

I.3. RETINOSIS PIGMENTARIA AUTOSOMICO DOMINANTE (RPAD)

La enfermedad RP con un patrón autosómico dominante afecta por igual a varones y mujeres. Se transmite en herencia de generación en generación y los portadores varones o mujeres tienen una probabilidad del 50% de transmitirlo a sus descendientes. Este tipo de herencia nos indica que el defecto genético que produce la enfermedad se localiza en uno de los cromosomas no sexuales, autosomas, del paciente (Fishman GA. y cols., 1985).

I.3.1. Rasgos fenotípicos en RPAD

La RPAD es la forma hereditaria en general menos grave, con aparición de síntomas de manera más tardía y progresión más lenta que otros tipos de RP. La agudeza (AV) y el campo visual (CV) se conservan durante más tiempo y el electroretinograma (ERG) es conservado en mayor porcentaje (sobre todo mixto y conos), aunque de amplitud disminuida, hasta su total abolición en la mayoría de los casos.

La mayoría de los árboles genealógicos de las familias afectadas por RPAD muestran una penetrancia completa. Sin embargo, se dan casos de familias que presentan una penetrancia incompleta de la enfermedad. Esta forma de herencia destaca entre las otras por su gran variabilidad fenotípica que puede darse de forma tanto intra como interfamiliar.

Clínicamente se consideran tres tipos de RPAD (Berson EL., 1993; Shastry B., 1994): difuso (tipo I), regional (tipo II) y sectorial (tipo III).

El fenotipo difuso se caracteriza por una severa disfunción de conos y bastones y la aparición de cambios de pigmentación difusos.

El tipo regional se caracteriza por la afectación o abolición de la respuesta del electroretinograma (ERG) de los bastones, mientras que se mantiene una respuesta ERG considerable de los conos.

Por último, el tipo sectorial presenta una relativa preservación de la función de bastones y conos pero con cambios de pigmentación en la zona inferior de la retina.

Los tres tipos no se han presentado nunca juntos en una misma familia por lo que constituyen entidades genéticamente separadas.

I.3.2. Genes asociados a RPAD

I.3.2.1. RHO

El gen de la rodopsina fue el primer gen caracterizado asociado a la RP (Drya y cols., 1990). Se localiza en el cromosoma 3 en la región 3q21-q24. Clonado por Nathans y Hogness en el año 1984 (Nathans and Hogness. 1984). Su tamaño es de algo más de 6 kilobases. Su estructura consta de cinco exones interrumpidos por cuatro intrones. En la región 5' del gen, se localizan las secuencias del promotor que regulan su expresión específica en los bastones.

Experimentos de aislamiento del núcleo celular, con incorporación de precursores nucleotídicos marcados sobre el ARN transcrito primario nuclear ("nuclear runoff"), junto con el análisis de "Northern blot" de ARN citoplasmático, han demostrado que la expresión de rodopsina se encuentra regulada a un nivel transcripcional y no post-transcripcional (Treisman JE. y cols., 1988; Timmers AM. y cols., 1993).

Estudios realizados sobre la secuencia promotora de este gen distinguen dos regiones *cis*-reguladoras diferentes, la región RPPR ("rhodopsin proximal promoter region") que abarca desde la posición -170pb hasta la +170pb (Kumar R. y cols., 1994; Chen S. y cols., 1996) y la región RER ("rhodopsin enhancer region") que abarca unos 100pb y se localiza en la región 5', aproximadamente a

dos kilobases del sitio de inicio del ARNm, actuando como un potenciador de la expresión de rodopsina (Nie Z. y cols., 1996). La región RPPR es suficiente para la expresión específica de los bastones (Zack y cols., 1991; Lem y cols., 1991).

Estudios *in vitro* han delimitado secuencias de ADN, Ret-1/PCE-1 (Kumar R. y cols., 1994; Morabito MA. y cols., 1991), BAT-1 (DesJardin LF. y cols., 1996), eopsin-1 (Ahmad J. 1995), Ret-4 (Chen S. y cols., 1996) y NRE (Rehemtulla A. y cols., 1996), que son reconocidas específicamente por proteínas implicadas en la regulación transcripcional de la expresión de la rodopsina.

Factores de transcripción como los codificados por los genes NRL y CRX, asociados también a retinopatías, se unen específicamente a algunas de estas secuencias (Kummart y cols., 1996; Chen y cols., 1997).

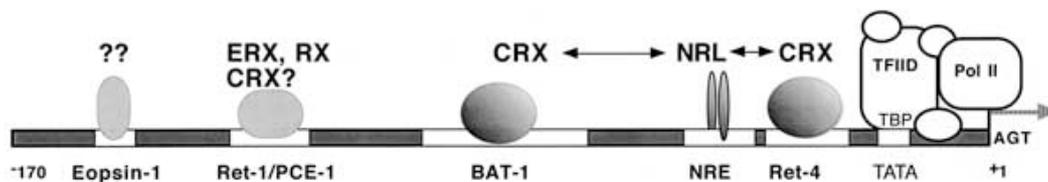


Figura 7. Esquema de la región RPPR del promotor del gen de la rodopsina.

