prematur i fa que el seu transcrit sigui susceptible de degradació per *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD). Per comprovar la presència de l'ARNm *Gfm1*<sup>-</sup> i distingir-lo de les variants *Gfm1*<sup>+</sup> i *Gfm1*<sup>R671C</sup> es van realitzar 3 PCRs convencionals (*Taula 4.18* i *Figura 4.7*) dutes a terme sobre ADNc de fetge i cervell de ratolins *Gfm1*<sup>+/+</sup> i *Gfm1*<sup>R671C/-</sup>.



**Figura 4.7. PCRs per analitzar l'ARNm de l'al·lel *Gfm1* en fetge i cervell.** Esquema de l'ADNc dels tres al·lels *Gfm1* (WT, KI i KO), indicant el número d'exons, la mutació p.R671C en *Gfm1*<sup>R671C</sup> i els exons eliminats en *Gfm1*<sup>-</sup>. Les fletxes en vermell representen la localització dels encebadors directe i revers per a les PCRs dirigides a detectar l'ARNm *Gfm1*<sup>-</sup> i distingir-lo de les altres variants (PCR WT, PCR WT/KO i PCR KO), la PCR per quantificar el percentatge de transcrit *Gfm1*<sup>-</sup> (PCR KI) i la PCR quantitativa a temps real (RT-qPCR).

- PCR WT: L'encebador directe es situa a l'exó 3 i el revers a l'exó 6. Permet detectar l'ADNc *Gfm1*<sup>+</sup> i *Gfm1*<sup>R671C</sup> (473 pb), però no distingir entre ells.
- PCR KO: L'encebador directe es situa a la unió entre els exons 1 i 4, i l'encebador revers es situa a l'exó 6. Permet amplificar l'ADNc *Gfm1*<sup>-</sup> (370 pb).
- PCR WT/KO: L'encebador directe es situa a l'exó 1 i l'encebador revers uneix a l'exó 4. Permet amplificar i distingir per mida l'ADNc *Gfm1*<sup>-</sup> (249 pb) del *Gfm1*<sup>+</sup> i *Gfm1*<sup>R671C</sup> (535 pb).

**Taula 4.18. Encebadors per analitzar l'ARNm provinent de l'al·lel *Gfm1*<sup>-</sup>**

PCR	Descripció	Seqüència (5' – 3')
<b>WT</b>	Encebador directe	GTT GGC GCT GTC ATG GAT TC
	Encebador revers	AAT CCA GCC GGA ATC TCG TC
<b>KO</b>	Encebador directe	CAG GGG AAG CAG GCC AC
	Encebador revers	AAT CCA GCC GGA ATC TCG TC
<b>WT/KO</b>	Encebador directe	CTG AGC ACA ACC GAT CAC CT
	Encebador revers	ACT GTC ATG GTC TGG CAC TG
<b>KI</b>	Encebador directe	AGC TTT CTG GGC TAC GGT TT
	Encebador revers	GTG TGC CCA GAA TCC TAC CTC

Per determinar els percentatges d'ARNm *Gfm1*<sup>R671C</sup> i *Gfm1*<sup>-</sup> a les mostres d'ADNc de fetge i cervell de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> es va dur a terme una darrera PCR (PCR KI/KO, Taula 4.18). Aquesta amplifica l'exó 16 de *Gfm1* situant l'encebador directe a l'exó 15 i el revers a l'exó 18 (Figura 4.4). El producte de PCR es digereix amb l'enzim *NcoI* (apartat 4.3.2.1), es corre en un gel d'electroforesi i s'identifiquen dues bandes

corresponents a l'ADNc *Gfm1*<sup>R671C</sup> (215 pb i 621 pb) i una banda de l'ADNc *Gfm1*- (837 pb). Les bandes resultants es densitometren amb l'*Image Studio Lite* i aquesta quantificació es corregeix pel tamany dels fragments (pb). Es comparen les quantificacions de les espècies *knock-out* (836 pb) i *knock-in* (621 pb) de *Gfm1*.

## 4.12. Determinacions bioquímiques

### 4.12.1. Activitats enzimàtiques dels complexos de la CTE

Per tal d'avaluar l'afectació de la cadena respiratòria mitocondrial es van analitzar les activitats enzimàtiques dels complexos I, II, III, i IV de la CTE i la resultant la de la combinació dels complexos II+III. A més, també es va quantificar l'activitat citrat sintasa, enzim del cicle de Krebs, com a marcador de massa mitocondrial.

Aquestes activitats es van determinar per espectrofotometria UV-visible basant-se en els mètodes prèviament descrits<sup>224,225</sup>, mitjançant l'espectrofotòmetre *UV-2401PC UV-VIS* (*Shimadzu*).

#### 4.12.1.1. Preparació d'homogenats proteics en tampó manitol

Les mostres utilitzades consisteixen en homogenats de teixit total en tampó manitol (mannitol 225 mM, sacarosa 75 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, [pH 7,2]). Breument, s'afegeixen 200 µL de tampó manitol temperat a 4°C sobre 20-50 mg de teixit prèviament polvoritzat en nitrogen líquid i aliquotat en tubs de 1,5 mL. S'homogeneïtza durant 10 segons ajudant-se de l'aparell *pellet pestles cordless motor* (*Sigma-Aldrich*) i es centrifuga durant 20 minuts a 650 x g a 4°C. Es transfereix el sobrenedant en un nou tub, es determina la concentració proteica (*apartat 4.4.6*), s'ajusta a una concentració de 2 mg/mL amb tampó manitol, es fan alíquotes i es preserven a -80°C fins al seu ús.

#### 4.12.1.2. Determinació de les activitats enzimàtiques

Les activitats enzimàtiques es determinen per espectrofotometria tal i com es detalla a continuació:

**Complex I (CI) o NADH deshidrogenasa.** El CI transfereix electrons del NADH a la ubiquinona (coenzim  $Q_{10}$ ) i la seua activitat es determina monitoritzant la disminució de l'absorbància del NADH a 340 nm. En aquest cas es substitueix la ubiquinona (molt hidrofòbica) per decilubiquinona (DB) (més hidrofílica). Per dur a terme la reacció, 20  $\mu$ L d'homogenat de teixit a 0,67 mg/mL de concentració proteica es barregen amb 945  $\mu$ L de la solució de reacció (DB 108  $\mu$ M, fosfat potàssic 54 mM [pH 7.5], BSA a 4,05 mg/mL) i 5  $\mu$ L d'etanol:DMSO (1:1) i s'incuba a 37°C durant 5 minuts. El blanc de reacció es du a terme paral·lelament fent servir les mateixes condicions però afegint 5  $\mu$ L de rotenona 2,5 mM (inhibidor del CI) en compte d'etanol:DMSO. D'aquesta forma es determina l'oxidació inespecífica del NADH, per restar-la posteriorment. La reacció s'inicia amb l'adició de 50  $\mu$ L de NADH 2 mM a 37°C, durant 3 minuts la DB es redueix a decilubiquinol ( $DBH_2$ ) i es monitoritza l'oxidació del NADH a 340 nm.

**Complex II (CII) o succinat deshidrogenasa.** El CII transfereix electrons del succinat a la ubiquinona. A la reacció *in vitro* s'utilitza DB per substituir la ubiquinona i el 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) per monitoritzar la transferència d'electrons. El succinat transfereix electrons a través del CII a la DB, formant-se  $DBH_2$ , i aquest els transfereix al DCPIP oxidat. Addicionalment, s'afegeix KCN per inhibir el CIV, frenar la transferència d'electrons i evitar que el DCPIP reduït torni a oxidar-se. La reducció del DCPIP es detecta com una disminució de l'absorbància a 600 nm i permet quantificar l'activitat del CII. A la pràctica, 20  $\mu$ L d'homogenat proteic a 0,67 mg/mL es barregen en 976  $\mu$ L de la solució de reacció (DCPIP 51 mM, fosfat potàssic 25,61 mM [pH 7,5], KCN 1,025 mM, succinat 20,49 mM, BSA a 2,049 mg/mL) i s'incuben a 37°C durant 5 minuts. L'absorbància es registra a 600 nm abans de l'inici de la reacció, per tal d'extreure la reducció inespecífica del DCPIP. La reacció s'inicia addicionant 4  $\mu$ L de DB (25 mM) i la reducció del DCPIP es monitoritza durant 3 minuts a 37°C.

**Complex III (CIII) o coenzim Q/citocrom c-reductasa.** El CIII transfereix els electrons del DBH<sub>2</sub> al citocrom c a la CTE. Per conèixer l'activitat del CIII, la reducció del citocrom c es determina *in vitro* mesurant l'increment d'absorbància a 550 nm. S'utilitza azida sòdica (NaAz) per inhibir el CIV i evitar el pas d'electrons entre el citocrom c i l'O<sub>2</sub>. 880 µL de la solució de reacció (fosfat potàssic 64,1 mM [pH 7,8], EDTA 1,282 mM, NaAz 3,85 mM, DBH<sub>2</sub> 384 µM, citocrom c 0,5 mM, Tween 0,051% (v/v)) s'incuben a 37°C amb 4 µL d'etanol 95%. La reacció s'inicia afegint 120 µL d'homogenat proteic (0,33 mg/mL) i es monitoritza a 550 nm durant 3 minuts 37°C. Per restar l'activitat inespecífica a la total, s'efectua la mateixa reacció però afegint 4 µL d'antimicina 20 mM (inhibidor del CIII) en lloc d'etanol 95%.

**Complex II+III.** L'activitat combinada dels complexos II i III transfereix els electrons del succinat al citocrom c. Aquesta activitat es determina seguint l'increment de l'absorbància del citocrom c reduït a 500 nm. L'oxidació del citocrom c és inhibida pel KCN. Es barregen 20 µL d'homogenat proteic (0,67 mg/mL) amb 880 µL de solució de reacció (fosfat potàssic 22,73 mM [pH 7,5], BSA 2,27 mg/mL, succinat 22,73 mM, KCN 1,14 mM). En paral·lel es prepara una reacció en què no s'afegeix homogenat proteic (tan sols tampó mannitol), per tal de quantificar el pendent residual generat pels reactius i restar-lo al de la reacció. S'incuben a 37°C durant 5 minuts i s'inicia la reacció afegint 100 µL de citocrom c 1 mM. La reducció del citocrom c es monitoritza a 550 nm durant 3 minuts 37°C.

**Complex IV (CIV) o citocrom c oxidasa.** El CIV transfereix electrons del citocrom c reduït a l'O<sub>2</sub>. Mesurant la disminució de l'absorbància a 500 nm es monitoritza l'oxidació del citocrom c reduït i determina l'activitat del CIV. Es prepara la solució de reacció (fosfat potàssic 50 mM [pH 7,5], citocrom c reduït 100 µM). La reducció (al 90-95%) del citocrom c (*Sigma C-7752; Fw 12384*) te lloc de forma manual per titulació (afegint ditionit sòdic) respecte d'una solució 100% oxidada amb ferricianur potàssic. 980 µL de la solució de reacció s'incuben a 37°C durant 5 minuts. La reacció s'activa afegint 20 µL d'homogenat proteic (0,67 mg/mL) i l'oxidació del citocrom c es monitoritza a 550 nm durant 3 minuts.

**Citrat sintasa (CS).** Es tracta d'un enzim del cicle de Krebs que catalitza la formació de citrat i coenzim A (CoA-SH) a partir d'oxalacetat (OAA) i acetil-CoA. Aquesta activitat s'utilitza com a marcador de la massa mitocondrial i permet corregir i normalitzar l'activitat absoluta dels complexos de la cadena respiratòria. Per a cada mostra, 20 µL d'homogenat proteic (0,67 mg/mL) es barregen amb 930 µL de la solució de reacció (DTNB (àcid 5,5'dithio-bis-(2-nitrobenzoic)) 100 µM, Tris-HCl 100 mM [pH 8,1], Acetil CoA 300 µM, Tritó X-100 0,1% (p/v)) i s'incuben a 37°C durant 5 minuts. Es registra l'absorbància a 412 nm durant els 4 minuts previs a l'inici de la reacció, per tal d'extreure aquesta activitat a l'activitat total. S'afegeixen 50 µL d'OAA (10 mM) per iniciar la reacció i es monitoritza la reducció del DTNB a àcid 2-nitro-5-benzoic (TNB) durant 4 minuts a 412 nm i 37°C.

#### 4.12.1.3. Càlcul de les activitats enzimàtiques específiques

Per tal de calcular cadascuna de les activitats enzimàtiques, s'aplica la següent fórmula prenent les absorbàncies de cada reacció tal i com s'han detallat prèviament:

$$\text{Activitat} \left( \frac{\text{nmols}}{\text{min} \cdot \text{mg prot}} \right) = \Delta \text{Abs específica} (\text{min}^{-1}) \cdot$$

$$\cdot \left( \frac{\text{volum reacció} (\mu\text{L}) \cdot 10^3}{\epsilon (\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot l \text{ cubeta} (\text{cm}) \cdot [\text{proteïna}] \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \cdot \text{volum mostra} (\mu\text{L})} \right)$$

On  $\Delta \text{Abs específica} = \Delta \text{Abs total} - \Delta \text{Abs inespecífica}$  i  $\epsilon$  fa referència als coeficients d'extinció molar següents:

- Activitat CI:  $\epsilon_{\text{NADH}} = 6.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Activitat CII:  $\epsilon_{\text{DCPIP}} = 19.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Activitat CIII, CII+III i CIV :  $\epsilon_{\text{cytc}} = 18.5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Activitat CS:  $\epsilon_{\text{DTNB}} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

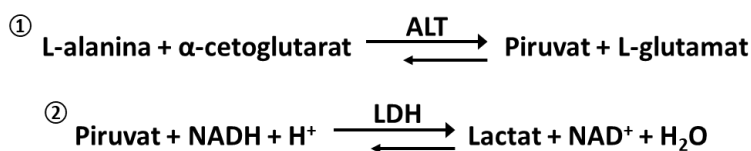
D'altra banda, el **volum reacció** sempre és de 1000 µL, **volum mostra** és de 20 µL per a totes les reaccions excepte per al CIII que és de 120 µL, **l cubeta** fa referència a la longitud de la cubeta (igual a 1 cm per a totes les reaccions) i **[proteïna]** és la concentració proteica dels homogenats.

## 4.12.2. Determinació de marcadors bioquímics en plasma

Les mostres de plasma obtingudes (*apartat 4.3.5.1*) es van destinar a l'anàlisi dels marcadors bioquímics detallats als següents subapartats.

### 4.12.2.1. Activitat alanina aminotransferasa

L'enzim ALT es troba principalment en cèl·lules hepàtiques, ajudant a metabolitzar proteïnes per generar energia, de forma que un increment dels seus nivells en plasma pot ser indicatiu de lesió hepàtica per citòlisi. L'activitat d'aquest enzim es va monitoritzar en la caracterització del model de ratolí *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* segons el mètode descrit a continuació que es basa en les reaccions il·lustrades a la *Figura 4.8*. Es determina el consum de NADH per la disminució de l'absorbància a 340nm ( $\lambda_{\text{abs}} \text{NADH}$ ) amb l'espectrofotòmetre *UV-2401PC UV-VIS (Shimadzu)*.



**Figura 4.8. Reaccions enzimàtiques per la determinació de l'activitat ALT.** Segons l'estequiometria de la reacció, la LDH converteix cada mol de piruvat en lactat, consumint un mol de NADH. Com que la LDH s'hi addiciona en excés a la reacció, el consum de NADH està limitat per la quantitat de piruvat, que és generat per l'ALT partint de L-alanina i  $\alpha$ -cetoglutarat. ALT: alanina aminotransferasa; LDH: lactat deshidrogenasa.

En primer lloc es prepara la mescla de reacció (*Taula 4.19*). Posteriorment, es realitza un blanc de reacció on es quantifica el consum inespecífic de NADH. Per fer això, s'afegeixen 50  $\mu\text{L}$  de plasma de ratolí a 720  $\mu\text{L}$  de la mescla de reacció.

**Taula 4.19. Composició de la mescla de reacció per la determinació de l'activitat ALT**

Reactiu	Volum ( $\mu\text{L}$ )	Concentració final
L-alanina (0,4 M)	80	44,4 mM
NADH (2 mM)	80	0,22 mM
Tris-HCl 1M [pH 7,5]	80	0,1 M
LDH 11,6 U/ $\mu\text{L}$ diluïda 1:10 en Tris-HCl 1M [pH 7,5]	3	4,8 U/mL
Aigua	477	



S'incuba la mescla de la reacció durant 10 minuts a 37°C i es monitoritza l'absorbància a 340 nm durant 10 minuts a 37°C. La reacció s'inicia afegint 80 µL de α-cetoglutarat, després es barreja per inversió i es llegeix de nou l'absorbància a 340 nm durant 10 minuts a 37°C. Finalment, es calcula l'activitat ALT, expressada en µmols de substrat transformat per minut, per litre de mostra (µmols·min<sup>-1</sup>·L<sup>-1</sup>; UI/L) a partir dels pendents de les rectes obtingudes, fent servir la llei de Lambert-Beer:

$$\text{Activitat ALT } \left( \frac{UI}{L} \right) = (A \cdot V_f \cdot 1000) / (\epsilon_{NADH} \cdot l \cdot V)$$

On **A** equival a la diferència dels pendents de les rectes obtingudes en funció del temps ( $\Delta Abs/min$ ), **V<sub>f</sub>** fa referència al volum final de la reacció (mL),  $\epsilon_{NADH}$  és el coeficient d'extinció molar del NADH ( $6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ); **l** és la longitud de la cubeta (cm) i **V** es correspon al el volum de mostra (mL).

#### 4.12.2.2. Altres marcadors bioquímics

En la caracterització del model *Gfm1<sup>R671C</sup>* els marcadors bioquímics en plasma es van analitzar amb la col·laboració del servei de bioquímica als Laboratoris Clínics Vall d'Hebron utilitzant l'aparell *AU5800 Series Clinical Chemistry Analyzers* (Beckman Coulter). A part de l'activitat ALT, es van determinar l'activitat AST (aspartat aminotransferasa), i les concentracions de triglicèrids (TGs), lactat (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>), amoni (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) i fosfatasa alcalina. Per fer això, el plasma fresc extret es va diluir 3 vegades en PBS i es va congelar a -80°C fins la seua anàlisi.

### 4.13. Anàlisi histoquímica de fetge

Per tal d'avaluar possibles alteracions morfològiques i/o bioquímiques al fetge dels models de ratolí generats es va dur a terme una avaluació histoquímica. Per fer això, un lòbul de cada fetge es va fixar en formalina 10% (p/v) durant 12-24h a 4°C. Al Servei d'Anatomia Patològica Vall d'Hebron, s'efectuava la inclusió de les mostres de fetge en blocs de parafina per tallar làmines de 4 µm i muntar-les sobre portaobjectes. Tot seguit, les mostres es van sotmetre als processos de desparafinització i rehidratació previs a les tincions histoquímiques. Concretament, al propi servei es van realitzar de forma automatitzada les tincions hematoxilina-eosina (HE) i d'àcid periòdic de *Schiff* (PAS), a més de la immunohistoquímica de

l'antígen Ki-67 (*apartat 4.13.2*). Al laboratori es va dur a terme la tinció tricromàtica de Masson (*apartat 4.13.1*).

L'escanejat d'alta resolució de les làmines amb l'escàner *Pannoramic 250 Flash III (3DHISTECH)* va permetre visualitzar i analitzar els resultats amb el programa associat *CaseViewer 2.4*.

#### **4.13.1. Tinció tricromàtica de Masson**

Aquesta tècnica permet tenyir de color blau les fibres de col·lagen tipus 1, diferenciant-les al mateix temps del nucli cel·lular i citoplasma. Això ajuda a determinar si en aquest cas el fetge dels ratolins presenta un cert grau de fibrosi. El protocol que es va seguir és el següent:

1. Es desparafinen els talls fent 2 rentats de 10 minuts en xilè, 2 rentats de 10 minuts en etanol 100%, 2 rentats de 10 minuts en etanol 90%, 2 rentats de 5 minuts en etanol 70% i 2 rentats de 5 minuts en aigua.
2. Es fixen les mostres amb solució de *Bouin*, 1 minut al microones a 480 W i 15 minuts a temperatura ambient.
3. Es renten les làmines durant 1 minut amb aigua corrent i s'aclareixen amb aigua desionitzada.
4. Els nuclis es tenyeixen amb hematoxilina de *Weigert* (recent preparada) durant 5 minuts.
5. Les làmines es renten amb aigua calenta corrent durant 10 minuts i s'aclareixen amb aigua desionitzada.
6. Es du a terme la tinció dels citoplasmes amb la solució *Bierbich Scarlet – Acid fuchsin* durant 5 minuts i es segueix amb 3 rentats d'1 minut amb aigua desionitzada.
7. Es tenyeix el col·lagen incubant amb àcid fosfotúnic/fosfomolibdic durant 3 minuts 4 vegades, i sense assecar les làmines s'incuben amb una solució de blau d'anilina durant 10 minuts.
8. Es fan 3 rentats de 1 minut amb aigua desionitzada.
9. La diferenciació es fa incubant en una solució d'àcid acètic glacial 1% (v/v) durant 1 minut.

10. Es renten les làmines 2 cops amb aigua desionitzada.
11. Es deshidraten les mostres incubant-les amb etanol 90% durant 1 minut, etanol absolut 1 minut i finalment, en xilè 1 minut.
12. Les làmines es munten amb medi de muntatge DPX (base tolué) afegint una gota i col·locant el cobreobjectes al damunt.

Finalment, sobre els talls de fetge tenyits amb el per Masson i HE es va valorar de forma semiquantitativa el grau i tipus d'esteatosi hepàtica no alcohòlica (micro- o macro vesicular), així com la presència de *ballooning* hepatocelular, inflamació i fibrosi<sup>226</sup>.

#### **4.13.2. Immunohistoquímica Ki-67**

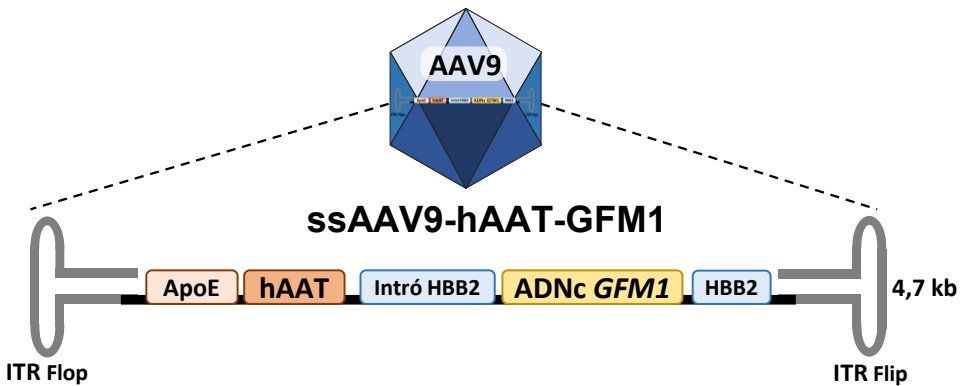
L'antigen Ki-67 es detecta per immunohistoquímica i serveix de marcador de proliferació cel·lular. Es fa servir el mòdul de tinció *Benchmark Ultra*, utilitzant el kit *UltraView Universal DAB 760-500 (Ventana Medical Systems)*. Es fa ús de l'anticòs primari anti-Ki-67 (30-9) monoclonal de conill (5278384001, *Ventana Medical*) i del kit de detecció *Universal HRP Multimer (Ventana Medical Systems)* que conté un còctel d'anticossos secundaris.

Es du a terme el recompte de nuclis positius (tenyits de marró) i nuclis totals, calculant així el percentatge de nuclis en fase de divisió. Per a cada mostra es prenen 3 seccions de 1 mm<sup>2</sup> capturades amb l'objectiu 10X i el comptatge s'efectua amb el programa *ImageJ (National institutes of Health)*.

#### 4.14. Construcció del vector ssAAV9-hAAT-GFM1

Per tal d'obtenir la construcció del vector ssAAV9-hAAT-GFM1 (Figura 4.9) es va partir dels següents plasmidis (Figura 4.10):

- **pMK-RQ-GFM1-Insert** (*Thermodfisher*) (4.607 pb) que conté la seqüència codificant del gen *GFM1* humà (ADNc *GFM1*, NCBI NM\_024996.5).
- **pSMD2-hAAT-UGT1A1** (7.703 pb) proporcionat per el Dr. Federico Mingozzi (Genethon, França). Aquest plasmidi conté un cassat d'expressió hepàtica conformat per l'*enhancer* del gen ApoE (apolipoproteïna E) i el promotor de la hAAT ( $\alpha$ -1-antitripsina humana), una regió intrònica del gen HBB2 (subunitat beta-2 de l'hemoglobina) i la senyal de poliadenilació d'aquest gen. Aquestes seqüències estan delimitades per les ITR de l'AAV2.



**Figura 4.9. Esquema del vector ssAAV9-hAAT-GFM1.** Genoma viral conformat per el cassat d'expressió hepàtica ApoE-hAAT (*enhancer* de l'*ApoE* i promotor de l'alfa-1-antitripsina humana), una regió intrònica i senyal de poliadenilació de *HBB2* (subunitat beta-2 de l'hemoglobina), l'ADN codificant del gen *GFM1* humà, i les ITR de l'AAV2. La càpsida elegida és la del serotip de l' AAV9.

Els estocs dels plasmidis de partida es van expandir un cop arribats al laboratori, transformant cèl·lules quimiocompetents *E. coli* XL10 Gold (apartat 4.14.4). Els clons transformats es van seleccionar utilitzant la resistència a kanamicina (pMK-RQ-GFM1-Insert) o ampicil·lina (pSMD2-hAAT-UGT1A1) (apartat 4.14.5). Els clons seleccionats es van créixer i per obtenir els plasmidis per Maxiprep (apartat 4.4.1.5).

#### 4.14.1. Digestió dels plasmidis amb enzims de restricció

A continuació, es van digerir els plasmidis per obtenir els fragments d'interès que després de lligar-se van donar lloc al plasmidi necessari per produir el vector terapèutic (Figura 4.10).

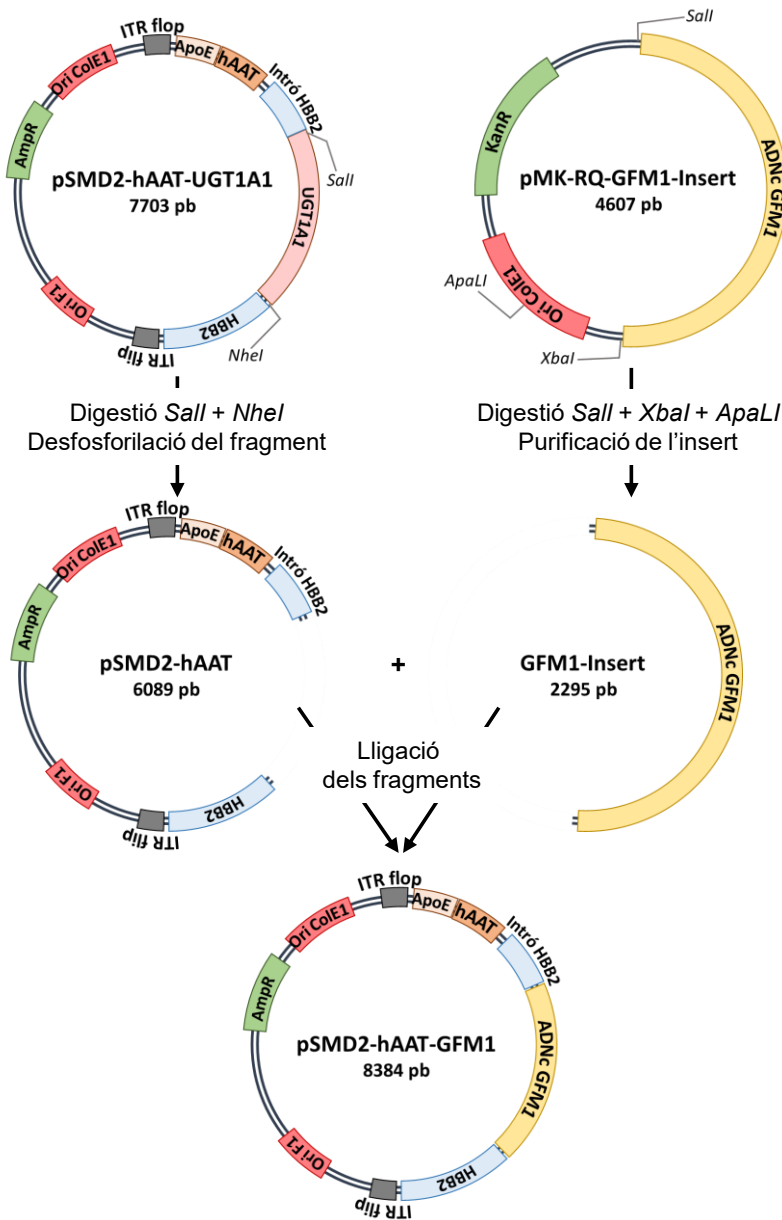


Figura 4.10. Obtenció del plasmidi pSMD2-hAAT-GFM1.

#### 4.14.1.1. Digestió de pMK-RQ-GFM1-Insert

Aquest plasmidi es va sotmetre a una triple digestió amb els enzims de restricció *Sall*, *XbaI* i *ApaLI* O/N a 37°C (Taula 4.20) de la següent forma:

Les dianes de restricció de *Sall* i *XbaI* delimiten la seqüència codificant de *GFM1* i com que el producte d'aquesta doble digestió donaria lloc a dos fragments amb longituds similars (2.312 pb i 2.295 pb), el fragment més gran no interessava i es va tallar amb l'enzim *ApaLI*. El resultat de la digestió (3 fragments de 2.295 pb, 1.811 pb i 501 pb) es va separar per electroforesi en un gel d'agarosa al 0,8% (p/v), per tal de seleccionar l'insert amb *GFM1* (2.295 pb) i purificar-lo (apartat 4.14.2).

**Taula 4.20. Composició de la reacció de digestió de pMK-RQ-GFM1-Insert amb *Sall*, *XbaI* i *ApaLI***

Reactiu	Volum	Concentració final
Tampó CutSmart® 10X <sup>1</sup>	5 µL	1X
<i>Sall</i> -HF (20 U/µL) <sup>2</sup>	2 µL	0,8 U/µL
<i>XbaI</i> (100 U/µL) <sup>2</sup>	2 µL	4 U/µL
<i>ApaLI</i> (50 U/µL) <sup>2</sup>	1 µL	1 U/µL
ADN plasmídic	10 µg	0,2 µg/µL
Aigua	Fins a 50 µL	

<sup>1</sup>Concentració 1X: Acetat de potassi 50 mM; Acetat de magnesi 10 mM; 100 µg/ml BSA; Tris-Acetate 20 mM [pH 7,9]; <sup>2</sup>New England Biolabs

#### 4.14.1.2. Digestió de pSMD2-hAAT-UGT1A1

Es va fer una doble digestió amb els enzims *NheI* i *Sall* O/N a 37°C (Taula 4.21).

**Taula 4.21. Composició de la reacció de digestió de pSMD2-hAAT-UGT1A1 amb *NheI* i *Sall***

Reactiu	Volum	Concentració final
Tampó CutSmart® 10X <sup>1</sup>	2,5 µL	1X
<i>NheI</i> -HF (20 U/µL) <sup>2</sup>	2 µL	1,3 U/µL
<i>Sall</i> -HF (20 U/µL) <sup>2</sup>	2 µL	1,3 U/µL
ADN plasmídic	4,5 µg	0,18 µg/µL
Aigua	Fins a 25 µL	

<sup>1</sup>Concentració 1X: Acetat de potassi 50 mM; Acetat de magnesi 10 mM; 100 µg/ml BSA; Tris-Acetate 20 mM [pH 7,9]; <sup>2</sup>New England Biolabs

Les dianes dels enzims de restricció flanquegen la seqüència de *UGT1A1*, que no interessava i és la que es va substituir per l'ADNc de *GFM1*. El resultat va donar lloc

a dos fragments d'ADN, de 1.614 pb i 6.089 pb i la comprovació es va fer corrent una mostra del producte de la digestió en un gel d'agarosa al 0,8% (p/v). En aquest cas, el fragment d'interès presentava una mida molt gran (6.089 pb) i això va complicar la seua purificació a partir del gel d'agarosa. Llavors, es va desfosforilar directament el producte de la digestió (*apartat 4.14.3.1*) just abans de la reacció de lligació (*apartat 4.14.3.2*).

#### 4.14.2. Purificació d'un fragment d'ADN a partir del gel d'agarosa

El plasmidi pMK-RQ-GFM1-Insert digerit amb *Sall*, *XbaI* i *ApaI* es va carregar en un gel d'agarosa a 0,8% (p/v) i separar per electroforesi a un voltatge constant de 80V (*apartat 4.4.5*). Un cop comprovat que els diferents fragments s'havien separat adequadament, es va tallar la banda del fragment que contenia l'ADNc de *GFM1* (2.295 pb) amb un bisturí. La purificació del fragment d'ADN del gel d'agarosa es va realitzar amb el kit comercial *QIAquick Gel Extraction Kit (28704, QIAGEN)* seguint el protocol proporcionat pel propi kit.

#### 4.14.3. Desfosforilació i lligació de fragments d'ADN

Es va fer servir el kit comercial *Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (4898117001, SigmaAldrich)* per dur a terme les dues reaccions de forma consecutiva.

##### 4.14.3.1. Desfosforilació

Un cop digerit el vector pSMD2-hAAT-UGT1A1 on es volia clonar l'insert, es van desfosforilar els extrems dels fragments d'ADN resultants per evitar la lligació sobre si mateixos (concatenació). La composició de la reacció es detalla a la *Taula 4.22*.

**Taula 4.22. Composició de la reacció de desforforilació**

Reactiu	Volum	Concentració final
Vector digerit (180 ng/μL)	4 μL	36 ng/μL
<i>rApid Alkaline Phosphatase Buffer 10X</i> <sup>1</sup>	2 μL	1X
<i>rApid Alkaline Phosphatase</i> <sup>2</sup>	1 μL	1U
Aigua	13 μL	

<sup>1</sup>0,5M Tris-HCl, 1 mM EDTA [pH 8,5], <sup>2</sup>1U/μL (Roche).

Una vegada barrejats tots els elements, la reacció va tenir lloc a 37°C durant 30 minuts. Seguidament es va inactivar la fosfatasa per incubació a 75°C durant 2 minuts i es va continuar amb la lligació.

#### 4.14.3.2. Lligació

Es va partir del vector digerit i desfosforilat, i del fragment de amb l'ADNc de *GFM1* purificat que interessava clonar al vector (insert). La barreja de la reacció es va preparar tal i que com indica la *Taula 4.23*.

**Taula 4.23. Composició de la reacció de lligació**

Reactiu	Volum	Concentració final
<b>Vector digerit i desfosforilat (36 ng/μL)</b>	1,4 μL	5 ng/μL
<b>Insert purificat (26,8 ng/μL)</b>	5,6 μL	15 ng/μL
<b>DNA Dilution Buffer 5X</b>	2 μL	1X
<b>Aigua</b>	Fins a 10 μL	-
<b>T4 DNA Ligation Buffer 2X</b>	10 μL	1X
<b>T4 DNA Ligase<sup>1</sup></b>	1 μL	0,25 U/μL

<sup>1</sup>5 U/μL (Roche)

Per facilitar la lligació la barreja es va incubar O/N a T/A. El producte de la lligació es va guardar a -20°C fins la seua utilització.

#### 4.14.4. Producció i transformació de cèl·lules quimiocompetents

Els bacteris quimiocompetents es van preparar a partir de la soca *E. coli XL10 Gold Ultracompetent Cells (200314, Agilent)* seguint els següents passos:

1. Es creixen 50 mL de la soca comercial en medi LB líquid fins arribar a una densitat òptica (OD<sub>600</sub>) equivalent a ~10<sup>8</sup> cèl·lules/mL.
2. El cultiu bacterià es transfereix a un tub estèril i s'incuba 10 minuts en gel.
3. Es centrifuga a 2.700 x g durant 10 minuts a 4°C. S'elimina el sobrenedant per decantació i es resuspèn el precipitat en 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M estèril i fred.
4. Es centrifuga a 2.700 x g durant 10 minuts a 4°C. S'elimina completament el sobrenedant i es resuspèn el precipitat en 2 mL de 0,1 M CaCl<sub>2</sub>.
5. S'afegeixen 500 μL de glicerol 50%, quedant una solució de glicerol 10%.
6. Es fan alíquotes i es guarden a -80°C.



Un cop produïts els bacteris quimiocompetents es va dur a terme la seua transformació amb els plasmidis d'interès: els utilitzats com a material de partida (pMK-RQ-GFM1-Insert i pSMD2-hAAT-UGT1A1) o el resultat de la lligació (pSMD2-hAAT-GFM1). Els passos a seguir son:

1. Es descongelen els bacteris quimiocompetents en gel (alíquotes de 100 µL) i s'afegeixen 10 ng de l'ADN que es vol transformar. En el cas de lligacions, es transformen 10 µL de la mescla de reacció.
2. S'agita suaument i incuba 30 minuts en gel.
3. Les cèl·lules s'exposen a un xoc tèrmic a 42°C durant 30 segons.
4. S'incuba de nou en gel durant 2 minuts.
5. S'afegeixen 250 µL de medi LB sense antibiòtic i s'incuba a 37°C durant una hora en agitació a 180 rpm.
6. Es sembra tot el volum en una placa de LB-Agar suplementat amb l'antibiòtic pertinent en cada cas a una concentració de 100 µg/mL.
7. S'incuba la placa O/N a 37°C.

#### **4.14.5. Cultiu de bacteris**

Per expandir les colònies de bacteris, de forma general aquestes es cultiven en medi LB líquid (*Luria Broth Base, 12795-027 Invitrogen*) suplementat amb l'antibiòtic de selecció pertinent a una concentració final de 100 µg/mL. El creixement es du a terme a 37°C i 180 rpm en recipients estèrils amb la capacitat suficient com per assegurar que el cultiu s'oxigeni correctament. Els clons es seleccionen en plaques de LB-agar (*Bacto™ Agar, 214010 Becton Dickinson*) a una concentració del 2% (p/v), suplementat amb el mateix antibiòtic a una concentració de 100 µg/mL, O/N a 37°C. Amb l'ajuda d'una nansa de *Kolle* es recullen diferents colònies crescudes, es sembren individualment en LB líquid i s'expandeixen per extreure ADN plasmídic per Miniprep (*apartat 4.4.1.4*) i comprovar per digestions enzimàtiques la presència del plasmidi d'interès (*apartat 4.14.6*).

Els clons seleccionats que contenen el plasmidi d'interès es congelen en 1 mL de glicerol al 15% en LB (v/v) i es guarden a -80°C.

#### 4.14.6. Comprovació del clonatge per digestions enzimàtiques

Es van realitzar digestions amb enzims de restricció per comprovar si el clonatge s'havia efectuat correctament i s'havien aconseguit colònies transformades amb pSMD2-hAAT-GFM1. Es va utilitzar la plataforma *Benchling*<sup>227</sup> per dissenyar digestions que oferiren patrons de bandes específics per al plasmidi d'interès (*Taula 4.24*).

**Taula 4.24. Digestions per comprovar la presència de pSMD2-hAAT-GFM1**

Reacció digestió	Enzim	Patró de bandes (pb) pSMD2-hAAT-GFM1	Patró de bandes (pb) pSMD2-AAT-UGT1A1
1	Xbal	4.383 ; 4.001	4.001 ; 3.702
2	Sall	8.384 pb	7.703
3	Xbal + Sall	4.001 ; 3.095 ; 1.288	4.001 ; 2.414 ; 1.288
4	BamHI	7.747 ; 637	7.703
5	BamHI + NheI	6.880 ; 867 ; 637	5.459 ; 2.244

L'ADN plasmídic provinent de Minipreps (*apartat 4.4.1.4*) i Maxipreps (*apartat 4.4.1.5*) es va digerir seguint la composició detallada a la *Taula 4.25*. El producte de les digestions es va correr per electroforesi en gel d'agarosa al 0,8% (p/v) (*apartat 4.4.5*) comprovant que el patró de bandes fos el corresponent al plasmidi pSMD2-hAAT-GFM1 (*Taula 4.24*).

**Taula 4.25. Composició de les digestions per comprovar la presència de pSMD2-hAAT-GFM1**

Reacció digestió	Reactiu	Volum	Concentració final
1	Xbal (100U/ $\mu$ L) <sup>2</sup>	1 $\mu$ L	5 U/ $\mu$ L
2	Sall-HF (20 U/ $\mu$ L) <sup>2</sup>	1 $\mu$ L	1 U/ $\mu$ L
3	Xbal (100U/ $\mu$ L) <sup>2</sup>	1 $\mu$ L	5 U/ $\mu$ L
	Sall-HF (20 U/ $\mu$ L) <sup>2</sup>	1 $\mu$ L	1 U/ $\mu$ L
4	BamHI (20U/ $\mu$ L) <sup>2</sup>	1 $\mu$ L	1 U/ $\mu$ L
5	BamHI (20U/ $\mu$ L) <sup>2</sup>	1 $\mu$ L	1 U/ $\mu$ L
	NheI-HF (20 U/ $\mu$ L) <sup>2</sup>	1 $\mu$ L	1 U/ $\mu$ L
	Tampó CutSmart® 10X <sup>1</sup>	2 $\mu$ L	1X
	ADN plasmídic	130 $\mu$ g	6,5 $\mu$ g/ $\mu$ L
	Aigua	Fins a 20 $\mu$ L	

<sup>1</sup>Concentració 1X: KAcO 50 mM; MgAc 10 mM; BSA 100  $\mu$ g/ml; Tris-acetat 20 mM [pH 7,9]; <sup>2</sup>New England Biolabs

#### 4.14.7. Seqüenciació

Per a la seqüenciació de pSMD2-hAAT-GFM1 utilitzada per la producció del rAAV, es van dissenyar un conjunt d'encebadors (*Taula 4.26*) contemplant la zona d'unió entre l'ADNc de *GFM1* i el vector de transferència.

Es va dur a terme seqüenciació automàtica basada en el mètode de Sanger i els resultats es van analitzar comparant les seqüències ofertes amb la de referència mitjançant l'eina *BLAST*. La seqüenciació la va realitzar el grup col·laborador dirigit per la Dra. Gloria González Asequinolaza (*Programa de terapia génica y Regulación de la Expresión Génica, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra – Pamplona*).

**Taula 4.26. Encebadors per seqüenciar pSMD2-AAT-GFM1**

Nom	Seqüència 5' → 3'	Direcció
<b>ITR_flip_Fw</b>	GGA CAG GTA TCC GGT AAG CG	Directe
<b>ITR_flip_Rv</b>	CGG GTA CCC CTC TCA CAC TA	Revers
<b>secApoE_Fw</b>	GCA AGC AGC AAA CAG CAA ACA C	Directe
<b>sechAATF1_Fw</b>	TTT CGG TAA GTG CAG TGG AAG C	Directe
<b>Secintro_Fw</b>	AGT CCA AGC TAG GCC CTT TTG C	Directe
<b>GFM1_1st_Fw</b>	CAG TGC CAG ACC ATG ACT GT	Directe
<b>GFM1_2nd_Fw</b>	TAT GCC GGA GAC ATC TGT GC	Directe
<b>GFM1_3rd_Fw</b>	ACT GGG CAA GAT GGA GTT GA	Directe
<b>ITR_flop_Fw</b>	CCA CCT TTC CCC TGA AGT GT	Directe
<b>ITR_flop_Rv</b>	AGG AAC GGT ACG CCA GAA TC	Revers

#### 4.14.8. Producció, purificació i titulació dels rAAV

El grup dirigit per la Dra. Gloria González Asequinolaza va dur a terme la producció, purificació i titulació del vector ssAAV9-hAAT-GFM1 seguint el protocol general<sup>228</sup> que es descriu a continuació:

Els rAAV9 es produeixen en cèl·lules HEK-293T co-trasfectades amb els plasmidis pSMD2-hAAT-GFM1 (amb la construcció prèviament descrita flanquejada per ITR) i pDP9.ape (*Plasmid Factory, Bielefeld, Alemanya*) que conté els gens adenovirals necessaris per la producció dels rAAV, gens *AAV2 rep* i gens *AAV9 cap*. El sobrenedant i les cèl·lules es recullen 72 hores post-transfecció.

El sobrenedant es tracta amb una solució de polietilenglicol (PEG8000, 8% v/v) durant 48-72h a 4°C. Es centrifuga a 3.000 rpm durant 15 minuts. El precipitat es resuspèn en tampó de lisi (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Triton X-100 0,1% (v/v)) i es conserva a -80°C.

Les cèl·lules que contenen rAAV, es tracten amb tampó de lisi i es congelen a -80°C. El lisat cel·lular es sotmet a tres cicles de congelació i descongelació, es tracta amb DNasa I i RNasa A (*Invitrogen™*) i es centrifuga a 2.500 rpm durant 10 minuts.

Les partícules virals es purifiquen per gradient de iodixanol del 15% al 57%. Les partícules virals efectives s'extreuen de la fracció al 40% i es concentren en columnes Amicon Ultra-15 ml (*Amicon®; Millipore, Bedford, MA*). Posteriorment es resuspenen en la solució vehicle (sacarosa 5% en PBS + àcid plurònic F68 (concentració final 0.001%)). Finalment, la titulació dels rAAV (partícules virals/mL) es determina per qPCR utilitzant encebadors dissenyats per alinear amb les seqüències ITR.

