

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Análisis de la tasa de traducción mitocondrial en fibroblastos embrionarios de ratón con hepatoencefalopatía COXPD1

Autora

Irene Cáceda Moreno

Directora

María Pilar Bayona Bafaluy

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza

Curso 2021-2022

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
1.1. Resumen.....	1
1.2. Abstract	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Hepatoencefalopatía por deficiencia combinada de fosforilación oxidativa tipo 1 (COXPD1) y <i>GFM1</i>	2
2.2. El sistema mitocondrial de fosforilación oxidativa (OXPHOS) y <i>GFM1</i>	2
2.3. <i>GFM1</i> , <i>Gfm1</i> y generación de ratones con las mutaciones en estudio	3
3. OBJETIVOS	5
4. MATERIALES Y MÉTODOS	6
4.1. Cultivos celulares.....	6
4.1.1 Condiciones de trabajo en el laboratorio de cultivos celulares	6
4.1.2 Protocolo de trabajo en el laboratorio de cultivos celulares	6
4.2. Técnicas de manipulación de RNA	7
4.2.1. Extracción de RNA total con TRIzol®	7
4.2.2. Cuantificación de RNA total por espectrofotometría	8
4.2.3. Retrotranscripción de mRNA	8
4.2.4. Amplificación de <i>Gfm1</i> a partir del cDNA mediante PCR.....	8
4.2.5. Electroforesis horizontal en gel de agarosa	9
4.2.6. Purificación de los productos de PCR y secuenciación	10
4.3. Técnicas de manipulación de proteínas.....	10
4.3.1. Extracción de proteínas totales.....	10
4.3.2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	11
4.3.3. Western Blot	11
4.3.3.1. Electroforesis vertical y desnaturizante en gel de poliacrilamida.....	11
4.3.3.2. Electrotransferencia de proteínas a membrana de PVDF.....	12
4.3.3.3.Incubación de la membrana con anticuerpos y detección quimiluminiscente ..	13
4.4. Técnicas de marcaje de proteínas en cultivos celulares	13
4.4.1. Marcaje de proteínas del sistema OXPHOS mediante inmunocitoquímica.....	13
4.4.2. Marcaje de la síntesis proteica mediante química click para microscopía	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
5.1.Estudio del genotipo de <i>Gfm1</i> en las líneas de fibroblastos embrionarios	15

5.2. Análisis de la expresión de la proteína EFG1 y de otras subunidades proteicas del sistema OXPHOS en las tres líneas celulares.....	17
5.3. Estudio de las bandas obtenidas en el Western Blot con anticuerpo anti-EFG1.....	19
5.4. Detección mediante inmunocitoquímica de subunidades proteicas de OXPHOS	20
5.5. Medida de la tasa de traducción mitocondrial utilizando la técnica click	21
6. CONCLUSIÓN	23
7. BIBLIOGRAFÍA	25

1. RESUMEN

1.1. Resumen

La hepatoencefalopatía por deficiencia combinada de fosforilación oxidativa de tipo 1 (COXPD1) es una enfermedad mitocondrial causada por mutaciones en el gen *GFM1* que codifica el factor de elongación mitocondrial G1 (EFG1). El estudio de diversos pacientes reveló una alteración en la secuencia de *GFM1*, un cambio de aminoácidos en la posición p.671 de Arginina a Citosina (p.R671C).

Se generaron modelos permitieran estudiar la enfermedad, ratones portadores de la mutación p.R671C en homocigosis (*Gfm1*^{R671C/R671C}). Sin embargo, su leve fenotipo condujo al intento fallido de obtener modelos *knock-out* para *Gfm1*, pero estos ratones sufrían letalidad embrionaria con el alelo en homocigosis. Como alternativa se generaron ratones heterocigotos con uno de sus alelos *knock-out* y otro con la mutación p.R671C (*Gfm1*^{-/R671C}). Los fibroblastos de estas líneas de ratones se estudiaron en este trabajo.

El análisis de los fibroblastos embrionarios ratón (MEFs) reveló niveles de EFG1 reducidos en la línea *Gfm1*^{-/R671C}. Sin embargo, los niveles de EFG1 en la línea con un fenotipo más leve (*Gfm1*^{R671C/R671C}) incrementaron ligeramente. Las dos líneas celulares con *Gfm1* mutado mostraron reducción en los niveles de COI, subunidad I del complejo IV o Citocromo c oxidasa de la cadena de fosforilación oxidativa. Esta expresión disminuida pudo observarse en el análisis mediante Western Blot e inmunocitoquímica. COI, proteína del sistema OXPHOS, es codificada por el DNA mitocondrial y sintetizada en los ribosomas mitocondriales, proceso en el que EFG1, factor de elongación tiene un papel fundamental.

No se logró medir la tasa de traducción mitocondrial con la química click. Aunque se observó marcaje, es necesario optimizar el protocolo para las líneas celulares en estudio.

1.2. Abstract

Combined oxidative phosphorylation deficiency hepatoencephalopathy type 1 (COXPD1) is a mitochondrial disease caused by mutations in *GFM1*, which encodes mitochondrial elongation factor G1 (EFG1). The study of several patients showed a change of amino acids at position 671 from Arginine to Cytosine (p.R671C) in the sequence of *GFM1*.

Models were generated to study the disease, mice carrying the p.R671C mutation in homozygosity (*Gfm1*^{R671C/R671C}). However, their mild phenotype led to the failed attempt to obtain *knock-out* models for *Gfm1*, but these mice suffered embryonic lethality with the allele in homozygosity. As an alternative, heterozygous mice were generated with one of their alleles *knock-out* and another with the p.R671C mutation (*Gfm1*^{-/R671C}).

Analysis of mouse embryonic fibroblasts (MEFs) in *Gfm1*^{-/R671C} line revealed reduced EFG1 levels. However, EFG1 levels in cells with a milder phenotype (*Gfm1*^{R671C/R671C}) increased slightly. Cell lines with mutated *Gfm1* showed reduction in the levels of COI, subunit I of complex IV or Cytochrome c oxidase of the oxidative phosphorylation chain. Lower expression of EFG1 could be observed in the analysis by Western Blot and immunocytochemistry. COI, protein of the OXPHOS system is encoded by mitochondrial DNA and synthesized in mitochondrial ribosomes; process in which EFG1, elongation factor has a fundamental role.

It was not possible to measure mitochondrial translation rate with click chemistry. Although tagging was observed, it is necessary to optimize the protocol for these cell lines.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Hepatoencefalopatía por deficiencia combinada de fosforilación oxidativa tipo 1 (COXPD1) y GFM1

La hepatoencefalopatía por deficiencia combinada de fosforilación oxidativa tipo 1 (COXPD1) es un trastorno autosómico recesivo causado por mutaciones en el gen *GFM1* (1).

Los pacientes que padecen COXPD1 experimentan diversos síntomas, entre los que se suelen incluir retraso en el crecimiento, microcefalia, hipertonicidad, hipotonía axial, encefalopatía, miocardiopatía y disfunción hepática. La enfermedad aparece tras el nacimiento o poco tiempo después y los pacientes tienen una esperanza de vida muy corta, falleciendo, en general, en sus primeras semanas o años de vida (2).

El gen *GFM1* está ubicado en el cromosoma 3q25.32, contiene 18 exones, tiene un tamaño de alrededor de 48 kb y codifica el factor de elongación mitocondrial G1 (EFG1), una GTPasa que participa en la elongación de la síntesis de proteínas mitocondriales (3). Concretamente permite el movimiento del complejo peptidil-tRNA-mRNA en el ribosoma durante la elongación de la proteína naciente.

2.2. El sistema mitocondrial de fosforilación oxidativa (OXPHOS) y GFM1

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares presentes en prácticamente todas las células eucariotas (4). Están involucradas en procesos metabólicos vitales que incluyen la muerte celular programada o la inmunidad innata, aunque su principal función es generar energía en forma de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS) (5).

El sistema OXPHOS es una estructura enzimática multiheteromérica que lleva a cabo la respiración celular. El sistema de fosforilación oxidativa está formado por cinco complejos (complejos I-V) ubicados en la membrana interna mitocondrial; los complejos I-IV constituyen la cadena de transporte de electrones. La energía derivada del transporte de electrones se utiliza para expulsar protones (H^+) de la matriz mitocondrial al medio extracelular, lo que genera un gradiente de protones que es empleado por el complejo V para generar ATP (6); una reacción fundamental que suministra aproximadamente el 90% de la energía utilizada por las células de los mamíferos (7).

Los cinco complejos que forman parte del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) están constituidos por aproximadamente 85 proteínas estructurales, 13 de las cuales están codificadas por el DNA mitocondrial (mtDNA) y el resto por el DNA nuclear (nDNA) (8). De estos 13 polipéptidos codificados por el DNA mitocondrial, 7 de ellos corresponden a subunidades del complejo I, una subunidad del complejo III, 3 subunidades del complejo IV y 2 subunidades del complejo V (ver Figura 1). El resto de los polipéptidos que componen estos complejos, así como el complejo II completo, están codificados en el DNA nuclear (9).

Además, existe un grupo de genes en el DNA nuclear, entre los que se encuentra *GFM1*, que codifican proteínas involucradas en numerosos procesos mitocondriales, como la transcripción o traducción del mtDNA; procesos relacionados de una u otra

manera con el correcto funcionamiento del sistema OXPHOS. Las mutaciones patológicas que afectan a estos genes o a los del propio sistema de fosforilación oxidativa llevan a una disfuncionalidad del sistema que da origen a una enfermedad mitocondrial (1).

El factor de elongación mitocondrial G1 (EFG1) está codificado por el gen nuclear *GFM1* y es un componente fundamental necesario para la translocación del ribosoma durante la traducción mitocondrial (10).

El proceso de traducción mitocondrial consta de 3 pasos: iniciación, elongación y terminación. El factor EGF1 interviene en la elongación de la proteína que está siendo sintetizada. Este proceso consiste en la transferencia del peptidil-tRNA naciente del sitio aceptor ribosómico (aminoacil o A) al sitio peptidil ribosómico y la consiguiente eliminación de un tRNA sin carga del sitio peptidil al sitio de salida ribosómico (11).