El gen RHO codifica una proteína de 348 aminoácidos. La rodopsina es un receptor acoplado a proteína G (“G-protein-coupled receptor”, GPCR), altamente especializado para la captación de fotones en las células bastón de la retina de los vertebrados. Su estructura consta de siete dominios transmembrana, un dominio citoplasmático y un tercer dominio intradiscal (Fig.8).

La proteína rodopsina constituye cerca del 80-90% del componente proteico del segmento externo de los bastones (Guyton, 1992). La opsina, apoproteína de la rodopsina (no lleva unido todavía el fotorpigmento, 11-cis-retinal), sufre modificaciones post-traduccionales por la adición de dos oligosacáridos mediante N-glicosilación en las asparaginas 2 y 15, además de la palmitoilación de las cisteínas 322 y 323 con las cadenas de ácidos grasos embebidos en la bicapa lipídica. La opsina, tras ser N-glicosilada en el retículo endoplasmático, se transporta hasta la membrana plasmática a través del aparato de Golgi. Una vez

allí, se une al cis-retinal mediante un enlace de base de Schiff protonada (PSB) en el residuo aminoácido Lys 296. La región C-terminal de la proteína, situada en el segmento citoplasmático, es fosforilada reversiblemente en residuos serina y treonina, por el enzima específico rodopsin kinasa, durante el proceso de fototransducción (Chabre y Deterre, 1989).

Se han generado ratones “knockout” del gen de la rodopsina para el estudio de retinosis pigmentaria (Humphries y cols., 1997). Este tipo de ratón se designa como rho -/- mientras que éstos cruzados con normales generan ratones tipo rho +/- . Los estudios morfológicos de los ratones rho -/-, animales que no tienen el gen de la rodopsina, muestran ausencia de segmentos externos en los conos perdiendo sus fotorreceptores en las tres primeras semanas de vida. Sobre la octava semana no se detecta ninguna señal en los ERG. Estos ratones permiten obtener transgenes donde se obvia el fondo genético debido a los alelos normales del ratón.

Los ratones rho +/- son animales con sólo un alelo del gen de la rodopsina. Los estudios morfológicos de las retinas de estos animales muestran la presencia de células fotorreceptoras pero de forma desorganizada. En ratones de edad avanzada se observa un acortamiento de la membrana externa de los bastones. La respuesta de estos ratones a los ERG y adaptación a la luz es prácticamente normal. La gran mayoría de las mutaciones de rodopsina se presentan en los pacientes de RP en heterocigosis. Este último sería el modelo de ratón elegido para su estudio, pero los estudios realizados muestran una afectación significativa de estos animales debido a la haploinsuficiencia del gen de la rodopsina, que debe tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados de los experimentos transgénicos.

Se han descrito hasta el momento más de cien mutaciones en el gen de la rodopsina que causan la enfermedad retinosis pigmentaria (RetNet; HMGD).

El tipo de mutación encontrado en la rodopsina es principalmente de carácter puntual, es decir, se produce el cambio de un solo nucleótido en la secuencia de ADN. Estas mutaciones en la mayoría de los casos ocasionan el cambio de un aminoácido en la secuencia primaria de la proteína.

Experimentos in vitro han demostrado que los cambios en la estructura primaria de la rodopsina comportan, en la mayoría de los casos, un cambio en la estructura de ésta y por tanto una pérdida o variación de su funcionalidad y/o transporte (Sung CH. y cols. 1991,1993; Liu X. y cols. 1996; Andrés A, tesis doctoral, 2002; Andrés A. y cols. 2003).

En algunos pocos alelos se han observado mutaciones del tipo deleciones (falta de nucleótidos en la secuencia de ADN), inserciones o mutaciones puntuales que producen un codón de finalización prematura de la proteína (Inglehearn CF. y cols., 1991; Horn M. y cols., 1992; Rosenfeld PJ. y cols., 1992; Bareil C. y cols., 1999). En todos los casos anteriores se obtiene una proteína anómala no funcional.

La mayoría de los alelos mutantes encontrados en rodopsina producen RP con un patrón de herencia autosómico dominante (RPAD). Sin embargo, se han detectado tres alelos que producen una RP autosómica recesiva (RPAR) (Kumaranickavel y cols., 1992, Rosenfeld y cols., 1992), así como uno que no produce RP sino ceguera nocturna congénita (Dryja y cols., 1993).

Esta diferencia de fenotipos nos da idea de la complejidad del mecanismo patológico de la RP. Estudios realizados con modelos animales en los que se han introducido alteraciones en el gen Rho, sugieren un tipo de mecanismo patológico de “ganancia de función” o efecto negativo del alelo mutado (Olson JE. y cols., 1992; Humphries M. y cols., 1997).

