

Discussió

Per què cerquem mutacions?

Des de la descripció de les primeres mutacions causants de malalties cap els anys 60s, el nombre de mutacions descrites en gens com a causa de diferents malalties no ha parat de créixer, tant en malalties mendelianes clàssiques com en d'altres amb diferents tipus d'herència. En malalties hereditàries relativament freqüents, com són la fibrosi quística o diferents hemoglobinopaties, es coneixen ja un gran nombre de mutacions així com la seva distribució a les diferents poblacions mundials. Pel cas de les malalties d'acumulació lisosòmica (LSD), és cap als anys 80s que hi ha les primeres anàlisis mutacionals exhaustives, com és el cas pioner de la malaltia de Gaucher. El gen *GBA*, causant d'aquesta malaltia, va ser seqüenciat el 1985 (Sorge i col., 1985) i fins ara s'hi ha identificat més de 200 mutacions patogèniques (Beutler i col., 2005). Des d'aleshores s'han anat descrivint els gens causants de la majoria de LSDs així com múltiples mutacions trobades als pacients d'aquestes malalties. Tanmateix, encara hi ha molta feina per fer. Per una banda, encara no es coneixen tots els gens implicats en possibles malalties lisosòmiques. Per exemple, els darrers casos on ha estat descrit el gen causant d'una LSD són del passat any 2006: mutacions a la Catepsina D que causen una malaltia *NCL-like* (Steinfeld i col., 2006) i mutacions al gen *TMEM76* causants de la MPSIIIC (o malaltia de Sanfilippo C) (Fan i col., 2006). Per una altra banda, tot i conèixer molts dels gens causants de LSDs encara hi ha poques poblacions per a les que s'hagi fet estudis mutacionals exhaustius.

Conèixer la variabilitat mutacional d'una població és important perquè, tot i que en la majoria de casos la genètica no s'utilitza encara com a única eina diagnòstica, el coneixement de les mutacions causants d'una malaltia ens pot aportar informació valuosa. N'és un exemple el cas d'aquells grups o poblacions humanes on, per conseqüència de la seva història, una o varies malalties hereditàries són més freqüents que en la resta de poblacions. En aquests casos, aquestes malalties no solament tenen una prevalença més elevada que en la resta de poblacions sino que normalment aquestes són causades per unes poques mutacions que s'han fixat en aquell grup degut, entre altres causes, a la seva

elevada endogàmia. Aquest és el cas de la malaltia de Gaucher en els jueus Asquenaites (Beutler i col., 1993) o el cas de la població finlandesa on podem trobar malalties que gairebé només s'han trobat en aquella població, com la Displàsia Diastròfica (DTD) o l'Epilèpsia Mioclònica Progressiva (EPM1) (de la Chapelle i Wright, 1998). Tot això permet que es puguin utilitzar aquests coneixements genètics per poder confirmar els diagnòstics i poder fer millor consell genètic a les famílies.

Per altra banda, en algunes malalties els diferents graus de severitat i la progressió de la malaltia poden ser predits per la mutació del pacient. És a dir, es pot establir una bona correlació genotip-fenotip. En tals casos el coneixement de les mutacions presents en un determinat pacient pot tenir una funció de pronòstic i així ajudar en la decisió sobre el millor tractament que cal donar al malalt.

Per últim, però no menys important, tot i que les malalties estudiades no presentin mutacions prevalents en la població analitzada, l'eina genètica sí que pot ser útil en molts casos. Són aquells casos per als que ja s'han identificat les mutacions en determinats pacients. En aquestes famílies, si s'ha de fer un diagnòstic prenatal, la cerca de la mutació serà una eina diagnòstica totalment efectiva. Encara més, la identificació de les mutacions ens pot permetre distingir amb seguretat els familiars portadors que amb una anàlisi enzimàtica no podríem diferenciar dels controls (evitant així l'ambigüetat que hi pot haver a nivell bioquímic), i així poder fer un millor consell genètic.

Per totes aquestes raons ens vam plantejar fer una anàlisi mutacional de la població espanyola i argentina afectada de les malalties gangliosidosi GM1 i Morquio B, ja que tot i que s'havien fet cerques de mutacions en el gen responsable d'aquestes malalties en diferents poblacions, mai s'havia fet un estudi mutacional exhaustiu en les poblacions espanyola o argentina. Paral·lelament a l'anàlisi mutacional es va realitzar un estudi haplotípic mitjançant diferents polimorfismes intragènics. A més a més, en aquells casos on l'efecte de la mutació no era evident analitzant únicament la seqüència genòmica dels pacients, es va intentar esbrinar l'efecte definitiu de la mutació.

Les mutacions a *GLB1*. Aspectes poblacionals

La seqüenciació del gen *GLB1* en mostres procedents de 49 pacients amb gangliosidosi GM1 (26 pacients espanyols, 3 portuguesos, 1 gambià, 16 argentins, 2 uruguaians i 1 brasiler) ens va permetre identificar el 100% de les mutacions causants de la malaltia en aquests pacients, així com les de 5 pacients espanyols amb la malaltia de Morquio B (veure Capítols 1.1 i 1.2 de Resultats). Vam trobar, per tant, les mutacions dels 108 al·lels mutats de les que 35 no havien estat descrites prèviament. Això suposa un nombre relativament important, ja que fins el moment de la publicació del primer article presentat en aquest treball només hi havia descrites al voltant d'unes 60 mutacions. Per tant, el nostre estudi suposa un increment de gairebé un 50% de mutacions noves.

Tot i que fa algun temps s'havia proposat l'existència de llocs recurrents de mutació (*hot spots*) en el gen *GLB1* (Silva i col. 1999), l'elevat nombre de mutacions diferents i variades que vam trobar a les dues poblacions analitzades és senyal d'una manca de mutacions prevalents. Tanmateix, ja és conegut des de fa temps que els dinucleòtids CpG són llocs més susceptibles de patir mutacions al desaminar-se les citosines metilades. En aquest sentit, varies de les mutacions que vam poder descriure, es localitzen en dinucleòtids CpG. Són mutacions com: p.R59H, p.R59C, p.R201H, p.R208C, p.R590C o el polimorfisme p.R521C. Precisament s'inclouen entre aquestes, les 2 úniques mutacions (p.R59H i p.R590C) que vam trobar en més d'un context haplotípic, indicant que és probable que aquestes mutacions s'hagin generat en més d'una ocasió. A més a més, la mutació p.R59H va ser la mutació més freqüent en les dues poblacions analitzades, amb una freqüència del 27,9% dels pacients de la població Ibèrica i del 15,8% de la població Sudamericana.

