



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Estudio de patogenicidad de la mutación c.1036C>T en el gen *TEFM*

Study of c.1036C>T mutation pathogenicity in TEFM gene

Autor

Javier Amezcua Gil

Directoras

María Pilar Bayona Bafaluy

Nuria Garrido Pérez

Grupo de Biogénesis y patología mitocondrial

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Máster Universitario en Biología Molecular y Celular

2017/2018

ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
1. RESUMEN	6
1.1 Resumen	6
1.2 Abstract	6
2. INTRODUCCIÓN	7
2.1 La mitocondria, el sistema OXPHOS y el mtDNA.....	7
2.2 Transcripción del mtDNA y su regulación	8
2.3 Replicación del mtDNA, TEFM y la elongación de la transcripción del mtDNA	11
2.4 Enfermedades mitocondriales	13
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
4. MATERIAL Y MÉTODOS	16
4.1 Reactivos y kits comerciales.....	16
4.2 Cultivos celulares	17
4.2.1 Líneas celulares.....	17
4.2.2 Mantenimiento celular y recogida de pellets.....	17
4.2.3 Congelación y descongelación celular	18
4.2.4 Medida de los niveles de ATP mitocondrial	18
4.3 Técnicas de manipulación de RNA	19
4.3.1 Extracción de RNA total con TRIzol®	19
4.3.2 Eliminación de trazas de DNA con DNasa I	19
4.3.3 Cuantificación de RNA total por espectrofotometría.....	20
4.3.4 Retrotranscripción del mRNA por RT-PCR.....	20
4.3.5 Análisis de expresión por qPCR (SYBR Green)	21
4.3.6 Análisis de expresión por qPCR (sondas TaqMan)	22
4.3.7 Amplificación de transcritos de TEFM por PCR	23
4.3.8 Electroforesis horizontal en gel de agarosa	24
4.3.9 Purificación de producto de PCR y secuenciación de la mutación c.1036C>T	25
4.4 Técnicas de manipulación de DNA	25
4.4.1 Extracción de DNA total.....	25
4.4.2 Cuantificación de DNA total por espectrofotometría	25
4.4.3 Amplificación del mtDNA por PCR y PCR anidada.....	25
4.4.4 Electroforesis horizontal en gel de agarosa	27
4.4.5 Purificación de producto de PCR y secuenciación del mtDNA.....	27
4.5 Técnicas de manipulación de proteínas.....	28

4.5.1 Extracción de proteínas totales.....	28
4.5.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	28
4.5.3 Western blot	29
4.5.4 Blue native PAGE (BN-PAGE).....	31
4.6 Aplicaciones bioinformáticas y análisis estadístico.....	33
5. RESULTADOS	35
5.1 Análisis bioinformático.....	35
5.1.1 Conservación evolutiva de TEFM y predicción patológica de la mutación c.1036C>T	35
5.1.2 Importancia estructural del extremo C-terminal de TEFM.....	37
5.2 Análisis de secuencias	38
5.2.1 Confirmación de la presencia de la mutación c.1036C>T de TEFM en el paciente 3304	38
5.2.2 Secuenciación del mtDNA del paciente 3304.....	39
5.3 Análisis de la función mitocondrial	40
5.3.1 Medida de los niveles de ATP mitocondrial	40
5.3.2 Cuantificación de transcritos mitocondriales.....	40
5.4 Ensayos funcionales basados en análisis de complementación genética	42
5.4.1 Confirmación de la sobreexpresión de las líneas celulares generadas	42
5.4.2 Valoración de la complementación genética en los niveles de TEFM	43
5.4.3 Comparación de sobreexpresión y niveles proteicos según la cantidad de vector lentiviral	44
5.4.4 Análisis del efecto de la sobreexpresión de TEFM wt	45
6. DISCUSIÓN	51
7. CONCLUSIONES	54
7.1 Conclusiones	54
7.2 Conclusions	54
8. BIBLIOGRAFÍA	55
9. ANEXOS	58
9.1 Secuencia codificante y proteica de TEFM (NCBI).....	58
9.2 Frecuencia de la mutación c.1036C>T en TEFM (ExAC)	59
9.3 Relaciones filogenéticas entre TEFM humano y TEFM homólogos de otras especies.....	60
9.4 Conservación de los residuos afectados por la mutación c.1036C>T	61

ABREVIATURAS

3304	Paciente con la mutación c.1036C>T en <i>TEFM</i> estudiado en el presente trabajo
μl	Microlitro
°C	Grados Celsius
APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosín trifosfato
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales
bp	Pares de bases
BSA	Albúmina de suero bovino
CI	Complejo I del sistema OXPHOS
CII	Complejo II del sistema OXPHOS
CIII	Complejo III del sistema OXPHOS
CIV	Complejo IV del sistema OXPHOS
CV	Complejo V del sistema OXPHOS
cDNA	DNA complementario
CSBII	Bloque de secuencias conservadas II
DDM	n-dodecil-β-D-maltósido
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMEM	Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa I	Desoxirribonucleasa I
dNTPs	Desoxinucleótido trifosfato
dsDNA	DNA bicatenario
EC	Complejo de elongación de la transcripción del mtDNA
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Fuerza centrífuga relativa (gravedad)
Gln, Q	Glutamina
GRAVY	Índice de hidropaticidad
h	Hora
IC	Complejo de iniciación de la transcripción del mtDNA
mA	Miliamperios
ml	Mililitro
mRNA	RNA mensajero
mtDNA	DNA mitocondrial
MTERF1	Factor de terminación de la transcripción mitocondrial 1
NCBI	Centro nacional de información biotecnológica
nDNA	DNA nuclear
nt	Nucleótidos
OXPHOS	Sistema de fosforilación oxidativa
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PDB	Banco de datos de proteínas
POLRMT	RNA polimerasa mitocondrial humana
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
qPCR	PCR cuantitativa
rCRS	Secuencia de referencia Cambridge del mtDNA revisada
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa A	Ribonucleasa A
rpm	Revolución por minuto
rRNA	RNA ribosómico
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa
s	Segundo
Sc	Supercomplejos respiratorios del sistema OXPHOS
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
siRNA	RNA de silenciamiento
TA	Temperatura ambiente
TEFM	Factor de elongación de la transcripción mitocondrial
TFAM	Factor de la transcripción mitocondrial A
TFB2M	Factor de la transcripción mitocondrial B2
TEMED	Tetrametiletilendiamina
Tm	Temperatura de hibridación
V	Voltios
wt	Carácter natural (fenotipo silvestre)

1. RESUMEN

1.1 Resumen

La transcripción del mtDNA es uno de los procesos más importantes en la regulación de la biosíntesis del sistema OXPHOS y en el mantenimiento del mtDNA por estar conectada con la replicación del mismo. La RNA polimerasa mitocondrial humana (POLRMT) actúa como molécula central de la transcripción, que se divide en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. Para que se produzca la elongación es necesario el factor de elongación de la transcripción (TEFM), que aumenta la procesividad de POLRMT y se encuentra codificado por el gen nuclear *TEFM*. En el presente trabajo se ha llevado a cabo un estudio de la mutación c.1036C>T en *TEFM* presente en el paciente 3304, que cursa con déficit serotoninérgico y disfunción hipotalámica, con el objetivo de determinar si es la responsable de la etiología de su enfermedad. Para ello, se ha analizado bioinformáticamente el carácter patológico de la mutación, se ha caracterizado el mtDNA del paciente y se ha valorado la existencia o ausencia de disfunción mitocondrial a nivel de producción de ATP, transcripción mitocondrial, cuantificación de subunidades del sistema OXPHOS y formación de complejos y supercomplejos respiratorios. Además, se ha aplicado un ensayo de complementación genética para analizar la recuperación de la función mitocondrial. La mutación c.1036C>T se predice como patológica, el paciente carece de mutaciones en su mtDNA y presenta una disfunción mitocondrial que podría estar relacionada con los síntomas de su enfermedad. Finalmente, la sobreexpresión de *TEFM* wt perjudica la funcionalidad mitocondrial de las células del paciente, imposibilitando la terapia génica como tratamiento.

Palabras clave: transcripción, replicación, mtDNA, *TEFM*, mutación, complementación genética.

1.2 Abstract

mtDNA transcription is one of the most important processes in OXPHOS system biosynthesis regulation and in mtDNA maintenance because of its connection with mtDNA replication. Human mitochondrial RNA polymerase (POLRMT) acts as a central molecule in transcription, which is divided into initiation, elongation and termination. For transcription elongation it is necessary the transcription elongation factor (TEFM), which increases POLRMT processivity and is encoded by *TEFM* nuclear gene. In the present work, 3304 patient, who has serotonin deficit and hypothalamic dysfunction, and carries the c.1036C>T mutation in *TEFM*, has been studied in order to establish his disease etiology. With this objective, mutation pathological character has been analyzed bioinformatically, patient mtDNA has been characterized and mitochondrial dysfunction has been evaluated by ATP production levels, mitochondrial transcription, OXPHOS system subunits quantification and respiratory complexes and supercomplexes formation. Moreover, a functional complementary assay has been applied to analyze mitochondrial function recovery. Mutation c.1036C>T is predicted to be pathological, patient lacks any mutations in its mtDNA and presents a mitochondrial dysfunction that could be related with his disease symptoms. Finally, *TEFM* wt overexpression impairs patient's cells mitochondrial functionality, making gene therapy impossible as a treatment.

Keywords: transcription, replication, mtDNA, *TEFM*, mutation, functional complementation.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 La mitocondria, el sistema OXPHOS y el mtDNA

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos y de origen endosimbótico que participan en diversos procesos celulares como la producción de energía en forma de ATP, homeostasis del calcio, producción de especies reactivas de oxígeno, apoptosis e incluso en la regulación del ciclo celular (El-hattab, Craigen y Scaglia, 2017; Shokolenko y Alexeyev, 2017). Se caracterizan por estar formadas por una membrana externa semipermeable y una membrana interna impermeable, que, en general, requieren de transportadores para la incorporación de moléculas procedentes del citosol, y una matriz mitocondrial. La membrana interna se pliega formando unas estructuras conocidas como crestas mitocondriales, en las que se localiza el sistema OXPHOS, mientras que en la matriz se encuentran moléculas de un DNA propio de las mitocondrias, conocido como mtDNA (Montoya, 2005).

El sistema OXPHOS (Figura 1) es el principal productor de ATP de la célula mediante el proceso conocido como respiración celular o fosforilación oxidativa y se caracteriza por estar constituido por cinco complejos proteicos que, de acorde al modelo plástico, pueden encontrarse asociados en supercomplejos o separados en complejos individuales según el estado metabólico celular (Lapuente-brun et al., 2013). Estos complejos respiratorios constituyen un caso único en la célula por estar constituidos por subunidades codificadas en dos genomas celulares distintos: el mtDNA y el nDNA.

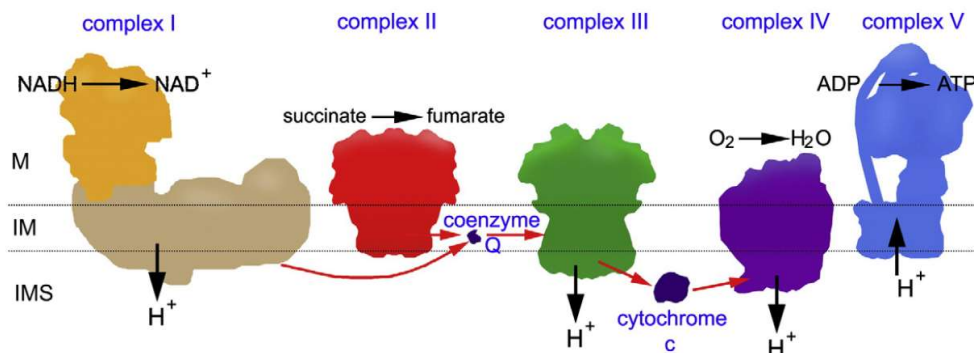


Figura 1. Representación esquemática de los complejos del sistema OXPHOS (Dudkina, Kouřil, Peters, Braun y Boekema, 2010). Los cinco complejos se muestran sin tener en cuenta sus posibles interacciones para dar lugar a la formación de supercomplejos. CI, CIII y CIV generan un gradiente electroquímico de protones que después son bombeados hacia la matriz mitocondrial por CV, sintetizándose ATP en el proceso. El CI se encuentra formado por 45 subunidades, CII por 4, CIII por 11, CIV por 13 y CV por 16. M: matriz mitocondrial; IM: membrana interna mitocondrial; IMS: espacio intermembrana.

El mtDNA es una molécula circular, cerrada, superenrollada y formada por 16.569 bp y por una cadena pesada y otra ligera, según su mayor o menor composición en guaninas y timinas (G + T), respectivamente (El-hattab et al., 2017). Contiene 37 genes caracterizados por carecer de intrones y de los que 13 codifican para subunidades de los complejos del sistema OXPHOS, 2 rRNAs (12S y 16S) y 22 tRNAs. De las 13 subunidades 7 son del Complejo I (CI) o NADH:ubiquinona oxidorreductasa (ND1, 2, 3, 4L, 5 y 6), 1 del Complejo III (CIII) o

ubiquinol:citocromo c oxidorreductasa (Cytb o citocromo b), 3 del Complejo IV (CIV) o citocromo c oxidasa (COI, II y III) y 2 del Complejo V (CV) o ATP sintasa (ATP6 y 8) y sólo ND6 se encuentra codificada en la cadena ligera. Por su parte, los rRNAs y tRNAs mitocondriales constituyen, junto a proteínas importadas desde el citosol, un sistema de traducción separado del citosólico (Montoya, 2005). Además, el mtDNA posee su propio código genético y cada mitocondria contiene múltiples copias de mtDNA que se agrupan entre sí en unos complejos conocidos como nucleoides. Éstos contienen proteínas, como la RNA polimerasa mitocondrial POLRMT, y están formados por entre 2 y 10 moléculas de mtDNA (Legros, Malka, Frachon, Lombès y Rojo, 2004).

2.2 Transcripción del mtDNA y su regulación

Todas las funciones mitocondriales están conectadas, directa o indirectamente, con el sistema OXPHOS y, dado que este depende de la expresión de genes mitocondriales y nucleares, la transcripción mitocondrial y su adecuada regulación son fundamentales para la correcta biosíntesis de los componentes del sistema y la funcionalidad de las mitocondrias. La mayor parte del mtDNA carece de regiones intergénicas no codificantes, pero existe una zona no codificante de aproximadamente 1,1 kb, localizada entre los tRNA^{Phe} y tRNA^{Pro}, que contiene todos los elementos necesarios para la transcripción del mtDNA, entre los que se encuentran los promotores de la transcripción de ambas cadenas (H₁ y H₂ para la cadena pesada y L para la cadena ligera), el origen de replicación de la cadena pesada O_H y tres bloques de secuencias conservadas (CSBI, CSBII y CSBIII) (Figura 2).

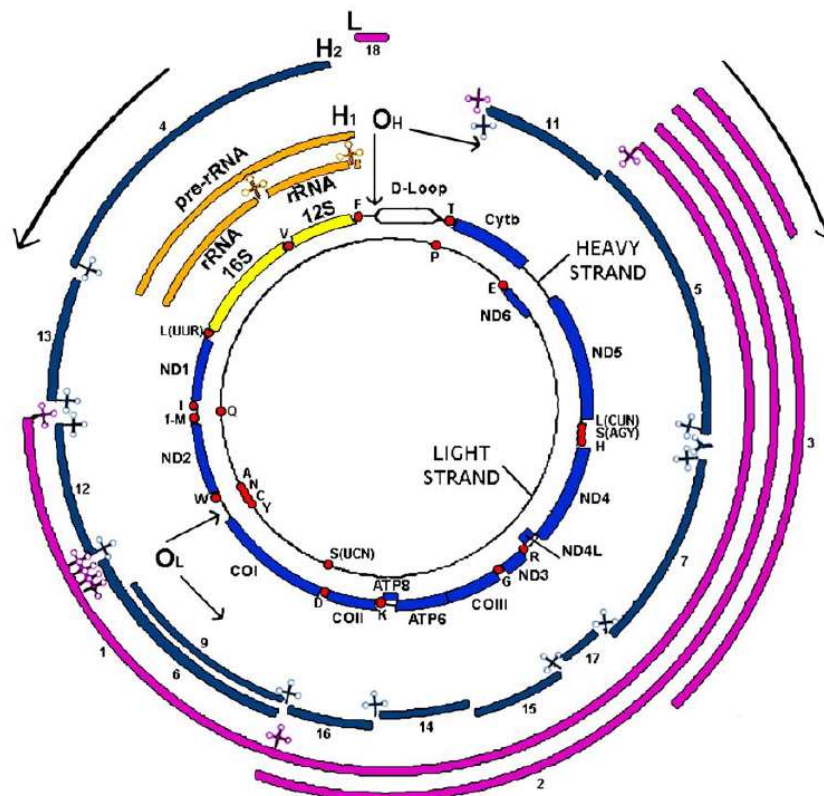


Figura 2. Mapa genético y de transcripción del DNA mitocondrial humano (Montoya, López-Pérez y Ruiz-Pesini, 2006). Las dos circunferencias interiores se corresponden con las cadenas ligera (*light strand*) y pesada (*heavy strand*) en las que se indican los genes para cuya transcripción sirven de molde. Los genes aparecen en amarillo (rRNAs), como puntos rojos (tRNAs, mostrados con la nomenclatura del aminoácido

que les corresponde) y en azul (genes codificantes de proteínas). Las circunferencias exteriores se corresponden con los transcritos procesados y sin procesar de la cadena pesada (naranjas a partir del promotor H₁ y azules a partir del promotor H₂) y ligera (rosas a partir del promotor L). Los diferentes transcritos poliadenilados que se obtienen entre ambas cadenas aparecen numerados (RNAs 4-17 de la cadena pesada y RNA 1, 2, 3 y 18 de la cadena ligera). O_H y O_L simbolizan el origen de replicación de la cadena pesada (sentido horario) y ligera (sentido antihorario), respectivamente, en base al modelo de desplazamiento de la hebra. H₁, H₂ y L indican los promotores y puntos de inicio de transcripción de la cadena pesada (H₁ y H₂, Sentido antihorario) y de la ligera (L, Sentido horario). La secuencia no codificante de 1,1 kb se localiza entre los tRNA^{Phe} (de la cadena pesada) y tRNA^{Pro} (de la cadena ligera) e incluye la región del bucle de desplazamiento (bucle-D o *D-loop*).

La existencia de promotores en ambas cadenas se debe a que tanto la cadena pesada como la ligera contienen información genética. Entre las dos la que tiene mayor información es la cadena ligera, pero en el campo de estudio de la transcripción del mtDNA la nomenclatura que predomina es la acuñada por Bibb *et al.* en 1981, según la cual la hebra codificante es la molde y no la que contiene la información y, por tanto, se dice que la principal hebra codificante del mtDNA es la cadena pesada (Shokolenko y Alexeyev, 2017). Tanto en una cadena como en otra la transcripción tiene lugar en tres etapas (iniciación, elongación y terminación), siendo las más estudiadas la iniciación y la terminación (Figura 5). La iniciación se produce mediante el complejo de iniciación (IC) que se encuentra formado por el factor de la transcripción mitocondrial A (TFAM), el factor de la transcripción mitocondrial B2 (TFB2M) y la RNA polimerasa mitocondrial (POLRMT en humanos). Primero TFAM reconoce y se une a los promotores, después recluta a POLRMT, formándose el complejo de pre-iniciación (pre-IC), y, finalmente, se une TFB2M al pre-IC, que finaliza la síntesis del IC, favorece la hibridación con el promotor correspondiente, participa en la apertura del DNA y recluta los primeros nucleótidos para la POLRMT. Como resultado se inicia la síntesis de RNA (Hillen, Morozov, Sarfallah, Temiakov y Cramer, 2017; Montoya *et al.*, 2006; Shokolenko y Alexeyev, 2017). Por su parte, el mecanismo de terminación de la transcripción iniciada en los promotores H₂ y L se desconoce, pero no así en H₁, cuya transcripción finaliza en el extremo 3' del rRNA 16S, antes del tRNA^{Leu} (Figura 2). El factor de terminación de la transcripción mitocondrial (MTERF1, también conocido como mTERF) es la proteína implicada en este proceso y aparentemente se trata de la única de las encontradas de dicha familia (MTERF1, MTERF2, MTERF3 y MTERF4) en participar en la terminación de la transcripción *in vivo* (Linder *et al.*, 2005).

La transcripción desde cualquiera de los tres promotores indicados da lugar a la generación de fragmentos policistrónicos que deben procesarse posteriormente para la obtención de los transcritos individuales. Según el modelo de puntuación, los tRNAs actúan como señales de reconocimiento (señales de puntuación) para las enzimas implicadas en el procesamiento, que realizan cortes endonucleotídicos precisos antes y después de las secuencias de los tRNAs sintetizados, obteniéndose los transcritos individuales (Ojala, Montoya y Attardi, 1981)¹. Como resultado, a partir de H₁ se generan los 2 rRNAs (rRNA 12S y 16S) y su precursor; a partir de H₂ 14 RNAs (RNA 4-17) de los 18 RNAs con colas de poliA en su extremo 3', la mayoría de los cuales se corresponden con mRNAs maduros, con excepción de los RNA 7 y RNA 14; y a partir de L los tres poliA mayores (RNAs 1, 2 y 3) y el menor poliA (RNA 18) (Figura

¹ Existen excepciones al modelo, como es el caso del RNA 7 y el RNA 14 que contienen de forma solapada los marcos abiertos de lectura de los genes ND4 y 4L, por un lado, y ATP6 y 8, por otro, respectivamente.

2). Los tRNAs se generan a partir de los tres promotores. Sin embargo, no todos los transcritos señalados se sintetizan en la misma cantidad, puesto que la actividad de los promotores difiere: el 80% de los transcritos mitocondriales puede atribuirse a la actividad del promotor H₁, el 9% al H₂ y 11% restante al promotor L. A ello se le suma que los transcritos de la cadena pesada son más estables que los de la ligera y que el mRNA de *ND6* es el único sintetizado a partir de la cadena ligera, no se poliadenila y es 10 veces menos abundante que los mRNAs de *CO1* y *CO2* (Mercer et al., 2011). Por tanto, es evidente que es necesaria la existencia de una maquinaria que regule la transcripción del mtDNA y mantenga así los niveles adecuados de cada transcrito para la síntesis del sistema OXPHOS. Esta regulación puede realizarse a nivel de la transcripción del RNA, de forma post-transcripcional, traduccional, post-traduccional y en el ensamblaje de complejos (Shokolenko y Alexeyev, 2017).

Actualmente no se conoce demasiado sobre la regulación de la transcripción, si bien existen trabajos que han propuesto diferentes mecanismos y puntos de regulación de la misma. En primer lugar, se ha visto que TFAM modula la transcripción según los niveles en que se encuentra, existiendo más actividad de los promotores H₂ y L a concentraciones bajas y moderadas de TFAM, respectivamente, y de H₁ a altas concentraciones (Lodeiro et al., 2012). En segundo lugar, la concentración de ATP también afecta a la actividad de los promotores H₁ y L, estimulándose la de ambos a 100 μM y suprimiéndose la de H₁ a concentraciones más elevadas de ATP, lo que se ha propuesto que es un mecanismo indirecto de regulación de la traducción, ya que a altos niveles de ATP la demanda energética es menor, no se requiere síntesis de las subunidades del sistema OXPHOS y, por tanto, tampoco rRNAs (Zollo, Tiranti y Sondheimer, 2012). En tercer lugar, se encuentra MTERF1 que se activa al fosforilarse y no sólo contribuye a la terminación de la transcripción de H₁, sino que además regula positivamente a H₁. Esto lo consigue interactuando tanto por encima del tRNA^{Leu} como de H₁, lo que se ha propuesto que lleva a cabo gracias a la formación de un bucle del mtDNA por el que resultan enfrentadas ambas regiones con las que interactúa (Montoya et al., 2006; Prieto-Martín, Montoya y Martínez-Azorín, 2004). En cuarto lugar y último lugar, la propia vida media de los RNAs, que se ha relacionado con la extensión de las colas de poliA, así como la actuación de un complejo llamado degradosoma en organismos eucariotas como *S. cerevisiae* (y cuya búsqueda de homólogos en humanos continúa) que participa tanto en la degradación de moléculas aberrantes como maduras, controlando así los niveles de abundancia de los transcritos mitocondriales (Shokolenko y Alexeyev, 2017).