I.3.2.2. RDS-periferina y ROM1

El gen RDS-periferina se aisló y caracterizó a partir de una cepa de ratón denominada rds (“retinal degeneration slow”). Esta cepa de ratones tiene una inserción de 10 kb en el gen RDS que le causa la enfermedad RP. El gen RDS-periferina humano, localizado en el cromosoma 6 (6p21) se aisló y caracterizó por el grupo de Travis (Travis y cols.1991a, 1991b). La proteína periferina codificada en humanos, muestra con la de ratón una homología mayor del 90 %.

El gen RDS-periferina tiene una estructura compuesta por tres exones y dos intrones. Se expresa en conos y bastones. Codifica una proteína de 346 aminoácidos que se localiza en el borde externo del disco. Su estructura consta de cuatro segmentos transmembrana, un dominio citoplasmático y otro intradiscal (Arikawa y cols., 1992) (Fig.10).

El gen ROM1 (“rod outer segment membrane protein 1”) se aisló y caracterizó a partir de una librería de ADNc por presentar un 35% de homología en su secuencia con el gen RDS-periferina (Bascom y cols.1992). El gen ROM1 se localiza en el cromosoma 11 (11p13), su estructura consta de tres exones y dos intrones (Bascom y cols., 1993a). Codifica una proteína de 351 aminoácidos que, al igual que la periferina, se localiza en los bordes externos de los discos de conos y bastones. Su estructura proteica, al igual que la periferina, consta de cuatro segmentos transmembrana, un dominio estructural citoplasmático y otro intradiscal.

Las proteínas Rds-periferina y Rom1 tienen siete cisteínas conservadas en su estructura primaria. Estos residuos Cys tienen un papel importante en el mantenimiento de sus estructuras terciarias y cuaternarias. Así, ambas proteínas forman homodímeros a través de enlaces covalentes por puente disulfuro. Estos homodímeros interaccionan entre sí mediante enlaces no covalentes para formar una estructura tetramérica (Goldberg y cols., 1995; Kedzierski y cols., 1999).

La función asignada a las proteínas Rds-periferina y Rom1 es de carácter estructural. La periferina parece implicada en la curvatura periférica de la membrana de los discos y también en el anclaje de los discos con el citoesqueleto. Se han realizado estudios con ratones rds *-/-*, observándose la

ausencia de segmento externo en los fotorreceptores, por lo que esta proteína es esencial para la biogénesis de éstos (Sanyal S. y cols., 1980; Kedzierski W. y cols., 1999).

Hasta el momento se han descrito más de 70 mutaciones en el gen RDS-periferina en familias con degeneraciones retinianas autosómico dominantes y tres polimorfismos comunes (RetNet; Arikawa y cols., 1992). Sin embargo, estas mutaciones expresan un fenotipo más heterogéneo que el encontrado en el gen RHO, probablemente debido a su expresión en ambos tipos de células fotorreceptoras. Así, se han asociado a mutaciones en este gen los fenotipos de RPAD, retinosis "punctata albescens", distrofia de conos y bastones (CORD) y distintos tipos de distrofias maculares (DM) como DM en patrón, DM en mariposa, DM viteliforme y fundus flavimaculatus (Wells y cols., 1993; Nichols y cols., 1993; Weleber y cols., 1993; Reig C. y cols., 1995; Keen and Ingelhearn, 1996; Kohl y cols., 1997).

Las distrofias maculares presentan en general un patrón de herencia autosómico dominante y un fenotipo cuyas características principales son: afectación central de la retina, disminución de la agudeza visual, alteración de la visión en color y fondo de ojo, y ERG con respuesta de conos alterada (<http://www.retina-international.org/sci-news/rdsmut.htm>)

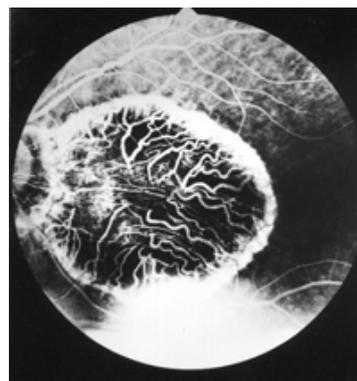
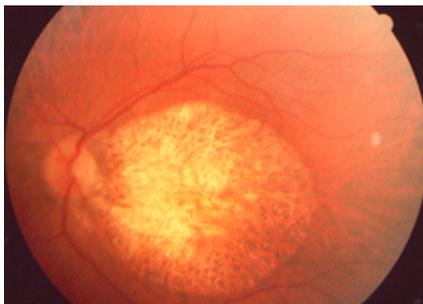


Figura 9. Fondo de ojo y angiografía de un paciente afectado de DMAD. Ambas imágenes permiten apreciar la afectación central de la retina a diferencia del fondo de ojo de un paciente afectado de RP (Figura 5) en el que se aprecia una degeneración retiniana periférica. Estas pruebas oftalmológicas permiten establecer claramente un diagnóstico diferencial entre ambas degeneraciones retinianas.

Se han detectado mutaciones en el gen ROM1 en familias RPAD. Sin embargo, no se ha podido establecer en ninguna de estas mutaciones una relación unívoca con RP (Bascom y cols., 1993b, Bascom y cols., 1995).