Un fet que aviat ens va cridar l'atenció va ser l'elevada presència d'individus d'ètnia gitana en la sèrie de pacients amb gangliosidosi GM1. En concret, entre els 29 pacients de la península ibèrica, 6 eren d'ètnia gitana, mentre que 2 dels 16 pacients argentins també ho eren. Així, sense haver fet un estudi poblacional exhaustiu, sembla clar que la prevalença de la gangliosidosi GM1 dins dels "Roma" (com també s'anomena

als gitanos) és superior que la que hi ha a la resta de la població espanyola i argentina, ja que essent grups minoritaris tant a Espanya com a l'Argentina, representen gairebé un 18% dels pacients que hem estudiat en aquestes poblacions (calculat conjuntament). L'anàlisi mutacional ens va confirmar quelcom que es podia sospitar veient aquesta elevada prevalença dins d'aquest grup i és que tots els gitanos analitzats van resultar ser homozigots per a una mateixa mutació, la p.R59H. No solament això, sino que l'haplotip establert amb els diferents polimorfismes intragènics seqüenciats va confirmar l'existència d'un haplotip conservat associat a la mutació p.R59H en tots els pacients romanís. A més a més, aquest haplotip era diferent als altres haplotips que es van trobar associats a aquesta mutació en pacients no gitanos. Globalment, aquests resultats indiquen que probablement hi ha hagut un efecte fundador dins d'aquest grup ètnic. Això no solament afectaria a un grup específic de gitanos com els ibèrics, sino a tota la població gitana, ja que mentre els gitanos espanyols tenien cognoms espanyols, els gitanos procedents d'Argentina tenien cognoms romanesos. Aquests resultats van ser confirmats paral·lelament a les nostres publicacions per un article on estudiaven 11 pacients gitanos procedents de Bulgària i un procedent d'Itàlia (Sinigerska i col., 2006). D'aquesta manera, amb aquest ja serien 2 els grups poblacionals en els que s'estableix una situació d'efecte fundador per a la gangliosidosi GM1, ja que prèviament s'havia descrit una població de l'illa de Xipre (Pelendri) on l'elevada prevalença de la gangliosidosi GM1 era explicada per una única mutació, la p.R482H (Georgiou i col., 2005).

A partir de totes aquestes dades podem fer un parell de reflexions i extreure'n una conseqüència més pràctica. Per una banda, l'existència d'aquesta mutació prevalent en l'ètnia gitana la podríem explicar per les característiques socials especials d'aquest grup, que és aparentment originari del nord de l'Índia i l'oest del Pakistan i que es va estendre arreu d'Europa i posteriorment a certs països d'Amèrica del Sud. Com altres grups humans, els gitanos mantenen una elevada endogàmia i això va poder afavorir l'elevada prevalença de la gangliosidosi GM1. De fet, en grups amb una alta consanguinitat és normal que en realitat hi hagi més d'una malaltia prevalent (o com a mínim, de prevalença superior a la resta de la població). Això també passa amb els gitanos, en els

que ja s'ha descrit una elevada freqüència per altres malalties així com efectes fundadors de mutacions causants de malalties com la síndrome de cataractes congènites, dismorfia facial i neuropatia (CCFDN), la síndrome miastènica congènita (CMS) o la deficiència de galactosidasa (GKD), entre d'altres (Morar i col., 2004). L'altre comentari fa referència al fet que si trobem una elevada freqüència de la gangliosidosi GM1 entre els gitans, es fàcil suposar que, de fet, en la població control (sana) romaní també sigui freqüent el canvi causant de la malaltia (p.R59H). En efecte, en cercar la presència de la mutació en individus gitans espanyols sans vam trobar un portador de 76, indicant una freqüència del canvi relativament elevada, tal com era d'esperar.

La conseqüència pràctica de tots aquests resultats és doble. En primer lloc, a nivell clínic, si es presenta un pacient d'ètnia gitana amb símptomes típics d'una LSD compatibles amb la gangliosidosi GM1, aquesta malaltia hauria de ser una de les primeres a analitzar a l'hora de fer el diagnòstic. A més a més, en aquest cas, el diagnòstic es podria fer directament per anàlisi de la mutació p.R59H ja que és la que esperaríem trobar en els pacients gitans amb gangliosidosi GM1.

Les mutacions a *GLB1*. Mutacions noves

Com hem descrit a l'apartat anterior, en el conjunt de pacients analitzats vam identificar les mutacions presents en els 108 al·lels mutats. Aquests 108 al·lels incloïen 52 mutacions diferents de les que 35 no havien estat descrites prèviament (indicades a la figura 16). Es pot apreciar com es troben distribuïdes gairebé per tot el gen, tot i que alguns exons semblen acumular-ne més. També hem identificat mutacions en els 2 únics exons on encara no se n'havia descrit, l'exó 5 i l'exó 11. A més a més, les mutacions descrites a l'exó 5 únicament generen canvis d'aminoàcid en la pauta de lectura de la β -gal, mentre que són sinònimes per la pauta de lectura de l'EBP.

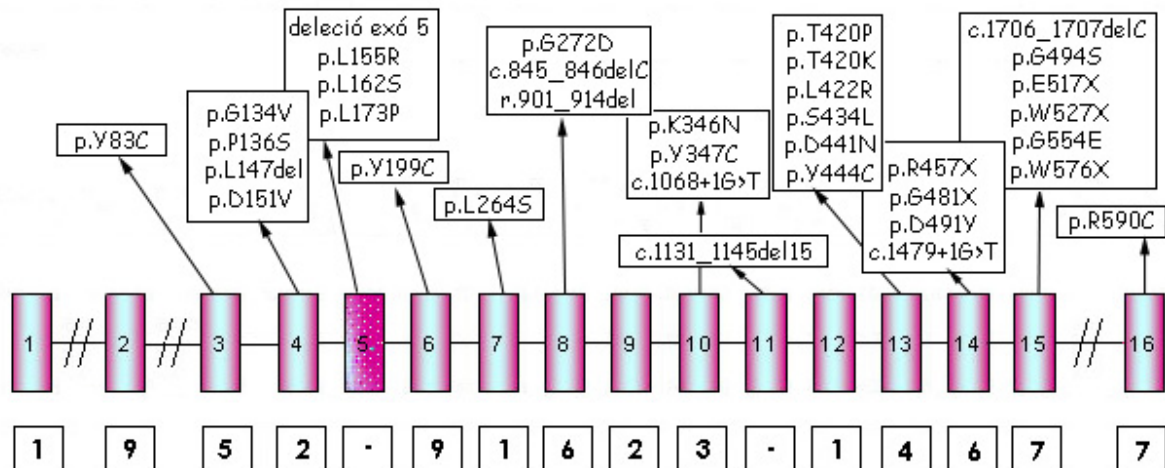
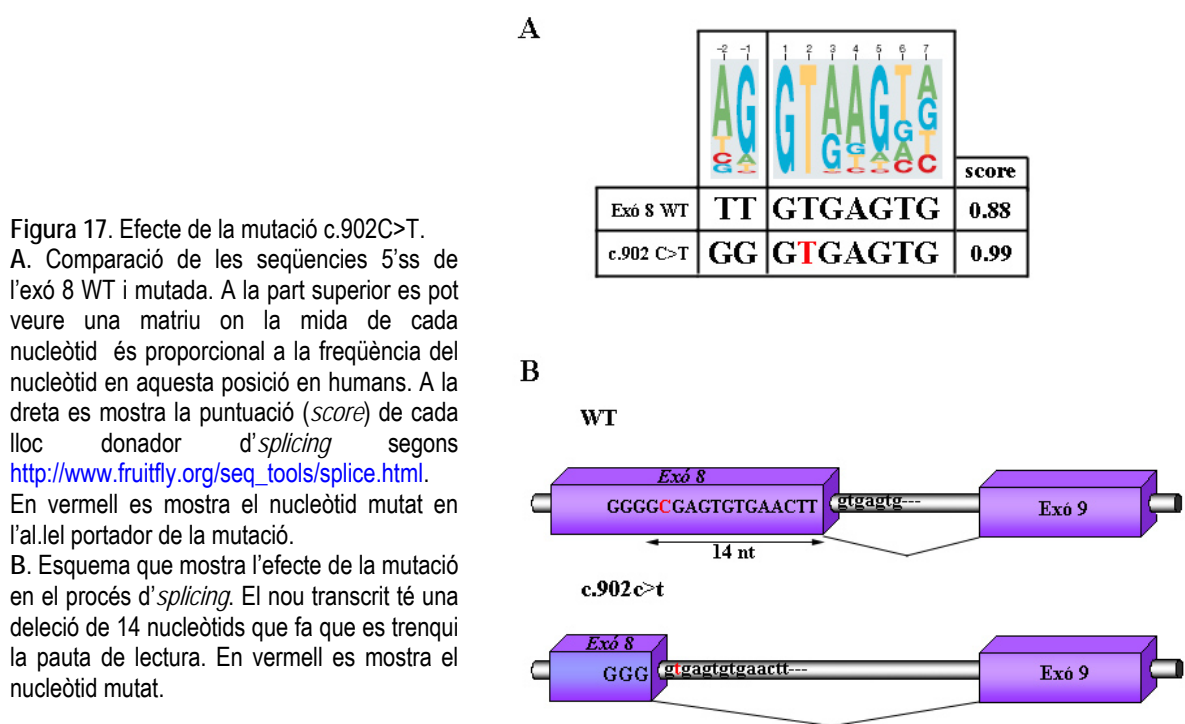