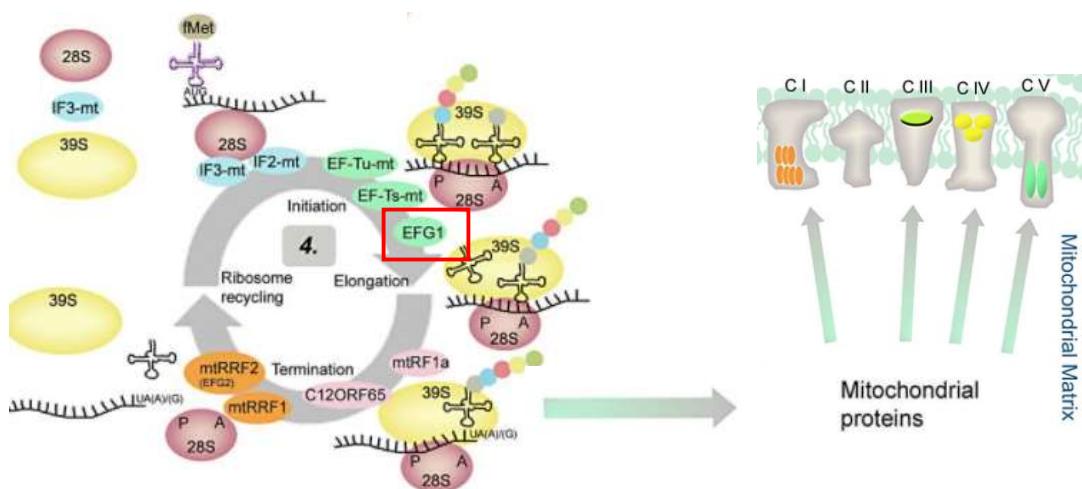


Figura 1: Descripción esquemática de genes humanos implicados en defectos de la síntesis de proteínas mitocondriales. Aparece resaltado en rojo el factor de elongación mitocondrial G1, proteína implicada en el proceso de elongación de la traducción de proteínas mitocondriales. Adaptado de Boczonadi et al. 2014 (12).

Mutaciones en *GFM1* se han asociado con un déficit de la síntesis de proteínas codificadas por el DNA mitocondrial, lo que genera una disminución en la actividad del sistema de fosforilación oxidativa al verse alterado el proceso de traducción de diversas subunidades proteicas de complejos del sistema OXPHOS (1).

Alteraciones en la síntesis proteica debido a mutaciones en *GFM1* causan la hepatoencefalopatía por deficiencia combinada de fosforilación oxidativa de tipo 1 (COXPD1).

2.3. *GFM1*, *Gfm1* y generación de ratones con las mutaciones en estudio

Las herramientas actuales que permiten estudiar la hepatoencefalopatía COXPD1 se restringen al uso de modelos *in vitro* como fibroblastos derivados de pacientes o células iPSCs. Las limitaciones de los modelos *in vitro* para estudiar los mecanismos de la enfermedad y para probar estrategias terapéuticas podrían solventarse con el uso de un modelo animal (1).

Con este objetivo se ha planteado el estudio de la enfermedad en ratones; portadores del gen *Gfm1* homólogo del gen *GFM1* de humanos. La secuencia codificante del cDNA de *Gfm1* de ratón codifica una proteína de 751 aminoácidos que muestran una identidad de secuencia del 89% y una similitud del 94% con la proteína codificada por el gen *GFM1* humano. (13)

El Grupo de Investigación de Enfermedades Neuromusculares y Mitocondriales de Barcelona junto con el Instituto de Investigación Vall d'Hebron y la Universidad Autónoma de Barcelona han generado ratones que albergan la mutación en el gen *GFM1* de un paciente que causa COXPD1. En primer lugar, se intentó establecer un ratón con los dos alelos KO para el gen *Gfm1* (*Gfm1*^{-/-}), pero los resultados no fueron exitosos debido a que los ratones con el alelo KO en homocigosis sufrían letalidad embrionaria (1).

Por ello, para el estudio de la enfermedad se emplean dos tipos de ratones generados mediante la tecnología CRISPR/Cas9: *Gfm1*^{R671C/R671C}, *Gfm1*^{-/-R671C}.

El primero de ellos presenta el cambio de aminoácidos más frecuentemente encontrado en pacientes (p.R671C) en homocigosis (*Gfm1*^{R671C/R671C}). Esta mutación sin sentido se genera por el cambio de nucleótidos en la posición c.2011-2013 del triplete CGG por TGC, en que, además de la mutación que tiene lugar en pacientes del cambio de un residuo de citosina en la posición 2011 por uno de tirosina, se introduce el cambio en la posición 2013 de un residuo de guanina por citosina, lo que genera la sustitución del residuo de arginina (R) en la posición 671 por un residuo de cisteína (C), que es lo que ocurre en humanos* (ver Figura 2).

*En humanos el cambio es del triplete CGC al triplete TGC.

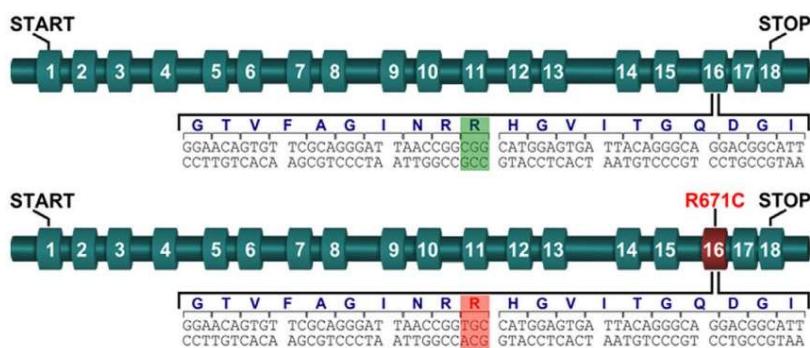


Figura 2: Representación de los exones del gen *Gfm1*. En la parte superior se muestra la secuencia del gen wild-type; marcado en verde se encuentra el triplete CGG, con citosina C en la posición 2011 y guanosina, G, en la posición 2013, que codifica para Arginina. En la parte inferior aparece representado el alelo con la mutación p.R671C presente en pacientes: en la posición 2011-2013 el triplete de nucleótidos CGG es sustituido por TGC, marcado en rojo y que pasa a codificar para el aminoácido cisteína. Adaptado de Molina-Berenguer et al. 2022 (1).

Los ratones *Gfm1*^{R671C/R671C} mostraron un fenotipo bioquímico leve en estudios previos (1). Por ello, se generaron además ratones *Gfm1*^{-/-R671C} que presentan un alelo con la mutación p.R671C observada en pacientes con COXPD1 y otro la ausencia funcional del otro alelo (KO) mediante una delección de los exones 2 y 3 que genera la aparición de un codón STOP prematuro en el exón 4 (ver Figura 3).

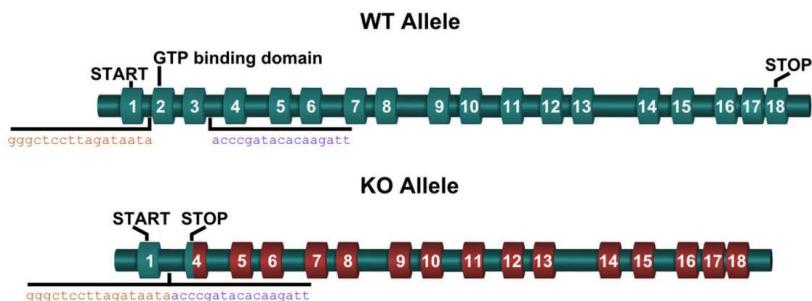


Figura 3: Representación de los exones del gen *Gfm1*. En la parte superior, el alelo wild-type, sin mutaciones en su secuencia. En la parte inferior, el alelo KO generado mediante la tecnología CRISPR/Cas9 que ha permitido generar un codón prematuro de STOP en el exón 4. Los exones posteriores al codón de STOP prematuro aparecen resaltados en rojo. Adaptado de Molina-Berenguer et al. 2022 (1).

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) son un tipo de células adherentes que crecen en monocapa. Constituyen un sistema muy poderoso para probar la función de los genes debido a su fácil accesibilidad, rápidas tasas de crecimiento y la posibilidad de una gran cantidad de experimentos.

Este trabajo estudia fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) de las tres líneas celulares: en primer lugar, la especie *wild-type*, el ratón con el gen *Gfm1* sin modificaciones (*Gfm1*^{+/+}); en segundo lugar, células de ratón que presenta los dos alelos con la mutación p.R671C (*Gfm1*^{R671C/R671C}); en tercer lugar, aquellas procedentes de ratón con un alelo con el cambio p.R671C y el otro alelo KO (*Gfm1*^{-/R671C}).

3. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es analizar la tasa de traducción mitocondrial de los fibroblastos embrionarios de ratón de las líneas *Gfm1*^{R671C/R671C} (con la mutación p.R671C, presente en pacientes, en homocigosis) y *Gfm1*^{-/R671C} (línea heterocigótica con un alelo knock-out de *Gfm1* y otro alelo con la mutación p.R671C). Se usó como control la línea de fibroblastos embrionarios de ratón *Gfm1*^{+/+}, con la secuencia de *Gfm1* inalterada.

La tasa de traducción mitocondrial de las células en estudio es analizada mediante el trabajo en el laboratorio, con el que se persiguen los siguientes objetivos:

- Verificar las secuencias del gen *Gfm1* en los fibroblastos embrionarios de ratón, confirmando si las distintas líneas celulares portan las mutaciones que esperamos.

- Analizar los niveles de expresión de EFG1 y de diversas subunidades del sistema de fosforilación oxidativa, OXPHOS en las líneas celulares en estudio.

- Estudiar *in vitro* los fibroblastos embrionarios mediante inmunocitoquímica, localizando microscópicamente diversas subunidades del sistema de fosforilación oxidativa y analizando sus niveles de expresión.

- Llevar a cabo un seguimiento de diversas proteínas mitocondriales y citosólicas recién sintetizadas en las células, determinando la alteración de estos procesos según la naturaleza de las líneas de celulares.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cultivos celulares

4.1.1 Condiciones de trabajo en el laboratorio de cultivos celulares

Los fibroblastos de las tres líneas celulares en estudio fueron manipulados en un cuarto específico de cultivos celulares bajo campana de flujo laminar, tratando en todo momento de mantener las condiciones de asepsia para evitar la contaminación de las células. Para ello, cada día de trabajo las superficies sobre las que se trabajó fueron esterilizadas previa y posteriormente empleando etanol al 70% y luz UV.

El trabajo en el laboratorio de cultivos celulares implica la observación al microscopio invertido de las células, lo que permite garantizar su crecimiento y correcto estado. La superficie del microscopio fue también esterilizada con etanol al 70%.

Para el cultivo de los fibroblastos, se empleó el medio comercial DMEM de Gibco® completo, con glucosa 4,5 g/l, piruvato de sodio 1 mM, L-Glutamina 584 mg/l y suplementado con 10% de SFB que favorece el crecimiento celular. Este medio fue siempre calentado previamente a su uso a 37 °C en un baño de agua termostatizado. Los medios utilizados fueron succionados mediante una bomba de vacío, cuya pipeta Pasteur fue tratada con lejía al 20% tras cada uso y desechada en el contenedor adecuado.

4.1.2 Protocolo de trabajo en el laboratorio de cultivos celulares

Las tres líneas celulares en estudio fueron proporcionadas por el laboratorio de Barcelona en el que se generaron las estirpes de ratones. Por ello, en etapas anteriores a este estudio, las células ya habían sido divididas y congeladas.

El trabajo en el laboratorio comenzó descongelando y sembrando las células, dando lugar así a cultivos de fibroblastos con distintos pasos de división: pase 48 en la placa de células *Gfm1^{+/+}*, pase 37 para *Gfm1^{R671C/R671C}* y pase 38 para *Gfm1^{-/-R671C}*. Las células congeladas se diluyeron con medio DMEM completo añadiendo 700 µl en el criotubo, repitiendo esta operación y transfiriendo el contenido tras resuspender a un tubo falcon. A continuación, para eliminar el DMSO (compuesto tóxico), las células fueron centrifugadas a 1500 g durante 5 minutos obteniendo de esta manera un pellet celular que fue por último resuspendido en 3 ml de medio DMEM y sembrado en placas Petri 100mm.