Se ha demostrado en unas pocas familias que, sólo los pacientes que presentan mutación en el gen ROM1 y RDS-periferina expresan un fenotipo de RP. Este tipo de mecanismo de expresión de la enfermedad se denomina digénico (Kajiwara y cols., 1994, Dryja TP. y cols., 1997).

Estudios de modelos de ratón donde el gen ROM1 ha sido abolido ("knockout"), demuestran que la proteína Rds-periferina es suficiente para la morfogénesis del segmento externo de los bastones y que la proteína Rom1 interviene en la regulación de la morfogénesis de los discos y en la viabilidad de los bastones ya que estos ratones, presentan unos discos más largos, un segmento externo desorganizado y una muerte lenta de los bastones por apoptosis. También se observa que la respuesta máxima de los bastones en estos mutantes es más baja que en los controles. Así, estos estudios concluyen que mutaciones en este gen podrían generar una degeneración recesiva de los fotorreceptores (Clarke G. y cols., 2000).

Todos estos resultados establecen serias dudas sobre el papel que el gen ROM-1 pueda ejercer en la patogenia de RPAD.

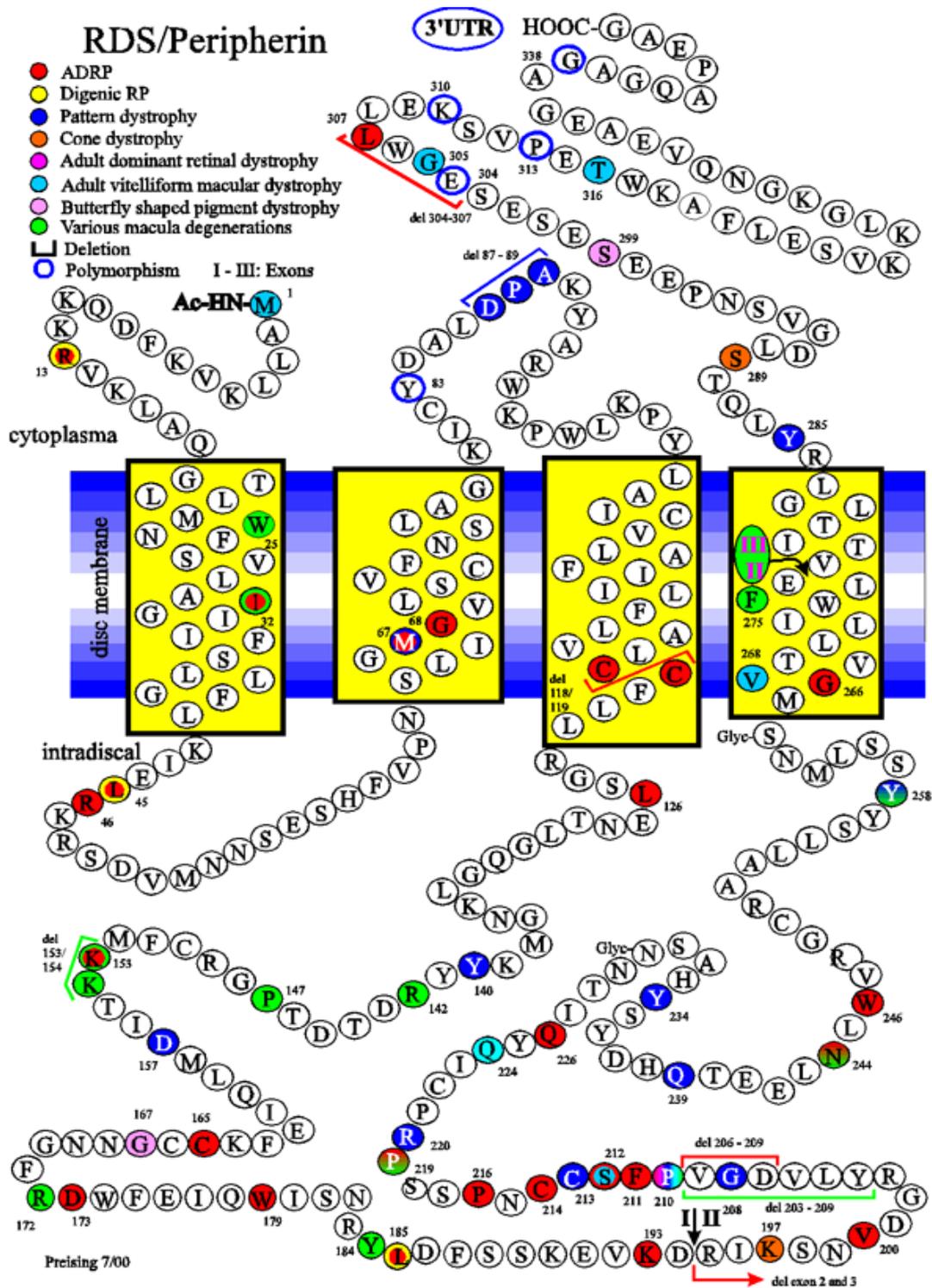


Figura 10. Esquema de la proteína Rds-periferina (Preising 7/00; Retina Internacional Newsletter) con las mutaciones descritas hasta el año 2000. Los distintos fenotipos y tipos de herencia correspondientes a cada mutación se indican con diferentes colores. La expresión de esta proteína tanto en conos como en bastones puede ser el origen de la variedad de fenotipos que originan distintas mutaciones en el gen RDS-periferina (por ejemplo RP y DM).