Figura 16. Distribució de les noves mutacions descrites en aquest treball al gen *GLB1*. Els recuadres superiors mostren les mutacions no descrites prèviament a cada exó. Els números inferiors indiquen el nombre de mutacions descrites prèviament en cadascun dels exons.

En quant al tipus d'aquestes noves mutacions, es confirma que la majoria són mutacions de sentit erroni (*missense*). Les altres són mutacions sense sentit (*nonsense*), mutacions que afecten el procés d'*splicing* així com diverses deleccions. Algunes d'aquestes es comentaran amb detall a continuació.

En cercar mutacions a vegades ens trobem casos on únicament seqüenciant el DNA genòmic dels pacients no és suficient per trobar la mutació o casos on la seqüència genòmica no ens informa completament de l'efecte de la mutació. És el cas de 2 de les mutacions que es descriuen al present treball: la r.901_914del i una delecció de l'exó 5.

El cas de la mutació r.901_914del és una mutació exònica l'efecte final de la qual no és un canvi d'aminoàcid o la introducció d'un codó de parada prematur sino l'alteració de l'*splicing* correcte. Clàssicament quan es trobava una mutació en una seqüència exònica es considerava que l'efecte final en la proteïna era el canvi d'un aminoàcid per un altre codificat pel nou codó. Però cada vegada més s'està veient que molts canvis exònics el que fan en realitat és alterar el procés d'*splicing*, ja sigui creant nous llocs donadors/acceptors d'*splicing* o creant/destruint altres seqüències reguladores de l'*splicing* (Revisions sobre el tema a Baralle i Baralle, 2005 i a Caceres i Kornblihtt, 2002). De fet, si fa uns 15 anys es calculava que la proporció de mutacions patogèniques que afectaven l'*splicing* estava al voltant del 15% (Krawczak i col., 1992), avui en dia ja es fan estimacions del 50% (Ars i col., 2000) o, fins i tot, del 62% (Lopez-Bigas i col., 2005). En el cas de la mutació r.901_914del, es tracta d'un canvi puntual a l'exó 8 (c.902C>T). Gràcies al fet que es disposava d'RNA del pacient es va poder observar que el canvi, que es trobava a la seqüència genòmica, no apareixia a la seqüència del cDNA. Hipotetitzant que la mutació estava provocant un canvi en l'*splicing* del gen i que el nou transcrit era degradat per NMD, vàrem tractar fibroblasts del pacient amb cicloheximida per inhibir



aquest procés d'NMD. D'aquesta manera es va poder recuperar parcialment aquest transcrit que estava essent degradat i es va comprovar que la mutació havia generat un nou lloc donador d'*splicing* més eficient que el del propi exó 8 (Fig. 17).

En cas de no haver disposat de mostra d'RNA del pacient, s'hauria considerat erròniament que aquesta mutació provocava únicament un canvi d'aminoàcid (en concret, el p.A301V). Per tant, per poder conèixer l'efecte final d'un canvi trobat en la seqüència genòmica d'un gen cal comprovar el possible efecte en el procés d'*splicing*.

Per altra banda, la mutació c.458-401_552+1033del1529 és una mutació que va ser identificada en dos pacients argentins (A15 i A18) i que implica una deleció de l'exó 5 així com d'una part de les seqüències intròniques flanquejants. És una mutació que va poder ser identificada perquè en trobar-se en homozigosi en un dels pacients (A18) no era possible amplificar per PCR l'exó 5 d'aquest pacient. Es van analitzar les seqüències flanquejants de l'exó 5 i es va observar que hi havia un elevat nombre de seqüències *Alu*. Les seqüències *Alu* són elements repetitius del genoma de tipus SINE (*short interspersed elements*) i són els elements mòbils més abundants del genoma humà. Aquestes seqüències *Alu* ja havien estat descrites en diverses ocasions com a font de mutacions patogèniques (Deininger i Batzer, 1999), per inserció o per recombinació. Per això, degut a l'elevat nombre de seqüències *Alu* que hi havia als dos introns flanquejants de l'exó 5, es va pensar que es podria haver donat un entrecreuament desigual entre dues d'aquestes seqüències, deleccionant-se així l'exó 5. Per comprovar-ho, vam dissenyar diferents encebadors que permetessin amplificar aquesta regió i finalment vam identificar i seqüenciar la regió deleccionada (veure Fig.1 a Resultats, 1.2). És interessant remarcar que es va poder trobar la mutació gràcies a trobar-se en homozigosi en el pacient, ja que si hagués estat en heterozigosi, tal com passa en l'altre pacient (A15), la mutació no s'hauria posat de manifest ja que l'exó 5 de l'al·lel no deleccionat s'amplificava correctament i la seva seqüència no mostrava cap canvi (corresponia a l'al·lel no deleccionat). Ara que es coneix l'existència d'aquesta mutació i que s'ha identificat en dos pacients no relacionats, caldrà tenir-la present en aquells casos en els que falti un al·lel per identificar. En aquests casos serà recomenable analitzar la presència d'aquesta mutació.

Correlació genotip-fenotip

Per últim, en relació a l'anàlisi mutacional, un dels objectius que cercàvem era poder establir quines mutacions es trobaven associades a les formes més lleus de la gangliosidosi GM1 així com a la malaltia de Morquio B, ja que són les formes més minoritàries i es deuen a uns canvis específics que permeten que la proteïna codificada segueixi mantenint certa activitat. En aquest sentit, la presència d'una mutació lleu en un dels dos al·lels, és suficient per a que l'individu desenvolupi la forma lleu de la malaltia independentment de la mutació de l'altre al·lel.

Veient el conjunt de mutacions trobades s'observa que tots els exons semblen essencials per a la proteïna, ja que a quasi tots hi ha mutacions que provoquen el tipus I de la malaltia. En canvi, només algunes acaben provocant les formes juvenils o adultes i, encara menys, la forma Morquio B. De fet, no únicament la posició, sino també el canvi aminoacídic concret és important per determinar l'efecte de la mutació. Això es veu en el cas dels codons p.T420 i p.R590, ja que en funció de l'aminoàcid que introdueix la mutació, el fenotip resultant és diferent. Així, p.T420P es troba en fenotips infantils (tipus I) mentre que p.T420K apareguè en un individu adult (tipus III), o p.R590H s'havia descrit en un individu juvenil (Boustany i col., 1993) mentre que p.R590C la vam trobar en dos pacients infantils.

