

Introducció

To suppose that the eye with all its inimitable contrivances
for adjusting the focus to different distances,
for admitting different amounts of light,
and for the correction of spherical and chromatic aberration,
could have been formed by natural selection,
seems, I confess, absurd in the highest degree.

Charles Darwin, *The Origin of Species*.

El terme RETINITIS PIGMENTÀRIA designa un conjunt heterogeni de distròfies retinals que afecten, en primer terme, un dels dos tipus de neurones fotoreceptores de la retina, els bastons. La mort dels fotoreceptors –característica fonamental d'aquesta patologia–, que s'esdevé per apoptosi, es produeix com a conseqüència de l'alteració d'un dels diversos gens implicats en la malaltia. Actualment, s'han identificat 31 gens responsables de les diverses formes d'herència de la retinitis pigmentària – autosòmica recessiva, dominant, i lligada al cromosoma X– i 7 loci addicionals, dels quals encara no se n'ha pogut clonar el gen causal. Aquest elevat nombre de gens causals –que representa únicament una fracció del total de famílies afectades– posa de relleu l'elevada heterogeneïtat genètica d'aquesta malaltia, que també es reflecteix a nivell clínic. A banda dels casos que es manifesten en un fenotip exclusivament visual –RETINITIS AÏLLADA–, hi ha nombrosos casos en què la manifestació fenotípica de l'alteració molecular s'esdevé en diversos òrgans a banda de l'ull; en aquests casos, parlem de RETINITIS SINDRÒMICA. Tot i això, en aquest treball, ens centrarem exclusivament en la descripció de les formes de retinitis aïllada i, principalment, de la forma autosòmica recessiva, la qual ha estat estudiada pel nostre grup durant els darrers 15 anys.

Pel que fa al fenotip clínic, la retinitis pigmentària es caracteritza per una pèrdua gradual de la visió que es manifesta inicialment en ceguesa nocturna i progressa amb un constrenyiment del camp visual de la perifèria cap al centre, que rep el nom de visió en túnel. Aquests primers signes fenotípics posen de manifest que l'alteració primària es produeix als bastons –fotoreceptors que ocupen majoritàriament la perifèria de la retina, medien la visió escotòpica i a baixa intensitat de llum–. A mesura que la degeneració retinal es generalitza cap a altres zones i tipus cel·lulars retinals, es produeix una disminució de l'agudesesa visual –quan afecta els cons– i un acúmul de depòsits de pigment en forma d'espícules a l'entorn dels vasos retinals –quan afecta l'EPITELI PIGMENTARI DE LA RETINA– (FIGURA 1). En estadis avançats, la degeneració retinal condueix a la pèrdua de la visió central.



Figura 1 | Fons d'ull en el qual s'observen els depòsits de pigment característics de la retinitis pigmentària (indicats per una fletxa).

Breu apunt històric:*Franz Cornelius Donders i la història d'un malnom*

El metge holandès FRANZ CORNELIUS DONDERS (Tilburg in Nordbrabant, 1818 – Utrecht, 1889. FIGURA 2A) va ser el primer en observar la presència de pigmentació en forma d'espícules òssies – característica de la retinitis pigmentària– en les retines d'alguns pacients cecs. Donders va poder identificar la presència de pigmentació gràcies a l'observació oftalmoscòpica del fons de l'ull. A mitjans del segle XIX, Hermann Ludwig Ferdinand von Helmholtz (Potsdam, 1821 – Berlin, 1894) havia inventat l'OFTALMOSCOPI o “mirall d'ull”, un instrument analític que permetia per primer cop l'observació acurada del fons de l'ull i que va suposar una revolució per a l'oftalmologia a partir de la segona meitat del segle XIX (FIGURA 2B). El 1857, set anys després de la invenció de l'oftalmoscopi, Donders va encunyar el terme RETINITIS PIGMENTÀRIA per a designar les alteracions pigmentàries que havia observat en les retines dels seus pacients cecs, que ell creia que eren producte d'un procés inflamatori (Donders 1857). El metge holandès va ser, doncs, el primer en estudiar aquesta patologia retinal i qui li va donar nom.

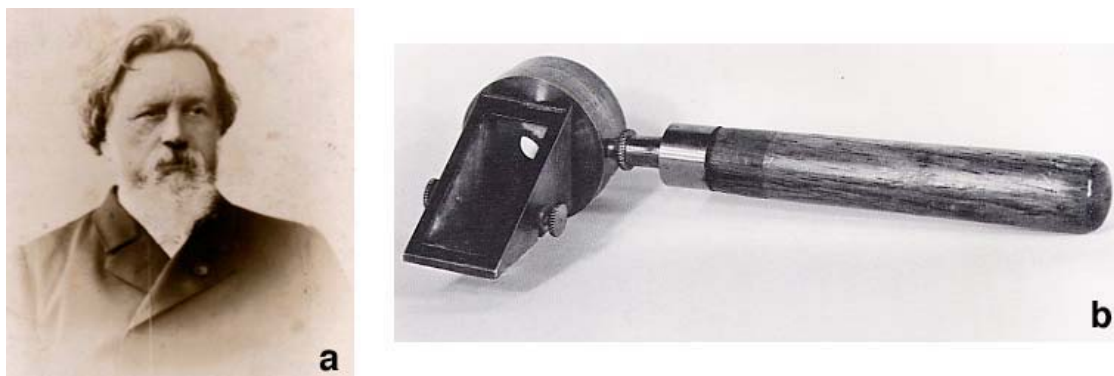


Figura 2 | a. Franz Cornelius Donders (1818–1889). b. Oftalmoscopi de Helmholtz (1851); instrument similar a l'utilitzat per Donders i que li va permetre descriure per primer cop les alteracions del fons d'ull de pacients amb retinitis pigmentària. Foto b: Deutsches Museum München.

Actualment, la presència d'espícules pigmentàries s'atribueix a la invasió del teixit retinal en degeneració per part de cèl·lules de l'epiteli pigmentari o bé a la migració de macròfags des de la circulació coriocapil·lar fins a la retina i que, en passar per l'epiteli pigmentari en degeneració, n'incorporen el pigment. La pigmentació en forma d'espícules òssies –que apareix en estadis avançats de la malaltia– és, doncs, una alteració secundària del procés de neurodegeneració de la retina. Ara sabem que les observacions de Donders, a mitjans del XIX, no corresponien a una alteració primària de tipus inflamatori (d'aquí el sufix –itis), però el terme retinitis pigmentària va fer fortuna i s'ha continuat emprant fins a l'actualitat. En medicina, s'empra el terme RETINOSI PIGMENTÀRIA, més ajustat a la clínica. Al llarg d'aquest treball, però, designarem aquesta malaltia amb el seu nom original, perllongant encara, la història d'un malnom.

1. Els teixits afectats: la retina i l'epiteli pigmentari

Per tal de situar en un context els esdeveniments moleculars i cel·lulars que tenen lloc durant la degeneració retinal, cal que fem referència primer als teixits en els quals es desenvolupa la malaltia.

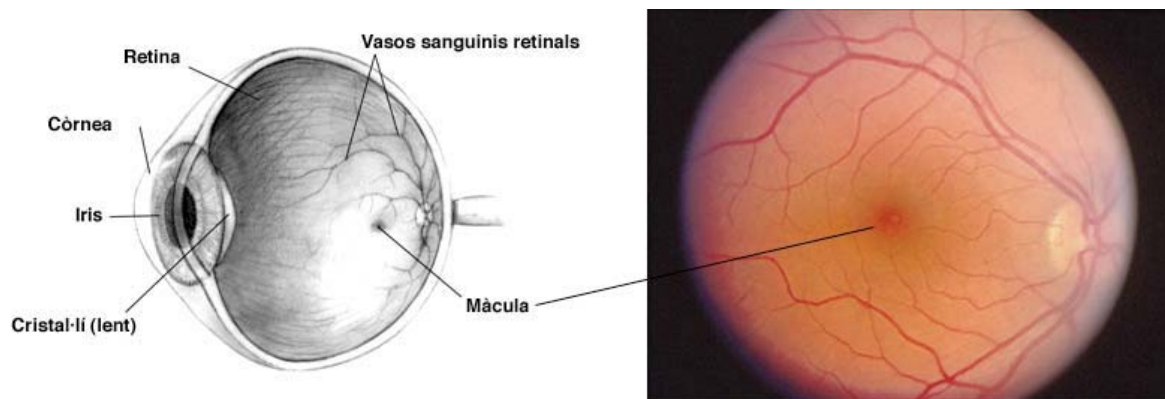


Figura 3 | Diagrama d'un ull humà (esquerra) i observació oftalmoscòpica del fons de l'ull (dreta), en la qual es pot observar en detall la retina, la màcula –part central de la retina i punt de major agudesa visual– i la irrigació abundant del teixit retinal. Adaptades de www.eyesearch.com i webvision.med.utah.edu.

1.1. La retina

La retina és una fina capa de teixit, d'uns 0.2 mil·límetres de gruix en el cas dels humans, que recobreix la cara interna de l'ull (FIGURA 3). Es forma durant el desenvolupament a partir d'una evaginació neuroectodèrmica del diencèfal embrionari, i d'un procés subseqüent d'invaginació que resulta en dues capes cel·lulars que donaran lloc a la neuroretina i a l'epiteli pigmentari (Chow i Lang 2001). *Sensu stricto*, és, doncs, l'única porció del cervell que rep estímuls de l'exterior de manera directa. La retina neural està formada per tres capes de neurones –capes nuclears– separades entre elles per dues capes on tenen lloc les connexions neuronals –capes plexiformes–. Les neurones sensorials –els fotoreceptors– estan en contacte directe amb l'epiteli pigmentari a través dels seus segments externs, que formen la CAPA DE FOTORECEPTORS; sota d'aquesta, hi ha la CAPA NUCLEAR EXTERNA, formada pels segments interns i els somes dels fotoreceptors i, a continuació, la CAPA PLEXIFORME EXTERNA, en la qual els axons dels fotoreceptors contacten amb les dendrites de les neurones bipolars i horitzontals. Més enllà, hi ha la CAPA NUCLEAR INTERNA, formada pels somes de les neurones horitzontals, bipolars i amacrines que contacten a través dels seus axons –en la CAPA PLEXIFORME INTERNA– amb les dendrites de les neurones ganglionars. I finalment, la CAPA DE CÈL·LULES GANGLIONARS, els axons de les quals formen el nervi òptic (FIGURES 4 I 6C).

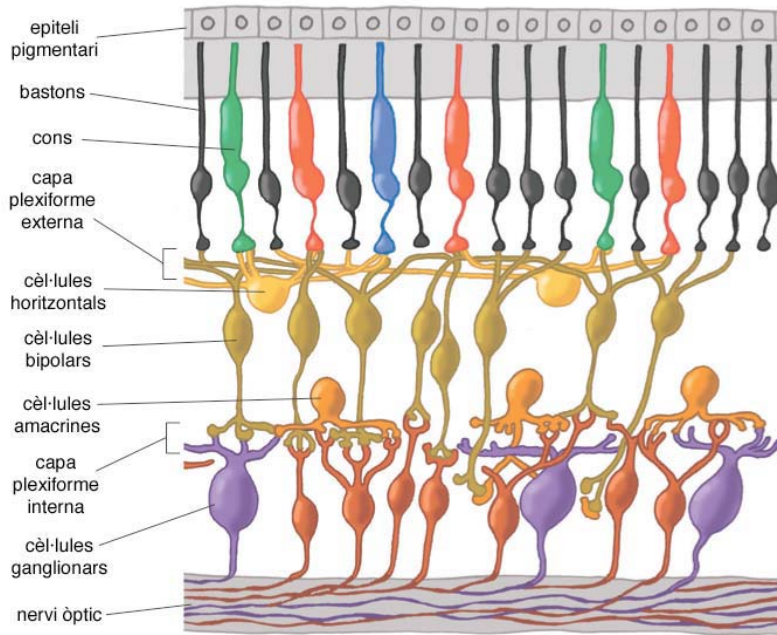


Figura 4 | Esquema dels principals tipus retinals. Les cèl·lules retinals estan ordenades en capes, de les quals la més propera a l'epiteli pigmentari és la capa dels fotoreceptors. Els segments interns i els somes dels fotoreceptors formen la capa nuclear externa, i els somes de les neurones bipolars i horitzontals, la nuclear interna. La darrera capa retinal és la capa de neurones ganglionars. Adaptada de (Kolb 2003).

Els primats tenim quatre poblacions diferents de fotoreceptors, tres de les quals són cons. A la capa nuclear interna, podem trobar-hi d'un a quatre tipus de cèl·lules horitzontals, 11 tipus de cèl·lules bipolars, i de 22 a 30 tipus de cèl·lules amacrines, segons l'espècie. També tenim una vintena de tipus de cèl·lules ganglionars diferents. En resum, a la retina, hi trobem des de les cèl·lules que responen a l'estímul lumínic fins a una intrincada xarxa de connexions neuronals, en la qual es produeixen els primers estadis de processament de la imatge.

De totes les capes de la retina, la més externa, encarada a la cambra vítria de l'interior de l'ull, és la capa de cèl·lules ganglionars, i la més interna, en contacte amb l'epiteli pigmentari, la capa dels fotoreceptors (FIGURA 5). La llum doncs ha de travessar les diverses capes de cèl·lules retinals per tal d'arribar als fotoreceptors, i un cop hi incideix i els estimula, la resposta elèctrica que s'hi genera viatjarà en sentit invers des dels fotoreceptors fins a les cèl·lules ganglionars (FIGURA 5); i des d'aquestes darreres neurones retinals, a través del nervi òptic, fins als centres encefàlics de la visió. La retina conté una zona central –la MÀCULA, en la qual el gruix de les diverses capes és menor–, que és el punt de major agudesa visual (FIGURES 3 I 5). El tipus de retina que tenim els humans i la resta de primats és el que s'anomena una RETINA DÚPLEX, en la qual la part central de la màcula –la FÒVEA– conté exclusivament cons i, en canvi, a la resta de la retina, hi ha cons i bastons, amb un predomini d'aquests darrers (FIGURA 5). Aquesta distribució regional dels fotoreceptors és el que ens permet disposar d'una bona discriminació visual en un ampli rang de condicions d'il·luminació; les àrees perifèriques de la retina poden detectar els fotons escadussers en la negra nit i el centre de la retina ens permet tenir una excel·lent visió diürna; perquè, com ja hem apuntat, i com veurem en detall més endavant, els diversos tipus de fotoreceptors responen a intensitats de llum diferents.

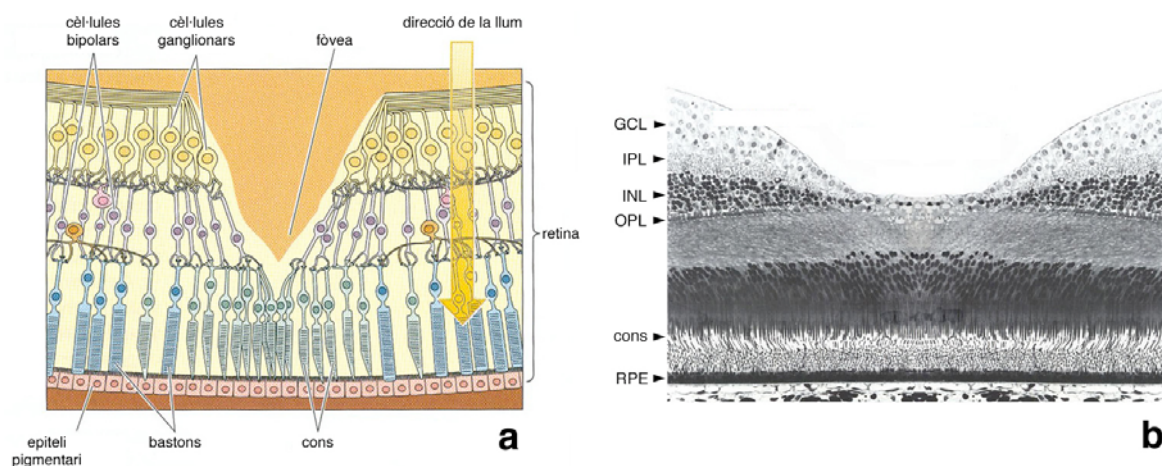


Figura 5 | **a.** Representació esquemàtica en secció vertical de la part central de la retina humana –la màcula– en la qual s'observa l'aprimament de les diverses capes de cèl·lules retinals i la distribució exclusiva de cons a la fòvea. També s'hi indica la direcció de la llum, que ha de travessar tota la retina fins a arribar als fotoreceptors. Adaptada de www.undergrad.ahs.uwaterloo.ca/~tbolton/Light.htm. **b.** Secció vertical de la fòvea d'un primat. GCL: capa de cèl·lules ganglionars. IPL: capa plexiforme interna. INL: capa nuclear interna. OPL: capa plexiforme externa. RPE: epiteli pigmentari de la retina. Adaptada de (Hagerman i Johnson 1991).

1.2. L'epiteli pigmentari

L'altre teixit afectat en la degeneració retinal, que juga un paper crític tant en la funció com en la viabilitat de les cèl·lules fotoreceptores, és l'epiteli pigmentari. L'epiteli pigmentari de la retina està constituït per una monocapa de cèl·lules de tipus epitelial que, a la seva cara apical, contenen unes prolongacions que envolten els segments externs dels fotoreceptors. Aquestes cèl·lules duen a terme diverses funcions essencials per a la viabilitat dels bastons i dels cons; entre les quals, la fagocitosi dels segments externs dels fotoreceptors –que es recanvien de manera circadiana–, i la regeneració de l'11-*cis*-retinal –el cromòfor de les opsines i la rodopsina–. A banda d'aquestes funcions, les cèl·lules de l'epiteli pigmentari contenen grànuls de melanina, que doten aquest teixit d'una coloració fosca característica. Aquesta coloració els permet absorbir els fotons de llum dispersos i n'evita la reflexió cap als fotoreceptors, que produiria la distorsió de les imatges. L'epiteli pigmentari també protegeix els fotoreceptors d'una exposició excessiva a la llum.

Breu apunt històric:

La neuroanatomia de la retina, en la base de la teoria neuronal de Ramón y Cajal

SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL (Petilla d'Aragó, 1852 – Madrid, 1934), va realitzar la primera descripció neuroanatòmica de la retina, en el seu monumental estudi sobre la retina dels vertebrats (Ramón y Cajal 1892), en el qual, mitjançant la tinció de Golgi, va poder demostrar que la retina conté neurones individuals –en oposició a la teoria reticular, que defensava que el sistema nerviós era

un sincici format per la fusió de dendrites i axons—. Cajal també va identificar i descriure en detall els principals tipus cel·lulars retinals: les cèl·lules fotoreceptores, bipolars, horitzontals, amacrines, i ganglionars (FIGURA 6).

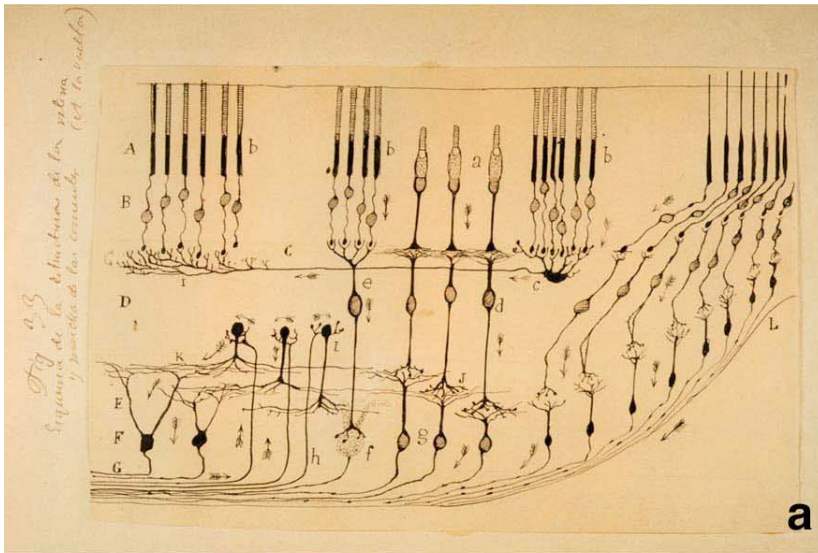
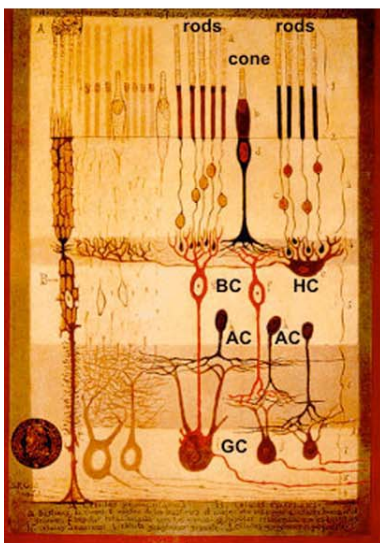
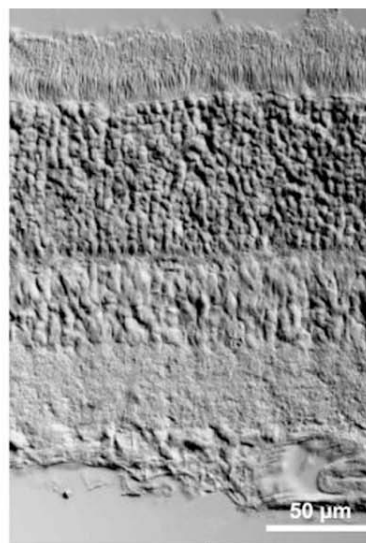


Figura 6 | a i b. Esquemes de la retina dels mamífers realitzats per Santiago Ramón y Cajal pels volts de 1901, en els quals es pot observar el grau d'acuresa amb què va descriure els diversos tipus cel·lulars retinals. **c.** Secció vertical de la retina de la rata, en què s'observen les capes de la retina en comparació amb l'esquema de Cajal en b. BC: cèl·lules bipolars, HC: cèl·lules horitzontals, AC: cèl·lules amacrines, GC: cèl·lules ganglionars, OS: segments externs dels fotoreceptors, IS: segments interns. ONL: capa nuclear externa, OPL: capa plexiforme externa, INL: capa nuclear interna, IPL: capa plexiforme interna, GCL: capa de cèl·lules ganglionars, NFL: fibres del nervi òptic.



↑↑
Llum

b



↑↑
Llum

c

A banda de l'acurada anàlisi morfològica de la retina, Cajal va fer un pas més enllà per dotar les seves observacions anatòmiques d'una explicació funcional. D'aquesta manera, va postular l'existència a la retina de dues vies principals de processament de la informació: la via principal, en la qual la informació es transmet des dels fotoreceptors fins a les cèl·lules ganglionars, passant per les cèl·lules bipolars; i una via d'associació lateral, en la qual participen les cèl·lules horitzontals i les cèl·lules amacrines. Cajal també va establir que en les capes plexiformes es produeixen la majoria de les connexions sinàptiques entre els diversos tipus neuronals de la retina.

2. Les cèl·lules fotoreceptores: els bastons i els cons

El 1648, ANTONI VAN LEEUWENHOEK (Delft, 1632–1723) va dur a terme les primeres observacions microscòpiques de la retina i va identificar les "estructures" que actualment coneixem com a cèl·lules fotoreceptores.

Les cèl·lules fotoreceptores presenten una morfologia comuna composta per quatre elements: el segment extern, el segment intern, el soma i la terminal sinàptica (FIGURA 7B). El SEGMENT EXTERN conté tot un seguit d'estructures membranoses aplanades, en forma de discos, on hi ha part de les molècules encarregades de la fototransducció (vegeu APARTAT 3.1) –entre les quals la rodopsina dels bastons o les diverses opsines dels cons–, i d'altres que contribueixen al manteniment de l'estructura dels discos (vegeu APARTAT 3.3).

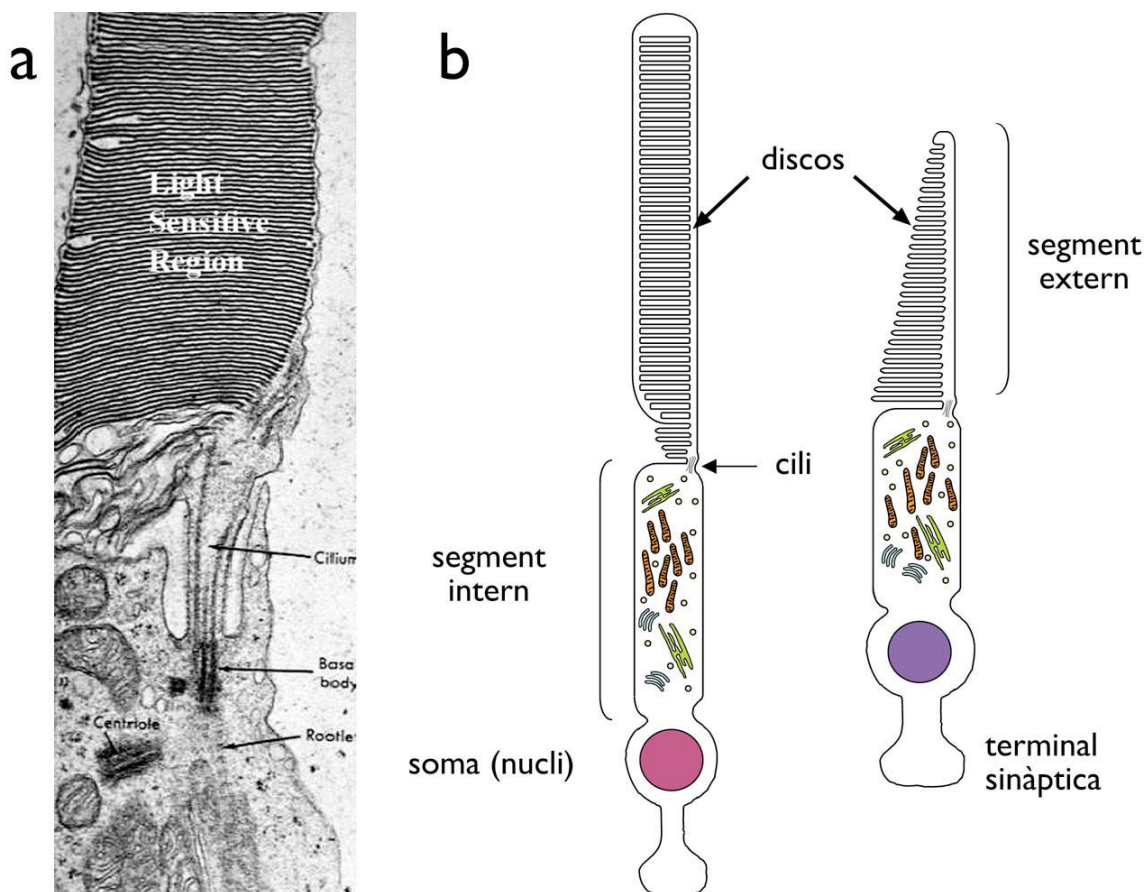


Figura 7 | Els fotoreceptors. (a) Micrografia electrònica d'una secció longitudinal d'un bastó, en la qual es poden observar els discos del segment extern, la zona de biogènesi de discos adjacent al cili (axonema) –entre el segment intern i l'extern–, i part del segment extern. (b) Representació esquemàtica d'un bastó (esquerra) i d'un con (dreta) en els quals s'hi indiquen els elements primordials que conformen aquests dos tipus cel·lulars retinals: el segment extern, format per centenars de discos membranosos que contenen els pigments visuals i altres proteïnes de la cascada de fototransducció; el segment intern, en el qual hi ha la major part dels orgànuls cel·lulars, i el soma, que conté el nucli; a l'extrem basal, els fotoreceptors acaben en un botó sinàptic que contacta amb les neurones bipolars i horitzontals.

Els discos del segment extern dels bastons es troben aïllats de la membrana plasmàtica, mentre que els dels cons hi mantenen una continuïtat. Com hem citat anteriorment, la part apical del segment extern és fagocitada per les cèl·lules de l'epiteli pigmentari, per tal de permetre'n el recanvi que es produeix a la part basal del segment amb l'addició de nous discos (FIGURA 7A). La morfologia del segment extern dóna nom als dos tipus bàsics de fotoreceptors; així, els bastons presenten un segment extern molt llarg i arrodonit a l'extrem, i els cons un segment extern més curt de forma cònica (FIGURES 7 I 8).

La resta d'elements d'una cèl·lula fotoreceptora són el SEGMENT INTERN, que conté la major part dels orgànuls cel·lulars –mitocondris, reticle endoplasmàtic, i Golgi–, i que és molt actiu en la síntesi proteica; el SOMA, que inclou el nucli cel·lular, i finalment, la TERMINACIÓ SINÀPTICA, que contacta amb les dendrites de les neurones bipolars i horitzontals.

La distribució de les diferents poblacions de fotoreceptors a la retina, com hem apuntat abans, respon a la seva especialització funcional; així, els bastons, majoritaris a la perifèria, són estimulats per intensitats baixes de llum i medien la visió en blanc i negre. En canvi, els cons –la densitat dels quals és màxima al centre de la retina– responen a intensitats altes de llum i ens permeten de veure-hi en colors. La majoria dels mamífers presenten dues poblacions de cons diferents: els que són sensibles a la llum verda, i els que ho són a la llum blava. En canvi, els primats tenim un tercer tipus de cons, a banda dels anteriors, que són sensibles a la llum vermella.

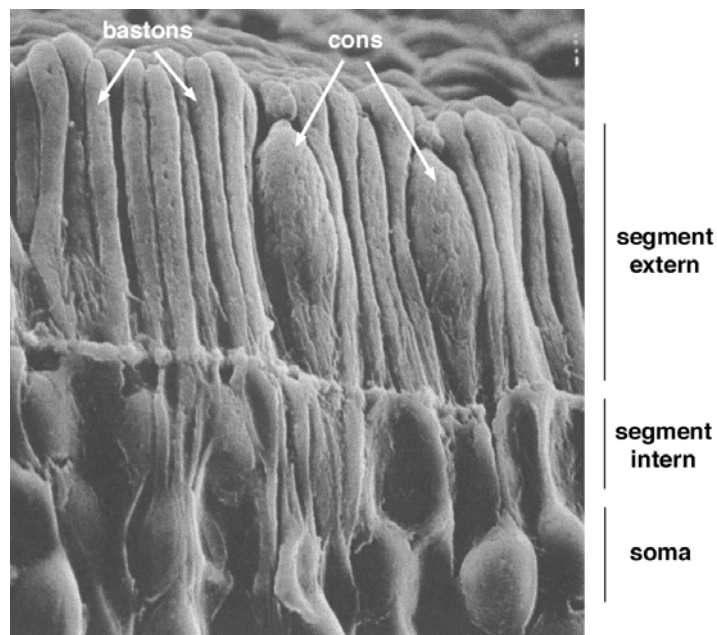


Figura 8 | Micrografia electrònica de rastreig de la capa de fotoreceptors de la retina d'un primat. Es pot observar en detall la morfologia extremadament especialitzada d'aquestes cèl·lules i les diferències morfològiques entre bastons i cons –principalment pel que fa al segment extern–. Adaptada de www.eyedesignbook.com.

