



Fundación Mencía Soler Lavín

Proyecto de Investigación

EQUIPO INVESTIGADOR

Dr. Ramon Martí Seves, Investigador Principal (CIBERER - U701)

Dr. Javier Torres Torronteras, Investigador Postdoctoral

Dra. Yolanda Cámara Navarro, Investigadora Postdoctoral Sénior

Raquel Cabrera Pérez, Investigadora Predoctoral

» **Institución**

Fundación Hospital Universitario Vall d'Hebron - Institut De Recerca (VHIR)

» **Contacto**

Passeig Vall d'Hebron, 119-129

08035 - Barcelona

Tel. 93 489 40 54

ramon.marti@vhir.org

www.fundacionmencia.org



Generación de un ratón knockin para una mutación en el gen *GFM1* como modelo de estudio de la hepatoencefalopatía por disfunción del factor de elongación mitocondrial *G1*

Las enfermedades mitocondriales son aquellas enfermedades genéticas que tienen en común la disfunción del Sistema OXPHOS (fosforilación oxidativa), cuya función es la producción de ATP mediante la generación de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La producción de ATP en las mitocondrias representa el 90 % de la energía usada por las células en mamíferos, por lo tanto, una característica en común entre las enfermedades mitocondriales es el déficit energético a nivel celular. Es por ello que en este tipo de patologías, a pesar de que el cuadro clínico se manifiesta de forma muy heterogénea, los tejidos que principalmente se ven afectados son aquellos que presentan una mayor demanda energética.

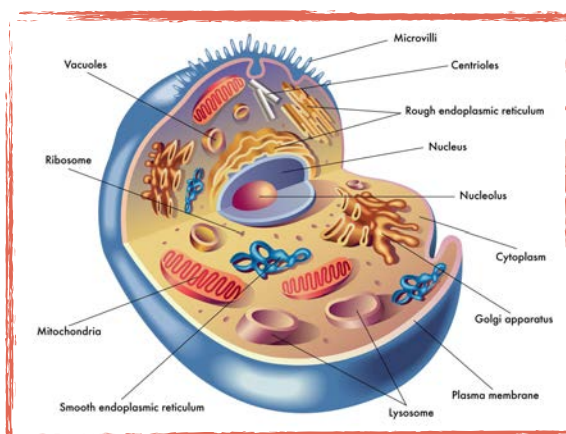


El sistema OXPHOS está compuesto por 5 complejos multiprotéicos, 4 de ellos (CI – CIV) forman parte de la cadena de transporte electrónico que genera el gradiente electroquímico en la membrana mitocondrial interna. El quinto (CV o ATPasa) es el responsable de síntesis de ATP. Estos complejos están formados por subunidades proteicas que están codificadas bien

por genes del DNA nuclear (nDNA), o por genes del DNA mitocondrial (mtDNA). El genoma mitocondrial consta de una molécula circular de DNA de doble cadena de 16.5 kb de tamaño. El mtDNA contiene los genes que codifican 13 polipéptidos de los complejos CI, CIII, CIV y CV, el rRNA de las dos subunidades ribosomales mitocondriales y los 22 tRNAs mitocondriales. El genoma mitocondrial está altamente compactado ya que todos estos genes se encuentran en ambas cadenas, carecen de regiones intrónicas y únicamente existe una región no codificante que corresponde al D-loop. Todas las proteínas codificadas en el mtDNA se localizan en la membrana mitocondrial interna formando parte del sistema OXPHOS, pero el resto de componentes mitocondriales, que incluyen la mayoría de los péptidos del

OXPPOS y otras proteínas implicadas en la transcripción, traducción replicación y mantenimiento del mtDNA, están codificadas en el nDNA. Por lo tanto, es necesaria una expresión coordinada entre los dos genomas para el correcto funcionamiento del sistema OXPPOS.

Las enfermedades mitocondriales pueden ser causadas por mutaciones en el mtDNA, las cuales son transmitidas por herencia materna, o causadas por mutaciones en el nDNA y transmitidas mediante herencia mendeliana. Las mutaciones en el nDNA pueden afectar a genes implicados en diferentes procesos relacionados directa o indirectamente con la biogénesis del sistema OXPPOS, como es el proceso de traducción de proteínas mitocondriales. Las mitocondrias tienen su propio mecanismo para la síntesis de proteínas que difiere tanto del citosólico como del mecanismo de traducción de proteínas en procariotas. Sin embargo, en todos ellos la traducción sigue los mismos pasos: iniciación, elongación y terminación, en las que participan diferentes factores, como los tRNAs y rRNAs codificados en el mtDNA, y proteínas ribosomales, proteínas de ensamblaje ribosomal, aminoacil-tRNA sintetasas, enzimas modificadoras de tRNAs y factores de iniciación, elongación y terminación codificados en el nDNA.