Para finalizar, cabe destacar que POLRMT es incapaz de iniciar la transcripción de un DNA de doble cadena sin TFAM y TFB2M (Fukuoh et al., 2009) y que carece de la procesividad necesaria para poder llevar a cabo la síntesis de los transcritos policistrónicos tan largos que se obtienen en la transcripción del mtDNA (Agaronyan, Morozov, Anikin y Temiakov, 2015). Por tanto, para que tenga lugar la transcripción es necesaria la existencia de una proteína que aumente la procesividad de POLRMT. Dicho factor se ha descubierto de forma relativamente reciente en humanos y recibe el nombre de factor de elongación de la transcripción mitocondrial o TEFM (Minczuk et al., 2011; Posse, Shahzad, Falkenberg, Hällberg y Gustafsson, 2015).

2.3 Replicación del mtDNA, TEFM y la elongación de la transcripción del mtDNA

La transcripción del mtDNA no sólo es importante para la síntesis de los transcritos necesarios para la biosíntesis de las subunidades del sistema OXPHOS, sino también para la replicación del mtDNA. Según el modelo de desplazamiento de la horquilla, el más aceptado para explicar la replicación del mtDNA, la transcripción y replicación del genoma mitocondrial se encuentran conectadas por medio de la transcripción de la hebra ligera que, al terminar de forma prematura, da lugar a la formación de un *primer* que es empleado por la DNA polimerasa mitocondrial (DNA polimerasa γ) para iniciar la replicación de la hebra pesada a partir del origen O_H (Figura 2). Posteriormente, al llegar al origen de replicación O_L la replicación de la cadena pesada continúa y comienza la replicación de la cadena ligera en sentido contrario, dando lugar así a una replicación unidireccional y asimétrica (Montoya, 2005; Montoya et al., 2006).

La terminación prematura de la transcripción de la cadena ligera se produce como consecuencia de una desestabilización del IC por parte de una secuencia rica en guaninas codificada por la CSBII, situada dentro de la región del bucle-D (*D-loop*) de la secuencia no codificante del mtDNA de 1,1 kb y cerca de O_H (Figuras 2 y 3). Esta secuencia rica en guaninas se caracteriza por estar formada por una región que se pliega adoptando una estructura secundaria de G-quadruplex en tres capas, que interacciona con el complejo de elongación (EC)² y es el responsable de su desestabilización, un espaciador de 8 bp y una secuencia final de 9 bp rica en AU que forma un híbrido RNA-DNA con el mtDNA y en la que ocurre la terminación prematura (Figura 3) (Agaronyan et al., 2015; Mukundan y Phan, 2013; Wanrooij et al., 2012). La región que adopta la conformación en G-quadruplex se ha visto que es altamente polimórfica y, en general, a mayor contenido en G mayor eficacia de la terminación prematura de la transcripción. Por su parte, el espaciador no parece ser funcionalmente importante, mientras que si se sustituye la secuencia rica en AU por GC no se observa terminación en el punto habitual. Todo ello sugiere que para que ocurra la terminación prematura es importante tanto la fuerza del G-quadruplex como la interacción débil entre el RNA naciente y el mtDNA (Agaronyan et al., 2015; Hillen, Parshin et al., 2017; Tan, Wellesley, Savery y Szczelkun, 2016).

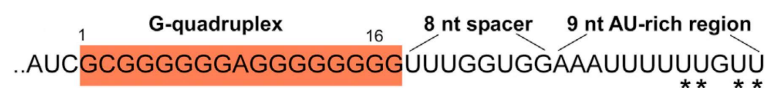


Figura 3. Esquema del transcrito codificado por la CSBII del mtDNA humano (Hillen, Parshin et al., 2017). La región que constituye el G-quadruplex (G6AG8) se encuentra resaltada en rojo. Los asteriscos indican los puntos de terminación prematura de la transcripción de la cadena ligera.

De forma relativamente reciente, se ha descubierto el factor de elongación de la transcripción mitocondrial o TEFM (c17orf42), una proteína hidrofílica localizada en la matriz mitocondrial y codificada por el gen nuclear *TEFM*, que impide la terminación de la transcripción prematura, actuando así como un anti-terminador, aumenta la procesividad de POLRMT e incrementa la capacidad de POLRMT de continuar con la síntesis de RNA cuando ésta introduce un apareamiento de bases incorrecto al transcribir. Todo ello sitúa a TEFM como una molécula fundamental en la elongación de la transcripción del mtDNA y el principal regulador en la

² El complejo de iniciación (IC) está formado por mtDNA, TFAM, TFB2M y POLRMT. El complejo de elongación (EC) por mtDNA, híbrido DNA-DNA y POLRMT. El complejo de anti-terminación por EC y TEFM.

conexión existente entre la transcripción y la replicación del mtDNA (Agaronyan et al., 2015; Hillen, Parshin et al., 2017; Minczuk et al., 2011; Posse et al., 2015; Sultana, Solotchi, Ramachandran, Patel y Wek, 2017). Estructuralmente, TEFM se caracteriza por ser una proteína formada por 360 aminoácidos y dividida en tres dominios estructurales: dominio N-terminal, inter-dominio enlazante y dominio C-terminal (Figura 4).

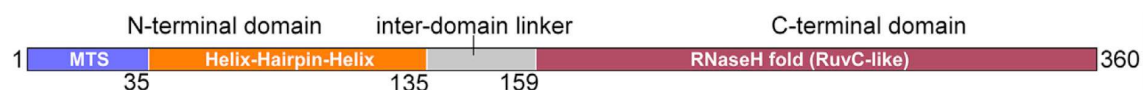


Figura 4. Representación esquemática del TEFM humano (Hillen, Parshin et al., 2017). Los dominios están identificados en base a predicciones basadas en homología de secuencia y se encuentran en diferentes colores: péptido señal de localización mitocondrial (MTS) en azul, dominio N-terminal en naranja, inter-dominio enlazante en gris y dominio C-terminal en frambuesa. Se muestran numerados los residuos de la proteína que abarca cada uno de los dominios.

El dominio C-terminal de TEFM se caracteriza por interactuar con el C-terminal de otra molécula de TEFM, constituyendo un homodímero funcional (Hillen, Parshin et al., 2017), por interactuar con el dominio catalítico de POLRMT y por adquirir un plegamiento similar al característico de la superfamilia de enzimas RNaseH-like y, en concreto, de la enzima RuvC, resolvasa que elimina las uniones de tipo Holliday que se forman durante la recombinación del DNA bacteriano (Majorek et al., 2014; Wyatt y West, 2014). Los sitios con actividad nucleasa del dominio C-terminal están degenerados, por lo que carece de actividad funcional como resolvasa, pero es el responsable junto al inter-dominio enlazante de la actividad anti-terminadora de TEFM y de su interacción con el RNA naciente (Agaronyan et al., 2015). En este sentido, se ha observado por modelado estructural que la desestabilización del EC por parte del G-quadruplex podría ocurrir por una interacción de este con la POLRMT y que lo que haría TEFM sería ocupar dichos dominios de interacción de la POLRMT, generando así un efecto alostérico por el que el G-quadruplex no podría entrar en contacto con POLRMT. Por su parte, el dominio N-terminal es una característica particular del TEFM humano, ya que no existe un dominio similar en otras resolvasas de uniones de tipo Holliday bacterianas o mitocondriales. Este dominio adopta una estructura de hélice-giro-hélice típicamente relacionada con la interacción de proteínas al DNA, de modo que podría constituir los puntos de interacción con el mtDNA junto al inter-dominio enlazante, aunque aparentemente de forma más débil. La interacción entre TEFM y el mtDNA favorece que este último cambie de conformación y se forme una abrazadera de DNA (del inglés *DNA clamp* o *sliding clamp*), responsable de incrementar la procesividad de POLRMT (Hillen, Parshin et al., 2017). Así, TEFM estabilizaría al EC evitando la desestabilización del mismo por parte del G-quadruplex, por un lado, y mediante la formación de la abrazadera de DNA y su interacción con POLRMT, por otro, contribuyendo mediante ambos mecanismos a la elongación de la transcripción de la cadena ligera y mediante el segundo mecanismo a la elongación de la transcripción de la cadena pesada.

Por todo ello, se propone que TEFM es el principal regulador de la transición entre la transcripción y la replicación mitocondrial (Agaronyan et al., 2015). En ausencia de TEFM, la transcripción de la cadena ligera termina de forma prematura en la CSBII, dando lugar a la formación de un *primer* utilizado para comenzar la replicación del mtDNA. En cambio, en presencia de TEFM se produciría la transición entre el IC y el EC, se estabilizaría el complejo de

elongación y se aumentaría la procesividad de POLRMT, promoviendo así la elongación de la transcripción tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada hasta la terminación de las mismas, en la que POLRMT se separaría del mtDNA y de TEFM (Figura 5). Cabe destacar que el sitio de POLRMT con el que interactúa TFB2M es ocupado por el mtDNA y TEFM en el complejo de anti-terminación, lo que lleva a afirmar que entre la iniciación y la elongación existe un reposicionamiento del DNA y que TFB2M y TEFM son mutuamente excluyentes, de manera que TFB2M debe salir del complejo antes de que TEFM pueda entrar (Hillen, Morozov et al., 2017).

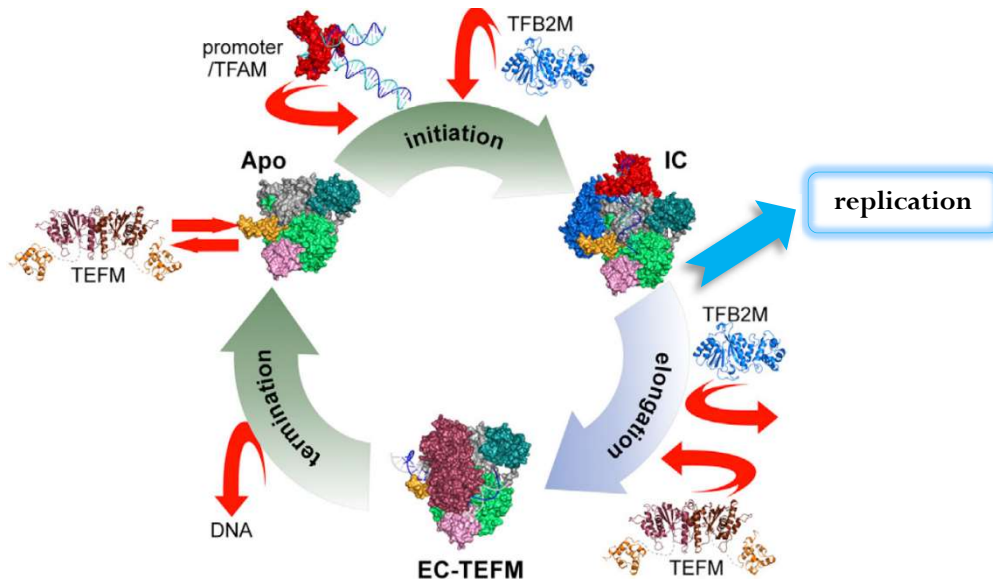


Figura 5. Esquema del ciclo de la transcripción del mtDNA humano (Hillen, Parshin et al., 2017). Durante la iniciación, POLRMT es reclutada a los promotores mediante interacciones con TFAM, formándose el pre-IC. Posteriormente, se une TFB2M a este pre-IC para dar lugar al IC, que, en el caso de la cadena ligera, transcribe el mtDNA desde L hasta el final de la CSBII. A continuación, ocurre un punto de inflexión en el que en ausencia de TEFM se promueve la replicación del mtDNA, pero en presencia del mismo tiene lugar la salida de TFB2M del complejo y consecuentemente la entrada de TEFM, iniciándose la elongación de la transcripción. Al final en la terminación POLRMT se separa del mtDNA y, en consecuencia, TEFM sale del complejo. El proceso para la cadena pesada sería el mismo que el descrito, con excepción de no producirse un punto de inflexión en CSBII por transcribirse en sentido contrario.

2.4 Enfermedades mitocondriales

Las enfermedades mitocondriales son un grupo de patologías clínicas y genéticamente heterogéneas que comparten como identidad molecular un defecto en la síntesis de ATP por fallo directo o indirecto del sistema OXPHOS. Se caracterizan por encontrarse entre las más comunes dentro de los errores innatos del metabolismo (prevalencia 1:5000 nacidos vivos) y ser enfermedades complejas por su doble origen genético, ya que pueden estar generadas tanto por mutaciones en cualquiera de los 37 genes contenidos en el mtDNA como en genes del nDNA que codifican para proteínas mitocondriales (proteínas que participan en el ensamblaje de los complejos respiratorios, proteínas transportadoras que permiten el importe de otras a la mitocondria, proteínas que intervienen en la replicación y la transcripción del mtDNA, etc). A menudo se manifiestan como enfermedades multisistémicas y son patologías en las que una misma mutación puede llevar a diferentes fenotipos o unos mismos síntomas pueden estar

causados por diferentes mutaciones. Por ello, la manera más habitual de clasificarlas es mediante un parámetro objetivo, como es el genético, esto es, clasificar las patologías en base a las mutaciones que las causan. En este sentido, toda nueva mutación hallada debe ser estudiada para determinar si realmente es patológica, cumpliendo criterios como que se encuentre presente sólo en pacientes y no en individuos controles, que afecte a una base muy conservada evolutivamente o que afecte a dominios funcionales importantes ([El-hattab et al., 2017](#); [Esterhuizen, van der Westhuizen y Louw, 2017](#); [Montoya, 2005](#)).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El paciente 3304 (adolescente de 14 años) estudiado en el presente trabajo se caracteriza por presentar déficit serotoninérgico y disfunción hipotalámica, esto es, insuficientes niveles de serotonina y alteraciones de la función del eje hipotálamo-hipofisiario. Esta última es posible que sea una consecuencia del déficit serotoninérgico, ya que la serotonina es una de las hormonas que regulan a dicho eje (Dinan, 1996; Heisler et al., 2007) y el paciente responde favorablemente a la suplementación con 5-hidroxitriptófano, un precursor de la síntesis de serotonina.

Por otra parte, de forma previa al presente trabajo se analizó el exoma del paciente y sólo se detectó una mutación *de novo*, es decir, no presente en los progenitores, en el gen nuclear *TEFM*, codificante para la proteína TEFM o factor de elongación de la transcripción mitocondrial. En concreto, se encontró la mutación c.1036C>T (cambio de C por T en la posición 1036 de la secuencia codificante del gen) en heterocigosis. Este cambio provoca que el codón CAA, codificante para la Q346, pase a ser el codón de parada TAA y, por tanto, ocurra una terminación de la traducción prematura con pérdida de los 15 últimos residuos del C-terminal (Figura S1). La mutación detectada en el paciente se caracteriza por no haberse descrito hasta el momento, según la base de datos de exomas secuenciados ExAC (Figura S2). Por tanto, podría ser que dicha mutación llevase a un fallo en el sistema OXPHOS que a su vez provocase una alteración en los niveles de serotonina, tal y como se ha descrito en otras patologías mitocondriales con otros metabolitos no directamente relacionados con la función mitocondrial (Esterhuizen et al., 2017; Thompson Legault et al., 2015).

En base a lo anterior, se estableció el principal objetivo de este trabajo que consiste en determinar si la mutación c.1036C>T en el gen *TEFM* es la responsable de patología que padece el paciente 3304. Para ello se plantearon una serie de objetivos parciales:

- I. Estudiar bioinformáticamente el carácter patológico de la mutación³.
- II. Confirmar la mutación obtenida previamente por secuenciación de exomas y caracterizar el DNA mitocondrial del paciente.
- III. Analizar los niveles de producción de ATP mitocondrial, los niveles de transcritos de genes mitocondriales, los niveles de TEFM y subunidades de los complejos respiratorios y la formación de complejos y supercomplejos respiratorios en células control y en células del paciente.
- IV. Aplicar complementación genética para valorar la recuperación de la función mitocondrial en células del paciente a nivel de transcripción, cantidad de proteína y formación de complejos y supercomplejos respiratorios mitocondriales.

³ En clínica una mutación no tiene por qué ser patológica, sino que sólo informa de que la frecuencia del cambio con respecto al genoma de referencia es menor del 1% en la población estudiada. Si la frecuencia fuera mayor del 1% entonces la variación detectada se trataría de un polimorfismo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Reactivos y kits comerciales

Todos los reactivos usados en el presente trabajo fueron de grado analítico o de grado apto para biología molecular y, en su caso, válidos para el crecimiento celular ([Tabla 1](#)).

Tabla 1. Material básico del presente TFM

Reactivo/kit comercial	Utilidad	Casa/marca comercial
TRIzol® Reagent	Extracción de RNA total	Invitrogen™
DNase I Amplification Grade	Eliminación de DNA	Invitrogen™
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Síntesis de cDNA monocatenario	Roche
Phusion Hot Start II DNA polymerase	Amplificación y obtención de cDNA bicatenario	Thermo Fisher Scientific
Low DNA Mass Ladder	Marcador de electroforesis horizontal en gel de agarosa	Life Technologies™
Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer	Amplificación de mtDNA	Thermo Fisher Scientific
EmeraldAMP® GT PCR Master Mix	Amplificación de fragmentos de mtDNA	Takara
DNA Molecular Weight Marker II	Marcador de electroforesis horizontal en gel de agarosa	Roche
<i>illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit de</i>	Purificación de producto de PCR	GE Healthcare
ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent	Purificación de producto de PCR	Applied Biosystems™
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Cuantificación de la amplificación de cDNA por qPCR	Roche
TaqMan™ RNA-to-C _T ™ 1-Step kit	Retrotranscripción y cuantificación de transcritos mitocondriales	Applied Biosystems™
Bradford Protein Assay	Cuantificación de proteínas	Bio-Rad
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Marcador de electroforesis SDS-PAGE	Bio-Rad
NativeMark™ Unstained Protein Standard	Marcador de electroforesis BN-PAGE	Life Technologies™
NativePAGE™ 3-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 10-well	Geles para electroforesis BN-PAGE	Invitrogen™
Amersham™ Hybond™ PVDF Membranes	Electrotransferencia de proteínas	GE Healthcare
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Revelado de anticuerpos	Thermo Fisher Scientific
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Medida de niveles de ATP	Promega
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Medida de la viabilidad celular	Promega

4.2 Cultivos celulares

4.2.1 Líneas celulares

Todas las células utilizadas durante el presente trabajo fueron fibroblastos de las siguientes líneas celulares:

- **Ci**: Fibroblastos control inmortalizados procedentes de un bebé sano con 1 mes de edad.
- **Ci^{TEFM(3)}**: Fibroblastos control inmortalizados procedentes de un bebé sano con 1 mes de edad y transducidos con 3 μ l de vector lentiviral con *TEFM* wt clonado.
- **Ci^{TEFM(50)}**: Fibroblastos control inmortalizados procedentes de un bebé sano con 1 mes de edad y transducidos con 50 μ l de vector lentiviral con *TEFM* wt clonado.
- **P**: Fibroblastos procedentes del paciente 3304 con la mutación c.1036C>T en *TEFM*.
- **P^{TEFM(3)}**: Fibroblastos procedentes del paciente 3304 con la mutación c.1036C>T en *TEFM* y transducidos con 3 μ l de vector lentiviral con *TEFM* wt clonado.
- **P^{TEFM(50)}**: Fibroblastos procedentes del paciente 3304 con la mutación c.1036C>T en *TEFM* y transducidos con 50 μ l de vector lentiviral con *TEFM* wt clonado.

4.2.2 Mantenimiento celular y recogida de pellets

El trabajo con cultivos celulares se llevó a cabo en un cuarto específico para dicha manipulación, equipado con campanas de flujo laminar, que permiten mantener las muestras en condiciones de esterilidad, y con microscopio invertido para observar el estado de las células. La superficie de trabajo de dichas campanas y los instrumentos utilizados fueron esterilizados previamente con luz UV y etanol al 70%. Los medios para cultivar, lavar, tripsinizar y centrifugar las células se precalentaron a 37 °C en un baño de agua. Los medios utilizados fueron succionados mediante una bomba de vacío, así como tratados con lejía al 20% tras cada uso y al finalizar cada sesión de trabajo, y todo el material en contacto directo con cultivos celulares fue desechado en los contenedores apropiados para ser procesado por empresas especializadas.

Todas las líneas celulares empleadas fueron fibroblastos, células adherentes que crecen en monocapa. El medio de cultivo utilizado fue el DMEM de Gibco® (con glucosa 4,5 g/l, piruvato de sodio 1 mM y L-Glutamina 584 mg/l, entre otros) completo, esto es, suplementado al 10% con SFB para favorecer el crecimiento celular. Los cultivos se mantuvieron durante su crecimiento en placas de Petri de 100 mm de diámetro (introducidas en un incubador a 37 °C, en atmósfera húmeda y al 5% de CO₂) y renovando el medio periódicamente cada 2-3 días con 12 ml de medio DMEM completo. Posteriormente, cuando las células alcanzaron la confluencia se procedió a su subcultivo mediante tripsinización, esto es, uso de la enzima tripsina para romper las interacciones proteicas que mantienen unidos a los fibroblastos entre sí y a la superficie de la placa. Para ello, se retiró el medio de cultivo por succión, se realizaron dos lavados de las células con 5 ml de PBS de Gibco® (para retirar las antitripsinas del SFB), se añadieron 700 μ l de solución de tripsina por placa (mezcla de PBS al 0,05% en tripsina y al 0,02% en EDTA, utilizado este último para favorecer la desestabilización de las membranas celulares por su acción quelante de iones divalentes), se incubaron 2-3 minutos a 37 °C para favorecer la acción de la tripsina, se comprobó que las células se hubiesen despegado por observación al microscopio invertido y se añadieron 4 ml de medio DMEM completo para parar la acción de la

tripsina. Finalmente, se homogeneizaron las células y se distribuyeron a nuevas placas con 8-10 ml de medio DMEM completo añadido previamente.

Para la recogida de pellets se tripsinizó, se paró la acción de la tripsina con 4 ml de medio DMEM completo y, tras homogeneizar, todo el contenido de las placas se trasladó a tubos Falcon de 15 ml. Se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm, se retiró el medio, se lavaron los pellets celulares resuspendiéndolos en 1 ml de PBS frío cada uno, se trasladaron a tubos eppendorf, se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm, se aspiró el PBS y se guardaron los pellets a -80 °C.

4.2.3 Congelación y descongelación celular

Las células a congelar se dejaron crecer hasta alcanzar un 70-80% de confluencia, se tripsinizaron y se recogieron por centrifugación. Cada pellet celular obtenido se resuspendió en 675 µl de medio DMEM completo frío, se introdujo en un criotubo con 75 µl de DMSO, solvente orgánico que actúa como agente criopreservante, y se almacenó junto a otros criotubos con pellets celulares a -80 °C en un soporte de congelación con 250 ml de isopropanol para favorecer una congelación paulatina y uniforme (descenso de aproximadamente 1 °C/min en dichos soportes). Después de al menos 24 horas los criotubos fueron almacenados en cajas convencionales a -80 °C hasta su uso posterior.

Por su parte, la descongelación de los criotubos almacenados se realizó con la mayor rapidez posible por ser el DMSO tóxico a temperatura ambiente (TA). Las células congeladas se diluyeron con medio DMEM completo fresco para diluir el DMSO y se sembraron en placas de Petri de 100 mm hasta el día siguiente, en que se cambió de medio a las células para eliminar definitivamente el DMSO y poder continuar con el mantenimiento de los cultivos celulares.

4.2.4 Medida de los niveles de ATP mitocondrial

Cada una de las líneas celulares seleccionadas para la medida de los niveles de ATP mitocondrial se sembraron en 12 pocillos de una placa de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 200 µl a partir de diluciones iniciales realizadas de cada línea celular (100.000 células/ml en medio DMEM completo), obteniéndose así una densidad de 20.000 fibroblastos por pocillo. Las células se sembraron mediante pipeta multicanal para reducir el error de pipeteo que pudiera provocar diferencias de densidad entre pocillos y, con el mismo objetivo, 6 de los 12 pocillos de cada línea celular fueron destinados a valorar la viabilidad celular y así referir los resultados finales de ATP al número real de células sembradas y viables por pocillo. Después de 10-14 horas, se realizaron dos lavados con PBS de todos los pocillos y se añadieron 100 µl de dos tipos de medios de cultivo a los pocillos, según estuvieran destinados a medir la cantidad de ATP mitocondrial o la viabilidad celular (Tabla 2), y se dejaron incubando 2 h a 37 °C y 5% de CO₂.