Breu apunt històric:

Topografia de la capa de bastons i cons de la retina humana

El 1935, l'any després de la mort de Cajal, l'oftalmòleg danès GUSTAV ØSTERBERG va realitzar els primers comptatges de cèl·lules retinals. Østerberg va determinar que una retina humana contenia entre 110 i 125 mil·lions de bastons i 6.4 mil·lions de cons (Østerberg 1935). També va establir que la densitat de cons és màxima a la fòvea ($147.000/\text{mm}^2$) i que disminueix a mesura que ens allunyem del centre de la retina en direcció a la perifèria (FIGURA 9).

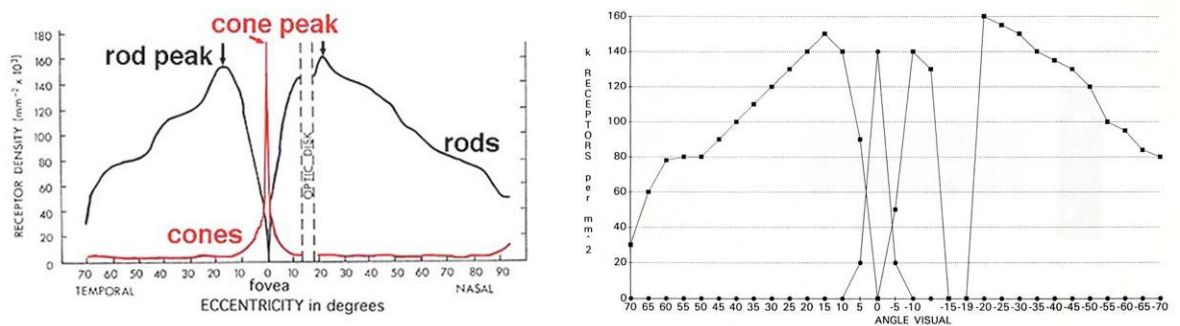


Figura 9 | Gràfiques en les quals es representa la densitat dels fotoreceptors (nombre de fotoreceptors / mm^2) al llarg del meridià horitzontal de la retina humana. La de l'esquerra correspon a la representació d'Østerberg de 1935, i la de la dreta és una representació més actual extreta de dragon.uml.edu/psych/. A la de la dreta: bastons (línia amb quadrats), cons (línia amb rodones). Com es pot comprovar entre -15 i -19 graus hi ha una absència total de cons i bastons. Aquest punt correspon a la taca cega –o taca de Mariotte–, que és el punt de la retina en el qual la reunió dels axons de les neurones ganglionars surt de la retina com a nervi òptic.

3. La retinitis pigmentària i altres distròfies retinals, a través dels gens que les causen

Estratègies de cerca de gens responsables de malalties humanes

La identificació dels gens causals de la retinitis pigmentària representa un paradigma del conjunt d'estratègies existents de cerca de gens responsables de malalties humanes (FIGURA 10), ja que, en la identificació dels diversos gens d'aquesta malaltia, s'han aplicat la majoria de les aproximacions emprades en genètica humana –com veurem més endavant quan parlem de cadascun dels gens causals–. Per una altra banda, la cerca de gens en aquesta patologia, al llarg dels darrers 15 anys, també és un bon exemple de l'evolució d'aquestes estratègies –des de la identificació del gen de la rodopsina, el 1989, fins a la del gen *CERKL* que descrivim en aquest treball, el 2004–, i del salt qualitatiu que ha suposat la seqüenciació completa del genoma humà per aquest tipus d'estudis.

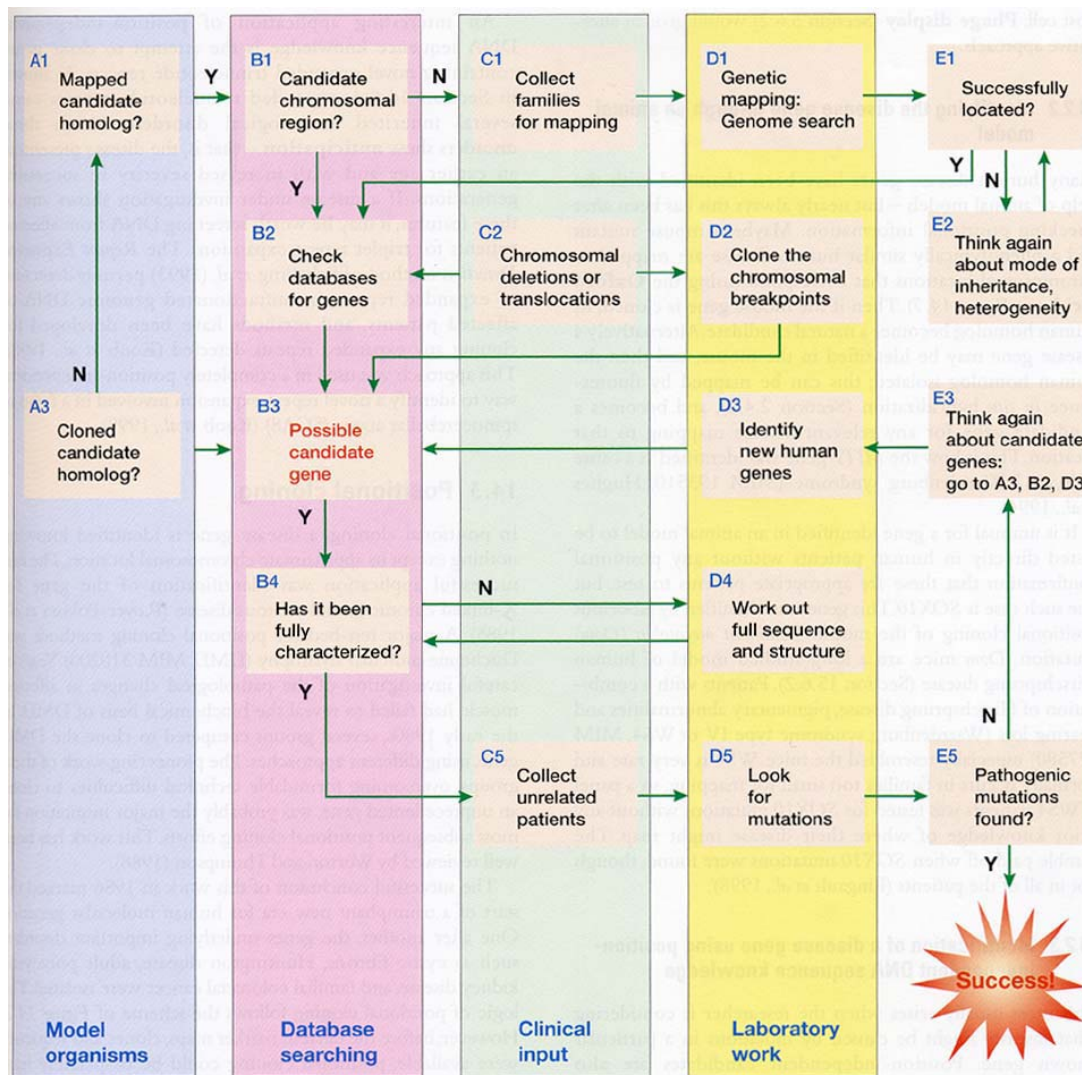


Figura 10 | Vies que recorre la cerca del gen responsable d'una malaltia. Aquesta pot consistir en una aproximació de clonatge posicional (B1-C1-D1, etc.), en un escrutini de gens candidats (B3-B4-C5, etc.), o bé, en una estratègia combinada de candidats posicionals (Strachan i Read 2004).

El clonatge posicional, la identificació del gen causal a partir del coneixement de la seva posició aproximada en un cromosoma

Tot i que és considerada una aproximació costosa, el CLONATGE POSICIONAL és l'estratègia que ha permès el coneixement que tenim actualment sobre la patogènia molecular de moltes de les malalties humanes de tipus hereditari. Aquesta estratègia s'ha constituït com una eina indispensable –tant abans com després de la seqüenciació del genoma humà– per a la identificació dels gens causals d'aquelles patologies en les quals la informació derivada de la clínica o de la disfunció molecular subjacent no permetia relacionar la malaltia amb un gen ja descrit. En aquests casos, el mapatge de la malaltia en una regió cromosòmica, a partir de l'estudi de famílies afectades, és el pas previ a la identificació d'un gen candidat i, finalment, de la mutació o alteració causal (FIGURA 10).

Per tal de mapar la posició aproximada al genoma del gen causal d'una malaltia d'herència mendeliana, cal genotipar els membres de la família o famílies afectades mitjançant l'anàlisi de centenars de marcadors genètics –per exemple, MICROSATÈL·LITS– distribuïts al llarg de tots els cromosomes. D'aquesta manera, es busca determinar si existeix LLIGAMENT GENÈTIC entre la malaltia i algun dels marcadors analitzats –indicatiu de sintènia entre el marcador i el gen causal, i senyalitzador de la posició relativa del gen en una regió cromosòmica concreta–. Aquesta estratègia, previa al clonatge posicional i font de la informació posicional de la qual es nodreix aquest darrer, rep el nom d'ANÀLISI DE LLIGAMENT GENÈTIC, i ha estat emprada en diverses ocasions per a localitzar i clonar, posteriorment, molts dels gens responsables de retinitis pigmentària.

A partir de finals dels noranta, amb l'extensió dels projectes de seqüenciació del genoma humà, es va identificar i es va començar a emprar una nova classe de marcadors –els POLIMORFISMES D'UN ÚNIC NUCLEÒTID (SNP)–, que han estat fonamentals per a la resolució dels objectius plantejats en aquest treball de tesi doctoral. Els SNP més freqüents són dial·lèlics, però se'n poden trobar alguns de trial·lèlics i tetra. Per tant, és un tipus de marcador molt poc polimòrfic en comparació amb els microsatèl·lits, que contenen múltiples al·lèls. Malgrat el baix polimorfisme d'aquests marcadors, els SNP són de gran utilitat per al mapatge de malalties humanes i altres trets genètics perquè són molt nombrosos i es troben distribuïts per tot el genoma.

La descoberta del gen *CERKL* com a gen responsable de retinitis pigmentària autosòmica recessiva, que es presenta en aquesta tesi, és un bon exemple de l'aplicació de l'anàlisi de lligament a la cerca de gens en aquesta malaltia. La identificació d'aquest gen com a responsable de la malaltia no s'hauria pogut dur a terme sense la caracterització prèvia del locus RP26 de retinitis pigmentària autosòmica recessiva, en una anàlisi de lligament realitzada al nostre grup (Bayés et al. 1998).

Un cop hem definit la localització cromosòmica aproximada del gen causal d'una malaltia –n'hem mapat el LOCUS a partir d'una anàlisi de lligament genètic–, el pas següent és la cerca del gen en qüestió en la regió cromosòmica definida. En molts casos, però, el locus identificat pot consistir en un segment de més de 10 Mb, que dificulta enormement la identificació del gen responsable de la malaltia. Per tal de restringir aquesta regió a un segment de mida més abastable, que faciliti el clonatge posicional del gen causal, caldrà analitzar més famílies i incrementar la densitat de

marcadors analitzats en l'interval. Abans de la seqüenciació del genoma humà, això darrer es realitzava a partir de la cerca de nous polimorfismes en YAC, BAC i cosmidis de la regió. Actualment, la informació sobre la posició i heterozigositat de nous marcadors polimòrfics –idonis per a analitzar en profunditat una regió candidata– està dipositada en bases de dades. Amb l'increment de la densitat de marcadors i amb l'anàlisi de famílies addicionals lligades al locus, cerquem definir de manera precisa els marges del locus i reduir-ne les dimensions. A banda d'això, en malalties d'herència recessiva, una cobertura densa de marcadors dins de l'interval de cosegregació –definit en una família consanguínia– ens pot facilitar el clonatge del gen a partir d'una estratègia de mapatge d'homozigositat.

L'estratègia de gens candidats: quan la posició no té importància i el que compta és la funció

En alguns casos, el coneixement de la funció d'un gen i de les bases bioquímiques i moleculars d'una malaltia hereditària humana han permès implicar un gen en una malaltia independentment de la informació sobre la seva posició. En el cas que ens ocupa –la retinitis pigmentària i altres distròfies retinals relacionades–, alguns dels gens que codifiquen proteïnes de la fototransducció o del cicle visual són exemples de gens identificats com a causals d'aquestes malalties sense una anàlisi de lligament prèvia. Per exemple, el gen de la rodopsina quinasa va ser considerat com a candidat per a la malaltia d'Oguchi –un subtipus de ceguesa nocturna estacionària congènita que es dona al Japó– perquè participa en el procés de desactivació de la rodopsina fotoactivada conjuntament amb l'arrestina, el gen de la qual ja havia estat implicat en aquesta malaltia. D'aquesta manera, van poder ser identificades mutacions en el gen de la rodopsina quinasa en pacients d'Oguchi que no tenien alterat el gen de l'arrestina (Yamamoto et al. 1997). Altres gens identificats purament com a candidats funcionals són el gen de la subunitat β de la fosfodiesterasa 6 (*PDE6A*), el gen que codifica la lecitina retinol aciltransferasa (*LRAT*), el gen del receptor unit a proteïna G de l'epiteli pigmentari de la retina (*RGR*), o el gen que codifica la proteïna sèrica d'unió a retinol (*RBP4*). Aquest darrer cas, és un exemple clar de com el coneixement de la base bioquímica d'una alteració metabòlica va ser clau en la identificació del gen responsable: la manca d'*RBP4* i els nivells baixos de retinol en el sèrum de dues germanes afectades d'un tipus de degeneració de l'epiteli pigmentari apuntaven a *RBP4* com a gen responsable (Seeliger et al. 1999).

A la retinitis, l'aplicació d'aquesta estratègia ha consistit, sovint, en l'escrutini del gen candidat en un nombre molt alt de pacients afectats, no relacionats entre ells. L'elevada heterogeneïtat genètica i clínica de les degeneracions retinals constitueix una dificultat addicional en aquest tipus d'aproximacions, ja que rarament es poden agrupar els pacients afectats i les famílies a partir de criteris clínics que en permetin una subcategorització. Així, l'escrutini mutacional d'un candidat *pur* és una aproximació costosa amb un rendiment baix: implica l'anàlisi de centenars de pacients de diverses distròfies retinals i condueix a la caracterització de l'alteració subjacent en pocs d'ells.

Una aproximació combinada: el candidat posicional

Durant el projecte de seqüenciació del genoma humà, s'ha anat incorporant un nombre creixent de gens a les bases de dades i se n'ha pogut determinar la posició física concreta als cromosomes. D'aquesta manera, s'ha introduït un nou tipus d'estratègia de cerca de gens de malalties humanes mendelianes: l'aproximació del candidat posicional. Aquesta estratègia es basa en l'ús combinat de les dades de lligament genètic i de la informació sobre els gens que es coneixen a la regió candidata definida per lligament. Així, s'han pogut identificar gens perquè aquests es trobaven en una regió candidata determinada per lligament i alhora se sabia que s'expressaven específicament al teixit afectat per la malaltia, o que formaven part, per exemple, de la mateixa família gènica –o participaven en el mateix procés cel·lular– que un altre gen que havia estat caracteritzat prèviament com a gen responsable. Exemples d'això són els gens *CNGA3* i *CNGB3* –que codifiquen respectivament les subunitats α i β del canal catiónic obert per cGMP dels cons– i el gen *GNAT2* –que codifica la subunitat β de la transducina específica dels cons–. Tots ells participen en el procés de fototransducció dels cons i han estat identificats com a gens causals d'acromatòpsia.

§

Biologia retinal i patologia molecular en la retinitis pigmentària

La descoberta dels gens responsables de la retinitis pigmentària (TAULA 1) i dels gens d'altres distròfies retinals associades ha permès la dissecció a nivell molecular del funcionament normal de les neurones fotoreceptores i d'altres tipus cel·lulars retinals. A mesura que s'han anat identificant els gens d'aquests desordres, i que se n'ha començat a estudiar la funció, s'ha anat bastint una classificació funcional que els agrupa en grans categories a l'entorn dels processos cel·lulars específics dels fotoreceptors. A les categories proposades inicialment per diversos autors, com ara la FOTOTRANSDUCCIÓ, el METABOLISME DEL RETINOL, i l'ESTRUCTURA CEL·LULAR dels bastons i dels cons, se n'han anat afegint d'altres, amb la descoberta de nous gens RP. Aquestes altres categories inclouen gens que intervenen en l'establiment i en el manteniment de la MORFOLOGIA RETINAL, en la DETERMINACIÓ I DIFERENCIACIÓ de les cèl·lules fotoreceptores i en l'EXPRESSIÓ ESPECÍFICA de determinats gens a la retina. Finalment, als darrers anys, la categorització funcional dels gens de la retinitis pigmentària s'ha expandit amb la inclusió de gens que codifiquen proteïnes implicades en els mecanismes de PROCESSAT DE PREMRNA, en el TRANSPORT INTRACEL·LULAR DE PROTEÏNES, i en la FUNCIÓ CITOESQUELÈTICA. Actualment, coneixem la funció, en diversos graus, de molts dels gens de la retinitis pigmentària; aquest és el pas previ i fonamental per tal de determinar per quins mecanismes les mutacions en aquests gens acaben provocant la mort dels fotoreceptors. En altres casos, com veurem més endavant, disposem de dades funcionals contradictòries; i finalment, hi ha gens RP el rol dels quals als fotoreceptors ens és encara desconegut i l'única dada de què disposem és que la seva disfunció porta a la mort d'aquestes cèl·lules.

En aquest apartat, a partir dels gens de la retinitis pigmentària repassarem cadascuna d'aquestes categories i els processos funcionals subjacents. També s'han inclòs aquí gens responsables d'altres tipus de distròfies retinals, relacionades amb la retinitis pigmentària, com ara l'amaurosi congènita de Leber, la ceguesa nocturna estacionària congènita, l'acromatòpsia, o les distròfies de cons i bastons, ja que els gens que les causen codifiquen proteïnes que participen en les mateixes vies, complexos proteics i processos cel·lulars que la majoria dels gens de la retinitis pigmentària, i per tant, a escala molecular, són malalties íntimament relacionades.

Taula 1 • Gens causals de retinitis pigmentària

retinitis pigmentària autosòmica dominant			
gen	proteïna	localització	altres distròfies associades a gens RP
<i>CA4</i>	anhidrasa carbònica IV	17q22	
<i>CRX</i>	factor de transcripció de cons i bastons amb caixa homeòtica de tipus Otx	19q13.32	LCA, adCORD
<i>FSCN2</i>	fascina retinal	17q25	
<i>HPRP3</i>	factor 3 de processat de premRNA	1p21.2	
<i>IMPDH1</i>	inosina monofosfat deshidrogenasa 1	7q32.1	
<i>NRL</i>	factor de transcripció neuroretinal amb cremallera de leucina	14q11.2	
<i>PRPF8</i>	factor 8 de processat de premRNA	17p13.3	
<i>PRPF31</i>	factor 31 de processat de premRNA	19q13.42	
<i>RDS</i>	periferina 2 / RDS	6p21.1	digRP, adMD, PD
<i>RHO</i>	rodopsina	3q21.3	adCSNB
<i>ROM1</i>	proteïna de membrana del segment extern dels bastons	11q12.3	
<i>RP1</i>	proteïna RP1	8q11.23	
<i>RP9</i>	proteïna RP9 o proteïna associada a la quinasa PIM1	7p14.3	
retinitis pigmentària autosòmica recessiva			
gen	proteïna	localització	distròfies
<i>ABCA4</i>	transportador amb una casset d'unió a ATP	1p22.1	CORD, MD (STGD), FFM
<i>CERKL</i>	proteïna similar a ceramida quinasa	2q31.3	
<i>CNGA1</i>	subunitat del canal catiónic obert per cGMP dels bastons	4p12	
<i>CNGB1</i>	subunitat ! del canal catiónic obert per cGMP dels bastons	16q13	
<i>CRB1</i>	homòleg del gen <i>crumbs</i> de <i>Drosophila</i>	1q31.3	LCA
<i>LRAT</i>	lecitina retinol aciltransferasa	4q32.1	CSRD
<i>MERTK</i>	protooncògen C-mer receptor tirosina quinasa	2q13	
<i>NR2E3</i>	receptor nuclear de la superfamília 2 grup E3	15q23	ESCS
<i>PDE6A</i>	subunitat de la fosfodiesterasa 6	5q32	
<i>PDE6B</i>	subunitat ! de la fosfodiesterasa 6	4p16.3	adCSNB
<i>RGR</i>	receptor unit a proteïna G de l'epiteli pigmentari	10q23.1	dCS
<i>RHO</i>	rodopsina	3q21.3	adCSNB
<i>RLBP1</i>	proteïna d'unió a retinaldehid cel·lular	15q26.1	arRPA
<i>RPE65</i>	proteïna de 65 kDa específica d'epiteli pigmentari	1p31.2	LCA
<i>SAG</i>	arrestina	2q37.1	arCSNB
<i>TULP1</i>	proteïna similar a tubby	6p21.31	CSRD, LCA
<i>USH2A</i>	usherina	1q41	US
retinitis pigmentària lligada a l'X			
gen	proteïna	localització	distròfies
<i>RP2</i>	proteïna RP2	Xp11.23	
<i>RPGR</i>	regulador de GTPasa implicat en retinitis pigmentària	Xp11.4	COD, AMD

Abreviatures:
 ad. autosòmica dominant, ar. autosòmica recessiva, AMD. degeneració macular associada a l'edat, COD. distròfia de cons, CORD. distròfia de cons i bastons, CS. esclerosi coroidal, CSNB. ceguesa nocturna estacionària congènita, dig. digènica, CSRD. distròfia retinal infantil severa, ESCS. síndrome d'increment de cons S, FFM. fundus flavimaculatus, LCA. amaurosi congènita de Leber, MD. degeneració macular, PD. distròfia de patró, RP. retinitis pigmentària, RPA. retinitis punctata albescens, STGD. malaltia d'Stargardt, US. síndrome d'Usher

3.1. La fototransducció

La visió és un dels sentits fonamentals dels vertebrats. Aquesta té lloc, en un primer estadi, a la retina amb la captació, per part dels fotoreceptors, dels fotons que incideixen en l'ull; com a conseqüència, es desencadena una cascada enzimàtica que culmina en la hiperpolarització de la membrana del fotoreceptor i condueix a la transmissió d'una resposta electroquímica cap al cervell, a través de neurones d'ordre superior.

Els principals esdeveniments moleculars de la fototransducció tenen lloc als segments externs dels fotoreceptors. Els discos dels segments externs dels bastons contenen gran quantitat del pigment visual, la RODOPSINA –constituïda per la proteïna opsina, codificada pel gen *RHO*, unida químicament al cromòfor 11-*cis*-retinal a través del residu K296–, que té el seu màxim d'absorció de llum a 500 nm. De resultes de l'absorció d'un fotó, l'11-*cis*-retinal s'isomeritza a tot-*trans*-retinal i la rodopsina pateix un seguit de canvis conformacionals que, en qüestió de milisegons, donen lloc a la formació de metarodopsina II i a la posterior hidròlisi de l'enllaç de base de Schiff, que permet la dissociació del cromòfor i l'opsina. Un cop la rodopsina és fotoactivada –en la forma de metarodopsina II–, s'uneix a la subunitat α de la proteïna G transducina (GNAT1) i catalitza l'intercanvi del GDP, unit a aquesta subunitat, per GTP (FIGURA 11).

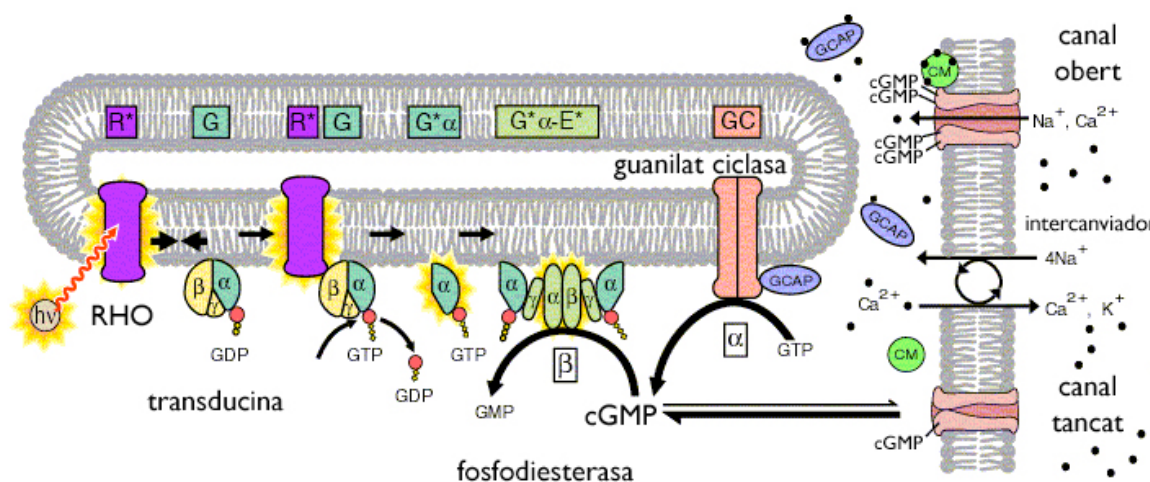


Figura 11 | La fototransducció. A la membrana dels discos, la rodopsina (RHO) fotoactivada interacciona amb la subunitat alfa de la transducina i catalitza la unió del GTP a aquesta proteïna G. La transducina unida a GTP activa una fosfodiesterasa de cGMP que hidrolitzarà aquest segon missatger. La disminució de la concentració intracel·lular de cGMP provoca el tancament dels canals catiónics oberts per cGMP que, juntament amb el manteniment dels mecanismes d'exportació de cations, condueix a la hiperpolarització de la membrana del fotoreceptor i a la consegüent transmissió sinàptica del senyal de la cascada de fototransducció. En l'extinció del senyal de la fototransducció hi intervenen, entre d'altres, una guanilat ciclasa retinal i les proteïnes activadores de la guanilat ciclasa (GCAP), que també es mostren aquí. Adaptada de (Pugh et al. 1999).

En aquest punt de la cascada de fototransducció, es produeix el primer estadi d'amplificació del senyal, en què cada molècula de metarodopsina II activa centenars de transducines. Al seu torn, cada molècula de subunitat α de transducina unida a GTP activa una molècula de fosfodiesterasa

(PDE6) eliminant-ne la subunitat inhibidora. Finalment, cada molècula de PDE6 catalitza la hidròlisi de vora 1000 molècules de cGMP per segon, i és en aquest pas en el qual s'esdevé el segon estadi d'amplificació del senyal de la fototransducció. De resultes d'aquests dos estadis, l'amplificació total de la cascada és de 10^5 cops (Pepe 2001).

cGMP, el missatger de la fototransducció

El principal missatger de la cascada enzimàtica de fototransducció és el nucleòtid cíclic cGMP. En la foscor, el cGMP s'uneix a uns canals catiónics presents a la membrana del segment extern dels fotoreceptors, i els manté oberts. D'aquesta manera, s'estableix un corrent d'entrada de cations (Na^+ , Ca^{2+} , i Mg^{2+}) en la foscor –el CORRENT DE FOSCOR–, que es tradueix en una despolarització parcial de la membrana i un alliberament sostingut de neurotransmissor (FIGURA 12). Per contra, en una situació de fotoactivació, la cascada de fototransducció condueix a la reducció dels nivells de cGMP, a través de la hidròlisi mediada per PDE6, i, en conseqüència, al tancament dels canals catiónics. La disminució del corrent de foscor, conjuntament amb el manteniment dels mecanismes d'exportació de cations, provoca la hiperpolarització de la membrana plasmàtica (FIGURA 12), que es tradueix en un alentiment de l'alliberació de neurotransmissor a la terminal sinàptica del fotoreceptor i en la consegüent transmissió del senyal fins als centres encefàlics de la visió.

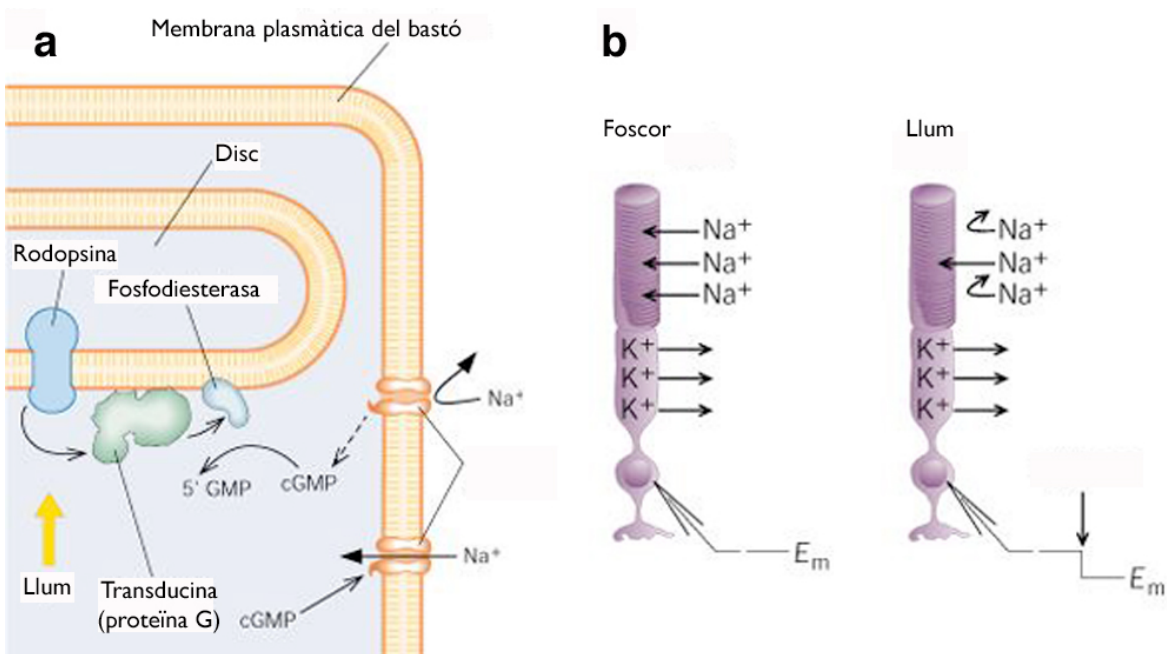


Figura 12 | La cascada de fototransducció als bastons. (a) Esquema parcial del segment extern dels bastons en el qual es representen els elements principals de la cascada de fototransducció com ara la rodopsina, la transducina, la fosfodiesterasa de cGMP –a la membrana dels discos– i els canals catiónics oberts per cGMP –a la membrana plasmàtica del fotoreceptor–. (b) Fluxos d'entrada i de sortida de cations als bastons en una situació de foscor i en una situació de llum, en la qual és activa la cascada de fototransducció.