Durante las semanas posteriores, los cultivos se mantuvieron en crecimiento en estufa a 37 °C en atmósfera húmeda y al 5% de CO₂, renovando el medio periódicamente cada 2-3 días con 10 ml de medio DMEM completo.

Cuando las células alcanzaron una confluencia de aproximadamente un 70-80% se dividieron y subcultivaron mediante tripsinización. Esta técnica emplea tripsina y EDTA; la tripsina es una serina proteasa que permite romper las uniones proteicas entre los fibroblastos, así como a la superficie de la placa; mientras que el EDTA favorece la desestabilización de las membranas celulares por su acción quelante de iones.

Para la división celular se retiró el medio de cultivo por succión con una bomba de vacío y se añadieron 700 µL de solución de tripsina (PBS al 0,05% en tripsina y al 0,02% en

EDTA), se incubaron 2-3 minutos en estufa a 37 °C para favorecer la acción de la tripsina, se comprobó que las células se hubiesen despegado por observación al microscopio y se añadieron 4 ml de medio DMEM completo para parar la acción de la tripsina. Finalmente, las células se distribuyeron en nuevas placas con 8-10 ml de medio DMEM completo.

Finalmente, se obtuvieron seis placas Petri de cada línea; tres de ellas fueron congeladas y las otras tres se emplearon para la extracción de pellets celulares.

Las células a congelar se tripsinizaron y se recogieron por centrifugación. Cada pellet celular obtenido se resuspendió en 675 µl de medio DMEM completo frío y se introdujo en un criotubo con 75 µl de DMSO (que actúa como agente criopreservante). Las células fueron en primer lugar almacenadas en un soporte de congelación con isopropanol, favoreciendo una congelación paulatina y uniforme (descenso de aproximadamente 1 °C/min). Después de, al menos 24 horas en el soporte, los criotubos se almacenaron en cajas convencionales a -80 °C en el congelador.

Para la extracción de pellets las células se tripsinizaron, se paró la acción de la tripsina con 4 ml de medio DMEM completo y se homogeneizó. Se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm, se retiró el medio y cada pellet celular se resuspendió en 500 µl de PBS frío. A continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm, se aspiró el PBS (sobrenadante) y los pellets se guardaron a -80 °C.

4.2. Técnicas de manipulación de RNA

4.2.1. Extracción de RNA total con TRIzol®

La extracción de RNA total de las células empleó TRIzol®, un reactivo a base de ácido-guanidio-fenol. El pH bajo (ácido) de la solución controla la separación del RNA del DNA y la proteína, la sal de guanidio sirve como agente desnaturizante de proteínas y el fenol es empleado para extraer ácidos nucleicos y proteínas.

En primer lugar, se mezclaron 500 µl de TRIzol® con cada uno de los pellets celulares previamente descongelados y se dejó reaccionar durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación, garantizando así el lisado celular. A continuación, se añadieron 100 µl de cloroformo para generar una bifase de extracción, con posterior agitación vigorosa durante 3 minutos e incubación 3 minutos a temperatura ambiente y centrifugación durante 15 minutos a 1200 g a 4 °C. Transcurrido este tiempo se obtuvieron tres fases, siendo la superior la fase acuosa en la que permanece el RNA, por lo que se recogió y se precipitó el RNA total añadiendo 250 µl de isopropanol frío.

Las muestras se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante, quedándonos con el pellet. A continuación, se añadieron 500 µl de etanol al 75% (evita la degradación de RNA por acción de RNasas), se centrifugaron 5 minutos 7500 g a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Los pellets de RNA obtenidos se dejaron secar a temperatura ambiente y se añadieron distintos volúmenes de H₂O Gibco® (libre de RNasas) con objeto de alcanzar una concentración similar de RNA total extraído en todas.

Por último, se incubaron en thermoblock a 55 °C con agitación de 450 rpm durante 10 minutos para favorecer la disolución de RNA.

4.2.2. Cuantificación de RNA total por espectrofotometría

Finalizada la extracción del RNA total, se determinó su concentración y pureza. Para ello se empleó el nanodrop NanoVue™, que permite determinar la concentración y pureza del RNA de manera sencilla empleando tan solo 2 µl de muestra.

Las relaciones de absorbancia son indicativas de la pureza del RNA extraído: Abs_{260/230} es un indicador de la presencia de compuestos orgánicos (valores aceptables en el rango de 2.0 a 2.2) mientras que Abs_{260/280} evalúa la pureza del DNA y RNA (valores en torno a 1.8 para muestras puras de DNA y de aproximadamente 2.0 para muestras puras de RNA). Una vez realizadas las medidas, los pellets se almacenaron a -80 °C.

4.2.3. Retrotranscripción de mRNA

El RNA total extraído de los pellets se retrotranscribió a cDNA. Para ello se empleó el kit comercial Invitrogen™ SuperScript™ Reverse Transcriptase.

El primer paso es el alineamiento de los *primers* al molde de RNA. Los volúmenes y reactivos necesarios se describen en el protocolo del kit comercial (ver Tabla1). Los componentes se centrifugaron durante 5 minutos a 65°C y se incubaron en hielo 1 minuto.

Tabla 1: Reactivos y volúmenes necesarios para el paso de alineamiento de los primers. Protocolo comercial Invitrogen™ SuperScript™ Reverse Transcriptase. El volumen de RNA y de agua Gibco® se determinan con los datos de concentración de la muestra determinada por espectrofotometría.

Componente	Volumen
50µM primer oligo (dT) ₂₀	1 µl
10µM mix dNTP (10mM)	1 µl
Molde de RNA (1µg)	Gfm1 ^{+/+} : 2,54 µl Gfm1 ^{R671C/R671C} : 1,5 µl Gfm1 ^{-/R671C} : 1,3 µl
Agua Gibco® (hasta 20 µl)	Gfm1 ^{+/+} : 8,46 µl Gfm1 ^{R671C/R671C} : 9,5 µl Gfm1 ^{-/R671C} : 9,7 µl

A continuación, se preparó el mix de reacción de retrotranscripción (ver Tabla 2), que se añadió al mix anterior preparado con los *primers* y el molde de RNA.

Tabla 2: Reactivos y volúmenes necesarios para el mix de reacción de retrotranscripción Protocolo comercial Invitrogen™ SuperScript™ Reverse Transcriptase.

Componente	Volumen
5X Buffer de la Transcriptasa Reversa SuperScript IV	4 µl
100mM DTT	1 µl
Inhibidor Recombinante de RNAsas	1 µl
Transcriptasa Reversa SuperScript IV (200U/ µl)	1 µl

Por último, se incubó durante 10 minutos a 50-55 °C y se inactivó la reacción con incubación durante 10 minutos a 80 °C. Las muestras con los cDNAs monocatenarios sintetizados fueron posteriormente almacenadas a -20 °C.

4.2.4. Amplificación de *Gfm1* a partir del cDNA mediante PCR

Una vez obtenido el cDNA, se llevó a cabo una PCR mediante la cual poder amplificar el gen de interés, *Gfm1*. Para ello se siguió el protocolo de la casa comercial

ThermoFisher® que emplea la DNA polimerasa de alta fidelidad *Phusion Hot Start II*, una enzima con una tasa de errores 50 veces menor que la polimerasa *Taq*.

Los *primers* necesarios para la PCR se diseñaron mediante la herramienta de diseño proporcionada por el NCBI y se comprobó si eran adecuados en las condiciones de la PCR empleando una herramienta de Thermo Fisher™.

Tabla 3: Secuencias de los primers diseñados para amplificar el fragmento del gen *Gfm1* de interés.

Primer	Secuencia	Tm° (°C)	Tm°' (°C)
<i>Gfm1</i> E13 F	5'-AGAGACCATTGTTGCCAG-3'	64	63.9
<i>Gfm1</i> E18 R	5'-GATGGTGAACACGGCTGGTA-3'	63.9	

*El primer directo (Forward, F) alinea con el exón 13 (E13) y el primer reverso (Reverse, R) con el exón 18 (E18). El valor de la Tm (melting temperatura) de la última columna es el valor que se debe emplear en la etapa de alineamiento de la PCR en base a las Tm de los dos primers.

Una vez preparado el mix con los reactivos necesarios (ver Tabla 4), los tubos se llevaron al termociclador y se inició el programa oportuno (ver Tabla 5). Finalmente, los productos de PCR obtenidos se guardaron a 4°C para su posterior uso.

Tabla 4: Reactivos necesarios para la PCR. Protocolo Thermo Fisher™ enzima *Phusion Hot Start II*.

Reactivo	Volumen
5X Buffer de la enzima <i>Phusion Hot Start II</i>	10 µl
100mM dNTPs	1 µl
10µM Primer R / Primer F	1 µl
cDNA	5 µl
DNA Polimerasa <i>Phusion Hot Start II</i> (2U/ µl)	1 µl
H ₂ O comercial Gibco®	31 µl

Tabla 5: Programa PCR con *Phusion Hot Start II* DNA polimerasa.

Paso del ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	98 °C	5 minutos	1
Desnaturalización Alineamiento	98 °C	10 segundos	30
	63,9 °C *	20 segundos	
	72 °C	15 segundos	
Extensión final	72 °C	5 minutos	1

*Los 63,9°C de la etapa de alineamiento se determinan por la Tm de los primers diseñados.

4.2.5. Electroforesis horizontal en gel de agarosa

Los resultados de la amplificación de los cDNA de interés obtenidos por PCR se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa empleando para ello el sistema *Mini-Sub® Cell GT* de Bio-Rad.

En primer lugar, se preparó gel de agarosa con una porosidad del 1% (p/v) disolviendo 1 gramo de agarosa en 100 ml de TAE1X. El TAE es una disolución tampón formada por Tris, acetato y EDTA; Tris y acetato permiten regular el pH y el EDTA es un quelante de cationes divalentes que secuestra el Mg²⁺ evitando que las nucleasas degraden los ácidos nucleicos. Finalmente se añadieron 10 µl de SYBR Safe™, que permite la tinción de ácidos nucleicos para su visualización mediante excitación UV o con luz azul.

Tras montar el soporte electroforético, se añadió el gel y se dejó polimerizar. A continuación, se introdujo en una cubeta de electroforesis (sumergida en TAE) y se cargaron las muestras en los pocillos mezclando para ello 25 µl de muestra con 3 µl de buffer de carga (cargamos el producto de PCR de cada línea celular en dos pocillos: 25 µl (+3 µl de buffer) + 25 µl (+3 µl de buffer); teniendo así los 50 µl obtenidos a partir de la PCR). Se cargó además el marcador de peso molecular (4 µl); un marcador de bajo peso molecular porque la banda de interés está en torno a los 600 pb. Finalmente, se llevó a cabo la separación electroforética aplicando un voltaje de 100V durante 45 minutos.

A continuación, el gel se extrajo del soporte y se observó mediante luz UV. Las tres bandas de interés del cDNA de *Gfm1* (una de cada línea celular) se cortaron y pesaron.