I.3.2.3. RP1

El gen RP1 (retinitis pigmentosa 1), se ha asociado a RPAD (Bowne SJ. y cols., 1999), y recibe su nombre por ser un gen localizado en la primera región cromosómica descrita mediante ligamiento de marcadores para la RP (Blanton y cols., 1991; Guillonneau X. y cols., 1999).

Esta región se expande a lo largo de 4 Mb en el cromosoma 8 (8q). Es una región parcialmente equivalente (sinténica) con la del cromosoma 4 de ratón. El uso de EST, fragmentos de genes aislados de una librería ADNc, en este caso de retina, permitió asignar dos de estos EST a la región de 4 Mb humana y de ratón. La búsqueda del gen correspondiente en una genoteca de levadura permitió clonar el gen RP1. La localización de este gen constituye un ejemplo del método de ligamiento (Sullivan y cols., 1999, Pierce y cols., 1999).

RP1 es un gen específico de los fotorreceptores cuyo nivel de expresión *in vivo* está regulado por los niveles de oxígeno en la retina (Pierce E. y cols., 1999). Su estructura está compuesta por cuatro exones y tres intrones. El cuarto exón tiene un tamaño considerable y se extiende a lo largo de 4 kb.

El gen RP1 codifica una proteína de 2.156 aminoácidos. La función de esta proteína en humanos no está descrita todavía. Sin embargo, la región N-terminal de la proteína Rp1 presenta una homología bastante significativa con la proteína humana doblecortina (DCX). Se ha demostrado que esta región de DCX interacciona con los microtúbulos (Gleesson JG. y cols., 1999; Horesh D. y cols., 1999) y estudios recientes han localizado esta proteína en el cilio tanto de conos como de bastones (Liu O. y cols., 2002). Se ha descrito una relación entre un mutante de la proteína DCX y anomalías cerebro-corticales (Gleesson JG. y cols., 1998).

Estudios con modelos de ratón “knockout” para este gen, atribuyen a la proteína Rp1 un importante papel en la correcta morfogénesis del segmento externo del fotorreceptor y en el transporte de rodopsina al segmento externo del mismo (Gao J. y cols., 2002). Estos estudios constituyen un buen modelo para futuros estudios funcionales de Rp1 en retina.

Se han detectado algunas mutaciones en este gen relacionadas con RPAD. La mayor parte de las mutaciones descritas se localizan en una región de unas 1000pb que se encuentran dentro del exón 4 de este gen. La mayoría de estas mutaciones dan lugar a la proteína Rp1 truncada (Sullivan y cols., 1999; Pierce y cols., 1999; Payne A. y cols., 2001).

También se han descrito mutaciones que generan una proteína truncada en su extremo C-terminal y no desencadenan RP (Baum L. y cols., 2001). Estos resultados podrían reforzar los estudios descritos anteriormente que adjudican un papel esencial al extremo N-terminal de la proteína en su función.

I.3.2.4. NRL, CRX y FIZ1

El gen NRL (“neural retina leucine zipper”) se aisló a partir de una librería de sustracción de retina como gen específico que se expresaba en retina adulta y células de retinoblastoma pero no en otros tejidos adultos.

El gen NRL se localiza en el cromosoma 14 (14q11). Se ha comprobado que el gen NRL es muy conservado y se expresa en la retina de los vertebrados adultos.

La estructura del gen consta de tres exones separados por dos intrones. El primer exón no contiene secuencias que codifiquen la proteína. Las secuencias codificantes se encuentran en los exones 2 y 3 del gen (Swaroop y cols., 1992; Farjo y cols., 1995).

Se han encontrado distintas mutaciones en el gen NRL causantes de RPAD (Bessant y cols., 1999; Martínez-Gimeno y cols., 2001; De Angelis MM. y cols., 2002). Sólo se han detectado, hasta el momento, dos variaciones de secuencia (mutaciones silenciosas) en la secuencia codificante del gen NRL, lo que indica el grado elevado de conservación de la secuencia.

La proteína codificada por el gen NRL contiene, en su extremo carboxi terminal, un dominio básico y una estructura en cremallera de leucinas (“leucina zipper”), que le permite una unión específica al ADN. Es miembro de la familia bZIP de proteínas de unión al ADN. Presenta una gran homología con su análogo en

ratón. Puede formar homodímeros y heterodímeros con otras proteínas como Maf y varios miembros de la familia de las oncoproteínas c-jun y c-fos.