Tabla 2. Medios de cultivo para valorar los niveles de ATP mitocondrial y el número de células viables

Reactivo	Niveles de ATP mitocondrial	Número de células viables
Medio de cultivo	DMEM <i>free</i> *	DMEM <i>free</i> *
Piruvato	1 mM	1 mM
2-deoxi-glucosa*	5 mM	-
CellTiter-Blue®**	-	20 µl

*DMEM *free* es medio DMEM sin SFB y sin glucosa. Utilizar un medio que posee piruvato, pero no glucosa, provoca que las células no puedan llevar a cabo la glucólisis y todo el ATP sintetizado y, posteriormente detectado, sea procedente del sistema OXPHOS (ATP mitocondrial). Este hecho se ve incentivado por la adición de 2-deoxi-glucosa, molécula que al encontrarse en exceso en el medio es captada por las enzimas glucolíticas en lugar de la glucosa y, al no poder ser degradada por poseer un grupo deoxi-, dichas enzimas quedan inhibidas y no se produce ATP por medio de la glucólisis.

**Reactivo de Promega (Tabla 1) que permite estimar por fluorescencia el número de células viables presentes en los pocillos, ya que la señal emitida depende de la capacidad metabólica de las células viables de reducir dicho reactivo.

Una vez finalizada la incubación, se midió la señal de fluorescencia en los pocillos usados para la estimación del número de células viables mediante el lector de placas NovoStar MBG de Labtech. Posteriormente, en los pocillos destinados al estudio de los niveles de ATP mitocondrial se añadió 1 volumen de la solución luciferina/luciferasa (preparada según las indicaciones presentes en el kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay de Promega), se agitó la placa durante 1-2 minutos para favorecer el lisado celular, se incubó la placa a TA durante 15 minutos para estabilizar la señal y se tomaron las medidas de luminiscencia en el mismo lector de placas anterior. Los resultados se expresaron como cantidad de ATP mitocondrial por célula viable.

4.3 Técnicas de manipulación de RNA

4.3.1 Extracción de RNA total con TRIzol®

La extracción del RNA total de las diferentes muestras se realizó en condiciones de esterilidad y mediante el reactivo TRIzol®, solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidinio que mantiene la integridad del RNA y permite purificarlo del resto de componentes celulares (a los que rompe y disuelve). Para ello primero se añadieron y mezclaron 500 µl de TRIzol® a cada uno de los pellets celulares, se dejaron reaccionar 5 minutos a TA y se añadieron 100 µl de cloroformo para generar una bifase de extracción, con posterior agitación vigorosa, incubación 3 minutos a TA y centrifugación 15 minutos 12000 g a 4 °C. Obtenida la bifase se recogió todo el volumen disponible de la fase acuosa y se precipitó el RNA total añadiendo 250 µl de isopropanol frío. A continuación, se incubaron las muestras 10 minutos a TA, se centrifugaron 10 minutos 12000 rcf a 4 °C y se eliminó el sobrenadante para realizar un lavado con 500 µl de etanol al 75%. Posteriormente, se mezclaron las muestras por inversión, se centrifugaron 5 minutos 7500 rcf a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Finalmente, los pellets de RNA obtenidos se dejaron secar al aire y TA (protegidos). Una vez secos, se añadieron distintos volúmenes de H₂O Gibco® a cada muestra en función de la cantidad de pellet obtenida con objeto de alcanzar una concentración similar de RNA total extraído en todas ellas. Finalmente, se incubaron los pellets en un thermoblock a 55 °C con agitación de 450 rpm durante 10 minutos para favorecer la disolución del RNA.

4.3.2 Eliminación de trazas de DNA con DNasa I

El tratamiento con DNasa I, endonucleasa que degrada tanto DNA monocatenario como bicatenario, se realizó con objeto de asegurar una mayor pureza de RNA en las muestras de RNA total y evitar así amplificadores inespecíficos como resultado de la hibridación de los *primers* con moléculas de DNA en lugar de con los transcritos de interés. Este paso extra de pureza al tratamiento con TRIzol® resulta especialmente relevante a la hora de cuantificar transcritos

mitocondriales por carecer el mtDNA de intrones y haber de media más de 1.000 copias de mtDNA por célula (Montoya, López-Pérez y Ruiz-Pesini, 2006).

En primer lugar, se cuantificó por espectrofotometría el RNA total extraído y en base a los resultados se calculó la cantidad de muestra y de H₂O libre de RNasas (RNasas inactivadas con DEPC) a añadir por tubo de reacción para un volumen de 8 µl. Posteriormente, se añadió 1 µl del buffer 10 X del kit DNase I Amplification Grade (Tabla 1) y 1 µl de DNasa I, obteniéndose así un volumen final de reacción de 10 µl, y se incubaron los tubos 10 minutos a TA para que tuviera lugar la reacción de degradación del DNA. Finalmente, se añadió 1 ul de EDTA (25 mM) a todos los tubos para parar la reacción por medio de la quelación de iones divalentes, necesarios para la actuación de la DNasa I, y se incubaron las muestras 10 minutos a 65 °C.

4.3.3 Cuantificación de RNA total por espectrofotometría

Para determinar la concentración y pureza del RNA total aislado se empleó un espectrofotómetro NanoVue™, depositando 2 µl en el pedestal del equipo para cada medida y teniendo presentes los criterios de pureza basados en relaciones de absorbancia A₂₆₀/A₂₈₀ (valor en torno 2 es indicativo de muestra pura para RNA y en torno a 1,8 para DNA) y A₂₆₀/A₂₃₀ (debe ser en torno a 2,2). Realizadas las medidas las muestras se almacenaron a -80 °C.

4.3.4 Retrotranscripción del mRNA por RT-PCR

A partir de la solución de RNA total se realizó la retrotranscripción de los mRNAs maduros con cola de poliA en su extremo 3' a cDNA monocatenario mediante RT-PCR, utilizando como *primer* un oligo(dT)₁₈. Para ello se preparó una mezcla inicial de reactivos con las muestras de RNA total, el oligo(dT)₁₈ y H₂O Gibco® (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Reactivos para síntesis de cDNA monocatenario (I)

Reactivo	Cantidad (µg/µl)
RNA total	1 µg
Oligo(dT) ₁₈	1 µl
H ₂ O Gibco®	Hasta 13 µl

Posteriormente, las muestras se desnaturalizaron 10 minutos a 65 °C en termociclador para eliminar las posibles estructuras secundarias presentes en los mRNAs que pudieran afectar a la retrotranscripción. Después se añadieron los segundos reactivos necesarios hasta un volumen final de 20 µl para cada tubo (Tabla 3.2) y se introdujeron las preparaciones en el termociclador para realizar la RT-PCR a 50 °C durante 30 minutos (tiempo escogido por tener el transcrito de interés un tamaño menor a 4 kb), después 5 minutos a 85 °C para inactivar a la retrotranscriptasa y, finalmente, a 4 °C indefinidamente. Por último, los cDNA monocatenarios sintetizados se almacenaron a -80 °C.

Tabla 3.2. Reactivos para síntesis de cDNA monocatenario (II)

Reactivo	Concentración stock	Volumen (µl)	Concentración final
Tampón	x5	4	x1
Inhibidor de RNasas	-	0,5	-
dNTPs	10 mM	2	1 mM

Retrotranscriptasa	-	0,5	-
Volumen final	-	20	-

4.3.5 Análisis de expresión por qPCR (SYBR Green)

La presente técnica es una variante de la PCR convencional que permite cuantificar los productos de PCR. Se llevó a cabo en el termociclador con espectrofluorímetro LightCycler® 2.0 de Roche, que cuenta con un carrusel en que se introducen capilares, cada uno de ellos con una muestra. Además, previamente a su uso se realizó la validación de la eficacia de los *primers* utilizados (Tabla 5) siguiendo las indicaciones del manual *Real-time PCR: understanding Ct* ofrecido por Applied Biosystems. Una vez validados, lo primero que se hizo fue preparar las mezclas de los reactivos necesarios (Tabla 4), teniendo en cuenta que el volumen final para cada capilar debía ser de 10 µl (9 µl de la mezcla de reactivos y 1 µl de cada muestra de cDNA monocatenario) y trabajando a baja luz para evitar dañar el SYBR Green (por su naturaleza fluorescente), así como en condiciones de asepsia en campana de flujo laminar para evitar contaminaciones que dieran lugar a amplificadores inespecíficos.

Tabla 4. Reactivos para la realización de la qPCR

Reactivo	Volumen (µl)
SYBR Green*	2
<i>Primers</i> (Tabla 5)	0,5
H ₂ O (RNasa free)	6,5
Volumen final	9

*Contiene el resto de componentes necesarios para el correcto funcionamiento de la qPCR (DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y tampón) y el propio SYBR Green, marcador fluorescente sensible y afín al dsDNA y, por tanto, útil para determinar por análisis de fluorimetría la cantidad de una determinada secuencia de DNA amplificada en cada ciclo (en caso de estar presente).

Tabla 5. *Primers* utilizados para la qPCR con SYBR Green

	Primer directo (5'→3')	Primer reverso (5'→3')	T _m (°C)
TEFM	ATGAGCGGGTCTGCCTCT	TAAGGCCAGTACAGGGATG	59
ACTB	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	59

De cada una de las muestras analizadas se estudió un replicado biológico (n=2) y se aplicó como mínimo un duplicado técnico, normalizando en todos los casos los datos obtenidos con respecto al gen de la β-actina (*ACTB*), gen constitutivo o *housekeeping* empleado como control interno para validar la técnica, cuantificar los niveles de transcritos de interés presentes y poder comparar la expresión entre las distintas líneas celulares. Además, se aplicaron controles negativos como evaluación de posibles contaminaciones.

Una vez preparadas las mezclas de reacción, distribuidas por los capilares oportunos y añadidas las diferentes muestras de cDNA, los capilares se centrifugaron 1300 g durante 1 minuto para bajar las muestras. Después los capilares se dispusieron en el carrusel, éste se introdujo en el termociclador y se amplificaron las muestras siguiendo un programa estándar de qPCR: desnaturalización inicial a 95 °C (10 minutos) seguida de 50 ciclos de amplificación

(desnaturalización a 95 °C 10 segundos, hibridación a 58 °C 10 segundos y extensión a 72 °C 10 segundos). Finalmente, de cada producto de la reacción se valoró su Ct o ciclo en que se supera el umbral de fluorescencia marcado por el equipo, pero en que la amplificación y nivel de intensidad de fluorescencia siguen teniendo una relación lineal, y su temperatura de hibridación (Tm), que informa de la especificidad de la amplificación.

4.3.6 Análisis de expresión por qPCR (sondas TaqMan)

Para la cuantificación de los transcritos mitocondriales se utilizaron sondas TaqMan en lugar de SYBR Green con objeto de garantizar una mayor especificidad de los resultados (cada sonda es específica de un determinado gen). Cada sonda está constituida por un *primer* central, unido en sus extremos a un fluoróforo y a un *quencher* que apantalla la fluorescencia del fluoróforo, y por los *primers forward* y *reverse*, todos ellos específicos para un determinado gen. La técnica se fundamenta en la actividad 5'→3' exonucleasa de la DNA polimerasa del *1-Step* kit (Tabla 1) con la que rompe el *primer* central de la sonda al amplificar el gen al que se encuentra hibridada y, en consecuencia, separarse el fluoróforo del *quencher* y poder detectar la fluorescencia emitida por el primero. De esta forma se consigue relacionar la intensidad de fluorescencia detectada por cantidad de cDNA de un determinado transcrito presente. Por su parte, el *primer forward* incluido en cada sonda es utilizado para sintetizar cDNA a partir de RNA y este *primer* junto al *primer reverse* son empleados para cuantificar el cDNA formado, todo ello en un solo paso sin necesidad de realizar una RT-PCR previa.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador habilitado para la lectura de placas de 96 pocillos (StepOne™ System de Applied Biosystems) y en cada pocillo se realizó tanto la retrotranscripción como la cuantificación en un solo paso del gen de interés y de un estándar interno gracias al uso de sondas con diferentes fluoróforos (emiten a longitudes de onda distintas) para cada uno. En concreto, primero se diseñó la placa y se prepararon las mezclas de reacción necesarias en función del número de genes y pocillos necesarios para cada gen (Tabla 6. 19 µl por pocillo) y, posteriormente a cada pocillo se le añadió 1 µl de cada RNA tratado con DNasa I. A continuación, se selló la placa con plástico, se le dio un pulso para bajar todo el contenido de cada pocillo y se inició el programa de qPCR (Tabla 7). De cada gen de interés se analizaron tres muestras biológicas (n=3) por duplicado técnico y los resultados obtenidos fueron valorados en función de los Ct conseguidos para cada producto de PCR.

Tabla 6. Reactivos utilizados para la qPCR *1-Step* con sondas TaqMan

Reactivo	Volumen (µl)
RT enzima Mix*	0,5
RT-PCR Mix*	10
Sonda FAM**	1
Sonda VIC**	1
H ₂ O (RNasa free)	6,5
Volumen final	19


*Contienen los componentes necesarios para sintetizar cDNA a partir del RNA tratado con DNasa I, para amplificar dicho cDNA y para cuantificarlo.

**La sonda TaqMan con el fluoróforo VIC es la que se emplea como estándar interno, siendo elegida la sonda del gen nuclear rRNA 18S para este fin, mientras que la sonda TaqMan con el fluoróforo FAM hace referencia a cada una de

las diferentes sondas empleadas según el gen mitocondrial de interés (*12S RNA*, *COI*, *ATP6*, *CYTB* y *ND6*). Todas las sondas fueron compradas a Thermo Fisher Scientific.

Tabla 7. Programa de qPCR 1-Step con sondas TaqMan

Etapa	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1. Incubación	900	48
2. Desnaturalización inicial	600	95
3. Desnaturalización	15	95
4. Extensión	60	60

 **40 ciclos**

4.3.7 Amplificación de transcritos de *TEFM* por PCR

Con objeto de obtener y secuenciar cDNA bicatenario de *TEFM* se amplificaron mediante PCR los cDNA monocatenarios obtenidos previamente, utilizando para ello la Phusion Hot Start II polimerasa, una DNA polimerasa de alta fidelidad y variante de la *Pfu* polimerasa, y la preparación de las mezclas de reacción adecuadas de acorde a las cantidades expuestas en la [Tabla 8](#). Una vez que éstas fueron elaboradas se llevaron a un termociclador, se inició el programa de PCR oportuno ([Tabla 9](#)) y, finalmente, los productos de PCR generados se guardaron a 4 °C. Cabe destacar que el programa de PCR utilizado se encuentra dividido en dos etapas porque, aunque se haya empleado la misma pareja de *primers* ([Tabla 10](#)), la secuencia de los mismos que hibrida con los transcritos es diferente en los primeros ciclos que en los sucesivos y, por tanto, también lo es la temperatura de hibridación. Este hecho se debe a que se amplificó tanto el cDNA de *TEFM* endógeno de las células como el clonado y a que este último contaba además con la secuencia Kozak y dos sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *PmeI*.

Tabla 8. Reactivos para amplificar los cDNA de *TEFM*

Reactivo	Concentración stock	Volumen (µl)	Concentración final
Tampón HF*	x5	10	x1
dNTPs	10 mM	1	200 µM
PHS II polimerasa	2 U/µl	1	0,04 U/µl
TEFM F**	10 µM	1	0,2 µM
TEFM R**	10 µM	1	0,2 µM
cDNA molde	-	5	-
H ₂ O miliQ	-	31	-
Volumen final		50	

*Contiene MgCl₂.

**Dilución previa 1/25 con H₂O Gibco® de todos ellos por estar a una concentración inicial de 250 µM.

Tabla 9. Programa de PCR con Phusion Hot Start II DNA polimerasa

	Etapa	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	
	1. Desnaturalización inicial	300	98	
Primera etapa	2. Desnaturalización	10	98	5 ciclos
	3. Hibridación	20	57	
	4. Extensión	20*	72	
	5. Desnaturalización	10	98	
Segunda etapa	6. Hibridación	20	69,8	28 ciclos
	7. Extensión	20*	72	
	8. Final de la extensión	300	72	
		∞	4	

*15-30 s/kb y el transcrito a amplificar cuenta con 1083 bp ó 1105 bp, según se trate de *TEFM* endógeno o de *TEFM* exógeno clonado.

Tabla 10. *Primers* para amplificar los cDNA de *TEFM*

Primer	Secuencia 5'→3'	Tm* (°C)	Tm'*(°C)
TEFM F	GTTTAAACGCCACCATGAGCGGGTCTGCCTC	80,5 (61,1)	69,8 (57)
TEFM R	GTTTAAACCTAAGGCTGAGAGTCAAACAC	66,8 (53)	

*Temperaturas de hibridación obtenidas mediante la aplicación Tm Calculator de Thermo Fisher Scientific (Phusion DNA polimerasa). La parte de las secuencias y temperaturas subrayadas se corresponden con las utilizadas y obtenidas para los 5 primeros ciclos, mientras que las secuencias completas para los siguientes 28 ciclos del programa.

4.3.8 Electroforesis horizontal en gel de agarosa

Los resultados de la amplificación de los cDNA de interés por PCR se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa en base al sistema Mini-Sub® Cell GT de Bio-Rad. Cada gel se preparó con una porosidad del 1% (p/v), disolviendo 0,5 g de agarosa en 50 ml del tampón electroforético TAE (Tris 40 mM, pH 8, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM. Tampón que permite que los grupos fosfato del DNA mantengan sus cargas negativas), solución a la que, tras hervir para disolver la agarosa y dejar enfriar brevemente, se añadió bromuro de etidio (agente que se intercala en el DNA y permite visualizarlo al irradiar con luz UV) a una concentración final de 0,5 µg/ml. A continuación, la solución se vertió sobre un soporte electroforético, cerrado con cinta de carroceros y con los peines necesarios para formar los pocillos de carga, y se dejó enfriar por completo para la polimerización de la agarosa. Después la cinta y los peines fueron retirados, se introdujo el soporte con el gel en una cubeta de electroforesis (sumergiéndolo con TAE), se cargaron las muestras en los pocillos, mezclando 4-5 µl de los productos de PCR con 2 µl de tampón de carga (Ficoll al 30%, que incrementa la densidad de las muestras para que se depositen en el fondo de los pocillos, y azul de bromofenol al 0,1 % p/v en TAE, que se desplaza con el frente de migración y, por tanto, permite controlar el transcurso de la electroforesis), y 5 µl de marcador Low DNA Mass Ladder (Tabla 1). Finalmente, se realizó la separación electroforética de las muestras cargadas aplicando un voltaje de 100 V 30 minutos.

4.3.9 Purificación de producto de PCR y secuenciación de la mutación c.1036C>T

Los productos de PCR fueron purificados previamente a su secuenciación mediante el kit comercial de GE Healthcare (Tabla 1), siguiendo el protocolo presente en dicho kit. Por su parte, para la secuenciación en sí se prepararon 15 µl de muestra a una concentración de 30 ng/µl de los productos de PCR purificados, a las que se añadieron 1,5 µl del *primer* de *TEFM* 5'-AGCATCAGGTGCTGAGCATG-3', y se mandaron a secuenciar al servicio de secuenciación de la empresa Secugen S.L. Finalmente, los resultados se analizaron con el software de alineamiento de secuencias CodonCode Aligner en base a la secuencia codificante de *TEFM* (Figura S1).

4.4 Técnicas de manipulación de DNA

4.4.1 Extracción de DNA total

La extracción del DNA total del pellet celular del paciente 3304 se realizó mediante el método fenol-cloroformo. En primer lugar, el pellet se incubó a 37 °C durante toda la noche en 250 µl de tampón TE pH 8 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) con 1,25 µl de proteinasa K (20 mg/ml) para degradar las proteínas presentes, con 25 µl de RNasa A (10 mg/ml) para degradar el RNA y con 5 µl de SDS al 25% para disgregar las membranas celulares. Al día siguiente, se llevaron a cabo dos extracciones, añadiendo en cada una 375 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), agitando la muestra y centrifugando a 13.300 rpm durante 5 minutos. Tras cada extracción, se recogió la fase acuosa (superior) en un nuevo tubo. A continuación, se llevó a cabo una tercera extracción con 250 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó, centrifugó a 13.300 rpm durante 5 minutos y se recogió la fase acuosa en un nuevo tubo. Posteriormente, se precipitó el DNA añadiendo 50 µl de acetato de amonio 7,5 M y 250 µl de isopropanol frío, mezclándolos por inversión (momento en que se visualizó el ovillo de DNA en suspensión). Seguidamente se centrifugó la muestra a 13300 rpm durante 5 minutos a 4 °C, se desechó el sobrenadante, el pellet se lavó con 500 µl de etanol al 75% y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Por último, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar el pellet y, una vez seco, el pellet se resuspendió en 75 µl de H₂O Gibco® y se almacenó la muestra a -20 °C.

4.4.2 Cuantificación de DNA total por espectrofotometría

Para determinar la concentración y pureza del DNA total aislado se empleó la misma metodología que en el apartado 4.3.3 *Cuantificación de RNA total por espectrofotometría*.

4.4.3 Amplificación del mtDNA por PCR y PCR anidada

Con objeto de secuenciar el mtDNA del paciente se llevó a cabo una PCR anidada para enriquecer la muestra de DNA total extraída en mtDNA. Esta PCR anidada estuvo constituida por una primera PCR larga (Tablas 11 y 12), en la que se amplificó la mayor parte del mtDNA (desde la base 1482 hasta la base 1180, es decir, 16,3 kb aproximadamente de las 16569 bp del mtDNA humano), y una segunda PCR (Tablas 11 y 13) en que se amplificaron fragmentos del producto de la PCR anterior. El resto del mtDNA no amplificado por la PCR anidada, así como fragmentos de la PCR anidada que daban problemas de amplificado, fueron sometidos a una tercera PCR (Tablas 11 y 13), nombrada como PCR F128, similar a la segunda PCR de la PCR anidada, pero

partiendo del DNA total extraído y no del producto de la PCR larga. Además, y de forma previa a la realización de estas PCR, los *primers* utilizados y sus temperaturas de hibridación (Tablas 14 y 15) fueron validados comprobando la ausencia de amplificadores en células ρ^0 (línea celular carente de mtDNA. Control negativo). Se verificó así que, en caso de detectar amplificadores, sólo procediesen del mtDNA y no de pseudogenes del genoma mitocondrial presentes en el nDNA. Como resultado de estas PCR se obtuvo el mtDNA amplificado en 8 fragmentos (Tabla 15), de los que F3-F7 procedían de la PCR anidada y F1, F2 y F8 de la PCR F128.

Tabla 11. Reactivos para la PCR anidada y PCR F128


Reactivo	Concentración stock	Volumen (μ l)	Concentración final
Master Mix*	x2	25	x1
Primer L**	25 μ M	1	0,5 μ M
Primer H**	25 μ M	1	0,5 μ M
DNA molde	-	-	100 ng
H ₂ O miliQ	-	Hasta 50	-
Volumen final		50	

*Master Mix diferente en función de si las muestras iban destinadas a realizar la PCR larga (Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer), la segunda PCR de la PCR anidada o la PCR F128 (EmeraldAMP® GT PCR Master Mix estas dos últimas). En ambos casos contienen una DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y tampón optimizado para la reacción.

**Los primers L hibridan con la cadena ligera del mtDNA y los H con la pesada, de forma análoga a la nomenclatura de *primers forward* y *reverse*.

Tabla 12. Programa de la PCR larga (primera de la PCR anidada)


Etapas	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1. Desnaturalización inicial	30	98
2. Desnaturalización	10	98
3. Extensión*	495	72
4. Final de la extensión	600	72
	∞	4

 **30 ciclos**

*La hibridación y la extensión ocurren a la vez y a la misma temperatura.

Tabla 13. Programa de la segunda PCR (de la PCR anidada) y PCR F128

Etapas	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1. Desnaturalización inicial	300	94
2. Desnaturalización	45	94
3. Hibridación	30	Tm*
4. Extensión	180	72
5. Final de la extensión	300	72
	∞	4

 **35 ciclos**

*Tm variable según la pareja de *primers* (ver Tabla 15).