4.2.6. Purificación de los productos de PCR y secuenciación

A partir de las bandas de *Gfm1* se extrajo el DNA de interés de las tres líneas celulares empleando para ello el kit comercial *DNA Gel Extraction kit* de Norgen Biotek.

El protocolo de purificación se basa en la cromatografía en columna. La columna se une a al DNA en condiciones de altas concentraciones de sal y libera el DNA unido en condiciones bajas de sal y ligeramente alcalinas. El fragmento de gel que contiene el DNA de interés se incubó con *Binding Buffer G* a 55 °C durante 10 minutos, un componente que contiene sales caotrópicas, lo que permite que el gel se disuelva y garantiza la unión reversible del DNA a la matriz. A continuación, la muestra se depositó en la columna, lo que lleva a la unión del DNA, pero no de la agarosa y otras impurezas que se eliminan en el flujo continuo. Por último, el DNA unido se lavó dos veces con solución de lavado A y el producto de PCR purificado se eluyó con el tampón de elución B.

Los productos de PCR purificados fueron enviados al servicio de la empresa Secugen S.L. para ser secuenciados. Esta empresa establece la concentración que debe tener el DNA; en este caso de 20 ng/µl en un volumen final de 15 µl además de 1.5 µl de primer (ver Tabla 6). Los resultados proporcionados por la empresa se alinearon mediante el programa *Codon Code Aligner* a la secuencia del gen *Gfm1* (obtenida de *Ensembl*).

Tabla 6: Preparación de los productos de PCR para secuenciación según los estándares de la empresa Secugen S.L. para productos de PCR de entre 500 y 1000 pb. La concentración de las muestras se determinó por espectrofotometría

Muestra	Concentración DNA	Volumen DNA	Volumen H ₂ O	Volumen primer
<i>Gfm1</i> ^{+/+}	95 ng/ µl	3,16 µl	1,184 µl	1,5 µl
<i>Gfm1</i> ^{R671C/R671C}	55,5 ng/ µl	5,14 µl	9,59 µl	1,5 µl
<i>Gfm1</i> ^{-/R671C}	60 ng/ µl	5 µl	10 µl	1,5 µl

4.3. Técnicas de manipulación de proteínas

4.3.1. Extracción de proteínas totales

En la extracción de proteínas se empleó el buffer de lisis RIPA 1X y un inhibidor de proteasas (*Complete™ Protease Inhibitor Cocktail* de Roche). RIPA 1X es una solución formada por TrisHCl 50 mM a pH 7'4 (agente tamponante), NaCl 50 mM (neutralizador de las cargas de la superficie de las proteínas), Tritón X-100 (permite la permeabilización de

membranas), deoxicolato de sodio 0'5% (detergente iónico que permite disociar las interacciones de proteínas) y EDTA (agente quelante) 5 mM estéril.

La solución de buffer de lisis RIPA 1X e inhibidor de proteasas se preparó con una relación 100:4 (400 µl de RIPA 1X y 16 µl de inhibidor de proteasas). Con ella se resuspendieron los pellets celulares; los volúmenes añadidos fueron distintos según la cantidad de pellet disponible: 125 µl para *Gfm1^{+/+}*, 100 µl para *Gfm1^{R671C/R671C}* y 75 µl para *Gfm1^{-/R671C}*. A continuación, se incubaron durante 15 minutos a 4 °C en rueda giratoria y se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 g a 4 °C. Por último, se recogió el sobrenadante con las proteínas totales para su cuantificación mediante el método de Bradford.

4.3.2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

El método de Bradford permite determinar la cantidad de proteína total en una muestra empleando un colorante hidrófobo cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo (máximo de absorción a 466 nm). Cuando el colorante se asocia con el entorno hidrófobo del interior de una proteína origina un color azul intenso que se puede medir (máximo de absorción a 595 nm). Por tanto, elaborando una recta de calibrado de valores de absorbancia a 595 nm con disoluciones de proteína de concentración conocida y midiendo la absorbancia de las muestras de interés, pueden interpolarse los valores en la recta y obtener la concentración estimada de proteínas.

Para la elaboración de la recta de calibrado se empleó una solución de BSA a una concentración de 1 mg/ml, a partir de la cual se prepararon distintas disoluciones de concentración conocida por duplicado (0, 1, 2, 3, 5, 10 y 15 µl de BSA) en 200 µl de reactivo de Bradford y H₂O miliQ hasta completar un volumen final de 1 ml. Por su parte, las muestras problema se prepararon también por duplicado; en este caso se emplearon 2 µl de muestra problema, 200 µl de reactivo de Bradford y H₂O miliQ hasta completar un volumen final de 1 ml. Una vez se añadió el reactivo de Bradford en las muestras, los tubos se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se midió la absorbancia a 595 nm empleando para ello un espectrofotómetro.

4.3.3. Western Blot

4.3.3.1. Electroforesis vertical y desnaturizante en gel de poliacrilamida

Las proteínas cuantificadas se cargaron en un gel de poliacrilamida con SDS para su separación mediante electroforesis desnaturizante. Este está compuesto por un gel *stacking* (concentrador) y un gel *running* (separador) de diferente concentración de poliacrilamida (ver Tabla 7).

Tabla 7: Reactivos y volúmenes necesarios para preparar los geles running y stacking de la electroforesis vertical y desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Reactivos	Gel running (10%)	Gel stacking (5%)
Acrilamida: bisacrilamida 30:0:8	1.7 ml	0.33 ml
Tris HCl 1.5M pH 8.8 4x	1.25 ml	0.5 ml
Persulfato amónico APS	15 µL	10 µL
TEMED	5 µL	5 µL
H ₂ O miliQ	2 ml	1.167 ml

Ambos geles se prepararon añadiendo sus respectivos reactivos a la vez, con excepción del APS y el TEMED que son los que inician y propagan la reacción de polimerización, y que solo se añadieron en primer lugar a la mezcla del gel *running*. La mezcla se vertió entre dos cristales de 1mm de separación en el soporte y seguidamente se añadió una capa de isopropanol para que el gel *running* polimerizase de forma recta. A continuación, se retiró el isopropanol y se añadió el APS y el TEMED a la mezcla del gel *stacking*, que rápidamente se añadió sobre el gel *running* hasta ocupar la totalidad de los cristales. Por último, se colocó un peine de 1 mm de grosor para formar los pocillos.

Tras la polimerización, se preparó el soporte para llevar a cabo la electroforesis desnaturizante; el sistema empleado fue *Mini-PROTEAN* ® Tetra Cell de Bio-Rad.

Una vez montado el soporte se cargaron el marcador de peso molecular (7 µl de *PP standard* de Bio-Rad) y las muestras (40 µg por pocillo) con 3 µl de tampón de carga 4X (glicerol 10%, Tris-HCl 50mM pH6,8, SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,02% (p/v) y β-mercaptopropano 1% (v/v)). Los volúmenes de muestra y H₂O necesarios se calcularon empleando las concentraciones determinadas por el método de Bradford (ver Tabla 8). Finalmente, se desarrolló la electroforesis a intensidad constante 12 mA durante 2 horas aproximadamente hasta el fin de la electroforesis.

Tabla 8: Preparación de las muestras cuantificadas por el método de Bradford para ser cargadas en el gel de electroforesis vertical y desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Muestra	Concentración muestra	Volumen muestra	Volumen H ₂ O
<i>Gfm1</i> ^{+/+}	6,86 µg/ µl	5,83 µl	3,17 µl
<i>Gfm1</i> ^{R671C/R671C}	3,92 µg/ µl	10,2 µl	0 µl
<i>Gfm1</i> ^{-/R671C}	5,89 µg/ µl	6,79 µl	2,21 µl

*La concentración determinada por método de Bradford permite calcular el volumen de muestra necesario para tener en cada pocillo 40 µg de DNA. El volumen de H₂O se calcula teniendo en cuenta que el volumen final del pocillo debe ser de 12 µl.

4.3.3.2. Electrotransferencia de proteínas a membrana de PVDF

Las proteínas separadas en el gel mediante electroforesis desnaturizante fueron transferidas a una membrana de PVDF (Floruro de polivinilideno). Para ello se utilizó el sistema de electrotransferencia *Trans-Blot* ® Cell de Bio-Rad.

En primer lugar, se activó la membrana de transferencia con metanol durante 10 segundos y se lavó con agua. A continuación, se sacó el gel de electroforesis del soporte y se desecharon el *stacking* gel. Tanto el gel, como la membrana y los papeles de transferencia se sumergieron en BSN frío (Tris 48 mM, glicina 39 mM y metanol 20% (v/v)) y se procedió a su montaje en el sistema. Por último, se llevó a cabo la electrotransferencia a potencia constante de 80 V durante 2 horas a 4 °C en agitación constante.

La eficiencia de la transferencia se comprobó mediante tinción reversible con *Ponceau S solution* de Sigma-Aldrich, un colorante rojo que tiñe las proteínas de forma inespecífica. Después de retirar el colorante con H₂O destilada, la membrana se incubó con disolución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS-T (detergente Tween-20 al 0,1% en PBS) toda la noche en cámara fría con agitación suave para bloquear la superficie de la membrana sin proteínas y evitar así la unión inespecífica de anticuerpos a la membrana.

4.3.3.3. Incubación de la membrana con anticuerpos y detección quimiluminiscente

Finalizada la transferencia del producto de electroforesis desnaturalizante a la membrana de PVDF, se procedió al marcaje de la proteína de interés EGF1, así como de algunas subunidades del sistema OXPHOS mediante inmunodetección directa.

Esta técnica se basa en el uso de un anticuerpo primario que se une a la proteína de interés y un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario y que está conjugado con la enzima peroxidasa. Cuando esta enzima entra en contacto con luminol y peróxido de hidrógeno, se produce la reducción del peróxido de hidrógeno a agua y la oxidación del luminol, reacción de la que resulta una señal quimioluminiscente.

La membrana que se dejó incubando con agente bloqueante (leche 5% en PBS-T) se lavó 3 veces (durante 5, 6 y 7 minutos) empleando PBS-T en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con distintos anticuerpos primarios y secundarios para detectar la proteína EGF1 y diversas subunidades de OXPHOS (ver Tabla 9). En primer lugar, se incubó con el anticuerpo primario durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación, se realizaron de nuevo tres lavados con PBS-T (durante 5, 6 y 7 minutos) y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, se llevaron a cabo los tres últimos lavados con PBS-T.

Tabla 9: Anticuerpo primarios y secundarios con sus referencias, pesos moleculares y diluciones empleadas en el Western Blot.

	Anticuerpo primario		Anticuerpo secundario	
	Peso	Dilución		Dilución
Anti-EGF1 173529 (Abcam)	75 kDa	1/1000	Anti-rabbit	1/5000
Anti-COI 459600 (Thermo Fisher)	37 kDa	1/3000	Anti-mouse	1/5000
Anti-Citrato Sintasa SAB7202186 (SIGMA)	52 kDa	1/1000	Anti-mouse	1/5000
Anti-SDHA 459200 (Thermo Fisher)	70 kDa	1/1000	Anti-mouse	1/5000
Anti-NDUFA9 459100 (Thermo Fisher)	36 kDa	1/1000	Anti-mouse	1/5000
Anti-Tubulina T6074 (SIGMA)	50 kDa	1/5000	Anti-mouse	1/5000
Anti-Actina A2066 (SIGMA)	42 kDa	1/5000	Anti-rabbit	1/5000

Para revelar el marcaje, se emplearon dos reactivos del *kit ECL* de Thermo Fisher™: peróxido de hidrógeno y luminol. Se añadieron 800 µl de cada uno y se incubó la membrana durante 2 minutos a temperatura ambiente. Los resultados se revelaron en el equipo de detección de quimioluminiscencia *Amersham™ Imager 600* de GE Healthcare.