Se han descrito patologías humanas causadas por mutaciones en factores que intervienen en la regulación del proceso de traducción, aunque el cuadro clínico asociado es muy variable ya que se han descrito manifestaciones neurológicas, cardíacas, hepáticas o hematológicas.

La hepatoencefalopatía por deficiencia combinada de la fosforilación oxidativa tipo 1, debida a mutaciones en el gen *GFM1*, es una enfermedad mitocondrial que afecta a la síntesis intramitocondrial de proteínas. Se trata de una enfermedad grave, que se manifiesta de forma temprana después del nacimiento, afecta principalmente al hígado y al cerebro y evoluciona rápidamente causando la muerte de los pacientes durante los primeros meses de vida, aunque algunos pacientes sobreviven más allá de los 2 años o incluso los 6 años de edad. Hasta el momento sólo se han descrito en la literatura científica 12 casos con mutaciones en *GFM1*; se trata, por tanto, de una enfermedad muy infrecuente.

Nuestro proyecto tiene como objetivo el desarrollo y caracterización de un modelo de ratón modificado genéticamente que contenga la mutación en el gen Gfm1

equivalente a la que presentan aquellos pacientes con el cuadro clínico menos grave. Se espera que la generación de este ratón permita disponer de un modelo animal que manifieste un fenotipo clínico y molecular similar al de los pacientes y que esté al alcance de toda la comunidad científica para estudiar la enfermedad y posibles terapias, incluyendo la terapia génica.

De hecho, la generación de modelos animales que mimetizan las enfermedades genéticas es un paso necesario para descifrar los aspectos desconocidos de estas patologías. En nuestro caso, además, se trataría del primer modelo murino de una enfermedad genética que afecta a la elongación en la síntesis mitocondrial de proteínas.

Este proyecto no sólo resultará un herramienta valiosa para el desarrollo y validación de aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de pacientes con hepatoencefalopatía por mutaciones en GFM1, sino que también nos permitirá conocer mejor las consecuencias de la alteración de la síntesis mitocondrial de proteínas en un modelo de mamífero, lo cual ayudará a entender mejor los mecanismos fisiopatológicos de otras enfermedades similares, es decir, aquellas que también afectan a la síntesis mitocondrial de proteínas, debidas a mutaciones en otros genes. Entre estas enfermedades podemos mencionar la acidosis láctica neonatal debida a mutaciones en MRPS16, MRPS22 o RMND1, la paraplejia espástica debida a mutaciones en SPG7, u otras enfermedades igualmente graves debidas a mutaciones en los genes PUS1, TUFM, TSFM, C12orf65, TRMU, DARS2 o TACO1.

Aunque en la mayoría de estos casos los datos de prevalencia de estas enfermedades indican que su frecuencia es muy baja, también es cierto que más de la mitad de los pacientes se han identificado en los últimos 5 años, probablemente debido a un mayor conocimiento de estas patologías y al uso de técnicas avanzadas de diagnóstico genético por secuenciación masiva.

La divulgación de los resultados obtenidos a partir de nuestro proyecto y la disponibilidad del ratón generado ayudarán a mejorar el conocimiento de estas enfermedades y contribuirá a crear sinergias de las cuales se puedan llegar a beneficiar, a medio o largo plazo, los pacientes de enfermedades pertenecientes a este grupo, que son todas ellas graves y sin cura efectiva en la actualidad.

PRESUPUESTO.

1. Gastos de personal

Contratación Investigador postdoctoral año 1 — 39.000 €

Contratación Investigador postdoctoral año 2 — 39.000 €

Contratación Investigador postdoctoral año 3 — 39.000 €

Subtotal gastos personal (incluye cuotas patronales de la seg. social) **117.000 €**

2. Gastos de ejecución – Bienes y Servicios

Subcontratación de la creación del ratón KI constitutivo — 18.000 €

Subcontratación de la creación del ratón KI condicional — 58.700 €*

Compra del ratón Cre Tg(Nefh-cre)12Kul/J — 2.500 €*

Gastos de estabulario (tarifas estabulación, anestésicos, tests sanitarios, etc) — 15.000 €

Reactivos de biología molecular (enzimas, substratos, anticuerpos, sondas, etc)— 20.000 €

Reactivos marcados radioactivamente — 15.000 €

Material general de laboratorio (plástico, guantes, pipetas, etc.) 5.000 €

Tarifas de servicios internos (unidad científica de apoyo) o externos (microscopio confocal, secuenciación, IRM, etc) — 8.000 €

Subtotal gastos de ejecución - Bienes y Servicios 142.200 €

*No será necesario en caso de que el modelo KI constitutivo sea viable.

3. Cómputo global

Total 259.200 €

*En caso que el modelo KI constitutivo sea viable el total será de **198.000 €**