La recuperació dels nivells de cGMP i el restabliment del corrent de foscó

Com hem vist, en l'estat de fotoactivació, la concentració de cGMP i calci dins la cèl·lula fotoreceptora disminueix. La FASE DE RECUPERACIÓ, que succeeix a la fotoactivació, té com a objectiu la desactivació de la rodopsina fotoactivada i la regeneració dels nivells d'aquests segons missatgers per tal de tornar a assolir la seva concentració en l'estat de foscó, i permetre l'obertura dels canals catiónics, el restabliment del corrent de foscó i la despolarització parcial de la membrana.

En la desactivació de la rodopsina, hi intervé una quinasa específica de rodopsina (RHOK) i la proteïna arrestina (SAG). RHOK fosforil·la la rodopsina i SAG s'uneix a la rodopsina fosforil·lada i en bloqueja el lloc d'unió a transducina (FIGURA 13) i, d'aquesta manera, s'extingeix la transducció del senyal fins a la fosfodiesterasa de cGMP. Per una altra banda, cal recuperar els nivells d'aquest segon missatger, i en aquesta tasca concorre l'acció d'una guanilat ciclasa específica de retina i d'una sèrie de proteïnes activadores de la guanilat ciclasa (GCAP), com veurem més endavant.

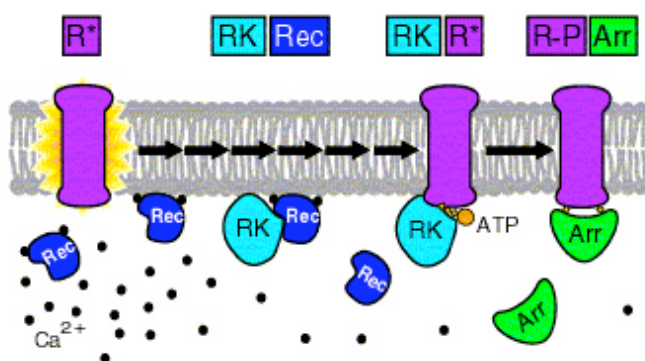


Figura 13 | El mecanisme de desactivació de la rodopsina fotoactivada. En aquest mecanisme hi participen les proteïnes rodopsina quinasa i arrestina (RK i Arr a l'esquema). La rodopsina quinasa fosforil·la la rodopsina (R*) i permet que s'hi uneixi l'arrestina que impedeix la interacció de la rodopsina amb la transducina, extingint la cascada de fototransducció iniciada per aquesta proteïna G. La proteïna recoverina (Rec), regulada per calci, s'uneix i segresta la rodopsina quinasa en la foscó. (Pugh et al. 1999).

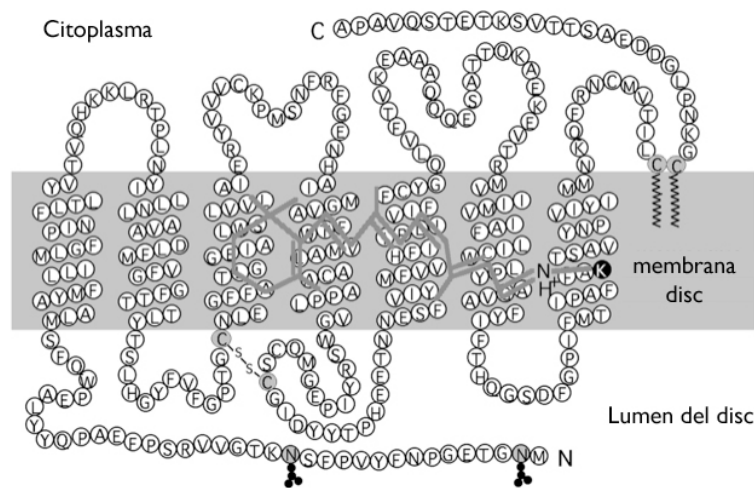
Les proteïnes de la cascada de transducció i les distròfies de la retina

Inicialment, a l'hora de caracteritzar els gens responsables de les distròfies retinals, els esforços es van centrar en els gens que codificaven proteïnes de la fototransducció, ja que des d'un punt de vista funcional eren candidats excel·lents. Al llarg dels anys, s'han identificat mutacions en diversos d'aquests gens; entre els quals, en el gen de la rodopsina (*RHO*) –tant en formes de retinitis pigmentària autosòmica dominant com recessiva, i en ceguesa nocturna estacionària congènita–, en el gen de la subunitat α de la transducina dels bastons (*GNAT1*) –responsable de ceguesa nocturna estacionària congènita–, en el gen de la subunitat β de la transducina dels cons (*GNAT2*) –en casos d'acromatòpsia–, en els gens de les subunitats α i β de la fosfodiesterasa (*PDE6A* i *PDE6B*) –responsables de formes recessives de retinitis pigmentària–, en els gens de les subunitats α i β del canal catiónic dels bastons (*CNGA1* i *CNGB1*) –causals d'arRP–, en els gens de les subunitats α i β del canal catiónic dels cons (*CNGA3* i *CNGB3*) –responsables d'acromatòpsia–, en el gen de l'arrestina (*SAG*) –en arRP i en ceguesa nocturna estacionària congènita–, en el gen de la rodopsina

quinasa (*RHOK*) –responsable de ceguesa nocturna estacionària congènita–, en el gen de la guanilat ciclasa retinal (*GUCY2D*) –responsable d’amaurosi congènita de Leber i de distròfia de cons i bastons–, i en el gen d’una de les proteïnes activadores de la guanilat ciclasa (*GUCA1A*) –en distròfia de cons i distròfia de cons i bastons–.

3.1.1. Gens RP que codifiquen proteïnes de la cascada de fototransducció

Figura 14 | Model bidimensional de la rodopsina bovina, en el qual es mostra la seva topologia a la membrana dels discos del segment extern. En gris es mostra l’11-*cis*-retinal unit al residu lisina (K296, en negre). Adaptada de (Hisatomi i Tokunaga 2002).



Rodopsina (*RHO*)

cr3:130730179–130736885 (5 exons)

adRP, arRP, adCSNB
(RP4)
3q21.3

A mitjans dels anys vuitanta, va ser caracteritzat i seqüenciat completament el gen humà que codifica el pigment visual (FIGURA 14), la proteïna rodopsina (Nathans i Hogness 1984).

El gen *RHO* ha estat identificat com a responsable del 30 al 40% dels casos de retinitis pigmentària autosòmica dominant (McWilliam et al. 1989, Dryja et al. 1990a, Dryja et al. 1990b, Farrar et al. 1990, Dryja et al. 1991). Mutacions en el gen *RHO* han estat implicades també en casos de retinitis pigmentària autosòmica recessiva (Rosenfeld et al. 1992), i d'una forma de ceguesa nocturna estacionària congènita d'herència dominant (Dryja et al. 1993).

A banda dels models animals espontanis, en el ratolí s'han intentat modelitzar les distròfies retinals humanes causades per alteracions del gen de la rodopsina, mitjançant tècniques de transgènesi i generació de *knockout*. En aquest sentit, a començaments dels noranta, es van dur a terme estudis que intentaven reproduir en el ratolí l'efecte de la mutació P23H –causal de retinitis pigmentària autosòmica dominant en humans (Olsson et al. 1992, Naash et al. 1993)–. Els ratolins heterozigots per l'al·lel P23H desenvolupen uns fotoreceptors aparentment normals, però amb el segment extern més curt que el normal. Progressivament, es produeix una reducció del nombre de

bastons i de cons i, conseqüentment, de les respostes electroretinogràfiques d'aquests, que recorda el fenotip humà (Naash et al. 1993).

Els ratolins *knockout Rho-/-* no presenten segments externs als bastons, els quals degeneren de manera progressiva fins als tres mesos d'edat, en què la pèrdua de fotoreceptors és evident. Un més abans de l'examinació morfològica, ja no mostren cap mena de resposta en les mesures electroretinogràfiques (Humphries et al. 1997). Els segment externs dels bastons als heterozigots *Rho+/-* són de mida més curta que els dels ratolins salvatges per la reducció (~43%) del contingut de rodopsina com a conseqüència de la modificació genètica (Liang et al. 2004). Recentment, s'ha determinat que les diferències en la resposta fisiològica entre els ratolins salvatges i els heterozigots *Rho+/-* responen als canvis estructurals del segment extern i no a la disminució de la densitat de rodopsina als discos (Liang et al. 2004).

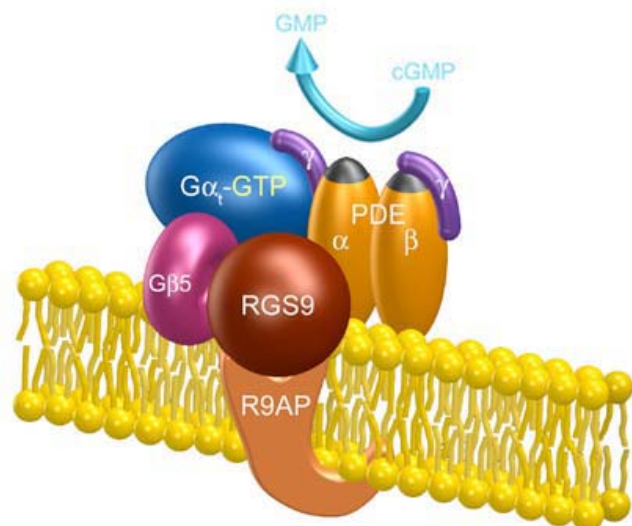
Subunitat de la fosfodiesterasa 6 (PDE6A)

cr5:149220358–149304549 (22 exons)

arRP
5q32

PDE6A codifica la subunitat de la fosfodiesterasa de cGMP dels bastons (Pittler et al. 1990). PDE6 és un enzim format per dues subunitats catalítiques homòlogues (P i P!), que formen un heterodímer que s'uneix a la membrana dels discos (FIGURA 15). Cadascuna d'aquestes subunitats conté un domini catalític a l'extrem C terminal que hidrolitza cGMP. En la foscor, PDE6 conté dues subunitats addicionals idèntiques (P#) reguladores, que inhibeixen l'activitat hidrolítica. En una situació d'il·luminació, la transducina interactua amb les subunitats P# –que salten del complex– i allibera la inhibició (FIGURA 15).

Figura 15 | Model tridimensional de PDE6 a la membrana del disc, en el qual es mostra com la interacció de la transducina (en blau) amb la subunitat P# (en morat) allibera la inhibició de les subunitats catalítiques (en taronja). La subunitat P#, conjuntament amb el complex format per les proteïnes RGS9, G β 5 i R9AP, intervé en l'activació de l'activitat GTPasa intrínseca de la transducina. (www.howelaboratory.harvard.edu).



A mitjans dels 90, havien estat mapats una vintena de loci de retinitis pigmentària i, en sis d'aquests casos, havia estat caracteritzat el gen causal. Tres d'aquests gens codificaven proteïnes de la cascada de transducció lumínica: la rodopsina, la subunitat del canal catiónic dels bastons, i la

subunitat de la fosfodiesterasa 6. Aquest fet va motivar la consideració com a candidats d'altres membres de la cascada de fototransducció. Així, el 1995, van ser identificades tres mutacions puntuals en el gen *PDE6A* en un cribratge mutacional realitzat en una mostra de 340 pacients de retinitis pigmentària no relacionats entre ells, que van situar-lo com al setè gen caracteritzat de la malaltia (Huang et al. 1995). Estudis posteriors, realitzats en població americana, han posat de manifest que *PDE6A* es troba alterat en un 3-4% dels casos de retinitis pigmentària autosòmica recessiva i que la major part de les mutacions identificades es localitzen en el domini d'unió a cGMP i en el domini catalític (Dryja et al. 1999). La deleció d'un nucleòtid en el codó 616 del gen ortòleg en el gos causa l'atròfia retinal progressiva en la raça Cardigan galesa (Petersen-Jones et al. 1999).

Subunitat de la fosfodiesterasa 6 (*PDE6B*)

cr4:609394–654542 (22 exons)

arRP, adCSNB
(CSNB3)
4p16.3

El gen *PDE6B* codifica la subunitat de la fosfodiesterasa de cGMP dels bastons (Weber et al. 1991, Altherr et al. 1992, Bateman et al. 1992, Collins et al. 1992). Una mutació sense sentit en el codó 347 va ser inicialment identificada com la causa de la degeneració retinal del ratolí *rd* [*retinal degeneration*, (Bowes et al. 1990, Pittler i Baehr 1991)]. Més tard, la subexpressió d'aquest gen – observada a la retina en desenvolupament de gossos de la raça setter irlandesa afectats de displàsia de bastons i cons (*rcd1*), i mesurats prèviament al procés degeneratiu– va ser associada a la patologia (Farber et al. 1992). Totes aquestes evidències en models animals van conduir a la identificació de *PDE6B* com a gen causal de retinitis pigmentària autosòmica recessiva (McLaughlin et al. 1993).

Al nostre grup, es va emprar per primer cop una aproximació basada en l'ANÀLISI DE COSEGREGACIÓ –combinada amb l'anàlisi d'homozigotitat en el cas de les famílies consanguínies– per tal d'analitzar el gen *PDE6B* en un panell de famílies espanyoles amb retinitis pigmentària autosòmica recessiva (Bayés et al. 1995a). Mitjançant aquesta aproximació combinada, va ser identificada l'alteració causal de la malaltia en tres famílies consanguínies del panell: una duplicació en tàndem de 71 parells de bases en l'exó 1 del gen *PDE6B* (Bayés et al. 1995a), i dues mutacions puntuals: una en l'exó 17, que provocava la substitució L699R en el domini catalític de *PDE6B* (Valverde et al. 1996), i l'altra en l'exó 13, que resultava en la substitució R552Q (Bayés et al. 1996). Aquest tipus d'estratègia ha estat utilitzada, pel nostre grup, al llarg dels anys, per a avaluar la implicació de diversos gens i loci de retinitis pigmentària autosòmica recessiva en la població espanyola (Bayés et al. 1995b, Bayés et al. 1996, González-Duarte et al. 1997, Martínez-Mir et al. 1999) i ha permès descriure noves mutacions en els gens *TULP1* i *CNGA1*, causals de la malaltia en dues de les famílies del panell (Paloma et al. 2000, Paloma et al. 2002b).

La caracterització de *PDE6B* com a gen responsable de retinitis pigmentària en humans va obrir la porta a l'associació de la displàsia de bastons i cons del setter irlandès, *rcd1* (Suber et al.

1993), i de l'alteració del ratolí *r*, *rodless retina* (Pittler et al. 1993), amb els ortòlegs de *PDE6B* en el gos i en el ratolí.

Els ratolins *r* i *rd*

La soca de ratolins *r* va ser descoberta per Keeler fa 80 anys i caracteritzada com una mutació d'herència autosòmica recessiva que conduïa a l'absència de cèl·lules visuals (Keeler 1924). Aquesta alteració va ser estudiada en la dècada següent per Keeler i d'altres, però l'estoc de Keeler va ser destruït el 1939 i, a finals de la Segona Guerra Mundial, els descendents dels ratolins *r* havien desaparegut. A començaments dels anys 50, a Basilea, Bruckner va identificar novament una soca de ratolins que presentava un fenotip de degeneració retinal. Investigadors de Londres i Estrasburg van caracteritzar la patologia en els descendents dels ratolins de Bruckner, van determinar que aquesta era diferent de la dels ratolins *r* descrita per Keeler, i van anomenar-los ratolins *rd*. Ja en la dècada dels 90, la caracterització de la mutació en el gen *PDE6B* com a responsable del fenotip del ratolí *rd*, per part de Pittler i Baehr, va obrir la porta a la possibilitat de determinar la relació entre el ratolí *rd* i el ratolí *r* de Keeler; però faltaven les mostres d'aquest darrer. La solució va arribar de la mà d'unes antigues preparacions microscòpiques de feia 70 anys, l'única font possible de DNA del ratolí *r*. A partir del DNA extret d'aquestes preparacions, es va poder amplificar i seqüenciar l'exó de *PDE6B* en el qual s'havia identificat la mutació sense sentit del ratolí *rd*, i es va determinar que el ratolí *r* presentava la mateixa mutació, així com, dos polimorfismes intrònics idèntics (Pittler et al. 1993). D'aquesta manera, es va poder determinar que els ratolins *r* de Keeler no havien desaparegut, sinó que havien perdurat en les soques actuals de ratolins *rd*.

En el ratolí *rd*, s'ha assajat una teràpia de tipus farmacològic mitjançant la injecció intraperitoneal de *D-cis*-diltiazem, un blocador de canals de calci que també actua als canals catiónics oberts per cGMP dels fotoreceptors. Aquest compost afavoreix la supervivència dels fotoreceptors i preserva parcialment la funció visual del ratolí *rd* (Frasson et al. 1999).

En humans, el gen de la *PDE6B* també s'ha trobat alterat en una forma de ceguesa nocturna estacionària congènita d'herència dominant [CSNB3, (Gal et al. 1994a, Gal et al. 1994b)].

La ceguesa nocturna estacionària congènita

Els pacients amb CEGUESA NOCTURNA ESTACIONÀRIA CONGÈNITA tenen una visió diürna normal mediada pels cons, però són cecs en condicions de molt poca il·luminació, en les quals fem ús dels bastons per a veure-hi. Així doncs, aquest tipus de desordre afecta exclusivament la maquinària de la fototransducció dels bastons i no compromet la viabilitat dels cons. Des d'un punt de vista genètic, és una malaltia heterogènia. Diversos dels gens considerats en aquesta introducció han estat associats a la malaltia: els gens *RHO*, *PDE6B* i *GNAT1* –en formes d'herència dominant–, els gens *SAG* (arrestina) i *RHOK* –en la malaltia d'Oguchi, una forma rara d'herència autosòmica recessiva– i el gen *RDH5*, també en una forma de ceguesa nocturna autosòmica recessiva.

Subunitat α del canal catiónic obert per cGMP dels bastons (*CNGA1*)

cr4:47778953–47824478 (10 exons)

arRP
4p12

El canal catiónic obert per cGMP dels bastons és un complex heterooligomèric format per dues subunitats homòlogues: la subunitat A1, α , i la subunitat B1, β (FIGURA 16). *In situ* –a la membrana del segment extern–, el canal adopta una estructura funcional tetramèrica constituïda per dues subunitats A1 i dues B1. Cadascuna d'aquestes subunitats presenta una topologia transmembrana similar a la dels canals de potassi que responen al voltatge. Tenen sis hèlix transmembrana putatives per subunitat (FIGURA 16), de les quals la cinquena i la sisena formen el porus del canal (Higgins et al. 2002). Com hem vist anteriorment, en una situació de fosc, nivells elevats de cGMP als bastons són sinònim de l'obertura d'aquests canals, i en canvi, la cascada enzimàtica de fototransducció, activada per acció de la llum, condueix a la disminució dels nivells de cGMP i al tancament dels canals.

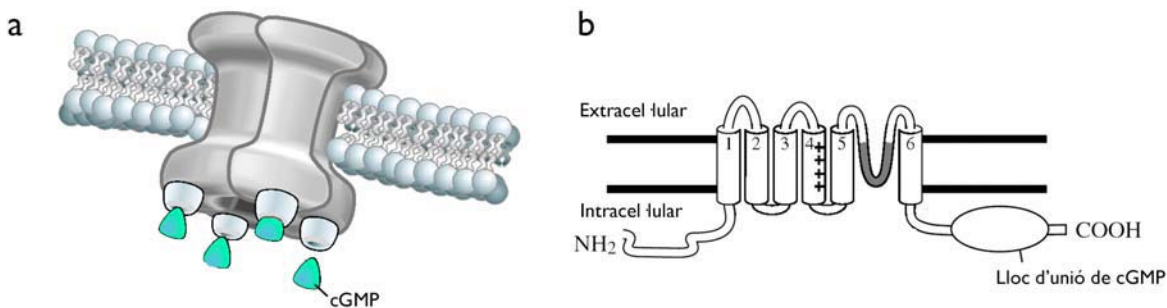


Figura 16 | (a) Estructura tridimensional del canal catiónic obert per cGMP dels bastons (CNG) a la membrana plasmàtica. El canal està compost per dues subunitats α i dues β , cadascuna de les quals conté un lloc d'unió a cGMP. (b) Topologia transmembrana de la subunitat α . El segment 4 és el sensor de voltatge, i el domini entre el cinquè i el sisè forma part del porus del canal (domini P, en gris). Adaptada de (Kramer i Molokanova 2001).

El gen *CNGA1* codifica la subunitat A1 (α) del canal catiónic obert per cGMP dels bastons (Dhallan et al. 1992) i va ser identificat com a gen causal de retinitis pigmentària autosòmica recessiva, a partir d'un cribratge mutacional realitzat en 267 pacients no relacionats de diverses formes de retinitis pigmentària (Dryja et al. 1995).

Subunitat β del canal catiónic obert per cGMP dels bastons (*CNGB1*)

cr16:56475003–56562497 (32 exons)

arRP
16q13

El gen *CNGB1* codifica la subunitat B1 (β) del canal catiónic obert per cGMP dels bastons. A partir de l'anàlisi de lligament realitzada en una família consanguínia francesa, afectada d'una forma severa de retinitis pigmentària autosòmica recessiva, es va identificar un locus al cromosoma 16, a

16q13-q21 (Bareil et al. 2001). Aquesta regió contenia *CNGB1*, un candidat evident, en el qual va ser identificada una mutació de canvi d'aminoàcid (G993V) en un residu conservat situat al domini putatiu d'unió a cGMP (Bareil et al. 2001).

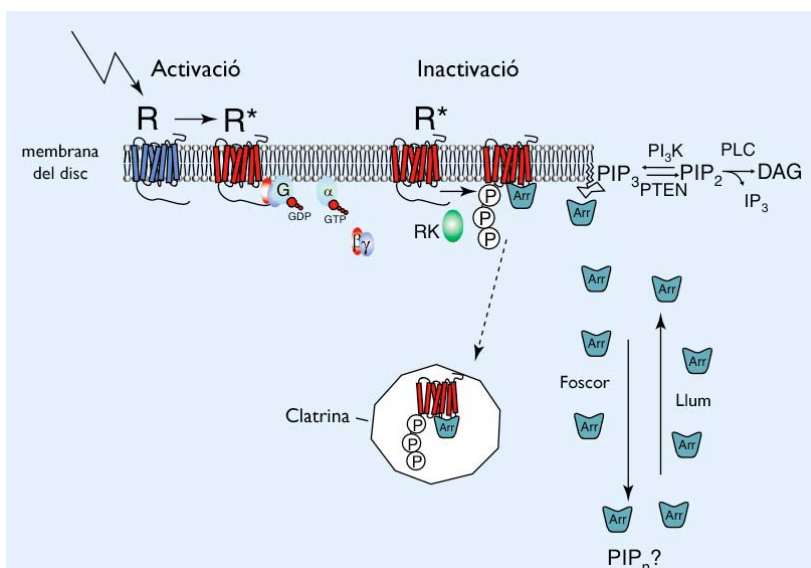
Arrestina (SAG)

cr2:233998492–234037701 (16 exons)

arRP, arCSNB
2q37.1

El gen *SAG* codifica l'arrestina –anomenada també antigen S–, una proteïna que s'expressa als fotoreceptors de la retina i als pineòcits de la glàndula pineal, i que, a la retina, està implicada en la fase de recuperació de la fototransducció; en concret, en la desactivació de la rodopsina fotoactivada (FIGURA 17). Després de ser excitada per un fotó de llum, i haver desencadenat la cascada de fototransducció, la rodopsina és fosforil·lada per una quinasa específica (RHOK), pas necessari per a que s'hi uneixi l'arrestina i la desactivi completament. La unió de l'arrestina a la rodopsina fosforil·lada impedeix que aquesta darrera interactui amb la proteïna G transducina, i d'aquesta manera s'extingeix el primer pas de la transducció del senyal lumínic.

Figura 17 | En la desactivació de la rodopsina hi intervé l'arrestina (Arr, a la figura), que s'uneix a la rodopsina un cop ha estat fosforil·lada per la rodopsina quinasa (RK, a la figura). L'arrestina és translocada cap a la membrana dels discos en funció de la llum incident. Tot i que, en vertebrats, encara no es coneixen els mecanismes pels quals es regula la translocació de l'arrestina, en *Drosophila*, s'ha començat a dilucidar el paper dels fosfatidilinositols en aquest procés i en l'endocitosi dels complexos rodopsina-arrestina, que depèn de clatrina. Adaptat de (Hardie 2003).



El paper de l'arrestina en el procés de desactivació de la rodopsina la convertia en un candidat excel·lent per a desordres retinals caracteritzats per alteracions de l'adaptació a la foscor. En aquest sentit, a mitjans dels noranta, va ser descrita una família consanguínia, en la qual un d'aquests trastorns retinals – la MALALTIA D'OGUCHI– cosegregava amb marcadors a 2q propers al gen de l'arrestina, per als quals els pacients eren homozigots, i van postular *SAG* com a gen responsable (Maw et al. 1995). La malaltia d'Oguchi és una forma rara de ceguesa nocturna estacionària congènita d'herència autosòmica recessiva, els pacients de la qual presenten una coloració característica daurada-marronosa del fons d'ull quan la retina s'adapta a la llum –anomenada el fenomen Mizuo– i una adaptació a la foscor anormalment lenta. L'escrutini del gen *SAG*, en pacients

japonesos d'Oguchi no relacionats, va permetre identificar, en cinc d'ells, la deleció 1147delA, en homozigosi (Fuchs et al. 1995). La mateixa mutació va ser associada posteriorment a casos de retinitis pigmentària autosòmica recessiva també al Japó (Nakazawa et al. 1998).

3.1.2. Gens que codifiquen proteïnes de la cascada de fototransducció, responsables d'altres distròfies retinals

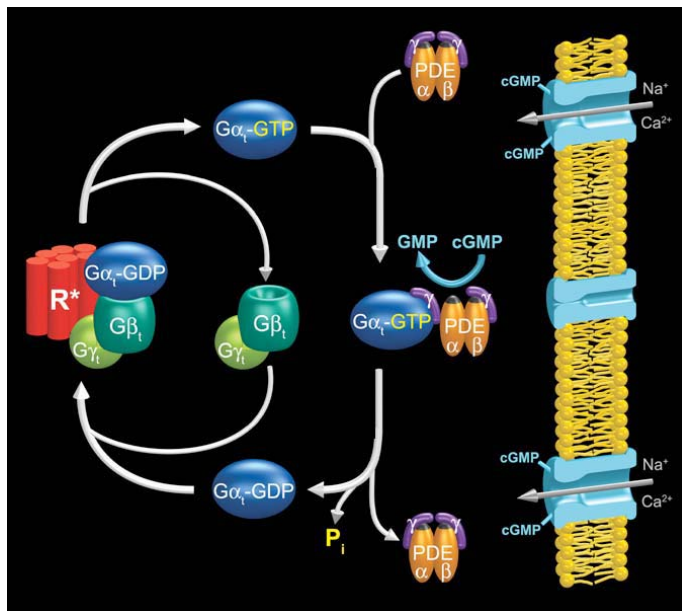


Figura 18 | Cicle de la proteïna G (transducina). La transducina interacciona amb la rodopsina fotoactivada (R*) i es produeix l'intercanvi del GDP, unit a la subunitat G_α de la transducina, per GTP. G_α-GTP es dissocia del complex G!G# i activa la fosfodiesterasa (PDE) per l'interacció amb la subunitat inhibidora PDE#. (www.howelaboratory.harvard.edu).

Subunitat de la transducina dels bastons (GNAT1)

cr3:50204162–50207392 (8 exons)

CSNB
3p21.31

El gen *GNAT1* codifica la subunitat de la transducina específica dels bastons (FIGURA 18). Aquest gen, va ser implicat com a causal d'una forma de ceguesa nocturna estacionària congènita anomenada FORMA NOUGARET (Dryja et al. 1996). El nom d'aquesta forma prové de l'evidència proporcionada per l'anàlisi del pedigrí dels individus afectats, tots ells descendents de Jean Nougaret, el carnisser d'un llogaret del sud de França anomenat Vendemian, que va viure entre els anys 1637 i 1719. La mutació G38D, en una de les còpies del gen *GNAT1* de Jean Nougaret, s'ha anat transmetent, de generació en generació, fins als nostres dies causant aquesta forma de ceguesa nocturna autosòmica dominant. Els descendents de Nougaret, com tots els altres pacients amb ceguesa nocturna estacionària congènita, presenten una visió diürna normal –mediada pels cons–, però són cecs en situacions de llum ambiental molt tènue, en les quals un individu normal només utilitza els bastons per a veure-hi sense discriminació de colors. L'efecte de la mutació G38D en *GNAT1* s'ha estudiat *in vitro*, i s'ha determinat que no altera la interacció entre les subunitats G_α i G_{βγ} de la transducina, ni impedeix l'activació de la transducina per part de la rodopsina fotoactivada. En canvi, altera la funció efectora de la transducina, és a dir, impedeix la unió de GNAT1 a la subunitat #

inhibidora de la fosfodiesterasa, i per tant, no permet l'activació de la fosfodiesterasa per part de la transducina (Muradov i Artemyev 2000).

Guanilat ciclase específica de la retina (*GUCY2D*)

cr17:7846716–7864382 (20 exons)

LCA, dCORD
(LCA1, CORD6)
17p13.1

La guanilat ciclase retinal (FIGURA 19) és un dels components essencials de la fase de recuperació, que s'esdevé després de l'extinció de l'impuls lumínic, i que està encaminada a la regeneració d'aquelles molècules que intervenen en la fototransducció. Aquest enzim catalitza la conversió de GTP a cGMP, per tal de restablir els nivells del nucleòtid cíclic en l'estat de fosc, que permetran l'obertura dels canals catiónics de la membrana dels fotoreceptors i la despolarització de la membrana.