En els treballs aquí presentats vam poder associar algunes de les mutacions noves a les formes més lleus, tal i com s'indica a la taula 6. A la taula, en les parelles de mutacions separades per / , com a mínim una de les dues ha de ser la responsable del fenotip associat (tot i que seria poc probable que ho fossin les dues).

Taula 6. Noves mutacions associades a formes lleus de la gangliosidosi GM1 i a Morquio B.

Tipus clínic	Mutació associada
II	p.L264S, p.S434L/p.G554E
III	p.L155R, p.T420K
Morquio B	p.Y83C, p.Y444C/p.G494S

Tanmateix, cal anar amb compte ja que la correlació genotip-fenotip no es pot establir de manera absoluta en els casos de mutacions lleus, ja que s'ha vist que una mateixa mutació pot donar lloc a fenotips amb diferent severitat. El cas paradigmàtic és el del canvi p.R201H descrit tant en pacients amb gangliosidosi GM1 (juvenils i adults) com amb Morquio B. És cert que en alguns dels pacients Morquio B descrits, portadors de la mutació p.R201H, al final es van acabar reclassificant com pacients amb gangliosidosi GM1, i en aquest sentit la mutació va ser un bon indicador de que acabarien apareixent complicacions neurològiques (Paschke i col., 2001). Però la variabilitat en el grau de severitat per aquesta mutació és notable i això ens ha de fer ser cautelosos a l'hora de pronosticar l'evolució de la malaltia a partir del genotip. Una possible explicació d'aquesta variabilitat podria trobar-se en l'activitat residual de l'altra mutació que acompanya a la mutació lleu. Però aquesta no semblaria ser l'única explicació i probablement caldria trobar altres motius com la variabilitat genètica i ambiental dels diferents pacients.

L'expressió de proteïnes mutades ens informa sobre l'efecte de les mutacions

Un cop identificades les mutacions causants de la gangliosidosi GM1 i Morquio B en la població espanyola i argentina es va voler conèixer l'efecte d'algunes d'aquestes mutacions en l'activitat enzimàtica de la β -galactosidasa (veure Capítols 2.1 i 2.2 de Resultats).

Que les mutacions descrites eren la causa de la patologia en els malalts semblava bastant clar ja que els malalts havien estat diagnosticats bioquímicament sense ambigüetat i el gen *GLB1* havia estat completament seqüenciat, de manera que les mutacions descrites eren els únics canvis trobats en els pacients. A més a més, les noves mutacions no es van trobar en 100 cromosomes control, descartant així possibles polimorfismes. No obstant, un altre punt a favor de que un canvi és patogènic s'aconsegueix estudiant l'activitat enzimàtica residual de les proteïnes mutades. Per altra banda, en els casos de pacients heterozigots no infantils no es pot saber *a priori* quina de les mutacions, o si totes dues, és la responsable de la forma més lleu. Per això, es van expressar en cèl.lules COS-7 varies de les noves mutacions trobades, així com algunes de les descrites prèviament, per poder comparar.

Com era d'esperar, les mutacions que havien estat associades a la forma més severa, la forma infantil, van resultar en una activitat residual nul.la. Van ser mutacions com: p.R59H, p.T420P, p.D441N o p.R590C. També pel canvi p.L162S, que en els pacients sempre s'havia trobat acompanyat d'un altre canvi, el p.R521C, es va demostrar que per si sol ja és suficientment greu per anul.lar tota l'activitat enzimàtica (acompanyat de p.R521C també té una activitat nul.la). Per altra banda, els canvis associats a formes més lleus com el p.R201H i el p.T420K, a la forma III, i el p.Y83C, a Morquio B, van donar lloc a proteïnes amb activitats residuals entre el 7 i el 15 % de l'activitat de l'enzim normal. Això concorda amb la menor gravetat de símptomes trobada als pacients portadors d'aquests canvis. És interessant el cas dels canvis p.T420P i p.T420K, ja que tot i ser en el mateix codó, el seu efecte és diferent. Això ja ho havíem detectat al comparar els

fenotips dels pacients portadors d'ambdues mutacions, però ho vam poder confirmar en fer l'expressió d'aquestes mutacions i veure que, en efecte, el canvi de la treonina per una lisina a la posició 420 permet retenir una certa activitat residual (un 10,3%) que no permet el canvi per una prolina. Un cas semblant a aquest s'havia descrit al codó 201 on les mutacions p.R201H i p.R201C també semblaven tenir efectes diferents. Però en el cas del codó p.R201, les diferències entre les dues mutacions no són tan marcades i fins i tot hi ha més heterogeneïtat fenotípica entre pacients que porten el mateix canvi que no entre els que en tenen un o l'altre (Caciotti i col., 2003; Morrone i col., 2000; Suzuki i col., 2001). Nosaltres mateixos hem descrit pacients amb la mutació p.R201H tant com tipus III com amb Morquio B. Per tant, pel canvi p.T420K caldrà veure si altres malalts portadors d'aquest canvi sempre desenvolupen el subtipus adult. Pel cas dels canvis p.Y444C i p.G494S, trobats com a nous canvis en un pacient Morquio B, no es va detectar activitat residual per cap dels dos i, per tant, no vam poder establir quin dels dos (o si els dos) era el causant d'aquesta forma lleu (Morquio B). És possible que aquest sistema no permeti distingir en el cas d'aquestes mutacions la presència d'una activitat residual per al gangliòsid GM1.

Per altra banda també vam expressar 3 canvis, en principi no patogènics, però interessants per diverses raons. Són els canvis p.R521C, p.S532G i p.R595W. El canvi p.S532G ja es coneixia anteriorment com un polimorfisme habitual a la població general. Nosaltres l'havíem trobat en un 7% de la població espanyola. També se sabia que tot i no ser patogènic, sí que tenia un cert efecte en l'activitat de la β -galactosidasa, ja que la seva expressió havia donat activitats d'un 75-95% de la control (Zhang i col., 2000). Nosaltres el vam expressar i vam obtenir una activitat del 60% del control, confirmant el seu paper "modificador" de l'activitat de la proteïna, cosa que cal tenir en compte quan es troba acompanyant altres canvis.

En aquest mateix sentit, vam poder descriure un nou canvi, el p.R595W. Aquest canvi es va trobar en el pare d'un pacient d'origen basc amb gangliosidosi GM1, però no en el pacient. El pare, tot i no ser afecte, presentava una activitat enzimàtica residual de la β -galactosidasa en els leucòcits inferior al que s'esperaria en individus portadors.

Aquestes dades semblaven indicar que ens trobàvem davant d'un nou al·lel pseudodeficient però no patogènic. A les LSDs, s'entén per pseudodeficiència aquella situació en la que un individu clínicament sa presenta l'activitat d'un enzim lisosòmic molt reduïda. És important conèixer aquests al·lels pseudodeficients perquè poden dur a realitzar errors en els diagnòstics. Per aquesta raó vàrem expressar en un sistema *in vitro* el canvi p.R595W i es va posar de manifest una reducció parcial de l'activitat de la proteïna, ja que la β -gal obtinguda presentava un 45% d'activitat residual. Una altra prova de que no es tractava d'un canvi patogènic va ser trobar-lo amb una certa freqüència a la població control. De fet, a la població control espanyola no basca es va trobar amb una baixa freqüència (0,8%), però a la basca (d'on era el pare del pacient) aquesta freqüència va ser superior (3,2%). Aquesta diferència entre la població espanyola no basca i la població basca concorda amb l'aïllament i peculiaritats genètiques conegudes per a la població basca (Aguirre i col., 1989; Mourant, 1983). En conseqüència, a l'hora de fer el diagnòstic enzimàtic per a possibles pacients amb gangliosidosi GM1 o Morquio B, caldrà tenir present l'existència a la població general de variants modificadores no patogèniques que alteren l'activitat enzimàtica en individus no afectes. Ademés, aquestes variants poden ser presents amb una freqüència superior en grups poblacionals concrets.