4.4. Técnicas de marcaje de proteínas en cultivos celulares

4.4.1. Marcaje de proteínas del sistema OXPHOS mediante inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica permite determinar la localización microscópica de las proteínas presentes en las células tomando como base una reacción antígeno-anticuerpo específica. El antígeno es la proteína que va a ser detectada en el tejido, mientras que el anticuerpo específico para ese antígeno es añadido a la muestra tras ser conjugado con compuestos que permiten su detección en el microscopio de fluorescencia. Esta técnica permitió llevar a cabo el marcaje de dos proteínas que componen el sistema de

fosforilación oxidativa OXPHOS: SDHA (subunidad A del complejo succinato deshidrogenasa, CII) y COI (subunidad I del complejo citocromo c oxidasa, CIV).

Las células se sembraron en una concentración de 20.000 células por pocillo en medio DMEM completo y se dejaron crecer hasta el día siguiente a 37°C en atmósfera húmeda y al 5% de CO₂. El día posterior, las células se fijaron con solución al 4% de paraformaldehído en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron 5 minutos con PBS y se permeabilizó la membrana celular para facilitar la entrada de los anticuerpos con 200 µl por pocillo de buffer Tx (5% BSA – 5%Trp/Pep en PBS), se incubaron las muestras 5 minutos y se lavaron durante 5 minutos con 2% BSA en PBS.

Por último, se realizó el marcaje con los anticuerpos que permitieron revelar la localización intracelular de las proteínas SDHA y COI. Para ello, se preparó el anticuerpo primario (ver Tabla 10) y las células se incubaron con esta solución durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS. Posteriormente se incubaron con la solución de anticuerpo secundario (ver Tabla 10) durante 2 horas y las células se lavaron con PBS 3 veces durante 5 minutos.

Tabla 10: Anticuerpos y diluciones empleadas en el marcaje inmunocitoquímico.

Anticuerpo primario		Anticuerpo secundario	
Anti-SDHA	1/500	Alexa Mouse® 594	1/750
Anti-COI	1/300	Alexa Mouse® 488	1/600

Finalmente, las células se tiñeron con solución DAPI en PBS, marcando de los núcleos celulares. Las imágenes de microscopía se obtuvieron gracias al servicio de microscopía del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), empleando el Microscopio de fluorescencia *Olympus IX8*.

4.4.2. Marcaje de la síntesis proteica mediante química click para microscopía

La química click describe un tipo de reacciones catalizadas por cobre entre una azida y un alquino. Las células se cultivan en presencia de L-HPG (L- homopropargilglicina), un análogo sintético funcional del aminoácido Metionina; como consecuencia las proteínas sintetizadas incorporan este aminoácido no canónico que contiene en su estructura un grupo alquino. A continuación, la adición de Alexa Fluor™ 488 Azida, un reactivo que contiene una azida en su estructura, reacciona con los alquinos de las proteínas sintetizadas mediante una reacción click catalizada por cobre. Como consecuencia se forma un conjugado estable de triazol que puede ser detectado por microscopía de fluorescencia en el rojo lejano.

El seguimiento de las proteínas recién sintetizadas se llevó a cabo en las tres líneas celulares en estudio en diferentes condiciones de cultivo. Por una parte, se incubó previamente con Harringtonina, un inhibidor de la biosíntesis proteica citosólica, observando por tanto señal de la biosíntesis proteica mitocondrial. Otras células se cultivaron con Cloranfenicol, un inhibidor de la biosíntesis proteica mitocondrial, correspondiéndose por tanto la señal detectada con la biosíntesis proteica citosólica.

El protocolo seguido se describe en el artículo “Monitoring mitochondrial translation in living cells” (14) y los reactivos son “Click- iT® Cell Reaction Kit” de la casa Invitrogen™:

Las células se sembraron con una concentración de 20.000 células por pocillo. El día posterior, se comenzó incubando los controles negativos durante 30 minutos a 37°C con 200 µl de medio de cultivo con cloranfenicol (150 µg/ml de cloranfenicol en EtOH). A continuación, todos los pocillos se incubaron durante 15 minutos con 200 µl de medio DMEM sin metionina y se incubó durante 30 minutos con L-HPG. Posteriormente, se retiró el medio y las células se incubaron durante 2 minutos sobre hielo con *buffer A* (10mM HEPES, 10mM NaCl, 5 mM KCl, 300 mM sacarosa, 0,015% digitonina en agua destilada). A continuación, las células se lavaron con *Buffer A* sin digitonina y se fijaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con 4% PFA en BSA. Las células se lavaron durante 5 minutos con PBS y se incubó con “quenching buffer” (100mM NH₄Cl en PBS) durante 20 minutos. Se permeabilizaron las membranas celulares con 3 incubaciones de 5 minutos en *Tx buffer* (5% BSA–5% Trp/Pep + 0,2% Triton-x en PBS) y por último se llevó a cabo la reacción de *click* durante 20 minutos con los reactivos necesarios (ver Tabla 11).

Tabla 11: Reactivos necesarios para la reacción de *click*, Click-iT® Cell Reaction Kit

Componente de reacción	Volumen necesario
1X Click-iT® cell reaction buffer	800 µl
CuSO ₄	20 µl
Click-iT® cell buffer additive	100 µl
Alexa Fluor™ 488 Azida	3 µl

Las células se lavaron con 3% BSA en PBS durante 5 minutos y a continuación, se incubaron con el anticuerpo primario durante 1 hora, se lavó tres veces con 3% BSA en PBS y se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario (ver Tabla 12). Las imágenes de microscopía se obtuvieron gracias al servicio de microscopía del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), empleando el Microscopio de fluorescencia Olympus IX8.

Tabla 12: Anticuerpos primarios y secundarios con sus diluciones empleadas en la Química Click.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Anti-SDHA 459200 (<i>Thermo Fisher</i>)	1/500	Alexa Mouse ® 594 nm	1/750
Anti-COI 459600 (<i>Thermo Fisher</i>)	1/300	Alexa Mouse ® 488 nm	1/600

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Estudio del genotipo de *Gfm1* en las líneas de fibroblastos embrionarios

Los fibroblastos embrionarios de las líneas *Gfm1*^{+/+}, *Gfm1*^{R671C/R671C} y *Gfm1*^{-/R671C} fueron cultivados. Posteriormente, se obtuvieron pellets de las tres líneas, a partir de los cuales se extrajo el RNA total que se empleó para determinar su genotipo.

El RNA total aislado fue cuantificado por espectrofotometría mediante *nanodrop NanoVue™*, determinando, además, las relaciones de absorbancia (ver Tabla 13). La línea de MEFs *Gfm1*^{+/+} tiene una concentración menor de RNA que las otras líneas celulares; sin embargo, esto no se debe, a priori, a diferencias entre las líneas, sino al hecho de que los pellets celulares fueron resuspendidos en distintos volúmenes.

Por otra parte, las relaciones de absorbancia nos permiten determinar que tenemos un RNA bastante puro sin DNA (Absorbancia _{260/280} de aproximadamente 2) ni otros compuestos orgánicos (Absorbancia _{260/230} cercana a 2).

Tabla 13: Resultados de la cuantificación por espectrofotometría del RNA total aislado

Muestra	Concentración RNA	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
$Gfm1^{+/+}$	394 ng/ μ l	2,054	1,480
$Gfm1^{R671C/R671C}$	664,4 ng/ μ l	2,068	1,449
$Gfm1^{-/R671C}$	763,2 ng/ μ l	2,058	1,669

El mRNA cuantificado se retrotranscribió a cDNA, con el que se llevó a cabo una PCR que empleó los *primers* previamente diseñados (ver Tabla 3). Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa y, a continuación, el gel se visualizó mediante luz UV. Como vemos en la Figura 4, la PCR ha permitido amplificar el cDNA de interés del gen *Gfm1*; confirmando el adecuado diseño de los *primers*.

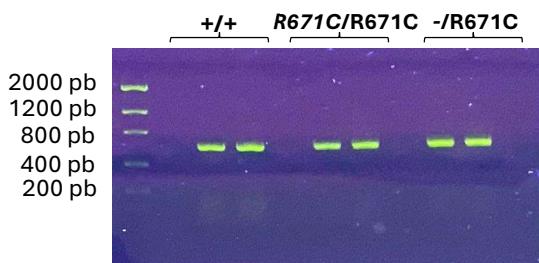


Figura 4: Visualización de los resultados de la electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (p/v). El marcador de pesos moleculares utilizado fue Low DNA Ladder de Life Technologies™. En torno a 600pb, las bandas por duplicado de *Gfm1* de MEFs $Gfm1^{+/+}$, $Gfm1^{R671C/R671C}$ y $Gfm1^{-/R671C}$.

Los cDNA de las tres líneas celulares, amplificados por PCR y separados por electroforesis se enviaron a la empresa Secugen S.L. para ser secuenciados. Se analizaron los resultados proporcionados, alineándolos mediante el programa *Codon Code Aligner* a la secuencia codificante del gen *Gfm1* obtenida de la base de datos *Ensembl*. En concreto, se localizaron los nucleótidos en las posiciones 2011-2013, triplete en el que debemos encontrar diferencias entre las líneas y que codifica para el aminoácido en la posición 671.

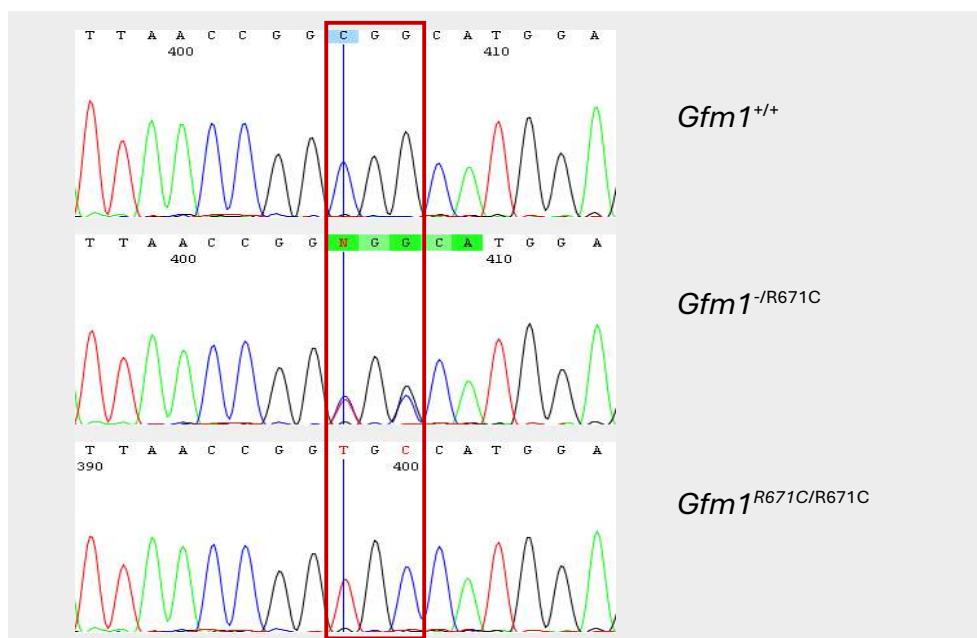


Figura 5: Secuenciación del fragmento de 600 pb del cDNA de interés de *Gfm1*. Resultados proporcionados por la empresa Secugen S.L. y analizados mediante el programa *Codon Code Aligner*. Los tres nucleótidos de interés en cada secuencia aparecen resaltados en un cuadro rojo.