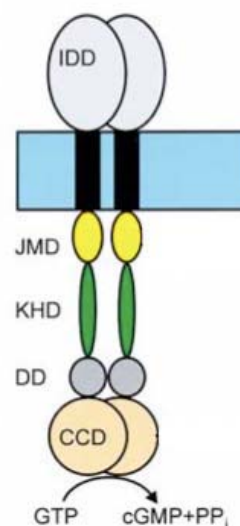


Figura 19 | A la membrana dels discos, la guanilat ciclase actua de forma dimèrica. IDD, domini intradiscal. JMD, domini jxtamembranós. KHD, domini d'homologia amb quinases. DD, domini de dimerització. CCD, domini catalític ciclase. Adaptada de (Koch et al. 2002).

L'activació de la guanilat ciclase, en la fase de recuperació, es produeix per la disminució de la concentració de calci intracel·lular, de resultes de la fotoactivació, i és mediada per una sèrie de proteïnes activadores. A la retina, tant en bastons com en cons, s'expressen dos gens que codifiquen guanilat ciclases: *GUCY2D* [17p13.1; *RETGC-1*, *GC-E*; (Shyjan et al. 1992, Oliveira et al. 1994)] i *GUCY2F* [Xq22.3-q23; *RETGC-2*, *GC-F*; (Lowe et al. 1995, Yang et al. 1995)]. Per immunocitoquímica, s'ha demostrat la colocalització de les dues ciclases a la mateixa cèl·lula (Yang i Garbers 1997). Les guanilat ciclases retinals són proteïnes de membrana de tipus I, es troben primordialment al marge dels discos del segment extern (Dizhoor et al. 1994, Liu et al. 1994, Lowe et al. 1995), i actuen de forma dimèrica (Yang i Garbers 1997), preferentment en forma d'homodímers. Al segment extern dels cons, s'immunodetecta més marcatge per a *GUCY2D* que al dels bastons (Liu et al. 1994).

A mitjans dels noranta, va ser localitzat, mitjançant el mapatge d'homozigositat en una sèrie de famílies del nord d'Àfrica, el primer locus responsable d'amaurosi congènita de Leber al cromosoma 17 (a 17p13), entre D17S796 i D17S786 [LCA1, (Camuzat et al. 1995)].

L'amaurosi congènita de Leber

L'AMAUROSI CONGÈNITA DE LEBER [OMIM#204000] agrupa un conjunt de distròfies retinals autosòmiques recessives que són la causa principal de disfunció visual en els nounats i els infants. Aquest tipus de distròfia retinal infantil va ser descrita per primer cop el 1869 per l'oftalmòleg alemany THEODOR LEBER (Karlsruhe 1840–1917), que va constatar la natura hereditària de la malaltia i el paper de la consanguinitat en la seva gènesi (Leber 1869, 1971). Fenotípicament es caracteritza per una disfunció visual moderada o severa que es detecta ja en el moment del naixement o en els primers mesos de vida, nistagme infantil, un alentiment de les respostes pupil·lars, i una absència total des de bon començament dels registres electroretinogràfics. Actualment, han estat descrits 7 loci de la malaltia i diversos dels gens responsables: el locus LCA1 (gen *GUCY2D*), el locus LCA2 (gen *RPE65*), el locus LCA3 (gen *RDH12*), el locus LCA4 (*AIPL1*), el locus LCA5, el locus LCA6 (gen *RPGRIPI*), el locus LCA9, i els gens *CRX*, *CRBI*, i *TULPI*. Com es pot veure, alguns d'aquests gens també causen formes d'herència autosòmica recessiva de la retinitis pigmentària.

En el locus LCA1, es va localitzar el gen de la guanilat ciclasa retinal (*GUCY2D*), en el qual van ser identificades mutacions causals d'amaurosi congènita de Leber (Perrault et al. 1996). La disfunció de *GUCY2D* condueix a uns nivells molt baixos de cGMP als fotoreceptors i al consegüent tancament permanent dels canals catiónics oberts per cGMP (Perrault et al. 1996). Les mutacions recessives en *GUCY2D*, responsables d'amaurosi congènita de Leber, evidencien també la incapacitat de l'altra guanilat ciclasa, *GUCY2F*, de compensar la pèrdua de funció de *GUCY2D*, i posen de manifest que aquesta darrera és probablement la guanilat ciclasa principal en la fase de recuperació. En aquest sentit, el gen *GUCY2D* s'expressa en cons i bastons en uns nivells més alts que *GUCY2F*.

En la mateixa regió del cromosoma 17, solapat amb el locus LCA1, va ser mapat un locus de distròfia de cons i bastons autosòmica dominant en una família britànica [CORD6, (Kelsell et al. 1997)], i identificades mutacions en el gen *GUCY2D* com a responsables de la malaltia (Kelsell et al. 1998, Perrault et al. 1998).

Proteïna activadora 1A de la guanilat ciclasa (*GUCA1A*)

cr6:42231151–42255770 (6 exons)

dCOD, dCORD
(COD3)
6p21.1

La proteïna *GUCA1A* –GCAP1 (Palczewski et al. 1994)– forma part de la família de proteïnes activadores de la guanilat ciclasa (proteïnes GCAP). Les proteïnes GCAP són un dels components reguladors de la cascada de fototransducció: són proteïnes que uneixen ions de calci a través de tres motius proteics –anomenats mans EF– i activen la guanilat ciclasa que es troba unida a la membrana dels segments externs dels fotoreceptors (FIGURA 20).

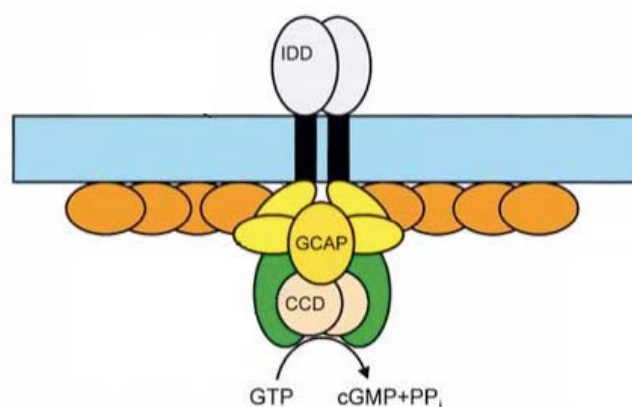


Figura 20 | Les proteïnes activadores de la guanilat ciclasa retinal (GCAP, en groc) s'uneixen a la guanilat ciclasa, i l'activen, quan els nivells de calci disminueixen per sota de 100 nM, després de la fotoactivació. IDD, domini intradiscal. CCD, domini catalític ciclasa. (Koch et al. 2002).

Han estat descrites quatre proteïnes d'aquesta família: GCAP1 (Palczewski et al. 1994), GCAP2 (Dizhoor et al. 1995), GCAP3 (Haeseleer et al. 1999) i GCIP (Li et al. 1998). A la retina dels mamífers, GCAP1 es localitza principalment a la membrana dels discos del segment extern dels cons, i GCAP2 tant al segment extern com intern dels cons i els bastons, majoritàriament als darrers (Kachi et al. 1999). Les GCAPs medien el mecanisme de realimentació que depèn de calci i que està encaminat a revertir el descens dels nivells de cGMP que es produeix en la fotoactivació. Com hem vist anteriorment, el descens en cGMP produeix el tancament dels canals catiónics, que fa disminuir la concentració intracel·lular de calci. Concentracions de calci per sota de 100 nM –característiques dels fotoreceptors adaptats a la llum– produeixen una desinhibició de les proteïnes GCAP, que activen la guanilat ciclasa, fent que augmenti la generació de cGMP i incrementi el nombre de canals oberts. Quan es recupera el corrent de fosc, i per tant incrementa la concentració de calci lliure per sobre de 500 nM, les GCAP tornen a ser inactives i no poden activar la guanilat ciclasa.

En el gen *GUCA1A*, va ser identificada una mutació de canvi d'aminoàcid (Y99C) en una família afectada de DISTRÒFIA DE CONS autosòmica dominant (Payne et al. 1998). Aquest tipus de distròfia està caracteritzada per una degeneració progressiva dels cons. Per aquesta raó, els individus afectats presenten fotofòbia, reducció de l'agudesa visual i, entre els 20 i els 30 anys, pèrdua de la visió en colors. Hi ha una afectació predominant de la visió central, per l'alta concentració de cons a la màcula, i pràcticament no hi ha afectació de la visió perifèrica dominada pels bastons (Payne et al.

1998). També, han estat descrites famíles amb distròfia de cons i bastons que tenen mutacions en aquest gen (Downes et al. 2001).

La proteïna GUCA1A amb la mutació Y99C activa de manera eficient la guanilat ciclasa de cons i bastons, però té alterada la seva afinitat pel calci (Dizhoor et al. 1998, Sokal et al. 1998). GUCA1A Y99C és insensible a la inhibició per calci, fins i tot a nivells per sobre d' 1 M , i, d'aquesta manera, manté activada constitutivament la guanilat ciclasa en tot el rang fisiològic de concentracions de calci (Dizhoor et al. 1998). Així doncs, l'activació constitutiva de la guanilat ciclasa, manté els nivells de cGMP elevats, el nombre de canals catiónics oberts, el corrent de foscor i els nivells intracel·lulars de calci, i aquests darrers poden ser la causa de la degeneració dels cons (Sokal et al. 1998). Per altra banda, s'ha determinat que GUCA1A Y99C activa la guanilat ciclasa en presència de GCAP no mutades carregades de calci (inhibides): demostració experimental de la dominància de les mutacions en *GUCA1A* (Dizhoor et al. 1998).

Recentment, ha estat generat un model animal, en ratolí, que conté la deleció dels gens *GCAP1* i *GCAP2*. Aquest model presenta un retard en la recuperació de la resposta a la llum, tant de bastons (Howes et al. 2002) com de cons (Pennesi et al. 2003b). Els mateixos estudis demostren que l'expressió del transgèn de *GCAP1*, sobre el fons del doble *knockout*, restableix el mecanisme de recuperació de la resposta a un flaix de llum, als bastons i als cons, en absència de *GCAP2* (Howes et al. 2002, Pennesi et al. 2003b).

Rodopsina quinasa, (*RHOK*, *GRK1*)

cr13:113369598–113373973 (3 exons)

CSNB
13q34

A començaments dels anys setanta, diversos grups van començar a acumular evidències a favor de l'existència, als fotoreceptors, d'una activitat de tipus quinasa que fosforil·lava la rodopsina, en un procés que depenia de la llum, és a dir, que es produïa un cop la rodopsina havia estat fotoactivada (Bownds et al. 1972, Kuhn i Dreyer 1972, Frank et al. 1973). La desactivació de la rodopsina és un procés que depèn de la llum i que consisteix en la fosforil·lació de la rodopsina per part d'una quinasa molt específica, anomenada rodopsina quinasa, *RHOK* (FIGURES 13 I 17).

La malaltia d'Oguchi és una forma rara de ceguesa nocturna estacionària congènita d'herència autosòmica recessiva. En l'adaptació a la llum, el fons de l'ull dels pacients d'Oguchi adopta una coloració groguenca-marronosa característica, que rep el nom de fenomen Mizuo. Com hem vist, van ser descrites mutacions en el gen de l'arrestina responsables de la malaltia d'Oguchi en pacients japonesos (Fuchs et al. 1995, Maw et al. 1995). La rodopsina quinasa i l'arrestina actuen, de manera seqüencial, en el procés de desactivació de la rodopsina fotoactivada i, per aquest motiu, el gen de la rodopsina quinasa era un candidat funcional idoni per a la malaltia d'Oguchi. El cribratge mutacional del gen *RHOK*, en tres pacients d'Oguchi que no presentaven mutacions en el gen de l'arrestina, va permetre caracteritzar tres mutacions en *RHOK* responsables d'aquesta forma de ceguesa nocturna estacionària (Yamamoto et al. 1997).

Subunitat del canal catiònic obert per cGMP dels cons (CNGA3)

cr2:98444917–98473581 (7 exons)

Acromatòpsia
(ACHM2)
2q11.2

El gen *CNGA3* codifica la subunitat del canal catiònic obert per cGMP específic dels cons. *CNGA3* va ser el primer gen identificat com a causal d'acromatòpsia autosòmica recessiva, o ceguesa completa als colors (Arbour et al. 1997, Kohl et al. 1998, Wissinger et al. 1998), en el que era el primer exemple d'una alteració de la visió en colors causada per un gen que no codificava cap dels fotopigments dels cons, i que evidenciava que la fototransducció, en les tres poblacions de cons de la retina, presentava una mateixa base genètica.

La ceguesa completa als colors

L'ACROMATÒPSIA, coneguda com a ceguesa completa als colors o monocromatisme dels bastons, és una malaltia ocular congènita caracteritzada per l'absència total de la visió en colors, una agudes visual reduïda, sobretot en intensitats elevades de llum –fet pel qual s'anomena també "ceguesa diürna"–, fotofòbia, i nistagme. És una malaltia rara, amb una prevalença de 1:20.000-1:50.000, d'herència autosòmica recessiva. Aquesta és una alteració específica de les tres poblacions de cons, els quals són viables però incapaçs de generar un impuls elèctric en resposta a la fotoactivació. La morfologia de la retina en els individus acromatòpsics és normal. Han estat descrits quatre loci responsables d'acromatòpsia; el primer dels quals, ACHM1 [OMIM#603096], va ser mapat al cromosoma 14 en un cas que presentava isodisomia uniparental materna per aquest cromosoma (Pentao et al. 1992) i del qual encara no se n'ha identificat el gen responsable. Les formes ACHM2 [OMIM#216900] i ACHM3 [OMIM#262300] són causades per mutacions en els gens que codifiquen les subunitats (*CNGA3*) i ! (*CNGB3*) del canal catiònic dels cons, respectivament. Aquest canal actua de manera anàloga, en la fototransducció, al canal catiònic dels bastons i és el responsable de generar la resposta elèctrica un cop s'ha produït la fotoactivació en els cons. Finalment, la forma ACHM4 [OMIM+139340] és causada per mutacions en el gen que codifica la subunitat de la transducina dels cons (*GNAT2*). A continuació, repassarem més detalladament cadascuna d'aquestes formes i els gens que les provoquen.

En aquest punt, cal remarcar que, tot i l'existència de tres gens de les opsines –que s'expressen cadascun d'ells en una població específica de cons i permeten la visió tricromàtica dels primats–, a partir del segon pas de la fototransducció els mecanismes moleculars subjacents són comuns en les tres poblacions de cons. Aquest fet es posa de manifest en tant que mutacions en algun dels gens de les opsines impossibiliten la visió de llum d'una determinada longitud d'ona –i, per tant, produeixen ceguesa parcial als colors–, i en canvi, mutacions en gens per sota de les opsines, en la cascada de fototransducció dels cons, produeixen acromatòpsia. Entre un 20 i un 30% dels casos de

ceguesa completa als colors són causats per l'alteració del gen *CNGA3*, que representa la segona causa més prevalent de la malaltia després de l'alteració del gen *CNGB3* (Kohl et al. 2002). Mutacions en *CNGA3* no han estat relacionades únicament a casos d'acromatòpsia completa, sinó que també han estat identificades en pacients acromatòpsics parcials, que mantenen una certa funció residual dels cons, i en casos rars de DISTRÒFIA DE CONS PROGRESSIVA SEVERA (Wissinger et al. 2001).

Subunitat del canal catiónic obert per cGMP dels cons (*CNGB3*)

cr8:87655278–87825017 (17 exons)

Acromatòpsia
(ACHM3)
8q21.3

A començaments dels setanta, van aparèixer publicats en revistes especialitzades els primers articles que analitzaven la prevalença força alta d'una forma de ceguesa completa als colors a la Micronèsia, als atols de Pingelap i Mokil i a l'illa de Pohnpei, FIGURA 21 (Brody et al. 1970, Hussels i Morton 1972).

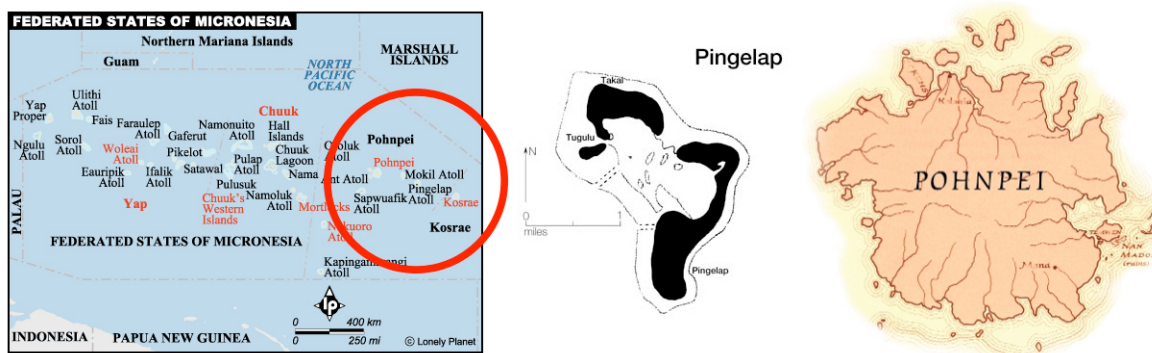


Figura 21 | Localització a la Micronèsia de l'atol de Pingelap i de l'illa de Pohnpei, en els quals hi ha una alta incidència de ceguesa completa als colors o acromatòpsia, causada per mutacions en el gen *CNGB3*.

En aquestes illes, entre un 4 i un 10% dels infants neixen cecs als colors. Pels volts de l'any 1775, el tifó Lengkieki va devastar l'atol de Pingelap i en va matar el noranta per cent de la població, que va quedar reduïda a uns vint supervivents. Abans del tifó, Pingelap tenia una població de gairebé mil habitants, una cultura i una llengua diferents de les de l'illa més propera, Pohnpei, i una organització social jeràrquica –al capdamunt de la qual hi havia la figura del *nahmwarki*, el rei–, que havien estat introduïdes pels primers pobladors de l'atol vuit-cents anys enrera. A partir dels vint supervivents del Tifó, entre els quals hi havia el *nahmwarki*, i durant gairebé dos-cents anys d'aïllament geogràfic, es va anar recuperant la població de l'atol fins a arribar als set-cents pingelapesos actuals. A causa de l'alta consanguinitat, diverses generacions després del tifó, va aparèixer una nova malaltia ocular a l'illa; el 1820, va néixer el primer nen acromatòpsic a Pingelap i en poques generacions el nombre de cecs als colors va créixer fins a més del 5% de la població. Els

nens que presentaven aquesta condició semblaven normals en néixer, però, cap als dos o tres mesos d'edat, començaven a parpellejar, moure els ulls i allunyar el cap de la llum del sol. Quan eren una mica més grans, es posava de manifest que no hi podien veure bé amb detall i, cap als quatre anys d'edat, era evident que no distingien els colors (Sacks 1996).

Els estudis genètics apunten que un dels nou mascles fundadors supervivents, el *nahnmwarki*, era portador de la mutació recessiva que, quatre generacions després del tifó, va donar lloc als primers casos d'acromatòpsia o *maskun* –"no visió", en pingelapès–, i que és present en homozigosi en totes les persones acromatòpsiques d'aquesta illa de la micronèsia (Sacks 1996, Sundin et al. 2000). Actualment, dels set-cents habitants de Pingelap, un terç són portadors de la mutació i hi ha 57 acromatòpsics (Sacks 1996).

En una anàlisi de lligament realitzada a partir de tres famílies provinents de Pingelap, va ser identificat un nou locus d'acromatòpsia al braç llarg del cromosoma 8 [ACHM3, 8q21-q22, (Winick et al. 1999)]. Els mateixos resultats van ser obtinguts en una altra anàlisi de lligament a partir d'una família irlandesa acromatòpsica (Milunsky et al. 1999). En un estudi posterior, l'anàlisi de noves famílies pingelapeses va permetre definir una regió crítica d'1.4 cM, que corresponia a unes 2 Mb (Sundin et al. 2000). En paral·lel, en un altre treball, també es va refinar l'interval i es va construir un contig de YAC (Kohl et al. 2000). Es va determinar que aquesta regió del cromosoma 8 era paràloga a una regió a 16q13 que contenia el gen *CNGB1*, que codifica la subunitat ! del canal catiònic dels bastons i que, com hem vist, causa retinitis pigmentària autosòmica recessiva. A partir d'aquestes dades, i del fet que el gen de la subunitat del canal catiònic dels cons (*CNGB3*) era responsable de la forma lligada a ACHM2, es va identificar un nou gen a 8q21.3, *CNGB3*, que codificava la subunitat ! del canal catiònic dels cons (Sundin et al. 2000). Aquest gen va ser identificat també, en un altre estudi, per l'homologia d'unes seqüències del contig de YAC de la regió amb el gen murí *cng6*: gen que, en el ratolí, codifica la subunitat ! del canal catiònic dels cons (Kohl et al. 2000). Finalment, en el gen *CNGB3*, va ser identificada la mutació responsable de la ceguesa als colors a l'atol de Pingelap (Sundin et al. 2000), i van ser descrites altres mutacions en diverses famílies acromatòpsiques d'arreu del món (Kohl et al. 2000).

El gen *CNGB3* és el responsable de la major part de casos, entre un 40 i un 50%, de ceguesa completa als colors (Kohl et al. 2002). L'ortòleg caní del gen *CNGB3* va ser identificat com el gen responsable de la degeneració de cons en les races de gos Malamute d'Alaska i Shorthaired Pointer alemanya, gràcies a la conservació de la sintènia entre la regió del cromosoma 8 humà que conté el gen *CNGB3* i la regió equivalent del cromosoma 29 caní, en la qual s'havia mapat el locus d'aquesta malaltia (Sidjanin et al. 2002).

Subunitat de la transducina dels cons (*GNAT2*)

cr1:109857755–109867747 (8 exons)

Acromatòpsia
(ACHM4)
1p13.3

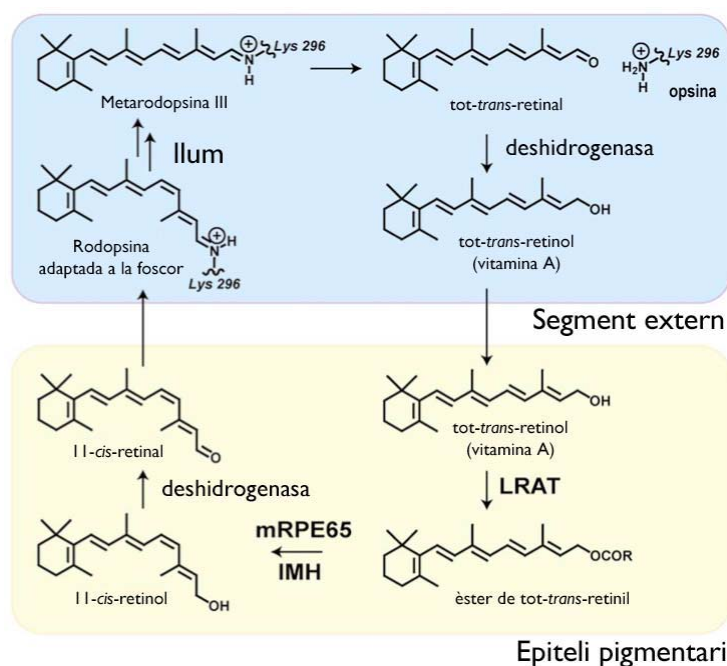
El gen *GNAT2* codifica la subunitat de la transducina específica dels cons, la proteïna G que transmet el senyal lumínic des de les opsines fins a la fosfodiesterasa de cGMP dels cons. Mutacions en el gen *GNAT2* són responsables d'un petit percentatge de casos d'acromatòpsia (Aligianis et al. 2002).

§

3.2. El metabolisme del retinol (vitamina A): el cycle visual

La vitamina A (tot-*trans*-retinol) és el substrat necessari per a la biosíntesi dels retinoides, compostos que desenvolupen funcions essencials en el desenvolupament, en el creixement, en la reproducció, en la immunitat, i en la visió. Als animals, la impossibilitat de sintetitzar retinol fa que l'haguem d'obtenir a través de la ingesta, en forma de vitamina A –èsters de retinil, retinol i, en petites quantitats, àcid retinoic– o com a provitamina A, als carotenoides dels vegetals i els fruits. A l'epiteli intestinal, tenen lloc els processos d'absorció de retinol i d'esterificació amb àcids grassos de cadena llarga, mitjançant l'enzim lecitina retinol aciltransferasa (LRAT), per a permetre la seva inclusió com a èsters de retinil en el centre hidrofòbic dels quilomicrons, i el seu transport posterior de la limfa a la circulació sanguínia. El fetge rep quilomicrons remanents i n'emmagatzema els èsters de retinil, com a reserva hepàtica de retinol per a l'organisme. Per a ser transportat a altres teixits, el retinol és desesterificat al fetge, s'acomplexa a la proteïna sèrica d'unió a retinol (RBP4) i és alliberat a la circulació sanguínia en un complex que incorpora la proteïna transtiretina (TTR); es creu que totes dues proteïnes impedeixen l'oxidació i la isomerització del retinol quan és distribuït a altres teixits, i la unió d'RBP4-retinol a TTR evita la pèrdua, per filtració a través dels glomèruls renals, del complex proteïna-retinol.

Figura 22 | El cycle visual en mamífers. El tot-*trans*-retinol es dissocia de l'opsina un cop la rodopsina ha estat fotoexcitada. Als bastons, una tot-*trans*-retinol deshidrogenasa redueix el tot-*trans*-retinol a tot-*trans*-retinol, que és alliberat fora de la cèl·lula i captat per l'epiteli pigmentari. A l'RPE, el tot-*trans*-retinol és esterificat per LRAT a èsters de tot-*trans*-retinil que seràn presentats per mRPE65 a una isomerohidrolasa (IMH) que els transformarà a 11-*cis*-retinal, que al seu torn serà convertit a 11-*cis*-retinal per acció d'RDH5. L'11-*cis*-retinal surt de l'epiteli pigmentari i és captat pels bastons, en els quals regenerarà la rodopsina. Adaptada de (Xue et al. 2004).



Per a la seva funció en la visió, com a cromòfor de les opsines dels cons i de la rodopsina dels bastons, en la forma d'11-*cis*-retinal, el retinol unit a proteïna és captat, a la membrana basal de l'epiteli pigmentari de la retina, probablement, per un receptor de proteïna d'unió a retinol. Dins de l'epiteli pigmentari, el tot-*trans*-retinol s'uneix a la proteïna d'unió a retinol cel·lular (CRBP) i és esterificat per una lecitina retinol aciltransferasa (LRAT) a èsters de tot-*trans*-retinil (FIGURA 22). A

banda de ser una forma d'emmagatzematge de vitamina A a l'epiteli pigmentari, els èsters de tot-*trans*-retinil són el substrat d'una isomerohidrolasa (ISH) que els transforma a 11-*cis*-retinol. En aquest pas, hi intervé la proteïna RPE65, que s'uneix als èsters de tot-*trans*-retinil i els presenta a la ISH. A continuació, l'11-*cis*-retinol s'uneix a la proteïna d'unió a retinaldehid cel·lular (RLBP1) i, tot seguit, és oxidat per acció de l'11-*cis*-retinal deshidrogenasa 5 (RDH5) a 11-*cis*-retinal. L'11-*cis*-retinal és alliberat de l'epiteli pigmentari i captat pels fotoreceptors des de l'espai extracel·lular, per tal de regenerar les opsines i la rodopsina (FIGURA 22).

La incidència d'un fotó de llum en el pigment visual produeix la isomerització del cromòfor 11-*cis*-retinal a tot-*trans*-retinal. Com hem dit anteriorment, aquesta isomerització indueix un canvi conformacional a l'opsina, que serà el detonant de la cascada de transducció visual. En aquest punt, s'inicia el procés de regeneració del cromòfor: el tot-*trans*-retinal s'allibera de l'opsina, s'uneix al fosfolípid fosfatidiletanolamina, i l'N-retinilidè-fosfatidiletanolamina que en resulta és translocat per la proteïna ABCA4 des de la cara interna de la membrana dels discos fins al citoplasma del fotoreceptor (FIGURA 23).

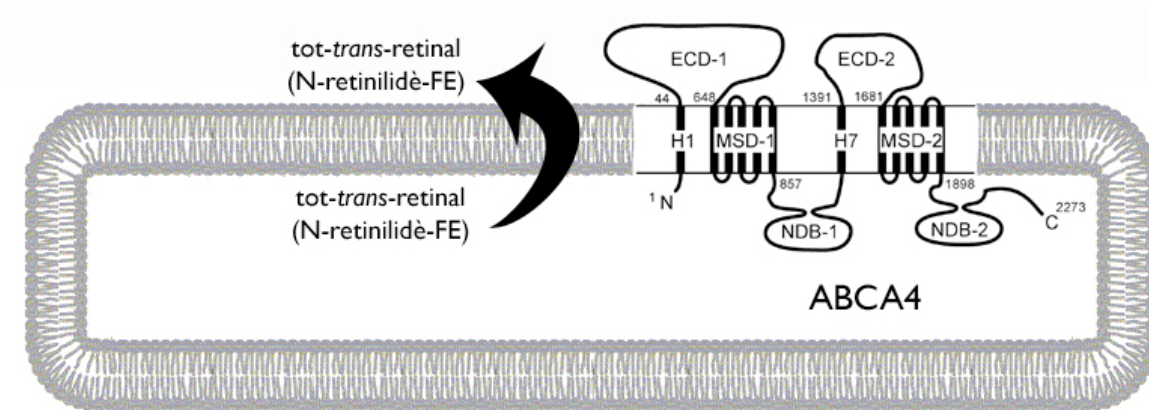


Figura 23 | Translocació del tot-*trans*-retinal unit a fosfatidiletanolamina (N-retinilidè-FE), per l'acció d'ABCA4, des de la cara interna de la membrana dels discos fins a la cara externa, citoplasmàtica.

Al citoplasma, una tot-*trans*-retinol deshidrogenasa (tRDH) redueix el tot-*trans*-retinal (unit a fosfatidiletanolamina) a tot-*trans*-retinol, que és alliberat a l'espai extracel·lular, d'on és captat per les cèl·lules de l'epiteli pigmentari. Com hem vist, a l'epiteli pigmentari, el tot-*trans*-retinol serà reciclat fins a 11-*cis*-retinal. El reciclatge del cromòfor també té lloc en les cèl·lules de Müller. Cal remarcar que ni els cons ni els bastons poden dur a terme tots sols el reciclatge del cromòfor (de tot-*trans*-retinal a 11-*cis*-retinal) i que necessiten la col·laboració d'altres cèl·lules de la retina. Aquest paper, hem vist que el realitzen les cèl·lules de l'epiteli pigmentari (cicle visual clàssic, FIGURA 24), però, més recentment, s'ha començat a dilucidar el rol d'altres poblacions cel·lulars, com les cèl·lules de Müller o els cons, en les vies de regeneració dels fotopigments (Arshavsky 2002).