Tabla 14. *Primers* para la PCR larga (primera de la PCR anidada)

Primer*	Secuencia 5'→3'	T _m (°C)
Oligo L	ACGCCCCGTACCCTCCTCAAGTATACTTCAAAGG	72
Oligo H	ACGCCAGGTCCTTTGAGTTTTAAGCTGTGGCTCG	

*Oligo L hibrida en la posición 1482 y Oligo H en la posición 1180 del mtDNA.

Tabla 15. Fragmentos obtenidos y *primers* utilizados en la segunda PCR (de la PCR anidada) y PCR F128

	Fragmento	Oligo 5'→3'	Hebra	Secuencia 5'→3'	Tamaño (bp)	T _m (°C)
PCR F128	F1	hmtL 569	L	AACCAAACCCCAAAGACACC	2452	66
		hmtH 2982	H	CTGATCCAACATCGAGGTCG		
	F2	hmtL 2797	L	GTCCTAAACTACCAAACCTGC	2417	65
		hmtH 5174	H	GTGTTAGTCATGTTAGCTTG		
2ª PCR	F3	hmtL 5061	L	AGCAGTTCTACCGTACAACC	2476	65
		hmtH 7497	H	TTTGAAAAAGTCATGGAGGCC		
	F4	hmtL8815	L	GATTTGAGAAGCCTTCGCTTC	2524	65
		hmtH 9819	H	GCTATAGGGTAAATACGGGC		
	F5	hmtL 9611	L	TCCCACTCCTAAACACATCC	2539	65
		hmtH 12111	H	AAACCCGGTAATGATGTCGG		
	F6	L1L	L	TACTCTCAATCAGCCACAT	2811	65
		hmtH 14559	H	GATTGTTAGCGGTGTGGTCG		
	F7	hmtL 14130	L	TCTTCCCACTCATCCTAACC	2590	65
		hmtH 112	H	ACAGATACTGCGACATAGGG		
PCR F128	F8	hmtL 15591	L	TTCGCCTACACAATTCTCCG	1643	66
		hmtH 626	H	TTTATGGGGTGATGTGAGCC		

4.4.4 Electroforesis horizontal en gel de agarosa

La correcta amplificación de los fragmentos del mtDNA se comprobó mediante la misma metodología que en el apartado 4.3.8 *Electroforesis horizontal en gel de agarosa*, con la salvedad de utilizar un gel de agarosa con porosidad del 0,7% (p/v) para visualizar el producto de la PCR larga precisamente por el mayor tamaño del mismo. Además, el tampón y el marcador utilizados en todas las electroforesis de los fragmentos del mtDNA fueron el TBE (Tris-borato 100 mM, pH 8.3, 2 mM EDTA) y el DNA Molecular Weight Marker II (Tabla 1), respectivamente.

4.4.5 Purificación de producto de PCR y secuenciación del mtDNA

La purificación de los productos de la PCR anidada y la tercera PCR (ver apartado 4.4.3 *Amplificación del mtDNA por PCR y PCR anidada* para más información) se llevó a cabo mediante ExoSAP-IT™, un reactivo enzimático que transforma el exceso de moléculas de *primers* y dNTPs en nucleósidos y fosfatos inorgánicos, evitando así la interferencia posterior de los mismos en la secuenciación. En concreto, de cada producto de PCR se tomaron primero 15 µl, a los que se les añadieron 6 µl del reactivo enzimático. Después, cada muestra se incubó a 37 °C durante 15 minutos para que tuviera lugar la reacción enzimática y, seguidamente, las muestras fueron

incubadas durante otros 15 minutos a 80 °C para inactivar al reactivo enzimático. A continuación, las muestras se trasladaron a la unidad de genómica de la Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Complutense de Madrid), donde cada uno de los 8 fragmentos fue secuenciado por el método de Sanger con tres *primers* para conseguir abarcar de forma óptima las 2000 bp aproximadas de cada fragmento (Tabla 15). Finalmente, los resultados obtenidos fueron analizados mediante el software de alineamiento de secuencias Sequencher (en base a la secuencia de referencia del mtDNA o rCRS), la base de datos MITOMAP y la web www.phylotree.org, ofreciendo estas dos últimas datos publicados de variaciones en el mtDNA humano y un exhaustivo árbol filogenético de los distintos haplogrupos mitocondriales conocidos, respectivamente.

4.5 Técnicas de manipulación de proteínas

4.5.1 Extracción de proteínas totales

La presente extracción se basó en utilizar el buffer de lisis RIPA (Tris HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 50 mM, Tritón X-100, desoxicolato de sodio 0,5% y EDTA 5 mM, esterilizado mediante autoclave), que permite aislar tanto proteínas solubles como de membrana de células de mamífero, y una mezcla comercial de inhibidores de proteasas de Roche para impedir la degradación de las proteínas de interés debido a la liberación de las propias proteasas endógenas. En concreto, los pellets celulares se resuspendieron en 100 µl de una mezcla preparada previamente de RIPA 1X e inhibidores de proteasas (en proporción 1:25, respectivamente) y se incubaron en una rueda giratoria a 4 °C durante 15 minutos para favorecer la extracción. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13000 g, 4 °C y 15 minutos y se recogieron los sobrenadantes en tubos nuevos para su posterior medida de concentración de proteínas total por el método de Bradford.

4.5.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

El método de Bradford se basa en el uso del reactivo homónimo para cuantificar la cantidad total de proteínas presentes en una determinada muestra. Dicho reactivo contiene azul brillante de Coomassie, un colorante hidrófobo que en disoluciones acuosas presenta un color pardo (máximo de absorción a 466 nm) por la presencia de ácido fosfórico, pero en presencia de proteínas origina un color azul (su máximo de absorción pasa a 595 nm), más azul cuanto más concentración de proteína haya presente. Por tanto, elaborando una recta de calibrado de valores de absorbancia a 595 nm con una proteína de concentración inicial conocida (albúmina de suero bovino o BSA) a diferentes concentraciones, y midiendo posteriormente la absorbancia de las muestras de interés, pueden interpolarse dichos valores en la recta (de ecuación análoga a la Ley de Beer-Lambert) y obtener la concentración estimada de proteínas totales en las soluciones problema. Para la elaboración de la recta de calibrado se partió de una solución de 1 mg/ml (1 µg/µl) de BSA y se aplicaron distintas diluciones por duplicado (0, 1, 2, 3, 5, 10 y 15 µl de BSA) en 200 µl del reactivo Bradford y H₂O miliQ hasta un volumen final de 1 ml. Por su parte, las muestras problema se prepararon por duplicado, usando en cada réplica 2 µl de las soluciones problema, 200 µl del reactivo Bradford y 800 µl de H₂O miliQ. Tanto las soluciones con BSA como las de las muestras se dejaron incubar 5 minutos a TA tras añadir el reactivo Bradford y se procedió a la medida de su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de haz

simple, usando para ello una cubeta de plástico de 1 cm de longitud de paso y la solución de 0 µl de BSA como control negativo. Tras interpolar en la recta, la concentración de proteínas totales por muestra se expresó en µg/µl.

4.5.3 Western blot

4.5.3.1 Electroforesis vertical y desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las proteínas cuantificadas fueron cargadas en geles de poliacrilamida con SDS para su separación mediante electroforesis desnaturizante (y, por tanto, en función de su peso molecular) con el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN® de Bio-Rad. Para ello se elaboró previamente el gel de electroforesis, compuesto por un gel *stacking* (concentrador) y un gel *running* (separador) de diferentes concentraciones de poliacrilamida (Tabla 16). 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, respectivamente, y que sólo se añadieron en primer lugar a la mezcla del gel *running*. A continuación, dicha mezcla se vertió entre dos cristales de 1 mm de separación, convenientemente colocados de forma previa sobre un soporte, hasta ocupar 2/3 aproximadamente del volumen total, y seguidamente se añadió una capa de isopropanol para que el gel *running* polimerizase de forma recta.

Tras la polimerización del gel *running*, se retiró el isopropanol, se lavó el gel *running* con H₂O destilada 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 montaron los cristales sobre la cubeta de electroforesis, se añadió el buffer de electroforesis (*running* buffer), se retiró el peine, se limpiaron los pocillos con ayuda de una jeringuilla y se procedió a la carga de las muestras. En concreto, se cargaron 6 µl de marcador (Tabla 1) en el primer pocillo y 12 µl de las muestras de interés en los siguientes. De esos 12 µl, 3 µl fueron de tampón de carga 4X (glicerol 10%, Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,02% (p/v) y β-mercaptoetanol 1% (v/v)) y el resto de diferentes proporciones entre las muestras problema y H₂O miliQ, según la cantidad de proteína a cargar (en µg) y los valores de concentración obtenidos mediante el método de Bradford.

Finalmente, se desarrolló la electroforesis a intensidad constante de 12 mA por gel hasta que el frente de banda atravesó el gel concentrador y llegó al separador, momento en que se incrementó la intensidad a 24 mA por gel hasta el fin de la electroforesis.

Tabla 16. Reactivos utilizados para la preparación de los geles *stacking* y *running*

Reactivo	Gel <i>stacking</i> (8%)*	Gel <i>running</i> (12,5%)*
Acrilamida:bisacrilamida 30:0,8	330 µl	2125 µl
Tampón 4X**	500 µl	1250 µl
H ₂ O miliQ	1167 µl	1500 µl
APS 20%	10 µl	15 µl
TEMED	5 µl	5 µl

*El gel *stacking* presenta un bajo porcentaje de porosidad (8%) para generar un tamaño de poro adecuado para poder concentrar todas las proteínas en un mismo punto, a partir del que se irán separando, ya que su avance se verá influenciado por el tamaño de poro del gel *running*, cuyo porcentaje de porosidad será más o menos elevado en

función si la proteína de interés es de menor o mayor tamaño, respectivamente (12,5% en el caso de todos los geles del presente TFM).

**Tampón diferente según el gel preparado. Tampón 4X del gel *stacking*: Tris HCl 0,5M pH 6,8, SDS 0,4%, EDTA 8 mM; Tampón 4X del gel *running*: Tris HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4% y EDTA 8 mM.

4.5.3.2 Electrotransferencia de proteínas a membrana de PVDF

Para visualizar las proteínas de interés fue necesaria la transferencia de las proteínas de las muestras separadas por electroforesis desnaturante a una membrana de PVDF. Para ello, se utilizó el sistema de electrotransferencia húmeda Trans-Blot® Cell de Bio-Rad, recortando y activando previamente un trozo de membrana con metanol, así como recortando cuatro trozos de papel Whatman®. Posteriormente, tanto el gel, la membrana como los papeles se sumergieron en BSN frío (tampón de electrotransferencia. Tris 48 mM, glicina 39 mM y metanol 20% (v/v)) y se procedió a su montaje junto al resto del sistema de electrotransferencia de Bio-Rad según las instrucciones del fabricante. Finalmente, se llevó a cabo la electrotransferencia en sí a potencia constante de 80 V durante 2 h, a 4 °C (con bloque de hielo para refrigerar y en cámara fría) y en agitación constante con imán a 500 rpm.

La eficiencia de la transferencia se comprobó mediante tinción reversible con rojo Ponceau (Ponceau S solution de Sigma-Aldrich), colorante rojo que tiñe las proteínas de forma inespecífica y que puede retirarse lavando la membrana varias veces con H₂O destilada. Después se incubó la membrana con una 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 y con agitación suave para bloquear la superficie de la membrana sin proteínas y evitar así la unión inespecífica de los anticuerpos usados con la membrana.

4.5.3.3 Incubación de membrana con anticuerpos y detección quimioluminiscente

La detección de la proteína de interés presente en la membrana de PVDF se basó en una inmunodetección indirecta, esto es, en el uso de un anticuerpo primario para localizar la proteína de interés, de un anticuerpo secundario (conjugado con la enzima peroxidasa) para localizar al primario y de dos sustratos de la enzima peroxidasa: luminol y peróxido de hidrógeno. Al entrar en contacto la peroxidasa con sus sustratos se produce la reducción del peróxido de hidrógeno a agua y la oxidación del luminol, reacción de la que resulta una señal luminosa prolongada (visible mediante el equipo adecuado) y correspondiente con la localización de la proteína de interés.

En primer lugar, se eliminó el exceso de agente bloqueante (leche al 5% en PSB-T) mediante 3 lavados con PBS-T de aproximadamente 5-10 minutos a TA y 90 rpm de agitación. A continuación, se incubó la membrana durante 2 horas con el anticuerpo primario a TA y 90 rpm de agitación, diluido a la proporción adecuada (Tabla 17) en 6 ml de una disolución de PBS-T al 0,25% de leche desnatada en polvo, y después se realizaron tres nuevos lavados con PBS-T (en las mismas condiciones que los anteriores). Posteriormente, se incubó la membrana durante 1 hora con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón o de conejo, según el origen biológico del anticuerpo primario, y conjugado con peroxidasa de rábano) en las mismas condiciones que el primario y diluido a la proporción adecuada (Tabla 17) de nuevo en 6 ml de una disolución de PBS-T al 0,25% de leche desnatada en polvo. Finalmente, se llevaron a cabo los tres últimos lavados con PBS-T (en las mismas condiciones que los anteriores) antes de revelar los resultados.

Una vez realizados los tres últimos lavados con PBS-T, se mezclaron previamente los dos reactivos del kit ECL de Thermo Fisher (peróxido de hidrógeno y luminol. [Tabla 1](#)), añadiendo 800 µl de cada uno, y se incubó la membrana con la solución resultante durante 1-2 minutos. A continuación, se introdujo la membrana en una funda de plástico y esta se dispuso sobre la bandeja superior del equipo de detección de quimioluminiscencia (Amersham™ Imager 600 de GE Healthcare), que permitió obtener imágenes de las proteínas de interés. Finalmente, las intensidades de las bandas obtenidas fueron cuantificadas mediante el software ImageQuant TL y la membrana utilizada se lavó con PBS-T e incubó toda la noche con leche al 5% en PBS-T, repitiendo todo el proceso (en caso de querer detectar otra proteína de la membrana), o bien se guardó a 4 °C en film transparente hasta su uso posterior.

Tabla 17. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas de interés (Western blot)

Anticuerpo	Mr proteína (kDa)	Dilución de trabajo	Origen biológico	Monoclonal/Policlonal	Casa comercial y código
TEFM Polyclonal Antibody	-	1:1000	Conejo	Policlonal	Thermo Scientific PA5-76409
Anti-Actin antibody	42	1:5000	Conejo	Policlonal	Sigma A2066
SHDA Monoclonal Antibody	70	1:1000	Ratón	Monoclonal	Thermo Scientific 459200
Total OXPHOS Human WB Antibody Cocktail	NDUFB8 (CI): 18 SDHB (CII): 29 UQCRC2 (CIII): 48 COII (CIV): 22 ATP5A (CV): 54	1:1500	Ratón	Monoclonal	Abcam ab110411
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody	-	1:5000	Cabra	Policlonal	Thermo Scientific 31460
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody	-	1:5000	Cabra	Policlonal	Thermo Scientific 31430

Enmarcados los anticuerpos secundarios utilizados. Los demás son anticuerpos primarios.

4.5.4 Blue native PAGE (BN-PAGE)

4.5.4.1 Preparación de mitoplastos para la BN-PAGE

Los mitoplastos son mitocondrias que carecen de membrana externa y muy útiles para el estudio de los complejos respiratorios mitocondriales. Pueden obtenerse mediante el uso de un detergente suave, como la digitonina, que en las cantidades apropiadas disgregue la membrana externa, pero deje intacta la membrana interna mitocondrial. Para ello, primero se obtuvo pellet de las líneas celulares a analizar, se lavaron dos veces los pellets con PBS frío y se contó el número de células de cada línea para asegurarse una misma densidad celular en todas ellas, concretamente, $2 \cdot 10^6$ millones de células. Posteriormente, los pellets de cada línea se resuspendieron en 200 µl de PSB frío, se les añadió 200 µl de digitonina 8 mg/ml (disuelta en PBS) y se incubaron en hielo durante 10 minutos para iniciar la formación de los mitoplastos. Pasado ese tiempo se realizaron dos lavados con 1 ml de PBS frío y centrifugación a 4 °C, 10000 g y 5 minutos, tras los que se terminó retirando el sobrenadante para obtener el pellet con mitoplastos y pudiendo congelarse a -80 °C o continuar con su preparación para la BN-PAGE. De

una u otra forma, lo siguiente que se realizó fue resuspender los pellets en 75-100 μ l de una solución 0,75 M ácido aminocaproico, 50 mM Bis-Tris/HCl pH 7 y añadir 10 μ l de detergente al 10% (concentración final de aproximadamente 1%) para extraer los complejos de la membrana interna mitocondrial. En particular, en caso de querer valorar los complejos mitocondriales de forma individual se utilizó DDM al 10% por ser un detergente fuerte que rompe las interacciones entre complejos, pero para estudiar los supercomplejos mitocondriales se añadió digitonina al 10%, dado que se trata de un detergente más suave que permite separar los complejos de la membrana interna de los mitoplastos, pero manteniendo las interacciones entre los mismos.

Una vez añadido el detergente, lo siguiente que se realizó fue incubar las muestras en una rueda giratoria a 4 °C para favorecer la actuación del mismo y, a continuación, se centrifugó a máxima velocidad, 4 °C y durante 30 minutos con el fin de separar los complejos mitocondriales del resto de componentes de los mitoplastos. Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes y se prepararon las muestras para la BN-PAGE, mezclando en tubos nuevos 20 μ l de cada muestra con 2 μ l de SB (Coomassie® Brilliant Blue G250 de SERVA al 5% en 75mM ácido aminocaproico, 50mM Bis-Tris/HCl pH 7), usado en sustitución del SDS para dotar a las proteínas de carga negativa y que así puedan migrar en el gel. Para finalizar, las muestras con SB pudieron congelarse a -80 °C junto a las muestras madre sin SB o cargarse en el gel de electroforesis para iniciar la BN-PAGE.

4.5.4.2 Electroforesis vertical y nativa en gel de poliacrilamida (BN-PAGE)

La BN-PAGE se caracteriza por ser una electroforesis nativa (no desnaturante y que, por tanto, mantiene las interacciones entre proteínas) que permite la separación y visualización de complejos proteicos gracias a los reactivos y al gradiente de porosidad de los geles utilizados (complejos respiratorios mitocondriales en este trabajo por cargar proteínas procedentes de mitoplastos). En particular, la BN-PAGE realizada se basó en el sistema NativePAGE™ Novex® Bis-Tris de Life Technologies™, utilizándose geles comerciales con un gradiente de porosidad del 3-12% (Tabla 1) y preparando el tampón del ánodo y los tampones del cátodo (Dark Blue y Light Blue) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez sacado el gel y colocado en la cubeta de electroforesis, en el primer pocillo se cargaron 15 μ l del marcador NativeMark™ (Tabla 1) con 2 μ l de SB y en el resto de pocillos se cargaron las muestras de complejos mitocondriales preparadas previamente. A continuación, se añadió el tampón del cátodo Dark Blue hasta cubrir la totalidad del gel y el tampón del ánodo hasta abarcar menos de la mitad de la cubeta de electroforesis. Posteriormente, se llevó la construcción a una cámara fría y se inició la separación electroforética a 100 V. Siguiendo las indicaciones del fabricante, cuando el frente de banda recorrió más de 1/3 del gel se paró la electroforesis para cambiar el tampón del cátodo Dark Blue por el Light Blue y después se reanudó la electroforesis, subiendo primero la potencia a 175 V y, tras un tiempo de separación con el Light Blue, a 240 V hasta el final de la electroforesis.

4.5.4.3 Electrotransferencia de proteínas a membrana PVDF

La transferencia de las proteínas del gel de la Blue native a una membrana de PDVF se realizó llevando a cabo la misma metodología que la descrita en el apartado 4.5.3.2 *Electrotransferencia de proteínas a membrana de PVDF*, con el añadido de lavar la membrana varias veces con metanol antes de teñir con rojo Ponceau para eliminar el color azul de la

membrana (debido a los tampones del cátodo Dark Blue y Light Blue) y así poder visualizar mejor las proteínas transferidas.

4.5.4.4 Incubación de membrana con anticuerpos y detección quimioluminiscente

Se empleó la misma metodología que la descrita en el apartado 4.5.3.3 *Incubación de membrana con anticuerpos y detección quimioluminiscente*, aunque usando anticuerpos primarios diferentes (Tabla 18).

Tabla 18. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas de interés (BN-PAGE)

Anticuerpo	Mr proteína y complejo (kDa)	Dilución de trabajo	Origen biológico	Monoclonal/Policlonal	Casa comercial y código
NDUFA9 Monoclonal Antibody	36 (CI 1000)	1:1000	Ratón	Monoclonal	Thermo Scientific 459100
	SDHA 70 (CII 130)	1:5000			Thermo Scientific 459200
OXPHOS Antibody Cocktail (propio)	UQCR2 48 (CIII ₂ 490)	1:1000	Ratón	Monoclonal	Abcam ab14745
	COI 40 (CIV 200)	1:2000			Thermo Scientific 459600
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody	-	1:5000	Cabra	Policlonal	Thermo Scientific 31430

Enmarcado el anticuerpo secundario utilizado. Los demás son anticuerpos primarios.

4.6 Aplicaciones bioinformáticas y análisis estadístico

Las aplicaciones y programas bioinformáticos empleados en este trabajo fueron:

- **Ensembl y UniProt:** bases de datos de genes y proteínas, respectivamente, utilizadas para conocer información básica sobre *TEFM* y la proteína humana que codifica.
- **ProtParam:** herramienta de ExPASy empleada para estimar el peso molecular de la proteína *TEFM* humana en diferentes condiciones y su índice de hidropaticidad (GRAVY).
- **ExAC:** base de datos de exomas secuenciados consultada para conocer información sobre la mutación del paciente.
- **BLAST:** herramienta disponible en NCBI y usada para la búsqueda de secuencias proteicas homólogas a la proteína *TEFM* humana.
- **Phylogeny.fr:** web que permite la construcción dendogramas o árboles filogenéticos en formato Newick con PhyML y su posterior visualización con la aplicación TreeDyn. Para la elaboración del árbol se llevó a cabo un alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de *TEFM* seleccionadas con ClustalW y posterior compactación con Gblocks.
- **WebLogo:** web en la que se pueden generar logos a partir de un alineamiento múltiple para visualizar los residuos más conservados entre las especies seleccionadas.
- **MutationTaster:** aplicación web que permite predecir si una mutación es patológica.
- **PyMOL:** programa que permite visualizar cristales resueltos de proteínas y utilizado para analizar el cristal 5OLA del complejo de anti-terminación.

- **CodonCode Aligner y Sequencher:** programas para estudiar secuencias de DNA de interés mediante alineamientos.
- **MITOMAP:** base de datos del genoma mitocondrial humano consultada para establecer el carácter patológico de las variaciones encontradas en el mtDNA del paciente 3304.
- **PhyloTree_{mt}:** web que ofrece un exhaustivo árbol filogenético de todos los haplogrupos mitocondriales humanos conocidos.
- **ImageQuant TL:** software para cuantificar las bandas obtenidas por electroforesis.

Por su parte, todo el análisis estadístico de los resultados del presente trabajo se llevó a cabo con el programa StatView y, en concreto, mediante Test-T (datos no pareados) por contar con un tamaño muestral pequeño. Además, se consideraron estadísticamente significativos los valores p menores de 0,05, 0,005 y 0,0005 (^a $p < 0,05$, ^{aa} $p < 0,005$ y ^{aaa} $p < 0,0005$ con respecto al control; ^b $p < 0,05$, ^{bb} $p < 0,005$ y ^{bbb} $p < 0,0005$ con respecto al paciente).