Per últim, el canvi p.R521C ens va semblar particularment interessant d'estudiar ja que havia estat descrit prèviament com un polimorfisme relativament freqüent en poblacions com la brasilera, on s'havia trobat amb una freqüència del 4% (Silva i col., 1999). Per altra banda, en un article més recent es parlava d'aquest canvi com d'una mutació de tipus III, ja que els autors hi descrivien un pacient adult homozigot sense cap altre variació a la seqüència del gen *GLB1*. A més a més, en expressar el canvi trobaven nivells residuals d'activitat similars als d'altres mutacions adultes (Caciotti i col., 2005b). Nosaltres, en cercar aquest polimorfisme, el vam trobar en un 1% de la població espanyola no afecta. Aquesta freqüència, juntament amb les freqüències trobades en altres poblacions, ens va semblar incompatible amb que aquest canvi fos sempre un canvi patogènic, ja que en els 30 pacients ibèrics amb gangliosidosi GM1 que s'havien estudiat, mai va ser trobat i, per la seva freqüència a la població general, s'esperaria que fos el canvi

més freqüent entre els pacients. Per aquests motius vam decidir expressar-lo, i el resultat obtingut (33,2% d'activitat residual) el va situar en una posició intermèdia entre les altres variants modificadores i les mutacions causants de la forma adulta. Si s'exclou la possibilitat que en el pacient descrit per Caciotti i col.laboradors hi hagués alguna altra mutació que no va ser detectada, els nostres resultats són compatibles amb que ens trobem davant d'un canvi amb suficient activitat residual per no provocar efectes simptomàtics, o provocar-los molt lleugerament. D'aquesta manera els individus homozigots podrien passar desapercebuts. Només en alguns casos (de moment només hauria estat descrit el cas de Caciotti i col.laboradors) la presència d'aquest canvi en homozigosi seria suficient per provocar la malaltia. En aquests casos, potser els factors ambientals o el rerefons genètic explicarien perquè aquests individus acaben desenvolupant la malaltia. Per tant, estaríem parlant d'un cas de penetrància incompleta que caldria confirmar tant amb la identificació d'individus homozigots per al canvi que no presentessin la malaltia, com amb la de nous individus malalts també homozigots (o heterozigots compostos) per p.R521C (cosa que alhora confirmaria que el pacient descrit fins ara no es tracta d'un cas realment excepcional).

En resum podem concloure que l'obtenció de variants mutades de la β -gal amb un sistema lipofectamina-cèl.lules COS-7 és un bon sistema tant per poder avaluar la gravetat dels diferents canvis identificats als pacients, com per confirmar o desmentir la patogenicitat dels mateixos. No obstant aquest sistema no ens permet discriminar les raons per les que les proteïnes mutades perden la seva activitat. És possible que les mutacions estiguin afectant al centre actiu de la proteïna o que provoquin un plegament incorrecte que impedeixi la seva activitat enzimàtica o, fins i tot, que algunes de les variants mutades siguin més fàcilment degradades. Tot i això, les bones correlacions obtingudes entre els canvis expressats i els fenotips dels pacients en els que es trobaven aquests canvis és senyal de que el sistema utilitzat és útil a l'hora d'establir la gravetat dels canvis trobats al gen *GLB1*.

Anàlisi de les interaccions de la β -galactosidasa

Es van realitzar també experiments per establir els efectes de les diferents mutacions de la β -galactosidasa en les interaccions que la β -gal fa amb les altres proteïnes del complex LMC, és a dir, la PPCA i la Neuraminidasa (veure Capítol 2.1 de Resultats). Per això vam seguir dues estratègies: per una banda es van analitzar aquestes proteïnes per transferència *Western* d'extractes de fibroblasts procedents de pacients i, per una altra banda, es va estudiar la seva interacció *in vitro* per coimmunoprecipitació (CoIP) de la β -gal amb anticossos anti-Neuraminidasa. Els resultats van ser dispars, ja que si bé en les CoIP semblava que totes les variants mutades seguien interaccionant amb el complex, en les anàlisis sobre els fibroblasts dels pacients a vegades alguna de les altres proteïnes presentava un patró modificat, indicant algun efecte de les mutacions de la β -gal sobre el complex LMC. Especialment la PPCA semblava “perdre” alguna de les seves formes en alguns dels pacients. També, en un dels pacients (GM4), fins i tot semblava que la Neuraminidasa fos gairebé absent. Aquests resultats semblarien indicar que els canvis *per se* no impedeixen la interacció de les proteïnes en el complex, com demostren les CoIP, però que *in vivo* l'estructura formada no és tan estable i això fa que la Neuraminidasa o alguns dels pèptids de la PPCA resultin en una estructura més fàcilment degradada. Això es veu confirmat, per exemple, pel fet que pacients amb gangliosidosi GM1 també presentin una marcada reducció de l'activitat de la Neuraminidasa (tot i que superior a l'activitat residual en pacients amb sialidosi). Precisament, tal com ja s'ha comentat abans, un dels principals objectius del LMC és el correcte plegament de les proteïnes i la protecció enfront de les proteases lisosòmiques i, per tant, és lògic que si aquest complex resulta afectat, les proteïnes que en formen part perdin estabilitat. Sorprenentment, l'alteració de les altres proteïnes del complex no sembla, en canvi, ser tan marcada en la β -gal, ja que tant en els fibroblasts dels pacients com en les versions mutades expressades a COS-7 sembla mantenir-se bastant intacta. Únicament, en els *Westerns* sobre mostres dels pacients sembla variar la proporció amb que es presenta la forma no madura (84-88

kDa) de la proteïna β -gal i en casos com el del pacient GM4, la forma madura de la proteïna (64 kDa) es mostra reduïda.

Les diferències trobades entre les CoIP i els *Westerns* d'extractes de fibroblasts de pacients ens recorden que l'efecte que estudiem *in vitro* en un experiment com la CoIP no té perquè reflectir les condicions exactes en que està succeint el fenomen *in vivo*. En aquest sentit, les diferències observades entre els experiments *in vivo* i *in vitro* sobre l'estudi de la interacció entre les proteïnes del complex LMC es podrien explicar per variables tals com l'ús d'una línia cel.lular no humana (cèl.lules COS-7) o pel fet que s'estaven sobreexpressant les 3 proteïnes (Neuraminidasa, PPCA i β -gal), la interacció de les quals es volia estudiar.

L' estudi dels mecanismes bàsics dels processos post-transcripcionals, tals com l' *splicing*, ens aporta nova informació sobre els gens

L'especial configuració de l'*splicing* alternatiu del gen *GLB1*, on 3 exons no consecutius, el 3, el 4 i el 6, no són inclosos en el transcrit madur (*exon skipping*), fent que únicament l'exó 5 quedi en una pauta de lectura diferent, ens va fer interessar pel mecanisme subjacent que controla aquest *splicing* alternatiu. En aquest cas l'*splicing* alternatiu dóna lloc a dues proteïnes amb diferents funcions (β -gal i EBP), i és gràcies a la doble pauta de lectura de l'exó 5 que l'EBP adquireix la seva funció.