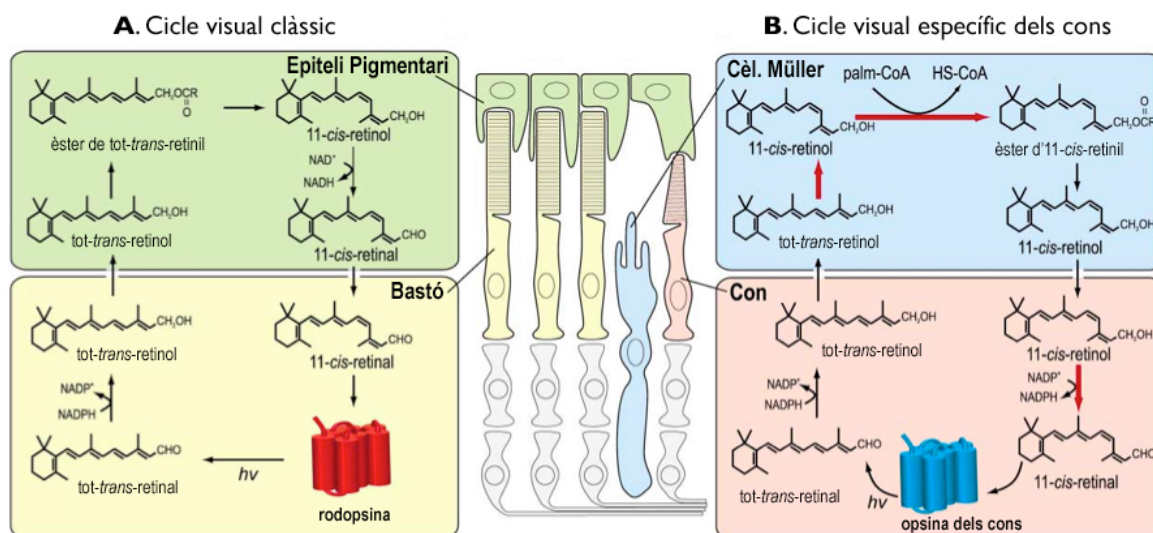


Figura 24 | Comparació entre el cicle visual clàssic descrit als bastons i el cicle visual específic dels cons. Aquest altre cicle visual, en el qual hi intervenen enzims dels cons i de les cèl·lules de Müller, està especialitzat en la regeneració de les opsines dels cons en condicions de molta il·luminació. Adaptada de (Arshavsky 2002).

Finalment, aquest mateix any, s'ha proposat l'existència d'un sistema de regulació del cicle visual a l'epiteli pigmentari, que controla tant la disponibilitat del substrat de la isomerohidrolasa –els èsters de tot-trans-retinil– com la del producte –l'11-cis-retinol–, en el qual hi intervenen les proteïnes RPE65 i LRAT (Xue et al. 2004).

Alteracions del metabolisme del retinol que causen distròfies retinals

Molts dels gens que codifiquen proteïnes que intervenen en el metabolisme del retinol han estat identificats com a gens responsables de diverses distròfies retinals. De tots ells, el cas paradigmàtic és el gen *ABCA4* –que codifica una proteïna transportadora d'N-retinilidè-fosfatidiletanolamina, que es troba situada a la membrana dels discos del segment extern dels bastons– i que és el gen causal d'un ventall extens de distròfies retinals, tant centrals com perifèriques. *ABCA4*, que va ser identificat com a gen causal de la malaltia d'Stagard –un tipus de distròfia macular–, va ser caracteritzat, posteriorment, al nostre grup, com a gen responsable d'una forma de retinitis pigmentària autosòmica recessiva, en el locus RP19, i aquest fet va obrir la porta a la implicació d'aquest gen en altres distròfies de la retina com ara el *fundus flavimaculatus*, la distròfia de cons i bastons, i la degeneració macular associada a l'edat. Altres gens del metabolisme del retinol que han estat identificats com a responsables de distròfies retinals són el gen de la lecitina retinol aciltransferasa (*LRAT*), el gen d'una proteïna específica de l'epiteli pigmentari (*RPE65*) que intervé en la isomerització del tot-trans-retinol a 11-cis-retinol, el gen de la proteïna d'unió a retinaldehid cel·lular (*RLBP1*), el gen que codifica el receptor unit a proteïna G de l'epiteli pigmentari de la retina (*RGR*), el gen de la proteïna sèrica d'unió a retinol (*RBP4*), i el gen de l'11-cis-retinol

deshidrogenasa de l'epiteli pigmentari de la retina (*RDH5*). Molt recentment, el gen d'una retinol deshidrogenasa dels fotoreceptors (*RDH12*) ha estat descrit com a gen causal d'amaurosi congènita de Leber i d'un altre tipus de distròfia retinal infantil severa. Cal remarcar, que les distròfies retinals causades per gens del metabolisme del retinol són, majoritàriament, d'herència autosòmica recessiva, tot i que hi ha alguna excepció discutible i, per tant, es posa de manifest que aquest tipus d'alteracions metabòliques, en heterozigosi, són complementades per la còpia salvatge del gen i no esdevenen patogèniques.

3.2.1. Gens RP que codifiquen proteïnes del metabolisme del retinol

Lecitina retinol aciltransferasa (*LRAT*)

cr4:156020476–156034155 (2 exons)

arRP, CSRD
4q32.1

El gen *LRAT* s'expressa en teixits en els quals el metabolisme de la vitamina A té un paper essencial, entre els quals trobem l'epiteli pigmentari de la retina (Ruiz et al. 1999). A l'epiteli pigmentari, *LRAT* catalitza la primera reacció del cicle visual fora del fotoreceptor, en la qual el tot-*trans*-retinol unit a CRBP, és esterificat –utilitzant lecitina com a donador del grup acil– per a formar èsters de tot-*trans*-retinol (FIGURA 22). Recentment, diverses aproximacions han servit per a refinar el nostre coneixement sobre la funció d'aquesta proteïna i descobrir-ne nous papers (FIGURA 25). El *knockout* del gen *Lrat* en ratolí presenta exclusivament afectació retinal –tot i que el gen s'expressa en diversos teixits–, caracteritzada per una reducció del 35% de la longitud dels segments externs dels bastons a les 6-8 setmanes (Batten et al. 2004). Els ratolins *Lrat*^{-/-} presenten uns nivells gairebé inexistents d'èsters de tot-*trans*-retinil al fetge, al pulmó, a l'ull i a la sang, i, en canvi, els nivells plasmàtics de tot-*trans*-retinol es redueixen només lleugerament. L'examinació electroretinogràfica posa de manifest una alteració severa ja des d'un inici, remisscent del fenotip humà (Batten et al. 2004). Com veurem al següent apartat, que fa referència a la funció de la proteïna RPE65, recentment s'ha descobert un nou rol de la proteïna *LRAT* com a palmitoïl transferasa en un bucle de regulació del cicle visual en el qual hi intervé RPE65 (Xue et al. 2004).

En un cribratge de 267 pacients amb distròfia retinal es van identificar dues mutacions en aquest gen (S175R i 396delAA) en tres pacients que presentaven un tipus de distròfia retinal infantil severa –CSRD, *childhood-onset severe retinal dystrophy*–, i es va demostrar l'absència d'activitat lecitina retinol aciltransferasa en cèl·lules COS-7 que havien estat transfectades amb la variant S175R del gen *LRAT* (Thompson et al. 2001).

Proteïna de 65 kDa específica d'epiteli pigmentari de la retina (RPE65)

cr1:68606465–68627663 (14 exons)

arRP, LCA
(RP20, LCA2)
1p31.2

A partir de la generació i estudi del *knockout* del gen *Rpe65* en el ratolí, es va poder postular la implicació de la proteïna RPE65 en el cycle visual i es va determinar que era essencial per a la biosíntesi del cromòfor visual (Redmond et al. 1998). El fenotip dels ratolins *Rpe65*^{-/-} es caracteritza per una manca de la funció dels bastons i una desorganització del segment extern d'aquestes cèl·lules –ahora que es preserva la funció dels cons– i per l'absència de rodopsina. L'acumulació d'èsters de tot-*trans*-retinil i la manca d'èsters d'11-*cis*-retinil, a l'epiteli pigmentari d'aquests ratolins, posa de manifest que RPE65 és necessària per a la isomerització del tot-*trans*-retinol a 11-*cis*-retinol. De resultes de l'alteració, els ratolins *Rpe65*^{-/-} no poden sintetitzar l'11-*cis*-retinal, i aquest fet desencadena la degeneració dels bastons que, en absència del cromòfor, no regeneren la rodopsina. El *knockout* d'*Rpe65*, però, no afecta la funció dels cons, en els quals el mecanisme de regeneració del cromòfor pot seguir altres vies independents de l'epiteli pigmentari (FIGURA 24). Altres autors, però, han posat de manifest que la funció dels cons també està afectada en aquest model i que la funció visual residual que s'observa prové dels bastons (Seeliger et al. 2001).

Tot un seguit d'estudis recents han permès definir amb precisió la funció múltiple i complexa de la proteïna RPE65. Se sabia que n'existeixen diverses formes: una forma d'alt pes molecular que s'associa a la membrana de l'epiteli pigmentari, mRPE65, i una forma soluble, sRPE65 (Ma et al. 2001). La forma mRPE65 s'ha descobert que uneix èsters de tot-*trans*-retinil de cadena llarga (Gollapalli et al. 2003, Jahng et al. 2003), i que és la forma que els presenta a la isomerohidrolasa (IMH) que els transformarà en 11-*cis*-retinol, FIGURA 22 (Mata et al. 2004). Per contra, la forma de baix pes molecular (sRPE65) s'uneix al tot-*trans*-retinol (vitamina A) i el fa accessible a LRAT. Les dues formes d'RPE65 s'uneixen a substrats diferents i difereixen entre elles pel seu estat de palmitoilació: mRPE65 està palmitoilada i sRPE65 no ho està (FIGURA 25). La transició entre les dues formes està mediada per LRAT que, en aquesta reacció, actua com a palmitoil transferasa (Xue et al. 2004). En el més recent d'aquests estudis, es proposa l'existència d'un cycle –entre mRPE65 i sRPE65, catalitzat per LRAT–, que funciona com un interruptor molecular, en el qual la forma mRPE65 actua com a donador de palmitoil, FIGURA 25 (Xue et al. 2004). Aquest es decanta en un sentit o en un altre en funció de les necessitats de cromòfor en una situació d'il·luminació o de foscor. En la foscor, quan no és necessària la síntesi del cromòfor, mRPE65 dona el palmitoil perquè LRAT esterifiqui l'11-*cis*-retinol i el faci inaccessible per a que no pugui ser transformat a 11-*cis*-retinal. En canvi, en una situació de llum, la fotoisomerització de la rodopsina es tradueix en un flux de tot-*trans*-retinol del fotoreceptor cap a l'epiteli pigmentari (FIGURA 25), que hi respon esterificant-lo, mitjançant LRAT, a èsters de tot-*trans*-retinil que seran processats per la isomerohidrolasa (ISH). Per una altra banda, els èsters de tot-*trans*-retinil promouen la conversió d'sRPE65 a mRPE65, que és la forma que els presenta a l'ISH per a formar 11-*cis*-retinol. En condicions d'il·luminació, l'11-*cis*-retinol és convertit a 11-*cis*-

retinal per acció de l'11-*cis*-retinol deshidrogenasa 5 (RDH5). En la foscor però, com hem apuntat, l'11-*cis*-retinol és palmitoïlat amb mRPE65 com a donador i es forma 11-*cis*-retinil palmitat –la forma d'emmagatzematge del cromòfor– i sRPE65 (Xue et al. 2004).

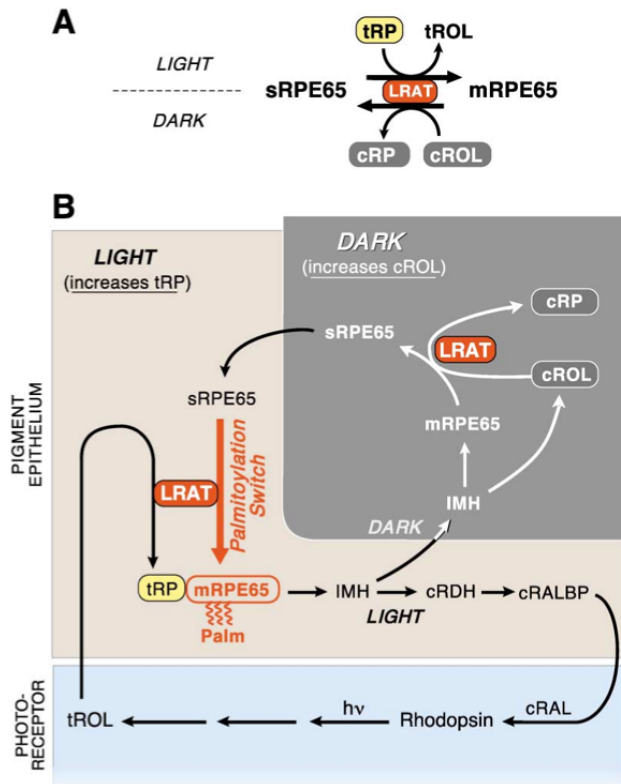


Figura 25 | El flux dels retinoides en el cicle visual. **(A)** Comportament de l'interruptor molecular d'RPE65, que depèn de la palmitoïlació mediada per LRAT, en una situació de llum i en la foscor. **(B)** Regulació del flux dels retinoides en el cicle visual mitjançant el sistema de palmitoïlació d'RPE65. cRAL, 11-*cis*-retinal. cRALBP, proteïna d'unió a retinaldehid cel·lular (RLBP1). cRDH, 11-*cis*-retinol deshidrogenasa 5 (RDH5). cROL, 11-*cis*-retinol. cRP, 11-*cis*-retinil palmitat. IMH, isomerohidrolasa. Palm, palmitat. tRP, tot-*trans*-retinil palmitat. tROL, tot-*trans*-retinol. (Xue et al. 2004).

Inicialment, el gen *RPE65* va ser descrit com un dels gens responsables de l'amaurosi congènita de Leber (Gu et al. 1997, Marlhens et al. 1997). Més tard, també van ser descrites mutacions en aquest gen en pacients amb retinitis pigmentària autosòmica recessiva (Morimura et al. 1998). L'ortòleg d'aquest gen en el gos és el responsable de la degeneració retinal present en alguns exemplars de la raça sueca Briard-Beagle, en els quals va ser identificada una delecció en homozigosi de 4 bp en el gen *RPE65* (Aguirre et al. 1998, Veske et al. 1999). Aquest model natural ha trascendit el camp de la recerca en distròfies retinals hereditàries, perquè representa un dels pocs exemples exitosos d'aplicació de la teràpia gènica al tractament d'una malaltia d'herència mendeliana. El protocol de teràpia gènica es va realitzar mitjançant la injecció subretinal d'un virus adenoassociat, que contenia l'al·lel salvatge del gen *RPE65*, en gossos Briard (Acland et al. 2001). Els gossos tractats van recuperar la visió, com es posava de manifest a les mesures electroretinogràfiques i en tests psicofísics i conductuals. En el model murí, s'ha assajat, amb bons resultats, el tractament amb 9-*cis*-retinal (van Hooser et al. 2000).

Proteïna d'unió a retinaldehid cel·lular (*RLBP1*)

cr15:87554103–87565828 (9 exons)

arRP, arRPA
15q26.1

El gen *RLBP1* codifica la proteïna d'unió a retinaldehid cel·lular (Crabb et al. 1988), una proteïna soluble que es troba únicament a la retina i a la glàndula pineal i que s'uneix a 11-*cis*-retinol i 11-*cis*-retinal (Saari 2000). A la retina, *RLBP1* s'expressa a l'epiteli pigmentari i a les cèl·lules de Müller (Maw et al. 1997).

El 1997, va ser identificada en el gen *RLBP1* una mutació de canvi d'aminoàcid (R150Q) en una família amb retinitis pigmentària autosòmica recessiva (Maw et al. 1997). Mutacions en el gen *RLBP1* han estat identificades, posteriorment, en pacients de RETINITIS PUNCTATA ALBESCENS autosòmica recessiva (Morimura et al. 1999a), en un subtipus d'aquesta malaltia que es dona a Suècia anomenat DISTRÒFIA BOTHNIA (Burstedt et al. 1999), i en una forma de distròfia retinal autosòmica recessiva reminiscent de la retinitis *punctata albescens*, però d'aparició més primerenca i progressió més ràpida, que afecta individus de l'illa de Newfoundland i que s'anomena DISTRÒFIA DE BASTONS I CONS DE NEWFOUNDLAND (Eichers et al. 2002).

Els animals homozigots *knockout* per la deleció d'*Rlbp1* presenten un retard, de més de deu cops, en la regeneració de la rodopsina, en la producció d'11-*cis*-retinol i en l'adaptació a la foscor. L'acumulació d'èsters de tot-*trans*-retinil posa de manifest un defecte en la isomerització del tot-*trans*-retinol a 11-*cis*-retinol. Tret d'aquests defectes en la fase de regeneració del pigment visual, els ratolins *Rlbp1*^{-/-} no presenten cap mena de degeneració dels fotoreceptors (Saari et al. 2001). Els resultats d'aquest treball suggereixen que *RLBP1* actua com una proteïna acceptora d'11-*cis*-retinol en la reacció d'isomerització del cicle visual.

Transportador amb una casset d'unió a ATP (*ABCA4*)

cr1:94170420–94298700 (50 exons)

arRP, CORD, MD, FFM
(RP19, STGD1)
1p22.1

ABCA4 codifica un transportador de la família de transportadors amb casset d'unió a ATP, específic de la retina, que es troba localitzat a la membrana dels discos del segment extern dels bastons (Sun i Nathans 1997). Els membres d'aquesta família de proteïnes participen en el transport, que depèn d'ATP, d'un ampli espectre de substrats a través de les membranes, i comparteixen una estructura comuna formada per 4 dominis, 2 d'unió a ATP i 2 més que contenen diversos segments transmembrana (FIGURA 26).

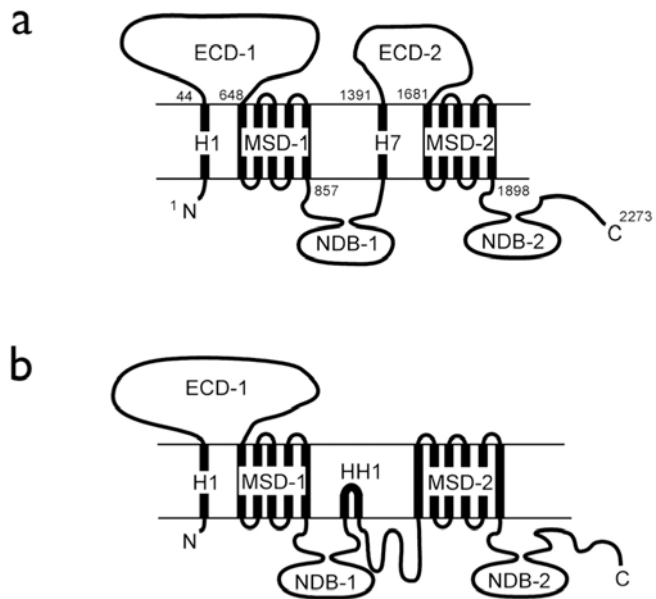


Figura 26 | Models topològics d'ABCA4 en la membrana dels discos. ECD, domini exocitoplasmàtic. H, domini transmembrana. HH, domini molt hidrofòbic. MSD, domini transmembrana múltiple. NDB, domini d'unió al nucleòtid (Bungert et al. 2001).

El model animal generat en el ratolí amb el *knockout* del gen ortòleg *RmP* (*Abca4*) presenta un retard en l'adaptació a la foscor, un augment del tot-*trans*-retinal i de fosfatidiletanolamina als segments externs, després de l'exposició a la llum, i una acumulació d'aquest darrer compost. A l'epiteli pigmentari d'aquests animals, també es detecten depòsits de lipofuscina que podrien resultar tòxics per a l'RPE, la degeneració del qual provocaria la conseqüent degeneració dels fotoreceptors (Weng et al. 1999). L'acúmulo d'*N*-retinilidè fosfatidiletanolamina suggereix que ABCA4 actua com una translocasa (FIGURA 23), que transporta aquest compost des de l'interior dels discos fins al citoplasma del fotoreceptor (Weng et al. 1999). L'*N*-retinilidè-fosfatidiletanolamina es forma per la unió a fosfatidiletanolamina del tot-*trans*-retinal, alliberat de la rodopsina.

El gen *ABCA4* és un paradigma de gen responsable d'un ampli ventall de distròfies retinals tant centrals com perifèriques. Inicialment va ser descrit com a gen principal de la malaltia d'Stagardt (Kaplan et al. 1993, Allikmets et al. 1997b).

La malaltia d'Stagardt

La MALALTIA D'STAGARDT és el tipus de degeneració macular juvenil més freqüent. Es manifesta entre els 6 i els 20 anys, com una deterioració gradual de la visió central caracteritzada per una reducció severa de l'agudesia visual –conseqüència de l'afectació macular– que progressa fins a la ceguesa total. Va ser descrita el 1909 per l'oftalmòleg alemany KARL BRUNO STAGARDT (Berlin 1875–Marburg 1927), que va reconèixer, en el fons d'ull dels pacients, les alteracions de la màcula envoltades per punts groguencs-blanquinosos de formes irregulars. La malaltia d'Stagardt és d'herència autosòmica recessiva i està causada per mutacions en el gen *ABCA4* (STGD1). Han estat descrites formes de degeneració macular d'herència dominant similars a Stagardt, una de les quals causada pel gen *ELOVL4* (6q14.1, STGD3 i STGD2) i un altre locus a 4p (STGD4).

Un any més tard, al nostre grup, *ABCA4* va ser caracteritzat com el gen causal de retinitis pigmentària autosòmica recessiva en el locus RP19 (Martínez-Mir et al. 1997a, Martínez-Mir et al. 1998). Aquest treball constitueix la primera implicació en una distròfia retinal perifèrica (retinitis pigmentària) d'un gen descrit inicialment com a causal de distròfia central (malaltia d'Stargardt). D'aquesta descoberta, se'n deriva la implicació d'*ABCA4* en diverses distròfies retinals: el *fundus flavimaculatus* (Gerber et al. 1995), la degeneració macular associada a l'edat (Allikmets et al. 1997a), i la distròfia de cons i bastons (Cremers et al. 1998, Maugeri et al. 2000), totes elles d'herència autosòmica recessiva. Al nostre grup, s'ha analitzat també aquest gen en pacients espanyols afectats d'Stargardt, *fundus flavimaculatus*, distròfia de cons i bastons, i distròfia de patró, i s'ha establert un model de correlació genotip-fenotip, entre els diversos tipus de mutacions en *ABCA4* i la severitat de la patologia; en el model, es posa de manifest que la presència en homozigosi d'una mutació nul·la es produeix exclusivament en casos de retinitis pigmentària (condició més severa) (Paloma et al. 2001, Paloma et al. 2002a).

Receptor unit a proteïna G de l'epiteli pigmentari de la retina (RGR)

cr10:85994814–86009695 (7 exons)

arRP, dCS
10q23.1

El gen *RGR* codifica un receptor acoblat a proteïna G, que conté set segments transmembrana, i és homòleg al gen de la rodopsina. La seva estructura genòmica és diferent de l'estructura dels gens de la resta d'opsines, fet que ha portat alguns autors a suggerir que *RGR* és el gen de la família de les opsines dels vertebrats que va divergir en primer lloc (Shen et al. 1994). *RGR* va ser identificat per hibridació diferencial a partir d'una genoteca d'epiteli pigmentari de la retina (Jiang et al. 1993), i es va demostrar que s'expressa tant a l'epiteli pigmentari com a les cèl·lules de Müller en nivells elevats (Pandey et al. 1994). La proteïna RGR uneix de manera preferent tot-*trans*-retinal (Shen et al. 1994), a diferència de la rodopsina que uneix la forma 11-*cis* del cromòfor. La unió d'aquesta "opsina no visual" a tot-*trans*-retinal té lloc també *in vivo* en una situació de foscor. En ser irradiada amb llum monocromàtica de 470 nm o llum propera a l'ultraviolada, es produeix la fotoisomerització del tot-*trans*-retinal, que es troba unit a RGR, a 11-*cis*-retinal (Hao i Fong 1999).

Un cribratge mutacional realitzat en pacients no relacionats –182 amb retinitis pigmentària autosòmica dominant, 182 amb retinitis pigmentària autosòmica recessiva, 383 amb retinitis pigmentària simplex, 45 amb amaurosi congènita de Leber, 28 amb retinitis *punctata albescens*, 22 amb esclerosi coroïdal i 93-95 controls normals– va permetre identificar dues mutacions: una substitució S66R, en homozigosi, en els individus afectats d'una família amb retinitis pigmentària autosòmica recessiva, i la inserció d'un nucleòtid en el codó G275, que es troba gairebé a l'extrem 3' codificant, en heterozigosi, en els individus afectats d'una família amb esclerosi coroïdal. Aquesta darrera, probablement d'herència dominant, ja que el pare de la família, difunt, es creu que també presentava la malaltia (Morimura et al. 1999b).

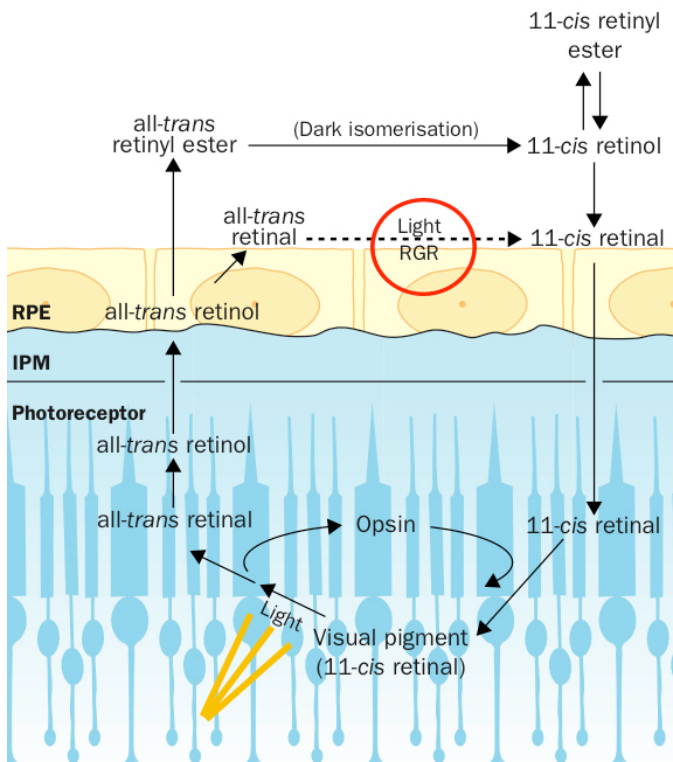


Figura 27 | A l'epiteli pigmentari, s'ha proposat que RGR (cercle roig) intervé en un cicle fòtic de regeneració del pigment visual. RGR s'uneix al tot-*trans*-retinal i aquest, *in vitro*, es fotoisomeritza a l'*11-cis*-retinal. Els ratolins *Rgr*^{-/-}, exposats a intensitats moderades de llum, regeneren l'*11-cis*-retinal més lentament que els ratolins salvatges. En l'RPE dels primers es produeix un increment d'èsters de tot-*trans*-retinil. Les dades del model murí suggereixen l'existència d'una via de regeneració del pigment visual en condicions d'il·luminació (Pepperberg i Crouch 2001).

La soca de ratolí *knockout* del gen *Rgr* posa de manifest que, a diferència del que s'ha observat en humans, tant els animals heterozigots *Rgr*^{+/-} com els animals homozigots *Rgr*^{-/-} no pateixen cap tipus de degeneració retinal (Chen et al. 2001). No obstant, el fenotip dels ratolins *Rgr*^{-/-} suggereix que RGR intervé en una via de regeneració de la rodopsina que funciona en condicions d'il·luminació (FIGURA 27). En aquesta situació, l'absència de la proteïna RGR produeix una disminució de la taxa de síntesi del cromòfor, *11-cis*-retinal i, com a conseqüència d'això, també s'observa una disminució de la quantitat de rodopsina regenerada en els ratolins *Rgr*^{-/-} respecte als ratolins salvatges. En canvi, en una situació d'adaptació a la foscor, els nivells del cromòfor són els mateixos en els ratolins *Rgr*^{-/-} que en els salvatges (Chen et al. 2001).

3.2.2. Gens que codifiquen proteïnes del metabolisme del retinol, responsables d'altres distròfies retinals

Proteïna sèrica d'unió a retinol (RBP4)

cr10:95341590-95350987 (6 exons)

RPE-D
10q23.33

Tot i que hi ha altres proteïnes d'unió a retinol (RBPs) que actuen dins de la cèl·lula, la proteïna sèrica d'unió a retinol, RBP4, és l'única RBP que transporta vitamina A –en la forma tot-

trans-retinol– a través de la circulació sanguínia, i es creu que la seva funció primordial és el transport de retinol cap als teixits (Quadro et al. 1999).

El 1999, es va descriure el fenotip de dues germanes que tenien problemes de visió nocturna, una reducció lleugera de l'agudesa visual, *fundus xerophthalmicus*, i una degeneració progressiva de l'epiteli pigmentari de la retina, que es trobava ja en un estadi d'afectació severa. Les dues germanes no presentaven nivells detectables de la proteïna RBP4 en sèrum, els nivells de retinol en sèrum eren un sisè dels nivells normals, i no tenien alterats els nivells d'èsters de retinil –que recordem que són la forma en la qual es transporta el tot-*trans*-retinol captat en la ingesta, i inclòs als quilomicrons, a través de la limfa i de la circulació sanguínia, fins al fetge–. La manca d'RBP4 en sèrum i els baixos nivells de retinol, van portar els autors del treball a analitzar el gen que codifica la proteïna sèrica d'unió a retinol (*RBP4*) i a determinar que les dues germanes eren heterozigotes compostes per dues mutacions en *RBP4* (Seeliger et al. 1999). A banda de l'afectació severa de l'epiteli pigmentari, les pacients no presentaven cap tipus d'alteració en altres teixits, fet que posava de manifest l'existència d'altres formes alternatives de transport de vitamina A cap als teixits; probablement mitjançant els èsters de retinil continguts als quilomicrons remanents (Seeliger et al. 1999).