#### 4.15. Anàlisis estadístiques

Les anàlisis estadístiques dels resultats obtinguts es van efectuar amb el programa *GraphPad Prism 9* (*GraphPad Software, Inc.*). Els tests aplicats apareixen detallats a cadascun dels peus de figura a l'apartat de resultats (*apartat 5*).

Com que el nombre de mostres per grup les diferents anàlisis efectuades al llarg de la tesi tendeix a ser reduït, es va optar per utilitzar tests estadístics no paramètrics, que solen ser més restrictius. Quan es comparaven dos grups es va aplicar el test Mann-Whitney. D'altra banda, per a comparacions múltiples (més de dos grups) es va fer servir el test Kruskal-Wallis i en el cas de que aquest fos significatiu es va aplicar el test de comparacions múltiples de Dunn per comparar la mitjana dels rangs de cada grup. Amb aquest últim test de correcció, depenent del que s'estava analitzant i quins grups es comparaven, es va decidir comparar la mitjana del rang de cada grup amb la del grup control (p. ex. HET i KI respecte de WT), o comparar la mitjana del rang de cada grup amb els de la resta de grups (p. ex. WT, KI/KO V i KI/KO AAV entre ells).



## 5. RESULTATS

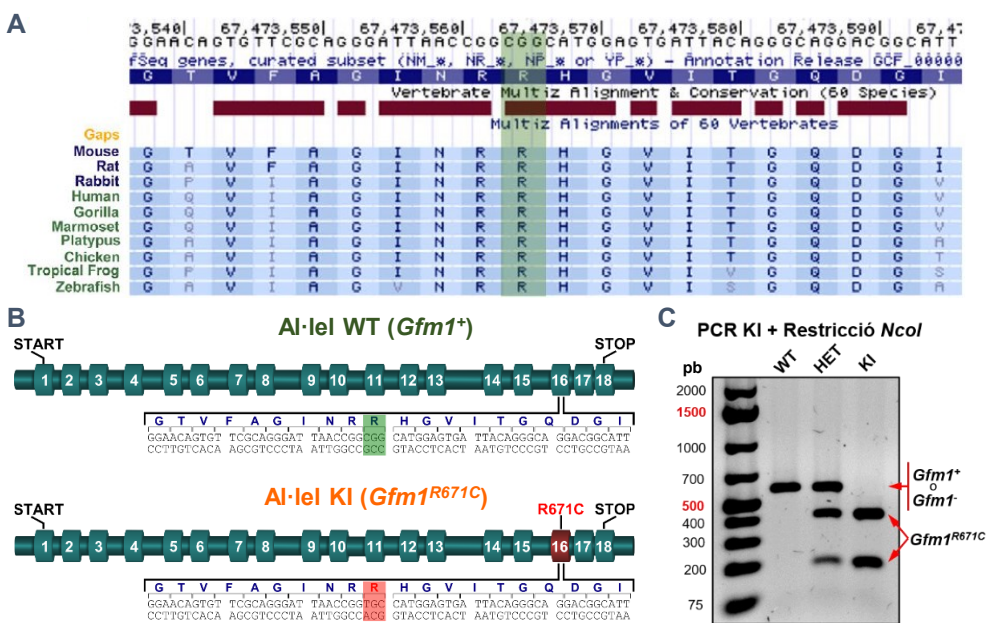
---



## 5.1. Model de ratolí homozigot *knock-in Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*

### 5.1.1. Generació del ratolí *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*

La mutació p.R671C a la seqüència d'EFG1 és la que fins el moment s'ha identificat amb més freqüència en pacients amb COXPD1, associant-se a una major esperança de vida. Es va comprovar que l'arginina R671 està conservada en proteïnes homòlogues d'EFG1 de multitud d'espècies de vertebrats, entre les quals hi ha el ratolí (Figura 5.1A).



**Figura 5.1. Generació del ratolí *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*.** (A) Alineaments múltiples de la seqüència de la proteïna EFG1 amb l'aminoàcid R671 (en verd) conservat en diferents espècies de vertebrats, utilitzant el *UCSC Genome Browser*<sup>229</sup> (B) Al·lels WT (*Gfm1<sup>+</sup>*) i KI (*Gfm1<sup>R671C</sup>*). La mutació antisentit c.2011\_2013delinsTGC a l'exó 16 causant del canvi p.R671C a la seqüència d'EFG1 subratllada en vermell. La seqüència diana de l'exó 16 està expandida per mostrar les diferències a les seqüències de nucleòtids i aminoàcids entre WT (verd) i KI (vermell). (C) Gel d'electroforesi representatiu per detectar l'al·lel *Gfm1<sup>R671C</sup>*. El producte d'amplificació de la PCR KI (613 pb) es sotmet a una digestió amb *NcoI*, la qual dona lloc a dos fragments (432 i 181 pb) si es presenta la mutació c.2011\_2013delinsTGC. Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*), HET (*Gfm1<sup>R671C/+</sup>*) i KI (*Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*).

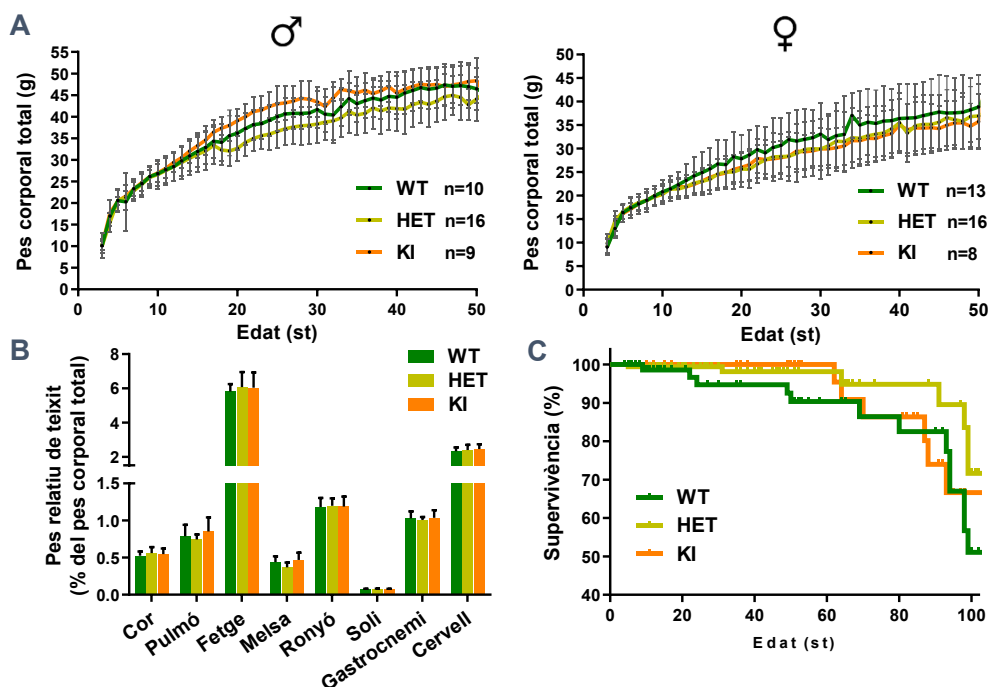
Tal i com es detalla a l'apartat 4.2, la mutació antisentit c.2011\_2013delinsTGC es va introduir per CRISPR/Cas9 a l'exó 16 del gen murí, donant lloc a l'al·lel *knock-in* de *Gfm1* (*Gfm1<sup>R671C</sup>*) (Figura 5.1B). Els aparellaments entre ratolins heterozigots



*Gfm1*<sup>R671C/+</sup> (HET) van permetre obtenir ratolins homozigots *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> (KI) (Figura 5.1C), detectant-se la transmissió mendeliana de l'al·lel mutant (27% *Gfm1*<sup>+/+</sup>, 50% *Gfm1*<sup>R671C/+</sup> i 23% *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>) amb distribució equitativa de genotips entre els dos sexes (Taula 5.1, apartat 5.2.1). A més, es va demostrar la fertilitat dels animals *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> després de veure que la descendència procedent d'aparellaments entre ratolins amb aquest genotip era viable.

### 5.1.2. Seguiment de pes i estudi de supervivència

Es va fer seguiment del pes corporal dels ratolins fins a les 50 setmanes d'edat, sense trobar diferències entre animals *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>, *Gfm1*<sup>R671C/+</sup> i *Gfm1*<sup>+/+</sup> de la mateixa ventrada, tant en mascles com en femelles (Figura 5.2A).

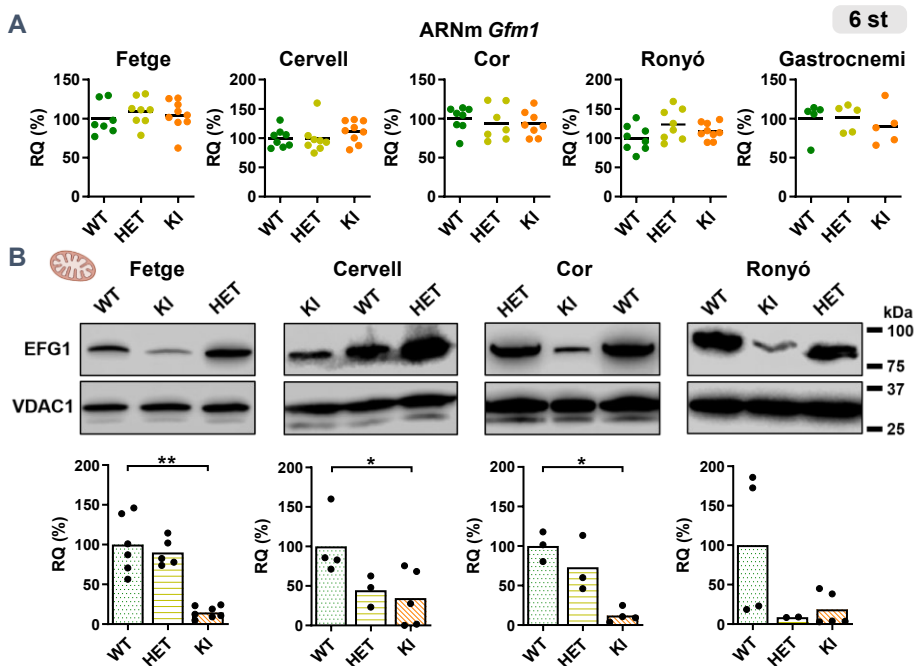


**Figura 5.2. Seguiment de pes i estudi de supervivència del ratolí *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>.** (A) Seguiment del pes corporal de ratolins mascles i femelles. Les barres representen la mitjana del pes ( $\pm$ SD). (B) Pesos relatius de teixits mostrats com a percentatge del pes corporal total, comparant ratolins WT (n=9), HET (n=8) i KI (n=9) de 6 setmanes d'edat. Les barres representen la mitjana (+SD). (C) Proporcions de supervivència, corba Kaplan-Meier (WT, n=94; HET, n=172; KI, n=63). Les observacions censurades apareixen com a punts a la gràfica. Els tests *Log-rank* (Mantel-Cox) i *Log-rank test for trend* van descartar diferències estadístiques entre les corbes de supervivència. Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>), HET (*Gfm1*<sup>R671C/+</sup>) i KI (*Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>).

A més a més, no es van detectar diferències al pes relatiu de diferents teixits (cor, pulmó, fetge, melsa, ronyó, músculs soli i gastrocnemi i cervell) entre ratolins dels tres genotips a les 6 setmanes d'edat (*Figura 5.2B*). Pel que fa a l'estudi de supervivència fins les 100 setmanes d'edat, els ratolins *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>, *Gfm1*<sup>R671C/+</sup> i *Gfm1*<sup>+/+</sup> van mostrar esperances de vida similars (*Figura 5.2C*).

### 5.1.3. Efecte de la mutació p.R671C sobre els nivells d'EFG1

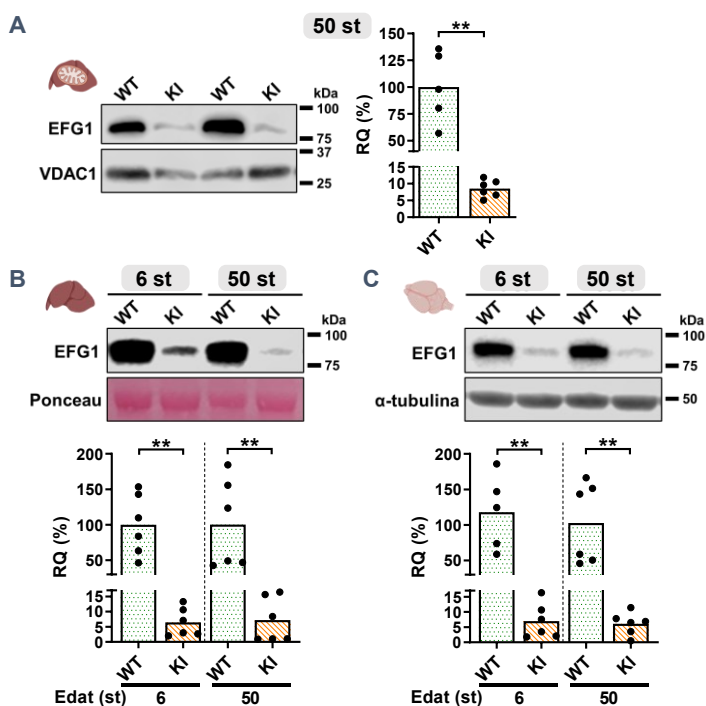
L'expressió de *Gfm1* es va analitzar per qPCR sobre mostres d'ARNm total de fetge, cervell, cor, ronyó i múscul esquelètic (gastrocnemi) de ratolins joves (6 setmanes d'edat), sense detectar diferències en la quantitat basal d'ARNm de *Gfm1* entre *Gfm1*<sup>+/+</sup>, *Gfm1*<sup>R671C/+</sup> i *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> en cap dels teixits (*Figura 5.3A*).



**Figura 5.3. Expressió de *Gfm1* als ratolins *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> a les 6 setmanes d'edat. (A)** L'ARNm de *Gfm1* es va quantificar per RT-qPCR, normalitzar respecte l'ARNm de *Ppia* i referir a una mostra calibradora. **(B)** Western blots representatius d'EFG1 en extractes mitocondrials de cor, ronyó, fetge i cervell. La quantitat d'EFG1 es va corregir per la de VDAC1 i referir a una mostra calibradora carregada a tots els western blots. Els valors, expressats com quantitat relativa (RQ), representen el percentatge de la mitjana dels WT. Cada punt és una mostra i les barres representen la mitjana. Es va aplicar el test Kruskal-Wallis i quan es van detectar diferències significatives ( $p < 0,05$ ), es van comparar els grups HET i KI amb el grup control (WT) aplicant el test de comparacions múltiples de Dunn. Els asteriscs indiquen significança estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>), HET (*Gfm1*<sup>R671C/+</sup>) i KI (*Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>).

D'altra banda, es van analitzar els nivells de proteïna EFG1 mitjançant immunodetecció per western blot SDS-PAGE sobre extractes mitocondrials de fetge, cervell, cor i ronyó de ratolins de 6 setmanes d'edat; detectant-se reduccions d'EFG1 d'aproximadament el 85% en mitocondris dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* als diferents teixits (*Figura 5.3B*). Aquesta caiguda d'EFG1 es va mantenir als extractes mitocondrials de fetge de ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* a les 50 setmanes d'edat ( $91,5\% \pm 2,6\%$ ; mitjana  $\pm$  SD) (*Figura 5.4A*).

Adicionalment, es va quantificar EFG1 sobre extractes proteics obtinguts a partir d'homogenats de fetge i cervell de ratolins de 6 i 50 setmanes d'edat. A les mostres dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* es van observar reduccions de la quantitat del factor d'elongació equiparables a les detectades en extractes mitocondrials, tant en fetge com en cervell a les dues edats (*Figura 5.3B* i *Figura 5.4B, C*). Aquests resultats suggereixen que la reducció d'EFG1 observada als extractes mitocondrials dels diferents teixits deu venir donada per una síntesi deficient o inestabilitat de la forma mutada de la proteïna (EFG1<sup>R671C</sup>).



**Figura 5.4. Nivells d'EFG1 en homogenats totals de fetge i cervell als ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*.** Peü de figura a la següent pàgina.

**Figura 5.4. Nivells d'EFG1 en homogenats totals de fetge i cervell als ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*.** (A) Western blot d'EFG1 en extractes mitocondrials de fetge de ratolins de 50 setmanes d'edat, utilitzant VDAC1 com a control de càrrega. (B, C) Nivells d'EFG1 en homogenats totals de fetge (B) i cervell (C) de ratolins de 6 i 50 setmanes d'edat. Com a control de càrrega es van utilitzar les proteïnes tenyides amb Ponceau en el cas de fetge i  $\alpha$ -tubulina en el cas de cervell. Les diferents proteïnes detectades per western blot es van quantificar per densitometria, corregint la quantitat de proteïna EFG1 de cada mostra pel control de càrrega corresponent. Els valors, expressats com quantitat relativa (RQ), representen el percentatge de la mitjana dels WT. Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent i les barres representen la mitjana. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*\* $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*) i KI (*Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*).

Els nivells d'EFG1 en mitocondris de gastrocnemi no es van poder analitzar a causa del baix rendiment del procés d'obtenció d'extractes mitocondrials a partir d'aquest teixit. No obstant això, els western blots sobre homogenats totals d'aquest múscul esquelètic també van permetre observar reduccions d'EFG1 (84%) als ratolins KI (Figura supl. 1).

#### 5.1.4. Avaluació del perfil COXPD molecular al fetge

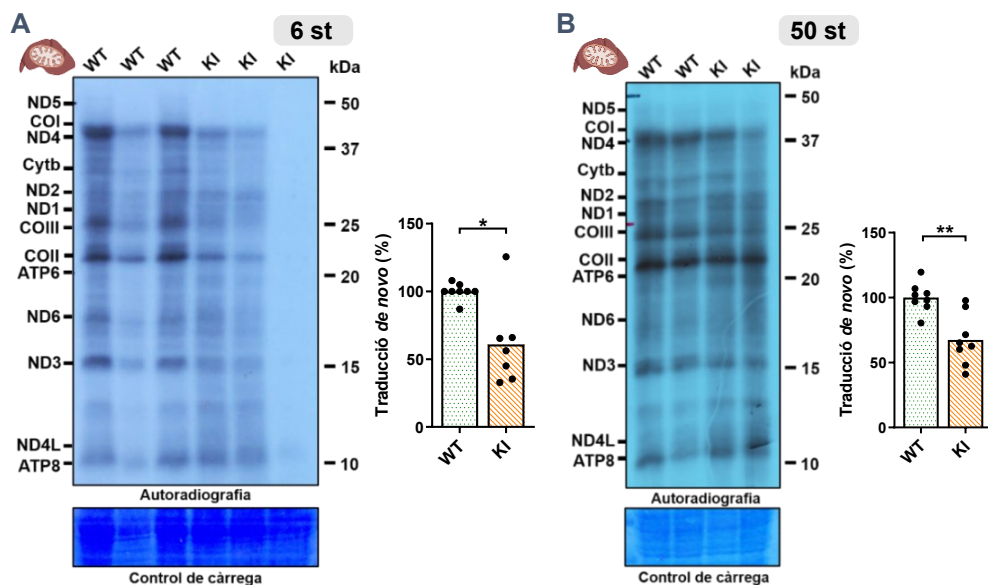
El perfil molecular de la COXPD1 es caracteritza principalment per una reducció dràstica de proteïna EFG1 que causa una disfunció de la traducció mitocondrial i, en conseqüència, afectació combinada de la cadena de transport d'electrons (CTE) i sistema OXPHOS. Aquests últims trets es van analitzar al model *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*, sobre diferents teixits de ratolins joves (6 setmanes d'edat) i al fetge de ratolins adults (50 setmanes d'edat).

##### 5.1.4.1. Disfunció de la traducció mitocondrial

Tenint en compte la funció que exerceix EFG1 en el pas d'elongació de la síntesi proteica mitocondrial<sup>31</sup>, es va analitzar la traducció mitocondrial *in organello* amb experiments de marcatge radioactiu de tipus *pulse* per testar el grau d'afectació d'aquest procés en diferents teixits.

Així doncs, sobre extractes mitocondrials de fetge de ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* es va detectar una reducció generalitzada de la taxa de síntesi *de novo* dels 13 polipèptids codificats a l'ADNmt, tant a les 6 setmanes d'edat (39,1%  $\pm$  31,5%; mitjana  $\pm$  SD, percentatge respecte dels WT) com a les 50 setmanes d'edat (32,7%  $\pm$  19,8%),

comparant amb el grup WT (Figura 5.5). Resultat que devia venir donat per la depleció de proteïna EFG1 als mitocondris de fetge del model *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>.



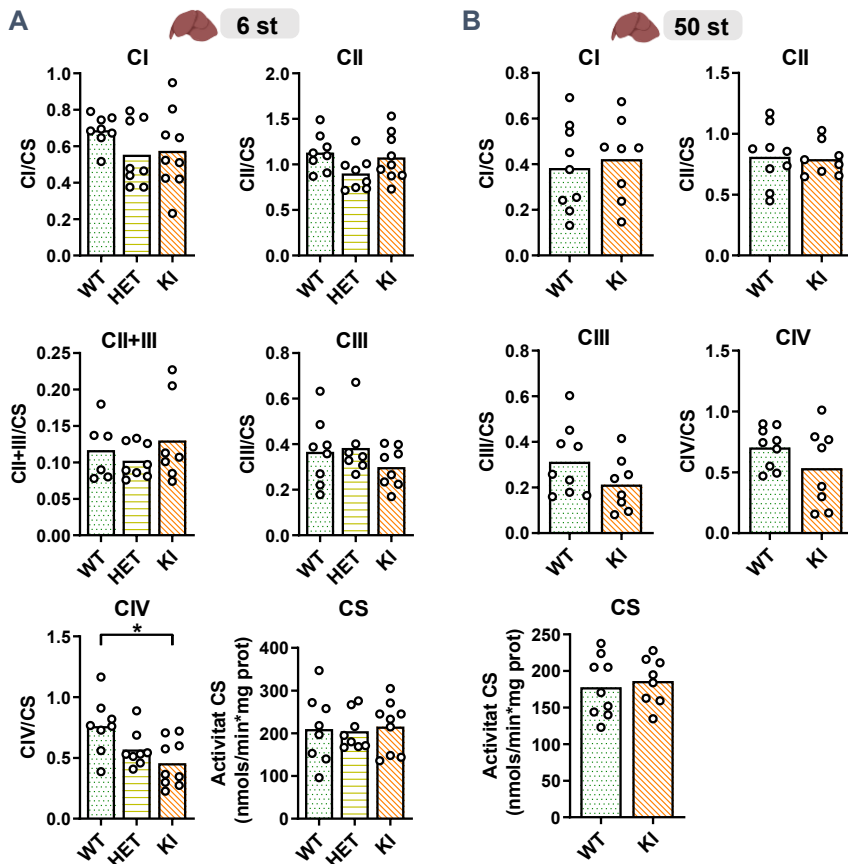
**Figura 5.5. Traducció mitocondrial al fetge del model *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>.** Traducció mitocondrial *in organello* (fases *pulse*) sobre extractes mitocondrials de fetge a les 6 setmanes d'edat (A) i 50 setmanes d'edat (B). Les proteïnes sintetitzades *de novo* es marquen radioactivament i detecten per autoradiografia. Per a cada mostra es quantifica per densitometria el conjunt de bandes i el valor obtingut es corregeix per la quantitat total de proteïna carregada al gel i tenyida amb blau de Coomassie. S'obtenen valors de traducció mitocondrial *de novo*, que s'expressen com al percentatge de la mitjana dels WT, i les barres representen la mitjana relativa. Els punts representen valors de ratolins individuals i els asteriscs indiquen significança estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>) i KI (*Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>).

Contràriament, als experiments de traducció mitocondrial efectuats sobre extractes mitocondrials de cervell i ronyó de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> joves (6 setmanes d'edat) no es va arribar a detectar reducció de la traducció mitocondrial *de novo*<sup>230</sup>. Resultat que suggereix que l'EFG1<sup>R671C</sup> residual és capaç de mantenir la taxa de síntesi dels polipèptids mitocondrials en alguns teixits (cervell i ronyó), però en canvi al fetge és insuficient i comporta un defecte a la traducció mitocondrial.

#### 5.1.4.2. Afectació de la CTE i el sistema OXPHOS al fetge

Per tal d'analitzar l'efecte de la mutació p.R671C en EFG1 sobre la funcionalitat del sistema OXPHOS, es van determinar les activitats enzimàtiques dels complexos de

la CTE sobre homogenats de fetge, cervell, ronyó, i múscul esquelètic de ratolins de 6 setmanes d'edat. Aquestes es van normalitzar per l'activitat citrat sintasa (enzim del cicle de Krebs) que es va utilitzar com a marcador de massa mitocondrial.



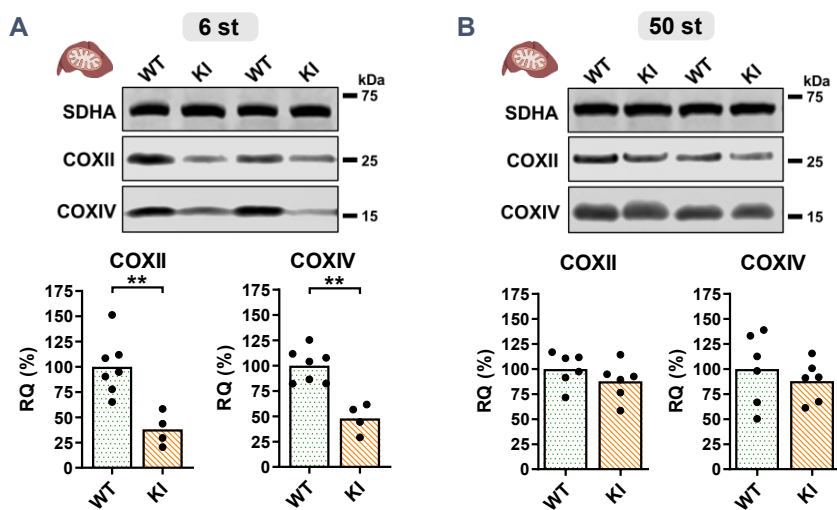
**Figura 5.6. Activitats enzimàtiques dels complexos de la CTE en fetge de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>.** Activitat enzimàtica dels complexos CI, CII, CIII, CII+III i CIV normalitzada respecte l'activitat citrat sintasa (CS) sobre homogenats de fetge, a les 6 setmanes d'edat (A) i 50 setmanes d'edat (B). Els cercles oberts representen valors de ratolins individuals i les barres fan referència a la mitjana dels valors de cada grup. En (A) es va aplicar el test Kruskal-Wallis i quan es van detectar diferències significatives ( $p < 0,05$ ), es van comparar els grups HET i KI amb el grup control (WT) aplicant el test de comparacions múltiples de Dunn. En (B) es va utilitzar el Mann-Whitney U-test. Els asteriscs indiquen significança estadística ( $*p < 0,05$ ). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>), HET (*Gfm1*<sup>R671C/+</sup>) i KI (*Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>).

Als homogenats de fetge de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> joves es va detectar una reducció del 40% de l'activitat enzimàtica del CIV en comparació amb l'activitat de les mostres WT (Figura 5.6A). En canvi, a les 50 setmanes d'edat, aquesta reducció

de l'activitat del CIV va deixar de ser significativa (Figura 5.6B). Les activitats enzimàtiques de la resta de complexos de la CTE i de la CS no van experimentar cap alteració significativa als homogenats de fetge de ratolins KI en cap de les dues edats en comparació amb els animals WT.

Les determinacions de les activitats enzimàtiques dels complexos de la CTE i l'activitat CS analitzades sobre homogenats de cervell, ronyó i gastrocnemi de ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* de 6 setmanes d'edat no van mostrar cap alteració significativa<sup>230</sup>. Resultat que va concordar amb la manca d'afectació de la traducció mitocondrial al cervell i ronyó dels ratolins KI joves.

D'altra banda, es van quantificar per western blot els nivells de COXII (codificada a l'ADNmt) i COXIV (codificada a l'ADNn) sobre extractes mitocondrials de fetge. Es van detectar reduccions significatives d'aquestes dues subunitats del CIV en ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* de 6 setmanes d'edat (COXII (60% ± 16,5%; mitjana ± SD), COXIV (52% ± 14,4%)) (Figura 5.7A).



**Figura 5.7. Nivells de subunitats del CIV en mitocondris de fetge de ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*.** Western blots representatius de COXII i COXIV en extractes mitocondrials de fetge de ratolins de 6 setmanes (A) i 50 setmanes d'edat (B). Les quantificacions per densitometria de les dues proteïnes es van corregir per SDHA, utilitzada com a control de massa mitocondrial. Els valors, expressats com quantitat relativa (RQ), representen el percentatge de la mitjana dels WT. Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent i les barres representen la mitjana. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*\* $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*) i KI (*Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*).

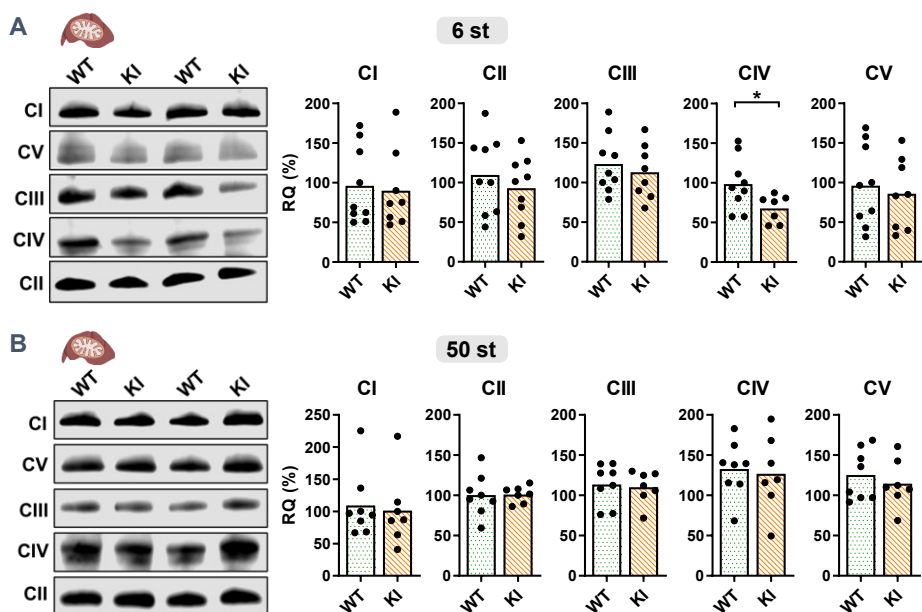
Tal i com s'havia observat amb les determinacions de les activitats de CTE, a les 50 setmanes d'edat van deixar d'observar-se reduccions significatives de COXII i COXIV en mitocondris de fetge dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* (Figura 5.7B).

Per últim, es va analitzar la quantitat basal complexos OXPHOS acoblats mitjançant western blot BN-PAGE dut a terme sobre extractes mitocondrials de fetge. A les 6 setmanes d'edat les mostres dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* van mostrar una reducció significativa del CIV acoblat ( $32,4\% \pm 17,22\%$ ; mitjana  $\pm$  SD, referit al la mitjana dels WT) (Figura 5.8A) d'acord amb la disminució de l'activitat enzimàtica d'aquest complex prèviament detectada, i de manera coherent amb la reducció de les subunitats COXII i COXIV. Contràriament, la quantitat de CIV acoblat en mitocondris de fetge dels ratolins KI va deixar d'estar significativament reduïda a les 50 setmanes d'edat (Figura 5.8B). Aquest últim resultat concordava amb la normalització de l'activitat del CIV en homogenats de fetge dels ratolins adults.

Per tant, es va confirmar que als mitocondris de fetge dels ratolins KI joves el defecte de la traducció mitocondrial donava lloc a una disminució del CIV acoblat, explicant la reducció de la seua activitat enzimàtica, fenotip molecular que desapareixia amb l'edat.

L'estat de la resta de complexos (CI, CII, CIII i CV) als mitocondris de fetge dels ratolins KI, es va mantenir equiparable al dels ratolins WT a les dues edats estudiades (Figura 5.8). Llavors es va fer visible que malgrat reduir-se de forma generalitzada la taxa de síntesi dels 13 polipèptids mitocondrials, la susceptibilitat dels complexos OXPHOS davant aquesta situació era diferent: CI, CIII i CV (que consten de subunitats codificades a l'ADNmt) no manifestaven cap alteració detectable, a diferència del CIV.





**Figura 5.8. Complexos OXPHOS en mitocondris de fetges de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>.** Quantificació dels complexos OXPHOS acoblats en extractes mitocondrials de fetge de ratolins de 6 setmanes (A) i 50 setmanes d'edat (B). L'anàlisi es va efectuar per western BN-PAGE amb anticossos específics contra el CI (NDUFA9), CII (SDHA), CIII, (UQCRC2), CIV (COXIV) i CV (ATP5A). La quantitat relativa (RQ) es va obtenir per densitometria de la banda de complex, normalitzada per la quantitat de CII i referida a una mostra calibradora carregada a tots els western blots. Els punts representen valors de ratolins individuals, s'expressen com al percentatge de la mitjana dels WT, i les barres representen mitjana dels valors per a cada grup. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*p<0,05; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>) i KI (*Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>).

### 5.1.5. Interacció d'EFG1<sup>R671C</sup> amb les subunitats del mitoribosoma

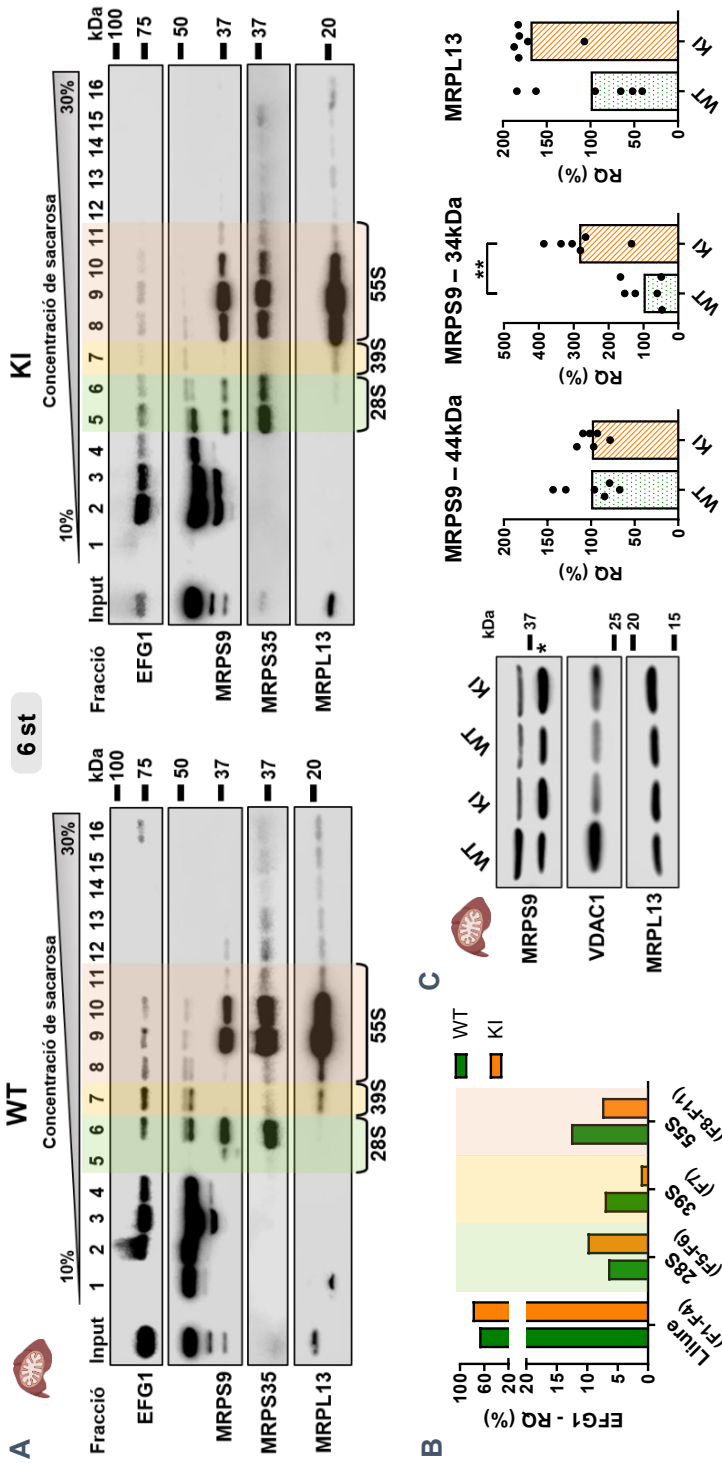
Per dur a terme la seua funció en la traducció mitocondrial, el factor d'elongació EFG1 necessita interaccionar amb el mitoribosoma. Amb l'objectiu d'analitzar si la mutació p.R671C podria alterar la unió d'EFG1 al mitoribosoma acoblat (55S) i a les subunitats petita (SSU – 28S) i gran (LSU – 39S) lliures, es van dur a terme experiments de separació en gradients de sacarosa. Tal i com es detalla a l'apartat 4.8, es van aïllar i subfraccionar extractes mitocondrials de fetge per centrifugació a través d'un gradient de densitat lineal de sacarosa 10%-30%, analitzant posteriorment el perfil de co-migració d'EFG1 amb proteïnes de la SSU (MRPS9 i MRPS35) i de la LSU (MRPL13) i comparant el resultat de mostres de ratolins *Gfm1*<sup>+/+</sup> i *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> (Figura 5.9A,B).

La distribució entre les fraccions del gradient dels marcadors de les subunitats gran (MRPL13, 21 kDa) i petita (MRPS9, 34 kDa i MRPS35, 37 kDa) del mitoribosoma ens va permetre localitzar la subunitat petita lliure (28S) a les fraccions 5 i 6, la subunitat gran lliure (39S) a la fracció 7, i el ribosoma sencer acoblat (55S) a les fraccions 8, 9 i 10 (*Figura 5.9A*).

L'anticòs que es va utilitzar contra MRPS9 va donar lloc a bandes de pesos moleculars superiors a l'esperat, a més de la seva banda específica de 34 kDa (*Figura 5.9, input al panell A, i panell C*), que es van localitzar majoritàriament en fraccions de baixa densitat (fraccions 1-5). Ignorem la identitat d'aquestes bandes d'alt pes molecular, tot i que podria tractar-se de la pròpia proteïna associada a altres pèptids o formes no completes de la subunitat petita del mitoribosoma.

L'anàlisi de la distribució d'EFG1 entre les diferents fraccions va mostrar que, als mitocondris d'ambdós ratolins, la major part del factor d'elongació (amb i sense la mutació p.R671C) sedimentava en les fraccions 2, 3 i 4 (69% per a *Gfm1<sup>+/+</sup>* i 79% per a *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*). Aquestes són fraccions de baixa densitat on no s'ubica cap subunitat del mitoribosoma, de manera que interpretem que es tracta majoritàriament d'EFG1 lliure.

La forma EFG1 no mutada va co-sedimentar per igual amb les subunitats 28S (7% a les fraccions 5-6) i 39S (7% a la fracció 7), amb un percentatge superior associat al mitoribosoma sencer (13% a les fraccions 8-11). En canvi, la proteïna mutada (EFG1<sup>R671C</sup>), es va trobar en un percentatge superior associada a la subunitat petita (10% a les fraccions 5-6, vs 7% de la forma no mutada), i inferior associada a la subunitat gran (1% a la fracció 7, vs 7% de la forma no mutada) i al mitoribosoma sencer (8% a les fraccions 8-11, vs 13% de la forma no mutada) (*Figura 5.9B*).



**Figura 5.9. Efecte de la mutació p.R671C sobre la interacció EFG1-mitribosoma.** (A) Perfils de co-sedimentació d'EFG1 amb proteïnes de la subunitat petita 28S (MRPS9 i MRPS35) i de la subunitat gran 39S (MRPL13) del mitribosoma en mitocondris de fetge de ratolins WT i KI. Les proteïnes es detecten per western SDS-PAGE a les fraccions de cada gradient (números) i a l'extracte mitocondrial inicial (input). (B) Quantificació d'EFG1, MRPS9, MRPS35 i MRPL13 per densitometria en cada fracció (F) del mitribosoma, referint-se la quantitat total de cada proteïna al conjunt de les fraccions. (C) Western blots representatius i quantificació per densitometria de MRPS9 i MRPL13. Es corregeix per VDAC1 (control de càrrega). Els valors individuals de cada ratolí, representats com a punts, s'expressen com a percentatge de la mitjana dels WT, i les barres representen la quantitat mitjana. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*\*p<0,01; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>) i KI (*Gfm1*<sup>R671C</sup>).

Per tant, tot i la dràstica reducció del contingut de proteïna EFG1<sup>R671C</sup> en els ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* en comparació amb la forma no mutada en els ratolins *Gfm1<sup>+/+</sup>*, la forma predominant en els dos casos és la lliure, amb percentatges similars. No obstant això, el fet que la mutació afecti la distribució d'EFG1 que cosedimenta amb el mitoribosoma sencer o a les seves subunitats podria suggerir que el canvi p.R671C afebleix la interacció de la proteïna amb el mitoribosoma, tot i que no la impedeix.

D'altra banda, les anàlisis per western blot de les mitoriboproteïnes en extractes mitocondrials de fetge de ratolins de 6 setmanes d'edat van detectar un augment significatiu de MRPS9 (banda de 34 kDa) als ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* (169% ± 30%, mitjana ± SD, referit a la mitjana dels WT), observant-se una tendència similar amb MRPL13 que no va arribar a assolir significança estadística per la dispersió dels valors de les mostres (*Figura 5.9C*). Aquesta situació, causada per sobre-expressió i/o estabilització de les mitoriboproteïnes, podria ser conseqüència d'un mecanisme molecular de resposta davant la depleció i possible disfunció d'EFG1<sup>R671C</sup>.

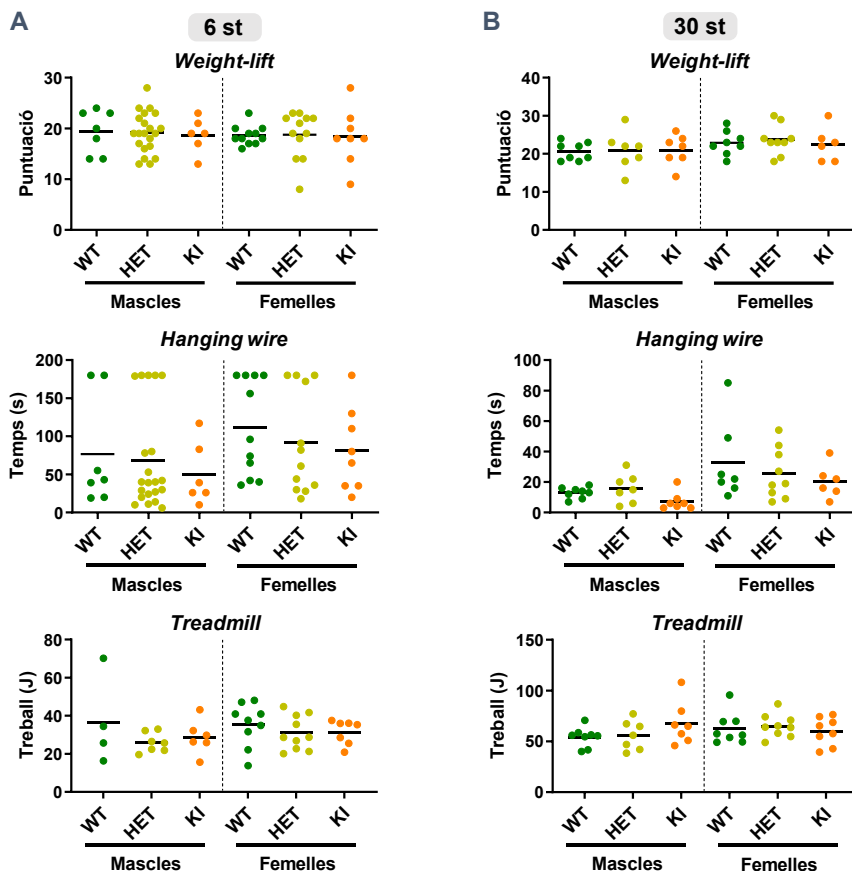
## 5.1.6. Avaluació de la condició física i fenotip hepàtic

### 5.1.6.1. Tests d'exercici físic

Al quadre clínic dels pacients amb COXPD1, entre les múltiples afectacions que s'han descrit que pateixen, hi destaca l'afectació muscular greu associada a l'encefalopatia.

És per això que, tot i que a simple vista el model de ratolí *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* no manifestava cap alteració fenotípica relacionada, es va avaluar la força muscular i resistència a l'exercici físic en ratolins de 4-6 setmanes d'edat i 30 setmanes d'edat (*Figura 5.10*).

Cap dels tres tests aplicats (*weight-lift*, *hanging wire* i *treadmill*) va permetre detectar cap efecte de la mutació p.R671C sobre les capacitats físiques dels ratolins, un cop comparats els ratolins *Gfm1<sup>+/+</sup>*, *Gfm1<sup>R671C/+</sup>* i *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* joves i adults dels dos sexes.