Per a realitzar l'abordatge d'aquest estudi es van seguir dues estratègies: analitzar l'*splicing* endògen en les cèl.lules HeLa i fibroblasts humans i utilitzar un sistema *in vitro* basat en minigens per poder estudiar l'efecte de diferents factors d'*splicing* sobre aquest procés (veure Capítol 3.1 a Resultats).

Per analitzar els transcrits endògens es van dissenyar diferents encebadors que permetien amplificar específicament un dels dos transcrits. Cal tenir en compte que el transcrit de l'EBP sempre és minoritari respecte el de la β -gal i això impedia que en una mateixa reacció de PCR es poguessin amplificar tots dos alhora. En fer una PCR usant els encebadors específics d'EBP com són l'EBP_F o l'EBP_R es pot amplificar, com és d'esperar, la banda corresponent a aquest transcrit. El que és interessant és que si prèviament s'han tractat les cèl.lules (tant cèl.lules HeLa com fibroblasts) amb cicloheximida (CHX), aleshores apareixen més bandes: la corresponent al transcrit de l'EBP i altres que correspondrien a transcrits "intermedis" amb diferents combinacions d'exons, per exemple sense els exons 3 i 4 però amb el 6 o sense el 6 però amb l'exó 3 o el 4. Sabem que la CHX és un inhibidor de la traducció que, en ser inhibida, de retruc inhibeix el procés de degradació de l'mRNA pel mecanisme de l'NMD. El fet que en tractar les cèl.lules amb CHX apareguin aquestes bandes extra, és senyal de que els mRNAs corresponents a aquestes bandes normalment són presents a la cèl.lula però són

degradats ràpidament per l’NMD. Això és lògic ja que la combinació d’exons en aquests transcrits implica la presència de codons d’aturada prematurs (PTCs) responsables de la inducció d’aquesta degradació (Fig.18).

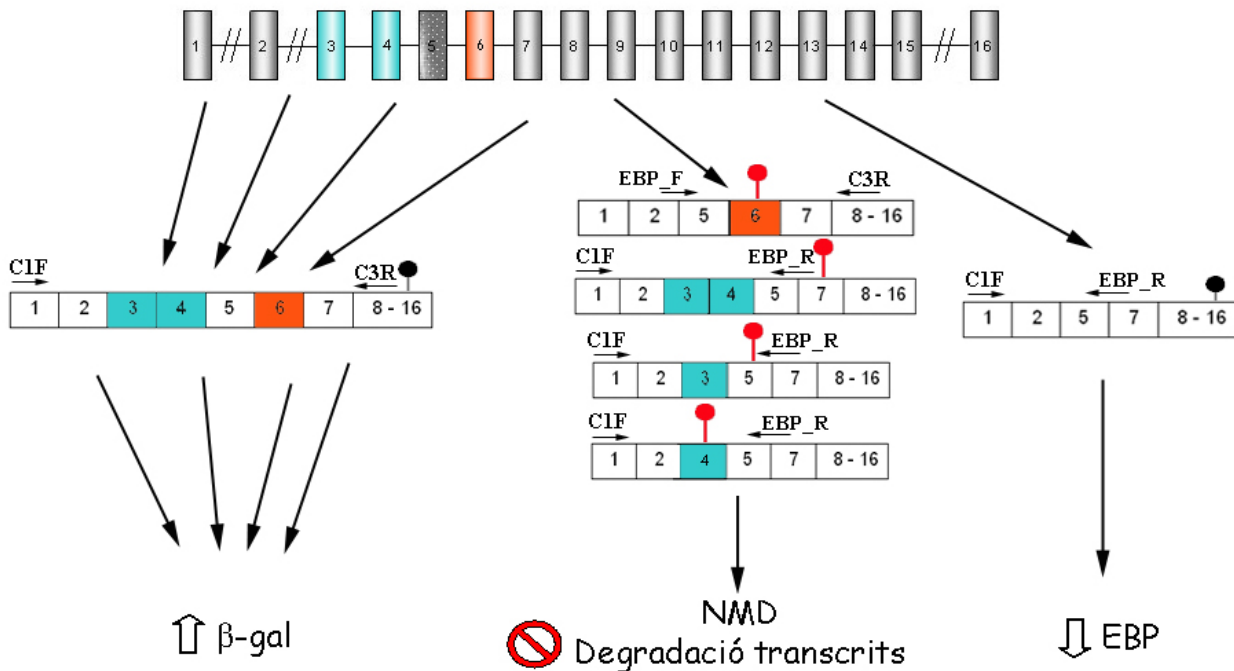


Figura 18. L’*splicing* del gen *GLB1* genera múltiples transcrits, la majoria inclouen tots els exons, generant el transcrit de la β -gal. En alguns casos els exons 3, 4 o 6 poden no ser inclosos, aleshores la presència o no d’un PTC permetrà que el transcrit es mantingui o no. Les fletxes mostren els encebadors que en cada cas amplificarien el transcrit indicat.
 ⬆ : codó d’aturada habitual. ⬆ : PTCs.

La interpretació d’aquest resultat seria que no hi ha un mecanisme específic dirigit a produir el transcrit de l’EBP, sino que, tot i que majoritàriament tots els exons són considerats com a tals i es genera un transcrit de 16 exons, en alguns casos minoritaris els exons 3, 4 o 6 són considerats introns i no són inclosos en el transcrit madur. D’aquesta manera es generen transcrits amb les múltiples combinacions d’exons possibles, però només aquells que no generen un PTC (com és el cas de l’absència dels exons 3, 4 i 6 alhora) podran “sobreviure”, mentre que els demés són degradats pel mecanisme d’NMD.

Si realment aquesta és l’explicació correcta, se’ns plantegen dues preguntes. El fet que en alguns casos no s’incloguin els exons 3, 4 i/o 6 és perquè aquests tenen senyals d’*splicing* febles? I en el cas que no sigui així, aleshores altres exons, com el 5, podrien també en alguns casos ser considerats introns i, per tant, no ser inclosos en el transcrit madur?

Per respondre la primera de les preguntes vam fer ús del minigèn que havíem construït. Aquest minigèn inclou els 6 exons implicats en l'*splicing* alternatiu (2, 3, 4, 5, 6 i 7) així com uns 200 parells de bases intròniques flanquejants. Les seqüències clonades eren suficients per a que tots els exons fossin reconeguts com a tals i, com en el gen endogen, el transcrit majoritari era el que incloïa tots 6 exons. Quan s'utilitza el minigèn, com que aquest no es veu afectat pel mecanisme d'NMD, la presència dels transcrits amb les diferents combinacions d'exons es posa de manifest sense necessitat del tractament amb CHX. A més a més, com que en cada cas es generen múltiples transcrits diferents, es poden utilitzar com a control per a quantificar els uns respecte els altres.

En analitzar els *scores* (puntuacions donades per programes informàtics) dels llocs acceptors d'*splicing* dels exons 3, 4 i 6 vam veure que: l'exó 4 el tenia bastant dèbil, l'exó 3 semblant a la mitja d'exons mentre que el 6 fins i tot el tenia per sobre de la mitja. Així, per analitzar si influïa la força del lloc acceptor d'*splicing* en la inclusió/exclusió dels exons es van mutagenitzar en el minigèn els llocs d'*splicing* 3' flanquejant els exons 3 i 4 (un de cada exó en cada cas) per millorar el seu *score*. Els resultats van demostrar que uns millors llocs acceptors d'*splicing* produïen una freqüència més elevada d'inclusió dels exons 3 i 4, però això no evitava que en alguns transcrits aquests exons seguisin tenint *exon skipping*.