5. RESULTADOS

5.1 Análisis bioinformático

5.1.1 Conservación evolutiva de TEFM y predicción patológica de la mutación c.1036C>T

La alta conservación evolutiva de una proteína o región de la misma supone un indicativo de que dicha secuencia de aminoácidos presenta una elevada importancia funcional para los organismos o la proteína en sí, respectivamente. En el caso de la proteína TEFM se ha descrito que participa en la elongación de la transcripción del mtDNA humano (Minczuk et al., 2011; Posse et al., 2015). Para comprobar la conservación entre especies eucariotas de TEFM, en general, y de su extremo C-terminal, en particular (con especial interés en los residuos Q346-P360 (nomenclatura de secuencia humana) por ser los que no se traducen debido a la mutación c.1036C>T del paciente 3304), lo primero que se realizó fue una búsqueda de secuencias homólogas a la secuencia primaria del TEFM humano (código de referencia NP_078959 en NCBI) mediante la herramienta BLAST de NCBI. En total se obtuvieron 577 resultados, de los que se eligieron 16 secuencias proteicas de entre las que hubiese constancia experimental en UniProt (sólo 5 de las 577 la tienen: *Danio rerio* (pez cebra), *Rattus norvegicus* (rata), *Mus musculus* (ratón), *Homo sapiens* (humano) y *Bos taurus* (vaca/toro). Figura S3) y de especies que estuvieran aparentemente alejadas en la evolución para obtener así un mayor espectro de secuencias y poder establecer con mayor rigor los residuos más conservados evolutivamente. A continuación, se llevó a cabo un alineamiento múltiple de dichas secuencias con ClustalW (Figura 6) y se realizó una compactación laxa de dicho alineamiento con Gblocks para eliminar los *gaps* o huecos que pudiesen haberse generado, así como residuos de bajo alineamiento y regiones divergentes a las demás. Tras dicha compactación se conservaron un 55% de los residuos originales. Finalmente, con los alineamientos múltiples compactos se llevó a cabo tanto la construcción de un dendograma o árbol filogenético con PhyML (Figura S3) como de un logo de secuencia con WebLogo (Figura S4) para visualizar las relaciones filogenéticas y los residuos más conservados entre las especies seleccionadas, respectivamente.

Como resultado, se obtuvo que la proteína TEFM se encuentra extendida entre los animales, pero no entre los organismos eucariotas, destacando la aparente ausencia de TEFM en aves, así como en plantas, hongos y protistas (según las secuencias homólogas obtenidas mediante el BLAST de NCBI). Por su parte, los residuos Q346-L353 del C-terminal se encuentran altamente conservados entre las especies estudiadas (Figura S4) y, en concreto, en animales vertebrados, con excepción de *Alligator mississippiensis* (caimán) que poseía una secuencia de TEFM con menor número de residuos que las demás (Figura 6). Además, el mejor modelo para estudiar la patología del paciente sería *Bos taurus*, dado que, entre las proteínas TEFM comprobadas experimentalmente, es el más cercano filogenéticamente al hombre (Figura S3) y tanto *Rattus rattus* como *Mus musculus* presentan ausencia de homología con TEFM humano desde la L353 (sin incluir) hasta el residuo final de la proteína (Figura 6). Cabe destacar que, dentro de la secuencia Q346-L353, el residuo menos conservado es la isoleucina 348 humana (I348), siendo valina o leucina en otras especies. No obstante, es de suponer que dicha variación no influya sobre la funcionalidad de la proteína por tratarse los tres posibles residuos de aminoácidos de naturaleza química similar (no polar) y por tener tamaños parecidos.

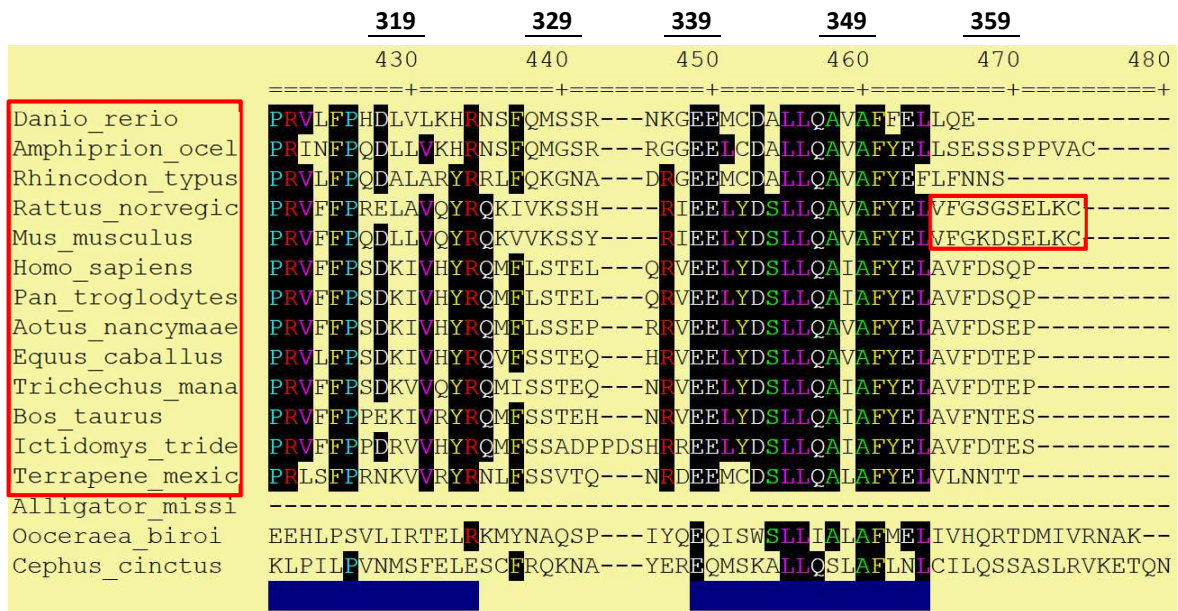


Figura 6. Alineamiento múltiple compactado de secuencias homólogas a la proteína TEFM humana (ClustalW). Se muestran los últimos residuos del dominio C-terminal del alineamiento de 16 secuencias de proteína TEFM de animales. Los números en negrita y subrayados encima de la figura se corresponden con los de la secuencia del TEFM humano (los de la figura son los del alineamiento). Las especies enmarcadas en rojo se corresponden con los animales vertebrados que presentan conservación de los residuos Q346-L353 (nomenclatura del TEFM humano). Las secuencias enmarcadas en rojo son los residuos finales del TEFM de rata y ratón a partir de la L353, que difieren con respecto al humano.

Por otra parte, para valorar si la mutación detectada por secuenciación de exomas en el paciente 3304 tenía o no carácter patológico se realizó una predicción de la probabilidad de patología de la misma con el programa de predicción MutationTaster, obteniendo a su vez información complementaria sobre la conservación evolutiva desde el residuo Q346 del TEFM humano (Figura 7). Como resultado, se predijo que la mutación es causante de enfermedad con una probabilidad de 0.99999998896414 y se confirmó que existen secuencias homólogas a partir del residuo Q346 del extremo C-terminal del TEFM humano en animales vertebrados (excepto en *F. catus* (gato), *G. gallus* (gallo) y *X. tropicalis* (rana)), pero no en animales invertebrados (*D. melanogaster* (mosca) ni en *C. elegans* (gusano transparente)).

conservation protein level for non-synonymous changes	species	match	gene	aa alignment
	Human			346 Q R V E E L Y D S L L Q A I A F Y E L A V F D S Q P *
	mutated	no alignment		n/a
	Ptroglydytes	all identical	ENSPTRG0000008965	346 Q R V E E L Y D S L L Q A I A F Y E L A V F D S Q P
	Mmulatta	all conserved	ENSMUG0000009073	347 Q R V E E L Y D S L L Q A V A F Y E L A V F D S P P
	Fcatus	no homologue		
	Mmusculus	all conserved	ENSMUSG0000046909	348 Y R I E E L Y D S L L Q A V A F Y E L
	Ggallus	no homologue		
	Trubripes	all conserved	ENSTRUG0000012221	333 R E G E E L C D A L L Q A V A F Y E L
	Drerio	all conserved	ENS DARG0000059469	353 N K G E E M C D A L L Q A V A F F E L
	Dmelanogaster	no homologue		
	Celegans	no homologue		
	Xtropicalis	no homologue		

Figura 7. Alineamiento de secuencias homólogas a los residuos Q346-P360 del TEFM humano (MutationTaster). Se muestra la homología comparada de la proteína TEFM humana entre las diferentes especies que la aplicación web tiene definidas por defecto, ofreciéndose el gen y la secuencia de alineamiento con los residuos blancos y sombreados en negro en aquellos casos en que existe homología.

En conclusión, la proteína TEFM se encuentra extendida entre los animales, pero no entre los organismos eucariotas y, por tanto, no parece ser una proteína conservada evolutivamente. Sin embargo, dentro de los 15 aminoácidos afectados por la mutación c.1036C>T del paciente, al menos los 8 primeros (Q346-L353) es muy probable que sean residuos importantes para la función de TEFM entre los organismos que la sintetizan por estar altamente conservados, así como por la alta probabilidad de patología de la mutación del paciente 3304.

5.1.2 Importancia estructural del extremo C-terminal de TEFM

Una vez determinada la conservación evolutiva de los residuos Q346-L353 de la proteína TEFM humana, y habiendo predicho que la mutación c.1036C>T (p.Q346X en secuencia proteica humana) tiene carácter patológico, lo siguiente que se planteó fue de qué forma puede influir la ausencia del extremo C-terminal en la funcionalidad de la proteína a nivel molecular. Para ello, se buscaron estructuras resueltas de la proteína TEFM humana en UniProt (código de referencia Q96QE5) y se seleccionó el cristal 5OLA del PDB, generado a partir de una mezcla en solución de dos mutantes para TEFM y POLRMT y una secuencia híbrida de RNA-DNA (Hillen, Parshin et al., 2017). En concreto, el mutante usado fue el variante $\Delta 135$ del TEFM humano, que carece de los 135 primeros residuos y, por tanto, del dominio N-terminal, pero conserva el interdominio enlazante y el dominio C-terminal (sin los residuos S358-P360) (Figura 4). Para visualizar el cristal se utilizó el programa PyMOL, observándose que la unidad asimétrica estaba constituida por dos complejos de anti-terminación, en el que cada uno se encuentra a su vez formado por una secuencia híbrida de RNA-DNA, una molécula de POLRMT y un homodímero de TEFM, que es la conformación activa y funcional de la proteína (Hillen, Parshin et al., 2017). Posteriormente, se buscaron interacciones polares entre TEFM y el DNA y TEFM y POLRMT que fueran cercanas al extremo C-terminal y se encontraron algunas con el DNA, de modo que se fueron eliminando todos los componentes del cristal hasta dejar sólo un monómero de TEFM y el híbrido RNA-DNA para una mejor visualización (Figura 8).

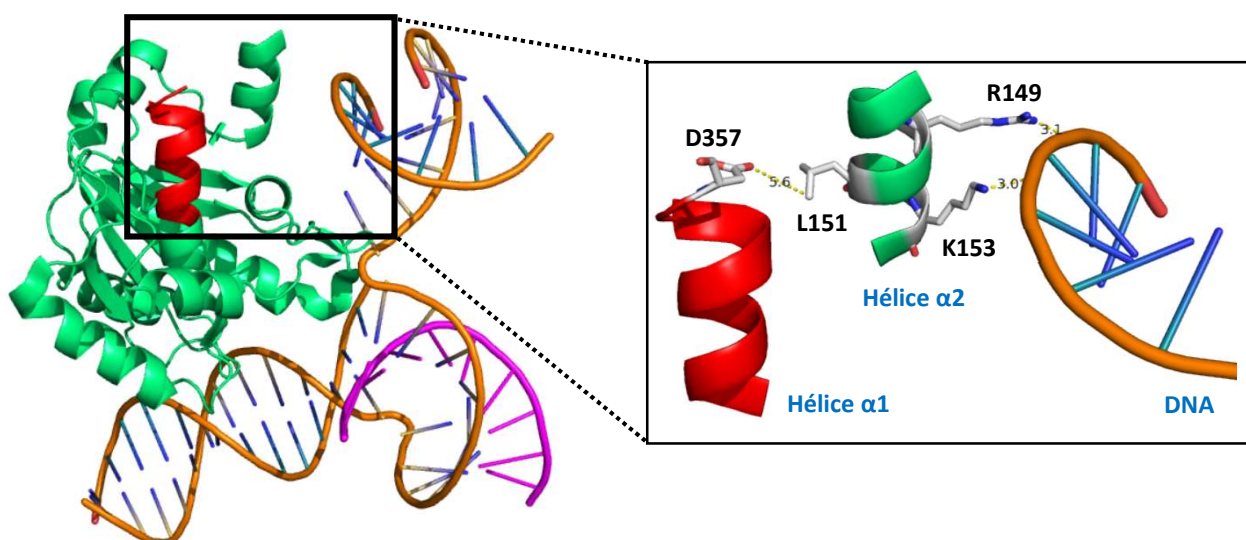


Figura 8. Estructura terciaria e interacciones de TEFM con una secuencia híbrida de RNA-DNA (basada en el PDB 5OLA). En verde se muestra un monómero del homodímero funcional de TEFM, en naranja el DNA y en rosa el RNA. En rojo aparece el fragmento de la hélice $\alpha 1$ que abarca las posiciones Q346-D357 y que se encuentra próxima a la hélice $\alpha 2$, existiendo 5,6 Å de distancia entre D357 y L151. De la hélice

$\alpha 2$ se muestran dos posibles interacciones con el DNA por medio de los residuos R149 (3,1 Å de distancia con el DNA) y K153 (3,0 Å de distancia con el DNA). De los residuos presentados en palitos o *sticks* (R149, L151, K153 y D357) los carbonos se muestran en blanco, oxígenos en rojo y nitrógenos en azul.

Como resultado se observó que la hélice $\alpha 1$ de TEFM, en que se encuentran los residuos R149, L151 y K153, parece interactuar con el DNA mediante interacciones electrostáticas entre los grupos fosfato del DNA cargados negativamente y residuos polares con carga positiva de TEFM, como son la R149 y la K153, como consecuencia de la proximidad y el posicionamiento de las cadenas laterales de dichos residuos. Por su parte, la hélice $\alpha 2$ de TEFM, que constituye el extremo C-terminal y en la que se encuentran los residuos conservados Q346-L353, no interactúa con la hélice $\alpha 1$, pero se encuentra próxima a la misma (existen 5,6 Å entre L151 y D357), de forma que la ausencia de la hélice $\alpha 2$, como ocurre en el paciente 3304, podría llevar a una modificación en el entorno de la hélice $\alpha 1$ que, a su vez, llevase a una pérdida de interacción con el DNA y, por ende, a una menor estabilización del complejo de elongación de la transcripción (Hillen, Parshin et al., 2017).

5.2 Análisis de secuencias

5.2.1 Confirmación de la presencia de la mutación c.1036C>T de TEFM en el paciente 3304

Para confirmar la mutación encontrada por secuenciación masiva primero se extrajo el RNA total de muestras del paciente y paciente transducido con 50 μ l de vector viral con TEFM wt clonado, utilizado como control, se retrotranscribió a cDNA monocatenario, se obtuvo cDNA bicatenario mediante PCR con DNA polimerasa de alta fidelidad, se verificó la correcta amplificación mediante electroforesis, se purificó el producto de PCR y se envió a un servicio de secuenciación para ser analizado por secuenciación de Sanger. Finalmente, las secuencias resultantes (secuencia de P o del paciente y secuencia de P^{TEFM(50)} o del paciente transducido) fueron estudiadas mediante el programa CodonCode Aligner (Figura 9).

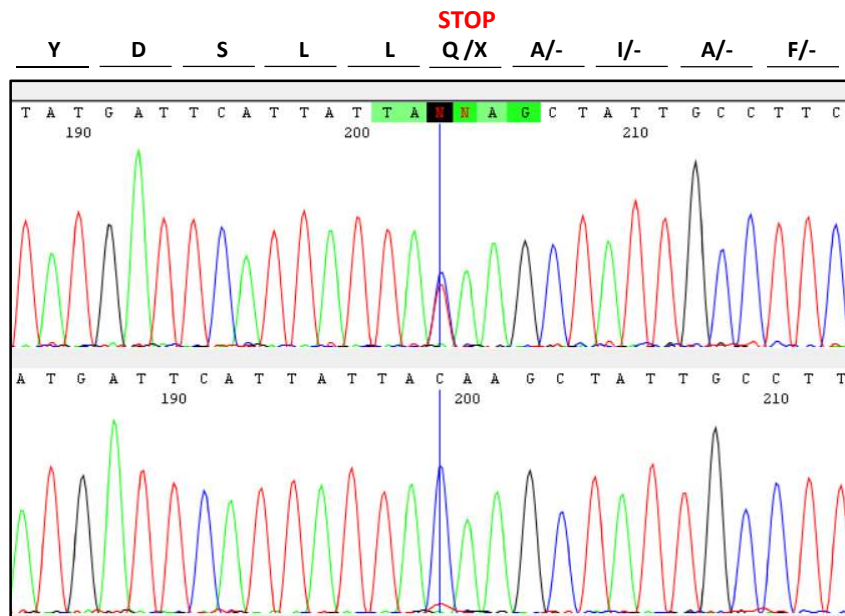


Figura 9. Electroferograma de la secuencia codificante de TEFM. Se ofrecen las secuencias de P (superior) y de P^{TEFM(50)} (inferior) en torno a la C1036 de la secuencia codificante de TEFM. Los picos azules se

corresponden con la detección de una citosina, mientras que los rojos de una timina, de forma que en la posición señalada con la línea azul (la 1036 de la secuencia codificante) se encuentran ambas bases en la secuencia P y, por tanto, existe heterocigosis en el paciente. En la secuencia de P^{TEFM(50)}, utilizada como control, se detecta, sobre todo, citosina en la posición 1036.

Los resultados obtenidos permitieron verificar que el paciente presenta la mutación c.1036C>T en heterocigosis por detectarse ambas bases en la posición 1036 de ambas secuencias, así como por haber una mayor cantidad de citosina en dicha posición de la secuencia P^{TEFM(50)}, algo esperable por existir una sobreexpresión en esta línea celular del alelo wt y, por tanto, detectarse muchas más copias con C1036 que con T1036.

5.2.2 Secuenciación del mtDNA del paciente 3304

Para poder determinar la secuencia del G-quadruplex del mtDNA del paciente 3304, así como para caracterizar el resto de la secuencia génica de dicho mtDNA y detectar posibles mutaciones en el mismo, se llevó a cabo la secuenciación del mtDNA del paciente 3304. Primero se realizó una PCR anidada para conseguir amplificar la mayor parte del mtDNA y después una PCR convencional para amplificar los fragmentos del mtDNA no obtenidos con la PCR anidada. Posteriormente, se llevó a cabo la purificación de todos los productos de PCR obtenidos y se enviaron las muestras a un servicio de secuenciación para su lectura por secuenciación de Sanger. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa Sequencher y la base de datos MITOMAP (Tabla 19) y no se detectó ninguna mutación, pero sí diferentes polimorfismos⁴. No obstante, la secuencia formada por las pares de bases 103-598 del fragmento 8 (Tabla 15), y en la que se incluye el CSBII (bp 299-315 según MITOMAP) y, por tanto, el G-quadruplex, no pudo analizarse correctamente por ser de baja calidad. Por tanto, habría que repetir el proceso en futuros ensayos para poder incluir la secuencia de este fragmento y tener así la información completa de la secuencia del mtDNA del paciente 3304. Finalmente, los polimorfismos encontrados se utilizaron para establecer el haplogrupo mitocondrial⁵ al que pertenece el paciente, en base al árbol filogenético de los mismos disponible en PhyloTree_{mt}. A falta de conocer las posibles variaciones presentes en la secuencia del fragmento 8 el paciente 3304 resultó ser del haplogrupo H1j2.

Tabla 19. Polimorfismos encontrados en el mtDNA paciente 3304

Polimorfismos del mtDNA del paciente 3304		
m.750A>G	m.4769A>G	m.15326A>G
m.1438A>G	m.8860A>G	m.15848A>G
m.1821A>G	m.12771G>A	m.16291C>T
m.3010G>A	m.13708G>A	m.16519T>C
m.4733T>C		

Marcados en negrita los polimorfismos propios del haplogrupo H1j2. Los demás polimorfismos constituyen el resto del haplotipo del paciente 3304.

⁴ En el análisis de secuencias del mtDNA la palabra polimorfismo se usa como sinónimo de variante no patológica, mientras que mutación como variante patológica.

⁵ Cada nueva variación que se introduce en el mtDNA da lugar a un genotipo mitocondrial o haplotipo ligeramente diferente del original. El conjunto de haplotipos estrechamente relacionados se conoce por el nombre de haplogrupo.

5.3 Análisis de la función mitocondrial

5.3.1 Medida de los niveles de ATP mitocondrial

Debido a la sospecha de que la patología del paciente 3304 se deba a la mutación c.1036C>T de *TEFM* y, por tanto, se trate de una enfermedad mitocondrial, lo primero que se hizo fue analizar la producción de ATP mitocondrial para valorar la funcionalidad del sistema OXPHOS en el paciente. Para ello se sembraron fibroblastos de las líneas celulares de interés por sextuplicado en pocillos de placas de 96 pocillos y se utilizó medio de cultivo DMEM sin glucosa, con piruvato y con 2-deoxi-glucosa para inhibir la glucólisis y destinar la producción de energía solamente a la cadena de transporte de electrones, asegurando así que el ATP detectado fuese ATP mitocondrial. Posteriormente, se valoraron los niveles de ATP por medio de la enzima luciferasa, que oxida a su sustrato luciferina en presencia de ATP dando lugar a la liberación de luz, detectándose más luz cuanto más ATP haya sintetizado la línea celular. Paralelamente, se valoró el número de células viables por pocillo mediante detección de fluorescencia para poder normalizar la señal lumínica con respecto al número de células viables, traduciendo así los resultados en cantidad de ATP mitocondrial producido por célula viva (Figura 10).

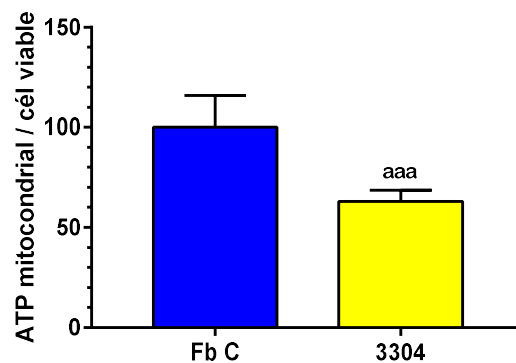


Figura 10. Niveles de ATP mitocondrial por célula viable en el paciente 3304 y línea celular control (Fb C). Se muestra la cantidad de ATP detectado en los fibroblastos procedentes de la línea control (100 de media) y del paciente (63 de media) con significación estadística ($p < 0,0005$). La línea control utilizada es una línea de fibroblastos sin immortalizar procedentes de un bebé sano con 1 mes de edad. Medidas realizadas por sextuplicado técnico ($n=1$) de ambas líneas celulares.

Los niveles de ATP mitocondrial detectados en el paciente 3304 fueron menores en relación al control utilizado (100 frente a 63 de media) y con una elevada significancia estadística ($p < 0,0005$), lo que indica que la producción de ATP está afectada y que existe disfunción mitocondrial en el paciente, presumiblemente por fallo en el sistema OXPHOS a causa de la mutación c.1036C>T en *TEFM*.

5.3.2 Cuantificación de transcritos mitocondriales

Como se ha indicado previamente, los diferentes niveles de ATP detectados entre control y paciente podrían ser debidos a una alteración del sistema OXPHOS por una síntesis insuficiente de los complejos respiratorios mitocondriales que lo constituyen. Ésta a su vez estaría generada por una menor transcripción mitocondrial como consecuencia de haber menos copias de *TEFM* wt en el paciente y, por tanto, una menor formación de complejos de anti-

terminación que permitiesen continuar con la transcripción de la cadena ligera. Para comprobar esta hipótesis se llevó a cabo un análisis de la expresión de diferentes genes mitocondriales (*12S RNA*, *COI*, *ATP6* y *CYT6* de la cadena pesada y *ND6* de la cadena ligera) mediante qPCR. En concreto, se extrajo el RNA total de pellets celulares del paciente y un control, se trató dicho RNA con DNasa I para evitar amplificadores inespecíficos por contaminación con mtDNA y se retrotranscribió a cDNA y amplificó por qPCR en un paso, utilizando sondas TaqMan para la cuantificación.