Los nucleótidos en las posiciones 2011-2013 de la línea de MEFs $Gfm1^{+/+}$ son CGG (ver Figura 5). Esta línea es la denominada wild-type; en la que $Gfm1$ no ha sido alterado y, por tanto, los nucleótidos son CGG y codifican para el aminoácido Arginina (R).

En el caso de la línea de MEFs $Gfm1^{-/R671C}$, en la posición 2011 la secuenciación revela tanto un residuo de citosina (C) como de timidina (T), en la posición 2012 un único residuo de guanina (G) y en la posición 2013 podemos observar tanto citosina (C) como guanosina (G) (ver Figura 5). Esto se debe a que esta línea celular porta en uno de los dos alelos la mutación en estudio presente en pacientes (p.R671C), que implica el cambio de aminoácidos en estas posiciones de CGG a TGC. Sin embargo, la línea celular cuenta con otro alelo knock-out, en el que tras la inserción de un codón de STOP prematuro no codifica la proteína EGF1; sin embargo, la secuencia de DNA continúa presente en el ratón a pesar de que no pueda expresarse traduciéndose a una proteína funcional; a esto se debe la presencia de la secuencia CGG, Es decir, esta línea revela en la secuenciación tanto el triplete CGG, que codifica para el residuo R (debido al alelo knock-out), como TGC, que codifica para el residuo C (procedente del alelo con la mutación de pacientes).

La línea de MEFs $Gfm1^{R671C/R671C}$ cuenta, en las posiciones 2011-2013 con los residuos TGC (ver Figura 5), propios de los alelos portadores de la mutación presente en pacientes y que codifican el aminoácido Cisteína (C) en la posición 671.

5.2. Análisis de la expresión de la proteína EFG1 y de otras subunidades proteicas del sistema OXPHOS en las tres líneas celulares

A partir de los cultivos celulares de fibroblastos, se extrajeron las proteínas totales de las líneas MEFs $Gfm1^{+/+}$, MEFs $Gfm1^{R671C/R671C}$ y MEFs $Gfm1^{-/R671C}$. Estas proteínas totales se cuantificaron mediante el método de Bradford: en primer lugar, se midió la absorbancia a 595nm de muestras de concentración de BSA conocida (ver Tabla 14).

Tabla 14: Resultados de la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

		Abs 595 nm	Abs 595 nm	Promedio Abs
		Tubo 0 (0 µl BSA)	0,000	0,000
Tubos recta patrón	Tubo 1 (1 µl BSA)	0,065	0,043	0,054
	Tubo 2 (2 µl BSA)	0,094	0,117	0,106
	Tubo 3 (5 µl BSA)	0,245	0,253	0,249
	Tubo 4 (10 µl BSA)	0,504	0,525	0,515
	Tubo 5 (15 µl BSA)	0,768	0,770	0,769

* La absorbancia se midió por duplicado; la última columna es la media de las dos medidas.

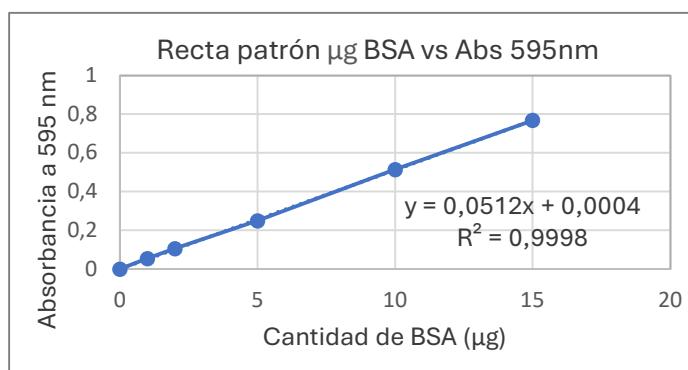


Figura 6: Recta patrón construida a partir de la medida de la absorbancia a 595 nm de muestras de BSA. En la parte derecha se muestra la ecuación de la recta construida a partir de la gráfica.

Con las medidas de absorbancia a 595 nm se construyó una recta patrón. La ecuación de la recta es $y = 0,0512x + 0,004$; siendo el término “y” la absorbancia a 595 nm y el término “x” la cantidad de proteína en μg .

A continuación, se midió la absorbancia a 595 nm de las muestras de interés, obteniendo la cantidad de proteína mediante la ecuación de la recta (ver Tabla 15). Se añadieron 2 μl de muestra; por ello la concentración se calcula dividiendo el valor entre 2.

Tabla 15: Cálculo de la concentración de proteína total en las muestras de las tres líneas celulares.

Muestra	Promedio Abs 595nm	μg de proteína en 2 μl	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Línea <i>Gfm1</i> ^{+/+}	0,703	13,713	6,856
Línea <i>Gfm1</i> ^{R671C/R671C}	0,402	7,844	3,922
Línea <i>Gfm1</i> ^{-/R671C}	0,604	11,779	5,890

La muestra de la línea celular de MEFs *Gfm1*^{+/+} tiene mayor concentración proteica que las líneas de MEFs *Gfm1*^{R671C/R671C} y MEFs *Gfm1*^{-/R671C} (ver Tabla 15). Esta diferencia puede deberse a que los pellets fueron resuspendidos en RIPA 1X e inhibidor de proteasas y, como consecuencia, puede que haya existido algún error en el pipeteo.

Tras cuantificar las proteínas, se llevó a cabo un Western Blot que permitió determinar los niveles proteicos de EFG1, así como de diversas subunidades del sistema de fosforilación oxidativa (ver Figura 7).

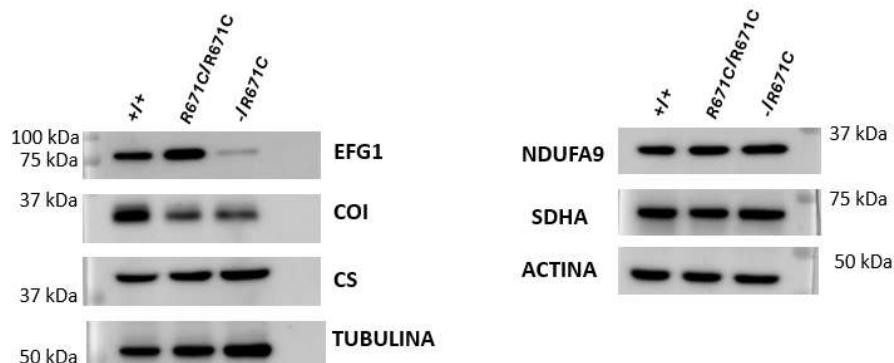


Figura 7: Resultados del Western Blot de las tres líneas celulares en estudio. En la membrana de la parte izquierda las hibridaciones fueron con anticuerpos: anti-EFG1, anti-COI, anti-CS y anti-Tubulina. En la membrana de la parte derecha, con anti-NDUFA9, anti-SDHA y anti-Actina.

Las bandas tienen diferente intensidad entre las tres líneas celulares para la proteína EFG1: observamos claramente disminuida la banda de EFG1 para la línea MEFs *Gfm1*^{-/R671C} (ver Figura 7), que cuenta con un alelo mutado debido a la formación de un codón STOP prematuro en la secuencia de *Gfm1* que impide que la correcta síntesis de la proteína EFG1. El otro alelo presente en esta línea porta la mutación p.R671C que también lleva a una alteración de EFG1. La banda de la línea MEFs *Gfm1*^{+/+} es menos intensa que en la línea celular *Gfm1*^{R671C/R671C}. Esto puede deberse a que la línea haya sufrido una adaptación, las células en cultivo habrían adquirido la capacidad de compensar su mutación incrementando la síntesis de la proteína EFG1; sin embargo, esta proteína estará mutada y no esperamos, por lo tanto, que sea completamente funcional.

Los niveles de COI, subunidad I del complejo IV o Citocromo c oxidasa codificada por el DNA mitocondrial, son mayores en la línea MEFs $Gfm1^{+/+}$ que en las otras dos líneas de estudio. Este hecho respalda el papel de la proteína EFG1 en el proceso de elongación mitocondrial; resultado que afianza que la mutación p.R671C sea patológica, se está viendo comprometida la función de EFG1 y, por tanto, la traducción mitocondrial. Además, la línea $Gfm1^{R671C/R671C}$, que mostraba niveles incrementados de proteína EFG1, no es capaz de llevar a cabo una adecuada traducción mitocondrial, provocando niveles reducidos de COI.

La Citrato Sintasa (CS), enzima que cataliza la primera reacción del ciclo de Krebs, se emplea como marcador de la biogénesis mitocondrial. Podemos observar que las bandas parecen similares entre las tres líneas, pudiendo ser algo más intensa en el caso de la línea de MEFs $Gfm1^{-/R671C}$, algo que debería confirmarse cuantificando las bandas (para lo que sería necesario realizar triplicados en el Western Blot). Este incremento podría deberse al intento de las maquinaria celular por incrementar la biosíntesis proteica para compensar el defecto de EFG1 debido a la mutación de $Gfm1$.

El análisis de NDUFA9, subunidad A9 del complejo Ubiquinona Oxidorreductasa (CIII), revela bandas con una intensidad similar en las tres líneas celulares en estudio. Esto puede deberse al hecho de que esta proteína está codificada por el DNA nuclear, por lo que la alteración de EFG1, implicada en la biosíntesis mitocondrial no afectaría a sus niveles. Las bandas de SDHA, subunidad del complejo Succinato Deshidrogenasa (CII), codificada por el DNA nuclear muestran también intensidades similares en las tres líneas.

Las proteínas Actina y Tubulina se emplearon como control interno. Se trata de proteínas que no deberían ver alterados sus niveles entre las líneas celulares, pese a las mutaciones. Por tanto, intensidades similares, como pueden observarse en la figura 7, entre las tres líneas confirmarían la adecuada carga del gel de electroforesis del Western Blot, validando así el resto de observaciones en el análisis del Western Blot.

5.3. Estudio de las bandas obtenidas en el Western Blot con anticuerpo anti-EFG1

El Western Blot de EFG1 permitió observar la banda de interés, con un peso molecular en torno a los 75kDa. Además, observamos otra banda superior a los 250 kDa con mayor intensidad en MEFs $Gfm1^{+/+}$ y $Gfm1^{R671C/R671C}$ que en $Gfm1^{-/R671C}$ (ver Figura 8).