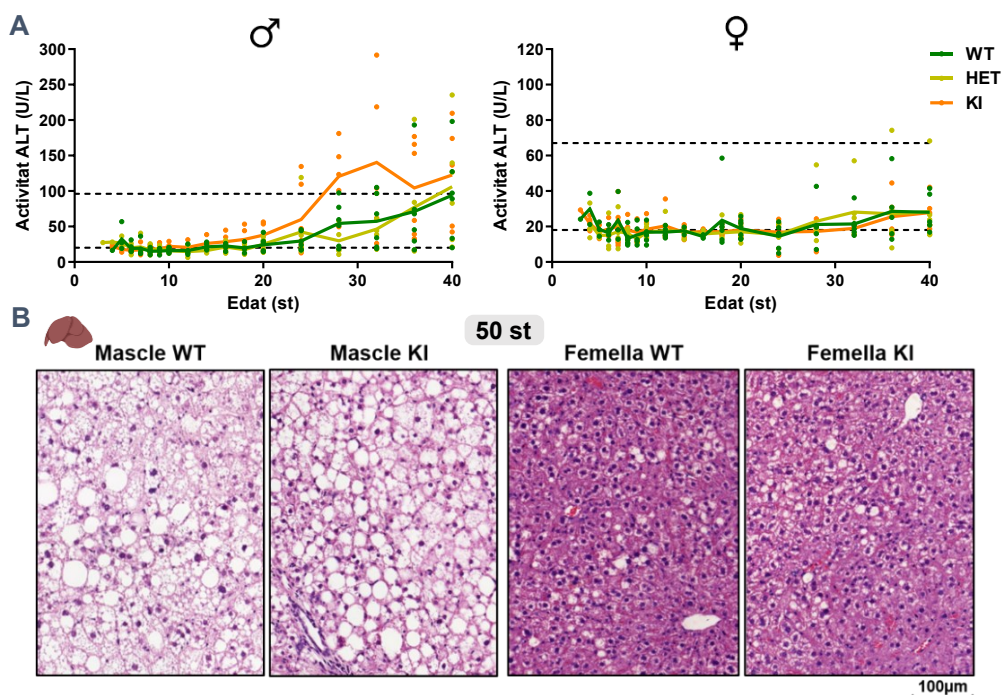


**Figura 5.10. Tests d'exercici físic sobre ratolins  $Gfm1^{R671C/R671C}$ .** La resistència física i força muscular es van avaluar en ratolins de 4-6 setmanes d'edat (A) i 30 setmanes d'edat (B), separant els animals per sexes. La puntuació del *weight-lift* representa la suma de temps (segons) que cada ratolí pot aixecar els diferents pesos (màxim de 5 s per pes). Al test *hanging wire* s'anota el temps que els animals es mantenen agafats del filferro penjat a 30 cm d'alçada fins caure. El treball exercit al *treadmill* es calcula com el producte entre la massa del ratolí, la força gravitatòria i la distància recorreguda. Els punts representen valors de ratolins individuals i les línies horitzontals representen mitjana dels valors. Ratolins WT ( $Gfm1^{+/+}$ ), HET ( $Gfm1^{R671C/+}$ ) i KI ( $Gfm1^{R671C/R671C}$ ).

### 5.1.6.2. Estudi de l'afectació hepàtica

La insuficiència hepàtica s'ha reportat en diversos pacients amb COXPD1, coincidint amb els casos més greus i desencadenant la mort prematura. Com que l'activitat ALT representa un marcador bioquímic útil per detectar dany hepatocel·lular, es van monitoritzar el seus nivells al plasma dels ratolins des del seu deslletament (3 setmanes d'edat) i fins les 40 setmanes d'edat. Les anàlisis efectuades van revelar un increment moderat de l'activitat ALT en alguns mascles a partir de les 24

setmanes d'edat; arribant a superar-se el 95% de l'interval de confiança per a valors del fons genètic C57BL6/Ntac<sup>231</sup>. Aquesta tendència, malgrat ser més clara al grup de mascles *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>, no va resultar significativa a nivell estadístic. A les femelles, en cap dels tres genotips es va detectar aquest increment de l'activitat ALT amb l'edat (Figura 5.11A).



**Figura 5.11. Avaluació de l'afectació hepàtica als ratolins *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>.** (A) Monitoratge de l'activitat ALT en plasma de ratolins des del deslletament fins les 40 setmanes d'edat. Les línies discontinues indiquen el 95% de l'interval de confiança per a valors del fons genètic murí C57BL6/Ntac<sup>231</sup>. Els punts fan referència a valors de ratolins individuals i les línies segueixen la mitjana dels valors. Es distingeix entre ambdós sexes i genotips. (B) Captures representatives de tincions hematoxilina-eosina sobre talls de 4 µm de fetges parafinats provinents de ratolins de 50 setmanes d'edat. S'aprecia estatòsi micro- i macrovesicular més pronunciada als mascles WT i KI. Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>), HET (*Gfm1*<sup>R671C/+</sup>) i KI (*Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>).

D'altra banda, es van dur a terme tincions hematoxilina-eosina (HE) sobre talls de fetge parafinats de ratolins de 50 setmanes d'edat. Es va observar un dany hepàtic més acusat als mascles que a les femelles. Les valoracions histològiques posteriors sobre els talls de fetge de mascles van revelar esteatosi hepatocel·lular de grau 2 i 3 (amb micro- i macrovesícules lipídiques), *ballooning* de grau 1 i 2, i inflamació lobular tant en ratolins *Gfm1*<sup>+/+</sup> com *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> (Figura 5.11B).

Aquests trets van confirmar la presència d'un perfil d'esteatohepatitis no alcohòlica (suma de les puntuacions  $\geq 5$ ) o un perfil d'esteatosi pròxim a aquesta condició (suma de les puntuacions de 3-4)<sup>226</sup>, fet que concorda amb l'increment d'activitats ALT observat prèviament.

Com que l'avanç cap a un perfil d'esteatosi hepàtica es va produir independentment del genotip dels ratolins, aquest tret no es va poder associar al defecte molecular del CIV causat per la traducció mitocondrial disfuncional dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*.

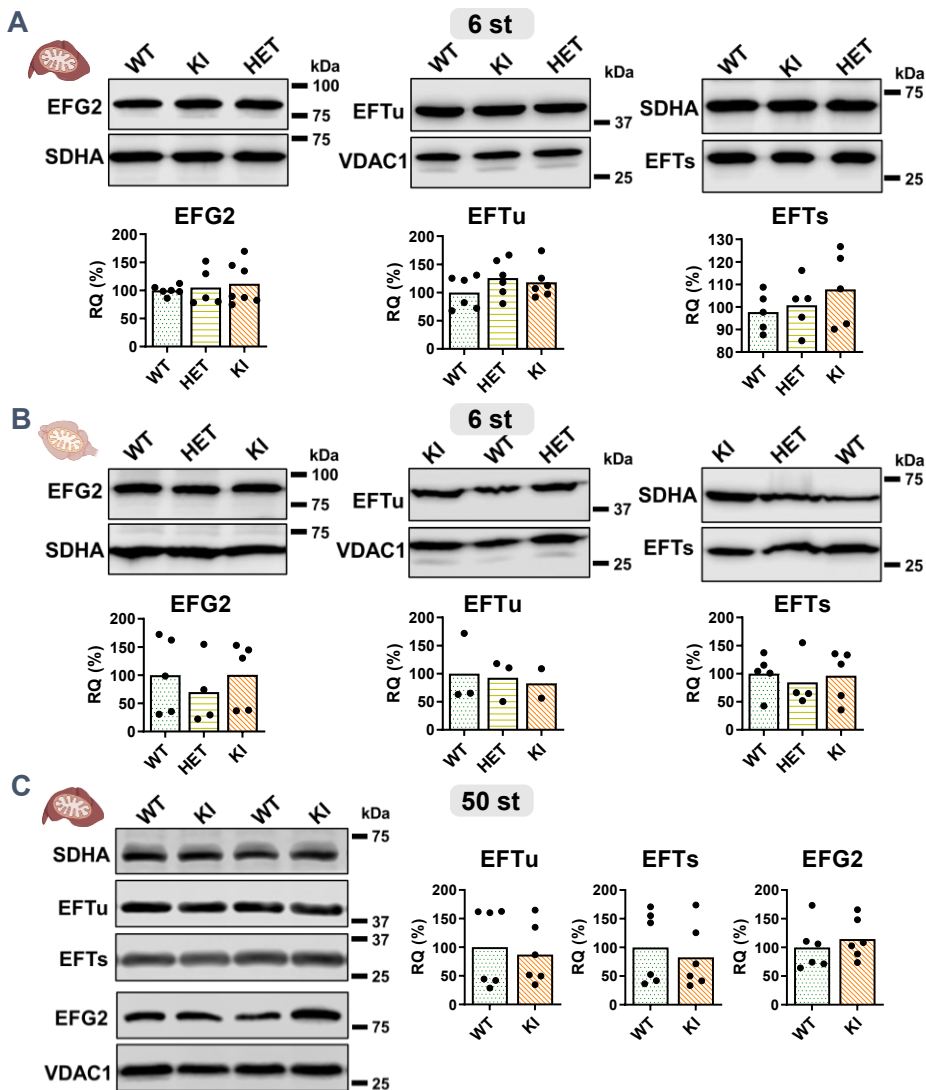
### 5.1.7. Cerca de mecanismes moleculars de resposta

Com a possibles mecanismes moleculars de resposta que poguessin estar compensant el dèficit d'EFG1 en els ratolins es van explorar l'expressió d'altres factors implicats a la traducció mitocondrial, el número de còpies d'ADNmt i els nivells d'expressió d'ARN codificats a l'ADNmt (ARNmt).

#### 5.1.7.1. Expressió de factors implicats a la traducció mitocondrial

Es va analitzar per immunodetecció per western blot els nivells de les proteïnes implicades a la traducció mitocondrial EFTs i EFTu (factors d'elongació) i EFG2 (factor de reciclatge del mitoribosoma). Les anàlisis efectuades sobre extractes mitocondrials de fetge a les 6 i 50 setmanes d'edat, i cervell de ratolins de 6 setmanes d'edat no van revelar cap alteració significativa en els ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* (Figura 5.12).

Tanmateix, les mateixes anàlisis efectuades sobre mitocondris de cor i ronyó de ratolins joves tampoc van mostrar alteració dels nivells dels factors de traducció en el grup KI<sup>230</sup>. Prèviament, i seguint la mateixa línia, ja s'havien descartat per RT-qPCR alteracions en l'expressió a nivell d'ARNm d'EFTu, EFTs i EFG2 en fetge, cervell, cor, ronyó i gastrocnemi de ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* de 6 setmanes d'edat<sup>230</sup>.

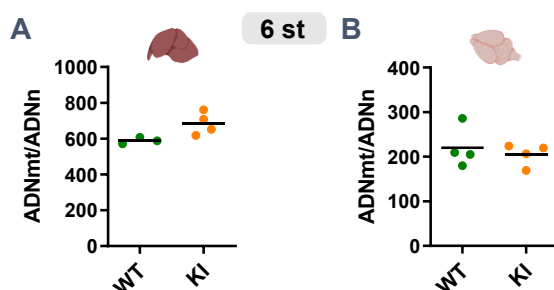


**Figura 5.12. Expressió de factors de traducció mitocondrial en fetge i cervell de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>.** Western blots representatius dels factors d'elongació EFTu i EFTs, i el factor de terminació EFG2 en extractes mitocondrials de fetge a les 6 setmanes d'edat (**A**), cervell a les 6 setmanes d'edat (**B**) i fetge a les 50 setmanes d'edat (**C**). Les quantificacions per densitometria d'aquestes proteïnes es van corregir per els nivells de SDHA o VDAC1 (utilitzades com a proteïnes control de massa mitocondrial). Els valors, expressats com quantitat relativa (RQ), representen el percentatge de la mitjana dels WT. Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent i les barres representen la mitjana de cada grup. Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>), HET (*Gfm1*<sup>R671C/+</sup>) i KI (*Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>).



### 5.1.7.2. Número de còpies d'ADNmt

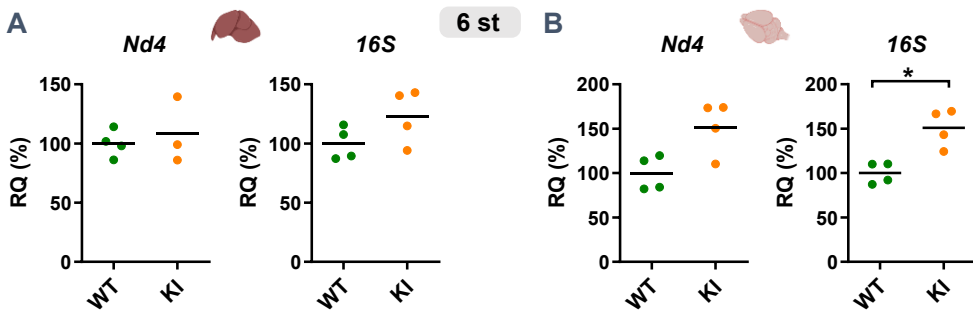
L'anàlisi per qPCR del número de còpies d'ADNmt es va efectuar sobre mostres d'ADN total de fetge i cervell de ratolins de 6 setmanes d'edat, detectant el número de còpies del gen *mt-Rnr2* (que codifica a l'ARNr 16S) i normalitzant el valor obtingut per la quantitat d'ADNn (número de còpies d'*Ang1*). No van arribar a detectar-se diferències significatives entre el número de còpies d'ADNmt dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* i *Gfm1<sup>+/+</sup>* en cap dels dos teixits, malgrat que en fetge es va apreciar una tendència a estar lleugerament incrementats al model KI (*Figura 5.13*).



**Figura 5.13. Número de còpies d'ADNmt en fetge i cervell de ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*.** El número de còpies d'ADNmt es va determinar per qPCR en extractes d'ADN total de fetge (A) i cervell (B) provinents de ratolins de 6 setmanes d'edat. Es van utilitzar sondes *Taqman* específiques per detectar el número de còpies del gen mitocondrial 16S i el gen nuclear *Ang1*, i obtenir el ratio equivalent a ADNmt/ADNn. Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent i les línies horitzontals representen la mitjana. Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*) i KI (*Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*).

### 5.1.7.3. Nivells d'ARN mitocondrials

La sobreexpressió i/o estabilització dels ARN mitocondrials (ARNmt) podria ser un mecanisme resposta versemblant davant d'alteracions a la traducció mitocondrial. Com que la transcripció mitocondrial tan sols produeix dos transcrits policistrònics i la majoria dels ARNmt es transcriuen a partir de la cadena pesada, es van analitzar els estats basals d'ARN dels gens mitocondrials *mt-Rnr2* i *mt-Nd4* (que codifiquen respectivament per a l'ARNr 16S i ND4) en fetge i cervell de ratolins de 6 setmanes d'edat. Els dos ARN mitocondrials van mostrar una tendència a estar incrementats als dos teixits estudiats dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* (*Figura 5.14*), assolint-se significança estadística en el cas de l'ARNr 16S al cervell ( $151\% \pm 21\%$ , mitjana  $\pm$  SD, referit a la mitjana dels WT).

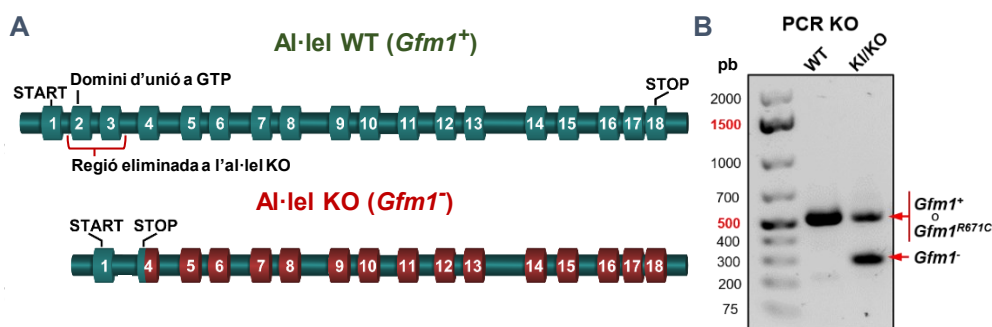


**Figura 5.14. Nivells d'ARN mitocondrials en fetge i cervell de ratolins  $Gfm1^{R671C/R671C}$ .** Els nivells basals d'ARN dels gens *mt-Nd4* (Nd4) i *mt-Rnr2* (16S) es van quantificar per RT-qPCR i normalitzar respecte els de l'ARNm de *Ppia*. Les determinacions es van dur a terme sobre mostres d'ARN total de fetge (**A**) i cervell (**B**) de ratolins de 6 setmanes d'edat. Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent i les línies horitzontals representen la mitjana. Els asteriscs indiquen significança estadística (\* $p < 0,05$ ; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT ( $Gfm1^{+/+}$ ) i KI ( $Gfm1^{R671C/R671C}$ ).

## 5.2. Model de ratolí heterozigot compost *Gfm1*<sup>R671C/-</sup>

### 5.2.1. Generació del ratolí *Gfm1*<sup>R671C/-</sup>

Amb la intenció d'obtenir un model de ratolí amb un fenotip més proper al dels pacients amb COXPD1, es va generar per CRISPR/Cas9 un al·lel *knock-out* constitutiu de *Gfm1* (KO, *Gfm1*<sup>-</sup>). Tal i com es detalla a l'*apartat 4.2*, es van eliminar els exons 2 i 3 de *Gfm1*, donant lloc a l'aparició d'un codó STOP prematur a l'exó 4 que prediu la síntesi d'una forma aberrant d'EFG1 posteriorment degradada (*Figura 5.15*).



**Figura 5.15. Generació de l'al·lel *knock-out* de *Gfm1*.** (A) Esquema dels al·lells WT (*Gfm1*<sup>+</sup>) i KO (*Gfm1*<sup>-</sup>). La deleció dels exons 2 i 3 mitjançant CRISPR/Cas9 genera una alteració en la pauta de lectura que dona lloc a un codó stop prematur a l'exó 4. Els exons després del codó stop estan ressaltats en vermell. (B) Gel d'electroforesi representatiu per detectar l'al·lel *Gfm1*<sup>-</sup>. El producte d'amplificació de la PCR KO genera un fragment de 318 pb (al·lel *Gfm1*<sup>-</sup>) o un fragment de 548 pb (al·lells *Gfm1*<sup>+</sup> i *Gfm1*<sup>R671C</sup>). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>) i KI/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>).

Cap dels aparellaments entre ratolins heterozigots KO (*Gfm1*<sup>+/-</sup>) va permetre identificar el genotip *Gfm1*<sup>-/-</sup> en ratolins nounats (*Gfm1*<sup>+/+</sup>: 38,2% i *Gfm1*<sup>+/-</sup>: 61,8%). Addicionalment, un estudi en paral·lel dut a terme en el propi grup va descartar la presència d'embrions *Gfm1*<sup>-/-</sup> de 10,5 i 13,5 dies de gestació, i la valoració anatòmica de l'úter de les femelles gestants va detectar amb freqüència llocs d'implantació buits als dies 10,5 i 13,5 post-coit. La distribució dels genotips *Gfm1*<sup>+/+</sup> (33,3%) i *Gfm1*<sup>+/-</sup> (66,7%) en aquests estadis va confirmar la letalitat embrionària a conseqüència de la pèrdua completa de proteïna EFG1 (*Taula 5.1*), demostrant que la funció del factor d'elongació és essencial en la traducció mitocondrial i la seua absència completa és incompatible amb el desenvolupament embrionari en ratolins.

Taula 5.1. Freqüència de genotips als aparellaments de ratolins

Aparellament	KI/WT x KI/WT	KO/WT x KO/WT	KI/WT ♂ x KO/WT ♀	KO/WT ♂ x KI/WT ♀	KI/KO x KI/KO
<b>Nº de cries (n)</b>	291	68	82	78	64
<b>WT (n; %)</b>	79; 27,1%	26; 38,2%	23; 28,0%	20; 25,6%	n.a.
<b>KO/WT (n; %)</b>	n.a.	42; 61,8%	15; 18,3%	19; 24,4%	n.a.
<b>KO (n; %)</b>	n.a.	0; 0,0%	n.a.	n.a.	0; 0,0%
<b>KI/WT (n; %)</b>	144; 49,5%	n.a.	21; 25,6%	16; 20,5%	n.a.
<b>KI/KO (n; %)</b>	n.a.	n.a.	23; 28,0%	23; 29,5%	38; 59,4%
<b>KI (n; %)</b>	68; 23,4%	n.a.	n.a.	n.a.	26; 40,6%
<b>Nº d'embrions</b>	n.i.	36	15	n.i.	22
<b>WT (n; %)</b>	n.i.	12; 33,3%	1; 6,7%	n.i.	n.a.
<b>KO/WT (n; %)</b>	n.i.	24; 66,7%	5; 33,3%	n.i.	n.a.
<b>KO (n; %)</b>	n.i.	0; 0,0%	n.a.	n.i.	0; 0,0%
<b>KI/WT (n; %)</b>	n.i.	n.a.	6; 40,0%	n.i.	n.a.
<b>KI/KO (n; %)</b>	n.i.	n.a.	3; 20,0%	n.i.	14; 61,9%
<b>KI (n; %)</b>	n.i.	n.a.	n.a.	n.i.	8; 38,1%

n: número; n.a.: no aplicable; n.i.: no investigat. Tots els embrions es van estudiar a dia 13,5 post coit (dpc), excepte per a l'aparellament KO/WT x KO/WT, on 22 embrions es van estudiar a dpc 13,5 i 14 embrions a dpc 10,5.

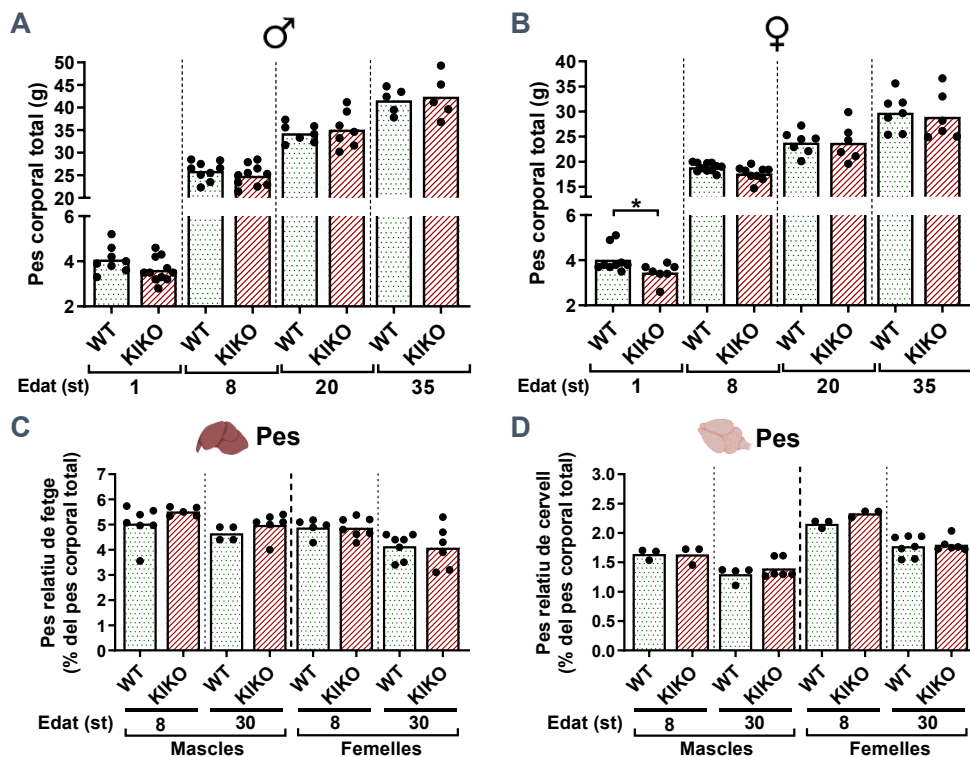
Davant d'aquest escenari es va optar per aparellar ratolins *Gfm1*<sup>R671C/+</sup> i *Gfm1*<sup>+/-</sup> per tal de generar ratolins heterozigots compostos *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> (KI/KO), amb una única còpia funcional de *Gfm1*, que al seu torn contingués la mutació c.2011\_2013delinsTGC.

Es va comprovar la segregació mendeliana de l'al·lel KO, amb distribució equitativa entre els dos sexes i independentment de si l'al·lel provenia de gàmetes masculins o femenins (Taula 5.1), fet que va demostrar la viabilitat dels ratolins amb genotip *Gfm1*<sup>R671C/-</sup>.

## 5.2.2. Anàlisi de pes i supervivència

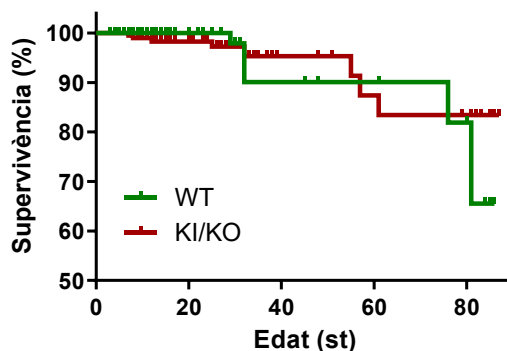
Es va seguir el pes corporal dels ratolins (a 1, 8, 20 i 35 setmanes d'edat), detectant una tendència dels animals *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> a presentar un pes inferior en ratolins d'una setmana d'edat, que va assolir significança estadística en el cas de les femelles (WT: 4 g ± 0,56 g, n=9; KI/KO: 3,45 g ± 0,42 g, n=7). No obstant això, després del

deslletament els pesos entre ratolins dels dos genotips es van igualar tant en mascles com en femelles deixant de detectar-se diferències (Figura 5.16A, B). A les 8 i 30 setmanes d'edat el pes de fetge i cervell en ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* es va mantenir normal als dos sexes en comparació amb els animals *Gfm1<sup>+/+</sup>* (Figura 5.16C,D).



**Figura 5.16. Pes corporal total, de fetge i cervell al model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*.** Control del pes corporal dels ratolins a 1, 8, 20 i 35 setmanes d'edat en mascles (A) i femelles (B). Pes relatiu de fetge (C) i cervell (D) expressat com a percentatge del pes corporal total per a cada animal. Les mesures es van fer sobre teixits de ratolins de 8 i 30 setmanes d'edat, separant per sexes. Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent i les barres representen la mitjana de cada grup. Els asteriscs indiquen significança estadística (\* $p < 0,05$ ; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*) i KIKO (*Gfm1<sup>R671C/-</sup>*).

Es va observar que els ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* presentaven una supervivència equiparable a la dels ratolins WT almenys fins les 80 setmanes d'edat (Figura 5.17). A més, els aparellaments entre animals d'aquest genotip va demostrar la fertilitat de mascles i femelles *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* (Taula 5.1).



**Figura 5.17. Estudi de supervivència del ratolí  $Gfm1^{R671C/-}$ .** Proporcions de supervivència, Curva Kaplan-Meier comparant els ratolins WT (n=294) i KI/KO (n=201). Les observacions censurades apareixen com a punts a la gràfica. Els tests *Log-rank (Mantel-Cox)* i *Log-rank test for trend* van descartar diferències estadístiques entre les corbes de supervivència. Ratolins WT ( $Gfm1^{+/+}$ ) i KI/KO ( $Gfm1^{R671C/-}$ ).

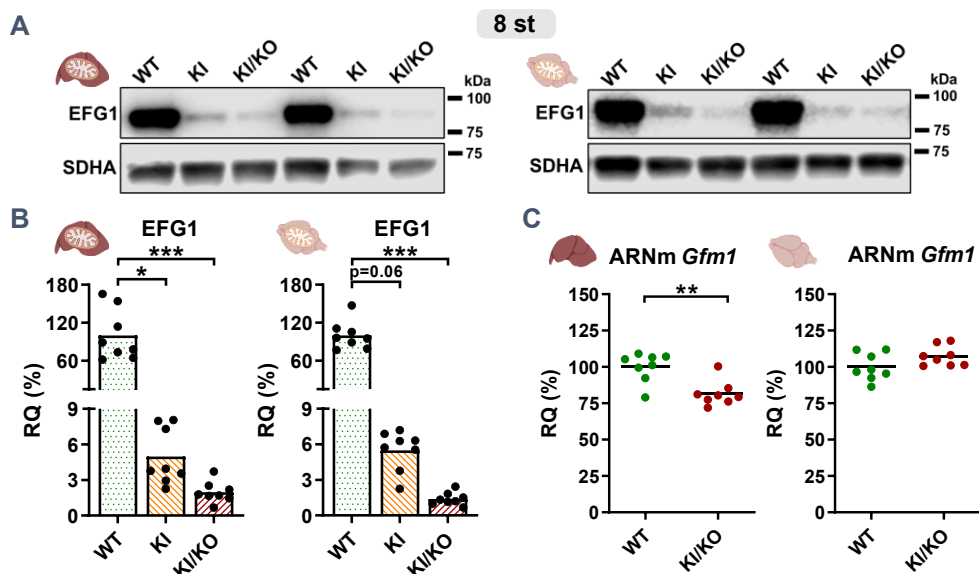
### 5.2.3. Quantificació dels nivells mitocondrials d'EFG1

Les anàlisis per western blot van revelar una reducció d'EFG1 més accentuada als ratolins  $Gfm1^{R671C/-}$  de 8 setmanes d'edat, tant en mitocondris de fetge ( $98,0\% \pm 0,9\%$ ; mitjana del percentatge de reducció dels nivells WT  $\pm$  SD) com de cervell ( $98,4\% \pm 0,5\%$ ), en comparació amb la reducció observada als ratolins  $Gfm1^{R671C/R671C}$  de la mateixa edat (fetge:  $95,0\% \pm 2,4\%$ ; cervell:  $94,5\% \pm 1,7\%$ ) (Figura 5.18A,B).

A les 30 setmanes d'edat es va observar que els animals  $Gfm1^{R671C/-}$  mantien la reducció d'EFG1 als mitocondris d'ambdós teixits (fetge:  $97,7\% \pm 0,8\%$ ; cervell:  $97\% \pm 0,6\%$ ) (Figura supl. 2).

El fet que els ratolins KI/KO presentin un reducció d'aproximadament el 50% d'EFG1 en comparació amb els animals KI recolza la predicció que la proteïna provinent de l'al·lel *knock-out* devia ser aberrant i degradar-se ràpidament. A més a més, es van detectar reduccions d'EFG1 similars sobre extractes proteics totals de cor als ratolins de 8 setmanes d'edat (KI:  $91,6 \pm 1,7\%$ ; KI/KO:  $97,5\% \pm 0,5\%$ ; reduccions respecte de WT) (Figura supl. 7A).

A diferència dels nivells de proteïna EFG1, els nivells basals d'ARNm de *Gfm1* quantificats per RT-qPCR a les 8 setmanes d'edat tan sols es van veure lleugerament reduïts al fetge del model KI/KO (18,5% ± 8,5%; % de reducció vs WT), mentre que en mostres de cervell no es van detectar diferències entre ratolins WT i KI/KO (Figura 5.18C).

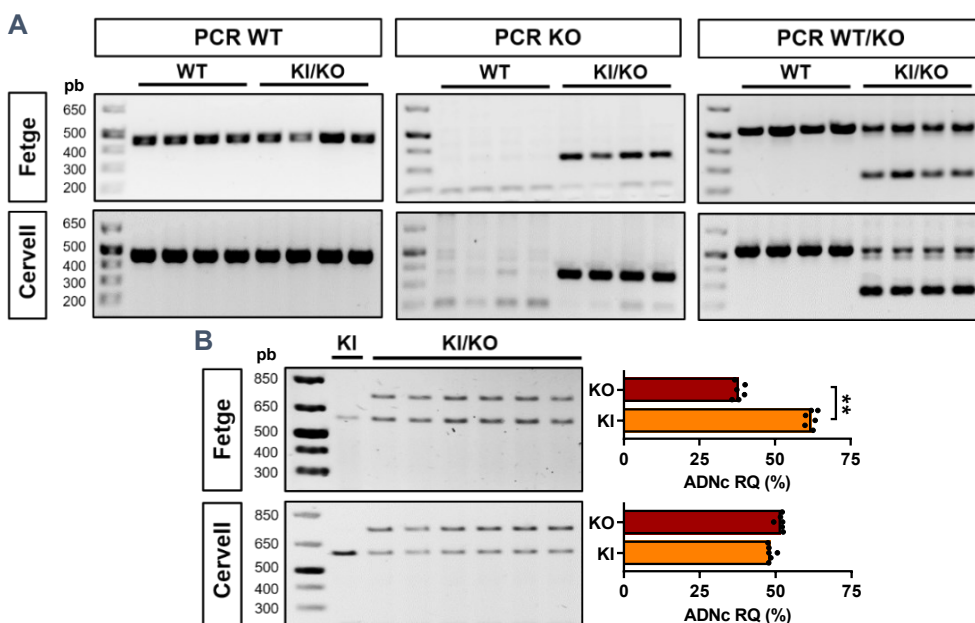


**Figura 5.18. Expressió d'EFG1 en fetge i cervell de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> de 8 setmanes d'edat.** (A) Western blots representatius per detectar EFG1 en mitocondris de fetge i cervell de ratolins de 8 setmanes d'edat. (B) Quantificacions per densitometria dels nivells d'EFG1. Cada valor es corregeix per SDHA i normalitza respecte d'una mostra calibradora carregada a tots els western blots. Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent i els seus valors, expressats com quantitat relativa (RQ), representen el percentatge de la mitjana dels WT. Es va aplicar el test Kruskal-Wallis i quan es van detectar diferències significatives (p < 0,05), es van comparar els grups WT, KI i KI/KO entre ells aplicant el test de comparacions múltiples de Dunn. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001). (C) Nivells basals d'ARNm de *Gfm1* quantificats per RT-qPCR i normalitzats respecte els nivells d'ARNm de *Ppia*. Els valors s'expressen com a RQ (percentatge de la mitjana dels WT). Cada punt és una mostra provinent d'un ratolí diferent i les línies horitzontals representen la mitjana. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*\*p < 0,01; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>), KI (*Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>) i KI/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>).

L'ARNm provinent de l'al·lel *Gfm1*<sup>-</sup> manca dels exons 2-3 i presenta un codó stop prematur a l'exó 4, fent que aquesta variant fos susceptible de ser degradada per el mecanisme *Non-Sense Mediated mRNA Decay* (NMD)<sup>232</sup>. Com que la sonda *Taqman* utilitzada per quantificar l'ARNm de *Gfm1* no permet distingir entre les

variants provinents dels al·lels WT, KI i KO (amplifica els exons 8-9 del gen), es van implementar PCRs convencionals sobre mostres d'ADNc de fetge i cervell de ratolins KI/KO i WT, podent detectar la variant *Gfm1*<sup>-</sup> (Figura 5.19A) i suggerint que almenys una part d'aquesta no es degrada.

Per tal d'aprofundir en aquest aspecte, es van determinar per RFLP els percentatges d'ARNm dels al·lels KO i KI sobre el total d'ARNm de *Gfm1* en mostres d'ADNc de ratolins KI/KO. Al cervell, els percentatges d'ARNm dels dos al·lels es trobaren en nivells similars (KO: 51,7% ± 1,2%; KI: 48,3% ± 1,2%); mentre que en fetge es van detectar nivells més baixos de l'ARNm KO que del KI (KO: 38,0% ± 1,7%; KI: 62,0% ± 1,7%) (Figura 5.19B).



**Figura 5.19. Anàlisi de l'ARNm *Gfm1* en fetge i cervell. (A)** Detecció de l'ARNm *Gfm1* KO al fetge i cervell de ratolins KI/KO de 8 setmanes d'edat. Les PCRs permeten distingir els ADNc WT (PCR WT), KO (PCR KO) i tots dos per separat (PCR WT/KO) després de separar els amplicons en gels d'agarosa (*apartat 4.11.4*). **(B)** Anàlisi RFLP dels nivells d'ARNm KO sobre el total de transcrits de *Gfm1* en mostres de fetge i cervell de ratolins KI/KO. El producte PCR KI + Digestió amb *NcoI* es va separar per electroforesi en gel d'agarosa i els fragments es van densitometrar i corregir per la seua mida (pb) (*apartat 4.11.4*). Com a control es va fer servir una mostra de ratolí KI. Els gràfics representen la quantitat relativa d'ARNm KO i KI com a percentatge sobre el total d'ADNc. Cada punt es correspon amb una mostra d'un ratolí diferent i les barres representen la mitjana dels valors de cada grup. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*\* $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>), KI (*Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>) i KI/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>).



Aquest resultat suggereix que en fetge l'ARNm KO podria ser subjecte d'una degradació parcial per NMD, mentre que en cervell aquest procés no té lloc; justificant per què la RT-qPCR no mostra la reducció del 50% als nivells d'ARNm de *Gfm1* al fetge i al cervell dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*.

### 5.2.4. Afectació de la traducció mitocondrial

Es va analitzar la taxa de traducció mitocondrial mitjançant experiments de tipus *pulse* sobre extractes mitocondrials de fetge i cervell. Sobre ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* de 8 setmanes d'edat es va detectar una reducció més pronunciada de síntesi *de novo* dels polipèptids codificats a l'ADNmt en fetge ( $39,6\% \pm 6,3\%$ ; mitjana  $\pm$  SD), en comparació amb la disfunció present al model *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* ( $65,4\% \pm 11,3\%$ ) (Figura 5.20A).

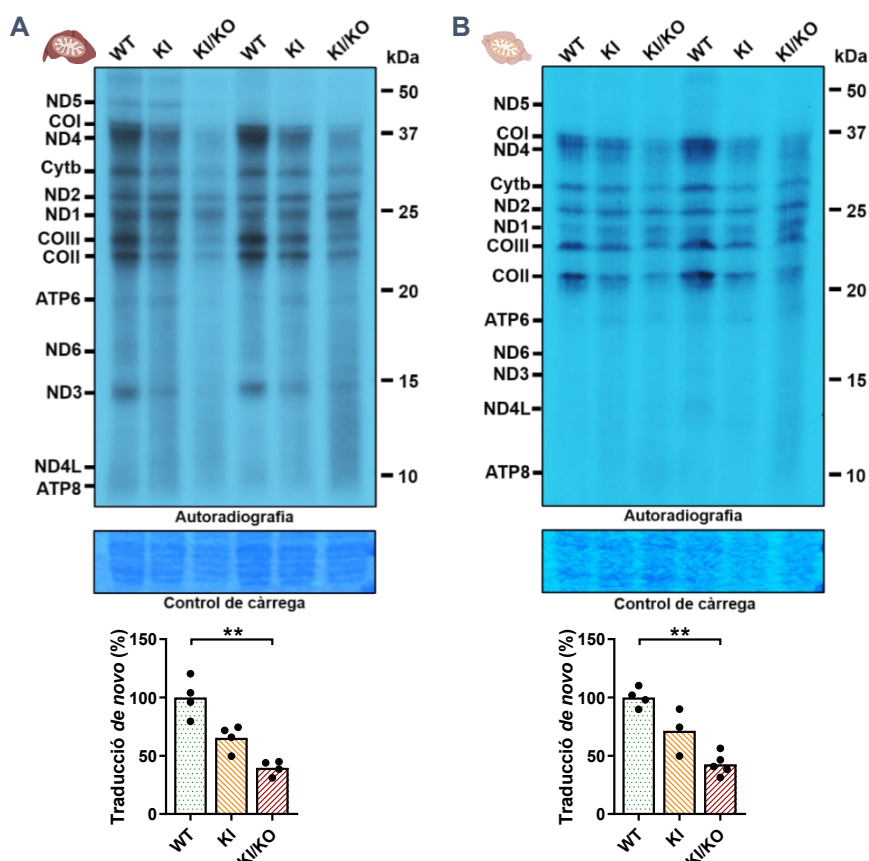


Figura 5.20. Traducció mitocondrial en fetge i cervell de ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* de 8 setmanes d'edat. Peu de figura a la següent pàgina.

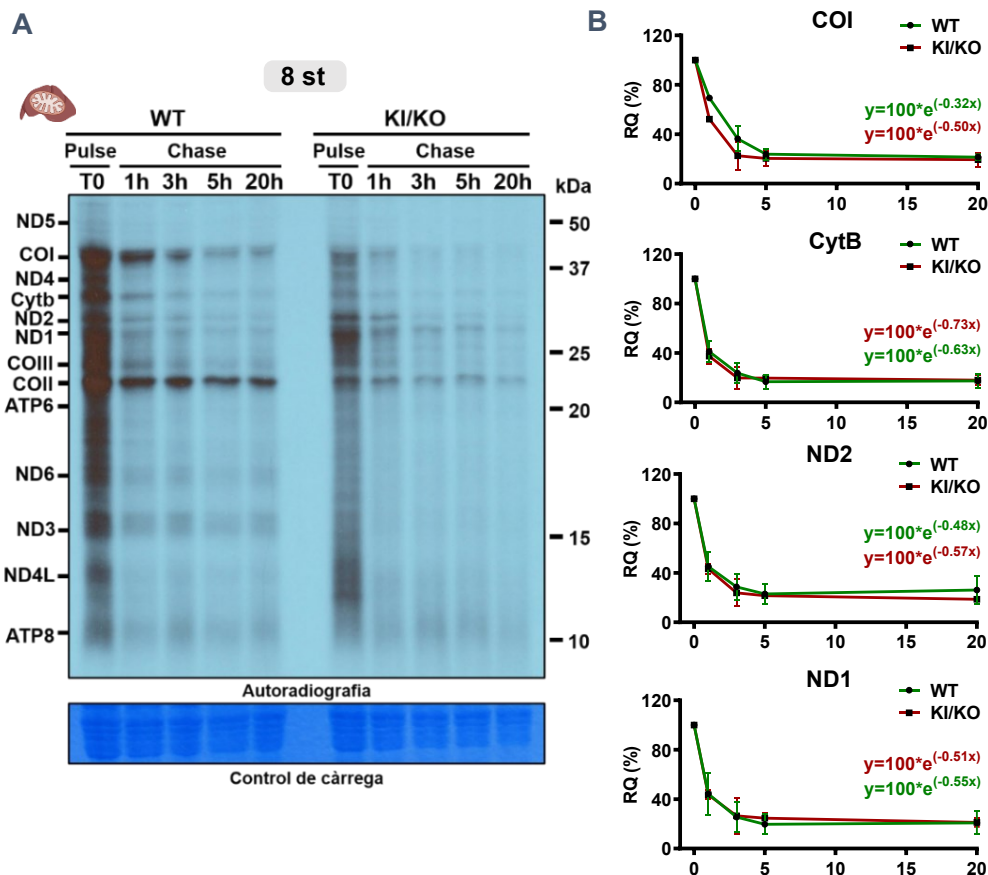
**Figura 5.20. Traducció mitocondrial en fetge i cervell de ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* de 8 setmanes d'edat.** La traducció mitocondrial *in organello* (fases *pulse*) es va efectuar sobre extractes mitocondrials de fetge (A) i cervell (B). Les proteïnes sintetitzades *de novo* es marquen radioactivament i es detecten per autoradiografia. Per a cada mostra es densitometra el conjunt de bandes i el valor obtingut es corregeix per la quantitat total de proteïna carregada al gel i tenyida amb blau de Coomassie. S'obtenen valors de traducció mitocondrial *de novo*, que s'expressen com el percentatge de la mitjana dels WT. Les barres representen la mitjana de la quantitat relativa i els punts representen els valors de ratolins individuals. Es va aplicar el test Kruskal-Wallis i quan es van detectar diferències significatives ( $p < 0,05$ ), es van comparar els grups WT, KI i KI/KO entre ells mitjançant el test de comparacions múltiples de Dunn. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*\* $p < 0,01$ ). Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*), KI (*Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*) i KI/KO (*Gfm1<sup>R671C/-</sup>*).

A més a més, la reducció addicional dels nivells d'EFG1 va donar lloc a una baixada significativa de la taxa de traducció mitocondrial al cervell dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*, que no s'havia detectat al model *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* (KI/KO: 42,7%  $\pm$  9,4%; KI: 71,4%  $\pm$  20,3%) (Figura 5.20B).

Aquesta disfunció de la traducció mitocondrial es va sostenir almenys fins les 30 setmanes d'edat tant al fetge (56,5%  $\pm$  10,1%) com al cervell (62,1%  $\pm$  30,8%) dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* (Figura supl. 3).

A part dels experiments de tipus *pulse*, on s'havia avaluat la taxa de síntesi dels polipèptids mitocondrials (traducció mitocondrial *de novo*), també es va estudiar l'estabilitat dels nous polipèptids sintetitzats sobre extractes mitocondrials de fetge amb experiments *pulse-chase* (Figura 5.21).

Els resultats van mostrar com la vida mitjana de la proteïna COI (COXI, subunitat del CIV) sintetitzada *de novo* es veia disminuïda al model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* (KI/KO: 1,39 h; WT: 2,16 h). Contràriament, l'estabilitat de les subunitats del CI i del CIII no es va veure alterada als mitocondris de fetge del model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* (ND1 (KI/KO: 1,27 h; WT: 1,35 h), ND2 (KI/KO: 1,22 h; WT: 1,43 h) i Cytb (KI/KO: 0,94 h; WT: 1,11 h)) (Figura 5.21B). Llavors, a part de veure's disminuïda la taxa de traducció mitocondrial de forma generalitzada, la reducció de la vida mitjana de COXI suggereix que la fidelitat de traducció d'alguns polipèptids mitocondrials podria estar alterada almenys al fetge dels ratolins KI/KO joves.