De los resultados obtenidos se analizó el Ct o ciclo en que, en escala logarítmica, el producto amplificado supera el umbral marcado por el equipo, teniendo presente que a menor Ct mayor amplificación del cDNA de partida, es decir, mayor cantidad de mRNA extraído y, por tanto, mayor expresión del gen de interés. En concreto, la cuantificación se basó en el método de aproximación $2^{-\Delta\Delta t}$, que presupone una eficiencia del 100% de los *primers* utilizados (sinónimo de duplicación completa de la cantidad de DNA presente en cada ciclo) y se basa en comparar el Ct obtenido para el gen de interés de cada muestra con el alcanzado por el estándar interno para cada una. En la [Figura 11](#), que refleja los resultados obtenidos, puede apreciarse una tendencia a que se transcriban menos los genes de la cadena pesada cuanto más alejados están del inicio de la transcripción H_2 ([Figura 2](#)) en el paciente con respecto al control, hasta el punto de que en el caso de *CYT6* (el más alejado) la disminución llega a ser estadísticamente significativa. Esto coincide con el hecho de que en ausencia de TEFM la transcripción mitocondrial sea menos procesiva y, por tanto, la expresión de genes más alejados del H_2 sea menor ([Agaronyan et al., 2015](#)). Por su parte, la transcripción de *ND6* pareció ser menor en el paciente con respecto al control, presumiblemente debido a que al existir un menor número de copias de TEFM wt existe un menor número de complejos de anti-terminación funcional, produciéndose así la desestabilización del complejo de elongación en el G-quadruplex. Todo ello de acuerdo al modelo de conexión entre la transcripción y la replicación fundamentado en el modelo de desplazamiento de la hebra ([Agaronyan et al., 2015](#); [Hillen, Parshin et al., 2017](#); [Montoya et al., 2006](#)).

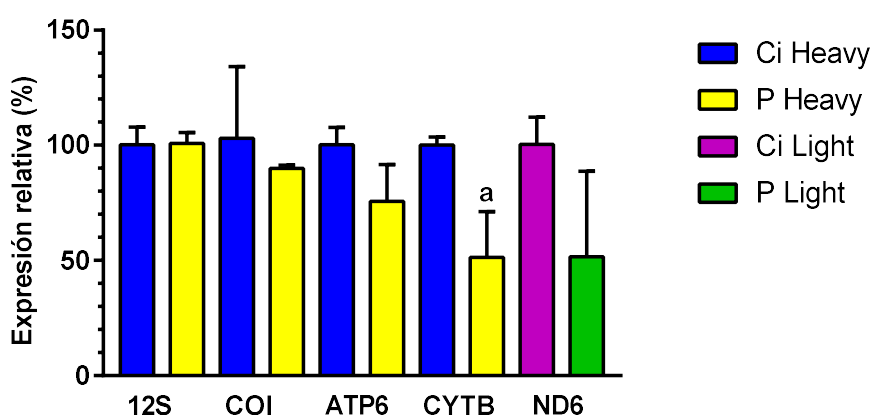


Figura 11. Cuantificación relativa con respecto a Ci de la expresión de los genes mitocondriales *12S RNA*, *COI*, *ATP6*, *CYT6* y *ND6* en las líneas P y Ci. Los datos ofrecidos son la media de un duplicado técnico (n=3) para cada muestra, junto a su desviación estándar. Los transcritos de la cadena pesada (*heavy*) aparecen representados en un color diferente a los de la cadena ligera (*light*). Sólo existe significancia estadística en P con respecto a Ci en el caso de la transcripción del *CYT6* ($p < 0,05$).

En síntesis, la menor cantidad de ATP mitocondrial presente en el paciente parece estar relacionada con un fallo en el sistema OXPHOS, debido a alteraciones en la expresión de los genes mitocondriales que repercute, presumiblemente, sobre la síntesis posterior de las subunidades de los complejos respiratorios mitocondriales que codifican.

5.4 Ensayos funcionales basados en análisis de complementación genética

5.4.1 Confirmación de la sobreexpresión de las líneas celulares generadas

La complementación genética consiste en la introducción de un gen wt en células afectadas por una mutación en dicho gen para verificar si el fallo funcional encontrado se recupera al existir una sobreexpresión de la copia silvestre y, de esta forma, asegurar con mayor rigor que la disfunción observada se debe a la mutación detectada. Para ello, se clonó el gen *TEFM* wt en un vector lentiviral de expresión en mamíferos y se incubaron aproximadamente $2 \cdot 10^6$ células de las líneas de fibroblastos de interés (Ci y P) con 50 μ l de dichas partículas lentivirales. Posteriormente y con objeto de verificar la correcta transducción, se llevó a cabo una qPCR para cuantificar la cantidad total de *TEFM* presente en las líneas celulares de interés. En concreto, se realizó utilizando SYBR Green y los resultados obtenidos fueron analizados mediante el método de aproximación $2^{-\Delta\Delta t}$ (Figura 12).

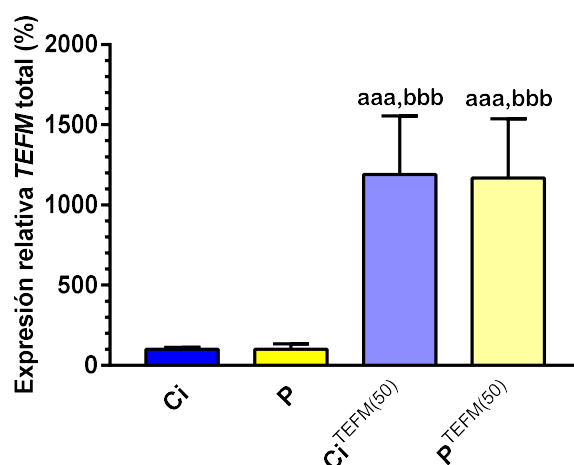


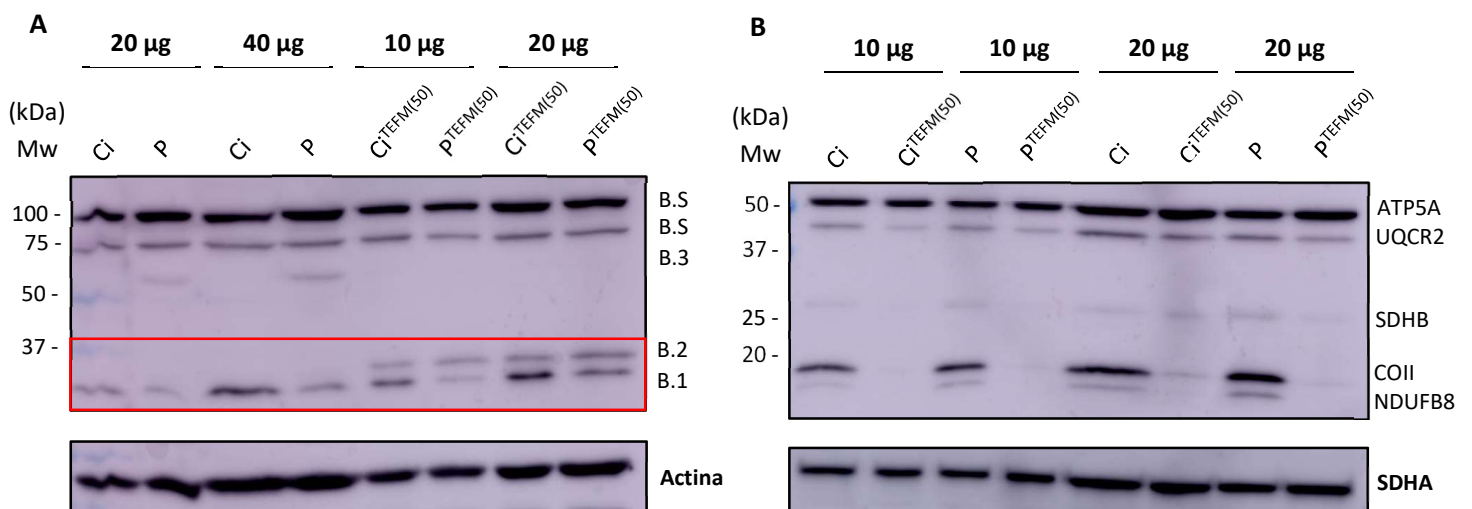
Figura 12. Cuantificación relativa con respecto a Ci de los transcritos de *TEFM* total (wt y mutado) en las líneas Ci, P Ci^{TEFM(50)} y P^{TEFM(50)}. Los datos ofrecidos son las medias de, al menos, un duplicado técnico (n=2) para cada muestra, junto a su desviación estándar. Entre control y paciente no existen diferencias significativas, mientras que ambas líneas transducidas son significativamente distintas tanto con respecto al control como con respecto al paciente sin transducir ($p < 0,0005$ en ambos casos).

Tanto en la línea Ci como en la P transducidas se detectó una expresión mucho mayor de *TEFM* total debida a la sobreexpresión del alelo wt, mientras que entre control y paciente no se detectaron diferencias aparentes en la expresión de *TEFM*, lo que sugiere que la mutación c.1036C>T no afecta a la transcripción de *TEFM*. Por tanto, puede concluirse que tras la introducción de *TEFM* wt en las líneas celulares el gen exógeno se expresa.

5.4.2 Valoración de la complementación genética en los niveles de TEFM

Desde que un gen se expresa hasta que se sintetiza la proteína para la que codifica existen diversos puntos de regulación, por lo que una mayor expresión de *TEFM* total en las líneas transducidas no tiene por qué necesariamente significar una mayor cantidad de TEFM. Para analizar este hecho se llevó a cabo la extracción total de proteínas de pellets celulares de las líneas de interés, se cuantificaron las proteínas extraídas por el método de Bradford y se llevó a cabo un Western blot, utilizando para la inmunodetección los anticuerpos de la [Tabla 17](#). En concreto, se llevó a cabo tanto la detección de la proteína TEFM como de varias subunidades de los complejos del sistema OXPHOS (en geles diferentes), es decir, NDUFB8 (CI), SDHB (CII), UQCR2 (CIII), COII (IV) y ATP5A (CIV), estando COII codificada en el mtDNA y las demás en el nDNA. Además, como estándares internos se emplearon la actina para TEFM y la SDHA para las subunidades de los complejos respiratorios ([Figura 13](#)), ya que esta última pertenece al CII, el único complejo respiratorio que no presenta subunidades codificadas en el mtDNA.

El anticuerpo contra TEFM utilizado dio lugar a la aparición de múltiples bandas entre las que las bandas 1 y 2 ([Figura 13A](#)) son correspondientes a TEFM, de acuerdo al peso molecular calculado mediante ProtParam (en función de si se tiene en cuenta el péptido señal (42 kDa) o no (38 kDa), respectivamente)⁶. Se especula que es posible que la banda 1 se corresponda con TEFM endógeno y la banda 2 con TEFM wt exógeno por sólo aparecer en las líneas transducidas (presumiblemente por experimentar un procesamiento diferente a TEFM endógeno). Así, parece haber más proteína TEFM endógena (banda 1) en las líneas Ci y Ci^{TEFM(50)} con respecto a P y P^{TEFM(50)}, respectivamente, pero no parece haber diferencias de TEFM wt exógeno (banda 2) entre las líneas transducidas. En el paciente no detectamos ninguna banda que pueda corresponder a TEFM mutado (36 kDa sin péptido señal), pero sí una superior entre 50 y 75 kDa (banda 3) que podría tratarse de TEFM mutado modificado post-traduccionalmente. En el caso de las subunidades de los complejos respiratorios no parece haber diferencias claras entre Ci y P, pero al sobreexpresar *TEFM* wt en ambas líneas existe una menor cantidad de las subunidades de los complejos mitocondriales, especialmente COII y NDUFB8 ([Figura 13B](#)).



⁶ Las bandas obtenidas presentan un menor peso molecular del esperado. Esto ocurre a veces, especialmente en el caso de las proteínas de membrana, debido a que a pesar del SDS las proteínas no se vuelven del todo lineales y, en consecuencia, experimentan un mayor desplazamiento del correspondiente a su peso molecular teórico ([Rath, Glibowicka, Nadeau, Chen y Deber, 2009](#)).

Figura 13. Detección de proteínas en las líneas celulares Ci, Ci^{TEFM(50)}, P y P^{TEFM(50)}. (A) Visualización de diferentes bandas mediante el anticuerpo contra TEFM (Tabla 17). B.1, B.2 y B.3 son banda 1, banda 2 y banda 3; B.S banda superior. Enmarcadas en rojo las bandas correspondientes a TEFM con y sin péptido señal (más información al respecto en el texto). La primera calle (Ci 20 µg) presenta bandas azules debido a un problema de carga por el que parte del marcador se traspasó a dicho pocillo. La actina fue utilizada como estándar interno. (B) Visualización de subunidades de los complejos respiratorios mitocondriales: ATP5A del CV, UQCRC2 del CIII, SDHB y SDHA del CII, COII del CIV (subunidad codificada en el mtDNA) y NDUFB8 del CI. SDHA fue utilizada como estándar interno. Ensayo: electroforesis SDS-PAGE (12,5% de porosidad el gel separador o *running* y 8% el concentrador o *stacking*) con electrotransferencia; Mw marcador de pesos moleculares; los µg que aparecen son la cantidad de proteína total cargada por pocillo.

5.4.3 Comparación de sobreexpresión y niveles proteicos según la cantidad de vector lentiviral

La menor cantidad detectada, en general, de las subunidades de los complejos respiratorios en las líneas transducidas (Figura 13B) podía deberse a haber utilizado una dosis muy elevada de partículas virales con el gen *TEFM* wt clonado (50 µl) que llevasen a un exceso perjudicial de sobreexpresión de *TEFM* wt por célula. Para averiguarlo se repitió la transducción de las líneas Ci y P con 3 µl de dichas partículas lentivirales y se cuantificaron los transcritos de *TEFM* total por qPCR con SYBR Green (Figura 14). Como resultado, se obtuvo mayor expresión que en las líneas control (Ci y P), pero menor que en las transducidas con 50 µl (Ci^{TEFM(50)} y P^{TEFM(50)}), es decir, se consiguió disminuir la expresión al reducir el número de copias del gen *TEFM* wt introducido por célula.

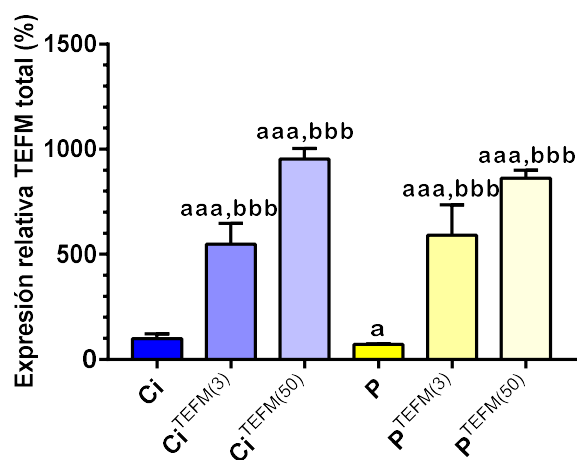


Figura 14. Cuantificación relativa con respecto a Ci de los transcritos de *TEFM* total (wt y mutado) en las líneas celulares Ci, Ci^{TEFM(3)}, Ci^{TEFM(50)}, P, P^{TEFM(3)} y P^{TEFM(50)}. Los datos ofrecidos proceden de la media de un duplicado técnico (n=2) para cada muestra, junto a su desviación estándar. Existen diferencias significativas entre control y paciente ($p < 0,05$), así como en las líneas transducidas tanto con respecto a Ci como a P ($p < 0,0005$ en ambos casos).

Una vez detectado que la dosis de vector lentiviral utilizada influía en la sobreexpresión de *TEFM* wt, volvió a valorarse la cantidad proteica tanto de TEFM como de subunidades de los complejos respiratorios mediante Western blot para las mismas muestras de proteínas extraídas y, además, Ci^{TEFM(3)} y P^{TEFM(3)} (Figura 15). Tanto en la detección de TEFM (Figura 15A) como en la de los complejos respiratorios (Figura 15B) volvieron a obtenerse aparentemente los mismos resultados que con anterioridad (Figura 13): por un lado, se detectaron las mismas bandas al

utilizar el anticuerpo contra TEFM (Figura 13A); por otro, se detectó una cantidad similar de las subunidades entre Ci y P (Figura 13B), pero una menor intensidad de banda en las líneas transducidas (incluyendo las de 3 μ l), lo que parece implicar que el efecto perjudicial de sobreexpresar *TEFM* wt es independiente del nivel de sobreexpresión.

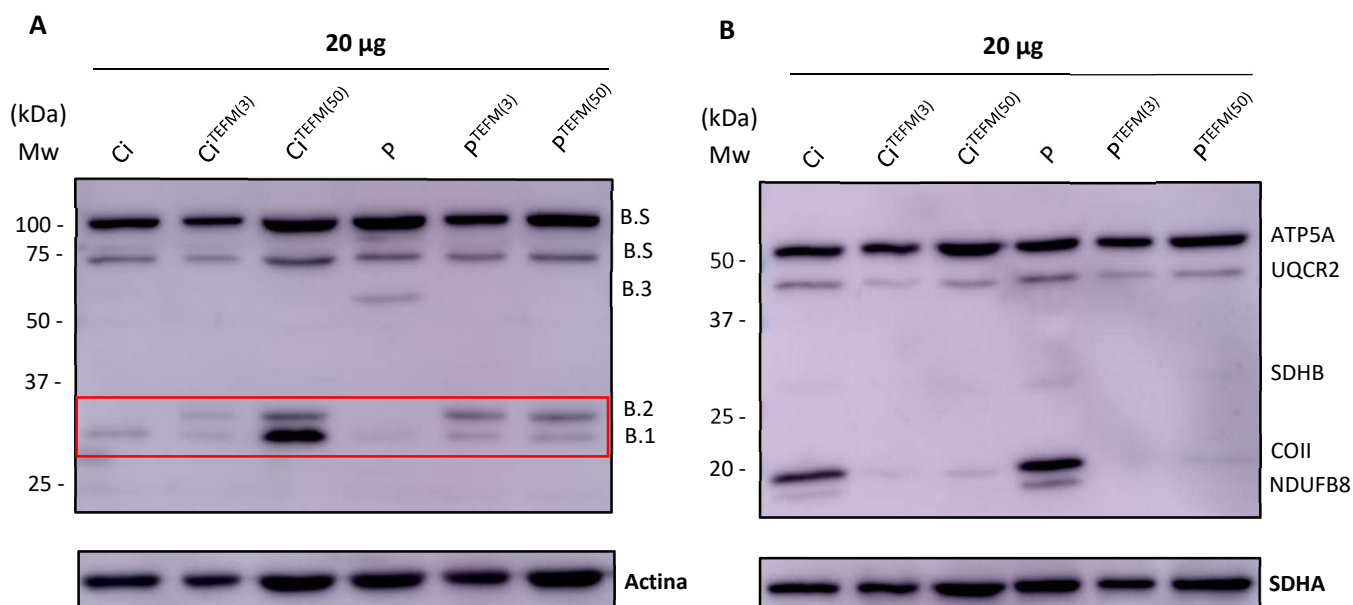


Figura 15. Detección de proteínas en las líneas celulares Ci, Ci^{TEFM(3)}, Ci^{TEFM(50)}, P, P^{TEFM(3)} y P^{TEFM(50)}. (A) Visualización de diferentes bandas mediante el anticuerpo contra TEFM (Tabla 17). B.1, B.2 y B.3 son banda 1, banda y banda 3; B.S banda superior. Enmarcadas en rojo las bandas correspondientes a TEFM con y sin péptido señal (más información al respecto en el texto). La tercera calle (Ci^{TEFM(50)}) presenta mayor intensidad de sus bandas por existir un problema de carga con las adyacentes. La actina fue utilizada como estándar interno. (B) Visualización de subunidades de los complejos respiratorios mitocondriales: ATP5A del CV, UQCR2 del CIII, SDHB y SDHA del CII, COII del CIV (subunidad codificada en el mtDNA) y NDUFB8 del CI. SDHA fue utilizada como estándar interno. Ensayo: electroforesis SDS-PAGE (12,5% de porosidad el gel separador o *running* y 8% el concentrador o *stacking*) con electrotransferencia; Mw marcador de pesos moleculares; los μ g son la cantidad de proteína total cargada por pocillo.

5.4.4 Análisis del efecto de la sobreexpresión de *TEFM* wt

Tras haber llevado a cabo la comprobación de la mayor sobreexpresión de *TEFM* wt al transducir, así como haber estudiado de forma cualitativa el efecto de la misma sobre la cantidad de proteína, se quiso valorar de forma cuantitativa la transcripción del mtDNA, los niveles proteicos de TEFM y de las subunidades de los complejos respiratorios y la presencia de complejos y supercomplejos respiratorios de estas nuevas líneas generadas, así como diferencias apreciables entre las líneas sin transducir no detectadas previamente.

5.4.4.1 Transcripción de genes mitocondriales

Se llevó a cabo la cuantificación de los transcritos de los genes mitocondriales *12S RNA*, *COI*, *ATP6*, *CYTB* y *ND6* de las diferentes líneas de estudio mediante qPCR con sondas TaqMan para cada gen de interés. Por su parte, el análisis de datos se realizó mediante el método de aproximación $2^{-\Delta\Delta t}$. En términos generales, se detectó una menor expresión de los genes analizados en las líneas transducidas, independientemente de que sobreexpresasen más o

menos *TEFM* (Figura 14), tanto con respecto al control como al paciente, siendo las diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los casos (Figura 16). Además, hubo una menor expresión en las células del paciente 3304 transducidas que en las líneas Ci transducidas, siendo especialmente evidente este hecho en la expresión del *12S RNA*, en que sólo se detectaron diferencias significativas con respecto al control y al paciente en $P^{TEFM(3)}$ y $P^{TEFM(50)}$. Todo ello sugiere que la correcta regulación de la expresión de *TEFM* es fundamental para una adecuada transcripción mitocondrial, hasta el punto de que una sobreexpresión en un sistema heterocigoto resulta más discapacitante que la propia mutación en sí.