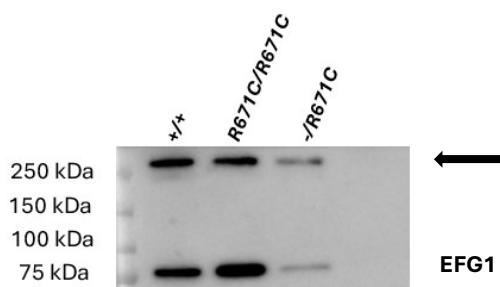


Figura 8: Resultados del Western Blot de EFG1 de las líneas celulares MEFs $Gfm1^{+/+}$, $Gfm1^{R671C/R671C}$ y $Gfm1^{-/R671C}$. La banda indicada con una flecha, en torno a 250 kDa es la banda en estudio.

En el Western Blot se empleó un anticuerpo monoclonal anti-EFG1, lo que nos garantiza que el marcaje no ha sido inespecífico y la banda superior es también de la proteína EFG1. Sin embargo, la aparición de esta banda en torno a los 250 kDa podría

deberse a las posibles modificaciones postraduccionales de la proteína. EFG1 murina es una proteína que cuenta con dos modificaciones postraduccionales: un residuo modificado con una fosfoserina en la posición 92 y un residuo de N-acetillisina en el aminoácido 176 (15). Sin embargo, son grupos químicos de tamaño pequeño insuficiente para justificar bandas de 250 kDa. Otra posibilidad es que la banda se debiera a la formación de trímeros de EFG1; por ello se realizó una búsqueda bibliográfica que apoyara esta idea, pero no se encontró información al respecto.

Para determinar el origen de banda y confirmar si es un trímero de EFG1, se llevó a cabo un segundo análisis de Western Blot de EFG1 con distintas concentraciones de β -mercaptopetoanol (ver Figura 9).

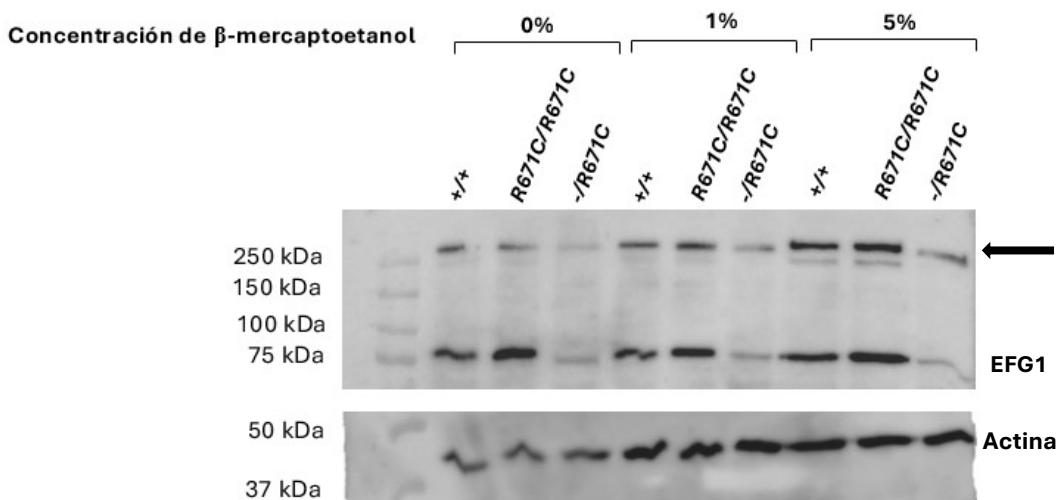


Figura 9: Resultados del Western Blot de EFG1 con distintas concentraciones de β -mercaptopetoanol de las tres líneas celulares. La banda en estudio en torno a los 250 kDa se señala con una flecha.

La Actina se empleó como estándar interno, la intensidad de sus bandas, pese a verse distorsionadas por el montaje del gel, fueron similares (ver Figura 9). Por ello, podemos establecer que los volúmenes de proteína cargados son parecidos.

El análisis reveló (ver Figura 9) intensidades en la banda superior a 250 kDa que fueron incrementando a medida que se incrementó la concentración de β -mercaptopetoanol. Sin embargo, el β -mercaptopetoanol es un compuesto que reduce los puentes disulfuro entre las proteínas, desnaturizándolas y como consecuencia con una mayor concentración de este compuesto, en el caso de tratarse de un trímero de EFG1, la intensidad de la banda superior debería ir disminuyendo. La figura 9 muestra lo contrario, demostrando que esta banda no es un trímero unido por puentes disulfuro de EFG1.

5.4. Detección mediante inmunocitoquímica de subunidades proteicas de OXPHOS

Los resultados del marcaje mediante inmunocitoquímica de las líneas celulares MEFs $Gfm1^{+/+}$, $Gfm1^{R671C/R671C}$ y $Gfm1^{-/R671C}$ se muestran en la figura 10.

Las imágenes obtenidas en las tres líneas celulares tienen un marcaje similar con el colorante DAPI, que se une al DNA y nos permite observar los núcleos.

Por otra parte, en la línea MEFs $Gfm1^{+/+}$, se observa mayor intensidad de marcaje de SDHA (subunidad A del complejo Succinato Deshidrogenasa de OXPHOS) que en las

líneas MEFs $Gfm1^{R671C/R671C}$ y MEFs $Gfm1^{-/R671C}$ (ver Figura 10). SDHA es una proteína codificada por el DNA nuclear cuyo análisis mediante Western Blot reveló bandas de intensidad aparentemente similar en las tres líneas celulares (ver Figura 7). Sin embargo, es posible que su localización en la célula sea más difusa y que no toda la proteína se encuentre dentro de la mitocondria formando parte del complejo II, lo que podría llevar a un marcaje menos intenso en las líneas MEFs $Gfm1^{R671C/R671C}$ y MEFs $Gfm1^{-/R671C}$. Esto podría deberse a que, a pesar de que el complejo II esté codificado en su totalidad por el DNA nuclear, la alteración que sufren las células conduzca a un incorrecto ensamblaje del complejo. Esta hipótesis debería ser confirmada mediante otros experimentos.

Otra hipótesis que justificaría los niveles de proteína SDHA podría ser el hecho de que en las líneas MEFs $Gfm1^{R671C/R671C}$ y MEFs $Gfm1^{-/R671C}$ exista un mayor número de mitocondrias que en $Gfm1^{+/+}$ pero con menor cantidad de complejo OXPHOS. Esto podría ocurrir si, en un intento por compensar el déficit de fosforilación oxidativa por la disminución de EFG1, las células hayan incrementado la biogénesis mitocondrial. Este hecho estaría justificado en el aparente incremento de los niveles de Citrato Sintasa en la MEFs $Gfm1^{-/R671C}$ en el Western Blot (ver Figura 7).

Por otra parte, se observa mayor intensidad de señal de COI en MEFs $Gfm1^{+/+}$ que en MEFs $Gfm1^{R671C/R671C}$ y MEFs $Gfm1^{-/R671C}$ (ver Figura 10). COI, subunidad I del complejo IV o Citocromo c oxidasa codificada por el DNA mitocondrial también mostró una tendencia similar en el análisis mediante Western Blot (ver Figura 7), respaldando de nuevo el papel crucial de EFG1 en la elongación mitocondrial.

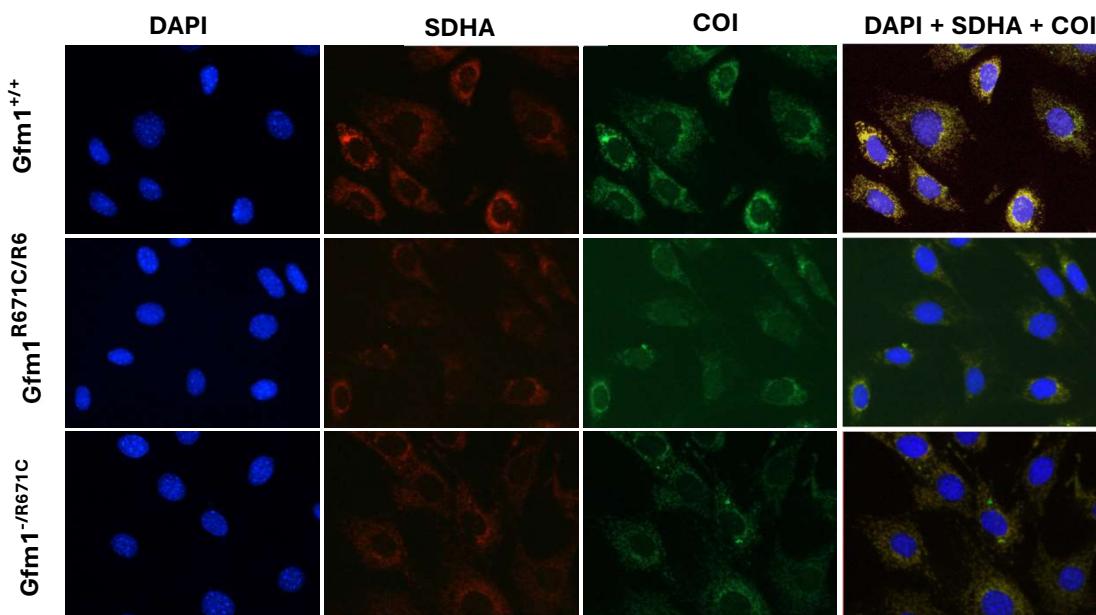


Figura 10: Resultados inmunocitoquímica. Las células aparecen marcadas con DAPI (color azul), anticuerpo anti-SDHA (rojo) y anti-COI (verde). Imágenes de microscopía 40X proporcionadas por el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), Microscopio de fluorescencia Olympus IX8.

5.5. Medida de la tasa de traducción mitocondrial utilizando la técnica click

La química click permite hacer un seguimiento y cuantificar las proteínas recién sintetizadas (16). La técnica se llevó a cabo en las tres líneas celulares en estudio en diferentes condiciones de cultivo. Sin embargo, tan solo se obtuvieron resultados para la línea celular MEFs $Gfm1^{-/R671C}$ (ver Figura 11).

La señal del colorante DAPI, que permite localizar los núcleos celulares, es similar en las células previamente tratadas con Harringtonina y Cloranfenicol (ver Figura 11).

La química click con *Alexa Fluor™ 488 Azida*, permite marcar específicamente las proteínas recién sintetizadas (en verde en la Figura 11). En las imágenes se observa un mayor marcaje en las células que han sido previamente tratadas con Cloranfenicol (CAP). Esto puede deberse a que este compuesto inhibe la biosíntesis proteica mitocondrial y por lo tanto logra marcar las proteínas citosólicas recién sintetizadas, proceso que lleva a una gran síntesis proteica y como consecuencia a un elevado marcaje. En el caso de las células previamente tratadas con Harringtonina (Harr), solo se observa marcaje de la biosíntesis proteica mitocondrial porque la síntesis citosólica está inhibida por este compuesto. Realmente, en este caso, el marcaje es menos intenso (ver Figura 11).