La proteína Nrl es un factor de transcripción (Farjo Q. y cols., 1997) que regula la expresión de la rodopsina en los bastones. Nrl se une de forma específica a la secuencia consenso de ADN: TGCN₆₋₈NGCA (Rehemtulla y cols. 1996). En la región promotora del gen de la rodopsina se localiza una región de unión con la proteína Nrl, NRE ("Nrl response element"), que abarca aproximadamente desde el nucleótido -40 hasta el -80 de la región promotora. Esta región se conserva en los promotores del gen RHO bovino y de roedores (Rehemtulla y cols. 1996, Kummar y cols., 1996). Estudios sobre el efecto regulador de la transcripción de esta proteína sobre el promotor de la rodopsina revelan que la región localizada justo por encima de la región NRE y que abarca desde el nucleótido -84 hasta el -130, también responde a los homodímeros de Nrl con una expresión aún mayor de rodopsina.

Al igual que otros factores de transcripción de la familia bZIP a la que pertenece, la proteína moduladora Nrl presenta dos dominios distintos (Swaroop A. y cols., 1992).

En la primera mitad de la proteína, codificado por el exón 2 del gen, se encuentra un dominio de transactivación (TA) rico en residuos de prolina, serina y treonina.

En el extremo carboxi-terminal de la proteína se encuentra el dominio de unión al ADN (DB; "DNA Binding"), codificado por el exón 3 del gen, que contiene una cremallera de leucinas que utiliza para formar dímeros, precedida de una serie de aminoácidos básicos implicados en la unión al ADN.

El gen CRX ("cone-rod homeobox") se expresa mayoritariamente en los fotorreceptores y pinealocitos. Se localiza en el cromosoma 19 (19q13.3). La estructura del gen consta de tres exones y dos intrones.

El gen CRX está localizado en la región cromosómica previamente asociada a distrofia de conos y bastones (CORDII). El análisis de mutaciones en estos pacientes demuestra que mutaciones en el gen CRX segregan de forma autosómica dominante con la enfermedad CORDII (Swain y cols., 1997; Freund y cols., 1997) y retinosis pigmentaria (Rivolta C. y cols., 2001).

Además, se han detectado mutaciones en CRX en casos de amaurosis congénita de Leber (Swaroop y cols., 1999).

La frecuencia de mutaciones causantes de RPAD en este gen es muy baja.

La proteína Crx codificada por el gen CRX consta de 299 aminoácidos con un dominio "homeobox" en la región N-terminal. Regula la expresión del gen RHO mediante interacción con las regiones Ret-4 y/o BAT-1 localizadas en la región RPPR del promotor del gen de la rodopsina (Chen, S. y cols., 1997). Reconoce *in vitro* la secuencia de ADN: TAATCC/A, esta secuencia la encontramos en la región promotora de varios genes específicos de las células fotorreceptoras como son los genes que codifican las proteínas rodopsina, arrestina, subunidad β de la cGMP-Fosfodiesterasa en los bastones y "interphotoreceptor retinoid binding protein" (IRBP) (Furukawa y cols., 1997; Chen y cols., 1997). Muchos de estos genes parecen necesitar también la presencia de este factor de transcripción para su expresión normal *in vivo* (Furukawa y cols., 1999; Livesey y cols., 2000; Bibb y cols., 2001).

Nrl y Crx interaccionan físicamente *in vivo* (Mitton KP, y cols., 2000) y actúan sinérgicamente en los ensayos de actividad transcripcional en el promotor del gen RHO (Chen y cols., 1997).

Recientemente se han realizado estudios para la identificación de moduladores sinérgicos o antagónicos de la actividad reguladora de la proteína Nrl en la retina. El cribado de una librería de ADNc de retina bovina mediante la técnica del doble-híbrido en levaduras, revela la existencia de una proteína que interacciona con la región N-terminal de Nrl, de función desconocida y que presenta gran homología con la proteína Fiz1 de ratón. Estos estudios demuestran que Fiz1 actúa como represor de la transactivación, mediada por Nrl pero no la mediada por Crx, en la actividad del promotor de la rodopsina en células transfectadas (Mitton KP. y cols., 2003).

Fiz1 se expresa en retina y puede tener un papel regulador de la señal de transducción en bastones, modulando como represor la actividad transcripcional de Nrl (Mitton KP. y cols., 2003). Este gen es, por lo tanto, un gen candidato de retinosis pigmentaria.

I.3.2.5. FSCN2

El gen de la fascina, FSCN2, tiene una expresión específica en retina. Se aisló a partir de una librería de ADNc de retina bovina, se localiza en el cromosoma 17 (17q25) (Saishin Y. y cols., 1997; Bardien-Kurger S. y cols., 1999; Tubb BE. Y cols., 2000)

Este gen consta de cinco exones y cuatro intrones que codifican una proteína de 492 aminoácidos, con un peso molecular de 55,057 kDa.

Esta proteína presenta una homología del 94% con la fascina de retina bovina y de un 56% con la humana.

El análisis de la región promotora de este gen revela secuencias consenso de unión al ácido retinoico y varias zonas potenciales de unión para los factores de transcripción Crx y Nrl.