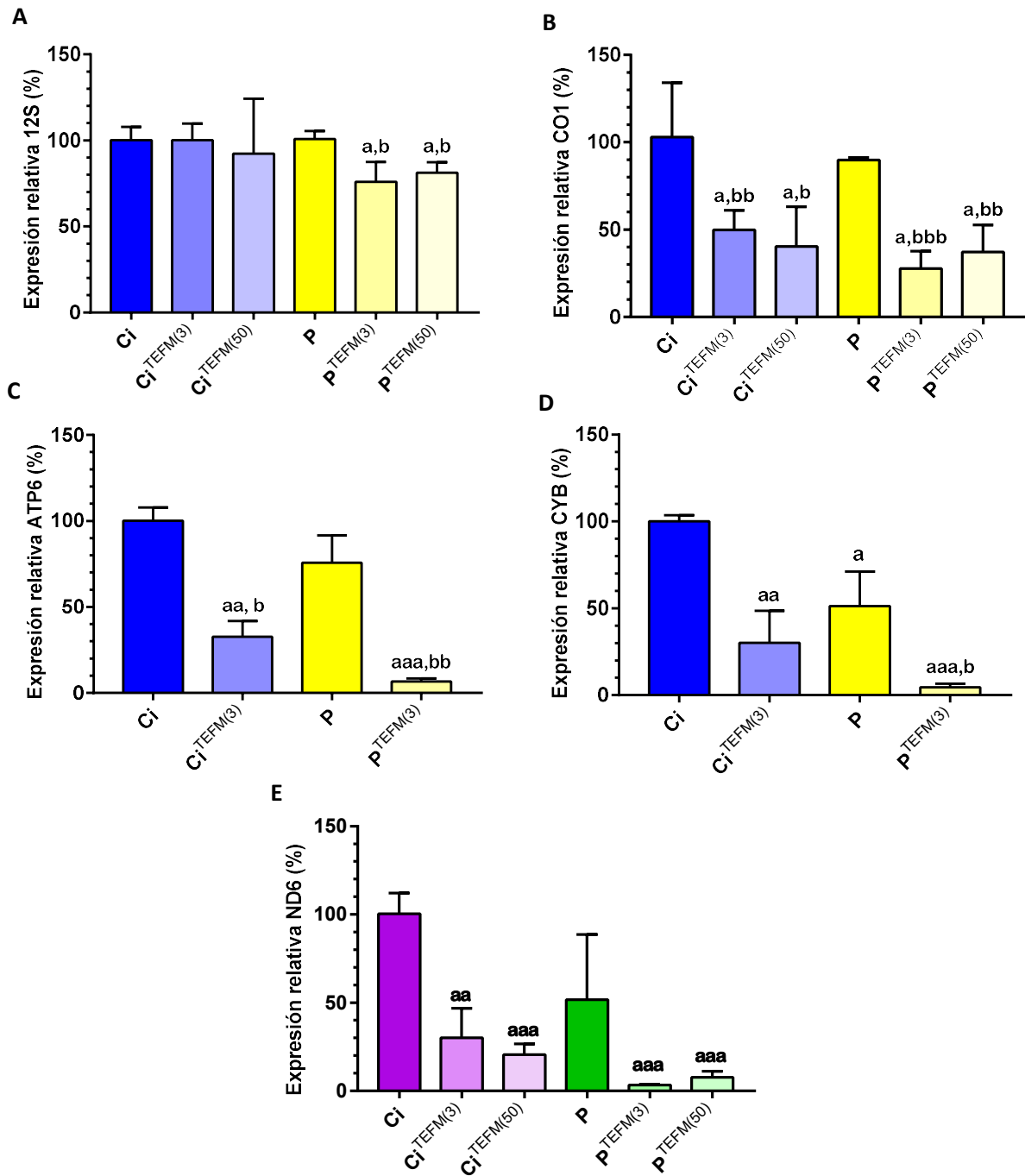


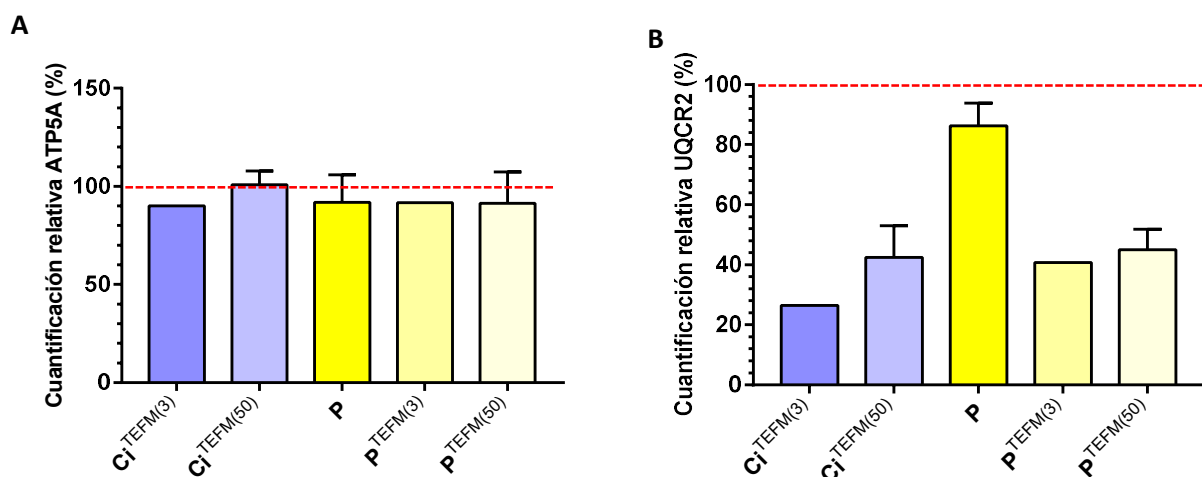
Figura 16. Niveles de expresión de genes mitocondriales con respecto a la línea Ci de las líneas celulares Ci, $Ci^{TEFM(3)}$, $Ci^{TEFM(50)}$, P, $P^{TEFM(3)}$ y $P^{TEFM(50)}$. (A) Cuantificación de la expresión de *12S RNA*. (B) Cuantificación de la expresión de *CO1*. (C) Cuantificación de la expresión de *ATP6*. (D) Cuantificación de la expresión de

CYTb. (E) Cuantificación de la expresión de *ND6*. Los datos obtenidos proceden de un duplicado técnico (n=3) para cada una de las muestras y de cada una se ofrece la desviación estándar y la significancia estadística con respecto a Ci y a P, de darse la circunstancia. En todos los casos se analizan los transcritos en las 6 líneas de estudio, con excepción de la expresión de *ATP6* (C) y *CYTb* (D), para los que de las líneas transducidas sólo se cuantificaron las de 3 µl por haber observado previamente en las demás la tendencia a disminuir la expresión en comparación con las líneas Ci y P, independientemente de haberse transducido con 50 µl o con 3 µl.

5.4.4.2 Niveles proteicos de subunidades de complejos respiratorios y TEFM

Para confirmar las valoraciones realizadas de forma previa y cualitativa sobre el efecto de la sobreexpresión en la cantidad de proteína de las líneas de estudio, se realizó la cuantificación de la intensidad de las bandas detectadas (Figura 17). Para ello, se normalizaron los datos con un estándar interno (SHDA para las subunidades de los complejos respiratorios y actina para TEFM) y se relativizaron con respecto a los valores obtenidos en la línea Ci, considerada el 100%.

En el caso de las subunidades de los complejos del sistema OXPHOS se confirma que no parece existir una evidente afectación en el paciente con respecto al control. Para la subunidad *NDUFB8* aparece un aumento de hasta tres veces su cuantificación con respecto al control, si bien las bandas detectadas con el anticuerpo contra dicho complejo fueron, en general, tenues (Figuras 13B y 15B) y, por tanto, más difíciles de ser cuantificadas con exactitud. En el caso de las líneas transducidas se cumple que existe una evidente menor cantidad de las subunidades *COII* y *NDUFB8* al sobreexpresar TEFM. En cuanto a la detección de TEFM, sólo se estudió la banda 1, por ser la única de las de interés (bandas 1-3) en poder relativizarse con respecto a Ci, y sólo se analizaron las calles de 20 y 40 µg del primer gel (Figura 13A), por tener las bandas de 10 µg una baja intensidad y por haber existido problemas de carga en el segundo gel (Figura 15A). Los resultados obtenidos confirman lo establecido previamente de forma cualitativa, con el añadido de que existe un aumento de TEFM wt endógeno en $P^{TEFM(50)}$ con respecto a P, de forma que es posible que la banda 1 no se corresponda a TEFM endógeno, sino a TEFM procesado (sin péptido señal) y la banda 2 a TEFM no procesado (con péptido señal) y que, por tanto, dicha banda sólo aparezca en las líneas sobreexpresadas como una consecuencia del exceso de transcripción y posterior síntesis de TEFM wt en las líneas transducidas, que conduce a que no todas las proteínas sintetizadas de TEFM puedan ser procesadas.



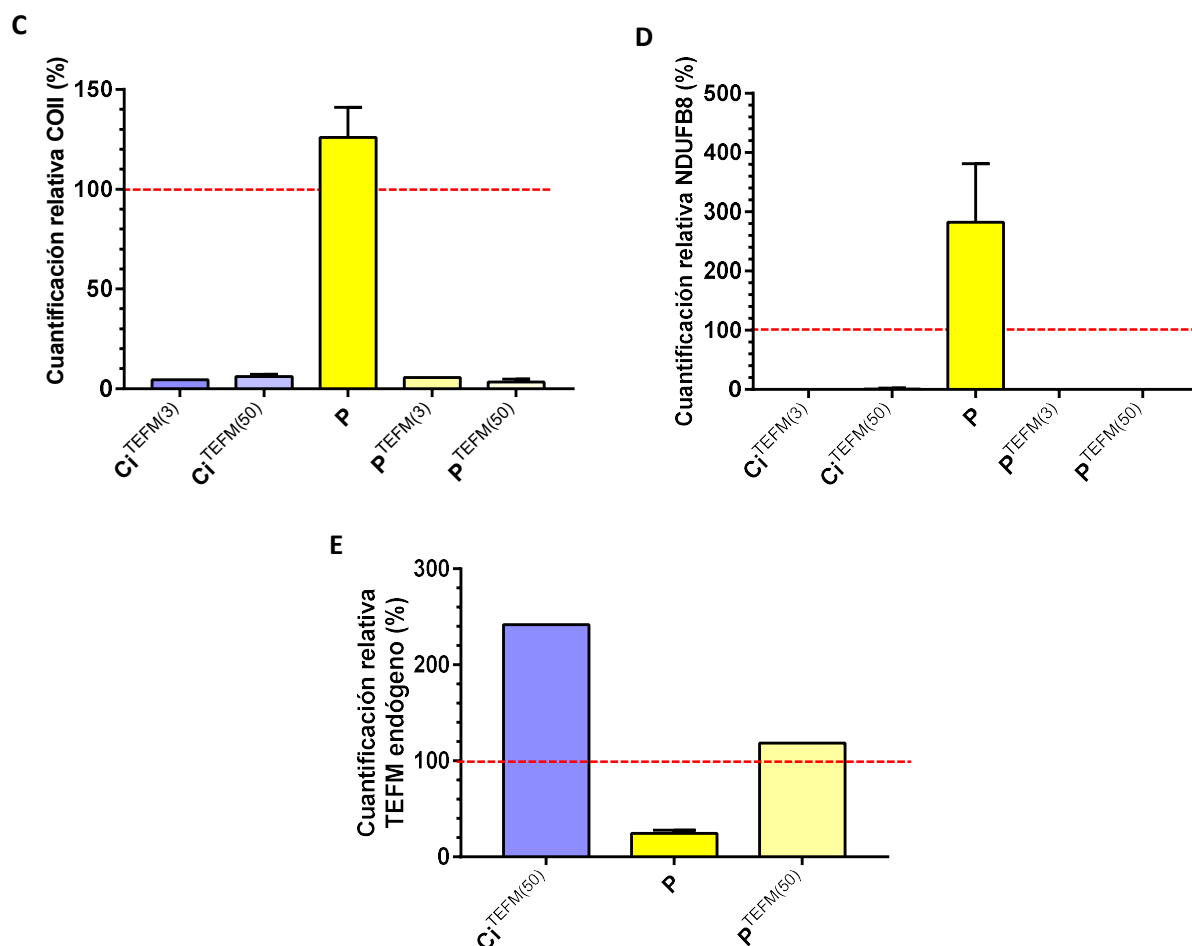


Figura 17. Cuantificación de proteínas con respecto a Ci de las líneas Ci^{TEFM(3)}, Ci^{TEFM(50)}, P, P^{TEFM(3)} y P^{TEFM(50)}. Las gráficas muestran la cuantificación relativa de la cantidad de TEFM endógeno (banda 1) (E) y de las subunidades ATP5A (A), UQCRC2 (B), COII (C) y NDUFB8 (D) de los complejos respiratorios. Los resultados ofrecidos proceden de, al menos, un duplicado técnico en caso de mostrarse desviación estándar o de un solo dato si no aparece desviación estándar para cada línea celular (n=1). La línea roja discontinua representa el valor de cuantificación de la línea Ci para cada una de las muestras (100%).

5.4.4.3 Formación de complejos y supercomplejos respiratorios mitocondriales

La valoración del estado de los complejos respiratorios mitocondriales en las líneas celulares de interés se llevó a cabo mediante la técnica BN-PAGE a partir de la obtención previa de mitoplastos. Éstos fueron tratados en primer lugar con DDM y después volvió a realizarse la experiencia utilizando digitonina con objeto de poder visualizar las interacciones entre los supercomplejos. Los resultados con DDM fueron cuantificados empleando el CII como estándar interno y tanto al utilizar DDM como digitonina pudieron detectarse los complejos mitocondriales con los anticuerpos utilizados (Tabla 18).

En los resultados obtenidos con DDM (Figuras 18A y 18B) no se encontraron diferencias en la cantidad de los complejos detectados entre los controles (Fb C y Ci) y P, con excepción del complejo I (CI), del que se obtuvo el doble en P con respecto a los controles (207% de CI en P, considerando la intensidad de señal media de los controles como el 100%). Por su parte, con digitonina (Figuras 18C y 18D) tampoco se apreciaron diferencias claras en la cantidad de los complejos entre Ci y P, pero sí se obtuvieron variaciones en la distribución de CI entre las líneas P y Ci, detectándose mayor cantidad de CI en supercomplejos en P (28% de CI en Sc) con respecto

a la línea Ci (15% de CI en Sc) (Tabla 20). Finalmente, tanto al transducir con 3 μ l (Figuras 18C y 18D) como con 50 μ l (Figuras 18A y 18B) se detectaron bandas mucho menos intensas que en Ci y P, lo que volvió a sugerir un efecto perjudicial sobre las células al sobreexpresar *TEFM* wt.

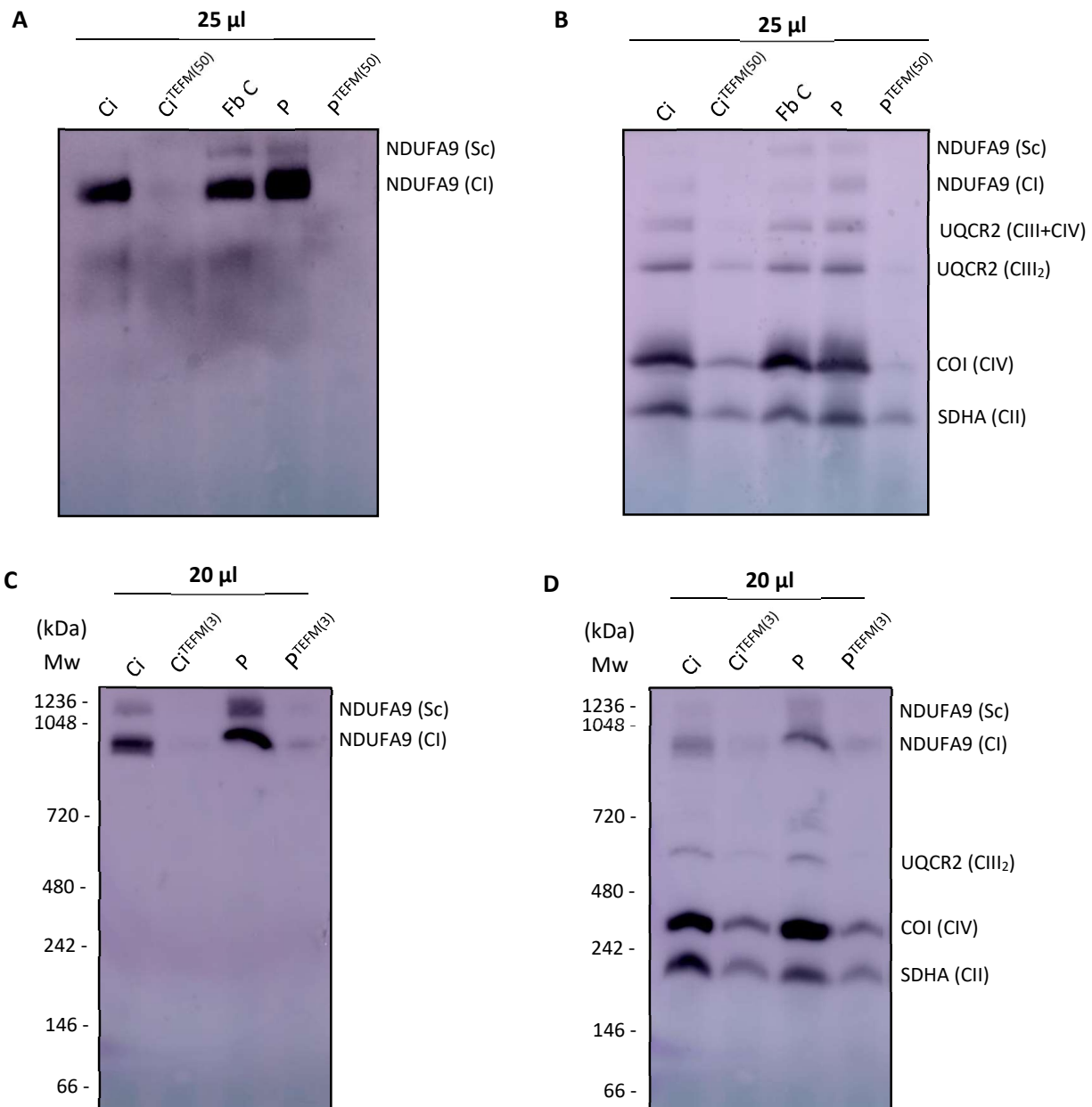


Figura 18. Detección de complejos y supercomplejos respiratorios en las líneas celulares Fb C, Ci, Ci^{TEFM(3)}, Ci^{TEFM(50)}, P, P^{TEFM(3)} y P^{TEFM(50)}. (A) y (B). Visualización de los complejos CI, CII, CIII₂ y CIV al tratar con 1% de DDM. Se aprecian bandas de supercomplejos (Sc y CIII+CIV). El complejo II (CII) fue utilizado como estándar interno. Línea Fb C: línea celular control utilizada de fibroblastos sin immortalizar procedentes de un bebé sano con 1 mes de edad. (C) y (D) Visualización de supercomplejos con CI (Sc) y complejos CI, CII, CIII₂ y CIV al tratar con 1% de digitonina. Ensayo: electroforesis BN-PAGE (geles de gradiente del 3-12% de porosidad); Mw marcador de pesos moleculares; se presupone la misma cantidad de μ g de proteína por pocillo por partir en todos los casos de $2 \cdot 10^6$ células.

Tabla 20. Distribución de la señal de NDUFA9 en banda de CI aislado y en banda de Sc

	Sc (%)	CI (%)
P	28,3408073	71,6591927
Ci	15,1974944	84,8025056

6. DISCUSIÓN

La utilización de técnicas de secuenciación masiva ha facilitado la identificación de nuevos genes y mutaciones causantes de enfermedades genéticas, incluidas las patologías mitocondriales (Calvo et al., 2012; Pronicka et al., 2016). Sin embargo, estas técnicas han conducido a su vez a un incremento de falsos diagnósticos, es decir, a considerar una variante (mutación o polimorfismo) como patológica de manera incorrecta, tal y como ha revelado el análisis de un gran número de exomas de individuos sanos (Lek et al., 2016). Por tanto, para realizar un diagnóstico genético correcto es necesario confirmar la patogenicidad de las mutaciones mediante pruebas funcionales. En este trabajo hemos llevado a cabo el estudio de la patogenicidad de la mutación c.1036C>T (Q346X en secuencia proteica humana) en *TEFM* para determinar si se trata de la etiología de la enfermedad que padece el paciente 3304.

En primer lugar, por análisis bioinformático hemos predicho que la mutación es patológica y que afecta a una región de *TEFM*, el extremo C-terminal, que se encuentra conservada entre los organismos que sintetizan a esta proteína (Figuras 6 y 7). No obstante, según nuestros datos, *TEFM* es una proteína que parece poco conservada evolutivamente entre los organismos eucariotas, si bien existen otros factores que interaccionan con sus respectivas RNA polimerasas, como es el caso del TEX bacteriano y del Spt6 eucariota, que son similares funcionalmente a *TEFM* y que comparten dominios homólogos con dicha proteína (Minczuk et al., 2011). Por su parte, mediante análisis estructural hemos mostrado interacciones entre el inter-dominio enlazante de la proteína y el mtDNA que son necesarias para la correcta función de *TEFM* (Hillen, Parshin et al., 2017) y proponemos que la pérdida del extremo C-terminal en el paciente 3304 (hélice α 1 en la Figura 8) puede llevar a una alteración del entorno de parte del inter-dominio enlazante que afecte a dichas interacciones (hélice α 2 en la Figura 8). Para confirmarlo, podría realizarse un ensayo de dicroísmo circular, valorando en los espectros resultantes si existen diferencias entre la conformación secundaria de *TEFM* wt y *TEFM* mutado.

Mediante secuenciación del mtDNA hemos caracterizado el genoma mitocondrial del paciente, sin encontrar mutaciones en el mismo, pero sí varios polimorfismos (Tabla 19) que nos han permitido establecer al paciente dentro del haplogrupo H1j2. Sin embargo, dicha clasificación es provisional, dado que los pares de bases 103-598 del fragmento 8 (Tabla 15) no hemos podido secuenciarlos correctamente. Entre dichos nucleótidos se encuentra la CSBII y, por ende, el G-quadruplex, de modo que no hemos podido determinar si el fenotipo del paciente es más o menos eficiente para la terminación de la transcripción prematura de la cadena ligera (Agaronyan et al., 2015). No obstante, la función de *TEFM* no parece verse influenciada por los polimorfismos de dicha región, produciéndose la elongación de la transcripción con la misma eficacia en todos ellos en presencia de *TEFM* (Tan et al., 2016). En consecuencia, los polimorfismos que el paciente pueda tener en dicha región no parece que vayan a ser importantes en el estudio de la patología de la mutación c.1036C>T en *TEFM*.

Como novedad, en el presente trabajo hemos llevado a cabo estudios *in vivo* con *TEFM*, realizando análisis funcionales tanto en fibroblastos control como en fibroblastos del propio paciente 3304. De esta manera, hemos podido analizar de forma directa el efecto de una mutación en *TEFM* sobre la función mitocondrial y su posible recuperación mediante

complementación genética. En este sentido, en todos los análisis realizados hemos visto que al sobreexpresar *TEFM* wt las líneas celulares se ven perjudicadas, experimentando una disfunción mitocondrial grave (Figuras 13, 15, 16, 17 y 18). Estos resultados sugieren, por un lado, que la terapia génica en pacientes con mutaciones en *TEFM* no es una opción terapéutica, aunque podrían usarse líneas transducidas con *TEFM* wt como control negativo en experimentos *in vivo* de la transcripción mitocondrial, y, por otro, que *TEFM* se trata de una proteína fuertemente regulada, ya sea a nivel de transcripción, traducción o modificaciones post-traduccionales. Esta observación sobre la regulación de *TEFM* coincide con el papel central de regulador de la transición entre la transcripción y la replicación del mtDNA que se ha propuesto para esta proteína (Agaronyan et al., 2015; Hillen, Parshin et al., 2017; Minczuk et al., 2011; Posse et al., 2015; Sultana, Solotchi, Ramachandran, Patel y Wek, 2017), así como con el hecho de que se ha predicho que si un paciente tuviese las dos copias de *TEFM* afectadas por una mutación patológica no sobreviviría, pero si sólo tuviera afectada una de las copias viviría, lo que encaja con la naturaleza heterocigota de la mutación c.1036C>T del paciente 3304 (Lek et al., 2016).

Comparando los resultados obtenidos entre fibroblastos control y fibroblastos del paciente, a nivel de expresión mitocondrial hemos detectado una tendencia a que se transcriban menos los genes de la cadena pesada del paciente cuanto más alejados estén del promotor H₂. Por su parte, de la cadena ligera hemos observado una aparente menor expresión de *ND6*, si bien la cuantificación de los transcritos de este gen fue muy variable (Figura 11). La tendencia que hemos visualizado en la transcripción de la cadena pesada coincide con la detectada al utilizar siRNAs de *TEFM*, en la que el gen menos afectado es *12S RNA* y el que más *CYTB* (Minczuk et al., 2011) y que los autores proponen como la causa de la reducción del 50% de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) que detectan en células tratadas con siRNAs de *TEFM* frente a células control. En cuanto a la variabilidad de la cantidad de los transcritos de *ND6* puede deberse a que se trate de uno de los genes del mtDNA cuya expresión y transcritos sintetizados se encuentren más regulados por ser el único gen codificante para proteína que se encuentra en una cadena diferente a los demás (Figura 2), no poliadenilarse (lo que en principio influye negativamente en su estabilidad), ser de los que menos se transcriben y de los que más expresión de RNA antisentido experimenta en comparación con su nivel de expresión con sentido (Mercer et al., 2011; Montoya, 2005). Por tanto, es de suponer que en fibroblastos del paciente exista un menor control de la regulación sobre *ND6* o simplemente que la cuantificación de los transcritos de este gen nos ha resultado más complicada por su menor nivel de expresión en comparación con otros genes mitocondriales (Mercer et al., 2011).

En cuanto a la cantidad de proteína, hemos detectado menos niveles de *TEFM* endógeno en el paciente en comparación con el control (Figura 17E) y una banda presente en el paciente, pero ausente en el resto de líneas (banda 3. Figuras 13 y 15) que podría tratarse de *TEFM* mutado modificado post-traduccionalmente, dado que no hemos detectado ninguna banda que pueda corresponderse con *TEFM* mutado (36 kDa sin péptido señal). Dicha modificación podría tratarse de una ubiquitinación que condujese a la degradación de *TEFM* mutado, explicándose así la menor cantidad de *TEFM* endógeno que hemos detectado en el paciente. Una manera de comprobarlo sería analizar la banda correspondiente mediante espectrometría de masas, separándola para ello en una electroforesis de segunda dimensión previamente. En el caso de las subunidades de los complejos respiratorios hemos observado un aumento mucho mayor de la cantidad de la subunidad *NDUFB8* en el paciente (Figura 17D), si bien para la subunidad *ATP5A*

(Figura 17A) no existen diferencias claras entre las líneas Ci y P ni al sobreexpresar *TEFM* wt. Es posible que esto último se deba a que el CV, del que forma parte la ATP5A, se encuentra dividido en dos subcomplejos (F_1 y F_0) cuya síntesis es independiente y en los que ATP5A forma parte de F_1 , mientras que las subunidades codificadas en el mtDNA (ATP6 y 8) se encuentran en F_0 (Rak, Gokova y Tzagoloff, 2011; Rühle y Leister, 2015).