Els ratolins *Rbp4*^{-/-} presenten nivells molt baixos de retinol en sang i una alteració de la funció visual als primers mesos de vida (Quadro et al. 1999). Si són alimentats amb una dieta que conté un aport suficient de vitamina A, tot i que els nivells de retinol en sang continuen sent baixos, els ratolins *Rbp4*^{-/-} recuperen una funció visual normal als cinc mesos d'edat. En canvi, si la dieta d'aquests ratolins és deficient en vitamina A, no es produeix la recuperació de la funció visual i els nivells de retinol en el sèrum són gairebé indetectables (Quadro et al. 1999). La funció primordial de la proteïna RBP4 és, doncs, la mobilització de les reserves de retinol existents al fetge, per tal de mantenir els nivells constants de retinol en sang en una situació d'ingesta insuficient de vitamina A. Aquest paper es posa de relleu als ratolins *Rbp4*^{-/-}, que mostren una alteració del procés de mobilització i, en canvi, no tenen alterada la captació i emmagatzematge al fetge de la vitamina A provinent de la dieta (Quadro et al. 1999).

11-*cis*-retinol deshidrogenasa de l'epiteli pigmentari de la retina (*RDH5*)

cr12:54400463–54404754 (5 exons)

CSNB (arFA)
12q13.2

L'any 1995, es va aïllar i caracteritzar, a partir d'epiteli pigmentari boví, una proteïna associada a membrana que formava part de la superfamília d'alcohol deshidrogenases de cadena curta, era d'expressió específica d'epiteli pigmentari i era activa en presència de NAD⁺ com a cofactor (Simon et al. 1995). Es tractava de l'11-*cis*-retinol deshidrogenasa que catalitza el darrer pas de la biosíntesi del cromòfor visual, l'11-*cis*-retinal (FIGURA 28). Un any més tard, el gen *RDH5* humà va ser caracteritzat i proposat com a gen candidat per algun tipus de distròfia retinal (Simon et al. 1996). Un cribratge mutacional realitzat en pacients de retinitis *punctata albescens*, *fundus albipunctatus* i retinitis pigmentària autosòmica recessiva i dominant va permetre identificar

mutacions en *RDH5* en dos pacients no relacionats que patien *fundus albipunctatus* d'herència autosòmica recessiva: una forma rara de ceguesa nocturna estacionària congènita caracteritzada per un retard en la regeneració dels fotopigments (Yamamoto et al. 1999).

El desenvolupament dels ratolins *knockout* homozigots *Rdh5*^{-/-} és completament normal i no presenten cap tipus d'afectació retinal com la que s'observa en humans (Driessen et al. 2000); tant l'aparença del fons d'ull com l'adaptació a la foscor –clarament alterades als pacients amb *fundus albipunctatus*– són del tot absents en aquests animals. L'efecte de la deleció en homozigosi del gen *Rdh5* es posa de manifest únicament quan els nivells de fotoactivació són molt elevats. En aquesta situació, es produeix un retard en l'adaptació a la foscor i una acumulació d'11-*cis*-retinol/13-*cis*-retinol i d'èsters d'11-*cis*-retinil/13-*cis*-retinil com a conseqüència de la reducció en la capacitat d'oxidar l'11-*cis*-retinol (Driessen et al. 2000). A l'epiteli pigmentari murí, hi hauria d'haver un altre mecanisme de regeneració del cromòfor visual, gràcies al qual els ratolins *knockout Rdh5*^{-/-} poden compensar la deficiència d'11-*cis*-retinol deshidrogenasa (Driessen et al. 2000).

Retinol deshidrogenasa de cadena curta amb especificitat dual de substrat (*RDH12*)

cr14:67258942–67270920

LCA, CSRD

(LCA3)

14q24.1

El gen *RDH12* va ser clonat juntament amb altres retinol deshidrogenases de cadena curta i especificitat dual de substrat presents a la retina humana, que van ser proposades com a nous constituents del cicle visual, FIGURA 28 (Haeseleer et al. 2002).

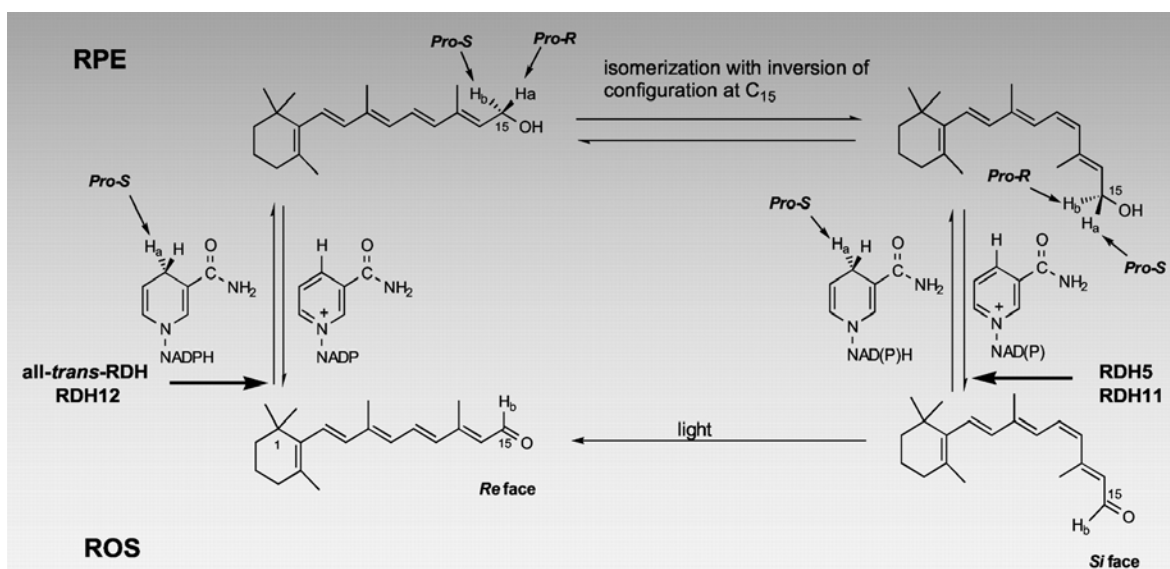


Figura 28 | Reaccions d'isomerització que tenen lloc en el cicle dels retinoides, en les quals intervenen *RDH12* i *RDH5*. La llum isomeritza l'11-*cis*-retinol a tot-*trans*-retinol, que es redueix, posteriorment, per una tot-*trans*-retinol deshidrogenasa, com ara *RDH12*. El tot-*trans*-retinol generat és isomeritzat en l'RPE a 11-*cis*-retinol i, tot seguit, oxidat per *RDH5* o *RDH11* a 11-*cis*-retinol. ROS, segment extern dels bastons. RPE, epíteli pigmentari de la retina. (Haeseleer et al. 2002).

Dos treballs recents han identificat mutacions en el gen *RDH12* en pacients d'amaurosi congènita de Leber (Perrault et al. 2004) i en una forma de distròfia retinal infantil severa –*CSRD*, *childhood-onset severe retinal dystrophy*– (Janecke et al. 2004). Al primer dels dos treballs, partint de la base que altres gens del cicle visual havien estat implicats en la patogènesi de l'amaurosi congènita de Leber (*RPE65*) i en distròfia retinal infantil severa (*LRAT*), es va realitzar el cribratge mutacional de tot un seguit de gens candidats en un conjunt de 179 pacients d'amaurosi congènita de Leber no relacionats entre ells (Perrault et al. 2004). Els gens analitzats van ser *LRAT*, i diversos gens que codifiquen retinol deshidrogenases específiques de l'epiteli pigmentari –*RDH10* i *RDH11*– i dels fotoreceptors –*RDH8*, *RDH12*, *RDH13*, i *RDH14*– (Haeseleer et al. 2002). En aquest estudi es van identificar 11 mutacions diferents en el gen *RDH12* com a responsables de l'amaurosi congènita de Leber (Perrault et al. 2004).

A l'altre treball, el mapatge d'homozigositat genòmic realitzat mitjançant un *microarray* de més de 10000 SNP (Affymetrix GeneChip Human Mapping 10K Arraying) en tres famílies austríaques, presumptament emparentades i afectades d'un tipus de distròfia retinal infantil severa, va permetre definir una regió crítica d'homozigositat de 2.86 Mb a 14q23.3-q24.1 (Janecke et al. 2004). Aquesta regió coincidia amb un locus d'amaurosi congènita de Leber descrit prèviament [*LCA3*, (Stockton et al. 1998)]. Dels 29 gens de la regió, un d'ells era el gen *RDH12*; un candidat excel·lent ja que s'expressa a la neuroretina i codifica una retinol deshidrogenasa presumptament implicada en el cicle visual –un nou exemple de com el coneixement d'un dels processos bioquímics alterats en la patologia és essencial per a la caracterització de nous gens candidats–. En aquest estudi s'han descrit diverses mutacions en aquest gen: la causal de la malaltia en les tres famílies austríaques i altres mutacions en pacients no relacionats (Janecke et al. 2004). Tots aquests pacients presenten una distròfia retinal severa, tant de bastons com de cons, que es manifesta entre els 2 i els 4 anys d'edat i que condueix a la ceguesa total entre els 18 i els 25 anys i que, per tant, contrasta amb la deficiència visual lleugera dels individus amb *fundus albipunctatus* causat per mutacions en el gen *RDH5*. La severitat fenotípica de les mutacions en *RDH12* apunta, doncs, que es tracta d'un enzim no redundat del cicle visual, la funció del qual no pot ser complementada per cap de les altres deshidrogenases retinals (Janecke et al. 2004).

3.3. L'estructura de les cèl·lules fotoreceptores

L'establiment i manteniment de l'estructura d'un tipus cel·lular tan especialitzat com els fotoreceptors requereix l'existència de proteïnes específiques destinades a acomplir aquesta funció. Aquest és el cas de les proteïnes periferina/RDS i ROM1, codificades per dos gens que han estat implicats en algunes formes d'herència dominant de retinitis pigmentària i que, en situació normal, intervenen en el manteniment de l'estructura dels discos del segment extern (FIGURA 29). RDS i ROM1 contenen 4 segments transmembrana i, conjuntament, formen heterotetràmers als marges dels discos.

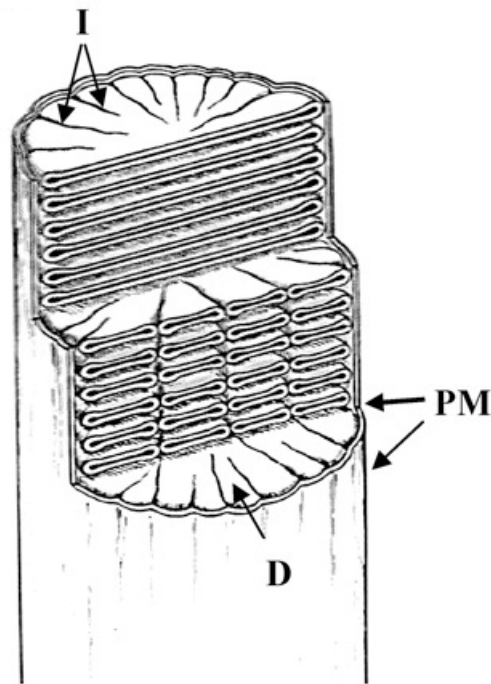


Figura 29 | Esquema que mostra l'estructura interna del segment extern dels fotoreceptors, en el qual es poden observar els centenars de discos membranosos que el conformen. En la membrana dels discos trobem gran part de la maquinària cel·lular de la fototransducció. El manteniment precís d'aquestes estructures, en el qual intervenen RDS i ROM1, és essencial per a la funció i la viabilitat dels fotoreceptors. D, discos. I, incisions. PM, membrana plasmàtica (Tam et al. 2004).

D'altra banda, la rodopsina representa al voltant del 70% del contingut proteic dels bastons, fet que ha suggerit que pugui tenir un rol secundari estructural a banda de la seva funció primària en la fototransducció (Hims et al. 2003). Així, la patologia retinal d'algunes de les mutacions en *RHO* podria ser causada també per un defecte estructural dels fotoreceptors.

Més recentment, la implicació en un tipus rar de degeneració retinal autosòmica recessiva del gen *PROM1* –que codifica una proteïna transmembrana similar a la prominina del ratolí, localitzada a la membrana del segment extern en les zones de gènesi de nous discos– ha tornat a posar de manifest la importància de les proteïnes estructurals per al funcionament correcte dels fotoreceptors.

3.3.1. Gens RP que codifiquen proteïnes estructurals del fotoreceptor

Periferina 2 / RDS (*RDS*)

cr6:42772317–42798287 (3 exons)

adRP, digRP, adMD, PD
6p21.1

A finals de la dècada dels 70, va ser descrit un altre fenotip de degeneració retinal en el ratolí; el fenotip de degeneració retinal lenta [*rds*, *retinal degeneration slow*, (van Nie et al. 1978)]. Aquest fenotip es caracteritza per una alteració del desenvolupament dels segments externs dels fotoreceptors, seguida d'una degeneració lenta de bastons i cons, similar a l'observada en les distròfies retinals humanes. El locus *rds* va ser mapat al cromosoma 17 del ratolí (Demant et al. 1979). En aquesta regió, mitjançant una estratègia d'hibridació substractiva, va ser clonat un mRNA específic de cèl·lules fotoreceptores com a putatiu gen *rds* (Travis et al. 1989). El producte del gen *rds* va ser caracteritzat i es va determinar que codificava una glicoproteïna associada a la membrana i localitzada específicament als discos dels segments externs dels fotoreceptors (Travis et al. 1991). L'inici de l'expressió d'aquest gen coincidia amb el procés de formació dels discos (Travis et al. 1991). Prèviament, s'havien presentat evidències que RDS i ROM1, una altra proteïna específica dels discos, formaven heterodímers *in vivo* (Bascom et al. 1990). L'any 1991, es va establir que el producte del gen *rds* del ratolí era el mateix que una proteïna anomenada periferina, que ja havia estat caracteritzada en cèl·lules fotoreceptores bovines i localitzada al marge dels discos (Connell et al. 1991). A l'igual que la periferina bovina, RDS contenia dues subunitats unides per un o més enllaços disulfur (Connell et al. 1991). La proteïna periferina es localitza al marge dels discos, tant de bastons com de cons (Arikawa et al. 1992).

A causa de la similitud del fenotip murí *rds* amb les alteracions observades en humans afectats de retinitis pigmentària, el gen humà *RDS* va ser clonat i caracteritzat, i es va determinar que era un gen específic de retina, situat en la regió proximal del braç curt del cromosoma 6 (Travis et al. 1991). En aquesta regió, va ser mapat un locus de retinitis pigmentària autosòmica dominant (Farrar et al. 1991a, Jordan et al. 1992) en una família irlandesa i caracteritzades mutacions en el gen *RDS* (Farrar et al. 1991b, Kajiwara et al. 1991). D'ençà, mutacions en el gen *RDS* han estat identificades en pacients afectats de diverses distròfies retinals; entre d'altres, distròfia macular de patró (Nichols et al. 1993a, Nichols et al. 1993b), distròfia macular i distròfia macular vitel·líforme (Wells et al. 1993), retinitis *punctata albescens* (Kajiwara et al. 1993), i retinitis pigmentària digènica (Kajiwara et al. 1994). Aquest darrer cas evidencia un tipus particular d'herència –la RP digènica– que ha estat caracteritzada en famílies en les quals només els dobles heterozigots per mutacions en els gens *RDS* (L185P) i *ROM1* (al·lel nul), i no pas els individus portadors de la mutació en *RDS*, manifestaven la malaltia (Kajiwara et al. 1994, Dryja et al. 1997). Recentment, ha estat generat un model animal de retinitis pigmentària digènica en el ratolí que reproduceix les substitucions aminoacídiques i els nivells d'*RDS* i *ROM1* observats en els pacients (Kedziński et al. 2001). La taxa de pèrdua de fotoreceptors del model digènic és més elevada que la del model dominant, generat al mateix estudi, i es constata

que, si els nivells combinats de RDS i ROM1 són inferiors al 60% –respecte els nivells del salvatge–, aquest fet es tradueix en una degeneració retinal clínicament significativa (Kedzierski et al. 2001).

En el ratolí, la correcció de l'alteració retinal *rds* en línies transgèniques evidenciava que el gen de la periferina era el responsable del fenotip de degeneració retinal lenta (Travis et al. 1992). Aquest fenotip va ser finalment caracteritzat a nivell molecular com a resultat de la inserció d'un element repetitiu de 9.2 kb en l'exó 2 del gen de la periferina 2, que resulta en un al·lel nul (Ma et al. 1995). En aquest model, la injecció subretinal d'un virus adenoassociat (AAV) recombinant, que codifica la periferina 2, restaura de manera estable la formació de discos, que contenen periferina 2 i rodopsina, i, conseqüentment, la formació de segments externs i la funció visual (Ali et al. 2000). Ha estat generat, també, un model animal en el ratolí que conté la delecció d'un nucleòtid en el codó 307 del gen de la periferina 2 (McNally et al. 2002), una mutació que, en humans, produeix retinitis pigmentària autosòmica dominant de progressió molt lenta. Els ratolins heterozigots per la mutació perden la major part dels fotoreceptors als 10 mesos i, en els homozigots, la pèrdua gairebé total s'assoleix als 4 mesos. En aquest treball, es postula una combinatòria de dominància negativa i haploinsuficiència per explicar els efectes de la mutació que s'observen en el model murí (McNally et al. 2002).

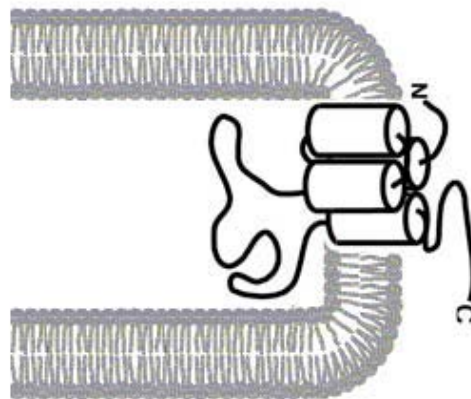


Figura 30 | Model topològic de les proteïnes RDS i ROM1. Aquestes proteïnes contenen 4 segments transmembrana, i formen heterotetràmers als marges dels discos. A la figura, s'ha representat un monòmer.

Proteïna de membrana del segment extern dels bastons (*ROM1*)

cr11:62137198–62139162 (3 exons)

digRP
11q12.3

ROM1 codifica una proteïna integral de membrana específica de la retina que presenta un 35% d'identitat aminoacídica amb la proteïna periferina 2/RDS (Bascom et al. 1989, Bascom et al. 1990, Bascom et al. 1992). La proteïna ROM1 es localitza al marge dels discos del segment extern dels bastons, on forma heterotetràmers amb RDS, FIGURA 30 (Bascom et al. 1990). ROM1 i RDS són membres de la superfamília de tetraspanines o transmembranes 4 (TM4SF). Com hem vist anteriorment, mutacions en heterozigosi en el gen *ROM1*, conjuntament amb mutacions en heterozigosi en el gen RDS, han estat proposades com la causa de la retinitis pigmentària d'herència

digènica (Kajiwara et al. 1994). Tot i que alguns autors han associat mutacions en el gen *ROM1* amb determinades formes de retinitis pigmentària d'herència dominant (Bascom et al. 1995, Sakuma et al. 1995), d'altres grups han aportat evidències experimentals que posen en dubte que mutacions únicament en *ROM1* en puguin ser la causa (Martínez-Mir et al. 1997b). En aquest estudi, realitzat al nostre grup, es descriu un al·lel doble mutant en el gen *ROM1* en una família espanyola amb retinitis pigmentària. El patró d'herència de la malaltia en aquesta família no és clar, ja que hi ha evidències que fan pensar en un patró autosòmic recessiu i d'altres que apunten a una herència dominant amb penetrància incompleta. En aquest escenari, la presència del doble al·lel mutant en individus RP i en germans i fills sans posa en qüestió la patogeneïtat d'aquest al·lel, a no ser que es tracti d'un tret amb penetrància incompleta, com hem apuntat, o bé un cas d'herència digènica amb mutacions en un gen diferent d'RDS (Martínez-Mir et al. 1997b).

3.3.2. Gens que codifiquen proteïnes estructurals del fotoreceptor, responsables d'altres distròfies retinals

Proteïna similar a prominina de ratolí (*PROML1*)

cr4:15646126–15753835 (27 exons)

arRD
4p15.32

El gen *PROML1* codifica una glicoproteïna amb 5 dominis transmembrana que va ser identificada per primer cop, en el ratolí, com una proteïna localitzada a la cara apical de cèl·lules neuroepiteliales (Weigmann et al. 1997) i, en humans, com un marcador antigènic de cèl·lules mare hematopoètiques (Miraglia et al. 1997, Yin et al. 1997), que s'expressava també en línies cel·lulars de retinoblastoma (Yin et al. 1997) i de retina adulta (Miraglia et al. 1997, Weigmann et al. 1997). La proteïna *PROML1* es troba localitzada en invaginacions de la membrana plasmàtica (Weigmann et al. 1997, Corbeil et al. 1999). A la retina, s'immunodetecta la seva presència a la capa que conté els segments externs dels bastons, i els nivells més alts es troben a les invaginacions de la membrana a la base del segment extern, que és el lloc on s'inicia la biogènesi dels discos (Maw et al. 2000).

La presència en homozigosi d'una deleció d'un nucleòtid (1878delG) en el gen *PROML1*, que produeix un canvi en la pauta de lectura i una terminació prematura de la traducció, ha estat caracteritzada en una família consanguínia de l'Índia com la causa de la degeneració retinal autosòmica recessiva que presenta (Maw et al. 2000). La introducció d'aquesta mateixa deleció en la proteïna Prom de ratolí i la seva expressió en cèl·lules CHO evidencien que la proteïna truncada no assoleix el seu destí a la membrana plasmàtica (Maw et al. 2000).

3.4. La transcripció

Els factors de transcripció *CRX*, *NRL* i *NR2E3* controlen l'expressió de gens específics dels fotoreceptors. *CRX* i *NRL* han estat identificats com a gens responsables de retinitis pigmentària autosòmica dominant. Mutacions en *CRX* també han estat implicades en casos d'amaurosi congènita de Leber i de distròfia de cons i bastons. *NR2E3* és el gen causal de la síndrome d'increment de cons S, i també ha estat associat a una forma de retinitis pigmentària autosòmica recessiva. En general, l'alteració d'aquests gens afecta, primàriament, el desenvolupament de la cèl·lula fotoreceptora i, en estadis més avançats de la malaltia, causa degeneració retinal (Phelan i Bok 2000).

3.4.1. Gens RP que codifiquen factors de transcripció

Factor de transcripció de cons i bastons amb caixa homeòtica de tipus Otx (*CRX*)

cr19:53016975–53038392 (5 exons)

adRP, LCA, adCORD
(CORD2)
19q13.32

CRX és un factor de transcripció específic dels fotoreceptors, que conté un homeodomini similar a *OTX1* i *OTX2* en la regió aminoterminal i que forma part de la classe *paired* (Freund et al. 1997, Furukawa et al. 1997). A la retina, l'expressió del gen *CRX* se circumscriu als fotoreceptors, tant en desenvolupament com totalment diferenciats (FIGURA 31). En aquestes cèl·lules, *CRX* s'uneix als elements d'unió de *CRX* (CRB) que es troben localitzats en els promotors de diversos gens d'expressió específica en els fotoreceptors, entre els quals hi ha els gens de les opsines (Furukawa et al. 1997). A banda de la seva expressió als fotoreceptors, *CRX* s'expressa també als pineòcits de la glàndula pineal.

En un dels primers assajos funcionals que es van dur a terme per analitzar el paper de *CRX* en la funció retinal, la sobreexpressió del gen ortòleg del ratolí a la retina, mitjançant un vector retroviral, produïa un augment del nombre de clons formats únicament per bastons i disminuïa el nombre de clons que contenien cèl·lules amacrines (interneurones) i cèl·lules de Müller (glials) (Furukawa et al. 1997). Per una altra banda, l'expressió, amb el mateix sistema, d'un al·lel dominant negatiu de *Crx* impedia la formació de segments externs. Aquests resultats van permetre determinar que *CRX* era un factor de transcripció implicat en la diferenciació de les cèl·lules fotoreceptores (Furukawa et al. 1997). El gen *CRX* va ser identificat i caracteritzat, inicialment, en la cerca del gen responsable d'un tipus de distròfia de cons i bastons el locus de la qual, *CORD2*, havia estat mapat a 19q (Evans et al. 1994, Freund et al. 1997). Mutacions en *CRX* també han estat implicades en casos d'amaurosi congènita de Leber (Freund et al. 1998) i en una forma de retinitis pigmentària de manifestació tardana i herència dominant (Sohocki et al. 1998), tot i que la mutació de canvi d'aminoàcid descrita en aquest cas (R41Q) havia estat descrita anteriorment en una família amb distròfia de cons i bastons (Swain et al. 1997).

Les cèl·lules fotoreceptores de la soca de ratolí *knockout* del gen *Crx* no presenten segments externs, ni tampoc es detecta l'activitat dels bastons i dels cons en les mesures electroretinogràfiques. En aquests ratolins, l'expressió de diversos gens específics dels fotoreceptors també està alterada (Furukawa et al. 1999).

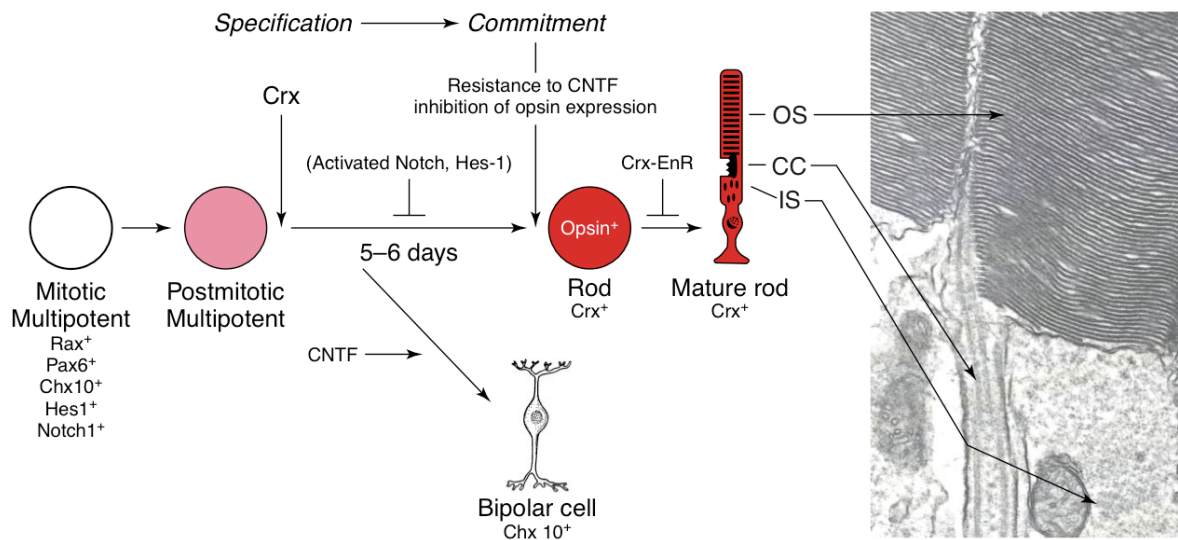


Figura 31 | Model del desenvolupament dels bastons. En els progenitors mitòtics, que donaran lloc als bastons, s'expressen una sèrie de factors de transcripció, amb homeodomini de tipus *paired* (*Rax*, *Pax6*), i d'altres, de tipus bHLH (*Chx10*). En algun punt, després que aquestes cèl·lules hagin esdevingut postmitòtiques i abans que comencin a expressar l'opsina, s'extingeix l'expressió d'aquests factors i, poc després que les cèl·lules hagin pres la decisió d'esdevenir bastons, s'inicia l'expressió de *Crx*. (Morrow et al. 1998).

Factor de transcripció neuroretinal amb cremallera de leucina (*NRL*)

cr14:23619184–23623658 (3 exons)

adRP
(RP27)
14q11.2

El gen *NRL* va ser clonat, a començaments dels anys noranta, mitjançant una aproximació d'hibridació substractiva, i es va determinar que la seva expressió se circumscribia exclusivament a la neuroretina i era alta als fotoreceptors (Swaroop et al. 1992). *NRL* codifica un factor de transcripció amb dos mòduls diferenciats: un primer, en la meitat aminoterminal, que conté el domini de transactivació, i un segon, en la meitat carboxitèrminal (domini bZIP), compost per un motiu bàsic d'unió al DNA i un motiu de dimerització de tipus cremallera de leucina. A través d'aquest domini, *NRL* interacciona amb el factor de transcripció *CRX*, amb el qual actua de manera sinèrgica, i intervé en l'expressió de gens específics dels fotoreceptors –com el de la rodopsina–, i en el desenvolupament dels bastons (Rehmtulla et al. 1996, Mitton et al. 2000, Mears et al. 2001).

A finals dels noranta, havien estat mapats nou loci de formes autosòmiques dominants de retinitis pigmentària, de les quals únicament havien estat identificats dos gens causals, els gens *RHO* i *RDS*. A partir de l'anàlisi de lligament realitzada en una família amb retinitis pigmentària autosòmica

dominant, en la qual s'havien exclòs la resta de loci, es va determinar lligament amb marcadors a 14q11 (RP27), i va ser caracteritzada una mutació de canvi d'aminoàcid en el gen *NRL* com a responsable de la malaltia (Bessant et al. 1999).

La soca de ratolí *knockout Nrl*^{-/-} presenta una manca completa de la funció dels bastons i un increment anormal de la funció dels cons de tipus S, remissent del fenotip humà present en la síndrome d'increment de cons S (Mears et al. 2001). L'aparent preponderància, pel que fa al nombre de cèl·lules, de la població de cons S per sobre de la població de bastons a les retines dels ratolins *Nrl*^{-/-} es posa de manifest en l'anàlisi morfològica de la retina i en mesures de l'expressió de gens específics dels bastons –rodopsina (*Rho*), transducina dels bastons (*Gnat1*), subunitat de la fosfodiesterasa (*Pdeb*)–, dels quals no se'n detecta l'expressió, i gens específics de cons –opsina de cons S (*Opn1sw*), transducina dels cons (*Gnat2*), arrestina dels cons–, que mostren un increment considerable de la seva expressió (Mears et al. 2001). La manca d'expressió d'un altre factor de transcripció específic de fotoreceptors, NR2E3, a les retines dels ratolins *Nrl*^{-/-}, suggereix una jerarquia en l'acció d'aquests dos factors de transcripció durant la determinació del destí cel·lular, en el desenvolupament retinal, a partir de les cèl·lules progenitores retinals. Aquesta jerarquia, en la qual NRL estaria per sobre d'NR2E3, és coherent amb el patró d'expressió temporal d'aquests dos factors: en el ratolí, NR2E3 apareix lleugerament més tard que NRL durant el desenvolupament de la retina (Mears et al. 2001).