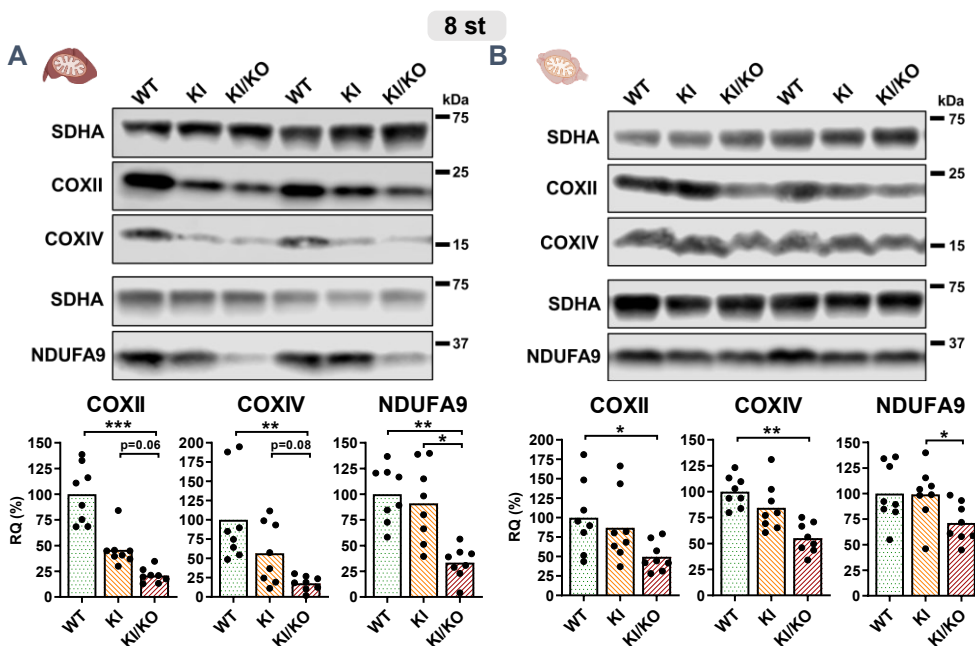
**Figura 5.21. Experiments *pulse-chase* en mitocondris de fetge de ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*.** (A) Autoradiografia de les proteïnes subjectes a les fases *pulse* i *chase* separades per SDS-PAGE. Les bandes més intenses (CO I, Cytb, ND1 i ND2) es van densitometrar i normalitzar per la quantitat total de proteïna tenyida amb Coomassie al gel (control de càrrega). (B) Es va fer l'experiment per duplicat i cada punt representa la mitjana ( $\pm$ SD) de la quantitat relativa referida a la fase *pulse* (T0) corresponent. La vida mitjana de cada pèptid es va calcular com a  $\ln(2)/K$  utilitzant la regressió no-lineal de caiguda d'una fase  $Y=Y_0 \cdot \exp(-K \cdot t)$ ; on  $Y$  és la quantitat residual de proteïna a un temps  $t$ , expressada com al percentatge de la banda a temps zero, que és  $Y_0 = 100$  (*pulse*); i  $K$  és el paràmetre que determina la velocitat de degradació de cada polipèptid. Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*) i KI/KO (*Gfm1<sup>R671C/-</sup>*).

## 5.2.5. Anàlisi del fenotip COXPD molecular al fetge i cervell

### 5.2.5.1. Reducció dels nivells de subunitats dels complexos CI i CIV

Es va dur a terme la immunodetecció per western blot de subunitats de CI i CIV. La reducció de la quantitat de proteïnes NDUFA9 (codificada a l'ADNn, del CI), COXII i COXIV (codificades a l'ADNmt i ADNn respectivament, del CIV) va ser més

pronunciada als ratolins KI/KO que als KI a les 8 setmanes d'edat. Concretament, en mitocondris de fetges KI/KO i prenent com a referència els valors dels ratolins WT, els nivells de NDUFA9 van ser  $33,5\% \pm 15,7\%$  (mitjana  $\pm$  SD), de COXII  $20,8\% \pm 7,2\%$  i de COXIV  $17,7\% \pm 9,3\%$ . Aquesta reducció va ser menys marcada al cervell d'aquest model, on els nivells de NDUFA9 van ser  $71,3\% \pm 19,0\%$ , de COXII  $49,7\% \pm 18,8\%$  i de COXIV  $55,3\% \pm 14,5\%$  (Figura 5.22).



**Figura 5.22. Nivells de subunitats dels complexos I i IV en fetge i cervell dels ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> de 8 setmanes d'edat.** Western blots representatius de subunitats del CIV (COXII i COXIV) i del CI (NDUFA9) en extractes mitocondrials de fetge (A) i cervell (B). Les quantificacions per densitometria de les tres proteïnes es van corregir per SDHA. Els valors, expressats com quantitat relativa (RQ), representen el percentatge de la mitjana dels WT. Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent i les barres representen la mitjana relativa per a cada grup. Es va aplicar el test Kruskal-Wallis i quan es van detectar diferències significatives ( $p < 0,05$ ), es van comparar els grups WT, KI i KI/KO entre ells aplicant el test de comparacions múltiples de Dunn. Els asteriscs indiquen significança estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>), KI (*Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>) i KI/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>).

A més a més, als ratolins KI i KI/KO vam observar una correlació positiva entre la quantitat d'EFG1 i de COXII i COXIV en mitocondris de fetge ( $p < 0,05$  i  $p < 0,01$  respectivament; test rho Spearman) i de cervell ( $p < 0,05$ ).

La mateixa anàlisi duta a terme sobre ratolins de 30 setmanes d'edat va mostrar que els ratolins KI/KO continuaven mantenint una reducció dels nivells de les proteïnes mitocondrials al fetge (NDUFA9: 69,3% ± 20,3%; COXII: 54,0% ± 8,7%; COXIV: 57,8% ± 6,6%) i cervell (NDUFA9: 74,4% ± 17,6%; COXII: 57,2% ± 19,1%; COXIV: 70,6% ± 16,0%) (*Figura supl. 4*).

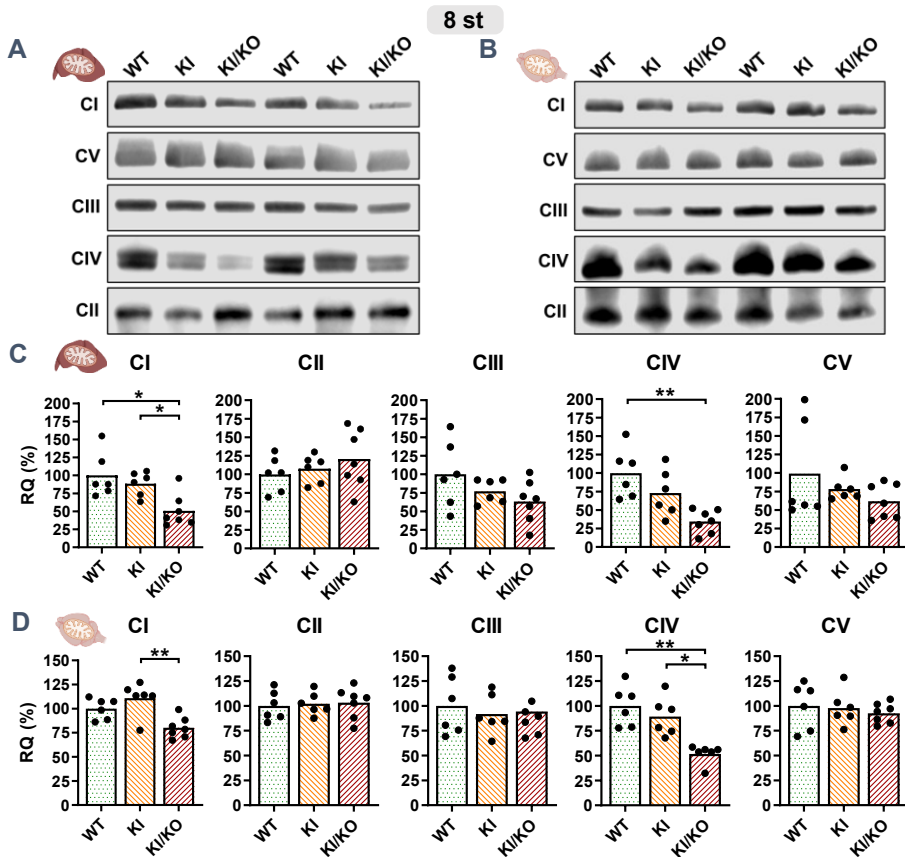
### 5.2.5.2. Alteració dels nivells de complexos OXPHOS

Els complexos OXPHOS acoblats es van analitzar mitjançant western blot BN-PAGE sobre extractes mitocondrials de fetge i cervell.

En ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* de 8 setmanes d'edat es van detectar, tant en fetge com en cervell, reduccions dels complexos CI (fetge: 50,7% ± 22,9%; cervell: 80,1% ± 10,8%; mitjana del percentatge de reducció respecte WT ± SD) i CIV (fetge: 34,5% ± 15,9%; cervell: 51,7% ± 9,7%) (*Figura 5.23*).

A més, en mitocondris de ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* i *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* es va observar una correlació positiva entre els nivells d'EFG1 i la quantitat de CI (en fetge i cervell) i de CIV (en cervell) ( $p < 0,05$ ; test rho Spearman).

D'altra banda, en mitocondris de fetge i cervell dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* de 30 setmanes d'edat es va conservar la reducció dels complexos CI (fetge: 62,9% ± 21,9%; cervell: 74,8% ± 32,6%) i CIV (fetge: 25,9% ± 22,9%; cervell: 50,0% ± 29,4%) (*Figura supl. 5*).

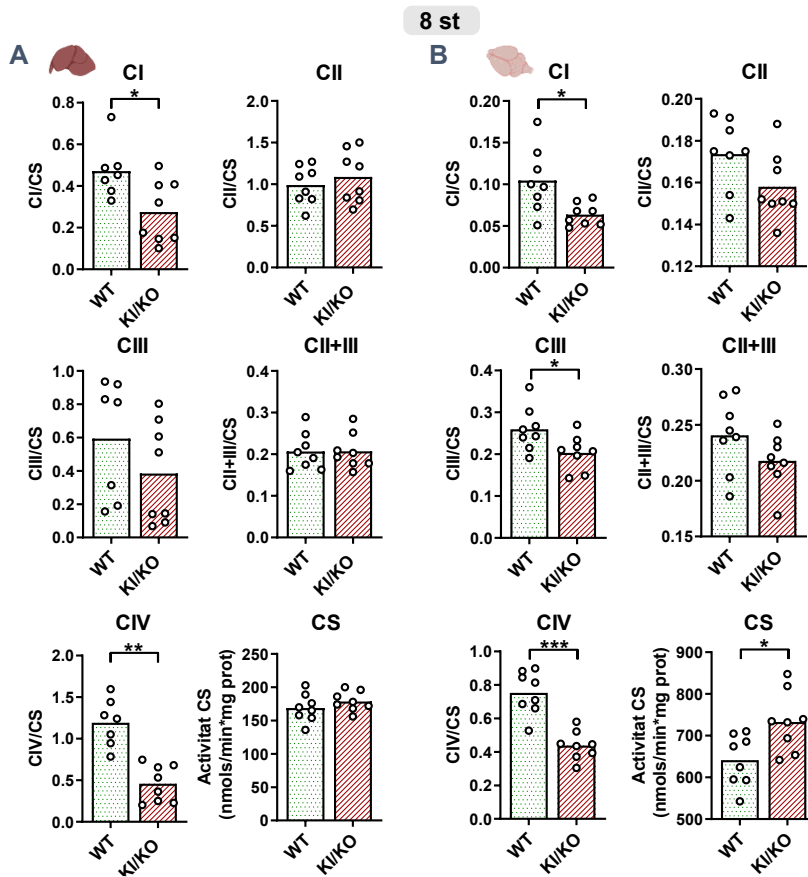


**Figura 5.23. Complexos OXPHOS en mitocondris de fetge i cervell de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> a les 8 setmanes d'edat.** Quantificació dels complexos OXPHOS acoblats en mitocondris de fetge (**A, C**) i cervell (**B, D**) per BN-PAGE amb anticossos contra CI (NDUFA9), CII (SDHA), CIII, (UQCRC2), CIV (COXIV) i CV (ATP5A). La quantitat relativa (RQ) es va determinar per densitometria de la banda de complex, normalitzada per la quantitat de complex II i referida a una mostra calibradora carregada a tots els western blots. En (**C**) i (**D**) els punts representen valors de ratolins individuals que s'expressen com al percentatge de la mitjana dels WT; i les barres representen la mitjana dels valors de cada grup. Es va aplicar el test Kruskal-Wallis i quan es van detectar diferències significatives ( $p < 0,05$ ), es van comparar els grups WT, KI i KI/KO entre ells aplicant el test de comparacions múltiples de Dunn. Els asteriscs indiquen significança estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>), KI (*Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>) i KI/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>).

### 5.2.5.3. Afectació de les activitats enzimàtiques de la CTE

Les determinacions de les activitats enzimàtiques dels complexos de la CTE sobre homogenats de fetge i cervell de ratolins de 8 setmanes d'edat van permetre detectar al model *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> una reducció de l'activitat del CIV en fetge ( $38,4\% \pm 18,7\%$ ; mitjana  $\pm$  SD, referit a la mitjana WT) i cervell ( $62,9\% \pm 21,9\%$ ).

També es va detectar una disminució de l'activitat del CI en ambdós teixits (fetge:  $52,1\% \pm 24,8\%$ ; cervell:  $60,9\% \pm 12,5\%$ ) i del CIII en cervell ( $78,4\% \pm 16,1\%$ ) que prèviament no havien estat observades al model *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*. A més, es va detectar un increment de l'activitat CS als cervells KI/KO ( $114,2\% \pm 11,3\%$ ) (*Figura 5.24*).



**Figura 5.24. Activitats enzimàtiques dels complexos de la CTE en fetge i cervell de ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* a les 8 setmanes d'edat.** Activitat enzimàtica dels complexos CI, CII, CIII, CII+III i CIV normalitzada respecte l'activitat citrat sintasa (CS) sobre homogenats de fetge (A) i cervell (B). Els cercles oberts representen valors de ratolins individuals i les barres fan referència a la mitjana dels valors de cada grup. Els asteriscs indiquen significança estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*) i KI/KO (*Gfm1<sup>R671C/-</sup>*).

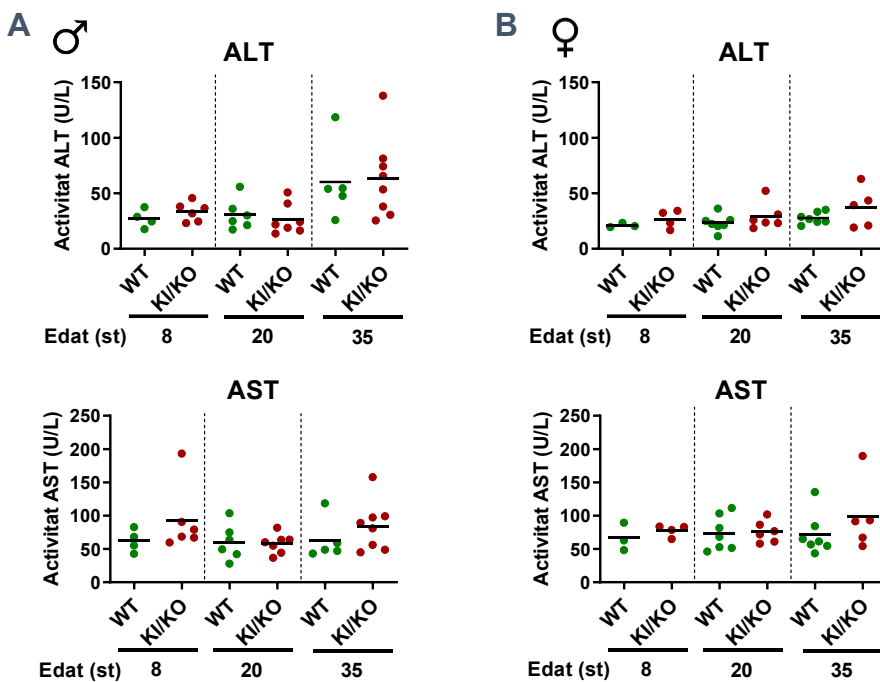
Respecte a l'evolució del fenotip amb l'edat, a les 30 setmanes d'edat es va mantenir l'afectació de la CTE en fetge i cervell als ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*, és a dir, disminució de de les activitats del CI (fetge:  $53,6\% \pm 20,9\%$ ; cervell:  $70,0\% \pm 11,3\%$ ), CIII (fetge:  $45,8\% \pm 20,3\%$ ; cervell:  $80,2\% \pm 10,4\%$ ) i CIV (fetge:  $33,9\% \pm 14,6\%$ ; cervell:  $81,3\%$

$\pm 9,2\%$ ). I en aquest cas, l'increment de l'activitat CS es va observar als fetges dels ratolins KI/KO ( $124,1\% \pm 14,3\%$ ) (*Figura supl. 6*).

Finalment, esmentar que al cor dels ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> de 8 setmanes d'edat es va detectar una activitat del CIV significativament inferior respecte a la del grup *Gfm1*<sup>+/+</sup> ( $74,7\% \pm 22,9\%$ ; mitjana  $\pm$  SD, referit a la mitjana WT), a diferència del model *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> on no s'havia detectat afectació del CIV (*Figura supl. 7B*).

### 5.2.6. Anàlisi de marcadors bioquímics en plasma

Com a marcadors de dany hepàtic en plasma es van determinar les activitats enzimàtiques de l'ALT i l'aspartat aminotransferasa (AST) sobre plasma de ratolins *Gfm1*<sup>+/+</sup> i *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> a les 8, 20 i 35 setmanes d'edat (*Figura 5.25*).

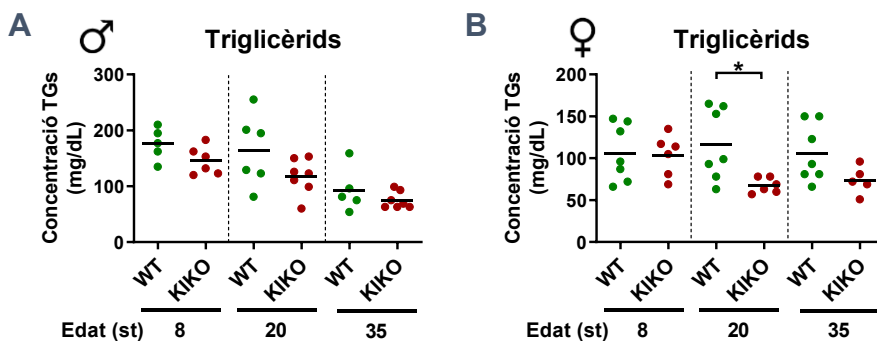


**Figura 5.25. Activitats ALT i AST al plasma de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup>.** Les activitats de l'ALT i l'AST es van determinar sobre el plasma de ratolins mascles (A) i femelles (B) de 8, 20 i 35 setmanes d'edat. Els punts representen els valors individuals i les barres horitzontals marquen la mitjana de cada grup. Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>) i KI/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>).



En cap dels dos sexes es van detectar alteracions significatives d'aquests marcadors bioquímics comparant els ratolins KI/KO amb els WT i únicament es va poder apreciar que l'ALT tendia a incrementar-se amb l'edat als ratolins mascles (a les 35 setmanes), independentment del genotip (Figura 5.25).

D'altra banda es va determinar la concentració de triglicèrids (TGs) en plasma de ratolins. Aquests són els principals lípids emmagatzemats al fetge de pacients amb esteatosi hepàtica (o fetge gras no alcohòlic). Es va poder observar una tendència dels ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> a presentar nivells inferiors de TGs en plasma en comparació amb grup *Gfm1*<sup>+/+</sup>, resultat que en el cas de les femelles va ser estadísticament significatiu a les 20 setmanes d'edat. Aquest tret podria suggerir una certa alteració al metabolisme lipídic, possiblement com a conseqüència del perfil COXPD hepàtic dels ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> (Figura 5.26).



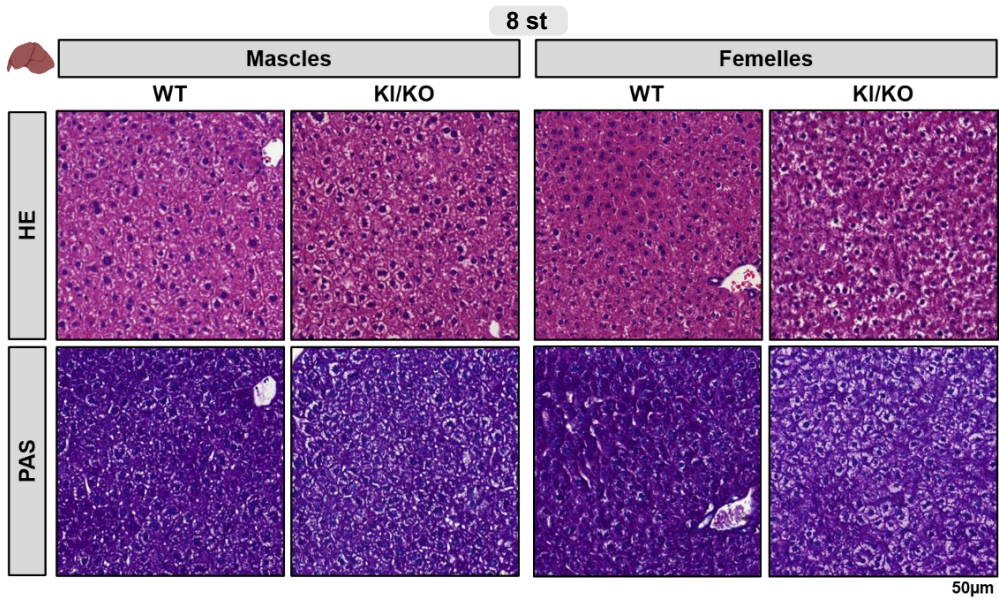
**Figura 5.26. Seguiment de la concentració de TGs al plasma de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup>.** Es va analitzar la concentració de triglicèrids (TGs) sobre el plasma de ratolins mascles (A) i femelles (B) de 8, 20 i 35 setmanes d'edat. Els punts representen els valors individuals i les barres horitzontals marquen la mitjana de cada grup. Els asteriscs indiquen significança estadística (\* $p < 0,05$ ; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>) i KI/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>).

Pel que fa a la concentració de lactat, no es va observar alterada al plasma dels ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> ni a les 8 ni a les 20 setmanes d'edat, comparant amb ratolins WT. Les concentracions d'amoni i fosfatasa alcalina tampoc es van trobar alterades en ratolins KI/KO joves (de 8 setmanes d'edat) (Figura supl. 8).

### 5.2.7. Estudi histològic del fenotip hepàtic

Les anàlisis histològiques de fetge no van permetre detectar trets diferencials entre ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* i *Gfm1<sup>+/+</sup>* joves i adults en cap dels dos sexes.

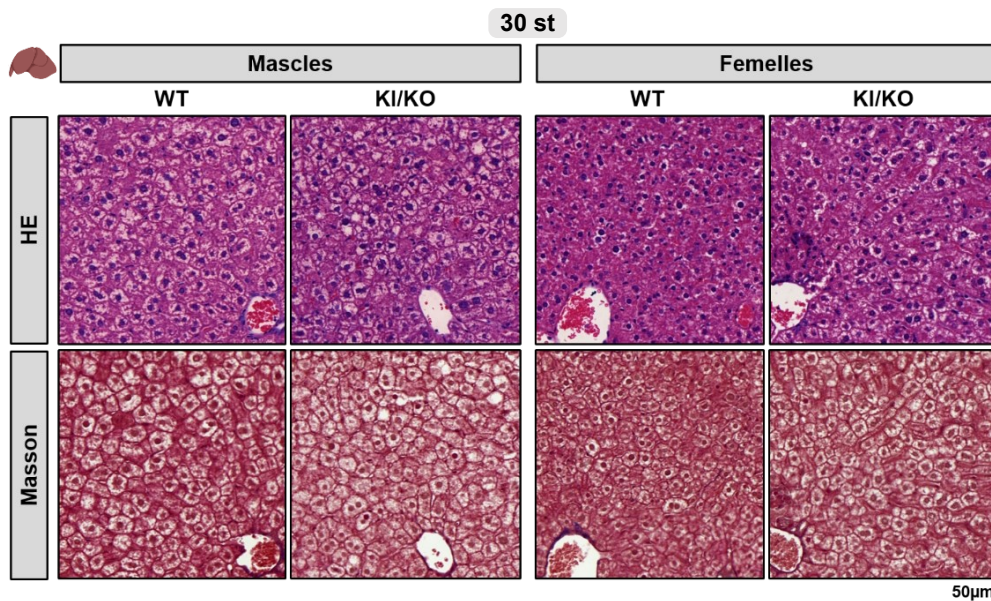
Als fetges de ratolins de 8 setmanes d'edat les tincions HE van revelar un aclariment citoplasmàtic dels hepatòcits tant en animals WT com KI/KO. A més, la tinció PAS va descartar que aquesta clarificació vingués donada per acumulacions de glicogen. Llavors, en el cas de ser deposicions lipídiques podria tractar-se d'un perfil primerenc d'esteatosi hepatocel·lular (grau 1-2) sense *ballooning* ni inflamació lobular (*Figura 5.27*).



**Figura 5.27.** Histologia de fetge en ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* de 8 setmanes d'edat. Captures representatives de tincions hematoxilina-eosina (HE) i d'àcid periòdic-Schiff (PAS) sobre talls de 4 µm de fetges parafinats provinents de ratolins mascles i femelles de 8 setmanes d'edat. Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*) i KI/KO (*Gfm1<sup>R671C/-</sup>*).

D'altra banda, en fetges de ratolins de 30 setmanes d'edat, la tinció HE va mostrar un grau d'aclariment citoplasmàtic més accentuat que a les 8 setmanes d'edat i la tinció tricromàtica de Masson va descartar l'acumulació de col·lagen (i per tant de fibrosi) (*Figura 5.28*).

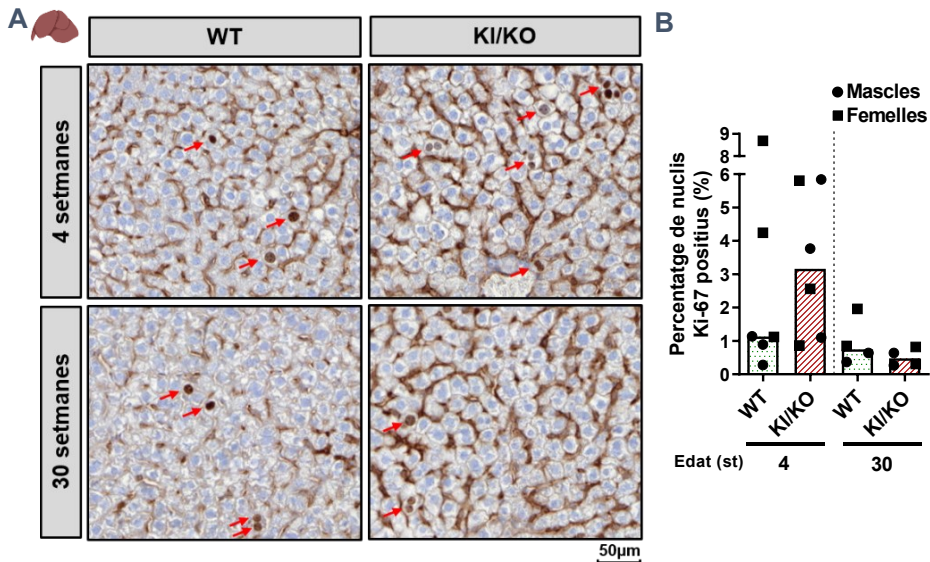
La valoració histològica de les dues tincions basant-se en el sistema de puntuació descrit per altres autors<sup>226</sup> va revelar un perfil d'esteatosi hepatocel·lular (grau 2-3) amb microvesícules lipídiques en la majoria dels fetges de ratolins adults, independentment del genotip.



**Figura 5.28. Histologia de fetge en ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* de 30 setmanes d'edat.** Captures representatives de tincions hematoxilina-eosina (HE) i tricromàtica de Masson sobre talls de 4 µm de fetges parafinats provinents de ratolins mascles i femelles de 30 setmanes d'edat. Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*) i KI/KO (*Gfm1<sup>R671C/-</sup>*).

Per últim, es va testar el grau de proliferació dels hepatòcits en ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* i *Gfm1<sup>+/+</sup>* tenyint per immunohistoquímica els nuclis positius per l'antigen Ki-67 que, per tant, es troben en divisió. Els comptatges realitzats en fetges de ratolins KI/KO a les 4 i 30 setmanes d'edat van mostrar un percentatge de nuclis en divisió normal, en comparació amb el grup WT, tot i que es va apreciar una tendència a que el grau de proliferació cel·lular fos inferior amb l'edat (*Figura 5.29*).

Tot plegat, la deficiència combinada de la fosforilació oxidativa al fetge del model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* no es va veure associada amb cap alteració histològica en el propi teixit ni en animals joves ni en adults.



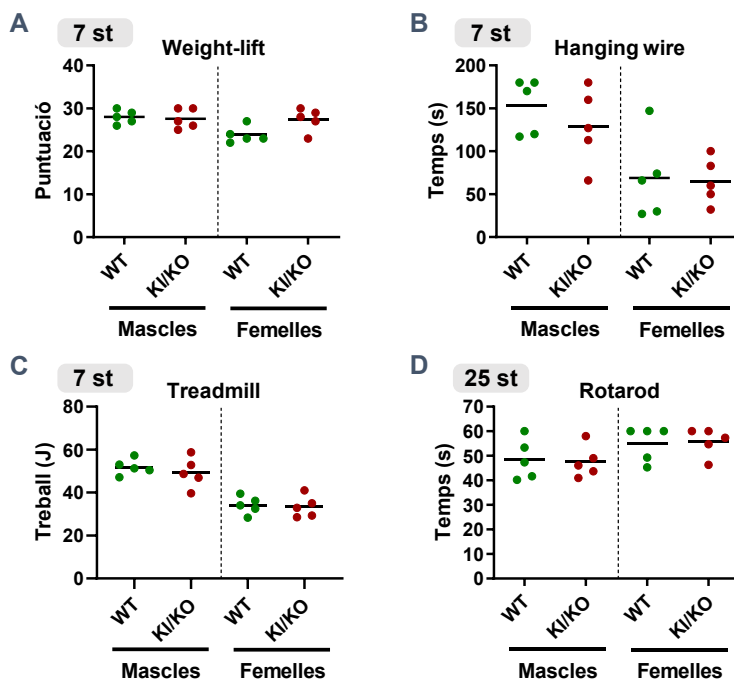
**Figura 5.29. Immunohistoquímica Ki-67 sobre fetges de ratolins  $Gfm1^{R671C/-}$ .** (A) Captures representatives de immunohistoquímica contra l'antígen Ki-67 sobre talls de 4  $\mu\text{m}$  de fetges parafinats provinents de ratolins de 4 i 30 setmanes d'edat. Les fletxes vermelles senyalitzen els nuclis positius (tenyits de marró). (B) Comptatges dels nuclis positius sobre el total de nuclis, expressats com a percentatges. L'anàlisi es va fer sobre 3 camps d'1mm<sup>2</sup> capturats a l'atzar amb l'objectiu de 10X per a cada tall. Els punts representen els valors de ratolins mascles, els quadrats de femelles i les barres la mitjana de cada grup. La comparació entre genotips dintre de cada edat (Mann-Whitney U-test) no va revelar diferències estadísticament significatives. Ratolins WT ( $Gfm1^{+/+}$ ) i KI/KO ( $Gfm1^{R671C/-}$ ).

### 5.2.8. Avaluació de l'exercici físic i fenotip neuromuscular

Es va testar la força muscular i la resistència física en ratolins joves (7 setmanes d'edat), aplicant els tests *weight-lift*, *hanging wire* i *treadmill*. Tant els mascles com les femelles  $Gfm1^{R671C/-}$  van obtenir resultats similars als dels ratolins  $Gfm1^{+/+}$  (Figura 5.30A, B, C) i no es va poder apreciar cap tret diferencial entre grups.

Més tard, sobre ratolins adults (25 setmanes d'edat) es va aplicar el test *rotarod*. Els resultats obtinguts tampoc van fer visibles diferències de coordinació motora, equilibri i resistència física entre els grups WT i KI/KO (Figura 5.30D).

Per tant, es pot dir que el perfil COXPD molecular que manifesta el model  $Gfm1^{R671C/-}$  en cervell no sembla que tingui associats defectes detectables a nivell físic i neuromuscular, almenys que siguin visibles amb els tests plantejats.



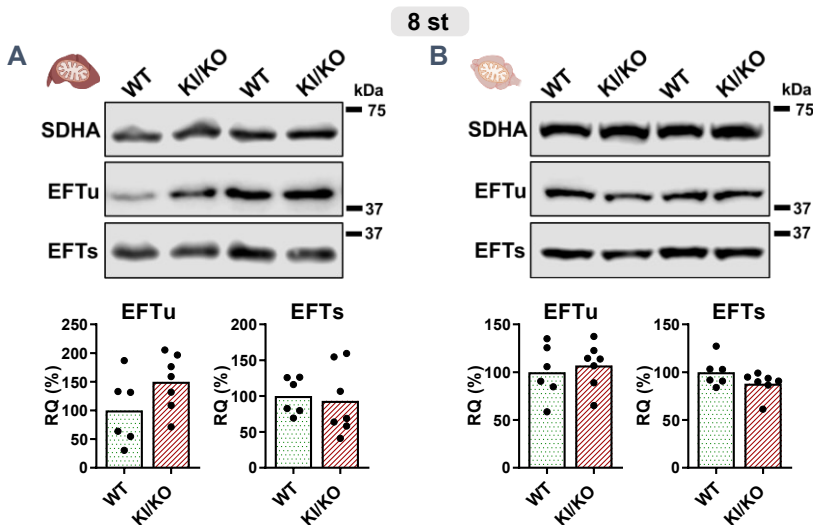
**Figura 5.30. Tests d'exercici físic i neuromusculars sobre el model  $Gfm1^{R671C/-}$ .** La resistència física, força muscular i coordinació motora es van avaluar en ratolins de 7 setmanes d'edat (**A, B, C**) i de 25 setmanes d'edat (**D**). La puntuació del *weight-lift* representa la suma de segons que cada ratolí aixeca els diferents pesos. Al test *hanging wire* s'anota el temps que els animals es mantenen agafats del filferro fins caure. El treball exercit al *treadmill* es calcula com el producte entre la massa del ratolí, la força gravitatòria i la distància correguda. Al test *rotarod* es registra el temps superat pels animals, sent el màxim 60 segons. Els punts representen valors de ratolins individuals i les línies horitzontals representen mitjana dels valors. Ratolins WT ( $Gfm1^{+/+}$ ) i KI/KO ( $Gfm1^{R671C/-}$ ).

### 5.2.9. Cerca de mecanismes moleculars de resposta al fetge i cervell

El model de ratolí  $Gfm1^{R671C/-}$ , tal i com s'ha descrit, presenta un clar fenotip molecular relacionat amb el de la COXPD1 tant en fetge com en cervell. No obstant això, la caracterització del model no va fer visible cap resultat indicatiu de patologia hepàtica i/o neuromuscular associada. Llavors es va decidir explorar mecanismes moleculars de resposta que poguessin estar estimulats en ambdós teixits i combatre la manifestació d'un fenotip més acusat: l'expressió d'altres factors de traducció, la massa mitocondrial, el número de còpies d'ADNmt, els nivells basals d'ARN mitocondrials i l'expressió de MRPs.

### 5.2.9.1. Estat basal d'altres factors d'elongació de la traducció mitocondrial

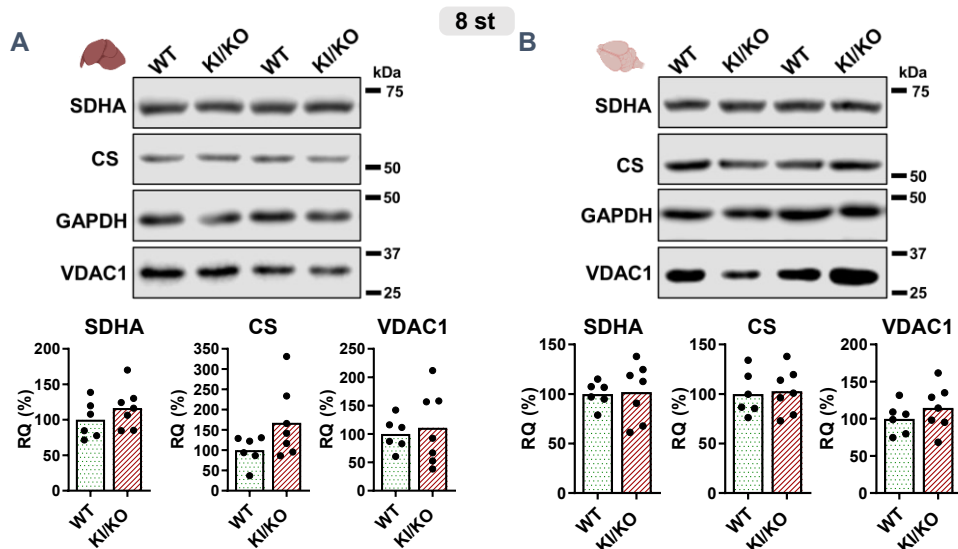
Es van analitzar els nivells dels factors EFTu i EFTs i no es van trobar alterats en mitocondris de fetge i cervell de ratolins KI/KO a les 8 setmanes d'edat, podent apreciar-se únicament una tendència d'EFTu a estar incrementat en mitocondris de fetges KI/KO (Figura 5.31).



**Figura 5.31.** Factors de traducció mitocondrial en fetge i cervell de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup>. Western blots representatius dels factors d'elongació EFTu i EFTs en extractes mitocondrials de fetge (A) i cervell (B) a les 8 setmanes d'edat. Les quantificacions per densitometria d'aquestes proteïnes es van corregir per les de SDHA. Els valors, expressats com quantitat relativa (RQ), representen el percentatge de la mitjana dels WT. Cada punt representa una mostra provinent d'un ratolí diferent i les barres indiquen la mitjana de cada grup. Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>) i KI/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>).

### 5.2.9.2. Massa mitocondrial

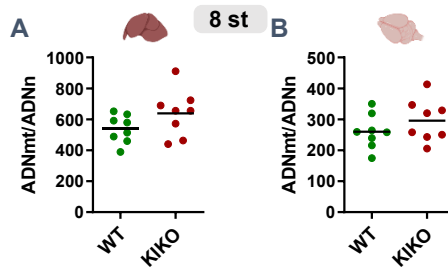
A les determinacions de les activitats enzimàtiques de CTE s'havia detectat una activitat CS major al cervell de ratolins KI/KO joves (Figura 5.23) i al fetge dels KI/KO adults (Figura supl. 6), suggestiva d'una major massa mitocondrial. Per tal d'indagar en aquest aspecte, es van analitzar per western blot les proteïnes CS, VDAC1 i SDHA sobre homogenats proteics de teixit total, i es va veure que l'estat basal d'aquestes proteïnes utilitzades normalment com a marcadors de massa mitocondrial no era significativament diferent als ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> en comparació amb els dels animals *Gfm1*<sup>+/+</sup> (Figura 5.32).



**Figura 5.32. Anàlisi de proteïnes indicadores de massa mitocondrial al fetge i cervell del model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*.** Western blots representatius de les proteïnes SDHA (subunitat flavoproteïna A del complex succinat deshidrogenasa), CS (citrat sintasa) i VDAC1 (proteïna 1 del canal d'anions dependent de voltatge) utilitzades com a marcadors de massa mitocondrial, sobre extractes de proteïna total de fetge (**A**) i cervell (**B**) de ratolins de 8 setmanes d'edat. Les quantificacions per densitometria de les tres proteïnes es van corregir per GAPDH (com a control de proteïna total). Els valors, expressats com quantitat relativa (RQ), representen el percentatge de la mitjana dels WT. Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent i les barres representen la mitjana relativa per a cada grup. Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*) i KI/KO (*Gfm1<sup>R671C/-</sup>*).

### 5.2.9.3. Número de còpies d'ADNmt

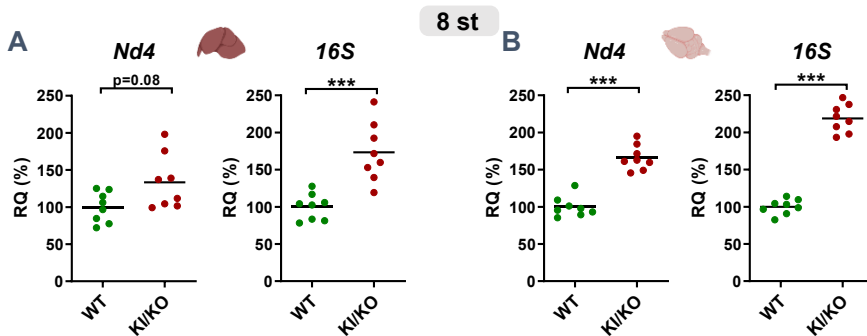
Es va quantificar per qPCR el número de còpies d'ADNmt sobre mostres d'ADN total de fetge i cervell de ratolins de 8 setmanes d'edat, i tot i que semblava apreciar-se una tendència a estar augmentats als teixits dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*, es van descartar diferències significatives en comparació amb el grup *Gfm1<sup>+/+</sup>* (Figura 5.33). Per tant, es va considerar que els processos associats a la replicació i/o manteniment de l'ADNmt no devien estar estimulats al fetge i cervell dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*.



**Figura 5.33. Número de còpies d'ADNmt en fetge i cervell de ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* joves.** El número de còpies d'ADNmt es va determinar per qPCR en extractes d'ADN total de fetge (A) i cervell (B) de ratolins de 8 setmanes d'edat. Es van utilitzar sondes *Taqman* específiques per detectar el número de còpies del gen mitocondrial *mt-Rnr2* (que codifica per a l'ARNr 16S) i el gen nuclear *Ang1*, i obtenir el ratio equivalent a ADNmt/ADNn. Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent i les línies horitzontals representen la mitjana dels valors de cada grup. Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*) i KI/KO (*Gfm1<sup>R671C/-</sup>*).

#### 5.2.9.4. Nivells d'ARN mitocondrials

Mitjançant les anàlisis per RT-qPCR es va detectar que a les 8 setmanes d'edat, en comparació amb els animals *Gfm1<sup>+/+</sup>*, els ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* tenien augmentats de forma considerable l'ARNm de *Nd4* en cervell ( $166,2\% \pm 16,8\%$ ; mitjana  $\pm$  SD, referit a la mitjana WT) i l'ARNr 16S en fetge ( $173,4\% \pm 39,6\%$ ) i cervell ( $218,9\% \pm 18,9\%$ ). L'ARNm de *Nd4* va mostrar una tendència a estar incrementat en fetges KI/KO tot i que l'augment no va ser estadísticament significatiu (Figura 5.34).



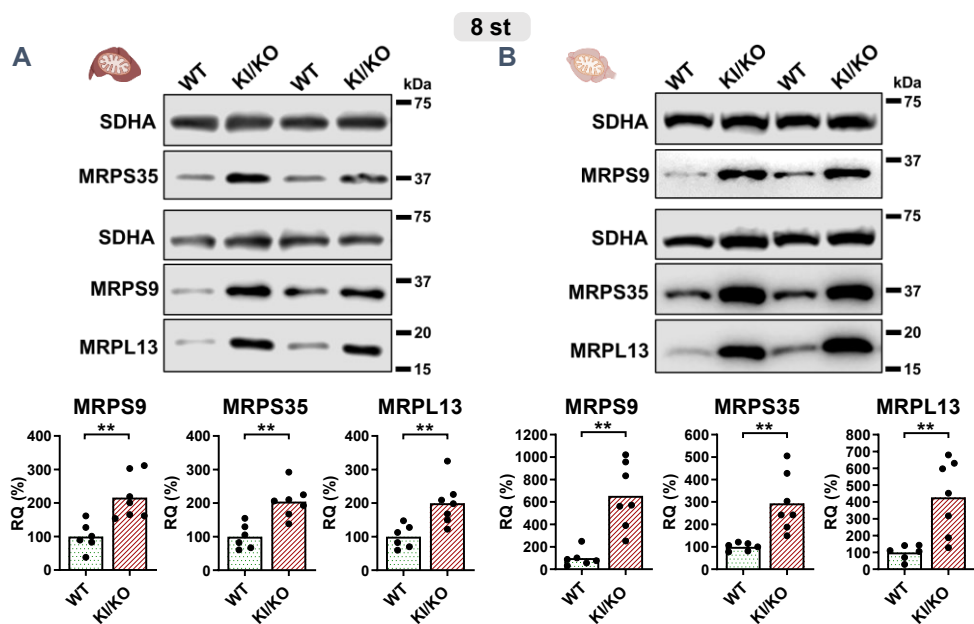
**Figura 5.34. Nivells d'ARN mitocondrials en fetge i cervell de ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*.** Els nivells basals d'ARN dels gens *mt-Nd4* i *mt-Rnr2* (16S) es van quantificar per RT-qPCR i normalitzar respecte els nivells d'ARNm de *Ppia*. Les determinacions es van dur a terme sobre mostres d'ARN total de fetge (A) i cervell (B) de ratolins de 8 setmanes d'edat. Els valors, expressats com quantitat relativa (RQ), representen el percentatge de la mitjana dels WT. Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent i les línies horitzontals representen la mitjana. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*) i KI/KO (*Gfm1<sup>R671C/-</sup>*).



El resultat, més clar que al model *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* (apartat 5.1.6.3), va mostrar que davant de l'afectació de la traducció mitocondrial al fetge i cervell causada per la depleció d'EFG1, potser s'estimulin mecanismes per mantenir elevats els ARN mitocondrials.

### 5.2.9.5. Quantitat mitocondrial de MRPs

Tant en fetge com en cervell de ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* de 8 setmanes d'edat es va detectar per western blot un augment de proteïnes que formen part del mitoribosoma (Figura 5.35), de forma consistent a l'observat anteriorment al fetge del model *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* (apartat 5.1.4).