Sin embargo, en ambos marcas podemos apreciar una escasa señal de *Alexa Fluor™ 488 Azida*. Esto puede deberse a la incompleta permeabilización de las membranas celulares; si esto ocurre, no se elimina el exceso de Azida tras el marcaje y como consecuencia, la señal se observa en toda la célula (ver Figura 11).

En cuanto al marcaje de la proteína SDHA; codificada por el DNA nuclear, observamos una señal similar en las células tratadas con Cloranfenicol y con Harringtonina (ver Figura 11).

Por último, cabe destacar la necesidad de optimizar el protocolo de la química *click* para estas líneas celulares; sería necesario buscar otros modos de permeabilizarlas.

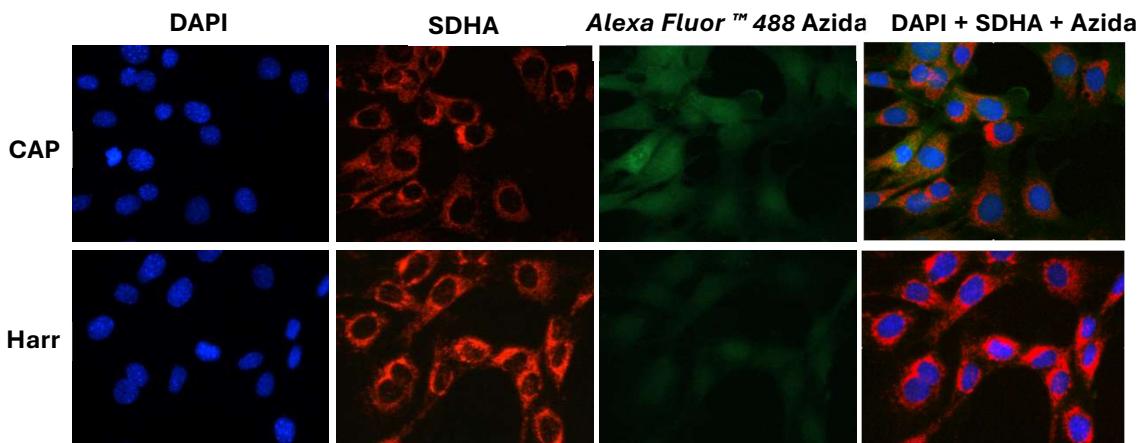


Figura 11: Resultados del marcaje con la química *click* de la línea MEFs $Gfm1^{-/-}R671C$. Las imágenes superiores son de células previamente tratadas con Cloranfenicol (CAP), y las de la parte inferior con Harringtonina (Harr). El marcaje se llevó a cabo con DAPI (azul), anticuerpo anti-SDHA (rojo) y *Alexa Fluor™ 488 Azida* (verde). Por último, las tres imágenes solapadas en la última columna. Imágenes de microscopía 40x proporcionadas por el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), Microscopio de fluorescencia Olympus IX8.

6. CONCLUSIONES

El estudio de la hepatoencefalopatía COXPD1 utilizando como modelo las líneas celulares MEFs $Gfm1^{+/+}$, MEFs $Gfm1^{R671C/R671C}$ y MEFs $Gfm1^{-/R671C}$ requiere verificar en primer lugar el material genético que portan los fibroblastos embrionarios de las tres líneas en estudio. Como se ha logrado determinar tras la secuenciación, los ratones contenían las mutaciones de interés: MEFs $Gfm1^{+/+}$ con el gen $Gfm1$ inalterado revelaron en las posiciones 2011-2013 el triplete CGG que codifica para el aminoácido Arginina. La línea de MEFs $Gfm1^{R671C/R671C}$, con la mutación p.R671C en homocigosis, posee en su secuenciación el triplete TCG, que codifica para el aminoácido Cisteína. Y, por último, la secuenciación de la línea con el fenotipo bioquímico más grave mostró en las posiciones 2011-2013 tanto el triplete CGG como el TCG, propios de su genotipo heterocigoto.

El análisis de la tasa de traducción mitocondrial de la proteína EFG1, así como de diversas subunidades del sistema de fosforilación oxidativa, demostró la clara disminución en los niveles de EFG1 en la línea $Gfm1^{-/R671C}$ y una consecuente disminución en los niveles de COI, subunidad I del complejo IV. Por otra parte, los niveles de EFG1 de la línea $Gfm1^{R671C/R671C}$ no disminuyeron; sin embargo, sí lo hicieron los niveles de COI, demostrando el papel crucial de EFG1 y el alcance de su alteración en la traducción mitocondrial, impidiendo la correcta síntesis de COI.

Además, la observación de una banda superior a 250 kDa en el estudio mediante Western Blot y su posterior análisis con concentraciones crecientes de β -mercaptoetanol nos permite afirmar que esta no es debida a la formación de un trímero de EFG1.

El estudio *in vitro* de los fibroblastos embrionarios de las tres líneas celulares en estudio mostró niveles de COI reducidos en las líneas $Gfm1^{-/R671C}$ y $Gfm1^{R671C/R671C}$, apoyando la idea anterior. Sin embargo, las imágenes de microscopía revelaron también niveles disminuidos de la proteína SDHA.

Por último, la química *click* ha permitido detectar proteínas recién sintetizadas con este marcaje; pero es necesario optimizar el protocolo para determinar mediante este método la tasa de traducción mitocondrial.

Este trabajo ha permitido determinar la tasa de traducción mitocondrial de EFG1, logrando así el objetivo principal del estudio. Los niveles de EFG1 se han visto alterados en las líneas celulares propuestas como modelo para el estudio de la hepatoencefalopatía COXPD1.

CONCLUSIONS

The study of COXPD1 hepatoencephalopathy using as a model the cell lines MEFs *Gfm1*^{+/+}, MEFs *Gfm1*^{R671C/R671C} and MEFs *Gfm1*^{-/R671C}, requires first verifying the genetic material carried by the embryonic fibroblasts of the three studied lines. As it has been determined, after sequencing, the mice contained the mutations of interest: MEFs *Gfm1*^{+/+} with the unaltered *Gfm1* gene has in the 2011-2013 positions the CGG triplet that encodes for the amino acid Arginine. The line of MEFs *Gfm1*^{R671C/R671C}, with the p.R671C mutation in homozygosity, revealed in its sequencing the TCG triplet, which encodes for the amino acid Cysteine. And finally, the sequencing of the line with the most severe biochemical phenotype showed in the 2011-2013 positions both the CGG triplet and the TCG: typical of its heterozygous genotype.

The analysis of the mitochondrial translation rate of the EFG1 protein as well as of various subunits of the oxidative phosphorylation system, demonstrated the clear decrease in the levels of EFG1 in the *Gfm1*^{-/R671C} line and a consequent decrease in the levels of COI, subunit I of complex IV. On the other hand, the EFG1 levels of the *Gfm1*^{R671C/R671C} line did not decrease; however, the COI levels did, demonstrating the crucial role of EFG1 and the extent of its alteration in mitochondrial translation, preventing the correct synthesis of COI.

In addition, the observation of a band of 250 kDa in the study by Western Blot and its subsequent analysis with increasing concentrations of β-mercaptoethanol allows us to affirm that this is not due to the formation of a trimer of EFG1.

The in vitro study of embryonic fibroblasts from the three cell lines showed reduced COI levels in the *Gfm1*^{-/R671C} and *Gfm1*^{R671C/R671C} lines, supporting the above idea. However, microscopy imaging also revealed decreased levels of the SDHA protein; something we did not expect.

Finally, click chemistry has made it possible to detect newly synthesized proteins with this marking but it is necessary to optimize the protocol to determine, using this method, the mitochondrial translation rate.

In short, with this work it has been possible to determine the mitochondrial translation rate of EFG1, the main objective of this study, levels of the protein have been affected in the cell lines proposed as a model for the study of COXPD1 hepatoencephalopathy.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Molina-Berenguer M, Vila-Julià F, Pérez-Ramos S, Salcedo-Allende MT, Cámara Y, Torres-Torronteras J, et al. Dysfunctional mitochondrial translation and combined oxidative phosphorylation deficiency in a mouse model of hepatoencephalopathy due to Gfm1 mutations. *FASEB Journal*. 2022 Jan 1;36(1).
2. Smits P, Antonicka H, van Hasselt PM, Weraarpachai W, Haller W, Schreurs M, et al. Mutation in subdomain G' of mitochondrial elongation factor G1 is associated with combined OXPHOS deficiency in fibroblasts but not in muscle. *European Journal of Human Genetics* 2011 19:3
3. Gfm1 G elongation factor, mitochondrial 1 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. [cited 2022 Apr 26].
4. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell* 2012 Mar 3 148(6):1145.
5. Saada A. Mitochondria: Mitochondrial OXPHOS function ex vivo - The use of primary fibroblasts. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014 Mar 1;48(1):60
6. Koopman WJH, Distelmaier F, Smeitink JAM, Willemse PHGM. OXPHOS mutations and neurodegeneration. *The EMBO Journal*. 2013 Jan 9;32(1):9–29
7. Schapira AH. Mitochondrial disease. *The Lancet* 2006 Jul;368(9529):70–82.
8. Valente L, Tiranti V, Marsano RM, Malfatti E, Fernandez-Vizarra E, Donnini C, et al. Infantile Encephalopathy and Defective Mitochondrial DNA Translation in Patients with Mutations of Mitochondrial Elongation Factors EFG1 and EFTu. *The American Journal of Human Genetics* 2007 Jan 1;80(1):44–58.
9. Aglais Arredondo Falagán D, Lic Gleymis Venet Cadet I, Dra Dra Olivia Román Guerra MsC Eglis Yanet Ramírez Delgado II II. ARTÍCULO DE REVISIÓN Bases moleculares de las enfermedades mitocondriales. MEDISAN. 2012;16(5):795.
10. Bhargava K, Templeton P, Spremulli LL. Expression and characterization of isoform 1 of human mitochondrial elongation factor G. *Protein Expression and Purification*. 2004 Oct 1;37(2):368–76.
11. Smits P, Antonicka H, van Hasselt PM, Weraarpachai W, Haller W, Schreurs M, et al. Mutation in subdomain G' of mitochondrial elongation factor G1 is associated with combined OXPHOS deficiency in fibroblasts but not in muscle. *European Journal of Human Genetics* 2011 19:3. 2010 Dec 1 19(3):275–9.
12. Boczonadi V, Horvath R. Mitochondria: Impaired mitochondrial translation in human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014 [26];48(100):77.
13. Gao J, Yu L, Zhang P, Jiang J, Chen J, Peng J, 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 May 15;74(1):109–14.
14. Yousefi R, Fornasiero EF, Cyganek L, Montoya J, Jakobs S, Rizzoli SO, et al. Monitoring mitochondrial translation in living cells. *EMBO Rep* . 2021 Apr 7;22(4):e51635.
15. Gfm1 - Elongation factor G, mitochondrial precursor - Mus musculus (Mouse) - Gfm1 gene & protein. UniProt. [cited 2022 Jun 20].
16. Yousefi R, Fornasiero EF, Cyganek L, Montoya J, Jakobs S, Rizzoli SO, et al. Monitoring mitochondrial translation in living cells. *EMBO Rep*. 2021 Apr 7;22(4).