Receptor nuclear de la superfamília 2 grup E3 (NR2E3)

cr15:69872030–69897624 (10 exons)

arRP, ESCS
15q23

NR2E3 és un factor de transcripció de tipus receptor nuclear que s'expressa específicament als fotoreceptors (Kobayashi et al. 1999). Té una estructura característica d'aquest tipus de factors de transcripció, amb un domini d'unió a DNA seguit d'un domini putatiu d'unió al substrat.

El gen *NR2E3* va ser identificat com el responsable de la SÍNDROME D'INCREMENT DE CONS S [ESCS, OMIM #268100; (Haider et al. 2000)]. Aquesta síndrome –d'herència autosòmica recessiva– és l'única malaltia hereditària retinal en la qual es produeix un increment de la funció d'un subtipus de fotoreceptors, i no s'esdevé, primàriament, una reducció del nombre de cèl·lules per apoptosi. Els pacients afectats per aquesta síndrome pateixen una sensibilitat més alta a la llum blava, la percepció de la qual és mediada pel subtipus S de cons; subtipus menys nombrosos, constituït per cèl·lules receptores de llum de longitud d'ona curta, blava. També presenten una pèrdua de la visió que s'inicia ben aviat en forma de ceguesa nocturna, una afectació variable de la visió mediada pels altres dos subtipus de cons, i degeneració retinal –que pot ser lleugera o severa, i que en el darrer cas és coneguda com la SÍNDROME DE GOLDMANN-FAVRE [OMIM #268100]–. El fenotip dels pacients ESCS suggereix que les mutacions en *NR2E3* distorsionen el programa genètic que intervé en l'establiment dels nombres relatius de cadascun dels subtipus de cons durant la retinogènesi. En el ratolí, s'ha determinat que l'expressió d'*Nr2e3* comença abans del desenvolupament dels cons de tipus S (Haider

et al. 2001). En aquest sentit, en un estudi recent, en el qual s'ha realitzat una anàlisi postmòrtem de la retina d'un pacient ESCS, s'ha observat l'absència completa de bastons i la presència del doble de cons, el 92% dels quals eren de tipus S (Milam et al. 2002).

El 94% dels pacients amb ESCS, analitzats al treball en què es va caracteritzar *NR2E3* com a gen causal de la malaltia, presentaven mutacions en aquest gen (Haider et al. 2000). El gen *NR2E3* també ha estat identificat com el responsable d'una forma autosòmica recessiva de retinitis pigmentària d'aparició tardana, present en una població portuguesa de Belmonte, a la Biera-Baixa, que té el seu origen en jueus conversos que van fugir d'Espanya a finals del segle XV (Gerber et al. 2000).

Finalment, també s'ha identificat el gen *Nr2e3* com el causal de la degeneració retinal autosòmica recessiva del ratolí *rd7*. Aquest ratolí presenta una deleció de l'intró 4 i part de l'exó 4 del gen *Nr2e3* (Akhmedov et al. 2000, Haider et al. 2001) i un fenotip retinal similar al dels humans amb síndrome d'increment de cons S.

3.5. Les interaccions cel·lulars

En un teixit tan altament organitzat com la retina –que conté diversos tipus cel·lulars especialitzats i una estructura cel·lular estratificada i interconnectada–, és essencial el manteniment de les interaccions entre les cèl·lules que el formen i entre aquestes i les cèl·lules de teixits veïns, relacionats íntimament, com ara l'epiteli pigmentari. En aquest sentit, són essencials les molècules que intervenen en l'establiment i el manteniment de la polaritat apical-basal i en l'adhesió cel·lular. No és d'extranyar, doncs, que l'alteració dels mecanismes de reconeixement, adhesió i polaritat condueixi a la desestructuració de la retina i a la mort de determinades poblacions cel·lulars, com ara els fotoreceptors. Entre els gens causals de la retinitis pigmentària, s'han identificat *MERTK* –que codifica una proteïna de l'epiteli pigmentari necessària per a que es produeixi la fagocitosi dels segments externs dels fotoreceptors–, en formes d'herència recessiva, el gen *CRB1* –implicat en el manteniment de la polaritat cel·lular–, en formes d'herència recessiva i també en l'amaurosi congènita de Leber, i el gen *USH2A*, que codifica una proteïna de la membrana basal i que és el responsable de la forma 2A de la síndrome d'Usher, una malaltia autosòmica recessiva caracteritzada per la pèrdua de l'audició als nadons i pel desenvolupament posterior de retinitis pigmentària. Aquest darrer gen també s'ha identificat com a responsable de casos de retinitis pigmentària en els quals no hi ha afectació de l'oïda.

3.5.1. Gens RP que codifiquen proteïnes que intervenen en interaccions cel·lulars

Protooncògen C-mer receptor tirosina quinasa (*MERTK*)

cr2:112372415–112503168 (20 exons)

arRP
2q13

El gen *MERTK* codifica un receptor amb activitat tirosina quinasa implicat en el procés de fagocitosi dels segments externs dels fotoreceptors per part de les cèl·lules de l'epiteli pigmentari de la retina. El procés de fagocitosi es produeix seguint un ritme circadià i és necessari per al recanvi dels segments externs, que s'esdevé de manera completa cada 9 dies. *MERTK* s'expressa en diversos teixits, inclosos l'epiteli pigmentari de la retina i l'esclera. L'ortòleg d'aquest gen en la rata va ser identificat com el responsable de la degeneració retinal present en la soca del *Royal College of Surgeons* [RCS, (D'Cruz et al. 2000)]. La soca de rata RCS presenta una distròfia hereditària recessiva, caracteritzada per la incapacitat de les cèl·lules de l'epiteli pigmentari de la retina de fagocitar els segments externs dels fotoreceptors. Aquesta alteració del procés de fagocitosi desencadena la mort posterior de les cèl·lules fotoreceptores. En una línia cel·lular d'epiteli pigmentari, derivada de la rata RCS, la infecció amb un adenovirus recombinant, que inclou el gen *Mertk*, recupera la capacitat fagocítica d'aquestes cèl·lules (Feng et al. 2002). El *knockout*, en homozigosi, del gen ortòleg en el ratolí produeix un fenotip indistingible del de la rata RCS, caracteritzat per una disfunció de la

fagocitosi dels segments externs dels fotoreceptors i un procés de degeneració retinal (Duncan et al. 2003).

L'anàlisi del gen ortòleg humà, *MERTK*, va permetre implicar-lo com a gen causal de retinitis pigmentària autosòmica recessiva (Gal et al. 2000). Molt recentment, mutacions en el gen *MERTK* han estat descrites en un pacient amb una forma severa de distròfia de bastons i cons (McHenry et al. 2004).

En el model animal de la rata RCS, s'han assajat amb bons resultats diversos protocols terapèutics: entre els quals, el transplantament subretinal de línies cel·lulars d'epiteli pigmentari humanes, ARPE19 i h1RPE7 (Lund et al. 2001), protocols de teràpia gènica amb la injecció subretinal de virus adenoassociats recombinants (Vollrath et al. 2001) (Smith et al. 2003), i l'administració intraperitoneal d'un antagonista del calci, la nilvadipina, que preserva la morfologia retinal i les respostes electroretinogràfiques, si es realitza en les primeres etapes de la degeneració retinal (Yamazaki et al. 2002).

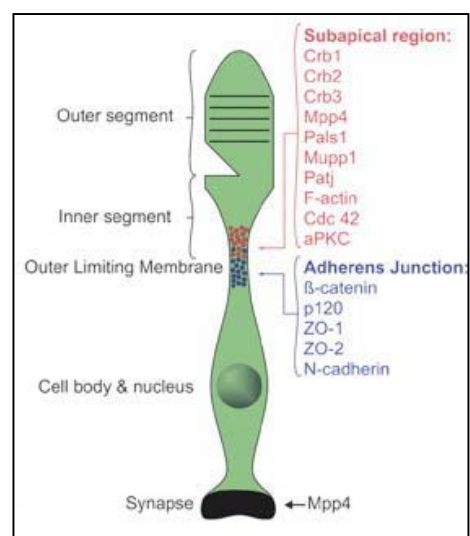
Homòleg del gen *crumbs* de *Drosophila* (*CRB1*)

cr1:193969064–194179241 (12 exons)

arRP, LCA
(RP12)
1q31.3

CRB1 codifica una proteïna homòloga a la proteïna Crumbs de *Drosophila*. Crumbs és una proteïna transmembrana associada a la formació de les unions adherents, que intervé en la morfogènesi dels fotoreceptors i en l'establiment de la polaritat apical-basal epitelial en la mosca (Grawe et al. 1996, Tepass 1996). La proteïna CRB1 conté 19 dominis similars als del factor de creixement epidèrmic (EGF), tres dominis globulars similars a laminina A, un domini transmembrana, i una cua citoplasmàtica amb un motiu ERLI (den Hollander et al. 1999a). Es creu que CRB1 intervé en processos d'interacció intercel·lular i en l'establiment de la polaritat cel·lular. En aquest sentit, en el ratolí s'ha vist que Crb1 es localitza a la regió subapical adjacent a les unions adherents de la membrana limitant externa de la retina (FIGURA 32), on s'associa a proteïnes com Mupp1, Lin-7 (Pals1, Mpp5) i Mpp4 (van de Pavert et al. 2004), de la família MAGUK de proteïnes associades a membrana. Alguns dels membres d'aquesta família, com *nagi oko* en el peix zebra, han estat implicats en degeneració retinal (Wei i Malicki 2002).

Figura 32 | Esquema de la localització de diverses proteïnes, entre les quals CRB1, en la regió subapical i en les unions adherents adjacents de la membrana limitant externa (van de Pavert et al. 2004).



Aquest gen es va identificar com el causant d'una forma de retinitis pigmentària autosòmica recessiva, caracteritzada per una pèrdua severa de la visió en edats inferiors als 20 anys, i en la qual els pacients presentaven una certa preservació de l'epiteli pigmentari adjacent i de sota les arterioles retinals, tot i que manifestaven un procés de degeneració que abarcava tota la retina [RP12, (Heckenlively 1982, van Soest et al. 1994, Leutelt et al. 1995, den Hollander et al. 1999a)]. Més tard, *CRB1* s'ha relacionat com a gen causal en d'altres formes de retinitis pigmentària autosòmica recessiva que no presenten preservació de l'epiteli pigmentari paraarteriolar (Lotery et al. 2001b), i com a gen causal d'entre un 9 i un 13% dels casos d'amaurosi congènita de Leber (den Hollander et al. 2001, Lotery et al. 2001a). Les mutacions de *CRB1* causals de retinitis són mutacions de canvi d'aminoàcid, mentre que les que causen amaurosi congènita de Leber són mutacions nul·les. Recentment, s'ha identificat un model natural de degeneració retinal en el ratolí, *rd8*, provocat per la deleció d'un parell de bases en el gen ortòleg *Crb1* (Mehalow et al. 2003): una mutació que causa un canvi de la pauta de lectura i un truncament de la proteïna, que afecta el domini transmembrana i citosòlic. Aquest model natural posa de manifest que *Crb1* és essencial per a la morfogènesi dels fotoreceptors i per al manteniment de la integritat de la membrana limitant externa.

En el ratolí *knockout* de *Crb1*, apareixen lesions retinals entre els 3 i els 9 mesos d'edat en les quals es perd la integritat de la membrana limitant externa, i que s'incrementen si s'exposa els ratolins a intensitats moderades de llum (van de Pavert et al. 2004). En aquest estudi, es posa de manifest que *CRB1* és fonamental per a mantenir una única capa ordenada de fotoreceptors, i que la seva deficiència provoca una pèrdua de les unions adherents entre els fotoreceptors i les cèl·lules de Müller, glials, que desencadena la desorganització estructural i funcional de la retina.

Usherina (*USH2A*)

cr1:212184630–212985133 (72 exons)

arRP, US
1q41

Aquest gen codifica una proteïna de la membrana basal, la usherina, que conté dominis laminina EGF i dominis de fibronectina de tipus III. És present en molts teixits, entre els quals en les membranes basals de la retina i de l'oïda interna (Bhattacharya et al. 2002). Recentment s'ha identificat que la usherina interacciona amb el col·lagen de tipus IV a la membrana basal (Bhattacharya et al. 2004).

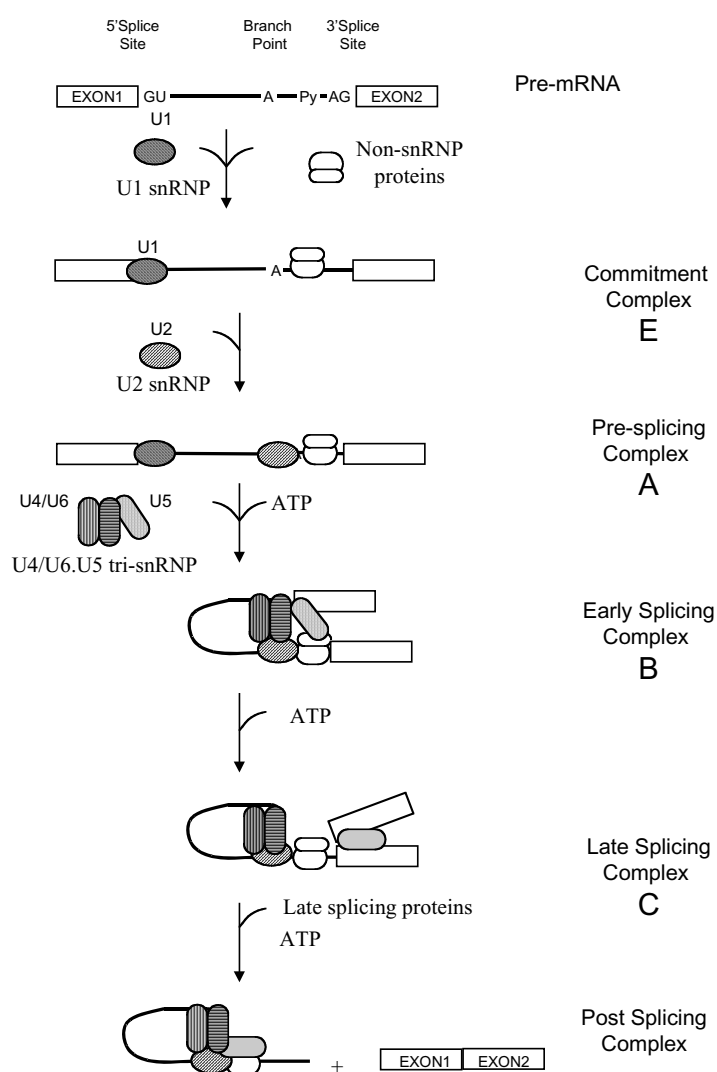
Mutacions en *USH2A* són la causa de la síndrome d'Usher autosòmica recessiva de tipus 2a (Kimberling et al. 1990, Lewis et al. 1990, Kimberling et al. 1995, Eudy et al. 1998), en la qual s'ha identificat una mutació molt prevalent, 2299delG (Liu et al. 1999). El gen *USH2A* també s'ha trobat alterat en casos de retinitis pigmentària autosòmica recessiva sense pèrdua d'oïda (Rivolta et al. 2000). En aquest cas, a diferència de les mutacions de canvi de pauta de lectura observades en la síndrome d'Usher 2a, es tracta d'una mutació de canvi d'aminoàcid (C759F), present en el 4.5% dels casos d'una mostra de 224 pacients de retinitis pigmentària autosòmica recessiva (Rivolta et al. 2000).

3.6. El processat de l'RNA missatger

Als darrers quatre anys, han estat identificats tres gens responsables de formes de retinitis pigmentària d'herència autosòmica dominant que no encaixen en cap de les categories funcionals clàssiques de gens RP, però que participen en un mateix procés cel·lular, el processat de premRNA.

El mecanisme de processat de premRNA es duu a terme en l'esplíceosoma, un gran complex macromolecular format per nombroses proteïnes i cinc RNA nuclears petits (snRNA), la funció del qual és l'eliminació de les seqüències intròniques existents en els transcrits a l'estadi de premRNA i la unió dels exons per tal de formar un mRNA madur (Hims et al. 2003).

Breument, la formació de l'esplíceosoma implica la unió, al premRNA, de diverses partícules ribonucleoproteiques (snRNP): U1 snRNP és la primera partícula que s'uneix al premRNA que ha de ser processat; a continuació, s'hi uneix U2 snRNP, i en darrer terme s'hi associa U4/U6:U5 tri-snRNP, per tal de constituir l'esplíceosoma complet, FIGURA 33 (McKie et al. 2001). Estudis recents han identificat al voltant de 145 proteïnes constituents de l'esplíceosoma, que inclouen tots els factors de processat prèviament identificats i 58 proteïnes noves, 30 de les quals participen en altres etapes de



l'expressió gènica i no són factors de processat de premRNA (Zhou et al. 2002). Aquestes dades posen de manifest que l'esplíceosoma és la màquina cel·lular més complexa que es coneix actualment i que alguns dels seus constituents participen en altres processos de l'expressió gènica vinculats o associats al processat de premRNA.

Figura 33 | Diagrama en què es mostren els components principals de l'esplíceosoma. Les snRNP en gris i la resta de constituents en blanc. PRPF8, PRPF31 i PRPF3 formen part del complex U4/U6:U5 tri-snRNP (Hims et al. 2003).

Els mecanismes de processat de premRNA han estat molt estudiats a *Saccharomyces cerevisiae*, en el qual s'han identificat els components proteics principals que participen en la formació dels espliceosomes (Zhou et al. 2002). Els ortòlegs humans de tres d'aquests factors identificats en el llevat –*PRPF8*, *PRPF31* i *HPRP3*– han estat caracteritzats com a gens causals de retinitis pigmentària dominant. Els gens *PRPF8* (U5-220K), *PRPF31* (U4/U6-61K) i *HPRP3* (U4/U6-90K) codifiquen factors que formen part del complex U4/U6:U5 tri-snRNP, un dels components majoritaris dels espliceosomes. Una de les qüestions més apassionants d'aquesta descoberta és com mutacions en tres factors de processat de premRNA ubics i que intervenen en un procés essencial en totes les cèl·lules poden ser responsables d'una patologia que afecta únicament el teixit retinal (Hims et al. 2003).

3.6.1. Gens RP que codifiquen factors de processat de premRNA

Factor 8 de processat de premRNA (*PRPF8*)

cr17:1500673–1534850 (43 exons)

adRP
(RP13)
17p13.3

PRPF8 és una proteïna de 2335 aminoàcids i 274 kD, molt conservada evolutivament (Luo et al. 1999). Sembla que té un paper estructural en l'arquitectura de la partícula ribonucleoprotèica petita nuclear (snRNP) U5 i que és essencial per a la formació del complex U4/U6:U5 tri-snRNP [Brown, 1992 #281] (Luo et al. 1999). En assajos d'immunoprecipitació amb anticossos contra *PRPF8*, coimmunoprecipita tant amb l'espliceosoma major, que depèn d'U2, com amb l'espliceosoma menor, que depèn d'U12. Aquests dos espliceosomes eliminen tipus diferents d'introns i contenen diferents menes de snRNA, excepte U5 snRNA que és l'únic que comparteixen (Luo et al. 1999). *PRPF8* coimmunoprecipita amb premRNA, mRNA en etapes intermèdies de processat i productes finals. Aquest fet indica que, probablement, *PRPF8* s'uneix a l'espliceosoma abans que tingui lloc la primera reacció de processat i que continua associat al complex durant el transcurs de les reaccions (Luo et al. 1999).

A mitjans dels noranta, es va mapar un locus de retinitis pigmentària autosòmica dominant al braç curt del cromosoma 17 (RP13) mitjançant una anàlisi de lligament en una família sudafricana (Greenberg et al. 1994). Estudis subsequents en aquesta família i d'altres van permetre refinar la localització d'RP13 a 17p13.3 (Kojis et al. 1996). Finalment, van ser identificades 7 mutacions de canvi d'aminoàcid en el gen *PRPF8*, en les tres famílies en les quals s'havia documentat cosegregació amb RP13 i en altres famílies no relacionades, afectades de retinitis pigmentària autosòmica dominant (McKie et al. 2001).

Factor 31 de processat de premRNA (*PRPF31*)

cr19:59310648–59326952 (14 exons)

adRP
(RP11)
19q13.42

Als anys noranta, va ser identificat el sisè locus responsable de retinitis pigmentària autosòmica dominant al braç llarg del cromosoma 19 (RP11), mitjançant un estudi de lligament en una família anglesa (Al-Magthteh et al. 1994). Les dades proporcionades per l'estudi d'altres famílies, que presentaven lligament amb el locus RP11 (Xu et al. 1995, Al-Magthteh et al. 1996, McGee et al. 1997), van permetre refinar la regió candidata fins a un interval d'aproximadament 600 kb a 19q13.4, en el qual va ser identificat el gen *PRPF31* (Vithana et al. 2001). Aquest gen era un candidat excel·lent, ja que pocs mesos abans *PRPF8* havia estat caracteritzat com el primer factor de processat de premRNA implicat en la patogènia d'una forma d'herència dominant de retinitis pigmentària. En el gen *PRPF31*, van ser identificades mutacions en 4 famílies lligades a RP11 i en tres casos esporàdics de retinitis pigmentària (Vithana et al. 2001).

A través d'estudis duts a terme amb el gen ortòleg de llevat, *PRP31* (Weidenhammer et al. 1996), es creu que Prp31p està implicada en el reclutament d'U4/U6:U5 tri-snRNP cap al prespliceosoma i en l'estabilització de les interaccions que permeten la formació de l'espliceosoma madur (Weidenhammer et al. 1997).

Factor 3 de processat de premRNA (*HPRP3*, *PRPF3*)

cr1:147110423–147138741 (16 exons)

adRP
(RP18)
1p21.2

HPRP3 codifica el tercer factor de processat de premRNA que ha estat implicat en retinitis pigmentària. A l'igual que els altres dos factors, *HPRP3* també és una proteïna molt conservada i d'expressió ubíqua que forma part del complex U4/U6:U5 tri-snRNP. El gen *HPRP3* és el responsable d'una forma de retinitis pigmentària autosòmica dominant caracteritzada per una manifestació primerenca de ceguesa nocturna (Xu et al. 1996b, Heng et al. 1998, Xu et al. 1998, Chakarova et al. 2002).

3.7. El Transport intracel·lular i el citoesquelet

En una cèl·lula tan especialitzada i d'estructura polaritzada com els fotoreceptors, que contenen un segment extern modificat i adaptat a la fototransducció, és important el paper estructural de les proteïnes citoesquelètiques, però també, el rol d'aquestes i altres proteïnes en els processos de transport de determinades molècules d'un extrem a l'altre de la cèl·lula. En aquest sentit, i als fotoreceptors en concret, cal remarcar la importància del transport de la rodopsina, o dels pigments visuals dels cons, des del seu lloc de síntesi fins a la seva localització precisa a la membrana dels discos del segment extern. En aquesta línia, és creu que el gen *TULP1*, alterat en una forma de retinitis pigmentària d'herència recessiva, codifica una proteïna important per al transport de la rodopsina. De la mateixa manera, podria actuar una proteïna del cili connector dels fotoreceptors, el producte del gen *RPGR* –gen majoritari de la retinitis pigmentària lligada a l'X, que està mutat també en diverses distròfies retinals d'herència lligada al sexe–, que sembla que intervé en el manteniment d'una distribució polaritzada de determinades proteïnes, entre les quals, les opsines. El producte del gen *RP2* –gen responsable, també, de formes d'herència lligada a l'X de la malaltia– podria estar implicat en la biogènesi de la tubulina i, per tant, en processos de senyalització cel·lular o de transport de vesícules, en els qual intervé el citoesquelet de tubulina. I finalment, el gen de la fascina retinal (*FSCN2*) –mutat en una forma dominant de retinitis pigmentària– codifica una proteïna empaquetadora de microfilaments d'actina que s'ha suggerit que intervé en la morfogènesi dels discos del segment extern. Molt recentment, s'ha descobert el paper de la proteïna RP1 –alterada en una forma de retinitis pigmentària autosòmica dominant– com a proteïna associada als microtúbuls de l'axonema dels fotoreceptors, que controla l'ordenació precisa dels discos del segment extern.

3.7.1. Gens RP que codifiquen proteïnes que intervenen en el transport intracel·lular o bé a funcions del citoesquelet

Proteïna similar a tubby (*TULP1*)

cr6:35573631–35588623 (15 exons)

arRP, CSRD, LCA
(RP14)
6p21.31

El locus RP14 va ser caracteritzat a mitjans dels noranta a partir d'una anàlisi de lligament (Knowles et al. 1994) en una família molt nombrosa de la República Dominicana afectada de retinitis pigmentària autosòmica recessiva, i va ser mapat en una regió del cromosoma 6 que contenia ja un gen responsable d'RP, el gen de la periferina 2 (*RDS*). L'anàlisi d'un polimorfisme intern d'aquest gen va posar de manifest que RP14 era un locus diferent que *RDS* i que estava situat prop del marcador D6S291, a uns 20 cM d'*RDS* en direcció telomèrica (Knowles et al. 1994). L'anàlisi d'una segona família dominicana relacionada va permetre el refinament del locus RP14 a una regió d'homozigotat de 2 cM, de la qual se'n va construir un contig complet (Banerjee et al. 1998b). En

aquesta regió del cromosoma 6, s'havia caracteritzat el gen *TULP1* [*Tubby-like protein 1* (North et al. 1997)], un dels gens humans homòlegs del gen *tubby* (*tub*) de ratolí; l'alteració espontània del gen *tub* de ratolí produïa el fenotip *tubby*, caracteritzat per obesitat d'aparició en adults, sordesa per degeneració coclear, i degeneració retinal progressiva de manifestació primerenca (Kleyn et al. 1996, Noben-Trauth et al. 1996). El gen humà *TULP1* era, doncs, un candidat prometedor com a gen RP14 perquè, a banda del fenotip de degeneració retinal del ratolí *tubby*, en humans, s'expressava a la retina (North et al. 1997). Finalment, *TULP1* va ser identificat per diversos grups com a responsable de la forma RP14 de retinitis pigmentària autosòmica recessiva (Banerjee et al. 1998a, Gu et al. 1998, Hagstrom et al. 1998). Al nostre grup, han estat caracteritzades dues noves mutacions, en els exons 5 i 10 del gen *TULP1*, causals de la malaltia en una família RP espanyola (Paloma et al. 2000). Mutacions en *TULP1* també han estat identificades en pacients d'un tipus de distròfia retinal infantil severa –CSRD, *childhood-onset retinal dystrophy* (Lewis et al. 1999)– i en pacients d'amaurosi congènita de Leber (Hanein et al. 2004).

En el ratolí, la proteïna TULP1 es troba exclusivament als fotoreceptors, en els quals s'immunodetecta principalment al segment intern (Hagstrom et al. 1999). El ratolí *knockout* de *tulp1* mostra una degeneració inicial tant de bastons com de cons, una localització ectòpica de les opsines dels diversos tipus de fotoreceptors, i una acumulació de vesícules extracel·lulars al voltant de la part distal dels segments interns (Hagstrom et al. 1999). Aquest model presenta degeneració retinal de manifestació primerenca amb una pèrdua ràpida i progressiva de fotoreceptors i, a diferència del ratolí *tubby*, té una capacitat auditiva i un pes corporal normals (Ikeda et al. 2000). A l'igual que en el ratolí, en retines humanes adultes, la proteïna TULP1 s'immunodetecta al segment intern, el soma i les sinapsis dels cons i dels bastons, i no és present al segment extern d'aquestes cèl·lules (Milam et al. 2000). En retina fetal humana, es detecten cèl·lules TULP1 positives al marge extern de la retina a partir de les 8 setmanes i, a partir de les 11 setmanes, els cons centrals en diferenciació presenten un fort marcatge positiu per a TULP1, previ a la presència d'opsina blava. Aquest fet suggereix un paper de TULP1 en el desenvolupament retinal (Milam et al. 2000).

Les dades funcionals acumulades sobre TULP1 i els altres tres membres d'aquesta família de proteïnes (TUB, TULP2, i TULP3) són contradictòries; els primers estudis funcionals, basats en dades estructurals cristal·logràfiques, apuntaven que les proteïnes de la família *tubby* eren factors de transcripció (Boggon et al. 1999). En aquest sentit, s'ha proposat que TUB i TULP3 actuen com a factors reguladors de la transcripció que es troben units, a través del domini carboxiterminal, a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat de la membrana plasmàtica, i que transloquen al nucli per hidròlisi mediada per la fosfolipasa C- β , activada en una via de senyalització iniciada en un receptor acoblat a proteïna G (Santagata et al. 2001). Una altra línia d'evidències, que parteix de l'anàlisi del model animal *tulp1*^{-/-}, suggereix una funció completament diferent de la proteïna TULP1; segons aquesta línia, TULP1 intervé en el transport fins als segments externs dels fotoreceptors de la rodopsina que s'està sintetitzant (Hagstrom et al. 2001). En primer lloc, es posa de relleu l'absència de TULP1 a les fraccions cel·lulars que corresponen a membranes i citoesquelet (Hagstrom et al. 1999); resultats que

contradiuen la hipòtesi que es tractaria d'activadors de la transcripció units a membrana. En aquest sentit, en els ratolins doble homozigot *tubby*^{-/-} *tulp1*^{-/-}, no es detecten canvis de l'expressió d'un grup de set gens específics de fotoreceptors (Hagstrom et al. 2001). En segon lloc, en aquest estudi, es demostra que el ratolí *tulp1*^{-/-} presenta una alteració de la localització de la rodopsina, anterior al procés de degeneració i que, per tant, no n'és un efecte secundari. La rodopsina s'acumula de forma ectòpica a la membrana plasmàtica i és present, també, en les vesícules extracel·lulars que s'observen, en aquest model, al voltant del segment intern dels fotoreceptors. El ratolí transgènic rodopsina P347S –que conté una mutació en una seqüència senyal del domini C terminal de la rodopsina, essencial per al seu transport fins als segments externs– presenta una acumulació de vesícules, que contenen rodopsina, a l'espai extracel·lular com la que s'observa en el ratolí *tulp1*^{-/-} (Hagstrom et al. 2001). En el ratolí P347S, la presència de vesícules s'accentua en línies que presenten una expressió elevada de rodopsina (línia A1) i no és tan marcada en línies d'expressió baixa (línia C1). Això suggereix que la generació de vesícules respon a una acumulació a la membrana plasmàtica de nivells alts de rodopsina que no ha pogut ser transportada correctament (Hagstrom et al. 2001). La similitud entre el fenotip cel·lular d'aquest model i el del ratolí *tulp1*^{-/-} reforça el paper de TULP1 en el transport del pigment visual.