**Figura 5.35. Nivells de les MRPs en mitocondris de fetge i cervell als ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* joves.** Western blots representatius de MRPS9, MRPS35 (de la SSU) i MRPL13 (de la LSU) en extractes mitocondrials de fetge (A) i cervell (B). Les quantificacions per densitometria d'aquestes proteïnes es van corregir per SDHA. Els valors, expressats com quantitat relativa (RQ), representen el percentatge de la mitjana dels WT. Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent i les barres representen la mitjana de cada grup. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*\* $p < 0,005$ ; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*) i K1/KO (*Gfm1<sup>R671C/-</sup>*).

Tot i que amb molta dispersió entre valors de diferents ratolins, al model KI/KO es va identificar augment de MRPs en mitocondris fetge en comparació amb el grup WT (MRPS9:  $216,4\% \pm 66,2\%$ , mitjana  $\pm$  SD, referit a la mitjana WT; MRPS35:  $204,6\% \pm 48,5\%$ ; MRPL13:  $199,8\% \pm 65,8\%$ ) i de forma més pronunciada en mitocondris de cervell (MRPS9:  $655,1\% \pm 290,1\%$  ; MRPS35:  $294,0\% \pm 129,2\%$ ; MRPL13:  $427,2\% \pm 221,0\%$ ) (*Figura 5.35*).

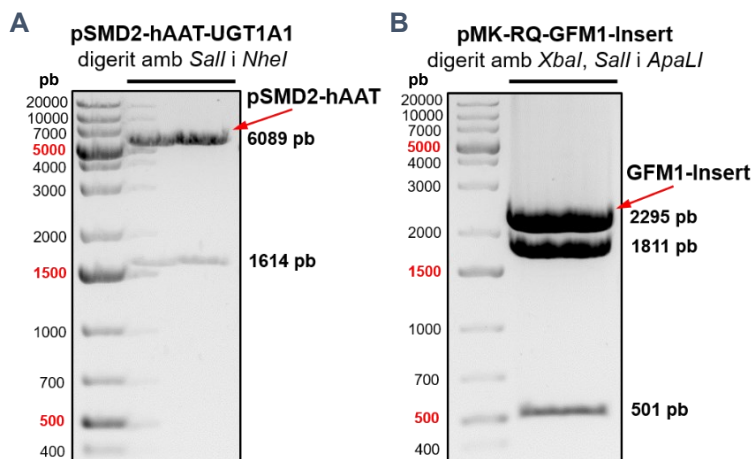
Es va comprovar que l'augment de les MRPs en mitocondris KI/KO es mantenia a les 30 setmanes d'edat en fetge i cervell (*Figura supl. 9*). Resultats suggestius d'una sobre-expressió i/o estabilització de MRPs als teixits diana principals als ratolins KI/KO.

### 5.3. Teràpia gènica amb rAAV sobre el model de ratolí *Gfm1*<sup>R671C/-</sup>

#### 5.3.1. Generació del vector ssAAV9-hAAT-GFM1

Per tal de generar el vector adenoassociat ssAAV9-hAAT-GFM1 (*Figura 4.6*), en primer lloc vam dur a terme el procés de clonatge del genoma del rAAV. Seguidament, el grup col·laborador dirigit per la Dra. Gloria González Aseguinolaza al CIMA, Universidad de Navarra (Pamplona), es va encarregar de confirmar que la seqüència del genoma viral era correcta, i de la fase de producció del vector.

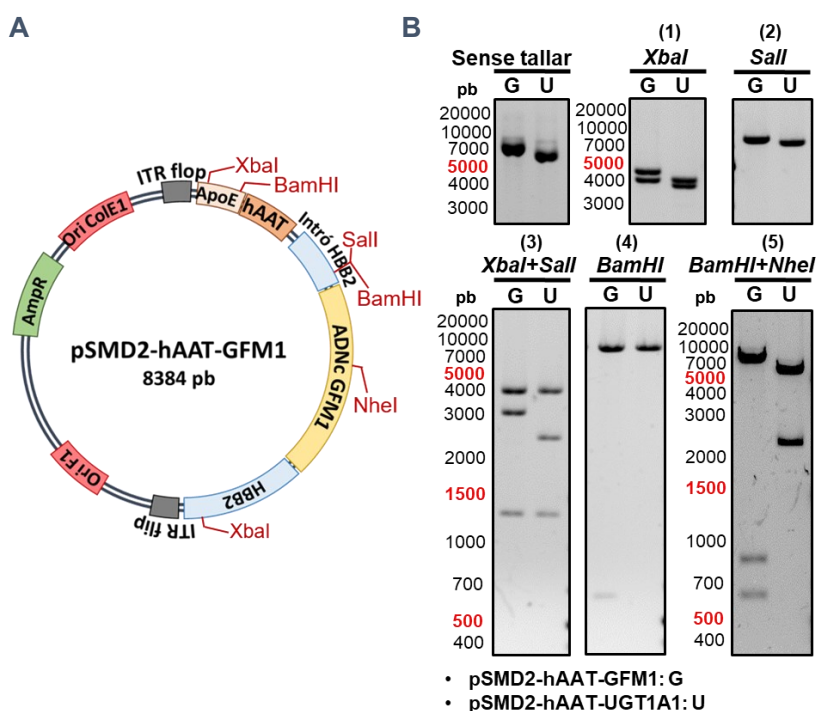
Pel que fa a la nostra tasca, com a material de partida es van utilitzar els plasmidis pSMD2-hAAT-UGT1A1 i pMK-RQ-GFM1-Insert, que presentaven l'esquelet del genoma viral (les ITR de l'AAV2; el cassat d'expressió ApoE-hAAT, enhancer-promotor; l'intró i poliA del gen *HBB2*) i l'insert (seqüència codificant de *GFM1*), respectivament. Aquests plasmidis es van sotmetre a digestions enzimàtiques per tal de confirmar la seua seqüència per electroforesi (*Figura 5.36*).



**Figura 5.36. Obtenció del plasmidi pSMD2-hAAT i l'insert *GFM1*.** Els plasmidis inicials es van digerir amb enzims de restricció i el producte es va córrer per electroforesi per identificar els fragments d'interès. **(A)** Plasmidi pSMD2-hAAT-UGT1A1 digerit amb *Sall* i *NheI*. El fragment de 6089 pb es correspon amb la seqüència pSMD2-hAAT sense l'insert UGT1A1, posteriorment desfosforilada i lligada amb l'insert *GFM1*. **(B)** Plasmidi pMK-RQ-GFM1-Insert digerit amb *XbaI*, *Sall* i *ApaLI*. El fragment de 2.295 pb es correspon amb l'insert *GFM1* que es va aïllar i introduir en pSMD2-hAAT donant lloc al plasmidi pSMD2-hAAT-GFM1.

Al seu torn, els fragments d'interès resultants es van fer servir per al clonatge: pSMD2-hAAT es va desfosforilar per evitar la lligació sobre si mateix, i l'insert *GFM1* es va aïllar del gel d'agarosa (Figura 5.36B).

Seguidament, es va efectuar la lligació dels fragments i transformació de les cèl·lules quimiocompetents. Les digestions amb combinacions diferents d'enzims de restricció van servir per seleccionar els clons de bacteris transformats amb el plasmidi d'interès, així com per confirmar que els productes de purificació per Miniprep i Maxiprep contenien pSMD2-hAAT-GFM1 (Figura 5.37).



**Figura 5.37. Comprovació del clonatge de pSMD2-hAAT-GFM1 per digestions enzimàtiques.** (A) Plasmidi pSMD2-hAAT-GFM1 amb la ubicació de les dianes dels enzims de restricció utilitzats. (B) Gels d'electroforesi representatius de les digestions de pSMD2-hAAT-GFM1 dutes a terme per comprovar el correcte clonatge tal i com es descriu a l'**apartat 4.14.6**: plasmidi sense tallar, i tallat amb (1) *XbaI*, (2) *Sall*, (3) *XbaI+Sall*, (4) *BamHI* i (5) *BamHI+NheI*. Les digestions es van efectuar sobre el plasmidi inicial pSMD2-hAAT-UGT1A1 (U) i sobre els clons positius obtinguts per a pSMD2-hAAT-GFM1 (G).

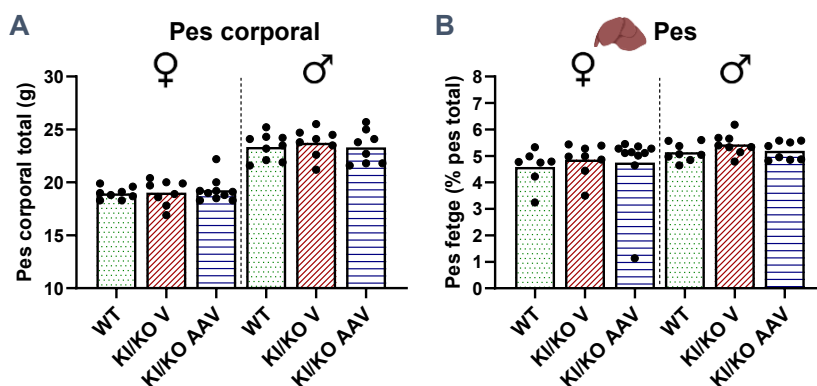
Després d'observar que els resultats de les digestions indicaven el clonatge correcte de pSMD2-hAAT-GFM1, es va purificar per Maxiprep i es va dissenyar un conjunt d'encebadors, que contemplaven la unió de l'ADNc de *GFM1* i el vector de

transferència (*Taula 4.26*), per a la seva seqüenciació pe part del grup col·laborador. Una vegada confirmat el correcte clonatge del genoma del rAAV, es va continuar amb la producció, purificació i titulació del vector (*apartat 4.14.8*), i se'ns van proporcionar el producte resultant: ssAAV9-hAAT-GFM1 a la concentració de  $1,56 \cdot 10^{13}$  gv/mL (genomes de vector/mL), utilitzant com a vehicle PBS-5% sacarosa, àcid plurònic F68 (0,001%- concentració final).

### 5.3.2. Anàlisi de l'efecte de la teràpia

Als ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> de 6 setmanes d'edat se'ls va administrar per via intravenosa una única dosi de  $5 \cdot 10^{12}$  gv/kg de ssAAV9-hAAT-GFM1 (grup KI/KO AAV). Quatre setmanes més tard, es van sacrificar els ratolins, es van obtenir els teixits i es van preservar per tal d'analitzar l'efecte de la teràpia gènica, comparant les diferents variables entre els grups WT, KI/KO V (tractats amb el vehicle) i KI/KO tractats amb el vector, de forma independent en mascles i femelles.

L'administració del rAAV no es va associar amb cap alteració del pes corporal total o pes relatiu de fetge als animals KI/KO quatre setmanes post-tractament (*Figura 5.38*). Tanmateix, no es va detectar macroscòpicament cap alteració anatòmica, ni cap signe indicatiu de carcinoma hepàtic a les necròpsies dels ratolins KI/KO AAV.



**Figura 5.38. Pes corporal total i de fetge dels ratolins de l'estudi de teràpia gènica 4 setmanes post-tractament.** Es representen els valors de pes corporal total (A) i pes relatiu de fetge (B), dels ratolins femelles i mascles de l'estudi de teràpia gènica amb rAAV a les 10 setmanes d'edat, just abans de ser sacrificarats per tal d'obtenir els teixits utilitzats per avaluar l'eficiència de transducció i l'eficàcia del tractament. Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>), KI/KO V (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>) injectats amb el vehicle) i KI/KO AAV (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>) injectats amb l'AAV.

Tot seguit, es va procedir a avaluar l'eficiència de l'estratègia de teràpia gènica analitzant, d'una banda, la transducció dels rAAV sobre fetge i cervell dels ratolins KI/KO tractats amb el vector, i d'altra banda, l'eficàcia de la teràpia sobre el fetge dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* a l'hora de revertir el fenotip molecular d'aquest model.

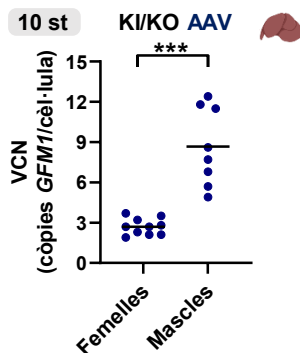
### 5.3.2.1. Determinació de la transducció del rAAV en fetge i cervell

Per poder analitzar el grau de transducció, es va determinar el número de còpies del vector (VCN) en mostres d'ADN total de fetge i cervell dels ratolins KI/KO AAV, quantificant el número de còpies del gen terapèutic per cèl·lula mitjançant qPCR. Es va comprovar mitjançant comparació de seqüència que la sonda *Taqman* utilitzada era específica per al gen *GFM1* humà i no hibridava amb el gen murí. A més, no es va observar cap senyal d'amplificació a mostres d'ADN total de ratolins WT i KI/KO injectats amb vehicle (utilitzats com a controls negatius). Per tant es va assegurar que la sonda era específica per al gen *GFM1* humà.

D'una banda, al fetge es va detectar transducció exitosa per part del rAAV, amb un VCN major en ratolins mascles ( $8,7 \pm 2,9$  còpies *GFM1*/cèl·lula, mitjana  $\pm$  SD) en comparació amb les femelles ( $2,7 \pm 0,6$  còpies *GFM1*/cèl·lula) (*Figura 5.39*).

Tal i com s'ha descrit prèviament en altres estudis, l'eficiència de transducció dels rAAV en fetge tendeix a ser major en ratolins mascles que en femelles<sup>233</sup>. Per això, vam decidir dur a terme els experiments en paral·lel i de forma independent als dos sexes per analitzar l'eficàcia de la teràpia gènica.

Per tal d'avaluar la transducció al cervell també vam analitzar el VCN en aquest teixit, tot i que en aquest cas no esperàvem expressió del gen terapèutic ja que el promotor hAAT és específic de fetge. L'anàlisi va mostrar com la injecció intravenosa de  $5 \cdot 10^{12}$  gv/kg va oferir una transducció quasi indetectable i per tant poc fiable als cervells dels ratolins KI/KO AAV dels dos sexes, quatre setmanes post-injecció (amb ~300 cèl·lules per cada còpia de *GFM1*).



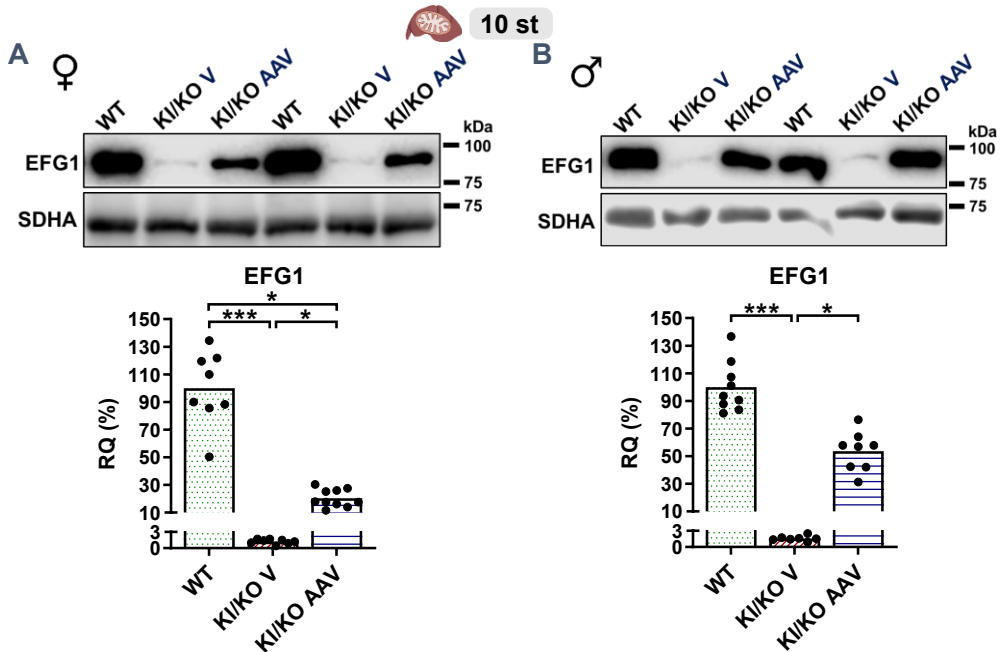
**Figura 5.39. Número de còpies de vector al fetge dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* tractats amb ssAAV9-hAAT-GFM1.** El grau de transducció del rAAV es va quantificar per qPCR sobre extractes d'ADN total de fetge de femelles i mascles. Es van utilitzar sondes *Taqman* específiques per detectar el número de còpies de *GFM1* i del gen nuclear *Ang1*, per tal d'obtenir el ratio equivalent a número de còpies del gen terapèutic per cèl·lula (VCN). Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent i les línies horitzontals representen la mitjana dels valors de cada grup. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*), KI/KO V (*Gfm1<sup>R671C/-</sup>* injectats amb el vehicle) i KI/KO AAV (*Gfm1<sup>R671C/-</sup>* injectats amb els rAAV).

### 5.3.2.2. Avaluació de l'eficàcia de la teràpia sobre el fetge

#### 5.3.2.2.1. Expressió del gen terapèutic

Es van quantificar i analitzar per western blot els nivells de proteïna EFG1 sobre extractes mitocondrials de fetge. L'anticòs primari que es va utilitzar era capaç de detectar simultàniament les formes murina i humana d'EFG1; per tant, l'augment d'EFG1 als mitocondris KI/KO AAV respecte dels KI/KO V vam considerar que es devia atribuir al producte d'expressió del gen terapèutic.

A les femelles KI/KO tractades amb el vector es va detectar un increment significatiu d'EFG1 ( $20,4\% \pm 6,4\%$ , mitjana  $\pm$  SD, referit a la mitjana dels WT) respecte del grup KI/KO injectat amb el vehicle ( $1,2\% \pm 0,4\%$ ) (Figura 5.40A). Als mascles KI/KO tractats amb el rAAV es va observar un increment dels nivells d'EFG1 més accentuat que a les femelles tractades ( $53,6\% \pm 14,3\%$ ), prenent com a referència el grup de ratolins injectats amb el vehicle ( $1,6\% \pm 0,5\%$ ) (Figura 5.40B). D'aquesta forma es va demostrar no sols l'expressió exitosa del gen terapèutic introduït al rAAV, sinó també que la forma humana d'EFG1 devia importar-se a l'interior dels mitocondris dels fetges murins.

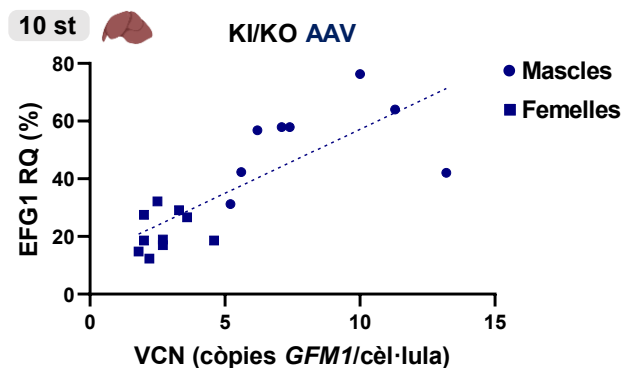


**Figura 5.40. Nivells d'EFG1 en mitocondris de fetge de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> tractats amb ssAAV9-hAAT-GFM1.** Western blots representatius dels nivells de proteïna EFG1 en extractes mitocondrials de fetge de ratolins femelles (**A**) i mascles (**B**), tractats amb el rAAV. Es representen les quantificacions per densitometria dels nivells d'EFG1. Cada valor es corregeix per SDHA i normalitza respecte d'una mostra calibradora carregada a tots els western blots. Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent i els seus valors, expressats com quantitat relativa (RQ), representen el percentatge de la mitjana WT. Les barres representen la mitjana de cada grup. Es va aplicar el test Kruskal-Wallis i quan es van detectar diferències significatives ( $p < 0,05$ ), es van comparar els tres grups entre ells aplicant el test de comparacions múltiples de Dunn. Els asteriscs indiquen significança estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>), KI/KO V (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup> injectats amb el vehicle) i KI/KO AAV (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup> injectats amb l'AAV).

A més, es va comprovar l'existència d'una correlació positiva entre el grau de transducció del fetge amb el rAAV (VCN) i la quantitat d'EFG1 en mitocondris d'aquest mateix teixit ( $p < 0,0001$ ; test rho Spearman) (Figura 5.41).

Tot i que amb aquesta aproximació preclínica inicial solament havíem administrat a una dosi el rAAV i analitzat l'efecte a 4 setmanes post-injecció, el fet de dur a terme l'estudi en femelles i mascles va poder mostrar l'expressió d'EFG1 aconseguida amb diferents graus de transducció viral sobre els fetges dels ratolins.





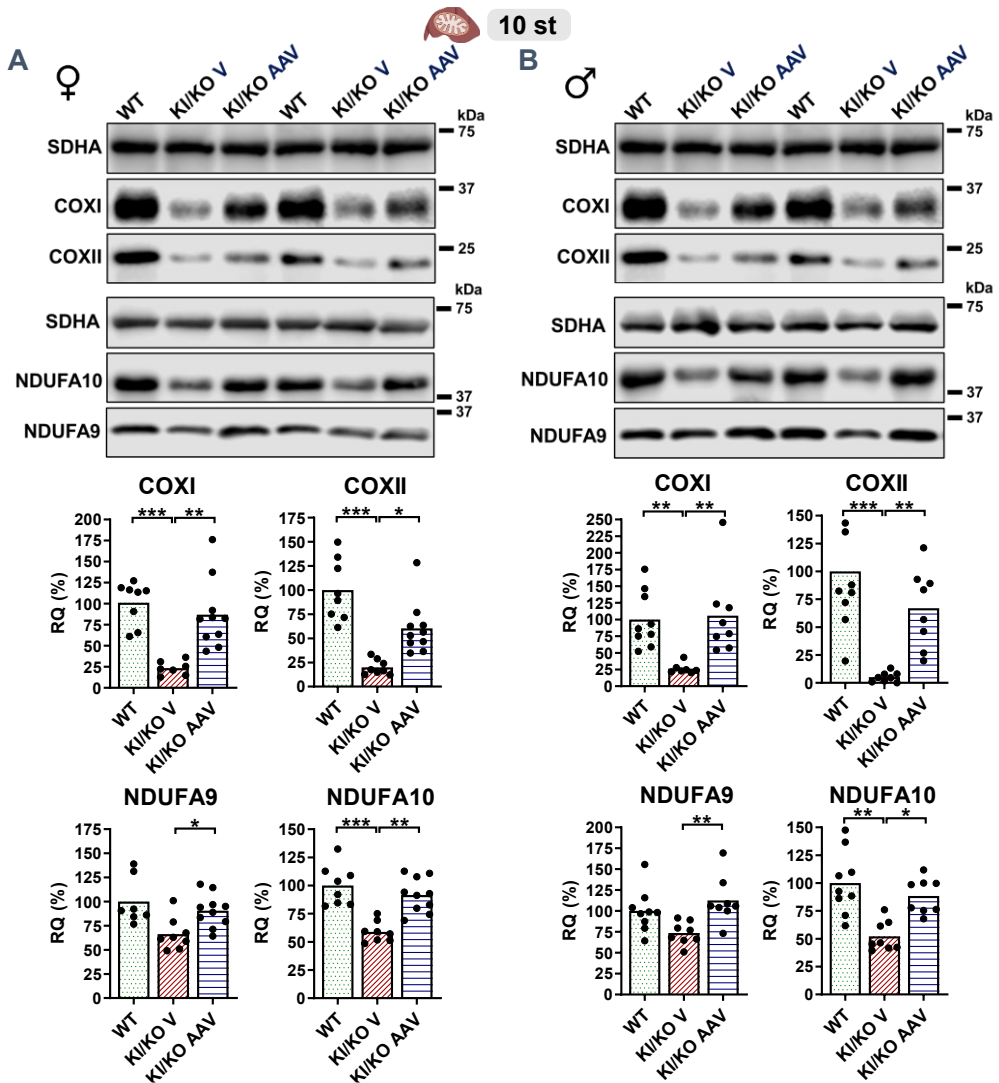
**Figura 5.41. Correlació entre el grau de transducció de ssAAV9-hAAT-GFM1 i l'EFG1 mitocondrial al fetge de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup>.** Anàlisi efectuada prenent els valors de VCN (còpies de *GFM1*/cèl·lula) i nivells d'EFG1 en mitocondris (RQ, % de la mitjana dels WT) als fetges dels ratolins KI/KO AAV femelles (quadrats) i mascles (cercles). La línia discontinua representa la regressió lineal calculada ( $Y = 4,433 \cdot X + 12,80$ ). Es va aplicar el test estadístic rho de Spearman, resultant significatiu (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ), amb  $r = 0,829$ .

### 5.3.2.2.2. Efecte sobre el sistema OXPHOS

En primer lloc es va analitzar per western blot l'expressió de les proteïnes NDUFA9 i NDUFA10 (codificades a l'ADNn, del CI) i COXI i COXII (codificades a l'ADNmt, del CIV) als extractes mitocondrials de fetge dels ratolins WT, KI/KO V i KI/KO AAV.

Per una banda, el tractament amb el rAAV va produir un increment significatiu de les quatre subunitats a les femelles KI/KO AAV recuperant els nivells normals d'aquestes proteïnes en molts casos (NDUFA9:  $90,5\% \pm 17,1\%$ ; NDUFA10:  $91,6\% \pm 15,3\%$ ; COXI:  $86,9\% \pm 41,1\%$ ; COXII:  $60,4\% \pm 27,1\%$ ; mitjana  $\pm$  SD, referit a la mitjana dels WT) en comparació amb el grup KI/KO V (NDUFA9:  $66,3\% \pm 16,8\%$ ; NDUFA10:  $58,9\% \pm 9,1\%$ ; COXI:  $23,5\% \pm 8,4\%$ ; COXII:  $20,0\% \pm 7,9\%$ ) (*Figura 5.42A*).

D'altra banda, els ratolins KI/KO mascles tractats amb el rAAV també van recuperar els nivells normals d'aquestes subunitats (NDUFA9:  $112,7\% \pm 28,2\%$ ; NDUFA10:  $88,4\% \pm 15,8\%$ ; COXI:  $105,9\% \pm 61,9\%$ ; COXII:  $67,0\% \pm 35,4\%$ ), comparant respecte el grup de mascles KI/KO V (NDUFA9:  $73,5\% \pm 13,6\%$ ; NDUFA10:  $52,2\% \pm 13,4\%$ ; COXI:  $26,3\% \pm 7,9\%$ ; COXII:  $5,2\% \pm 4,4\%$ ) (*Figura 5.42B*). Resultats que fan pensar que la forma humana d'EFG1 expressada als mitocondris dels ratolins KI/KO AAV deu promoure l'expressió de polipèptids codificats a l'ADNmt.

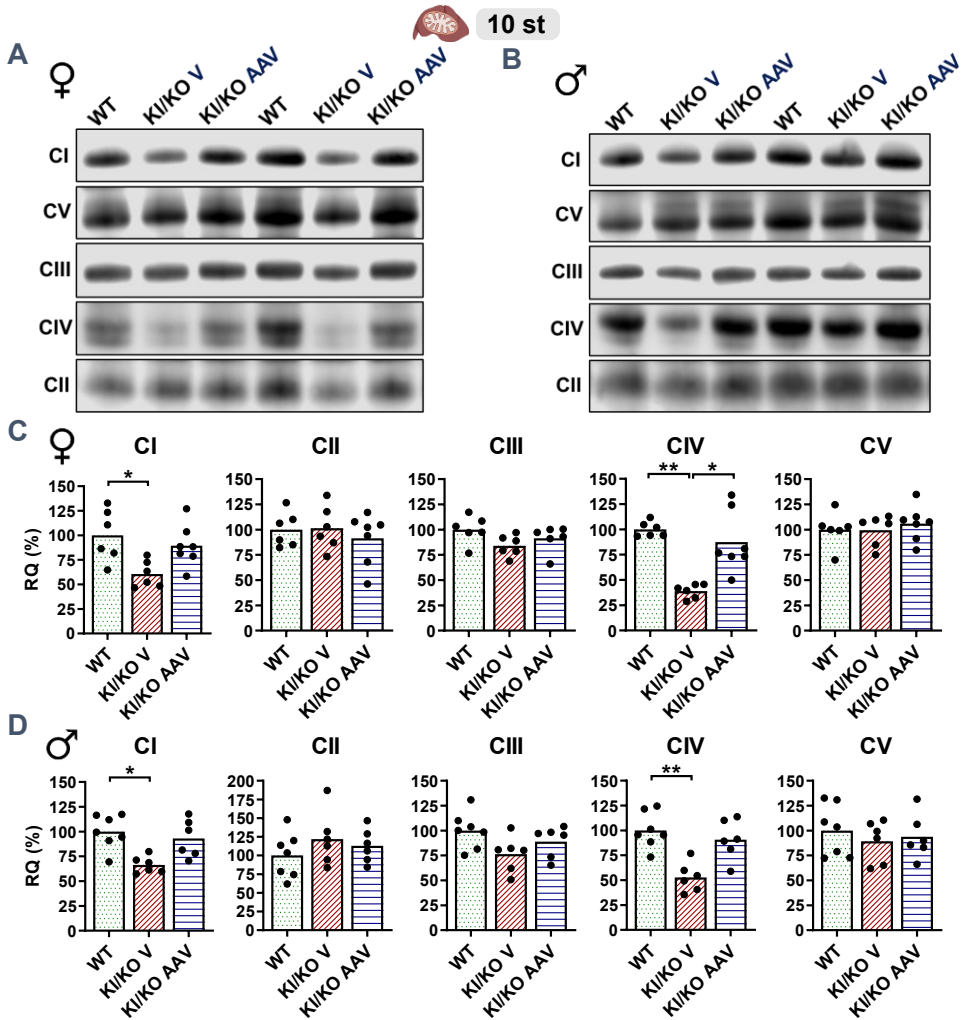


**Figura 5.42.** Nivells de subunitats del CI i CIV en mitocondris de fetge de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> tractats amb ssAAV9-hAAT-GFM1. Western blots representatius de les proteïnes NDUFA9 i NDUFA10 (CI); COXII i COXIV (CIV) en extractes mitocondrials de fetge de ratolins femelles (A) i mascles (B), tractats amb el rAAV. Es representen les quantificacions per densitometria de cada proteïna. Cada valor es corregeix per SDHA i normalitza respecte d'una mostra calibradora carregada a tots els western blots. Cada punt es correspon amb un ratolí diferent i els seus valors, expressats com quantitat relativa (RQ), representen el percentatge de la mitjana dels WT. Les barres representen la mitjana de cada grup. Es va aplicar el test Kruskal-Wallis i quan es van detectar diferències significatives (p<0,05), es van comparar els tres grups entre ells aplicant el test de comparacions múltiples de Dunn. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>), KI/KO V (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup> injectats amb el vehicle) i KI/KO AAV (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup> injectats amb l'AAV).

Cal destacar que amb l'anàlisi dels resultats dels ratolins KI/KO tractats amb el rAAV, es va detectar una correlació positiva entre els nivells d'EFG1 i els de COXI als mitocondris de fetge ( $p < 0,0001$ ; test rho Spearman) (*Figura supl. 10*). Correlació no observada entre els nivells d'EFG1 i els de les altres subunitats analitzades (COXII, NDUFA9 i NDUFA10).

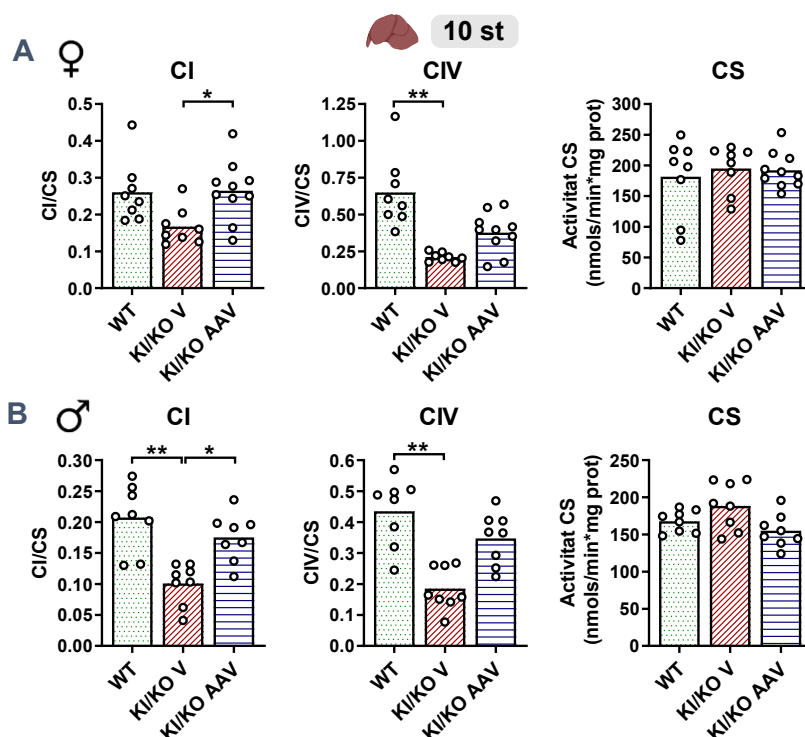
També es van analitzar els nivells dels complexos OXPHOS acoblats i es va observar que als ratolins KI/KO tractats amb el rAAV es recuperaven els nivells de CI i CIV (femelles: CI:  $89,5\% \pm 21,4\%$ ; mitjana  $\pm$  SD, referit a la mitjana dels WT; CIV:  $87,4\% \pm 30,2\%$ ; i mascles: CI:  $93,1\% \pm 19,1\%$ ; CIV:  $90,8\% \pm 20,0\%$ ), assolint valors equiparables als dels ratolins WT, i en comparació amb el que es detectava als ratolins injectats amb el vehicle (femelles: CI:  $60,5\% \pm 13,7\%$ , CIV:  $38,9\% \pm 6,9\%$ ; mascles: CI:  $66,3\% \pm 8,5\%$ , CIV:  $52,8\% \pm 14,7\%$ ) (*Figura 5.43*).

Aquest resultat suggereix que les subunitats provinents de la traducció mitocondrial en que intervé la forma humana d'EFG1 són estables i s'acoblen amb les subunitats nuclears, aconseguint recuperar els complexos CI i CIV tant als mascles com a les femelles *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* tractats amb el rAAV, prop d'assolir els nivells basals dels ratolins *Gfm1<sup>+/+</sup>*.



**Figura 5.43. Estat dels complexos OXPHOS al fetge de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> tractats amb ssAAV9-hAAT-GFM1.** Quantificació dels complexos OXPHOS acoblats en mitocondris de fetge de femelles (**A, C**) i mascles (**B, D**). L'anàlisi es va dur a terme per BN-PAGE amb anticossos específics contra el CI (NDUFA9), CII (SDHA), CIII, (UQCRC2), CIV (COXIV) i CV (ATP5A). La quantitat relativa (RQ) es va quantificar per densitometria de la banda de complex, normalitzada per la quantitat de CII i referida a una mostra calibradora carregada a tots els western blots. En (**C**) i (**D**) els punts representen valors de ratolins individuals que s'expressen com al percentatge de la mitjana dels WT; i les barres representen mitjana dels valors de cada grup. Es va aplicar el test Kruskal-Wallis i quan es van detectar diferències significatives ( $p < 0,05$ ), es van comparar els tres grups entre ells aplicant el test de comparacions múltiples de Dunn. Els asteriscs indiquen significança estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>), KI/KO V (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup> injectats amb el vehicle) i KI/KO AAV (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup> injectats amb l'AAV).

Finalment, es van analitzar les activitats enzimàtiques dels complexos CI i CIV de la CTE i la de l'enzim CS sobre homogenats de fetge dels ratolins inclosos a l'estudi (Figura 5.44).



**Figura 5.44. Activitats enzimàtiques de CI i CIV al fetge de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> tractats amb ssAAV9-hAAT-GFM1.** Activitat enzimàtica dels complexos de la cadena respiratòria CI i CIV normalitzats respecte l'activitat citrat sintasa (CS) sobre homogenats de fetge de ratolins femelles (A) i mascles (B). Els cercles oberts representen valors de ratolins individuals i les barres fan referència a la mitjana dels valors de cada grup. Es va aplicar el test Kruskal-Wallis i quan es van detectar diferències significatives ( $p < 0,05$ ), es van comparar els tres grups entre ells aplicant el test de comparacions múltiples de Dunn. Els asteriscs indiquen significança estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>), KI/KO V (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup> injectats amb el vehicle) i KI/KO AAV (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup> injectats amb l'AAV).

Les anàlisis van revelar que el tractament amb el rAAV restitueix quasi per complet l'activitat enzimàtica normal del CI en ratolins KI/KO (femelles:  $101,7\% \pm 30,9\%$ , mitjana  $\pm$  SD, referit a la mitjana WT; mascles:  $84,5\% \pm 18,7\%$ ), respecte el grup injectat amb el vehicle (femelles:  $64,1\% \pm 19,2\%$ ; mascles:  $48,7\% \pm 15,9\%$ ).

A més a més, l'activitat enzimàtica del CIV (més reduïda que la del CI) s'incrementa als ratolins KI/KO AAV (femelles:  $58,0\% \pm 2,1\%$ ; mascles:  $79,8\% \pm 19,3\%$ ), en comparació amb la dels ratolins KI/KO V (femelles:  $32,5\% \pm 4,6\%$ ; mascles:  $42,5\% \pm 16,0\%$ ), desapareixent les diferències significatives entre grups WT i KI/KO AAV.

Pel que fa a l'activitat CS, aquesta no mostrava cap variació significativa entre els tres grups de ratolins comparats a cap dels dos sexes.

Els resultats van demostrar com la teràpia gènica no només restitueix la síntesi dels polipèptids codificats a l'ADNmt i els complexos OXPHOS acoblats, sinó també la seua funcionalitat.



## 6. DISCUSSIÓ

---





Fins l'actualitat s'han descrit almenys 31 mutacions patogèniques diferents en *GFM1* associades amb COXPD1<sup>54–69</sup>. Per a caracteritzar aquestes mutacions i les seues conseqüències bioquímiques, s'han utilitzat fibroblasts de pacients com a model d'estudi, així com biòpsies d'altres teixits<sup>55–57</sup>. Com que aquesta segona opció sovint resulta menys accessible, s'ha apostat per la generació d'iPSCs com a model alternatiu d'estudi<sup>80</sup>. D'altra banda, per poder conèixer millor la funció d'EFG1 a la traducció mitocondrial, s'han dut a terme estudis amb *S. cerevisiae*<sup>56</sup>, *Drosophila melanogaster*<sup>77</sup> i *C. elegans*<sup>82</sup>. La disponibilitat d'aquesta diversitat de models tant *in vitro* com *in vivo* resulta altament útil, no obstant això la manca d'un model de ratolí per l'estudi directe de la COXPD1 ha representat fins l'actualitat una limitació important de cara a aprofundir en la fisiopatologia de la malaltia i testar potencials aproximacions terapèutiques.

El ratolí constitueix un model *in vivo* molt important dintre de la recerca biomèdica, havent-se demostrant la seua utilitat en l'estudi de malalties mitocondrials, i concretament d'alteracions donades per defectes a la traducció mitocondrial<sup>99–114,234</sup>. Pel que fa a la COXPD1, la proteïna EFG1 humana conserva un 89% d'identitat i 94% de similitud amb la forma ortòloga murina<sup>32</sup>, i els primers esforços per generar un ratolí homozigot *knock-out* per a *Gfm1* van concloure amb la letalitat abans del deslletament dels animals<sup>116,117</sup>.

D'altra banda, actualment no existeix cap tractament específic per a la COXPD1, de forma que no es pot frenar la progressió de la malaltia ni evitar la mort prematura dels pacients amb presentació més greu<sup>54,55,61</sup>. A més, és molt difícil corregir la marcada afectació clínica o millorar la qualitat de vida dels pacients que presenten major supervivència<sup>60,62,64,65</sup>. Com que es tracta d'una malaltia monogènica, la teràpia gènica podria ser utilitzada per corregir el defecte genètic en *GFM1* o introduir una còpia correcta del gen funcional. Aquesta segona opció és recolzada per assajos funcionals fets amb fibroblasts de pacients que han corregit el fenotip molecular COXPD1 inicial<sup>54,57</sup>. A l'hora de testar la teràpia gènica *in vivo*, els vectors basats en virus adenoassociats (rAAV) s'han utilitzat sobre models de ratolí de diferents malalties mitocondrials oferint resultats prometedors<sup>127</sup> i obrint la porta per iniciar estratègies similars sobre altres malalties com la COXPD1.

Davant d'aquest escenari, aquesta tesi ha anat adreçada a avançar en dos aspectes molt importants i necessaris per la recerca translacional relacionada amb l'hepatoencefalopatia deguda a mutacions en *GFM1*. D'una banda, la major part d'esforços s'han destinat a generar i caracteritzar dos models de ratolí per a la COXPD1: l'homozigot *knock-in Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* i l'heterozigot compost *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*. D'altra banda, s'ha iniciat un estudi preclínic de teràpia gènica utilitzant el vector ssAAV9-hAAT-GFM1 dirigit a fetge sobre el ratolí *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*, per tal d'investigar els efectes d'aquest potencial tractament sobre el fenotip hepàtic del model murí.

## 6.1. Models de ratolí amb fenotip COXPD1 molecular

### 6.1.1. Efecte dels al·lels mutants de *Gfm1* sobre la proteïna EFG1

Seqüencialment, es van obtenir per edició gènica mitjançant el sistema CRISPR/Cas9<sup>92</sup> els al·lels mutants *knock-in (Gfm1<sup>R671C</sup>)* i *knock-out (Gfm1<sup>-</sup>)* de ratolí, cadascun dels quals ha demostrat tenir unes conseqüències diferents sobre la proteïna EFG1, i per consegüent sobre el perfil molecular dels models de ratolí generats.

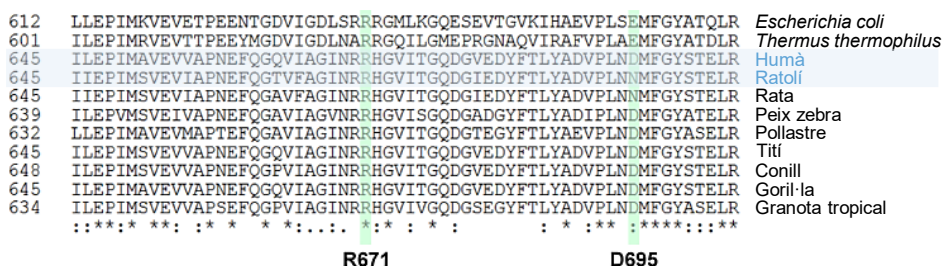
Tenint en compte que en pacients amb COXPD1 les mutacions en *GFM1* sovint s'associen a mortalitat en nadons, existia el risc que la modificació genètica en el gen *Gfm1* de ratolí fos letal en estat embrionari o a edats molt primerenques, la qual cosa dificultaria enormement o faria inviable el seu ús com a model de la malaltia per a testar teràpies. Per aquesta raó es va decidir generar un ratolí *knock-in* amb la mutació antisentit p.R671C. Aquesta mutació és la que fins al moment s'ha identificat en un major nombre de pacients, molts dels quals presenten associada una esperança de vida més llarga<sup>60,62,64,65</sup>, de manera que el risc que un ratolí amb aquesta mutació fos inviable semblava menor que si es triava una altra mutació més letal en pacients. A més, l'aminoàcid R671 de la proteïna humana es troba conservat a la seqüència murina d'EFG1.

L'estudi de ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* joves ens va permetre observar que la mutació c.2011\_2013delinsTGC (p.R671C) en *Gfm1* no altera els seus nivells basals d'ARNm però es veu associada a una reducció important de proteïna EFG1 als

mitocondris de tots els teixits analitzats (fetge, cervell, cor, ronyó) i que, per tant, deu estar relacionada amb l'afectació de la síntesi i/o estabilitat de la proteïna mutada EFG1<sup>R671C</sup>. La reducció d'EFG1 en homogenats de teixit total (fetge i cervell), equiparable a l'observada en extractes mitocondrials, suggereix que el canvi p.R671C afecta la pròpia estabilitat de la proteïna, tot i que no ens permet treure conclusions relatives a l'eficiència d'import d'EFG1<sup>R671C</sup> des del citosol a mitocondris.

Tot i que caldria contemplar la possibilitat que la mutació p.R671C pugui induir un canvi conformacional de la proteïna i alterar la unió de l'anticòs primari utilitzat en la quantificació per western blot SDS-PAGE, tot conduint a infraestimar la quantitat residual d'EFG1, pensem que és molt improbable que aquesta situació es doni, ja que ens vam assegurar de que l'anticòs primari utilitzat es dirigeix contra l'epítip situat entre els aminoàcids 450-650 d'EFG1, en una zona allunyada del canvi p.R671C. A més, reduccions similars d'EFG1 es van observar utilitzant un anticòs primari alternatiu (*14274-1-AP*, *Proteintech*), dirigit a la regió 400-751 d'EFG1 (resultat no mostrat en aquesta tesi).

La informació estructural disponible sobre EFG1 suggereix que la depleció del factor d'elongació associada a l'alteració de l'aminoàcid R671 podria estar relacionada amb la pèrdua d'estabilitat de la proteïna mutant. El residu R671 es creu que pot contribuir a l'estabilització de la proteïna EFG1 humana formant un pont d'hidrogen amb l'aminoàcid D695, i per això el canvi p.R671C causaria una caiguda dràstica d'EFG1 als pacients<sup>60</sup>. Tots dos residus, R671 i D695, estan conservats a les proteïnes ortòlogues d'EFG1 de moltes espècies, mantenint probablement la seua interacció (*Figura 6.1*).