Por otra parte, hemos detectado aproximadamente el doble de cantidad de CI en el paciente con respecto a los controles utilizados (líneas Fb C y Ci), así como una mayor presencia de supercomplejos (Figura 18). Ambas observaciones coinciden con el gran aumento ya comentado de la cantidad de NDUFB8 en el paciente en comparación con la línea Ci (Figura 17B). Además, hemos observado una producción de ATP mitocondrial significativamente disminuida en el paciente con respecto a la línea Fb C (Figura 10), lo que encaja con la menor expresión mitocondrial detectada en el paciente (Figura 11). Todo ello permite afirmar que el paciente 3304 experimenta disfunción mitocondrial como consecuencia de la mutación c.1036C>T en *TEFM*, que codifica para una copia de *TEFM* mutada que, de alguna forma (quizá por no ser capaz de interactuar con el mtDNA eficazmente o por experimentar modificaciones post-traduccionales que lleven a su degradación, como se ha comentado previamente, y, por tanto, a una cantidad insuficiente de *TEFM* funcional), provoca una reducción de la transcripción mitocondrial y, en consecuencia, un fallo en el sistema OXPHOS que lleva a una menor producción de ATP mitocondrial (Minczuk et al., 2011). Teniendo en cuenta que el sistema OXPHOS es el principal centro productor de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Li et al., 2013) es posible que la alteración del mismo genere más ROS y estimule al nDNA de los fibroblastos a llevar a cabo una mayor expresión y síntesis de las subunidades nucleares de los complejos respiratorios, especialmente de CI, y que estos complejos terminen agrupándose en supercomplejos para tratar de reducir los niveles de ROS, dando lugar a los supercomplejos observados en los ensayos con BN-PAGE (Anwar, Saldana-Caboverde, Garcia y Diaz, 2018).

Finalmente, el paciente 3304 experimenta disfunción hipotalámica por déficit serotoninérgico y, por tanto, se trata de una patología dependiente de tejido. Este hecho sugiere que el mecanismo propuesto de compensación del nDNA ante un fallo del sistema OXPHOS por la mutación c.1036C>T en *TEFM* sea suficiente para mantener la función celular en fibroblastos, pero no en neuronas. Además, recientemente se ha descrito que una inhibición del CI por rotenona lleva a una mayor detección del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), producto de la degradación de la serotonina, en el medio extracelular de la línea celular SH-SY5Y⁷ (de la Fuente, Burke, Eaton y Heales, 2017). Por tanto, tras haber observado en el presente trabajo que la mutación c.1036C>T en *TEFM* causa disfunción mitocondrial, para continuar con el estudio de la patología de la mutación del paciente 3304, esto es, la conexión entre *TEFM* y los niveles de serotonina, podría utilizarse la línea SH-SY5Y como modelo de estudio.

⁷ Línea celular procedente de un neuroblastoma capaz de sintetizar serotonina endógena (Islahudin et al., 2014).

7. CONCLUSIONES

7.1 Conclusiones

Las conclusiones que pueden extraerse en base a los objetivos planteados y a los resultados obtenidos en el presente trabajo son las siguientes:

- I. La proteína TEFM no se encuentra conservada evolutivamente en organismos eucariotas. No obstante, entre los organismos que la sintetizan su extremo C-terminal es importante para el correcto funcionamiento de la proteína.
- II. El paciente 3304 presenta la mutación c.1036C>T del gen *TEFM* en heterocigosis, varios polimorfismos en su mtDNA y pertenece al haplogrupo H1j2.
- III. El paciente 3304 experimenta disfunción mitocondrial. En comparación con los controles utilizados presenta menor expresión de los genes mitocondriales, menor cantidad de proteína TEFM, mayor cantidad de las subunidades COII del CIV y NDUFB8 del CI, mayor presencia de supercomplejos y, finalmente, menor producción de ATP mitocondrial.
- IV. La sobreexpresión del gen *TEFM* wt conduce a una disfunción mitocondrial pronunciada que imposibilita poder estudiar la patología del paciente 3304 por complementación genética.

7.2 Conclusions

Based on the objectives set and the results achieved in this work, conclusions obtained are the following:

- I. TEFM protein is not evolutionarily conserved in eukaryotic organisms. However, its C-terminal end it is important for the correct protein function among the organisms that synthesize TEFM.
- II. 3304 patient has heterozygous c.1036C>T mutation in *TEFM*, carries several polymorphisms in his mtDNA and belongs to H1j2 haplogroup.
- III. 3304 patient experiences mitochondrial dysfunction. Compared with controls he has lower mitochondrial genes expression, lower TEFM protein amount, higher COII (CIV) and NDUFB8 (CI) subunits amount, higher supercomplexes formation, and, finally, lower mitochondrial ATP production.
- IV. TEFM wt overexpression lead to severe mitochondrial dysfunction, thus 3304 patient pathology can not be studied by functional complementation.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agaronyan, K., Morozov, Y. I., Anikin, M. y Temiakov, D. (2015). Replication-transcription switch in human mitochondria. *Science*, 347(6221), 548–551.
- Anwar, M. R., Saldana-Caboverde, A., Garcia, S. y Diaz, F. (2018). The organization of mitochondrial supercomplexes is modulated by oxidative stress in vivo in mouse models of mitochondrial encephalopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6).
- Calvo, S. E., Compton, A. G., Hershman, S. G., Lim, S. C., Lieber, D. S., Tucker, E. J., ... Mootha, V. K. (2012). Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Science Translational Medicine*, 4(118).
- de la Fuente, C., Burke, D. G., Eaton, S. y Heales, S. J. R. (2017). Inhibition of neuronal mitochondrial complex I or lysosomal glucocerebrosidase is associated with increased dopamine and serotonin turnover. *Neurochemistry International*, 109, 94–100.
- Dinan, T. G. (1996). Minireview Serotonin and the Regulation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function. *Life Sciences*, 58(20), 1683–1694.
- Dudkina, N. V., Kouřil, R., Peters, K., Braun, H. P. y Boekema, E. J. (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797(6–7), 664–670.
- El-hattab, A. W., Craigen, W. J. y Scaglia, F. (2017). Biochimica et Biophysica Acta Mitochondrial DNA maintenance defects. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863, 1539–1555.
- Esterhuizen, K., van der Westhuizen, F. H. y Louw, R. (2017). Metabolomics of mitochondrial disease. *Mitochondrion*, 35(May), 97–110.
- ExAC. Gene: TEFM. Disponible: <http://exac.broadinstitute.org/gene/ENSG00000172171> (2018).
- Fukuoh, A., Ohgaki, K., Hatae, H., Kuraoka, I., Aoki, Y., Uchiumi, T., ... Kang, D. (2009). DNA conformation-dependent activities of human mitochondrial RNA polymerase. *Genes to Cells*, 14(8), 1029–1042.
- Heisler, L. K., Pronchuk, N., Nonogaki, K., Zhou, L., Raber, J., Tung, L., ... Tecott, L. H. (2007). Serotonin Activates the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis via Serotonin 2C Receptor Stimulation. *Journal of Neuroscience*, 27(26), 6956–6964.
- Hillen, H. S., Morozov, Y. I., Sarfallah, A., Temiakov, D. y Cramer, P. (2017). Structural Basis of Mitochondrial Transcription Initiation. *Cell*, 171(5), 1072.e10-1076.
- Hillen, H. S., Parshin, A. V., Agaronyan, K., Morozov, Y. I., Graber, J. J., Chernev, A., ... Temiakov, D. (2017). Mechanism of Transcription Anti-termination in Human Mitochondria. *Cell*, 171(5), 1082–1093.e13.
- Islahudin, F., Tindall, S. M., Mellor, I. R., Swift, K., Christensen, H. E. M., Fone, K. C. F., ... Avery, S. V. (2014). The antimalarial drug quinine interferes with serotonin biosynthesis and action. *Scientific Reports*, 4.
- Lapiente-brun, E., Moreno-loshuertos, R., Latorre-pellicer, A., Balsa, E., Perales-clemente, E., Calvo, E. y Cruz, R. (2013). Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain, (June), 1567–1570.

- Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombès, A. y Rojo, M. (2004). Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *Journal of Cell Science*, 117(13), 2653–2662.
- Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., ... MacArthur, D. G. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), 285–291.
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H. y Yang, X. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of Hematology & Oncology*, 6(1), 19.
- Linder, T., Park, C. B., Asin-Cayuela, J., Pellegrini, M., Larsson, N. G., Falkenberg, M., ... Gustafsson, C. M. (2005). A family of putative transcription termination factors shared amongst metazoans and plants. *Current Genetics*, 48(4), 265–269.
- Lodeiro, M. F., Uchida, A., Bestwick, M., Moustafa, I. M., Arnold, J. J., Shadel, G. S. y Cameron, C. E. (2012). Transcription from the second heavy-strand promoter of human mtDNA is repressed by transcription factor A in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(17), 6513–6518.
- Majorek, K. A., Dunin-Horkawicz, S., Steczkiewicz, K., Muszewska, A., Nowotny, M., Ginalski, K., y Bujnicki, J. M. (2014). The RNase H-like superfamily: New members, comparative structural analysis and evolutionary classification. *Nucleic Acids Research*, 42(7), 4160–4179.
- Mercer, T. R., Neph, S., Dinger, M. E., Crawford, J., Smith, M. A., Shearwood, A. M. J., ... Mattick, J. S. (2011). The human mitochondrial transcriptome. *Cell*, 146(4), 645–658.
- Minczuk, M., He, J., Duch, A. M., Ettema, T. J., Chlebowski, A., Dzionek, K., ... Holt, I. J. (2011). TEFM (c17orf42) is necessary for transcription of human mtDNA. *Nucleic Acids Research*, 39(10), 4284–4299.
- Montoya, J. (2005). Biogénesis y Patología Mitocondrial. *Revista de La Real Academia de Ciencias de Zaragoza*, 60, 7–28.
- Montoya, J., López-Pérez, M. J. y Ruiz-Pesini, E. (2006). Mitochondrial DNA transcription and diseases: Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1757, 1179–1189.
- Mukundan, V. T., & Phan, A. T. (2013). Bulges in G-quadruplexes: Broadening the definition of G-quadruplex-forming sequences. *Journal of the American Chemical Society*, 135(13), 5017–5028.
- Ojala, D., Montoya, J. y Attardi, G. (1981): tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, 290(5806), 470-4.
- Posse, V., Shahzad, S., Falkenberg, M., Hällberg, B. M. y Gustafsson, C. M. (2015). TEFM is a potent stimulator of mitochondrial transcription elongation in vitro. *Nucleic Acids Research*, 43(5), 2615–2624.
- Prieto-Martín, A., Montoya, J. y Martínez-Azorín, F. (2004). Phosphorylation of rat mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is required for transcription termination but not for binding to DNA. *Nucleic Acids Research*, 32(7), 2059–2068.
- Pronicka, E., Piekutowska-Abramczuk, D., Ciara, E., Trubicka, J., Rokicki, D., Karkucinska-Wieckowska, A., ... Płoski, R. (2016). New perspective in diagnostics of mitochondrial

- disorders: Two years' experience with whole-exome sequencing at a national paediatric centre. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 1–19.
- Rak, M., Gokova, S. y Tzagoloff, A. (2011). Modular assembly of yeast mitochondrial ATP synthase. *EMBO Journal*, 30(5), 920–930.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G. y Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE, 106(6), 1760–1765.
- Rühle, T. y Leister, D. (2015). Assembly of F1F0-ATP synthases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847(9), 849–860.
- Shokolenko, I. N. y Alexeyev, M. F. (2017). Mitochondrial transcription in mammalian cells. *Frontiers in Bioscience*, 22(6), 835–853.
- Sultana, S., Solotchi, M., Ramachandran, A., Patel, S. S. y Wek, R. C. (2017). Transcriptional fidelities of human mitochondrial POLRMT, yeast mitochondrial Rpo41, and phage T7 single-subunit RNA polymerases. *Journal of Biological Chemistry*, 292(44), 18145–18160.
- Tan, B. G., Wellesley, F. C., Savery, N. J. y Szczelkun, M. D. (2016). Length heterogeneity at conserved sequence block 2 in human mitochondrial DNA acts as a rheostat for RNA polymerase POLRMT activity. *Nucleic Acids Research*, 44(16), 7817–7829.
- Thompson Legault, J., Strittmatter, L., Tardif, J., Sharma, R., Tremblay-Vaillancourt, V., Aubut, C., ... Villeneuve, J. (2015). A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome. *Cell Reports*, 13(5), 981–989.
- Vieira, P. C., Fátima, M. y Silva, G. F. (2002). A Rapid and Simple Method for Determination of 5-Hydroxytryptophan in Dietary Supplements by Capillary Electrophoresis. *J. Braz. Chem. Soc.*, 13(1), 115–118.
- Wanrooij, P. H., Uhler, J. P., Shi, Y., Westerlund, F., Falkenberg, M. y Gustafsson, C. M. (2012). A hybrid G-quadruplex structure formed between RNA and DNA explains the extraordinary stability of the mitochondrial R-loop. *Nucleic Acids Research*, 40(20), 10334–10344.
- Wyatt, H. D. M. y West, S. C. (2014). Holliday junction resolvases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(9), 1–29.
- Zollo, O., Tiranti, V. y Sondheimer, N. (2012). Transcriptional requirements of the distal heavy-strand promoter of mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(17), 6508–6512.

9. ANEXOS

9.1 Secuencia codificante y proteica de TEFM (NCBI)

Nucleotide Sequence (1083 nt):

ATGAGCGGGTCTGTCTCTTCACGGCGGGAGAGAGGTGGAGATGCTTTCTGACCCCGTCGAGGTCATCCC
TGTACTGGGCCTTACATAATTTCTGCTGTCGGAAAAATCCACTACACCTAAGAAAATTACTCCCAATGT
TACTTTTTGTGATGAAAATGCAAAGGAGCCCGAAAAATGCACTTGACAAGCTTCTCTTTCAGAACAGCAG
GCTTCCATCTTGCATGTGTTGAATACAGCATCTACTAAAGAACTTGAAGCTTTCCGATTGCTTCGTGGAA
GAAGGTCCATCAATATCGTAGAGCACAGAGAAAACCTTTGGGCCATTTTCAGAATTTAGAGAGTTTAAATGAA
TGTGCCCTTGTTTAAGTATAAAAAGTACAGTTCAAGTTTGTAACCTCATACTTTGTCCAAAGACTGGACGG
GAAAAAAGAAAAGTCACCGAAAAACCGTTCCCTGAGAAAAGCTCCTCAAACCAGACATAGAAAAGAGAAAGAC
TTAAGGCAGTTAATAGTATCATATCTATCGTTTTTGGTACTCGAAGAATTGCCGTTGGGCTCACCTTGATCG
TAAGTTGACAGTGTCTGGACTGGCAGCAAAGTGACCGTTGGAGTTTAAATGAGAGGAATATACTCATCATCA
GTCTATTTAGAAAGAGATTTCCCTCGATCATTTCAAAGATGCCATAAGCAGATTTCTATGTTCTGGAAAAAA
CAGGACTTTCCATTCAGAACTCATCTCTGTTTCCAATACTGTTACATTTTCATATCATGGAAGCCATGCT
GTATGCCTTATTAATAAAAACCTTTTGCCCAGGATGGGCAGCATCAGGTGCTGAGCATGAATCGAAATGCA
GTGGGGAAGCATTTTGAACTGATGATTGGTACTCCCGGACTAGTGAAAAGAGCTAGTGAAGCAGTTTC
TCTTCGATTCTATACTGAAGGCGGATCCTCGGGTGTCTTCCCATCAGATAAAAATAGTTCACTACAGACA
GATGTTTTTATCTACTGAACTACAAAAGAGTAGAAGAGCTTTATGATTCATTATTA^{CAA}GCTATTGCCTTC
TATGAATTAGCAGTGTGACTCTCAGCCTTAG

Translation (360 aa):

MSGSVLFTAG^ERWRCFLTPSRSSLYWALHNFCCRKKTTPKKITPNVTFCDENAKEPENALDKLFSSEQQ
ASILHVLNTASTKELEAFRLLRGRSINIVEHRENFQPFQNLLESLMNVPLFKYKSTVQVCNSILCPKTGR
EKRKSPENRFLRLLKPDIERERLKA^VNSIISIVFGTRRIAWAHLDRKLTVLDWQQSDRWSLMRGIYSSS
VYLEEISSIIISKMPKADFYVLEKTGLSIQNSSLPFILLHFHIMEAMLYALLNKTFADGQHQVLSMNRNA
VGKHFELMIGDSRTSGKELVKQFLFDSILKADPRVFFPSDKIVHYRQMFLSTELQRVEELYDSSL^QAIAF
YELAVFDSQP

Fig. S1. Secuencia codificante de TEFM (1083 nt) y secuencia proteica primaria de TEFM (360 aa). En amarillo aparece señalado el codón CAA (codificante para la Q346) afectado por la mutación c.1036C>T, que pasa a ser el codón de parada TAA de acorde al código genético del nDNA humano. La alternancia entre los colores negro y azul de las secuencias se corresponde con los diferentes exones de la secuencia codificante del gen, estando la mutación localizada en el exón 4.

9.2 Frecuencia de la mutación c.1036C>T en *TEFM* (ExAC)

Variant	Chrom	Position	Consequence	Filter	Annotation	Flags	Allele Count	Allele Number	Number of Homozygotes	Allele Frequency
17:29226234 G / A	17	29226234	p.Gln346Ter	PASS	stop gained	LC LoF	1	120002	0	0.000008333

Fig. S2. Datos de ExAC sobre la mutación c.1036C>T (p.Gln346Ter/p.Q346X en secuencia proteica) de *TEFM*. La frecuencia de la mutación es de 0,000008333 y, por tanto, catalogada como singleton o mutación descrita en un único caso.

9.3 Relaciones filogenéticas entre TEFM humano y TEFM homólogos de otras especies

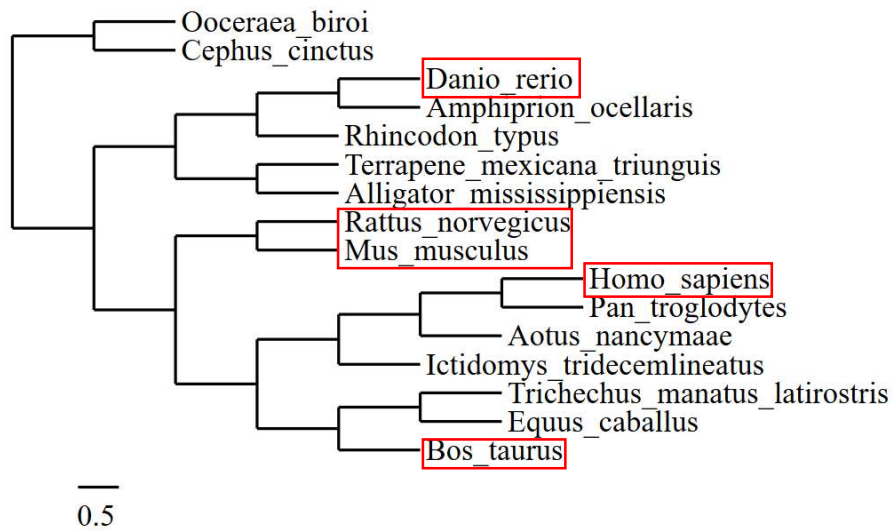
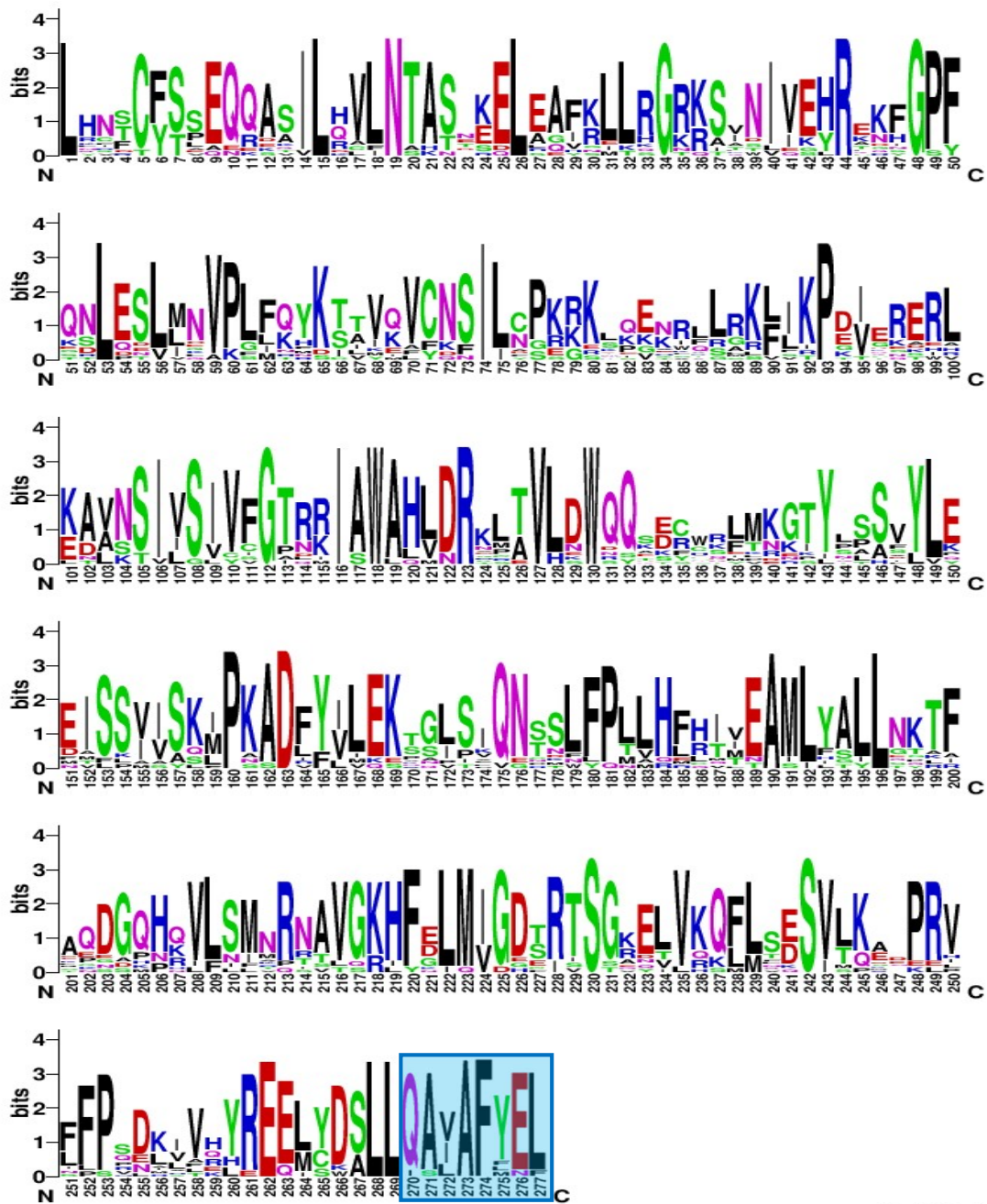


Fig. S3. Dendrograma de 16 especies con proteínas TEFM homólogas a la humana. El dendrograma se corresponde con un cladograma y, por tanto, sólo informa de las proteínas TEFM homólogas a la humana más cercanas o más alejadas de la misma evolutivamente. Empezando por *Ooceraea biroi* y terminando por *Bos taurus* los nombres comunes de las especies que aparecen son: los dos primeros son insectos, los tres siguientes peces, después tortuga, caimán, rata, ratón, hombre, monos (los dos siguientes), ardilla, manatí, caballo y, por último, toro. Enmarcadas en rojo se muestran las únicas especies en las que existen constancia experimental de TEFM, según datos de UniProt.

9.4 Conservación de los residuos afectados por la mutación c.1036C>T



weblabgo.berkeley.edu

Fig. S4. Logo de secuencia de la proteína TEFM. Logo de secuencia obtenido a partir del alineamiento múltiple compactado de 16 secuencias de proteína TEFM de animales eucariotas. Enmarcados en azul los residuos conservados en las especies analizadas y afectados por la mutación c.1036C>T. Los números de secuencia se corresponden a los de los residuos conservados y no los de la proteína completa.