La proteína de retina fascina, tiene un papel importante en la morfogénesis de los discos de las células fotorreceptoras, permitiendo el ensamblaje y empaquetamiento de los microfilamentos de actina en la célula (Saishin Y. y cols., 2000).

Este gen se ha asociado con RPAD y DMAD. Hasta el momento sólo se ha descrito una mutación causante de RP (Wada Y. y cols., 2001; Wada Y. y cols., 2003) en la población japonesa. También se han detectado cinco mutaciones polimórficas en la misma población (Nakazawa M. y cols., 1991).

I.3.2.6. Genes de expresión ubicua

Las distrofias retinianas hereditarias tienen su origen molecular en la presencia de mutaciones que se transmiten en el genoma de una a otra generación. Estas mutaciones se localizan mayoritariamente en genes que están relacionados con el desarrollo, estructura y función de la retina. Sin embargo, en el último año se ha descubierto que mutaciones en genes con expresión ubicua producen retinosis pigmentaria y estas mutaciones son patológicas sólo en retina y no en otros tejidos donde también se expresan (McKie A. y cols., 2001; Bowne SJ. y

cols., 2002; Chakarova C. y cols., 2002; Kennan A. y cols., 2002; Makarova O. y cols., 2002; vanLith-Verhoeven y cols., 2002;).

Mutaciones encontradas en los genes de expresión ubicua PRPF3 (RP18), PRPF8 (RP13) y PRPF31 (RP11), factores de procesamiento o empalme (“splicing”) del pre-RNA_m (Wang F. y cols., 1997), han sido recientemente asociadas a RPAD (Chakarova C. y cols., 2002; Makarova O. y cols., 2002; McKie A. y cols., 2001; vanLith-Verhoeven y cols., 2002; Martínez-Gimeno y cols., 2003).

A pesar de su expresión ubicua, las mutaciones encontradas en estos genes en humanos parecen producir efectos patológicos únicamente en retina.

Estos tres genes de expresión ubicua codifican proteínas componentes de la partícula tri-snRNP U4/U6-U5, que se une y se disocia dinámicamente en cada ciclo de “splicing”.

El gen PRPF31 codifica una proteína de 61kDa. Experimentos *in vitro* han demostrado que esta proteína es esencial para el ensamblaje de la partícula tri-snRNP. Mutaciones en este gen disminuyen la frecuencia de empalme del RNA_m primario en la célula (Vithana EN. y cols., 2001). Algunas de estas mutaciones presentan una penetrancia incompleta por lo que podría hablarse de un mecanismo patológico de haploinsuficiencia más que de un efecto dominante negativo (Martínez-Gimeno y cols., 2003).

El gen PRPF8 codifica una proteína de 2335 aminoácidos, componente del “core” de U5snRNP (Lao H. y cols., 1992; Brown J. y cols., 1992).

El gen PRPF3 contiene una región que parece ser esencial para la interacción proteína-proteína (Heng H., 1998).

Las mutaciones encontradas hasta ahora en los genes PRPF8 y 3 se localizan en zonas concretas que abarcan 14 codones (exón 42) y 2 codones (exón 11) respectivamente, mientras que las mutaciones encontradas en el gen PRPF31 quedan más dispersas a lo largo del gen.

Otro gen de expresión ubicua en el que se han encontrado mutaciones asociadas a RPAD (RP10) y en un caso a DMAD, es el gen IMPDH1 (Inosina monofosfato deshidrogenasa tipo I) (Bowne S.J. y cols., 2002 y 2003; Kennan A. y cols., 2002; Grover S. y cols., 2003; Wada Y. y cols., 2003).

Las mutaciones descritas en este gen de expresión ubicua parecen ser patológicas únicamente en retina.

La proteína IMPDH cataliza la conversión del inosinmonofosfato (IMP) a xantosina monofosfato (XMP), que es un paso limitante en la biosíntesis del nucleótido guanidina.

Estudios de expresión génica de mutantes de este gen, Arg224Pro y Asp226Asn, demuestran que las proteínas mutantes presentan una disminución de su solubilidad respecto a la normal pero no parece haber cambios en la actividad enzimática de éstas. Estos estudios concluyen que estas mutaciones no alteran el sitio activo del enzima. En cualquier caso, sí parecen afectar a la solubilidad/estabilidad de la proteína (Aherne A. y cols., 2003).

El hecho llamativo de que el efecto patológico que inducen mutaciones en estos genes de expresión ubicua sea exclusivo en retina, requerirá futuros estudios sobre el mecanismo patológico que estas alteraciones puedan inducir. Se ha propuesto que la expresión de estos alelos mutados produce una haploinsuficiencia u otro mecanismo que impide que el alto requerimiento metabólico de los fotorreceptores pueda satisfacerse. Esta insuficiencia metabólica puede dirigir a la célula fotorreceptora a la apoptosis.

En la población española se han detectado mutaciones en genes de expresión ubicua (Martínez-Gimeno M. y cols. 2003) asociados a RPAD, citados anteriormente. Los resultados del estudio de estos genes, no se presentan en esta tesis ya que ésta abarca sólo el estudio de genes de expresión específica en retina, pero sí son objeto de otra tesis doctoral en el grupo.