**Figura 6.1. Conservació dels aminoàcids R671 i D695 d'EFG1 entre espècies.** Alineaments de la seqüència proteica d'EFG1 mostrant la conservació dels residus R671 i D695 (en verd) entre diferents espècies, utilitzant la base de dades *UniProtKB* (<https://www.uniprot.org>).

A la posició 695 de la proteïna murina es localitza una asparagina (N), que manté la capacitat d'interaccionar amb R671 a través d'un pont d'hidrogen. Llavors, en ratolins, la introducció d'una cisteïna a la posició 671 d'EFG1 podria alterar l'estabilitat de la proteïna tal i com s'ha hipotetitzat per a la forma d'EFG1 humana<sup>60</sup>.

A banda de l'estabilitat de la proteïna EFG1 vam voler avaluar si existia una alteració evident en la interacció del factor d'elongació mutat (EFG1<sup>R671C</sup>) amb el mitoribosoma. Les inferències fetes en estudis duts a terme sobre la proteïna EF-G bacteriana (ortòloga a l'EFG1 eucariòtica)<sup>235</sup> i sobretot en estudis recents de criomicroscopia electrònica (cryo-EM) sobre l'EFG1 mitocondrial<sup>41</sup> han permès analitzar l'estructura i les interaccions dels dominis del factor d'elongació de mamífers amb els diferents elements implicats a la síntesi de polipèptids codificats a l'ADNmt: (1) domini G – ARNr 16S a LSU, (2) domini II – SSU, (3) domini III – connecta el domini G amb els dominis II i V, (4) domini IV – ARNm-ARNt al lloc P i (5) domini V, on es localitza la mutació p.R671C, es situa prop del centre d'associació a GTP (GAC) de la LSU<sup>41</sup>.

Als mitocondris de fetge dels ratolins *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> es detecta al voltant d'un 15% de proteïna EFG1 en comparació amb els nivells basals dels ratolins *Gfm1*<sup>+/+</sup>. Aquesta proteïna residual EFG1<sup>R671C</sup>, tot i que continua interaccionant amb les diferents subunitats del mitoribosoma, ofereix un patró de co-migració lleugerament diferent: major proporció en estat lliure i detecció inferior en les fraccions de la subunitat 39S i del ribosoma acoblat 55S. Així doncs, sembla que els experiments de co-migració suggereixen que la mutació p.R671C, a part de desestabilitzar EFG1, pugui alterar subtilment la interacció del factor d'elongació amb el mitoribosoma. No obstant això, som conscients de les limitacions d'aquests experiments així com la dificultat de replicar resultats on s'aprecien defectes lleus. Llavors, per tal de poder confirmar aquest segon efecte de la mutació seria necessari efectuar experiments addicionals (p. ex. de tipus *pull down*).

Després de comprovar el subtil fenotip del model *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>, que es discuteix més avall, es va apostar per generar l'al·lel *knock-out* de *Gfm1*. Malgrat que a l'*European Mouse Mutant Archive* (EMMA) existeix un ratolí KO disponible<sup>116,117</sup>, es tracta d'un *knock-out first-allele*<sup>91</sup> que, tot i ser poc probable, pot tenir expressió

residual dels exons WT que haurien d'estar interferits (al·lel hipomòrfic)<sup>236</sup> i es recomana aparellar-se amb línies de ratolins *Cre-* i *Flp-* per tal d'eliminar el constructe de selecció per recombinació homòloga i acabar obtenint un ratolí KO constitutiu. És per això que vam apostar per l'estratègia CRISPR-Cas9 per tal de generar l'al·lel *Gfm1*<sup>-</sup>, ampliant la informació relativa a la letalitat prèvia al deslletament reportada per la EMMA<sup>116,117</sup> i demostrant aquesta vegada que la manca completa d'EFG1 resulta letal durant les fases embrionàries primerenques. Concretament, el fet de no trobar embrions *Gfm1*<sup>-</sup> en femelles als 10,5 dies de gestació, a part de la detecció amb freqüència de llocs d'implantació sense restes d'embrions, suggereix letalitat embrionària post-implantació entre els dies 5,5 i 9,5 post-coit<sup>237</sup>. Durant aquesta etapa de gestació té lloc la formació de la placa neural en ratolins, i les anormalitats neuronals, junt amb la insuficiència placentària i els defectes cardiovasculars<sup>237</sup>, s'han reportat com a freqüents durant la letalitat embrionària en diferents models de ratolins KO<sup>238</sup>. Això convida a pensar que el desenvolupament del CNS en ratolins podria ser especialment vulnerable a la manca d'EFG1, relacionant-se amb l'encefalopatia prematura que manifesten els pacients. Tot plegat, es subratlla el rol d'EFG1 durant l'etapa del desenvolupament, de forma congruent amb el greu fenotip clínic prematur observat en pacients amb mutacions patogèniques en *GFM1*<sup>54,55,61</sup>.

L'ARNm resultant de l'al·lel *Gfm1*<sup>-</sup> és susceptible de ser degradat per *Non-Sense Mediated mRNA Decay* (NMD), ja que el codó stop prematur a l'exó 4 es situa 185 nucleòtids en direcció 5' respecte de l'última unió d'exons<sup>232</sup>. Als ratolins KI/KO joves, els nivells basals d'ARNm de *Gfm1* quantificats per qPCR es mantenen sense alterar al cervell, mentre que al fetge es veuen lleugerament reduïts. A més, l'anàlisi per PCR-RFLP ens va permetre descartar la degradació per NMD de l'ARNm *Gfm1*<sup>-</sup> al cervell, i suggereix que aquesta variant tan sols es veu lleugerament reduïda en mostres de fetge respecte de l'ARNm *Gfm1*<sup>R671C</sup>. Aquest resultat constitueix una prova que l'eficiència del mecanisme NMD és variable, no sols entre diferents ARNm, sinó també per a una mateixa espècie d'ARNm segons el tipus cel·lular en que es trobi, tal i com han observat altres autors<sup>239</sup>. Els resultats de la PCR-RFLP ens permeten descartar que, almenys als teixits analitzats, es doni una degradació parcial de l'ARNm KO i sobreexpressió i/o estabilització del missatger provinent de l'al·lel KI com a resposta. D'altra banda, els western blots sobre mitocondris de fetge

i cervell dels ratolins KI/KO joves mostren una reducció de proteïna EFG1 adicional d'aproximadament un 50% en comparació amb el model *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*, associant-se a l'efecte de l'al·lel *Gfm1*<sup>-</sup>. Per tant, encara que l'ARNm KO sembla que escapa del NMD, el producte de la seva traducció, amb la deleció de dos exons fora de pauta de lectura i generació d'un codó stop prematur, és aberrant i es degrada.

Tot plegat, l'estratègia seguida per generar l'al·lel *Gfm1*<sup>-</sup> va resultar exitosa, i propicia l'efecte desitjat: reduir encara més els nivells basals d'EFG1 mitocondrials al model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* per tal d'accentuar el fenotip dels ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*, tal i com han fet altres estudis on s'ha optat per generar ratolins heterozigots compostos KI/KO<sup>240</sup>.

### 6.1.2. Disfunció de la traducció mitocondrial i del sistema OXPHOS

La caracterització molecular de fibroblasts de pacients amb COXPD1 posa de manifest la reducció de la taxa de traducció mitocondrial en aquestes mostres<sup>57,62</sup>, observacions que vam reproduir en mostres de fibroblasts de pacients del nostre centre en treballs previs al nostre laboratori (resultats no publicats). Aquesta disfunció normalment porta associada una deficiència combinada de la fosforilació oxidativa caracteritzada per l'afectació dels complexos CI i CIV<sup>54,58,60,61</sup>, a la qual es suma de vegades la de CIII i CV<sup>55-57</sup>. Aquests resultats són extrapolables a fetge, múscul esquelètic i en menor mesura cor, quan puntualment s'han pogut obtenir biòpsies d'aquests teixits<sup>55</sup>, i fan visible l'afectació diferencial del sistema OXPHOS entre teixits, correlacionant en alguns casos amb els nivells basals de l'EFG1 mutada residual<sup>55,58</sup>. El cervell és l'òrgan que, a part del fetge, manifesta una afectació clínica més pronunciada en pacients, però la impossibilitat d'obtenir biòpsies per tal de caracteritzar el perfil molecular causant de l'encefalopatia ha impedit investigar què ocorre en aquest teixit.

El model de ratolí *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* no sols és viable, sinó que malgrat experimentar una reducció important dels nivells mitocondrials d'EFG1 a tots els teixits estudiats, tan sols al fetge manifesta una lleu afectació del CIV a les 6 setmanes d'edat a causa d'una taxa de traducció mitocondrial inferior. Lluny d'accentuar-se el fenotip molecular amb l'envelliment, als ratolins KI de 50 setmanes d'edat es manté reduïda la traducció mitocondrial *de novo* en fetge, però desapareix el defecte de CIV.

El ratolí *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* representa un model millorat de la COXPD1, on la depleció addicional d'EFG1 comporta una reducció de la traducció mitocondrial més accentuada al fetge i fa visible un defecte similar en cervell. En conseqüència, en ambdós teixits s'observa afectació de CI i CIV (disminució dels nivells basals de complexos acoblats, que explica l'activitat enzimàtica inferior) i de forma més subtil del CIII (menor activitat enzimàtica). És rellevant que aquest fenotip molecular s'observa a les 8 setmanes d'edat i es manté almenys fins les 30 setmanes d'edat. A més, als homogenats de cor dels ratolins KI/KO joves es detecta reducció de l'activitat del CIV, obrint la porta a explorar aquest teixit més en profunditat i analitzar si s'accentua el defecte amb l'edat tal i com s'ha demostrat en altres models murins amb afectació de la traducció mitocondrial<sup>104,113</sup>.

En altres estudis efectuats al nostre laboratori sobre ratolins WT s'ha observat que els nivells basals d'EFG1 mitocondrial són més alts en fetge que en cervell, cor i ronyó (*Figura supl. 5.10*), mantenint un patró d'expressió similar al descrit en humans i que podria influir en l'afectació específica de teixit observada a conseqüència de la mutació p.R671C<sup>32,55</sup>. D'altra banda, estudis sobre mitocondris de ratolins WT han revelat que la velocitat inicial de la traducció mitocondrial és major en fetge que en cor i això pot influir per exemple en cas del ratolí homozigot KI de MRPS34 en la major gravetat dels canvis moleculars trobats en fetge en comparació amb els identificats en cor<sup>104</sup>. Coincideix que al model *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*, el fetge és l'únic òrgan entre els estudiats, on la taxa de traducció mitocondrial es veu reduïda de forma clara. De manera coherent, la major susceptibilitat d'aquest teixit davant la depleció d'EFG1 es va confirmar als ratolins KI/KO. La quantitat superior d'EFG1 per mitocondri al fetge dels ratolins WT pot estar relacionada amb que a les 6-8 setmanes d'edat la demanda de proteïnes codificades a l'ADNmt sigui major, tenint el factor d'elongació un rol més important en fetge en comparació amb altres teixits i podent ser una raó per la qual la depleció d'EFG1 és més crítica sobre la traducció mitocondrial i per consegüent sobre el sistema OXPHOS en fetge. Al model KI/KO, la traducció mitocondrial sols es va analitzar en fetge i cervell, i no podem descartar que aquesta passi a estar també afectada en altres teixits com per exemple cor, on sí que està reduïda l'activitat del CIV en ratolins joves.



Els defectes en proteïnes relacionades amb la traducció mitocondrial solen afectar de forma heterogènia els diferents teixits, tant en pacients<sup>19,47,241</sup> com en models murins<sup>85,86</sup>. S'ha postulat que una traducció mitocondrial defectuosa deu causar una depleció més ràpida de les proteïnes codificades a l'ADNmt en cèl·lules proliferatives, mentre que les cèl·lules o teixits amb una taxa de divisió més baixa deuen mantenir les subunitats del sistema OXPHOS de forma més prolongada<sup>118</sup>. No obstant això, les característiques i necessitats particulars de cada teixit i/o els mecanismes moleculars de resposta que puguin estar estimulats (discutits a continuació), poden arribar a justificar la progressió o reversió d'un determinat fenotip en un teixit concret amb el pas del temps<sup>75,113</sup>. Així doncs, dintre de cada model de ratolí, cada teixit sol comportar-se de manera diferent<sup>107</sup>, i al seu torn està subjecte a experimentar variacions del seu fenotip amb l'edat. Aquesta elevada complexitat ens va conduir a centrar-nos en la caracterització molecular de fetge i cervell al model KI/KO, pel fet de que són els òrgans més afectats als pacients amb COXPD1.

A molts dels models de ratolí amb defectes a la traducció mitocondrial, el CIV tendeix a ser un dels que, dintre del perfil COXPD, es veu afectat de forma més clara<sup>100,101,104,113</sup>, tal i com ocorre als mitocondris dels ratolins KI (en fetge a les 8 st) i KI/KO (en fetge i cervell a les 8 i 30 st). Als nostres resultats quan es veu afectada la traducció mitocondrial, estimem una reducció generalitzada de la taxa de síntesi dels polipèptids codificats a l'ADNmt. Cal tenir en compte que la identificació de cada polipèptid es va dur a terme per extrapolació de cada banda marcada radioactivament amb el marcador de pes molecular i no per immunodetecció amb anticossos específics<sup>223</sup>, per tant no podem estar completament segurs de l'assignació específica de cada proteïna a cada banda. Llavors, és difícil descartar la possibilitat de que les proteïnes del CIV tinguin una taxa de traducció inferior en comparació amb la d'altres proteïnes codificades a l'ADNmt que formen part d'altres complexos<sup>44</sup>.

D'altra banda, la proteïna COXI (MT-CO1) sintetitzada *de novo* és fàcilment distingible i mostra una menor estabilitat al model KI/KO segons els experiments *pulse chase* efectuats sobre mitocondris de fetge. El procés d'acoblament del CIV s'ha descrit que l'inicien COX4 i COX5A, però la inserció de COXI junt amb el complex MITRAC (C12orf62 i MITRAC12) a la membrana continua considerant-se

la base per a l'acoblament del CIV<sup>16</sup>. Altres autors han observat que el *turnover* de COXI en mitocondris control és més ràpid que el d'altres proteïnes sintetitzades *de novo*, fent que el CIV sigui especialment vulnerable a la síntesi reduïda de les seues subunitats<sup>100</sup>. Per tant, als mitocondris de fetge i cervell dels nostres models murins, la menor estabilitat de COXI podria justificar la reducció dels nivells basals de CIV acoblat i la seua activitat enzimàtica, així com la disminució d'altres subunitats del propi complex (COXII i COXIV) que podrien no ser estables en estat lliure i degradar-se. A part de COXI no s'ha observat que les altres proteïnes codificades per l'ADNmt siguin menys estables, encara que veuen reduïda la seua taxa de síntesi, suggerint que la mutació p.R671C i depleció d'EFG1 desencadenen principalment una disminució de la taxa de traducció mitocondrial *de novo*, més que de fidelitat de la traducció mitocondrial<sup>234</sup>.

Al model KI/KO es suma l'afectació del CI tant en fetge com en cervell (disminució del CI acoblat i de la seua activitat). A més, s'observa que la subunitat NDUFA9 (codificada a l'ADNn) també està disminuïda, segurament per la seua desestabilització en estat lliure (igual que COXIV). Pel que fa al CIII, pensem que la determinació espectrofotomètrica d'activitats de la CTE<sup>225</sup> és un mètode quantitativament més acurat en comparació amb la immunodetecció per BN-PAGE, i encara que la determinació de l'activitat del CIII sol tenir associades més dificultats en comparació amb la dels altres complexos, es fa visible un lleuger defecte en els dos teixits diana.

El CII és l'únic del sistema OXPHOS conformat sols per subunitats codificades a l'ADNn, per això no sol estar afectat en malalties associades a defectes en la traducció mitocondrial<sup>19</sup>. En algun cas particular s'ha detectat per histoquímica una major activitat succinat deshidrogenasa (part del CII) en biòpsies musculars de pacients amb COXPD1<sup>56</sup> que, com en altres malalties mitocondrials, s'associa a un augment de massa mitocondrial com a resposta al defecte del sistema OXPHOS, més que a una sobreexpressió de CII. Tanmateix, l'augment del CII acoblat també s'ha detectat en ratolins amb defectes a la traducció mitocondrial causats per la pèrdua específica de MTIF3 en cor i múscul esquelètic<sup>115</sup>. No obstant això, als models murins KI i KI/KO es mantenen uns nivells normals de la subunitat SDHA (en mitocondris i homogenats de fetge i cervell), del CII acoblat i la seua activitat

enzimàtica (en mitocondris i homogenats de fetge i cervell, respectivament). Per aquesta raó hem utilitzat SDHA i CII com a marcadors de massa mitocondrial a les immunodeteccions per western blot SDS-PAGE i BN-PAGE.

La reversió del dèficit de CIV en fetge als ratolins KI de 50 setmanes d'edat apunta a que la traducció mitocondrial, que continua sent menys eficient a aquesta edat, podria tenir un rol més actiu en animals joves i anar diluint-se les conseqüències dels seus defectes amb l'edat. Això podria deure's a una major activitat mitocondrial i per tant del sistema OXPHOS durant les etapes de desenvolupament, quan teixits com el fetge són proliferatius, mentre que amb l'edat, quan el *turnover* mitocondrial es redueix<sup>242</sup>, l'acoblament del CIV no es veu tan alterat. Una altra possibilitat, compatible amb l'anterior, seria la possible estimulació de mecanismes moleculars de resposta dirigits a estabilitzar i acoblar les subunitats al CIV<sup>7</sup>. La caracterització dels ratolins KI/KO adults es va efectuar a les 30 setmanes d'edat tenint en compte el precedent del model KI, l'estalvi de temps per obtenir els ratolins i pensant que els pacients amb COXPD1 tenen associada una esperança de vida reduïda i no seria del tot representatiu estudiar edats més avançades al model murí. El fet de que el fenotip COXPD es mantingui a les 30 setmanes d'edat, obre una ampla finestra temporal de cara a testar potencials aproximacions de teràpies sobre el model KI/KO.

Finalment, és cert que cal tenir present el fons genètic mixt entre C57BL/6NTac i C57BL/6J de la colònia *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> a l'hora d'interpretar alguns resultats. No obstant això, pensem que les alteracions moleculars relatives al perfil COXPD són prou robustes, algunes d'elles ja s'havien detectat al model KI (que presentaven un fons genètic homogeni C57BL/6NTac) i el fet d'introduir animals KI amb el fons genètic mixt a la caracterització dels ratolins KI/KO dona garanties que la probabilitat d'errors relatius a aquest aspecte deu ser molt baixa. A més a més, als ratolins utilitzats per l'estudi de teràpia gènica, amb fons genètic homogeneïtzat cap a la soca C57BL/6J, es conserva el fenotip COXPD molecular del model KI/KO, tal i com s'observa als ratolins control exposats al vehicle.

### 6.1.3. Absència de fenotip neuromuscular i hepàtic COXPD1

El greu quadre clínic que pateixen des de just després del naixement els pacients amb COXPD1 contrasta amb que en cap dels dos models murins generats (KI i KI/KO) s'han arribat a detectar alteracions en la condició física, ni disfuncions neuromusculars o hepàtiques que reproduïxin els trets clínics dels pacients, relacionades amb el fenotip molecular COXPD derivat de la depleció d'EFG1. La supervivència dels ratolins KI i KI/KO és normal en comparació amb la dels animals *Gfm1<sup>+/+</sup>*, tots dos models són fèrtils i el pes relatiu dels teixits analitzats no ofereix variacions entre genotips. Pel que fa al pes corporal l'únic rellevant és que aquest és inferior als ratolins KI/KO de 7 dies d'edat, tot i que es normalitza després del deslletament. Tret que seria interessant explorar més en profunditat ja que en el cas de no estar relacionat amb el fons genètic mixt, podria ser indicatiu d'un desenvolupament endarrerit derivat del perfil COXPD molecular.

Els tests d'exercici físic duts a terme han demostrat que els ratolins mutants KI i KI/KO, tant joves com adults, presenten una resistència física i força normals, que concorden amb les activitats enzimàtiques normals de la cadena respiratòria observades en múscul esquelètic. Tampoc s'han detectat alteracions neuromusculars diferencials indicatives de menor coordinació o possible afectació neurològica als ratolins KI/KO, malgrat el defecte OXPHOS en cervell. En aquest sentit, cal comentar que al model KI/KO es va intentar analitzar la morfologia cerebral provant de mesurar l'àrea i gruix de l'isocòrtex sobre talls criopresservats i tenyits amb *Cresyl Violet*, però la baixa qualitat dels talls obtinguts ens va impedir efectuar una anàlisi acurada. Llavors, roman la incògnita de si el perfil COXPD molecular en cervell porta associat un defecte morfològic que encara que sigui lleu pugui derivar en algun defecte funcional detectable. Per tant, seria interessant plantejar en un futur anàlisis d'imatge per ressonància magnètica<sup>208,243</sup> sobre cervells de ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* i, en el cas de detectar qualsevol tipus d'anomalia, repetir el *Rotarod* a altres edats o modificant-ne les condicions, i/o aplicar altres tests cognitius<sup>244</sup>. De fet, companys del propi grup de recerca han dut a terme una bateria de tests sobre ratolins KI/KO nounats dirigits a detectar qualsevol defecte en el desenvolupament i els resultats, tot i que deurien de validar-se amb una cohort més amplia d'animals,

suggereixen possible afectació auditiva, resultat prèviament descrit en models amb defectes a la traducció mitocondrial<sup>112</sup>.

L'estudi d'altres models murins amb traducció mitocondrial disfuncional ha posat de manifest alguns trets metabòlics que no hem observat en el nostre model. Per exemple, el defecte a la síntesi de polipèptids codificats a l'ADNmt en el ratolí heterozigot *Ptcd1*<sup>+/-</sup> s'ha relacionat amb obesitat d'aparició adulta que resulta en esteatosi hepàtica, postulant-se les mutacions en aquesta proteïna de maduració de l'ARNr-mt com a un factor de predisposició important per desenvolupar la síndrome metabòlica<sup>110</sup>. No obstant això, els signes d'afectació hepàtica observats als nostres ratolins mutants no estan relacionats aparentment amb la marcada depleció d'EFG1. D'una banda, l'increment de l'activitat ALT en plasma i el perfil histològic d'esteatohepatitis s'observa tant en ratolins *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> com en *Gfm1*<sup>+/-</sup> amb l'envelliment, i encara que als mascles KI la tendència d'augment de l'ALT és més marcada, sembla que aquests trets deuen estar associats al fons genètic, ja que n'hi ha resultats previs que recolzen la predisposició de la soca C57BL/6NTac a experimentar aquestes alteracions<sup>245</sup>. En biòpsies de pacients s'ha detectat increment de glicogen en múscul<sup>56</sup> i fibrosi i acumulació de lípids en fetge<sup>58</sup>. Als ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> (amb fons genètic mixt), s'entreveu a les 30-35 setmanes d'edat una progressió de l'ALT i esteatosi hepàtica similar a l'observada amb el model KI. A més, l'anàlisi histològica descarta alteració del glicogen hepàtic<sup>246</sup> a les 8 setmanes d'edat i revela absència de fibrosi a les 30 setmanes d'edat. Amb tot això, sembla que l'afectació OXPHOS al fetge d'ambdós models murins no es troba lo suficientment accentuada com per a desencadenar insuficiència hepàtica. Interessa recordar que s'han reportat alguns casos de pacients amb COXPD1 que presenten defectes OXPHOS en fetge però no manifesten símptomes hepàtics<sup>65</sup>, i és fàcil pensar que aquesta situació pugui ser més habitual ja que el diagnòstic molecular normalment no s'efectua sobre biòpsies de fetge.

Alguns autors han observat que l'augment de la proliferació cel·lular estimulada per una resposta d'estrès mitocondrial podria ajudar a revertir defectes de la traducció mitocondrial al fetge de models de ratolí<sup>113</sup>. Per contra, en models murins amb defectes mitocondrials i hepatotoxicitat induïda, la regeneració hepàtica s'ha detectat reduïda<sup>247</sup>. Als ratolins KI/KO la immunohistoquímica Ki-67 en fetge no revela cap

alteració. No obstant això, independentment del genotip es deixa entreveure i valida la major capacitat proliferativa dels hepatòcits als animals joves en comparació amb els ratolins adults<sup>248</sup>.

Les anàlisis de marcadors bioquímics en plasma, dirigides principalment a detectar alteracions relacionades amb el perfil COXPD hepàtic dels models KI i KI/KO, no han permès detectar pràcticament cap tret diferencial. Tan sols és destacable la detecció d'una concentració inferior de triglicèrids al plasma dels ratolins KI/KO de 20 setmanes d'edat en comparació amb els animals WT. Resultat que, tal i com s'ha detectat al model de ratolí *Wars2*<sup>V117L/V117L</sup><sup>107</sup>, podria estar relacionat amb l'increment d'àcids grassos lliures circulants reportat als ratolins heterozigots *Gfm1*<sup>+/-</sup> de l'EMMA<sup>116,117</sup>, i suggerir una possible alteració del metabolisme lipídic com a efecte resposta davant el defecte OXPHOS dels models murins. De fet, en altres models de ratolí amb defectes a la traducció mitocondrial s'ha detectat augment d'intermediaris del cicle de Krebs (*MRPS12*<sup>ep/ep</sup>)<sup>113</sup>, o al model *Ptcd1*<sup>+/-</sup> sota una dieta rica en greix s'ha observat reducció del contingut de lípids estimulada per AKT, que junt amb una major biogènesi mitocondrial protegeixen els ratolins de guanyar pes i redueixen l'acumulació de lípids en fetge<sup>111</sup>. No obstant això, tenint present la predisposició del fons genètic de les nostres colònies per desenvolupar esteatosi hepàtica, qualsevol aspecte relacionat amb el metabolisme de lípids deu ser estudiat amb prudència, i seria interessant analitzar-lo sota el fons genètic homogeni C57BL/6J.

D'altra banda, l'increment de lactat en plasma propi dels pacients amb COXPD1 no s'observa al model KI/KO, i fa que es plantegi l'opció de testar altres marcadors bioquímics de disfunció mitocondrial, com per exemple FGF21 (*fibroblast growth factor 21*), en mostres de sang dels ratolins<sup>107,249</sup>. Poder trobar un marcador d'aquest tipus amb valors diferencials al plasma dels ratolins KI/KO seria molt rellevant a l'hora d'avaluar la progressió del perfil COXPD sense haver de sacrificar els animals, en condicions normals i/o per monitoritzar millor l'efecte d'una potencial estratègia terapèutica.

#### **6.1.4. Estimulació de mecanismes moleculars de resposta**

La dràstica reducció d'EFG1 als ratolins KI i KI/KO altera la funcionalitat de la traducció mitocondrial i dona lloc a un defecte OXPHOS clar en fetge, però també en cervell al segon model murí. Tanmateix, per tal d'intentar donar resposta a per què el fenotip COXPD molecular aparentment no desencadena cap patologia sobre fetge i cervell, resulta interessant avaluar possibles mecanismes que puguin estar estimulats i compensar el dèficit d'EFG1.

En pacients s'ha proposat que la composició de la maquinària de traducció pot explicar la resposta variable de diferents teixits a les mutacions en *GFM1* i que alguns processos compensatoris poden activar-se, com és la sobreexpressió d'altres factors d'elongació<sup>55</sup>. Una observació similar s'ha descrit en ratolins, on la manca del factor d'iniciació MTIF3 en cor s'ha relacionat amb un augment d'altres factors de traducció com EFTu i EFG2<sup>115</sup>. Contràriament, als nostres models de ratolí no s'han trobat evidències dels ajustaments de sobreexpressió indicats, ja que l'expressió dels factors EFTu, EFTs i EFG2 no es troben incrementats als mitocondris de cap dels teixits analitzats, i tan sols resta conèixer si amb altres factors d'iniciació, terminació o reciclatge ocorre el mateix.

En malalties on la disfunció mitocondrial és la base d'un procés d'alteració del desenvolupament cerebral o neurodegeneratiu és freqüent trobar associat un augment de la massa mitocondrial per a superar el defecte qualitatiu causat per proteïnes mitocondrials mutades, resposta que en molts casos no sol ser suficient per corregir el dèficit energètic ja que no incrementa la quantitat de mitocondris funcionals<sup>122</sup>. Als fetges i cervells dels ratolins KI/KO, es detecta un augment d'activitat CS que podria venir donat per l'increment de massa mitocondrial i/o l'estimulació d'intermediaris del cicle de Krebs, tal i com alguns autors han reportat en altres models murins similars<sup>113</sup>. Tanmateix, mitjançant western blot els nivells d'aquest enzim, així com el d'altres marcadors de massa mitocondrial (SDHA i VDAC1) no es detecten augmentats als homogenats de teixits de ratolins KI/KO joves. Aquests resultats divergents poden explicar-se per la major sensibilitat del mètode espectrofotomètric d'activitat enzimàtica en comparació amb la immunodetecció de les proteïnes a l'hora de detectar alteracions subtils, tal i com

ocorre amb el defecte de CIII als animals KI/KO (reducció de l'activitat sense observar nivells inferiors del complex acoblat).

Per una altra banda, tant als animals KI com KI/KO joves el número de còpies d'ADNmt es manté equiparable al dels ratolins WT als dos teixits diana analitzats, suggerint que el defecte de la traducció mitocondrial no porta associat un augment de la replicació i/o estabilització de l'ADNmt.

La caracterització d'altres models de ratolí amb defectes a la traducció mitocondrial i disfunció del sistema OXPHOS ha permès identificar en diverses ocasions un increment dels nivells basals d'espècies d'ARNmt (ARNm<sup>113</sup>, ARNt<sup>114</sup> o ARNr<sup>99</sup>) derivat de l'estimulació de la transcripció mitocondrial i/o l'estabilització posterior dels transcrits<sup>103</sup>, així com una estimulació de la biogènesi del mitoribosoma<sup>99,108,109,115</sup>. En el nostre cas, la quantificació dels nivells basals de l'ARNm *Nd4* i de l'ARNr *16S* deixa entreveure un augment de les dues espècies als cervells dels ratolins KI joves. Tanmateix, al model KI/KO és rellevant que, quan s'intensifica el perfil COXPD, també augmenten de forma més evident ambdós ARN mitocondrials tant al fetge com al cervell dels animals joves. Encara que seria interessant ampliar les anàlisis a més transcrits, aquests resultats demostren que la reducció de la taxa de traducció mitocondrial derivada del dèficit d'EFG1 comporta una resposta relacionada amb l'estimulació de la transcripció mitocondrial i/o l'augment de l'estabilitat dels transcrits resultants. Possiblement, la resposta més ràpida i marcada que sembla haver-hi al cervell en comparació amb fetge pot tenir a veure amb l'afectació diferencial dels dos teixits, sobretot en el context del model KI.

Paral·lelament, als ratolins KI es detecta un increment de dues proteïnes del mitoribosoma (MRPS9 i MRPL13) en mitocondris de fetge, confirmant-se aquest efecte al fetge i cervell del model KI/KO, on es suma l'augment de MRPS35. Això concorda amb l'augment dels nivells de l'ARNr *16S* i suggereix que s'estigui estimulants la biogènesi del mitoribosoma, sent de nou la resposta més marcada en mitocondris de cervell que amb els de fetge. Tenint en compte que les MRPs estan codificades a l'ADNn, si el seu augment fos causat per la seua sobreexpressió es confirmaria que el defecte mitocondrial dels ratolins mutants engega una resposta compensatòria a nivell nuclear o citoplasmàtic. Alternativament, aquest augment es



podria deure a l'estabilització de les MRPs als mitocondris, la qual cosa suggeriria una resposta compensatòria relacionada amb ajustos de l'homeòstasi proteica post-traducciona. En relació amb això, l'augment de les MRPs no té per què traduir-se en un increment de les subunitats 28S i 39S o del mitoribosoma acoblat, i seria interessant aprofundir en aquest aspecte. De fet, i com a exemple, al model de ratolí *Ctpp*<sup>-/-</sup>, tot i que es dona una situació similar a la nostra, els nivells del mitoribosoma acoblat (55S) es presenten reduïts<sup>103</sup>.

Al model de ratolí KO específic de fetge per a la proteïna LRPPRC, a part de veure's incrementada la quantitat de mitoribosomes per unitat de mitocondri, s'indueixen mecanismes de proteòstasi per mantenir un balanç entre les subunitats del sistema OXPHOS codificades a l'ADNmt i a l'ADNn. A més, s'observen canvis als glicerofosfolípids de membrana que poden participar en l'estabilització del CIV residual en supercomplexos, apuntant a que aquesta reorganització supramolecular pot afavorir la preservació de la funcionalitat de la CTE<sup>102</sup>. Cal tenir present que, en el nostre cas, els BN-PAGE efectuats han anat dirigits a l'anàlisi individual dels complexos OXPHOS i seria interessant en un futur modificar les condicions experimentals per tal de poder estudiar els supercomplexos. Els complexos OXPHOS s'acoblen entre ells formant supercomplexos, havent-se descrit que d'aquesta manera millora l'eficiència de la CTE i per tant el rendiment energètic<sup>7</sup>. Llavors, no és estrany pensar que als fetges i cervells KI/KO es pugui donar una reorganització sobretot de CI i CIV en supercomplexos per compensar la seua disminució, o bé promoure la seua estabilització tal i com ocorre amb altres models murins<sup>113</sup>, minimitzant així els efectes del fenotip COXPD.

S'ha observat que, depenent del grau i/o tipus d'afectació de la traducció mitocondrial, el fenotip molecular derivat pot ser completament desigual entre diferents models murins, específic per a cada teixit i oferint una progressió variable amb l'edat en cada cas. Per a cada situació, la resposta integrada d'estrès (ISR) promoguda a través de diferents mecanismes, pot assolir diferents graus: des de no engegar-se i desencadenar patogenicitat, fins a estimular-se causant modificacions compensatòries a nivell transcryptòmic i proteòmic que arribin a rescatar total o parcialment el defecte inicial<sup>107,113</sup>. En la caracterització molecular sobre biòpsies de pacients, llevat de la descripció dels nivells basals dels factors d'elongació i els ratios

entre ells<sup>55</sup>, no tenim constància de que s'hagin explorat de moment altres possibles mecanismes de resposta. En el cas de poder aprofundir en un futur en aquest estudi sobre diferents teixits tant de pacients com del model murí KI/KO, es podrien fer visibles mecanismes que ajuden a que els ratolins aconseguixin compensar o esquivar els efectes de la depleció d'EFG1 i possiblement no estan activats en humans, obrint la porta a cercar formes de promoure o imitar l'escenari del model murí en humans i suggerint noves aproximacions terapèutiques per a la COXPD1.

### 6.1.5. Alternatives i perspectives de futur del model *Gfm1*<sup>R671C/-</sup>

Els defectes mitocondrials no sempre desencadenen un fenotip detectable a través de l'observació o de proves funcionals no invasives als models *in vivo*, i de vegades és sota certes condicions d'estrès quan aquest fenotip s'evidencia. És el cas per exemple del ratolí *knock-out* per a la topoisomerasa 1 mitocondrial (TOP1mt), sense fenotip aparent en condicions normals, però on la fibrosi en fetge induïda amb CCl<sub>4</sub> compromet el manteniment de l'ADNmt, les funcions mitocondrials i, en conseqüència, la regeneració hepàtica<sup>247</sup>. Resultats rellevants que, extrapolats a un context de carcinoma hepatocel·lular, han demostrat la correlació entre la manca de TOP1mt i la major supervivència de pacients amb aquest tipus de càncer, assenyalant la importància de TOP1mt per al creixement tumoral i convertint-se en una potencial diana per a futurs tractaments<sup>250</sup>.

D'altra banda, la deleció d'EFG1 induïda amb tamoxifè sobre el ratolí *Gfm1*<sup>-/-</sup> específic per a limfòcits T durant el desenvolupament de l'encefalomielitis autoimmunitària experimental (EAE) protegeix dels símptomes de la malaltia, demostrant que EFG1 és necessari per a la funcionalitat de les cèl·lules Th17 i aportant una evidència per considerar la inhibició de la traducció mitocondrial com a un mètode per combatre respostes patològiques de les cèl·lules Th<sup>118</sup>. A part de proposar a EFG1 com una diana prometedora per controlar la traducció mitocondrial i modular la resposta immunitària, aquests autors van subratllar la capacitat dels antibiòtics que actuen sobre el mitoribosoma per alterar les funcions cel·lulars<sup>118</sup>.

Aquests exemples demostren que els models de ratolí amb defectes mitocondrials són de gran utilitat per a la recerca bàsica i translacional, tant en el camp de les

malalties mitocondrials com en el d'altres patologies amb major prevalença. Això posa en valor la potencial aplicabilitat futura del model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>*, al temps que ajuda a pensar aproximacions que podrien posar-se sobre la taula per tal de millorar el model perquè reproduïxi millor el quadre clínic de la COXPD1.

La combinació dels al·lels *knock-in* i *knock-out* en el model *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* aconsegueix reduir la proteïna EFG1 fins a un 2-5% dels nivells basals als mitocondris de fetge i cervell comparant amb animals WT. Tot i això, la taxa de traducció mitocondrial es manté lo suficientment elevada com per a que el defecte de la CTE i el sistema OXPHOS no acaben desencadenant cap manifestació patològica clara i, pel que hem pogut detectar, els ratolins semblen mantenir-se bàsicament sans. Tenint en compte que l'absència completa d'EFG1 resulta letal en estadis embrionaris, queda de manifest que el llindar a partir del qual deu haver afectació patològica ha de situar-se en uns nivells de factor d'elongació encara menors.

Davant d'aquesta situació, és inevitable pensar en aproximacions dirigides a alterar la funcionalitat de la proteïna EFG1 residual dels ratolins KI/KO o que permetin directament reduir un esglaó més els nivells basals del factor d'elongació. Així doncs, s'ha plantejat administrar els ratolins KI/KO amb antibiòtics que puguin tenir efectes deleteris sobre la traducció mitocondrial, prioritant l'ús de molècules com l'ArgC (*Argyrisin C*) que tenen com a diana EFG1<sup>118</sup>. De fet al propi grup ja s'han realitzat estudis preliminars utilitzant fibroblasts de pacients amb COXPD1 i fibroblasts embrionaris de ratolins (MEFs), i els resultats mostren com a part de l'ArgC, l'àcid fusídric i el tedizolid (que inhibeixen la traducció bacteriana) produeixen certa toxicitat cel·lular a nivell mitocondrial i podrien ser bons candidats per testar el seu efecte sobre el model KI/KO. Alternatives una mica més inespecífiques i agressives podrien incloure sotmetre als animals amb compostos que indueixen toxicitat hepàtica, com ara el CCl<sub>4</sub>, tal i com s'ha fet amb altres models<sup>247</sup>. Una altra opció podria ser l'estudi d'un ratolí KO de *Gfm1* específic de fetge o cervell, que en el cas de no ser letal durant l'etapa embrionària seria molt útil per caracteritzar el desenvolupament i la fisiopatologia de cada teixit amb absència completa d'EFG1.

## 6.2. Teràpia gènica amb rAAV sobre el model *Gfm1*<sup>R671C/-</sup>

### 6.2.1. Estratègia preclínica plantejada

Donat que la COXPD1 és una malaltia monogènica, la correcció gènica mitjançant la introducció d'una còpia funcional de *GFM1* amb un vector a les cèl·lules dels teixits afectats dels pacients podria evitar la progressió de la malaltia i corregir certs defectes clínics ja presents. Al propi grup ja s'ha demostrat que el tractament de fibroblasts de pacients amb COXPD1 amb un vector lentiviral (LV) que conté la seqüència codificant de *GFM1* sota la regulació del promotor de la fosfoglicerat quinasa humana (*hPGK*), ofereix una transducció capaç de dirigir l'expressió d'EFG1 de forma eficient i estable, revertint el fenotip molecular característic (resultats no publicats). En aquesta tesi hem donat el primer pas de cara a extrapolar l'estudi preclínic de teràpia gènica a un model *in vivo*, el ratolí *Gfm1*<sup>R671C/-</sup>, que hem generat i caracteritzat en aquest mateix treball i que ha demostrat tenir un clar fenotip molecular susceptible de ser corregit.

Els rAAV són actualment l'opció preferida per a les estratègies de teràpia gènica *in vivo* ja que, a diferència dels LV, són vectors amb una taxa d'integració negligible i per tant redueix la possible genotoxicitat. La seua biologia, estructura simple i absència de malalties associades ha fet que siguin un dels vectors de transferència líders en el desenvolupament clínic, i un gran nombre d'assaigs clínics ja ha demostrat que són segurs i ben tolerats<sup>251</sup>.

L'ús de vectors adenoassociats permet la correcció gènica d'un teixit específic mitjançant l'aplicació sistèmica gràcies a la combinació de diferents càpsides víriques amb un tropisme determinat i la regulació de l'expressió gènica mitjançant promotors específics, la qual cosa permet dirigir la teràpia als teixits afectats<sup>192,252,253</sup>. En el context de l'hepatoencefalopatia deguda a mutacions en *GFM1*, tenint en compte el quadre clínic dels pacients es prioritza fer arribar la còpia funcional de *GFM1* a cervell i fetge, que són els teixits amb afectació més greu. Vam elegir la forma humana de *GFM1* com a gen terapèutic dels rAAV generats ja que, en cas d'obtenir resultats positius en els ratolins, això facilitarà la seua possible translació futura cap a assaigs clínics. De cara a aplicar la teràpia gènica sobre el model

*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>, fins l'actualitat no es tenia coneixement que la forma humana d'EFG1 fos capaç d'importar-se correctament des del citosol als mitocondris de ratolí i exercir la seua funció a la maquinària de traducció mitocondrial murina. Davant d'aquesta incertesa, es va decidir començar pel fetge com a diana, ja que a diferència del cervell és un teixit molt més accessible utilitzant rAAV amb tropisme natural<sup>192</sup>, i tal i com s'ha comentat a la introducció, ofereix avantatges com l'alta taxa de transducció dels hepatòcits, la quiescència amb l'edat<sup>254</sup> i la capacitat d'esquivar la resposta immunitària cap al gen terapèutic<sup>193</sup>.

Entre els serotips que presenten tropisme hepàtic es va decidir utilitzar la càpsida de l'AAV9, ja que també s'ha descrit que té capacitat per transduir cervell<sup>255</sup> i d'aquesta forma es podrien obtenir resultats útils de cara al disseny d'una futura estratègia preclínica dirigida a aquest teixit. Pel que fa al genoma del vector, es van utilitzar les ITR de l'AAV2 i el casset ApoE-hAAT (*enhancer*-promotor), que al propi grup han donat lloc a resultats exitosos en estudis preclínics amb el model murí d'una altra malaltia, el MNGIE, amb *TYMP* com a gen terapèutic<sup>207,208</sup>. Altres elements del nostre vector, com ara l'intró HBB2 i el seu senyal de poliadenilació, també acompanyaven el casset ApoE-hAAT i l'ADNc de *TYMP* als estudis anteriors.

Tenint en compte la influència significativa del sexe dels ratolins sobre la transducció hepàtica dels rAAV<sup>233</sup> vam decidir incloure mascles i femelles en el nostre estudi, analitzant en paral·lel i de forma independent l'efecte de la teràpia sobre els dos sexes. La injecció intravenosa del vector és una de les més utilitzades pel fet de ser poc invasiva; la dosi ( $5 \cdot 10^{12}$  gv/kg) es troba dintre del rang administrat normalment en estudis similars<sup>127</sup> i l'edat d'administració (6 setmanes) és equivalent en humans a la d'alguns pacients amb COXPD1. El grup de ratolins KI/KO tractats amb vehicle, s'ha utilitzat per controlar efectes adversos notables que aquest pogués originar, tot i que en estudis futurs dirigits a analitzar la immunogenicitat del gen terapèutic i del seu producte d'expressió, es deuria substituir per animals KI/KO administrats amb un AAV9 amb un constructe similar al del nostre vector però sense *GFM1*.

Per últim, la manca d'un marcador bioquímic circulant o qualsevol altre tipus de biomarcador associat al perfil COXPD dels ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> impossibilita seguir periòdicament l'efecte de la teràpia als animals tractats amb el rAAV. Com que es

feia necessari sacrificar els ratolins per analitzar l'eficàcia de l'estratègia preclínica sobre els teixits diana, es va plantejar que quatre setmanes post-tractament podria ser temps suficient per detectar transducció hepàtica<sup>209</sup>, expressió de *GFM1* i recuperació del defecte OXPHOS<sup>127</sup>. Afortunadament, les prediccions han resultat exitoses, però continua sent interessant avaluar en un futur el fenotip COXPD a temps més prolongats (p. ex. a les 30 setmanes d'edat), per tal d'analitzar el manteniment de l'efecte aconseguit i el grau de dilució del gen terapèutic amb el temps.

El vector ssAAV9-hAAT-GFM1 administrat segons les condicions descrites no s'associa amb cap alteració de pes corporal ni del pes relatiu de fetge dels ratolins KI/KO. Les necròpsies no revelen cap anormalitat macroscòpica als teixits dels ratolins tractats i no s'ha detectat cap alteració que suggereixi efectes adversos relacionats amb el tractament, tal i com s'ha observat en altres ocasions<sup>174,175</sup>. No obstant això, aquest estudi s'ha centrat en l'avaluació de l'eficàcia del rAAV generat i seria necessari efectuar estudis exhaustius de bioseguretat (anàlisi histològica dels teixits, biomarcadors, anàlisi de supervivència prolongada, etc.) per tenir informació acurada d'aquest aspecte, que no formava part de l'abast dels nostres objectius.