Regulador de GTPasa implicat en retinitis pigmentària (RPGR)

crX:37884818–37942892 (19 exons)

XlrRP; XldRP; XICOD; XlrAMD
(RP3, COD1)
Xp11.4

El gen *RPGR* codifica una proteïna reguladora de guanosina trifosfatasa (GTPasa) que conté un domini aminoterminal que presenta certa identitat aminoacídica amb la proteïna RCC1, una proteïna nuclear que actua com a factor intercanviador de nucleòtids de guanina (GEF, *guanine nucleotide exchange factor*) de la GTPasa petita Ran. Tot i aquesta homologia, no s'ha demostrat l'activitat GEF de la proteïna *RPGR*. A partir dels estudis a nivell cel·lular, realitzats en el model animal generat en el ratolí mitjançant la deleció del gen *RPGR*, s'ha suggerit la possibilitat que aquesta proteïna intervingui en el manteniment d'una distribució polaritzada de determinades proteïnes, com ara les opsines, en la cèl·lula fotoreceptora (Hong et al. 2000). En el ratolí *knockout* per *RPGR*, s'observa una mala localització de les opsines dels cons i de la rodopsina dels bastons que és prèvia al procés degeneratiu. Mitjançant un cribratge per a detectar interaccions proteïques, va ser identificada una proteïna que interactua amb *RPGR*, que va ser denominada *RPGRIP1*, *RPGR-interacting protein 1* (Hong et al. 2001). *RPGR* i *RPGRIP1* colocalitzen al cilí connector dels fotoreceptors, el pont cel·lular que separa el soma del segment extern en bastons i cons. Els ratolins *knockout* per a *Rpgrip1* presenten un increment de la mida dels discos del segment extern dels fotoreceptors, i un fenotip més acusat que el resultant de la deleció d'*Rpgr* (Zhao et al. 2003). En aquest estudi, s'ha observat que, *in vitro*, *RPGRIP1* forma homodímers i filaments, i proposen que es

tracta d'un component estructural de l'axonema del cili, estructura en la qual s'hi ancora RPGR (Zhao et al. 2003).

Des de finals dels anys quaranta, es tenia constància de l'existència de formes de retinitis pigmentària d'herència lligada al sexe (Falls i Cotterman 1948). No va ser, però, fins als anys vuitanta, i començaments dels noranta, que es van realitzar diversos estudis de lligament genètic encaminats a determinar i identificar el nombre de loci de retinitis pigmentària que es trobaven situats al cromosoma X. Tot aquest seguit d'estudis van acabar constatant la presència de dos loci principals d'RP al braç curt d'aquest cromosoma, que van ser designats RP2 –a Xp11.23– i RP3 –a Xp11.4–, i d'un tercer loci menys representatiu, designat RP6 –a Xp21.3-p21.2– (Denton et al. 1988, Chen et al. 1989, Musarella et al. 1990, Ott et al. 1990).

Mitjançant l'anàlisi de lligament i el mapatge per delecions, es va poder acotar el locus RP3 en un interval de menys d'1 Mb, en el qual diversos grups van identificar microdelecions i altres tipus de mutacions en un gen fins llavors desconegut, el gen *RPGR* (Meindl et al. 1996, Roepman et al. 1996). Investigacions posteriors de diversos grups han posat de manifest que el gen *RPGR* presenta un patró complex de processat alternatiu del seu transcrit. A la retina, s'ha demostrat la presència d'un transcrit diferencial que conté un exó anomenat ORF15 –que inclou l'exó 15 i part de l'intró 15–, en el qual s'acumulen gran part de les mutacions observades en persones amb retinitis pigmentària d'herència lligada al sexe (Vervoort et al. 2000)

Mutacions en el gen *RPGR* també han estat descrites en una forma de retinitis pigmentària associada a infeccions respiratòries recurrents, en la qual s'observa una desorganització microtubular de les cèl·lules ciliades respiratòries (Dry et al. 1999); en una forma de retinitis pigmentària amb pèrdua d'oïda i infeccions sinorespiratòries (Zito et al. 2003); en distròfia de cons lligada a l'X [COD1, (Demirci et al. 2002, Yang et al. 2002)]; i en una forma de degeneració macular atrofica (Ayyagari et al. 2002). Finalment, l'atrofia retinal progressiva lligada a l'X que s'observa en la raça de gos husky siberiana (Zeiss et al. 2000) ha estat caracteritzada a nivell molecular i s'han pogut identificar dues mutacions –en dues soques diferents de gos, XLPRA1 i XLPRA2– en l'ortòleg caní del gen *RPGR* que, a l'igual que el gen humà, presenta un patró complex de processat del seu transcrit i un exó ORF15 diferencial, que és l'exó terminal del transcrit majoritari d'*RPGR* a la retina, en el qual s'han aïllat les mutacions (Zhang et al. 2002).

Mutacions en el gen *RPGRIP1*, que codifica una proteïna que interactua amb RPGR, causen amaurosi congènita de Leber [LCA6, (Dryja et al. 2001)] i distròfia de cons i bastons [CORD9, (Hameed et al. 2003)].

Proteïna RP1 (RP1)

cr8:55691179–55705947 (4 exons)

adRP
(RP1)
8q11.23

A començaments dels noranta, va ser caracteritzat a partir d'una anàlisi de lligament el segon locus responsable de retinitis pigmentària autosòmica dominant, després de la rodopsina, al braç llarg del cromosoma 8, en una família americana (Blanton et al. 1991). Els 8 cM del lligament inicial van ser reduïts a una regió crítica de 4 cM gràcies a la identificació d'una segona família a Austràlia (Xu et al. 1996a). Diversos grups van identificar un gen d'expressió específica als fotoreceptors contingut en aquesta regió com la causa d'aquesta forma de retinitis pigmentària autosòmica dominant (Guillonnet et al. 1999, Pierce et al. 1999, Sullivan et al. 1999).

Fins fa ben poc, l'únic que se sabia d'aquesta proteïna de funció desconeguda és que la seva part aminoterminal presentava identitat aminoacídica amb DCX (*doublecortin*), una proteïna neuronal associada als microtúbuls que, quan es troba alterada, causa lisencefàlia en humans. Recentment, s'ha vist que el *knockout* d'*Rp1* en el ratolí provoca una mala orientació dels discos del segment extern (Liu et al. 2003). No se sap com està regulada l'orientació precisa i ordenada dels centenars de discos del segment extern al llarg de l'axonema, però es creu que aquest darrer hi juga un paper important. En aquest sentit, un altre treball publicat fa pocs mesos demostra que Rp1 forma part de l'axonema i que la part aminoterminal de la proteïna li permet interaccionar amb els microtúbuls, n'estimula la formació *in vitro* i els estabilitza (Liu et al. 2004). La disrupció dirigida, en el ratolí, de determinats dominis del gen posa de manifest que els dominis DCX d'*Rp1* participen en el control de la longitud i de l'estabilitat de l'axonema. Així, actualment se sap que RP1 és la primera proteïna associada als microtúbuls (MAP) específica dels fotoreceptors (Liu et al. 2004).

Proteïna RP2 (RP2)

crX:46452628–46498043 (5 exons)

XIRP
(RP2)
Xp11.3

La major part de formes d'herència lligada al cromosoma X de la retinitis pigmentària estan associades a dos loci principals: RP3 (gen *RPGR*) i RP2 que, respectivament, representen aproximadament el 70% i el 10% dels casos de retinitis pigmentària lligada a l'X (Miano et al. 2001). En individus amb retinitis pigmentària lligada a l'X, es va analitzar la presència de reordenaments cromosòmics submicroscòpics a la regió crítica de 5 cM, que havia estat definida per clonatge posicional, al braç petit del cromosoma X (Thiselton et al. 1996), i, en un dels pacients, es va identificar la inserció d'un element LINE1 en l'intró d'un nou gen. El cribratge mutacional d'altres pacients va permetre identificar tot un seguit de mutacions en el gen *RP2* (Schwahn et al. 1998).

El gen *RP2* és d'expressió ubíqua i codifica una proteïna que presenta un cert grau d'identitat aminoacídica amb el cofactor C, una xaperona específica de tubulines que està implicada en el

darrer pas de la maduració de la β -tubulina, necessari per a la heterodimerització amb α -tubulina i la consegüent formació de microtúbuls (Schwahn et al. 1998). En estudis funcionals, s'ha demostrat que RP2, a l'igual que els cofactors C, D i E, estimula l'activitat GTPasa de la tubulina, però que no pot substituir funcionalment el cofactor C a la reacció d'heterodimerització (Bartolini et al. 2002). De fet, una de les mutacions caracteritzades en el gen *RP2*, en un residu conservat també al cofactor C (R118H en RP2), suprimeix l'activitat estimuladora de la GTPasa de la tubulina, tant a la proteïna RP2 com al cofactor C (Bartolini et al. 2002). També s'ha caracteritzat la interacció d'RP2 amb Arl3, (*ADP ribosylation factor (Arf)-like 3*), un factor que forma part d'una família de proteïnes petites d'unió a GTP, d'almenys 8 membres, relacionades amb Ras, de les quals Arl2 s'ha demostrat que és essencial per a la biogènesi de la tubulina (Grayson et al. 2002). Així doncs, RP2 intervindria, conjuntament amb Arl3, en la connexió de la membrana amb el citoesquelet, necessària en processos de senyalització cel·lular o de transport de vesícules als fotoreceptors.

Fascina retinal (*FSCN2*)

cr17:77110016–77114631 (4 exons)

adRP
(RP30)
17q25.3

La fascina retinal (*FSCN2*) està codificada per un gen d'expressió específica als fotoreceptors, paràleg del gen *FSCN1*, que codifica la fascina, una proteïna empaquetadora d'actina. Les fascines són proteïnes citoesquelètiques que entrecreuen F-actina per a formar feixos molt ordenats. Aquests feixos de microfilaments d'actina formen part d'extensions cel·lulars dinàmiques com ara els fil·lopodis de les neurones en creixement (Saishin et al. 1997). Als fotoreceptors, s'ha suggerit que *FSCN2* podria empaquetar els microfilaments d'actina que intervenen en la morfogènesi dels discos del segment extern (Tubb et al. 2000).

Un cribratge mutacional realitzat en 120 pacients amb retinitis pigmentària autosòmica dominant, 200 pacients amb retinitis pigmentària autosòmica recessiva i 100 pacients amb retinitis pigmentària simplex, tots ells japonesos, va permetre caracteritzar una deleció d'un nucleòtid (208delG) en el gen *FSCN2* en 4 famílies amb retinitis pigmentària autosòmica dominant (Wada et al. 2001).

3.8. Els altres gens RP

En aquest darrer apartat, hem inclòs aquells gens causals de retinitis pigmentària la funció dels quals no pot ser classificada en cap de les categories anteriors, o bé perquè són gens poc caracteritzats funcionalment, o perquè les proteïnes que codifiquen no formen part dels processos biològics que hem anat descrivint en aquesta introducció.

Proteïna RP9 o proteïna associada a la quinasa PIM1 (RP9)

cr7:32907651–32922242 (6 exons)

adRP
(RP9)
7p14.3

El 1993, va ser mapat mitjançant una anàlisi de lligament el quart locus de retinitis pigmentària autosòmica dominant al braç curt del cromosoma 7 (Inglehearn et al. 1993), en una única família gran del sud-est d'Anglaterra. Un any més tard, gràcies a una anàlisi més detallada de marcadors de la regió, es va acotar el locus RP9 a un segment d'entre 1.6 i 4 cM, a 7p13-p15 (Inglehearn et al. 1994), del qual se'n va construir un contig de YAC de 4.8 Mb de longitud que abarcava tota la regió (Keen et al. 1995). Finalment, en aquesta família va ser identificada una mutació en un gen no caracteritzat anteriorment, l'ortòleg del qual, en el ratolí, codifica una proteïna de funció desconeguda que interacciona amb el producte de l'oncogen *PIM-1* (Keen et al. 2002). Una segona mutació va ser identificada en un pacient no relacionat amb aquesta família. El gen *RP9* s'expressa en diversos teixits.

Inosina monofosfat deshidrogenasa 1 (IMPDH1)

cr7:127626282–127644257 (17 exons)

adRP
(RP10)
7q32.1

El locus RP10 va ser mapat al braç llarg del cromosoma 7 a partir d'una anàlisi de lligament en una família espanyola afectada de retinitis pigmentària autosòmica dominant (Jordan et al. 1993). La descoberta d'altres famílies, una americana (McGuire et al. 1995) i una altra espanyola (Millan et al. 1995), que presentaven lligament amb aquesta regió permetia suposar que RP10 podia tractar-se d'un locus de retinitis pigmentària autosòmica dominant força representat, i va ajudar a reduir la mida de la regió crítica del locus a un interval de 5 cM, del qual se'n va contruir un contig de YAC que abarcava 5 Mb (McGuire et al. 1996). Una quarta família, que presentava lligament amb RP10, va ser identificada a Escòcia (Mohamed et al. 1996). A partir d'una anàlisi comparativa de l'expressió de 6000 gens, mitjançant *microarrays*, a la retina de ratolins salvatges i de ratolins als quals se'ls havia delectat el gen de la rodopsina, van poder ser identificats una sèrie de transcrits l'expressió

dels quals s'havia reduït o incrementat a les retines dels ratolins *Rho-/-* (Kennan et al. 2002). L'homòleg humà d'un d'aquests trànscrips, que codificava l'enzim inosina monofosfat deshidrogenasa 1 (IMPDH1), mapava al braç llarg del cromosoma 7, dins del locus RP10. El gen *IMPDH1* va ser identificat en un altre estudi, ja que la seva expressió disminuïa 6 cops, respecte als nivells normals, en retines de ratolins als quals s'havia deletat el gen *Crx*, que hem vist que codifica un factor de transcripció que controla l'expressió de nombrosos gens retinals (Bowne et al. 2002). El cribratge mutacional va identificar el gen *IMPDH1* com a responsable de la forma de retinitis pigmentària autosòmica dominant lligada al locus RP10 (Bowne et al. 2002, Kennan et al. 2002). IMPDH1 és una proteïna força ubíqua que actua com un homotetràmer i que catalitza el pas limitant de la síntesi *de novo* de nucleòtids de guanina. Es creu que podria tenir un paper en el metabolisme dels nucleòtids cíclics als fotoreceptors, que és important en la transducció de l'impuls lumínic (Bowne et al. 2002).

Anhidrasa carbònica IV (CA4)

cr17:55582130–55591686 (8 exons)

adRP
(RP17)
17q23.2

L'anhidrasa carbònica és un enzim ancorat a glucosilfosfatidilinositols que es troba a la membrana plasmàtica de les cèl·lules epitelials del ronyó i del cèl·lules endotelials pulmonars, i en d'altres microcapil·lars, especialment els coriocapil·lars de l'ull, però que no s'expressa a la retina (Rebello et al. 2004).

El locus RP17 de retinitis pigmentària autosòmica dominant va ser mapat, mitjançant una anàlisi de lligament, entre els marcadors D17S809 i D17S942 en una família sudafricana (Bardien et al. 1995). En estudis subsegüents, va ser refinat a un interval de 10 cM, entre els marcadors D17S1607 i D17S1874, gràcies a noves famílies lligades a marcadors de 17q22, i, finalment, a un segment d'1 cM, entre D17S1604 i D17S948 (Bardien et al. 1997, Bardien-Kruger et al. 1999). El mateix any 1999, va ser publicat un altre estudi que demostrava el lligament d'una família holandesa amb el locus RP17 i que definia una regió de cosegregació de 7.7 cM entre D17S1607 i D17S948 (den Hollander et al. 1999b). En tots aquests primers estudis es van descartar una sèrie de gens candidats, entre els quals el gen de la subunitat de la fosfodiesterasa 6 (*PDE6G*) –l'ortòleg del qual causa una degeneració retinal recessiva en el ratolí–, el gen de l'inhibidor tissular de metal·loproteïnases 2 (*TIMP2*), el gen de la fascina retinal (*FSCN2*), el gen de l'aminoxidasa específica de retina (*AOC2*) i el gen de la subunitat de la transducina dels cons (*GNGT2*).

En un estudi publicat aquest any, han estat seqüenciats una sèrie de gens candidats en un interval de 3.6 Mb, i s'ha identificat una mutació (R14W) en el gen *CA4*, en dues de les famílies RP17 sudafricanes (Rebello et al. 2004). L'expressió en cèl·lules COS-7 en cultiu de l'al·lel de *CA4* mutat provoca l'acumulació de la proteïna malplegada al reticle endoplasmàtic (ER), que condueix a l'activació de marcadors d'estress de l'ER i de la resposta a proteïnes malplegadas (*unfolded protein response*, UPR) i a l'apoptosi de les cèl·lules en cultiu (Rebello et al. 2004). Els efectes de la mutació

R14W s'ha vist que poden ser revertits amb l'ús d'agents químics que actuen com a xaperones (Bonapace et al. 2004). L'elevada expressió de l'al·lel mutat de CA4 conduiria a l'apoptosi de les cèl·lules endotelials dels coriocapil·lars i a la conseqüent isquèmia retinal, que provocaria la retinitis pigmentària.

§§

4. Els loci orfes de la retinitis pigmentària

En el moment d'escriure aquesta tesi, han estat identificats un total de 31 gens responsables de les diverses formes d'herència de la malaltia: 13 gens responsables de les formes dominants, 17 gens responsables de les formes recessives, entre els quals també s'inclou el gen de la rodopsina –que causa tant RP dominant com recessiva–, i 2 gens responsables de formes lligades al cromosoma X (revisat i actualitzat en RetNet, Retinal Information Network, www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/). Resten per identificar els gens responsables de 7 loci addicionals, que descriurem, breument, a continuació. Aquests corresponen exclusivament a loci de retinitis pigmentària autosòmica recessiva (4 loci) i lligada a l'X (3 loci), perquè d'ençà de la descoberta, aquest any, del gen de l'anhidrasa carbònica IV (RP17), no resta cap locus orfe de retinitis pigmentària autosòmica dominant.

4.1. Loci orfes de retinitis pigmentària autosòmica recessiva

Locus RP22

16p12.3-p12.1

A partir de l'anàlisi de lligament i el mapatge d'homozigositat realitzats en dues famílies consanguínies de l'Índia, amb retinitis pigmentària autosòmica recessiva, va ser definit un nou locus RP en una regió de 16 cM del braç curt del cromosoma 16, entre D16S287 i D16S420 (Finckh et al. 1998). En aquest estudi, va ser analitzar per seqüenciació, i exclòs, un candidat posicional, el gen *CRYM*, que codifica la proteïna cristal·lina-mu, majoritària a la lent de l'ull dels vertebrats.

Locus RP25

6cen-q15

El locus RP25 va ser identificat mitjançant l'anàlisi de regions cromosòmiques que contenien gens que codificaven receptors d'àcid gammaaminobutíric, GABA (Ruiz et al. 1998). El GABA és el principal neurotransmissor inhibidor de la retina humana, i se suposava que els receptors de GABA podien estar implicats en la retinitis pigmentària. En famílies consanguínies amb retinitis pigmentària, es va realitzar un mapatge d'homozigositat centrat en les regions cromosòmiques dels receptors de GABA que va permetre identificar el locus RP25 al cromosoma 6, entre els marcadors D6S257 i D6S1644, en una regió que conté els gens de les subunitats GABRR1 i GABRR2 del receptor GABA-C (Ruiz et al. 1998). El locus RP25 va ser refinat a un interval de cosegregació de 2.4 cM a partir de l'anàlisi d'una família paquistanesa de tres generacions que presentava 12 individus amb retinitis pigmentària autosòmica recessiva lligada a marcadors de 6q. Els autors no van poder identificar cap gen en aquest interval (Khaliq et al. 1999).

Locus RP28

2p16-p11

El locus RP28 va ser identificat a partir d'una anàlisi de lligament en una família índia consanguínia que presentava 4 membres, de dues generacions diferents, afectats de retinitis pigmentària autosòmica recessiva. La malaltia en aquesta família estava lligada a marcadors del braç curt del cromosoma 2, a 2p11-p15, en una regió que abarcava 16 cM (Gu et al. 1999). En un estudi recent, s'ha localitzat una segona família índia que presenta lligament genètic amb marcadors del locus RP28 i s'ha reduït el locus a un segment d'1.06 cM –entre els marcadors D2S2225 i D2S296– que conté 15 gens, 14 dels quals s'expressen a la retina o a l'ull (Kumar et al. 2004).

Locus RP29

4q32-q34

Aquest és el darrer locus de retinitis pigmentària que ha estat mapat. L'any 2001, Hameed i col·laboradors van caracteritzar-lo mitjançant un estudi de lligament genètic realitzat en una família paquistanesa consanguínia. En aquesta família, es va determinar que la malaltia estava lligada a marcadors del cromosoma 4 i es va poder mapar un nou locus (RP29) en un interval de 4.6-cM, a 4q32-q34, definit per una regió putativa d'homozigotitat, entre D4S3035 i D4S2417 (Hameed et al. 2001).

4.2. Loci orfes de retinitis pigmentària lligada al cromosoma X

Locus RP6

Xp21.3-p21.2

A banda dels dos loci majoritaris de retinitis pigmentària del cromosoma X (RP2 i RP3/RPGR), en els quals s'han pogut identificar els gens causals, hi ha nombroses famílies amb un patró d'herència lligada al cromosoma X, en les quals la malaltia no està causada per mutacions en cap d'aquests dos gens. Mitjançant una anàlisi de lligament multilocus a partir de 62 famílies amb retinitis pigmentària lligada a l'X, es va determinar l'existència d'un tercer locus RP en el cromosoma X, entre els marcadors DXS28 i DXS164 (Ott et al. 1990).

Locus RP23

Xp22

Aquest locus de retinitis pigmentària lligada a l'X va ser caracteritzat en una família amb un fenotip atípic caracteritzat per una edat molt primerenca d'inici de la malaltia als mascles. L'interval de cosegregació, definit per les recombinacions en aquesta família, comprèn una regió de 15-cM a

Xp22, entre els marcadors DXS1223 i DXS7161 (Hardcastle et al. 2000). En aquest mateix estudi, va ser descartat el gen XLR51 –el gen causal de la retinosquistis– com a responsable d'aquesta forma de retinitis lligada a l'X.

Locus RP24

Xq26-q27

Mitjançant una anàlisi de lligament amb 52 marcadors microsatèl·lits situats al llarg del cromosoma X, en una única família amb retinitis pigmentària, va ser identificat un nou locus (RP24) a Xq26-q27, en una regió de 23 cM, entre els marcadors DXS8094 i DXS8043 (Gieser et al. 1998).

5. El locus RP26 de retinitis pigmentària autosòmica recessiva

5.1. La família P2

A mitjans dels anys noranta, al nostre grup, va començar a ser estudiada una família gran, consanguínia, en la qual segrega una forma autosòmica recessiva de retinitis pigmentària (FIGURA 34). Aquesta família, que anomenem P2, és originària del sud d'Espanya i, probablement, la seva consanguinitat es remunta quatre generacions enllà de la paterna (Bayés et al. 1998). Dels quinze fills de la família, cinc presenten retinitis pigmentària caracteritzada per l'alteració de la visió, tant perifèrica com central, a partir de la segona dècada de vida (FIGURA 34).

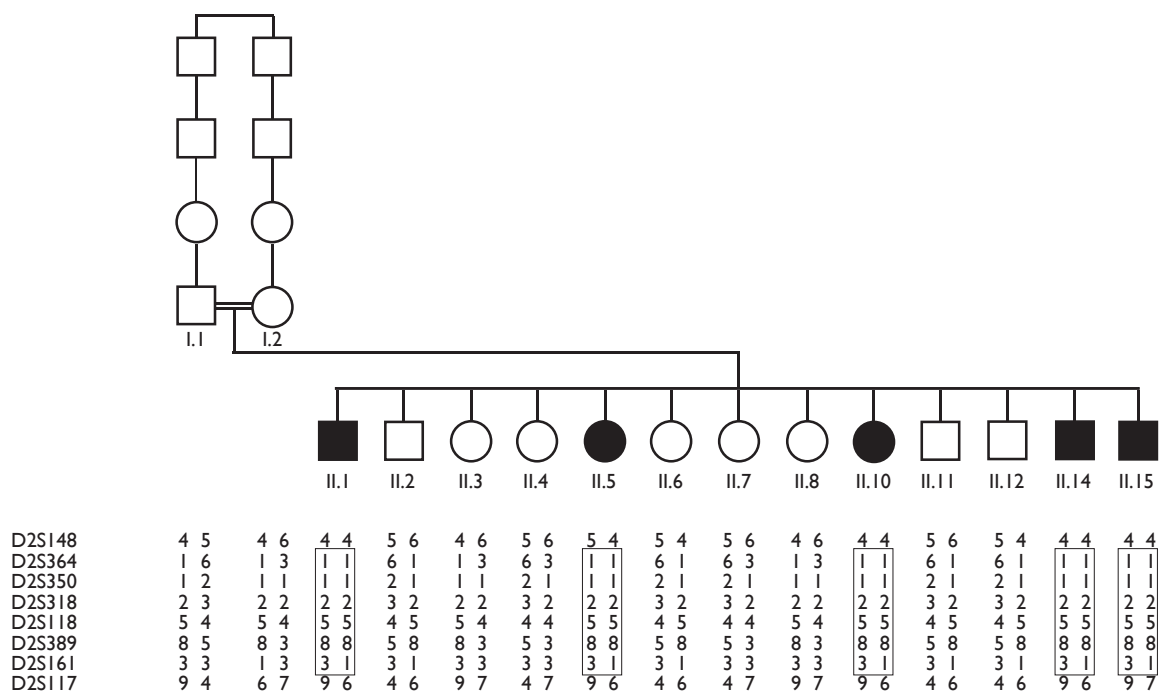


Figura 34 | Pedigrí de la família P2, en la qual segrega una forma autosòmica recessiva de retinitis pigmentària. Es mostren els haplotips pels marcadors emprats en l'anàlisi de lligament i en la definició del locus RP26. Els requadres indiquen l'haplotip compartit pels malalts que defineix l'interval de cosegregació, entre D2S148 i D2S117. Adaptada de (Bayés et al. 1998).

El fenotip clínic d'aquests cinc germans s'ajustava als criteris diagnòstics de la retinitis pigmentària. Així, tots ells presentaven les alteracions característiques del fons d'ull –pal·lidesa del disc òptic, atenuació dels vasos retinals, i acumulació de depòsits de pigment intraretinals– en diversos graus d'afectació. També presentaven alteracions maculars i una absència completa de resposta electroretinogràfica, tant dels bastons com dels cons; excepte els pacients II.10 i II.14, de 28 i 24 anys, que presentaven una resposta electroretinogràfica dels bastons d'amplitud molt reduïda, i una resposta dels cons reduïda, en el pacient II.10, i normal en el pacient II.14. La preservació de la

resposta electroretinogràfica dels cons en el pacient II.14 indicava que l'alteració primària en aquesta família era dels bastons, com és característic en la retinitis pigmentària (Bayés et al. 1998).

5.2. Exclusió de gens i loci candidats

De bon principi, en aquesta família, es va analitzar la cosegregació de la malaltia amb marcadors dels loci caracteritzats d'un seguit de distròfies retinals (retinitis pigmentària, síndrome d'Usher i síndrome de Bardet-Biedl). També, van ser analitzats, per cosegregació, els següents gens candidats: *PDE6B*, *RHO*, *RDS*, *ROM1*, *RCV1*, *NRL* i *PDE6G*, alguns dels quals havien estat descrits ja com a gens responsables de retinitis pigmentària. Cap dels gens i loci considerats cosegregava amb la malaltia i, conseqüentment, van ser exclosos emprant aquest criteri. A partir d'aquí, s'obria la porta a l'aplicació de l'anàlisi de lligament a la família P2, encaminada a identificar un nou gen responsable de retinitis pigmentària (Bayés et al. 1998).

5.3. Anàlisi de lligament i definició del locus RP26

L'anàlisi de lligament, a la família P2, es va dur a terme mitjançant l'escrutini de marcadors de tipus microsatèl·lit distribuïts de manera uniforme arreu del genoma. Un dels marcadors, el microsatèl·lit D2S118, localitzat al cromosoma 2, va donar un valor de *lod score* de 4.12 a $\alpha=0.00$. L'anàlisi d'haplotips de 7 marcadors addicionals d'aquesta regió va permetre caracteritzar un nou locus de retinitis pigmentària autosòmica recessiva i determinar dos fenòmens de recombinació que delimitaven l'interval de cosegregació d'aquest nou locus (FIGURA 34). RP26 –com va ser designat– va ser mapat al braç llarg del cromosoma 2, entre els marcadors D2S148 i D2S117, a 2q31-q33 (Bayés et al. 1998). L'any en el qual va ser realitzada l'anàlisi de lligament, i prenent com a referència les distàncies del mapa genètic de Généthon (Gyapay et al. 1994), el locus RP26 comprenia un interval de cosegregació d'11 centiMorgans (cM), entre els marcadors esmentats, i contenia una presumpta regió d'homozigotitat de 7 cM, compresa entre D2S148 i D2S161 (Bayés et al. 1998).

Inicialment, en aquesta regió, va ser considerat el gen que codifica l'arrestina (*SAG*) –que havia estat mapat a 2q24-q37–, però l'anàlisi de cosegregació amb un polimorfisme intragènic va descartar que *SAG* estigués situat dins del locus (Bayés et al. 1998). Més tard, es va demostrar que la localització física d'*SAG*, al cromosoma, era més distal que la del locus.

Finalment, en aquest estudi, es va analitzar la cosegregació del marcador D2S118 amb la malaltia en 47 famílies espanyoles. La implicació d'RP26 en la patogènia d'aquestes famílies va ser exclosa en 44 casos i, únicament tres famílies, que presentaven *lod score* lleugerament positius, no van poder ser excloses aplicant aquest criteri (Bayés et al. 1998).

En aquest treball de tesi, es descriu l'anàlisi en profunditat del locus RP26, que ens ha permès delimitar amb exactitud el segment cromosòmic que ocupa a 2q31-q32; la caracterització funcional d'un nou gen del locus, *ORMDL1*, –identificat pel nostre grup– i de la família gènica a la qual pertany; i, finalment, la definició d'una regió candidata –dins del locus–, el clonatge d'un nou gen humà (*CERKL*) –a la regió candidata–, i la caracterització d'aquest gen com a nou gen responsable de retinitis pigmentària.