Constatant que la feblesa dels llocs d'*splicing* no era suficient per justificar que únicament aquests exons (3, 4 i 6) no s'incloguessin en alguns dels transcrits, vam dissenyar un encebador (2_4F) que ens permetès detectar si es generaven altres transcrits que no incloguessin exons diferents als exons 3, 4 i 6, com per exemple l'exó 5. Efectivament, vam comprovar que el minigèn produïa alguns transcrits en els que no es trobava l'exó 5 i, a més a més, en analitzar els transcrits endògens de les cèl.lules (HeLa i fibroblasts) tractades amb CHX també apareixien bandes que corresponien a un transcrit sense l'exó 5.

Amb aquestes dades el model de la figura 18 hauria de ser ampliat amb més transcrits intermedis formats per diferents combinacions d'exons, que no incloguessin l'exó 5, que també serien degradats en generar-se un PTC. Això confirmaria la nova

funció darrerament proposada de l'NMD a mamífers, que és la d'eliminar el soroll genòmic (Mendell i col., 2004). És a dir, tot i que els exons del gen *GLBI* estan ben definits i en la majoria dels casos la maquinària d'*splicing* els reconeix com a tals, l'spliceosoma a vegades els "salta" (caldría potser comprovar si aquest "salt" és un error de la maquinària o és "voluntari") i no s'inclouen a l'mRNA. Això genera gran quantitat de transcrits erronis i cal un mecanisme, l'NMD, que els elimini per evitar la presència de múltiples proteïnes truncades que podrien tenir efectes nocius per a la cèl.lula.

Realment és sorprenent que una configuració d'*splicing* tan específica com la que dona lloc a l'EBP sembli no estar "dirigida" i que l'existència d'aquest transcrit es degui únicament al fet casual de que aquesta combinació concreta d'exons no genera un PTC. Per aquesta raó vam voler analitzar si algun altre element que intervé normalment a l'*splicing* (constituti i alternatiu), com són les proteïnes SR, estava jugant algun paper en aquest *splicing* concret. Vam cotransfectar cèl.lules HeLa amb el minigèn que havíem construït juntament amb diferents plasmidis que expressaven alguna de les proteïnes SR conegudes. El resultat va ser sorprenent ja que la sobreexpressió de les diferents SRs alterava la proporció relativa dels transcrits generats pel minigèn i aquestes noves proporcions eren repetitives tant a nivell de les PCRs quantitatives com de noves cotransfeccions. Així doncs, sembla que les proteïnes SR sí que poden jugar un paper en el control de l'*splicing* del gen *GLBI*. No obstant, no cal oblidar que en l'experiment *in vitro* s'estan sobreexpressant aquestes proteïnes SR i que, per tant, els efectes observats poden no donar-se en condicions fisiològiques.

Per intentar comprendre millor el fet curiós de que l'*splicing* de l'EBP fos fruit d'una casualitat, es va voler estudiar què succeïa en altres espècies. Ja se sabia que a ratolí (*Mus musculus*) aquest *splicing* alternatiu no podia tenir lloc ja que la putativa pauta de lectura de l'EBP generaria un PTC (Morreau i col., 1991). Analitzant la seqüència de la β -gal a altres espècies (rata, gos, gat, macaco, conill i pollastre) vam observar que a totes elles, exceptuant la rata, a l'exó 5 hi havia una possible doble pauta de lectura. Per tant, semblava que l'existència d'una única pauta de lectura de l'exó 5 estaria restringida als rossegadors (família Murinae). Vol dir això que la presència dels dos transcrits és

ancestral i que als murins la introducció d'un codó d'aturada a la segona pauta de l'exó 5 va ser suficient per fer desaparèixer el transcrit de l'EBP? Si la resposta és afirmativa, aleshores esperaríem que a totes les espècies estudiades existís l'EBP i que fos codificada pel gen *GLB1*. En canvi, als murins, hauria d'existir una altra proteïna que hagués pogut reemplaçar la funció de l'EBP.

En aquest sentit vam poder comprovar que efectivament, en cèl·lules de ratolí (RAW264.7) no existia un transcrit equivalent al de l'EBP. Però, per altra banda, si tractàvem aquestes cèl·lules amb CHX, sí que apareixia dèbilment aquest transcrit, confirmant que és l'existència del PTC (i no un altre mecanisme de l'*splicing* alternatiu) el que impedeix que aquest transcrit es generi a ratolí. Vam intentar sense èxit detectar el possible transcrit de l'EBP partint d'RNA total d'embrió de pollastre (*Gallus gallus*), això però no implica descartar que aquest transcrit pugui existir efectivament al pollastre en alguna altre fase del desenvolupament o teixit específic.

Per altra banda, si realment a totes les espècies analitzades existís l'EBP codificada per l'homòleg del gen *GLB1* (mentre que als murins no), esperaríem que la força selectiva per mantenir la segona pauta de lectura de l'exó 5 provoqués unes taxes de substitució sinònimes (Ks) inferiors entre totes elles que les Ks entre l'ésser humà i el ratolí o la rata. Com es pot observar a la taula 2 presentada a l'article del capítol 3 dels resultats del present treball, efectivament les taxes de substitució sinònimes més elevades van ser les calculades per l'home i el ratolí i per l'home i la rata (més elevades que la Ks entre l'home i el pollastre, per exemple). Seria interessant poder comprovar aquestes dades veient si hi ha realment una "EBP" a la resta d'espècies (no murins) codificada per l'homòleg de *GLB1* i, alhora, si a murins hi ha alguna proteïna equivalent a l'EBP codificada per algun altre gen.

En definitiva, aquests estudis sobre els transcrits del gen *GLB1* ens han permès aprofundir en el coneixement del procés que està regulant l'*splicing* alternatiu d'aquest gen. Per altra banda, els estudis realitzats amb l'ús dels minigens han posat de manifest un efecte de les proteïnes SR sobre el procés, cosa que apunta a un possible mecanisme regulador ja sigui de forma permanent o temporal en moments o teixits específics.

La gangliosidosi GM1 i la malaltia de Morquio B. Avenços d' aquesta tesi.

En aquesta tesi s'han realitzat diferents estudis entorn de les malalties causades per mutacions en el gen *GLB1*: la gangliosidosi GM1 i el Morquio B. Aquests estudis han pretès abarcar diversos aspectes complementaris i incrementar el coneixement entorn d'aquestes malalties, tant a nivell pràctic, amb la possibilitat de realitzar diagnòstics o pronòstics genètics, com a nivell de coneixença bàsica, en estudiar, per exemple, el mecanisme que origina els dos transcrits del gen *GLB1*.

L'estudi mutacional ens ha aportat una nova visió de la presència d'aquestes malalties a la Península Ibèrica i a Sudamèrica. A tots dos llocs s'ha vist que les mutacions patogèniques són molt heterogènies i que n'hi ha poques que es trobin en més d'un pacient. Únicament, el grup d'individus d'ètnia gitana ha mostrat la presència d'una única mutació causant de la malaltia, independentment del seu origen geogràfic actual. En aquest cas el resultat aporta solucions pràctiques de cara al diagnòstic de la malaltia en aquest grup ètnic.

Per altra banda, l'expressió *in vitro* de variants mutades de la β -galactosidasa és un pas més enllà en la caracterització de les mutacions perquè aporta la confirmació de que un canvi determinat és realment una mutació i no una variable no patogènica. Fins i tot, en casos com el del canvi p.R521C ens pot informar sobre l'aspecte paradoxal de que un canvi relativament freqüent a la població pugui ser en algun cas patogènic.