### **6.2.2. Transducció dels teixits diana i expressió hepàtica del gen terapèutic**

El vector ssAAV9-hAAT-GFM1 transdueix de forma exitosa el fetge dels ratolins KI/KO, detectant-se un número de còpies de genoma viral significativament superior en mascles que en femelles, d'acord amb el que s'ha descrit en referència a la influència dels andrògens per augmentar la transducció dels AAV fins a 7 vegades als fetges dels ratolins mascles en comparació amb les femelles<sup>233</sup>. D'altra banda, la quantitat d'EFG1 en mitocondris de fetge augmenta fins aproximadament el 20% i 50% en femelles i mascles respectivament, en comparació als nivells basals WT. A més es confirma una correlació positiva entre el número de còpies de vector i els nivells mitocondrials d'EFG1. La caracterització dels models murins KI i KI/KO ha fet visible que EFG1 es troba en excés en condicions normals, i tal i com es discuteix a continuació, creiem que no és necessària una recuperació completa del factor d'elongació per a poder restituir la CTE i el sistema OXPHOS.

Tal i com ha ocorregut amb altres estudis de teràpia gènica basada en AAV sobre models murins, la forma humana de la proteïna expressada pel gen terapèutic, en el nostre cas EFG1, aconsegueix importar-se satisfactòriament a mitocondris<sup>200,206,210</sup>. Aquest pas és crític i la seua eficiència podria avaluar-se, tal i com s'ha fet en el context de LHON, on sota injeccions intraoculars d'AAV2-ND4FLAG s'ha confirmat per immunoprecipitació i immunofluorescència que la forma humana de ND4 es processa i importa correctament als mitocondris de cèl·lules ganglionars de la retina i axons del nervi òptic murins<sup>256</sup>.

Idealment el tractament hauria d'arribar per igual a totes les cèl·lules hepàtiques, assolint una transducció generalitzada. Així doncs, un aspecte a tenir en compte i pendent de ser avaluat és si la transducció del rAAV i per consegüent l'expressió de la proteïna terapèutica es distribueix de forma homogènia al llarg del fetge. Les anàlisis per immunohistoquímica o immunofluorescència utilitzant un anticòs específic contra l'EFG1 humana, podrien ser una bona estratègia per quantificar el percentatge de cèl·lules hepàtiques eficientment tractades, així com identificar àrees del fetge on el vector té més difícil l'accés.

Contràriament al que ocorre en fetge, la transducció del ssAAV9-hAAT-GFM1 en cervell és molt poc eficient, i encara que a la qPCR s'arriba a amplificar *GFM1* al cervell de ratolins tractats, a diferència del que passa als controls negatius (WT i KI/KO V), pensem que el VCN obtingut és poc fiable ja que es van haver d'utilitzar extractes d'ADN total molt concentrats per tal d'amplificar *GFM1*, la qual cosa s'associava a una certa interferència de la reacció qPCR. L'eficiència de la transducció del CNS per part del serotip AAV9 administrat per via intravenosa sovint ha ofert resultats divergents<sup>257,258</sup>, i depèn de diverses variables entre les quals hi ha: la dosi (que correlaciona amb el VCN), la formulació del vehicle (que pot facilitar travessar la barrera hematoencefàlica), si es tracta d'un genoma scAAV (que incrementa el grau de transducció en comparació amb els ssAAV), o la presència d'anticossos neuralitzants (NAbs), entre d'altres<sup>258</sup>. Llavors, és cert que d'entre els serotips naturals l'AAV9 és, a part de l'AAVrh10, el que major transducció al sistema nerviós central ofereix, però depenent del tipus cel·lular, l'àrea cerebral a la qual es vulgui arribar i el gen terapèutic seleccionat, l'eficiència obtinguda amb una administració sistèmica es veu compromesa i és limitada en molts casos<sup>258,259</sup>. Una

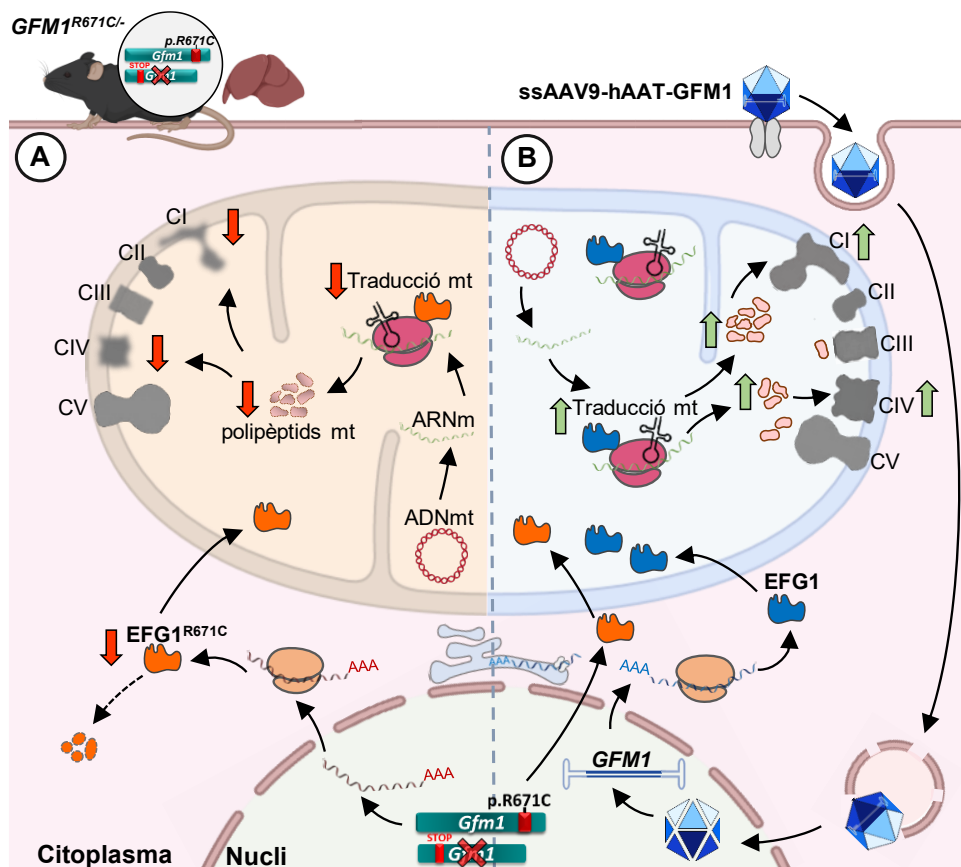
alternativa per tal d'incrementar l'eficiència de transducció de l'AAV9 al CNS seria testar vies d'administració alternatives, com ara la intratecal<sup>260</sup>. No obstant això, com que en el nostre cas preferim optar per una administració intravenosa del rAAV, i l'opció d'incrementar de la dosi podria causar efectes adversos sobre teixits perifèrics<sup>258</sup>, potser la millor opció és la de seleccionar una càpsida de nova generació de cara als futurs estudis preclínics dirigits a cervell.

### 6.2.3. Correcció del perfil COXPD molecular del fetge

La proteïna EFG1 humana expressada pel gen terapèutic, que conserva un 94% de similitud amb la proteïna ortòloga murina<sup>32</sup>, s'importa a mitocondris i a més deu ser funcional tal i com demostra la reversió del fenotip molecular COXPD hepàtic dels ratolins KI/KO tractats amb el rAAV.

Les anàlisis de traducció mitocondrial *in organello* aquest cop van oferir resultats poc consistents (no mostrats en aquesta tesi) que no van replicar als diferents intents realitzats. Segurament la causa deu estar relacionada amb algun factor experimental desconegut, i com que es tracta d'un mètode on s'utilitzen mitocondris frescs, es va esgotar el nombre de ratolins KI/KO AAV i per tant d'oportunitats per tal de resoldre el problema. No obstant això, els mateixos extractes mitocondrials obtinguts van permetre detectar la restitució parcial dels nivells basals de les subunitats NDUFA9, NDUFA10, COXI i COXII als ratolins KI/KO tractats. Resultat que associem a l'augment de la taxa de síntesi dels polipèptids codificats a l'ADNmt (com COXI i COXII) gràcies a la funció de l'EFG1 humana. La recuperació quasi per complet dels complexos CI i CIV mitocondrials demostra que els polipèptids derivats de la traducció mitocondrial als animals KI/KO AAV deuen ser estables i acoblar-se junt amb les subunitats codificades a l'ADNn, explicant que aquestes últimes deixin d'estar lliures i degradar-se (com NDUFA9 i NDUFA10). Finalment, les activitats enzimàtiques de CI i CIV confirmen la millora del defecte de la CTE amb la teràpia, mostren la funcionalitat dels complexos i la correcció del fenotip COXPD molecular del fetge (*Figura 6.2*).





**Figura 6.2. Efecte de l'estratègia preclínica de teràpia gènica sobre el model de ratolí  $Gfm1^{R671C/-}$ .** (A) Fenotip COXPD molecular al fegatí del model  $Gfm1^{R671C/-}$ , on la depleció d'EFG1 $^{R671C}$  (taronja) redueix l'eficiència de síntesi dels polipeptidus codificats a l'ADNmt, donant lloc a una afectació de CI i CIV (complexos acoblats i activitat enzimàtiques inferiors). (B) El ssAAV9-hAAT-GFM1 transduïx els hepatòcits del model murí, proveint-los de la seqüència correcta de  $GFM1$ . L'EFG1 humana expressada pel gen terapèutic (blau) s'importa a mitocondris i és funcional, revertint el perfil COXPD inicial.

El balanç de subunitats codificades a l'ADNmt i l'ADNn ha permès en altres ocasions corregir el defecte d'un complex OXPHOS determinat a través de teràpia gènica amb rAAV dirigida a restituir subunitats codificades a l'ADNn (NDUFS4<sup>200-202</sup>) o l'ADNmt (ND4<sup>203</sup>), així com de factors d'acoblament i estabilització de complexos (SURF1<sup>204</sup>). Tanmateix, nosaltres hem donat un pas addicional incrementant el *pool* de polipeptidus provinents de la traducció mitocondrial per tal d'equilibrar els seus nivells amb els dels codificats a l'ADNn i recuperar l'estat basal dels complexos CI i CIV.

Tal i com s'ha avançat anteriorment, el grau de transducció (VCN) correlaciona positivament amb la quantitat de proteïna EFG1 mitocondrial. Aquesta correlació no es detecta entre els nivells basals d'EFG1 i els d'algunes subunitats OXPHOS (COXII, NDUFA9, NDUFA10), els complexos CI i CIV, i les seues activitats enzimàtiques als ratolins KI/KO tractats. En canvi, s'observa correlació positiva clarament significativa entre les quantitats d'EFG1 i COXI i això podria deure's a que el *turnover* de COXI és major<sup>100</sup> i llavors aquesta subunitat reflecteix millor els canvis d'eficiència de la traducció mitocondrial dependents d'EFG1. D'altra banda, el fet que el CIV estigui més afectat que el CI al fetge del model KI/KO pot justificar que el tractament amb els rAAV restitueixi l'activitat del CI de forma més clara en comparació amb la del CIV.

Les nostres observacions sobre els ratolins tractats amb ssAAV9-hAAT-GFM1 consoliden la idea que EFG1 es presenta en excés en condicions basals i encara que aquest no restitueixi els seus nivells per complet als animals KI/KO tractats, el seu increment a partir d'un determinat llindar ja aconsegueix un marcat efecte sobre el sistema OXPHOS i la CTE. De fet, als fetges de les femelles KI/KO AAV, tot i que l'expressió de l'EFG1 humana és inferior, les quantitats i activitats de CI i CIV assoleixen valors similars als detectats en mascles KI/KO AAV. Llavors, de cara a la translació de la teràpia a altres teixits murins o inclús a humans, aquesta observació suggereix que la l'ús dels rAAV pot arribar a corregir en gran mesura el perfil COXPD1 molecular encara que l'expressió del gen terapèutic no sigui òptima i els increments de la quantitat d'EFG1 siguin modestos. A més a més, és possible que l'acoblament dels complexos OXPHOS requereixi més temps i que l'efecte terapèutic encara pogués millorar respecte a l'observat, aspecte que podria analitzar-se en un futur prolongant el període entre l'administració del vector i el sacrifici dels animals.

Els resultats obtinguts amb l'estratègia de teràpia gènica són molt encoratjadors, però convé tenir presents algunes consideracions en les que es deuria d'indagar per tal de descartar possibles efectes perjudicials. La sobre-expressió excessiva de proteïnes mitocondrials pot, per si sola, causar defectes en la funció mitocondrial i el metabolisme. La producció de proteïnes mitocondrials defectuoses o mal plegades codificades a l'ADNn pot donar lloc a estrès per sobreacumulació de precursors mitocondrials (mPOS), així com disfunció dins dels propis mitocondris per

acumulació de proteïnes mal plegades (ISR, UPR)<sup>261</sup>. En el nostre cas seria interessant confirmar que l'EFG1 codificada pel gen terapèutic no s'acumula al citosol, ja que podria col·lapsar els canals d'import de les membranes externa i interna mitocondrials. D'altra banda, si la traducció mitocondrial es veïés accelerada en excés i fos poc acurada podria donar lloc a un excés de polipèptids aberrants a l'interior dels mitocondris i desencadenar una resposta d'estrès perjudicial. Per últim, pel que fa al balanç de proteïnes codificades als dos genomes<sup>31</sup> a la nostra situació segurament s'està contribuint més a la seua estabilització que desregulació. No obstant això, de nou convé assegurar que els polipèptids mitocondrials no es sobreexpressin en excés.

#### **6.2.4. Translació de la teràpia gènica als pacients amb COXPD1**

La teràpia basada en substitució gènica mitjançant rAAV està actualment en fase d'assaig clínic per a una de les malalties mitocondrials més freqüents (LHON)<sup>128</sup>, i s'han publicat diversos estudis preclínics aplicant aquesta estratègia sobre models de ratolí d'altres malalties mitocondrials<sup>127</sup>. D'entre aquestes hi ha les síndromes de depleció i delecions de l'ADNmt i deficiències relacionades amb la síndrome de Leigh, entre d'altres. Actualment, no tenim coneixement que s'hagin dut a terme estratègies preclíniques similars sobre models murins amb defectes a la traducció mitocondrial que estiguin relacionats amb algun subtipus de COXPD, de manera que el nostre estudi possiblement en constitueix el primer exemple.

De cara a la translació de la teràpia a humans, com que el dèficit d'EFG té lloc de forma generalitzada a tots els teixits, l'ús d'un vector amb un promotor constitutiu i una càpsida amb tropisme ampli podria ser l'opció més convenient<sup>194,261</sup>. No obstant això, cal tenir en compte que amb aquesta estratègia es complicaria encara més el control de la teràpia sobre els diferents teixits, sent altament difícil fixar la dosi necessària per a que a tots els tipus cel·lulars el grau de transducció, expressió d'EFG1 i restitució de la traducció mitocondrial entre d'altres, fossin els òptims: suficients per a corregir el defecte del sistema OXPHOS, però no excessius per evitar efectes adversos<sup>261</sup>. Llavors, potser seria preferible dirigir la teràpia als òrgans més afectats, és a dir, fetge i cervell, utilitzant un rAAV i unes condicions d'administració específiques i independents per a cada teixit diana.

D'altra banda, cal destacar que en estudis en primats no humans i en pacients no s'ha detectat transducció hepàtica diferencial entre sexes<sup>262</sup>, de manera que a priori no caldria tenir en compte aquest aspecte en el cas d'un futur assaig clínic.

El rol d'EFG1 en humans pot tenir especial importància durant l'etapa del desenvolupament i potser superada una certa edat el seu dèficit deu tenir menor transcendència. Això explicaria el quadre clínic post-natal i de ràpida evolució en molts pacients, i la raó per la qual als pacients que sobreviuen aquesta primera etapa sembla que es frena la progressió de la malaltia, tot i que romanen les afectacions existents. Llavors, és possible que una única administració dels rAAV tan aviat com fos possible (idealment al fetus dins del propi úter<sup>194,263</sup>) pogués ser suficient per rescatar el desenvolupament neonatal, diluir les afectacions cerebral i hepàtiques, i allargar l'esperança de vida dels pacients amb COXPD1.

A més a més, el fet d'iniciar la teràpia a etapes primerenques del desenvolupament faria que als pacients la presència de NAbS contra els rAAV fos menys probable. Per contra, a la teràpia gènica sobre infants el genoma del vector tendeix a diluir-se amb el creixement, disminuint l'expressió del gen terapèutic i fent que s'hagin de re-administrar noves dosis dels rAAV. En el cas de veure's en aquesta necessitat al context de la COXPD1, s'haurien d'implementar estratègies per tal d'esquivar la resposta immunitària i els NAbS pre-existents als pacients: des de l'ús d'immunosupressors<sup>162</sup> fins a l'aplicació de nous rAAV amb cassets terapèutics o càpsides modificades<sup>147</sup>.

Des del 2019 fins ara s'han publicat 18 pacients nous amb COXPD1<sup>64,65,67-69</sup> (un 46,2% del total de casos publicats) suggerint que amb la millora del diagnòstic genètic aquestes xifres es poden veure incrementades notablement en els propers anys. El diagnòstic precoç *per se* és un factor limitant en la majoria de malalties mitocondrials i concretament en la COXPD1. Aquest, és un aspecte clau per tal de poder aplicar a temps qualsevol potencial aproximació terapèutica i així evitar la mort prematura i l'aparició de trets clínics com l'encefalopatia que, amb el temps, són difícils de corregir.

Els resultats d'aquest estudi conviden a pensar que el vector ssAAV9-hAAT-GFM1 podria ajudar a evitar la insuficiència hepàtica associada a la letalitat de molts dels pacients amb COXPD1. Així doncs, aquest darrer bloc de la tesi reforça la idea que la teràpia gènica basada en rAAV és una aproximació factible per al tractament de l'hepatoencefalopatia deguda a mutacions en *GFM1*, i a més a més, constitueix una prova sòlida de la gran utilitat del ratolí heterozigot compost *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* com a model de la COXPD1, tant per a l'estudi de la malaltia com per a testar potencials aproximacions terapèutiques.

## 7. CONCLUSIONS

---



1. La mutació p.R671C desestabilitza la proteïna EFG1 i redueix dràsticament els seus nivells als extractes mitocondrials i homogenats de teixits. Tanmateix, l'EFG1<sup>R671C</sup> residual preserva la seua capacitat d'unió al mitoribosoma, tot i que la mutació podria debilitar subtilment aquesta interacció.
2. L'al·lel *Gfm1*<sup>-</sup> en homozigosi és incompatible amb el desenvolupament embrionari, mentre que la seua presència al model *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> accentua la depleció d'EFG1, el defecte de traducció mitocondrial i el perfil COXPD molecular al fetge i cervell respecte al fenotip dels ratolins *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>.
3. En condicions normals, la proteïna EFG1 es troba en excés en ratolins, ja que reduccions del ~85-95% (model *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>) només donen lloc a disfunció moderada del CIV en fetge, i és necessària una reducció més acusada (~98%, model *Gfm1*<sup>R671C/-</sup>) per causar COXPD en fetge i cervell, sent el CIV de la CTE el més sensible al defecte de traducció mitocondrial del nostre model, seguit dels complexos CI i CIII.
4. El perfil COXPD molecular observat al fetge i cervell del model *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> no desencadena l'hepatoencefalopatia que manifesten els pacients, suggerint que, als ratolins, l'activació de mecanismes moleculars de resposta com l'augment de la biogènesi i/o estabilització d'ARNmt i MRPs podria compensar el dèficit d'EFG1, mantenint una traducció mitocondrial que, tot i ser disfuncional, no sembla arribar a ser patològica.
5. El vector ssAAV9-hAAT-GFM1 administrat per via intravenosa a una dosi de 5·10<sup>12</sup> gv/kg transdueix de forma eficaç les cèl·lules hepàtiques, assolint VCN equiparables als obtinguts en estudis preclínics similars.
6. L'EFG1 humana codificada pel gen terapèutic s'expressa de forma exitosa, restituint parcialment els nivells del factor d'elongació als mitocondris de fetge del model *Gfm1*<sup>R671C/-</sup>. A més, la correcció del perfil COXPD molecular al fetge dels ratolins tractats apunta a que el factor d'elongació humà és funcional a la traducció mitocondrial murina.



7. El ratolí *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> manifesta un clar fenotip molecular al fetge i cervell, i encara que seria convenient ampliar la seua caracterització per identificar altres possibles trets fenotípics, constitueix un model animal de gran utilitat per a la COXPD1: tant per a investigar els mecanismes fisiopatològics de la malaltia com per a testar teràpies potencials.
  
8. La teràpia gènica basada en l'addició d'una còpia funcional de *GFM1* mitjançant l'ús de rAAV representa una aproximació terapèutica potencialment eficaç per a la COXPD1, que mereix ser investigada més a fons per tal de confirmar la seua possible utilitat futura.

## 8. BIBLIOGRAFIA

---



1. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primer*. 2016;2(1):1-22.
2. Alston CL, Rocha MC, Lax NZ, Turnbull DM, Taylor RW. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J Pathol*. 2017;241(2):236-250.
3. Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1659(2-3):115-120.
4. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. *N Engl J Med*. 2003;348(26):2656-2668.
5. Ylikallio E, Suomalainen A. Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann Med*. 2012;44(1):41-59.
6. Gray MW. Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later. *Mol Biol Cell*. 2017;28(10):1285-1287.
7. Lobo-Jarne T, Pérez-Pérez R, Fontanesi F, et al. Multiple pathways coordinate assembly of human mitochondrial complex IV and stabilization of respiratory supercomplexes. *EMBO J*. 2020;39(14).
8. Garcia L. Appendix 1. Basic Properties of Mitochondria. *Methods Cell Biol*. 2007;80:809-812.
9. Keogh MJ, Chinnery PF. Mitochondrial DNA mutations in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1847(11):1401-1411.
10. Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol*. 1988;4:289-333.
11. Luo S, Valencia CA, Zhang J, et al. Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(51):13039-13044.
12. Osawa S, Jukes TH, Watanabe K, Muto A. Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol Rev*. 1992;56(1):229-264.
13. Schlieben LD, Prokisch H. The Dimensions of Primary Mitochondrial Disorders. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:600079.
14. Morgenstern M, Stiller SB, Lübbert P, et al. Definition of a High-Confidence Mitochondrial Proteome at Quantitative Scale. *Cell Rep*. 2017;19(13):2836-2852.
15. Rath S, Sharma R, Gupta R, et al. MitoCarta3.0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D1541-D1547.
16. Tang JX, Thompson K, Taylor RW, Oláhová M. Mitochondrial OXPHOS Biogenesis: Co-Regulation of Protein Synthesis, Import, and Assembly Pathways. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):3820.
17. Zeviani M, Viscomi C. Mitochondrial Neurodegeneration. *Cells*. 2022;11(4):637.

18. Smits P, Smeitink J, van den Heuvel L. Mitochondrial Translation and Beyond: Processes Implicated in Combined Oxidative Phosphorylation Deficiencies. *BioMed Res Int*. 2010;2010:e737385.
19. Boczonadi V, Horvath R. Mitochondria: Impaired mitochondrial translation in human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;48:77-84.
20. Zinovkina LA. DNA Replication in Human Mitochondria. *Biochem Mosc*. 2019;84(8):884-895.
21. Graziewicz MA, Longley MJ, Copeland WC. DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem Rev*. 2006;106(2):383-405.
22. Larsen NB, Rasmussen M, Rasmussen LJ. Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion*. 2005;5(2):89-108.
23. Stuart JA, Brown MF. Mitochondrial DNA maintenance and bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(2):79-89.
24. Ramón J, Vila-Julà F, Molina-Granada D, et al. Therapy Prospects for Mitochondrial DNA Maintenance Disorders. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12):6447.
25. Copeland WC. Inherited Mitochondrial Diseases of DNA Replication. *Annu Rev Med*. 2008;59(1):131-146.
26. Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM. DNA Replication and Transcription in Mammalian Mitochondria. *Annu Rev Biochem*. 2007;76(1):679-699.
27. Hyvärinen AK, Pohjoismäki JLO, Reyes A, et al. The mitochondrial transcription termination factor mTERF modulates replication pausing in human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(19):6458-6474.
28. Boczonadi V, Ricci G, Horvath R. Mitochondrial DNA transcription and translation: clinical syndromes. Garone C, Minczuk M, eds. *Essays Biochem*. 2018;62(3):321-340.
29. Siira SJ, Spähr H, Shearwood AMJ, et al. LRPPRC-mediated folding of the mitochondrial transcriptome. *Nat Commun*. 2017;8(1):1532.
30. Chrzanowska-Lightowlers ZMA, Horvath R, Lightowlers RN. 175th ENMC International Workshop: Mitochondrial protein synthesis in health and disease, 25–27th June 2010, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*. 2011;21(2):142-147.
31. Wang F, Zhang D, Zhang D, Li P, Gao Y. Mitochondrial Protein Translation: Emerging Roles and Clinical Significance in Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9.
32. Gao J, Yu L, Zhang P, et al. Cloning and Characterization of Human and Mouse Mitochondrial Elongation Factor G, GFM and Gfm, and Mapping of GFM to Human Chromosome 3q25.1–q26.2. *Genomics*. 2001;74(1):109-114.

33. O'Brien TW. Properties of human mitochondrial ribosomes. *IUBMB Life*. 2003;55(9):505-513.
34. Jones CN, Wilkinson KA, Hung KT, Weeks KM, Spremulli LL. Lack of secondary structure characterizes the 5' ends of mammalian mitochondrial mRNAs. *RNA*. 2008;14(5):862-871.
35. Temperley RJ, Wydro M, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM. Human mitochondrial mRNAs--like members of all families, similar but different. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797(6-7):1081-1085.
36. Mikelsaar R. Human mitochondrial genome and the evolution of methionine transfer ribonucleic acids. *J Theor Biol*. 1983;105(2):221-232.
37. Christian BE, Spremulli LL. Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1819(9-10):1035-1054.
38. Kuzmenko A, Atkinson GC, Levitskii S, et al. Mitochondrial translation initiation machinery: Conservation and diversification. *Biochimie*. 2014;100(1):132-140.
39. Koc EC, Spremulli LL. Identification of Mammalian Mitochondrial Translational Initiation Factor 3 and Examination of Its Role in Initiation Complex Formation with Natural mRNAs. *J Biol Chem*. 2002;277(38):35541-35549.
40. Christian BE, Spremulli LL. Evidence for an Active Role of IF3mt in the Initiation of Translation in Mammalian Mitochondria. *Biochemistry*. 2009;48(15):3269-3278.
41. Kummer E, Ban N. Structural insights into mammalian mitochondrial translation elongation catalyzed by mtEFG1. *EMBO J*. 2020;39(15):e104820.
42. Richter R, Rorbach J, Pajak A, et al. A functional peptidyl-tRNA hydrolase, ICT1, has been recruited into the human mitochondrial ribosome. *EMBO J*. Published online 2010.
43. Herrmann JM, Woellhaf MW, Bonnefoy N. Control of protein synthesis in yeast mitochondria: the concept of translational activators. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(2):286-294.
44. Weraarpachai W, Antonicka H, Sasarman F, et al. Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nat Genet*. 2009;41(7):833-837.
45. Harmel J, Ruzzenente B, Terzioglu M, Spähr H, Falkenberg M, Larsson NG. The leucine-rich pentatricopeptide repeat-containing protein (LRPPRC) does not activate transcription in mammalian mitochondria. *J Biol Chem*. 2013;288(22):15510-15519.
46. Kobayashi Y, Momoi MY, Tominaga K, et al. A point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;173(3):816-822.

47. Webb BD, Diaz GA, Prasun P. Mitochondrial translation defects and human disease. *J Transl Genet Genomics*. 2020;4(2):71-80.
48. Häkli S, Luotonen M, Sorri M, Majamaa K. Mutations in the two ribosomal RNA genes in mitochondrial DNA among Finnish children with hearing impairment. *BMC Med Genet*. 2015;16(1):3.
49. Liu Z, Song Y, Li D, et al. The novel mitochondrial 16S rRNA 2336T>C mutation is associated with hypertrophic cardiomyopathy. *J Med Genet*. 2014;51(3):176-184.
50. Chatzisprou IA, Alders M, Guerrero-Castillo S, et al. A homozygous missense mutation in ERAL1, encoding a mitochondrial rRNA chaperone, causes Perrault syndrome. *Hum Mol Genet*. 2017;26(13):2541-2550.
51. Moulinier L, Ripp R, Castillo G, Poch O, Sissler M. MiSynPat: An integrated knowledge base linking clinical, genetic, and structural data for disease-causing mutations in human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases. *Hum Mutat*. 2017;38(10):1316-1324.
52. Meyer-Schuman R, Antonellis A. Emerging mechanisms of aminoacyl-tRNA synthetase mutations in recessive and dominant human disease. *Hum Mol Genet*. 2017;26(R2):R114-R127.
53. Boczonadi V, Smith PM, Pyle A, et al. Altered 2-thiouridylation impairs mitochondrial translation in reversible infantile respiratory chain deficiency. *Hum Mol Genet*. 2013;22(22):4602-4615.
54. Coenen MJH, Antonicka H, Ugalde C, et al. Mutant Mitochondrial Elongation Factor G1 and Combined Oxidative Phosphorylation Deficiency. *N Engl J Med*. 2004;351(20):2080-2086.
55. Antonicka H, Sasarman F, Kennaway NG, Shoubridge EA. The molecular basis for tissue specificity of the oxidative phosphorylation deficiencies in patients with mutations in the mitochondrial translation factor EFG1. *Hum Mol Genet*. 2006;15(11):1835-1846.
56. Valente L, Tiranti V, Marsano RM, et al. Infantile Encephalopathy and Defective Mitochondrial DNA Translation in Patients with Mutations of Mitochondrial Elongation Factors EFG1 and EFTu. *Am J Hum Genet*. 2007;80(1):44-58.
57. Smits P, Antonicka H, van Hasselt PM, et al. Mutation in subdomain G' of mitochondrial elongation factor G1 is associated with combined OXPHOS deficiency in fibroblasts but not in muscle. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(3):275-279.
58. Balasubramaniam S, Choy YS, Talib A, Norsiah MD, van den Heuvel LP, Rodenburg RJ. Infantile Progressive Hepatoencephalomyopathy with Combined OXPHOS Deficiency due to Mutations in the Mitochondrial Translation Elongation Factor Gene GFM1. In: *JIMD Reports - Case and Research Reports*, 2012/2. JIMD Reports. Springer; 2012:113-122.

59. Calvo SE, Compton AG, Hershman SG, et al. Molecular Diagnosis of Infantile Mitochondrial Disease with Targeted Next-Generation Sequencing. *Sci Transl Med.* 2012;4(118):118ra10-118ra10.
60. Galmiche L, Serre V, Beinat M, et al. Toward genotype phenotype correlations in GFM1 mutations. *Mitochondrion.* 2012;12(2):242-247.
61. Ravn K, Schönewolf-Greulich B, Hansen RM, et al. Neonatal mitochondrial hepatoencephalopathy caused by novel GFM1 mutations. *Mol Genet Metab Rep.* 2015;3:5-10.
62. Brito S, Thompson K, Campistol J, et al. Long-term survival in a child with severe encephalopathy, multiple respiratory chain deficiency and GFM1 mutations. *Front Genet.* 2015;6.
63. Simon MT, Ng BG, Friederich MW, et al. Activation of a cryptic splice site in the mitochondrial elongation factor GFM1 causes combined OXPHOS deficiency. *Mitochondrion.* 2017;34:84-90.
64. Bravo-Alonso I, Navarrete R, Vega AI, et al. Genes and Variants Underlying Human Congenital Lactic Acidosis—From Genetics to Personalized Treatment. *J Clin Med.* 2019;8(11):1811.
65. Barcia G, Rio M, Assouline Z, et al. Clinical, neuroimaging and biochemical findings in patients and patient fibroblasts expressing ten novel GFM1 mutations. *Hum Mutat.* 2020;41(2):397-402.
66. Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, et al. A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. *PLoS Genet.* 2016;12(1):e1005679.
67. You C, Xu N, Qiu S, et al. A novel composition of two heterozygous GFM1 mutations in a Chinese child with epilepsy and mental retardation. *Brain Behav.* 2020;10(10):e01791.
68. Su C, Wang F. Clinical and molecular findings in a family expressing a novel heterozygous variant of the G elongation factor mitochondrial 1 gene. *Exp Ther Med.* 2020;20(6):173.
69. Khan AU, Khan I, Khan MI, et al. Whole exome sequencing identifies a novel compound heterozygous GFM1 variant underlying developmental delay, dystonia, polymicrogyria, and severe intellectual disability in a Pakhtun family. *Am J Med Genet A.* 2022;188(9):2693-2700.
70. Rodnina MV, Savelsbergh A, Katunin VI, Wintermeyer W. Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature.* 1997;385(6611):37-41.
71. Rodnina MV, Peske F, Peng BZ, Belardinelli R, Wintermeyer W. Converting GTP hydrolysis into motion: versatile translational elongation factor G. *Biol Chem.* 2019;401(1):131-142.
72. Nierhaus KH. An elongation factor turn-on. *Nature.* 1996;379(6565):491-492.



73. Terasaki M, Suzuki T, Hanada T, Watanabe K. Functional compatibility of elongation factors between mammalian mitochondrial and bacterial ribosomes: characterization of GTPase activity and translation elongation by hybrid ribosomes bearing heterologous L7/12 proteins. *J Mol Biol.* 2004;336(2):331-342.
74. Rodnina MV, Stark H, Savelsbergh A, et al. GTPases mechanisms and functions of translation factors on the ribosome. *Biol Chem.* 2000;381(5-6):377-387.
75. Boczonadi V, Bansagi B, Horvath R. Reversible infantile mitochondrial diseases. *J Inherit Metab Dis.* 2015;38(3):427-435.
76. Tsuboi M, Morita H, Nozaki Y, et al. EF-G2mt Is an Exclusive Recycling Factor in Mammalian Mitochondrial Protein Synthesis. *Mol Cell.* 2009;35(4):502-510.
77. Trivigno C, Haerry TE. The Drosophila Mitochondrial Translation Elongation Factor G1 Contains a Nuclear Localization Signal and Inhibits Growth and DPP Signaling. Treisman J, ed. *PLoS ONE.* 2011;6(2):e16799.
78. Suárez-Rivero JM, Pastor-Maldonado CJ, Povea-Cabello S, et al. UPRmt activation improves pathological alterations in cellular models of mitochondrial diseases. *Orphanet J Rare Dis.* 2022;17(1):204.
79. McKnight CL, Low YC, Elliott DA, Thorburn DR, Frazier AE. Modelling Mitochondrial Disease in Human Pluripotent Stem Cells: What Have We Learned? *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7730.
80. Zurita-Díaz F, Galera-Monge T, Moreno-Izquierdo A, et al. Generation of a human iPSC line from a patient with a mitochondrial encephalopathy due to mutations in the GFM1 gene. *Stem Cell Res.* 2016;16(1):124-127.
81. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007;131(5):861-872.
82. Fox BC, Slade L, Torregrossa R, et al. The mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor AP39 improves health and mitochondrial function in a *C. elegans* primary mitochondrial disease model. *J Inherit Metab Dis.* 2021;44(2):367-375.
83. Sánchez-Martínez Á, Luo N, Clemente P, et al. Modeling human mitochondrial diseases in flies. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 2006;1757(9):1190-1198.
84. Steele SL, Prykhodzhiy SV, Berman JN. Zebrafish as a model system for mitochondrial biology and diseases. *Transl Res.* 2014;163(2):79-98.
85. Ruzzenente B, Rötig A, Metodiev MD. Mouse models for mitochondrial diseases. *Hum Mol Genet.* 2016;25(R2):R115-R122.

86. Iommarini L, Peralta S, Torraco A, Diaz F. Mitochondrial Diseases Part II: Mouse models of OXPHOS deficiencies caused by defects in regulatory factors and other components required for mitochondrial function. *Mitochondrion*. 2015;22:96-118.
87. Torraco A, Peralta S, Iommarini L, Diaz F. Mitochondrial Diseases Part I: Mouse models of OXPHOS deficiencies caused by defects in respiratory complex subunits or assembly factors. *Mitochondrion*. 2015;21:76-91.
88. Bouabe H, Okkenhaug K. Gene Targeting in Mice: A Review. In: Bailer SM, Lieber D, eds. *Virus-Host Interactions: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Humana Press; 2013:315-336.
89. Stanford W, Cohn J, Cordes S. Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP.. Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet* 2: 756-768. *Nat Rev Genet*. 2001;2:756-768.
90. Acevedo-Arozena A, Wells S, Potter P, Kelly M, Cox RD, Brown SDM. ENU mutagenesis, a way forward to understand gene function. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:49-69.
91. Skarnes WC, Rosen B, West AP, et al. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*. 2011;474(7351):337-342.
92. Liu ET, Bolcun-Filas E, Grass DS, et al. Of mice and CRISPR: The post-CRISPR future of the mouse as a model system for the human condition. *EMBO Rep*. 2017;18(2):187-193.
93. Pyzocha NK, Ran FA, Hsu PD, Zhang F. RNA-Guided Genome Editing of Mammalian Cells. In: Storici F, ed. *Gene Correction: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Humana Press; 2014:269-277.
94. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013;8(11):2281-2308.
95. Yang H, Wang H, Jaenisch R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat Protoc*. 2014;9(8):1956-1968.
96. Zhou J, Shen B, Zhang W, et al. One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;46:49-55.
97. Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nat Biotechnol*. 2015;33(5):538-542.
98. Nakada K, Hayashi JI. Transmitochondrial mice as models for mitochondrial DNA-based diseases. *Exp Anim*. 2011;60(5):421-431.

99. Lagouge M, Mourier A, Lee HJ, et al. SLIRP Regulates the Rate of Mitochondrial Protein Synthesis and Protects LRPPRC from Degradation. *PLoS Genet.* 2015;11(8):e1005423.
100. Ruzzenente B, Metodiev MD, Wredenberg A, et al. LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. *EMBO J.* 2012;31(2):443-456.
101. Cuillerier A, Honarmand S, Cadete VJJ, et al. Loss of hepatic LRPPRC alters mitochondrial bioenergetics, regulation of permeability transition and transmembrane ROS diffusion. *Hum Mol Genet.* 2017;26(16):3186-3201.
102. Cuillerier A, Ruiz M, Daneault C, et al. Adaptive optimization of the OXPHOS assembly line partially compensates lrpprc-dependent mitochondrial translation defects in mice. *Commun Biol.* 2021;4(1):1-14.
103. Szczepanowska K, Maiti P, Kukat A, et al. CLPP coordinates mitoribosomal assembly through the regulation of ERAL1 levels. *EMBO J.* 2016;35(23):2566-2583.
104. Richman TR, Ermer JA, Davies SMK, et al. Mutation in MRPS34 Compromises Protein Synthesis and Causes Mitochondrial Dysfunction. Moraes CT, ed. *PLoS Genet.* 2015;11(3):e1005089.
105. Dogan SA, Pujol C, Maiti P, et al. Tissue-specific loss of DARS2 activates stress responses independently of respiratory chain deficiency in the heart. *Cell Metab.* 2014;19(3):458-469.
106. Aradjanski M, Dogan SA, Lotter S, et al. DARS2 protects against neuroinflammation and apoptotic neuronal loss, but is dispensable for myelin producing cells. *Hum Mol Genet.* 2017;26(21):4181-4189.
107. Agnew T, Goldsworthy M, Aguilar C, et al. A Wars2 Mutant Mouse Model Displays OXPHOS Deficiencies and Activation of Tissue-Specific Stress Response Pathways. *Cell Rep.* 2018;25(12):3315-3328.e6.
108. Cámara Y, Asin-Cayuella J, Park CB, et al. MTERF4 regulates translation by targeting the methyltransferase NSUN4 to the mammalian mitochondrial ribosome. *Cell Metab.* 2011;13(5):527-539.
109. Metodiev MD, Spähr H, Loguercio Polosa P, et al. NSUN4 Is a Dual Function Mitochondrial Protein Required for Both Methylation of 12S rRNA and Coordination of Mitoribosomal Assembly. Barsh GS, ed. *PLoS Genet.* 2014;10(2):e1004110.
110. Perks KL, Ferreira N, Richman TR, et al. Adult-onset obesity is triggered by impaired mitochondrial gene expression. *Sci Adv.* 2017;3(8):e1700677.
111. Perks KL, Ferreira N, Ermer JA, et al. Reduced mitochondrial translation prevents diet-induced metabolic dysfunction but not inflammation. *Aging.* 2020;12(19):19677-19700.

112. Akbergenov R, Duscha S, Fritz AK, et al. Mutant MRPS5 affects mitoribosomal accuracy and confers stress-related behavioral alterations. *EMBO Rep.* 2018;19(11):e46193.
113. Ferreira N, Perks KL, Rossetti G, et al. Stress signaling and cellular proliferation reverse the effects of mitochondrial mistranslation. *EMBO J.* 2019;38(24).
114. Metodiev MD, Lesko N, Park CB, et al. Methylation of 12S rRNA Is Necessary for In Vivo Stability of the Small Subunit of the Mammalian Mitochondrial Ribosome. *Cell Metab.* 2009;9(4):386-397.
115. Rudler DL, Hughes LA, Perks KL, et al. Fidelity of translation initiation is required for coordinated respiratory complex assembly. *Sci Adv.* 2019;5(12):eaay2118.
116. Phenotypes for Gfm1 MGI:5781632 MGI Mouse. Accessed March 7, 2023. [https://www.informatics.jax.org/allele/genoview/MGI:5781632?counter=1#homeostasis\\_metabolism\\_id](https://www.informatics.jax.org/allele/genoview/MGI:5781632?counter=1#homeostasis_metabolism_id)
117. INFRAFRONTIER Consortium. INFRAFRONTIER--providing mutant mouse resources as research tools for the international scientific community. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(D1):D1171-D1175.
118. Almeida L, Dhillon-LaBrooy A, Castro CN, et al. Ribosome-Targeting Antibiotics Impair T Cell Effector Function and Ameliorate Autoimmunity by Blocking Mitochondrial Protein Synthesis. *Immunity.* 2021;54(1):68-83.e6.
119. Criscuolo D, Avolio R, Matassa DS, Esposito F. Targeting Mitochondrial Protein Expression as a Future Approach for Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2021;11.
120. Pompei M, Pompei F. Overcoming bioethical, legal, and hereditary barriers to mitochondrial replacement therapy in the USA. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36(3):383-393.
121. Smeitink JA, Zeviani M, Turnbull DM, Jacobs HT. Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders. *Cell Metab.* 2006;3(1):9-13.
122. Uittenbogaard M, Chiaramello A. Mitochondrial Biogenesis: A Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders and Neurodegenerative Diseases. *Curr Pharm Des.* 2014;20(35):5574-5593.
123. Domínguez-González C, Madruga-Garrido M, Mavillard F, et al. Deoxynucleoside Therapy for Thymidine Kinase 2–Deficient Myopathy. *Ann Neurol.* 2019;86(2):293-303.
124. Blázquez-Bermejo C, Molina-Granada D, Vila-Julià F, et al. Age-related metabolic changes limit efficacy of deoxynucleoside-based therapy in thymidine kinase 2-deficient mice. *EBioMedicine.* 2019;46:342-355.

125. Blázquez-Bermejo C, Carreño-Gago L, Molina-Granada D, et al. Increased dNTP pools rescue mtDNA depletion in human POLG-deficient fibroblasts. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2019;33(6):7168-7179.
126. Hirano M, Emmanuele V, Quinzii CM. Emerging therapies for mitochondrial diseases. *Essays Biochem.* 2018;62(3):467-481.
127. Hanaford AR, Cho YJ, Nakai H. AAV-vector based gene therapy for mitochondrial disease: progress and future perspectives. *Orphanet J Rare Dis.* 2022;17(1):217.
128. Home - ClinicalTrials.gov. Accessed February 18, 2023. <https://clinicaltrials.gov/>
129. Arabi F, Mansouri V, Ahmadbeigi N. Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 2022;153:113324.
130. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide (GTCT, FMS19). Accessed March 28, 2023. <https://a873679.fmphost.com/fmi/webd/GTCT>
131. Bonnefoy N, Fox TD. Directed alteration of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA by biolistic transformation and homologous recombination. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2007;372:153-166.
132. Yasuzaki Y, Yamada Y, Ishikawa T, Harashima H. Validation of Mitochondrial Gene Delivery in Liver and Skeletal Muscle via Hydrodynamic Injection Using an Artificial Mitochondrial Reporter DNA Vector. *Mol Pharm.* 2015;12(12):4311-4320.
133. Yamada Y, Furukawa R, Yasuzaki Y, Harashima H. Dual function MITO-Porter, a nano carrier integrating both efficient cytoplasmic delivery and mitochondrial macromolecule delivery. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2011;19(8):1449-1456.
134. Santos J, Sousa F, Queiroz J, Costa D. Rhodamine based plasmid DNA nanoparticles for mitochondrial gene therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014;121:129-140.
135. Bulcha JT, Wang Y, Ma H, Tai PWL, Gao G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):53.
136. Kohn DB, Booth C, Shaw KL, et al. Autologous Ex Vivo Lentiviral Gene Therapy for Adenosine Deaminase Deficiency. *N Engl J Med.* 2021;384(21):2002-2013.
137. Fumagalli F, Calbi V, Natali Sora MG, et al. Lentiviral haematopoietic stem-cell gene therapy for early-onset metachromatic leukodystrophy: long-term results from a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial and expanded access. *Lancet Lond Engl.* 2022;399(10322):372-383.