I.4. MECANISMOS MOLECULARES TERAPIA GENICA EN RP. SITUACION ACTUAL

La RP es una enfermedad que actualmente no tiene cura. Una de las líneas de investigación de la retinosis pigmentaria en general y de la RPAD en particular se orienta a la comprensión de los mecanismos moleculares que desencadenan la enfermedad, con el objetivo de diseñar terapias adecuadas para su curación (Bessant DA. y cols., 2001).

Un hecho significativo en RPAD es que la presencia de una mutación en un gen no sólo causa defectos en la función específica de la proteína que codifica, sino que desencadena la degeneración de la célula en la que se expresa y, por extensión, la de la retina. Por ello, el enfoque sobre las terapias moleculares para pacientes de RPAD debe partir del hecho (al menos en la mayoría de los genes hasta ahora asociados a RPAD) que los alelos portadores de la mutación desencadenan un efecto dominante negativo. La eliminación del efecto negativo exige el reemplazo de este alelo o la eliminación y/o bloqueo total o parcial de su producto génico (RNA mensajero o proteína) (Sullenger BA, y cols., 1994).

Una de las vías de estudio de los mecanismos moleculares que inducen la aparición de una patología consiste en el análisis de expresión génica celular o de tejido y su comparación con sus equivalentes normales. En el caso de las enfermedades retinianas, esto supone un problema debido a la imposibilidad de obtener biopsias de los pacientes durante el transcurso de la enfermedad. Por tanto, la expresión de los alelos mutados y los efectos moleculares que inducen su expresión en la retina no se pueden estudiar en los pacientes de RP.

En cuanto a la funcionalidad de los alelos mutados de genes relacionados con RPAD, uno de los métodos para estudiar la estructura y función de las moléculas mutantes consiste en expresarlas en sistemas celulares *in vitro*.

Es probable que los pacientes con patrón de herencia RP dominante exijan terapias diferentes a la de los pacientes recesivos. Sin embargo, también es probable que la muerte de los fotorreceptores, independientemente de la mutación o gen anómalo que la causa, siga una ruta común que es la muerte

celular programada o apoptosis. Así, la cura parcial o total de la RP podría consistir también en detener los procesos degenerativos a través de terapias que actuasen sobre el proceso degenerativo de la retina sorteando de esta forma la heterogeneidad mutacional característica de esta enfermedad. Estudios en esta dirección son por ejemplo los realizados con ribozimas, caspasas y factores neurotróficos y de crecimiento (La Vail MM. y cols., 1998; Farrar GJ, y cols., 2002). De ahí la importancia que adquiere en este campo la investigación fisiológica y farmacológica.

Recientemente se han obtenido buenos resultados en la transferencia de genes a retinas animales mediante inyección. La utilización de vectores de transferencia derivados de virus de ADN permite una mayor eficiencia en la transferencia génica así como una menor reacción inmunológica (Sarra GM. y cols., 2002). Un ejemplo reciente de la investigación en este campo han sido los experimentos de terapia génica que han permitido rescatar el fenotipo salvaje (WT) del ratón *rds* (-/-) mediante la transferencia del gen normal *rds*-periferina (Ali y cols., 2000). Otro experimento destacable en esta misma línea es la recuperación de la visión en un perro RPE65 -/-, afectado de amaurosis congénita de Leber, mediante la transferencia del gen RPE65 (WT) (gen de expresión específica de epitelio pigmentario de la retina) utilizando un adenovirus (AAV) como vector de transferencia (Acland GM, y cols., 2001). Avances en este tipo de experimentos abren expectativas sobre la terapia génica, al menos en los casos recesivos de RP, en los que parece que los dos alelos mutados provocan un efecto de falta de función del gen.

Otra línea de investigación se centra en el uso de ribozimas (Berzal-Herranz A, y col., 1997; Sullivan JM. y cols., 2002). Las ribozimas son moléculas sencillas de ARN que tienen una acción catalítica (nucleasa) sobre moléculas de ARN. Se diseñan ribozimas que reconocen secuencias específicas de ARN y son capaces de producir cortes en ellas de una forma similar a las enzimas de restricción. Ya se han empleado ribozimas en experimentos con ratones transgénicos portadores de mutaciones en el gen de la rodopsina como Pro23His (O'Neill y cols., 2000), con resultados que parecen indicar un efecto eficiente en el retraso y eliminación del desarrollo de RP en ratones.

Otras aproximaciones terapéuticas de actualidad se basan en el trasplante de células retinianas en el espacio subretinal (Coffey PJ. y cols., 2002) y la implantación de microchips que generan impulsos eléctricos haciendo de “retinas artificiales” (Chow AY. y cols., 2002).

Se han hecho varios intentos en este campo. La obtención de células adecuadas y la reconstrucción de tejidos parecen ser los problemas básicos en los trasplantes, que podrían tener solución a partir del uso de células madre (“stem cells”) (Tropepe V. y cols., 2000) o de las actualmente controvertidas técnicas de clonación.