En estudiar els processos que regulen l'*splicing* alternatiu del gen *GLB1* no es pretenia aconseguir una aplicació directa per a les malalties. No obstant, no s'ha de descartar que el coneixement de mecanismes moleculars bàsics, com en aquest cas l'*splicing* d'un gen, no puguin tenir algun dia alguna aplicació pràctica. Per exemple, actualment a partir dels coneixements bàsics sobre l'*splicing* dels gens *SMN1* i *SMN2* ja s'estan assajant teràpies per a l'atròfia muscular espinal (SMA) (revisat a Wirth i col., 2006). De moment, hem pogut averiguar que l'*splicing* alternatiu del gen *GLB1* que dona

lloc a l'EBP no sembla ser un fenomen dirigit i que en aquest procés hi juga un paper important el mecanisme de l'NMD.

Tot i que actualment no hi ha teràpies definitives per tractar la gangliosidosi GM1 o la malaltia de Morquio B, desitgem que els treballs presentats en aquesta tesi puguin aportar el seu petit granet de sorra per a que algun dia aquestes malalties puguin tenir una teràpia definitiva.

Conclusions

⇨ S'ha realitzat l'anàlisi mutacional de 49 pacients amb gangliosidosi GM1 i 5 amb la malaltia de Morquio B seqüenciant completament el gen *GLB1*. El resultat ha estat la identificació del 100% de les mutacions causants d'aquestes malalties. Els pacients estudiats provenien bàsicament d'Espanya i d'Argentina, cosa que ha permès establir les mutacions majoritàries en el gen *GLB1* en aquestes poblacions. En concret, la mutació p.R59H ha resultat ser la mutació més freqüent, en trobar-se en 25 dels 106 al·lels (espanyols i sudamericans) analitzats (23,6%).

⇨ Els 108 al·lels mutants identificats inclouen 52 mutacions diferents de les que 35 no havien estat descrites prèviament. La majoria de mutacions trobades són mutacions de sentit erroni, però també s'han descrit mutacions sense sentit, mutacions que afecten el correcte *splicing*, insercions i delecions.

⇨ L'anàlisi dels orígens dels pacients estudiats indica que la gangliosidosi GM1 és més prevalent en els individus d'ètnia gitana. A més a més, en aquesta població la malaltia és causada per una única mutació, la p.R59H. En tots els pacients d'ètnia gitana estudiats, aquesta mutació es troba associada a un únic haplotip, mentre que en els pacients no gitanos es troba associada a diferents haplotips. Aquest fet indica un possible efecte fundador d'aquesta mutació en la població gitana.

⇨ L'anàlisi de l'RNA de les mostres del pacient GM1.11 ha permès caracteritzar la mutació c.902C>T present a l'exó 8 del gen *GLB1*. Aquesta mutació afecta el correcte *splicing* en generar un nou lloc donador d'*splicing*. En el nou transcrit hi ha un canvi de pauta de lectura que acaba provocant una degradació del mateix per NMD i que fa que aquest transcrit només pugui ser detectat en tractar les cèl·lules amb cicloheximida, un inhibidor de l'NMD. En el cas de no haver estudiat l'efecte de la mutació en l'*splicing*, aquesta hauria estat considerada una mutació de sentit erroni.

⇒ Amb l'estudi mutacional i les dades clíniques dels pacients s'han pogut establir correlacions genotip-fenotip per a la majoria de noves mutacions detectades. Les noves mutacions que provoquen el tipus infantil són: p.G134V, p.P136S, p.L147del, p.D151V, p.L162S+p.R521C, deleció de l'exó 5, p.Y199C, c.854_846delC, c.902C>T, p.K346N, p.Y347C, c.1068+1G>T, c.1131_1145del15, p.T420P, p.L422R, p.D441N, p.G481X, p.D491Y, c.1479+1G>T, c.1706_1707delC, p.E517X, p.W527X, p.P549L, p.W576X, p.R590C. Les mutacions que provoquen el tipus II (juvenil) són: la p.L264S i una (o les dues) de les següents, p.S434L i p.G554E. Les mutacions p.L155R i p.T420K provoquen la forma adulta, mentre que la p.Y83C i una (o les dues) de les p.Y444C i p.G494S provoquen la malaltia de Morquio B.

⇒ S'ha realitzat l'expressió *in vitro* de 14 variants mutades de la β -galactosidasa utilitzant el sistema de transfecció amb Lipofectamina en cèl.lules COS. Amb aquest sistema ha estat possible quantificar les activitats enzimàtiques residuals de les diferents variants.

⇒ L'expressió dels canvis p.R59H, p.L162S, p.L173P, p.T420P, p.D441N i p.R590C, presents en pacients tipus I, ha donat lloc a proteïnes amb una activitat residual nul.la. Les variants p.Y83C, p.R201H i p.T420K, presents en pacients adults i/o Morquio B, presenten activitats residuals d'entre el 7 i el 15% del valor control. Les variants polimòrfiques i les pseudodeficients tals com la p.R521C, la p.S532G i la p.R595W han generat les activitats residuals més elevades amb valors d'entre el 30% i el 60% del valor de la proteïna control.

⇒ S'ha descrit una nova variant pseudodeficient de la β -galactosidasa, el canvi p.R595W. Aquesta variant provoca una marcada reducció de l'activitat de la β -gal en el plasma i els leucòcits dels individus portadors, sense que aquesta reducció arribi a ser patològica.

⇨ S'han realitzat estudis de CoIP per estudiar la interacció de variants mutades de la β -galactosidasa amb les proteïnes Neuraminidasa i PPCA del complex LMC. Aquests estudis no han mostrat diferències clares entre les variants mutades i la proteïna control. En canvi, en l'estudi de les proteïnes β -galactosidasa, Neuraminidasa i PPCA per transferència *Western* en mostres d'extractes proteics de pacients s'observa l'alteració d'aquestes proteïnes en alguns dels pacients.

⇨ S'ha estudiat el procés d'*splicing* alternatiu en el gen *GLB1* humà. El tractament amb cicloheximida de cèl.lules HeLa i fibroblasts humans ha posat de manifest l'existència de transcrits que normalment són degradats pel procés d'NMD. Per tant, per *splicing* alternatiu del gen *GLB1* es generen més transcrits dels que finalment són funcionals, essent el procés d'NMD el filtre que elimina els no funcionals.

⇨ Els estudis mitjançant l'ús minigens permeten concloure que els llocs acceptors d'*splicing* dèbils no justifiquen per sí sols l'*skipping* d'aquests exons en alguns transcrits, tot i que millorar aquests llocs d'*splicing* ha incrementat la proporció d'inclusió dels exons estudiats. Per altra banda, les cotransfeccions amb proteïnes SR han mostrat que aquestes proteïnes tenen la capacitat d'alterar les proporcions entre els diferents transcrits, indicant així una possible funció reguladora d'aquestes proteïnes en el gen *GLB1*.

⇨ La comparació entre les seqüències homòlogues al gen *GLB1* humà de diferents espècies ha mostrat que únicament a murins la segona pauta de lectura de l'exó 5 (equivalent al transcrit EBP) és trencada per un codó d'aturada prematur (PTC). El tractament amb cicloheximida en cèl.lules de ratolí RAW264.7 permet detectar un transcrit equivalent al de l'EBP, indicant que és el PTC la causa de la seva absència a les cèl.lules.