138. Lee CS, Bishop ES, Zhang R, et al. Adenovirus-Mediated Gene Delivery: Potential Applications for Gene and Cell-Based Therapies in the New Era of Personalized Medicine. *Genes Dis.* 2017;4(2):43-63.
139. Cunliffe TG, Bates EA, Parker AL. Hitting the Target but Missing the Point: Recent Progress towards Adenovirus-Based Precision Virotherapies. *Cancers.* 2020;12(11):3327.
140. Kennedy SB, Bolay F, Kieh M, et al. Phase 2 Placebo-Controlled Trial of Two Vaccines to Prevent Ebola in Liberia. *N Engl J Med.* 2017;377(15):1438-1447.
141. Sebastian S, Lambe T. Clinical Advances in Viral-Vectored Influenza Vaccines. *Vaccines.* 2018;6(2):29.
142. Kirschner J. Postnatal gene therapy for neuromuscular diseases – opportunities and limitations. *J Perinat Med.* 2021;49(8):1011-1015.
143. Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science.* 1965;149(3685):754-756.
144. Berns KI, Muzyczka N. AAV: An Overview of Unanswered Questions. *Hum Gene Ther.* 2017;28(4):308-313.
145. Somanathan S, Breous E, Bell P, Wilson JM. AAV Vectors Avoid Inflammatory Signals Necessary to Render Transduced Hepatocyte Targets for Destructive T Cells. *Mol Ther.* 2010;18(5):977-982.
146. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EGD, et al. Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B. *N Engl J Med.* 2014;371(21):1994-2004.
147. Li C, Samulski RJ. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2020;21(4):255-272.
148. Qin W, Xu G, Tai PWL, et al. Large-scale molecular epidemiological analysis of AAV in a cancer patient population. *Oncogene.* 2021;40(17):3060-3071.
149. Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Methods Enzymol.* 2012;507:229-254.
150. Sonntag F, Schmidt K, Kleinschmidt JA. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(22):10220-10225.
151. Earley LF, Powers JM, Adachi K, et al. Adeno-associated Virus (AAV) Assembly-Activating Protein Is Not an Essential Requirement for Capsid Assembly of AAV Serotypes 4, 5, and 11. *J Virol.* 2017;91(3):e01980-16.
152. Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther.* 2005;12(1):S18-S27.
153. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(5):358-378.

154. Nonnenmacher M, Weber T. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther.* 2012;19(6):649-658.
155. Finn JD, Hui D, Downey HD, et al. Proteasome inhibitors decrease AAV2 capsid derived peptide epitope presentation on MHC class I following transduction. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2010;18(1):135-142.
156. Weitzman MD, Linden RM. Adeno-associated virus biology. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2011;807:1-23.
157. Li H, Malani N, Hamilton SR, et al. Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood.* 2011;117(12):3311-3319.
158. Pupo A, Fernández A, Low SH, François A, Suárez-Amarán L, Samulski RJ. AAV vectors: The Rubik's cube of human gene therapy. *Mol Ther.* 2022;30(12):3515-3541.
159. Korneyenkov MA, Zamyatnin AA. Next Step in Gene Delivery: Modern Approaches and Further Perspectives of AAV Tropism Modification. *Pharmaceutics.* 2021;13(5):750.
160. Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol.* 2016;21:75-80.
161. Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, et al. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol.* 2002;76(2):791-801.
162. Verdera HC, Kuranda K, Mingozzi F. AAV Vector Immunogenicity in Humans: A Long Journey to Successful Gene Transfer. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2020;28(3):723-746.
163. Flotte TR. Gene Therapy Progress and Prospects: Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther.* 2004;11(10):805-810.
164. Smith RH. Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther.* 2008;15(11):817-822.
165. Au HKE, Isalan M, Mielcarek M. Gene Therapy Advances: A Meta-Analysis of AAV Usage in Clinical Settings. *Front Med.* 2021;8:809118.
166. Duan D, Yue Y, Yan Z, Engelhardt JF. A new dual-vector approach to enhance recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression through intermolecular cis activation. *Nat Med.* 2000;6(5):595-598.
167. McCarty DM. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2008;16(10):1648-1656.
168. Chao H, Liu Y, Rabinowitz J, Li C, Samulski RJ, Walsh CE. Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2000;2(6):619-623.

169. Burger C, Gorbatyuk OS, Velardo MJ, et al. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther*. 2004;10(2):302-317.
170. Kotterman MA, Schaffer DV. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2014;15(7):445-451.
171. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*. 2017;377(18):1713-1722.
172. Kuzmin DA, Shutova MV, Johnston NR, et al. The clinical landscape for AAV gene therapies. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(3):173-174.
173. Klein RL, Dayton RD, Tatom JB, Henderson KM, Henning PP. AAV8, 9, Rh10, Rh43 vector gene transfer in the rat brain: effects of serotype, promoter and purification method. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2008;16(1):89-96.
174. Donsante A, Miller DG, Li Y, et al. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science*. 2007;317(5837):477.
175. Chandler RJ, LaFave MC, Varshney GK, et al. Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J Clin Invest*. 2015;125(2):870-880.
176. Niemeyer GP, Herzog RW, Mount J, et al. Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood*. 2009;113(4):797-806.
177. Nathwani AC, Rosales C, McIntosh J, et al. Long-term safety and efficacy following systemic administration of a self-complementary AAV vector encoding human FIX pseudotyped with serotype 5 and 8 capsid proteins. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2011;19(5):876-885.
178. Hudry E, Vandenberghe LH. Therapeutic AAV Gene Transfer to the Nervous System: A Clinical Reality. *Neuron*. 2019;101(5):839-862.
179. Sabatino DE, Bushman FD, Chandler RJ, et al. Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: An integrated perspective. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2022;30(8):2646-2663.
180. Hermonat PL, Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1984;81(20):6466-6470.
181. Flotte T, Carter B, Conrad C, et al. A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther*. 1996;7(9):1145-1159.
182. Mendell JR, Al-Zaidy SA, Rodino-Klapac LR, et al. Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs. *Mol Ther*. 2021;29(2):464-488.



183. Melchiorri D, Pani L, Gasparini P, et al. Regulatory evaluation of Glybera in Europe-two committees, one mission. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(9).
184. Russell S, Bennett J, Wellman JA, et al. Efficacy and safety of voretigene neparovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet.* 2017;390(10097):849-860.
185. Mahlangu J, Kaczmarek R, von Drygalski A, et al. Two-Year Outcomes of Valoctocogene Roxaparovec Therapy for Hemophilia A. *N Engl J Med.* 2023;388(8):694-705.
186. Pipe SW, Leebeek FWG, Recht M, et al. Gene Therapy with Etranacogene Dezaparovec for Hemophilia B. *N Engl J Med.* 2023;388(8):706-718.
187. Jacobs F, Gordts SC, Muthuramu I, De Geest B. The liver as a target organ for gene therapy: state of the art, challenges, and future perspectives. *Pharm Basel Switz.* 2012;5(12):1372-1392.
188. Gao G, Alvira MR, Somanathan S, et al. Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(10):6081-6086.
189. Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, et al. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol.* 2004;78(12):6381-6388.
190. Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res.* 1962;22:842-849.
191. Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology.* 2009;137(2):466-481.
192. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection. *Mol Ther.* 2008;16(6):1073-1080.
193. Cao O, Dobrzynski E, Wang L, et al. Induction and role of regulatory CD4+CD25+ T cells in tolerance to the transgene product following hepatic in vivo gene transfer. *Blood.* 2007;110(4):1132-1140.
194. Di Donfrancesco A, Massaro G, Di Meo I, Tiranti V, Bottani E, Brunetti D. Gene Therapy for Mitochondrial Diseases: Current Status and Future Perspective. *Pharmaceutics.* 2022;14(6):1287.
195. Suzuki-Hatano S, Saha M, Rizzo SA, et al. AAV-Mediated TAZ Gene Replacement Restores Mitochondrial and Cardioskeletal Function in Barth Syndrome. *Hum Gene Ther.* 2019;30(2):139-154.
196. Wang S, Li Y, Xu Y, et al. AAV Gene Therapy Prevents and Reverses Heart Failure in a Murine Knockout Model of Barth Syndrome. *Circ Res.* 2020;126(8):1024-1039.

197. Perdomini M, Belbellaa B, Monassier L, et al. Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich's ataxia. *Nat Med*. 2014;20(5):542-547.
198. Piguet F, de Montigny C, Vaucamps N, Reutenauer L, Eisenmann A, Puccio H. Rapid and Complete Reversal of Sensory Ataxia by Gene Therapy in a Novel Model of Friedreich Ataxia. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2018;26(8):1940-1952.
199. Gérard C, Xiao X, Filali M, et al. An AAV9 coding for frataxin clearly improved the symptoms and prolonged the life of Friedreich ataxia mouse models. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. 2014;1:14044.
200. Di Meo I, Marchet S, Lamperti C, Zeviani M, Viscomi C. AAV9-based gene therapy partially ameliorates the clinical phenotype of a mouse model of Leigh syndrome. *Gene Ther*. 2017;24(10):661-667.
201. Reynaud-Dulaurier R, Benegiamo G, Marrocco E, et al. Gene replacement therapy provides benefit in an adult mouse model of Leigh syndrome. *Brain J Neurol*. 2020;143(6):1686-1696.
202. Silva-Pinheiro P, Cerutti R, Luna-Sanchez M, Zeviani M, Viscomi C. A Single Intravenous Injection of AAV-PHP.B-hNDUFS4 Ameliorates the Phenotype of Ndufs4 <sup>-/-</sup> Mice. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020;17:1071-1078.
203. Pereira CV, Peralta S, Arguello T, Bacman SR, Diaz F, Moraes CT. Myopathy reversion in mice after restoration of mitochondrial complex I. *EMBO Mol Med*. 2020;12(2):e10674.
204. Ling Q, Rioux M, Hu Y, Lee M, Gray SJ. Adeno-associated viral vector serotype 9-based gene replacement therapy for SURF1-related Leigh syndrome. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2021;23:158-168.
205. Di Meo I, Auricchio A, Lamperti C, Burlina A, Viscomi C, Zeviani M. Effective AAV-mediated gene therapy in a mouse model of ethylmalonic encephalopathy. *EMBO Mol Med*. 2012;4(9):1008-1014.
206. Torres-Torronteras J, Cabrera-Pérez R, Vila-Julià F, et al. Long-Term Sustained Effect of Liver-Targeted Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy. *Hum Gene Ther*. 2018;29(6):708-718.
207. Cabrera-Pérez R, Vila-Julià F, Hirano M, Mingozzi F, Torres-Torronteras J, Martí R. Alpha-1-Antitrypsin Promoter Improves the Efficacy of an Adeno-Associated Virus Vector for the Treatment of Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy. *Hum Gene Ther*. 2019;30(8):985-998.
208. Vila-Julià F, Cabrera-Pérez R, Cámara Y, et al. Efficacy of adeno-associated virus gene therapy in a MNGIE murine model enhanced by chronic exposure to nucleosides. *EBioMedicine*. 2020;62:103133.

209. Bottani E, Giordano C, Civiletto G, et al. AAV-mediated liver-specific MPV17 expression restores mtdna levels and prevents diet-induced liver failure. *Mol Ther.* 2014;22(1):10-17.
210. Lopez-Gomez C, Sanchez-Quintero MJ, Lee EJ, et al. Synergistic Deoxynucleoside and Gene Therapies for Thymidine Kinase 2 Deficiency. *Ann Neurol.* 2021;90(4):640-652.
211. Yang L, Slone J, Li Z, et al. Systemic administration of AAV-Slc25a46 mitigates mitochondrial neuropathy in Slc25a46<sup>-/-</sup> mice. *Hum Mol Genet.* 2020;29(4):649-661.
212. Transcript: ENSMUST00000077271.9 (Gfm1-201) - Summary - Mus\_musculus - Ensembl genome browser 109. Accessed March 15, 2023. [https://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/Transcript/Summary?g=ENSMUSG0000027774;r=3:67337429-67383862;t=ENSMUST00000077271](https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Transcript/Summary?g=ENSMUSG0000027774;r=3:67337429-67383862;t=ENSMUST00000077271)
213. GRCm38 - mm10 - Genome - Assembly - NCBI. Accessed March 15, 2023. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000001635.20/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001635.20/)
214. Hay AM, Howie HL, Gorham JD, et al. Mouse background genetics in biomedical research: The devil's in the details. *Transfusion (Paris).* 2021;61(10):3017-3025.
215. Deacon R. Measuring the Strength of Mice. *J Vis Exp JoVE.* 2013;76.
216. Aartsma-Rus A, Putten M van. Assessing Functional Performance in the Mdx Mouse Model. *JoVE J Vis Exp.* 2014;(85):e51303.
217. Nogales-Gadea G, Pinós T, Lucia A, et al. Knock-in mice for the R50X mutation in the PYGM gene present with McArdle disease. *Brain.* 2012;135(7):2048-2057.
218. Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS.* 2011;50(5):600-613.
219. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 4th ed. Cold Spring Harbor laboratory press; 2012.
220. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
221. González-Vioque E, Torres-Torronteras J, Andreu AL, Martí R. Limited dCTP Availability Accounts for Mitochondrial DNA Depletion in Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (MNGIE). *PLoS Genet.* 2011;7(3):e1002035.
222. Matthews DE, Hessler RA, Denslow ND, Edwards JS, O'Brien TW. Protein composition of the bovine mitochondrial ribosome. *J Biol Chem.* 1982;257(15):8788-8794.

223. Fernández-Silva P, Acín-Pérez R, Fernández-Vizarra E, Pérez-Martos A, Enriquez JA. In vivo and in organello analyses of mitochondrial translation. *Methods Cell Biol.* 2007;80:571-588.
224. Wibom R, Hagenfeldt L, von Döbeln U. Measurement of ATP production and respiratory chain enzyme activities in mitochondria isolated from small muscle biopsy samples. *Anal Biochem.* 2002;311(2):139-151.
225. Medja F, Allouche S, Frachon P, et al. Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion.* 2009;9(5):331-339.
226. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology Baltim Md.* 2005;41(6):1313-1321.
227. Cloud-based platform for biotech R&D | Benchling. Accessed March 15, 2023. <https://www.benchling.com/>
228. García-Olloqui P, Rodríguez-Madoz JR, Di Scala M, et al. Effect of heart ischemia and administration route on biodistribution and transduction efficiency of AAV9 vectors. *J Tissue Eng Regen Med.* 2020;14(1):123-134.
229. UCSC Genome Browser Home. Accessed March 22, 2023. <https://genome.ucsc.edu/>
230. Molina-Berenguer M, Vila-Julà F, Pérez-Ramos S, et al. Dysfunctional mitochondrial translation and combined oxidative phosphorylation deficiency in a mouse model of hepatoencephalopathy due to Gfm1 mutations. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2022;36(1):e22091.
231. Otto GP, Rathkolb B, Oestereicher MA, et al. Clinical Chemistry Reference Intervals for C57BL/6J, C57BL/6N, and C3HeB/FeJ Mice (*Mus musculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS.* 2016;55(4):375-386.
232. Brogna S, Wen J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(2):107-113.
233. Davidoff AM, Ng CatherineYC, Zhou J, Spence Y, Nathwani AC. Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood.* 2003;102(2):480-488.
234. Rudler DL, Hughes LA, Viola HM, Hool LC, Rackham O, Filipovska A. Fidelity and coordination of mitochondrial protein synthesis in health and disease. *J Physiol.* 2021;599(14):3449-3462.
235. Nechifor R, Wilson KS. Crosslinking of Translation Factor EF-G to Proteins of the Bacterial Ribosome Before and After Translocation. *J Mol Biol.* 2007;368(5):1412-1425.

236. Hosur V, Low BE, Li D, et al. Genes adapt to outsmart gene targeting strategies in mutant mouse strains by skipping exons to reinitiate transcription and translation.
237. Papaioannou VE, Behringer RR. Early Embryonic Lethality in Genetically Engineered Mice: Diagnosis and Phenotypic Analysis. *Vet Pathol.* 2012;49(1):64-70.
238. Wilson R, Geyer SH, Reissig L, et al. Highly variable penetrance of abnormal phenotypes in embryonic lethal knockout mice. *Wellcome Open Res.* 2017;1:1.
239. Sato H, Singer RH. Cellular variability of nonsense-mediated mRNA decay. *Nat Commun.* 2021;12(1):7203.
240. Yang H, Brosel S, Acin-Perez R, et al. Analysis of mouse models of cytochrome c oxidase deficiency owing to mutations in *Sco2*. *Hum Mol Genet.* 2010;19(1):170-180.
241. Rötig A. Human diseases with impaired mitochondrial protein synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1807(9):1198-1205.
242. Miwa S, Lawless C, Von Zglinicki T. Mitochondrial turnover in liver is fast in vivo and is accelerated by dietary restriction: application of a simple dynamic model. *Aging Cell.* 2008;7(6):920-923.
243. Marazuela P, Paez-Montserrat B, Bonaterra-Pastra A, Solé M, Hernández-Guillamon M. Impact of Cerebral Amyloid Angiopathy in Two Transgenic Mouse Models of Cerebral  $\beta$ -Amyloidosis: A Neuropathological Study. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9):4972.
244. Rodriguiz RM, Wetsel WC. Assessments of Cognitive Deficits in Mutant Mice. In: Levin ED, Buccafusco JJ, eds. *Animal Models of Cognitive Impairment*. Frontiers in Neuroscience. CRC Press/Taylor & Francis; 2006.
245. Kawashita E, Ishihara K, Nomoto M, Taniguchi M, Akiba S. A comparative analysis of hepatic pathological phenotypes in C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains in non-alcoholic steatohepatitis models. *Sci Rep.* 2019;9(1):204.
246. Lesner NP, Wang X, Chen Z, et al. Differential requirements for mitochondrial electron transport chain components in the adult murine liver. Chacinska A, Malhotra V, eds. *eLife.* 2022;11:e80919.
247. Khiati S, Baechler SA, Factor VM, et al. Lack of mitochondrial topoisomerase I (TOP1mt) impairs liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(36):11282-11287.
248. Pibiri M. Liver regeneration in aged mice: new insights. *Aging.* 2018;10(8):1801-1824.

249. Lehtonen JM, Forsström S, Bottani E, et al. FGF21 is a biomarker for mitochondrial translation and mtDNA maintenance disorders. *Neurology*. 2016;87(22):2290-2299.
250. Baechler SA, Factor VM, Dalla Rosa I, et al. The mitochondrial type IB topoisomerase drives mitochondrial translation and carcinogenesis. *Nat Commun*. 2019;10(1):83.
251. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs*. 2017;31(4):317-334.
252. Asokan A, Schaffer DV, Samulski RJ. The AAV Vector Toolkit: Poised at the Clinical Crossroads. *Mol Ther*. 2012;20(4):699-708.
253. Toscano MG, Romero Z, Muñoz P, Cobo M, Benabdellah K, Martin F. Physiological and tissue-specific vectors for treatment of inherited diseases. *Gene Ther*. 2011;18(2):117-127.
254. Kattenhorn LM, Tipper CH, Stoica L, et al. Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Liver Disease. *Hum Gene Ther*. 2016;27(12):947-961.
255. Manfredsson FP, Rising AC, Mandel RJ. AAV9: a potential blood-brain barrier buster. *Mol Ther*. 2009;17(3):403-405.
256. Guy J, Qi X, Koilkonda RD, et al. Efficiency and Safety of AAV-Mediated Gene Delivery of the Human ND4 Complex I Subunit in the Mouse Visual System. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(9):4205-4214.
257. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol*. 2009;27(1):59-65.
258. Gray SJ, Matagne V, Bachaboina L, Yadav S, Ojeda SR, Samulski RJ. Preclinical Differences of Intravascular AAV9 Delivery to Neurons and Glia: A Comparative Study of Adult Mice and Nonhuman Primates. *Mol Ther*. 2011;19(6):1058-1069.
259. Liu D, Zhu M, Zhang Y, Diao Y. Crossing the blood-brain barrier with AAV vectors. *Metab Brain Dis*. 2021;36(1):45-52.
260. Bey K, Ciron C, Dubreil L, et al. Efficient CNS targeting in adult mice by intrathecal infusion of single-stranded AAV9-GFP for gene therapy of neurological disorders. *Gene Ther*. 2017;24(5):325-332.
261. Slone J, Huang T. The special considerations of gene therapy for mitochondrial diseases. *Npj Genomic Med*. 2020;5(1):7.
262. Pañeda A, Lopez-Franco E, Kaeppel C, et al. Safety and Liver Transduction Efficacy of rAAV5-cohPBGD in Nonhuman Primates: A Potential Therapy for Acute Intermittent Porphyria. *Hum Gene Ther*. 2013;24(12):1007-1017.
263. Peddi NC, Marasandra Ramesh H, Gude SS, Gude SS, Vuppapapati S. Intrauterine Fetal Gene Therapy: Is That the Future and Is That Future Now? *Cureus*. Published online February 23, 2022.

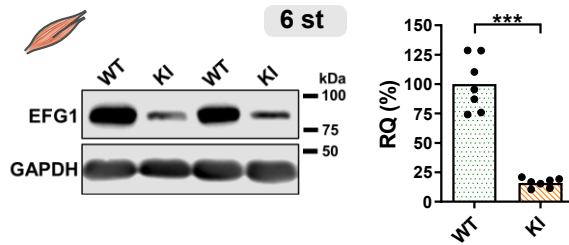


## 9. ANNEX 1: FIGURES SUPPLEMENTÀRIES

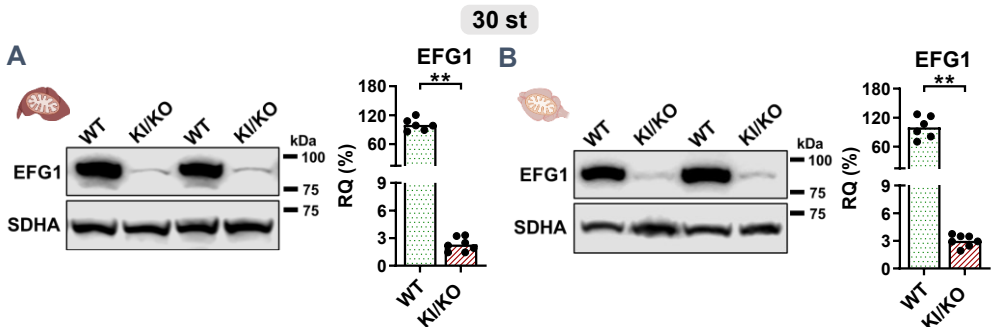
---



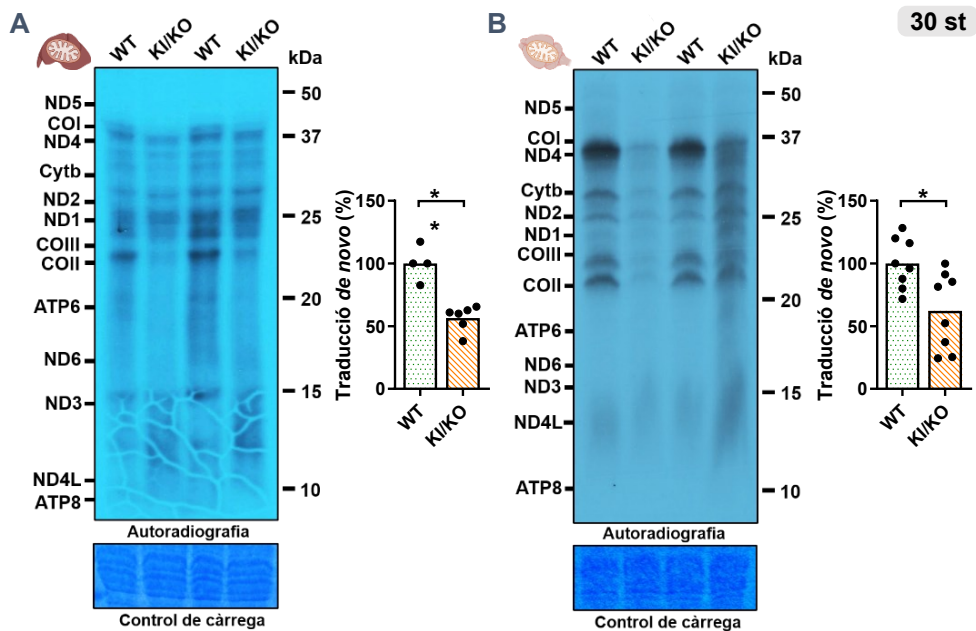




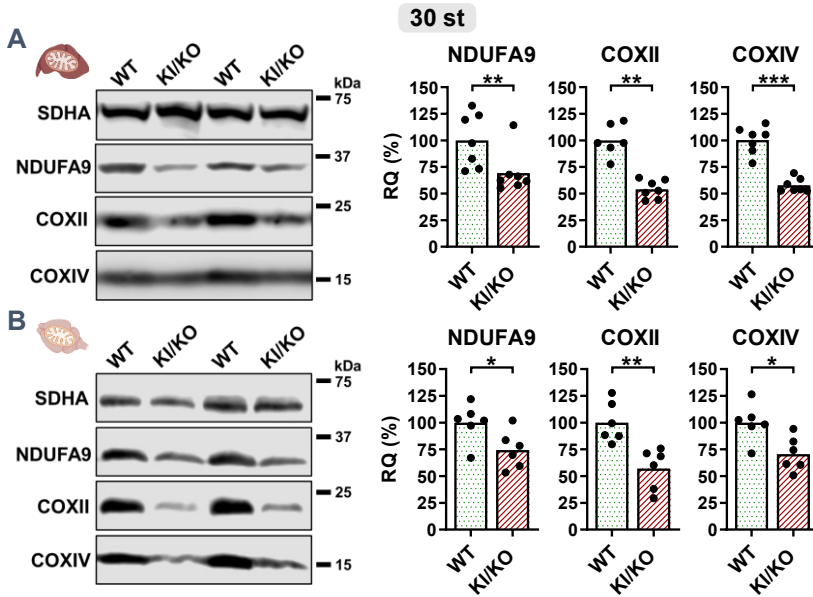
**Figura suplementària 1. Nivells d'EFG1 en homogenats de gastrocnemi de ratolins *Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>* a les 6 setmanes d'edat.** Western blots representatius per detectar EFG1 en homogenats de múscul gastrocnemi de ratolins de 6 setmanes d'edat. Cada valor d'EFG1 quantificat per densitometria es corregeix pel valor de GAPDH. Els valors, s'expressen com quantitat relativa (RQ) i es representen com al percentatge de la mitjana dels WT. Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*\* $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*) i KI (*Gfm1<sup>R671C/R671C</sup>*).



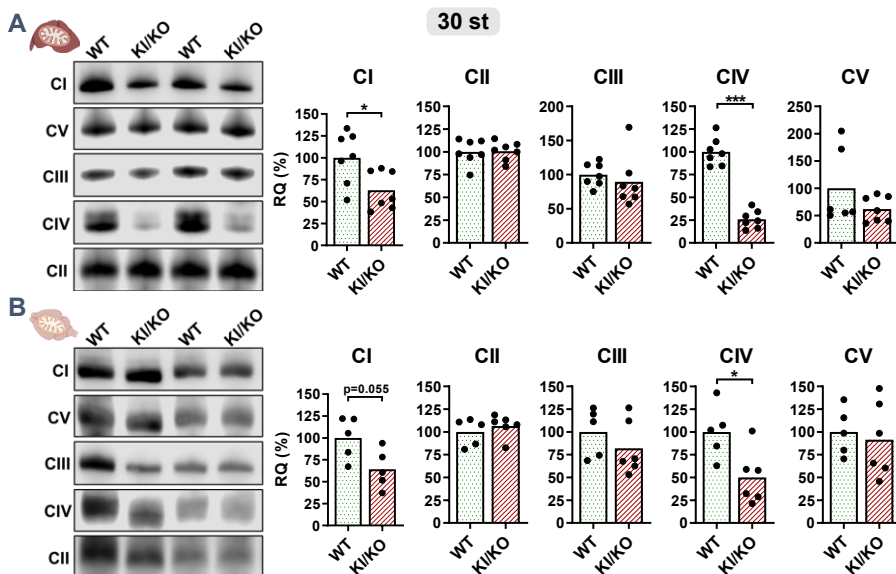
**Figura suplementària 2. Nivells d'EFG1 en mitocondris de fetge i cervell de ratolins *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* a les 30 setmanes d'edat.** Western blots representatius per detectar EFG1 en mitocondris de fetge (A) i cervell (B) de ratolins de 30 setmanes d'edat. Cada valor d'EFG1 quantificat per densitometria es corregeix per SDHA. Els valors, expressats com quantitat relativa (RQ) es representen com al percentatge de la mitjana dels WT i cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*\* $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1<sup>+/+</sup>*) i KI/KO (*Gfm1<sup>R671C/-</sup>*).



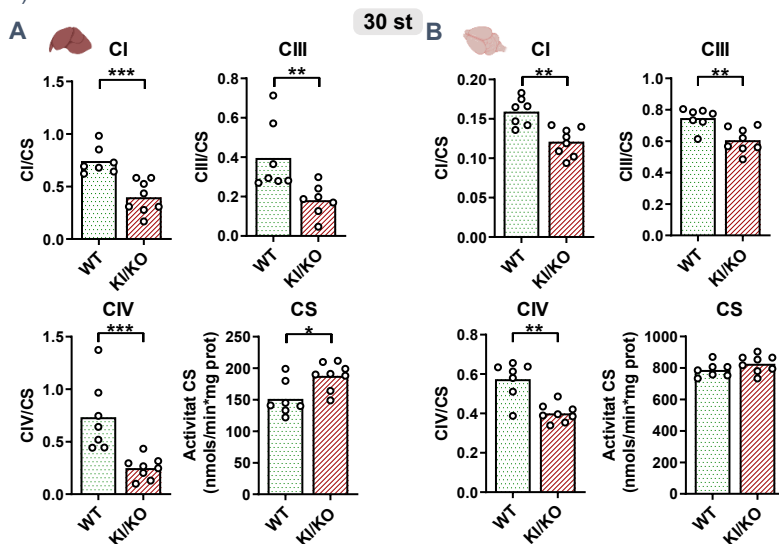
**Figura suplementària 3. Traducció mitocondrial en fetge i cervell de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> de 30 setmanes d'edat.** La traducció mitocondrial *in organello* es va dur a terme utilitzant extractes mitocondrials de fetge (**A**) i cervell (**B**). Les proteïnes sintetitzades *de novo* es marquen radioactivament i detecten per autoradiografia. Per a cada mostra es densitometra el conjunt de bandes i el valor obtingut es corregeix per la quantitat total de proteïna carregada al gel i tenyida amb blau de Coomassie. S'obtenen valors de traducció mitocondrial *de novo*, que s'expressen com al percentatge de la mitjana dels WT. Les barres representen la mitjana de la quantitat relativa i els punts representen els valors de ratolins individuals. Els asteriscs indiquen significança estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>) i K1/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>).



**Figura suplementària 4. Nivells de subunitats dels complexos I i IV en fetge i cervell dels ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> de 30 setmanes d'edat.** Western blots representatius de subunitats del CIV (COXII i COXIV) i del CI (NDUFA9) en mitocondris de fetge (**A**) i cervell (**B**). Les quantificacions per densitometria de les dues proteïnes es van corregir per SDHA. Els valors, expressats com quantitat relativa (RQ), representen el percentatge de la mitjana dels WT. Cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent i les barres representen la mitjana relativa per a cada grup. Els asteriscs indiquen significança estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>) i KI/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>).

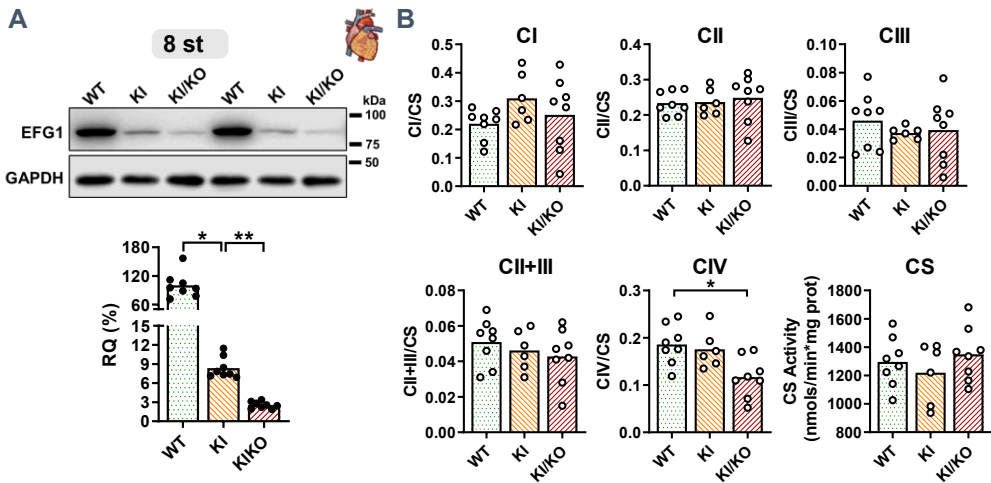


**Figura suplementària 5. Complexos OXPHOS en mitocondris de fetge i cervell de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> a les 30 setmanes d'edat.** Quantificació dels complexos OXPHOS acoblats en mitocondris de fetge (A) i cervell (B). L'anàlisi es va dur a terme per immunodetecció per BN-PAGE amb anticossos específics contra CI (NDUFA9), CII (SDHA), CIII, (UQCRC2), CIV (COXIV) i CV (ATP5A). La quantitat relativa (RQ) es va quantificar per densitometria de la banda de complex, normalitzada per la quantitat de CII i referida a una mostra calibradora carregada a tots els western blots. Els punts representen valors de ratolins individuals que s'expressen com al percentatge de la mitjana dels WT; i les barres representen mitjana dels valors de cada grup. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*p<0,05; \*\*p<0,01; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>) i K1/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>).



**Figura suplementària 6. Activitats enzimàtiques dels complexos de la CTE en fetge i cervell de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> a les 30 setmanes d'edat.** Peu de figura a la següent pàgina.

**Figura suplementària 6. Activitats enzimàtiques dels complexos de la CTE en fetge i cervell de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> a les 30 setmanes d'edat.** Activitats enzimàtiques dels complexos de la CTE (CI, CII i CIV) normalitzades respecte l'activitat citrat sintasa (CS) sobre homogenats de fetge (A) i cervell (B). Els cercles oberts representen valors de ratolins individuals i les barres fan referència a la mitjana dels valors de cada grup. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; Mann-Whitney U-test). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>) i KI/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>).



**Figura suplementària 7. Nivells d'EFG1 i activitats de CTE en cor als ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> de 8 setmanes d'edat.** (A) Western-blot representatiu d'EFG1 en homogenats de cor. Cada valor d'EFG1 quantificat per densitometria es corregeix per SDHA. Els valors, expressats com quantitat relativa (RQ) es representen com al percentatge de la mitjana dels WT i cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent. (B) Activitat enzimàtica dels complexos de la CTE normalitzats respecte l'activitat citrat sintasa (CS) sobre homogenats de cor. Els cercles oberts representen valors de ratolins individuals i les barres fan referència a la mitjana dels valors de cada grup. Es va aplicar el test Kruskal-Wallis i quan es van detectar diferències significatives (p<0,05), es van comparar els grups WT, KI i KI/KO entre ells aplicant el test de comparacions múltiples de Dunn. Els asteriscs indiquen significança estadística (\*p<0,05; \*\*p<0,01). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>), KI (*Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>) i KI/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>).

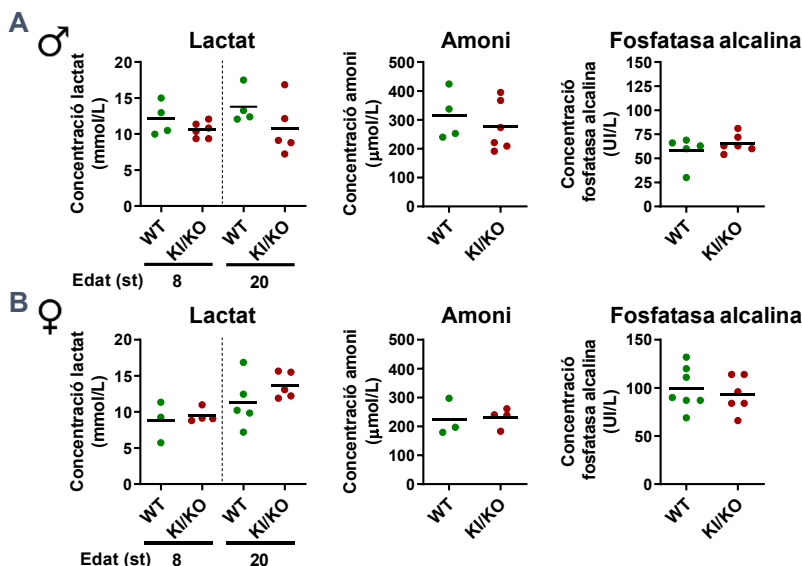


Figura suplementària 8. Anàlisi de les concentracions de lactat, amoni i fosfatasa alcalina al plasma de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup>. Sobre el plasma de ratolins mascles (A) i femelles (B) es va determinar la concentració de lactat a les 8 i 20 setmanes d'edat, i els nivells d'amoni i fosfatasa alcalina a les 8 setmanes d'edat. Els punts representen els valors individuals i les barres horitzontals marquen la mitjana de cada grup Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>) i K1/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>).

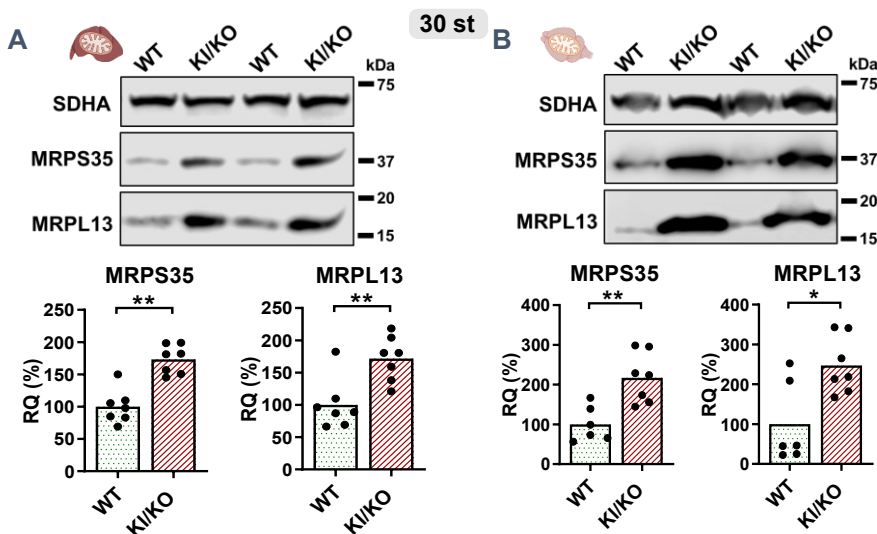
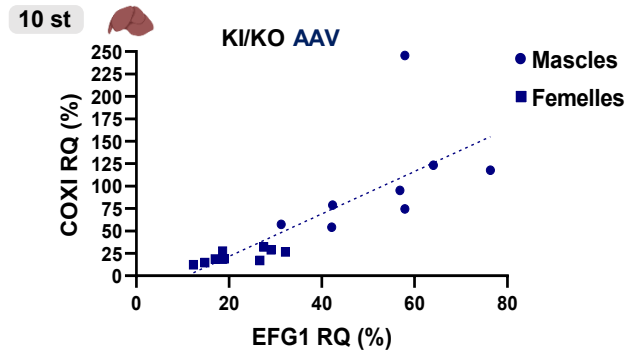
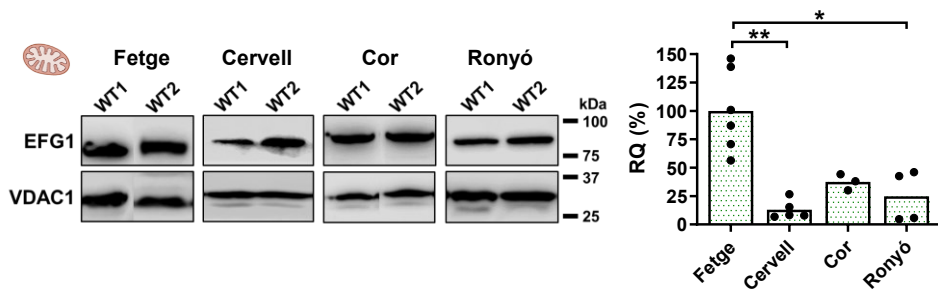


Figura suplementària 9. Nivells de MRPs al fetge i cervell de ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> de 30 setmanes d'edat. Western-blots representatius de les mitoïboproteïnes MRPS35 i MRPL13 en mitocondris de fetge (A) i cervell (B). Les quantificacions per densitometria d'aquestes proteïnes es van corregir per SDHA. Els valors, expressats com quantitat relativa (RQ), representen el percentatge de la mitjana dels WT. Cada punt representa una mostra provinent d'un ratolí diferent i les barres indiquen la mitjana de cada grup. Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>) i K1/KO (*Gfm1*<sup>R671C/-</sup>).



**Figura suplementària 10. Correlació entre els nivells mitocondrials d'EFG1 i els de COXI al fetge dels ratolins *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> tractats amb el rAAV.** Anàlisi efectuada prenent els valors d'EFG1 i de COXI en mitocondris (RQ, % de la mitjana dels WT) als fetges dels ratolins KI/KO AAV femelles (quadrats) i mascles (cercles). La línia discontinua representa la regressió lineal calculada ( $Y = 2,369 \cdot X + 25,78$ ). Es va aplicar el test estadístic de Spearman, resultant significatiu (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ), amb  $r = 0,929$ .



**Figura suplementària 11. Comparació dels nivells basals d'EFG1 mitocondrial entre teixits de ratolins WT.** Western blot representatiu d'EFG1 en mitocondris de fetge, cervell, cor i ronyó de ratolins WT. Cada valor d'EFG1 quantificat per densitometria es corregeix per VDAC1. Els valors, expressats com quantitat relativa (RQ) es representen com al percentatge de la mitjana del valors de fetge i cada punt es correspon amb una mostra provinent d'un ratolí diferent. Es va aplicar el test Kruskal-Wallis i quan es van detectar diferències significatives ( $p < 0,05$ ), es van comparar els diferents teixits entre ells aplicant el test de comparacions múltiples de Dunn. Els asteriscs indiquen significança estadística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Ratolins WT (*Gfm1*<sup>+/+</sup>). Resultat provinent del treball fi de màster de Sandra Pérez Ramos, "Search of mechanisms that compensate for the deleterious effects of R671C mutation in a *Gfm1* knock-in mouse model of the hepatoencefalopathy due to combined oxidative phosphorylation deficiency 1", setembre del 2018.





## 10. ANNEX 2: PUBLICACIÓ DERIVADA DE LA TESI

---



**Títol original:** Dysfunctional mitochondrial translation and combined oxidative phosphorylation deficiency in a mouse model of hepatoencephalopathy due to *Gfm1* mutations

**Autors:** Miguel Molina-Berenguer<sup>1,2</sup>, Ferran Vila-Julià<sup>1,2</sup>, Sandra Pérez-Ramos<sup>1,2</sup>, Maria Teresa Salcedo-Allende<sup>3</sup>, Yolanda Cámara<sup>1,2</sup>, Javier Torres-Torronteras<sup>1,2</sup>, Ramon Martí<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Research Group on Neuromuscular and Mitochondrial Diseases, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Pathology Department, Vall d'Hebron Research Institute, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

**DOI:** 10.1096/fj.202100819RRR

**Revista i any de publicació:** *FASEB Journal*, Novembre 2021

### **Resum original:**

Hepatoencephalopathy due to combined oxidative phosphorylation deficiency type 1 (COXPD1) is a recessive mitochondrial translation disorder caused by mutations in *GFM1*, a nuclear gene encoding mitochondrial elongation factor G1 (EFG1). Patients with COXPD1 typically present hepatoencephalopathy early after birth with rapid disease progression, and usually die within the first few weeks or years of life. We have generated two different mouse models: a *Gfm1* knock-in (KI) harboring the p.R671C missense mutation, found in at least 10 patients who survived more than 1 year, and a *Gfm1* knock-out (KO) model.

Homozygous KO mice (*Gfm1*<sup>-/-</sup>) were embryonically lethal, whereas homozygous KI (*Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup>) mice were viable and showed normal growth. R671C mutation in *Gfm1* caused drastic reductions in the mitochondrial EFG1 protein content in different organs. Six-to eight-week-old *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> mice showed partial reductions of *in organello* mitochondrial translation and respiratory complex IV enzyme activity in the liver. Compound heterozygous *Gfm1*<sup>R671C/-</sup> showed a more pronounced decrease of EFG1 protein in liver and brain mitochondria, as compared with *Gfm1*<sup>R671C/R671C</sup> mice.

At 8 weeks of age, their mitochondrial translation rates were significantly reduced in both tissues. Additionally, *Gfm1<sup>R671C/-</sup>* mice showed combined oxidative phosphorylation deficiency (reduced complex I and IV enzyme activities in liver and brain), and blue native dysfunctional molecular phenotype, showing impaired mitochondrial translation and combined respiratory chain dysfunction, making it a suitable animal model for the study of COXPD1.

**Entitats finançadores:** Programa PERIS, Número d'ajut: SLT002/16/00370; Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Programa FI, Número d'ajut: 2018FI\_B\_01115; Fundació La Caixa i Fundación Mencía, Número d'ajut: LCF/PR/ PR16/51110011; Instituto de Salud Carlos III, Número d'ajut: PMP15/00025; Fundación Mutua Madrileña.

