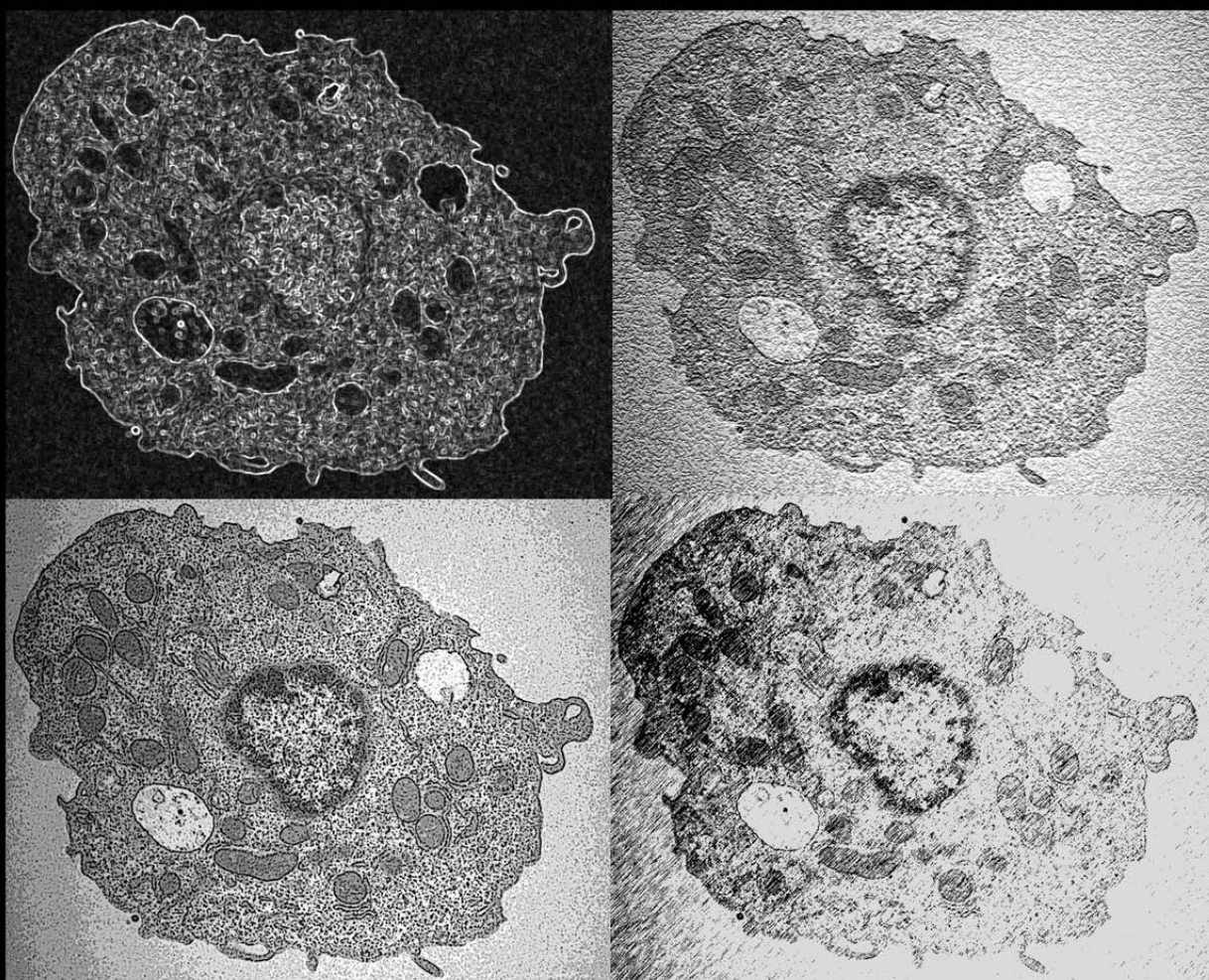


Caracterització de mutacions causants de la malaltia de Gaucher. Aproximació a una teràpia gènica.



Anna Diaz Font
2006

**Caracterització de mutacions causants de la
malaltia de Gaucher.
Aproximació a una teràpia gènica.**

Memòria presentada per
Anna Díaz Font

Per optar al grau de
Doctora en Ciències Biològiques

*Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Lluïsa Vilageliu
Arqués i el Dr. Daniel Grinberg Vaisman al Departament de
Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de
Barcelona*

Programa de Genètica (Bienni 1999-2001)

Dra. Lluïsa Vilageliu Arqués

Dr. Daniel Grinberg Vaisman

Anna Diaz Font

Barcelona, gener 2006

Índex

Introducció	1
Presentació	3
1. El lisosoma	5
1.1. Malalties d'acúmul lisosòmic (LSD)	7
2. Els glicosfingolípid	11
2.1. Estructura i funció dels glicosfingolípid	11
2.2. Metabolisme dels glicosfingolípid	13
2.2.1. Biosíntesi dels glicosfingolípid	15
2.2.1.1. La Glucosilceramida sintasa (GCS)	17
2.2.2. Degradació dels glicosfingolípid	18
2.3. Malalties associades al metabolisme dels glicosfingolípid	19
2.3.1. Malalties associades a la síntesi dels glicosfingolípid	19
2.3.2. Malalties associades a la degradació dels glicosfingolípid: les esfingolipidosis	20
3. La malaltia de Gaucher	23
3.1. Fites importants en la història de la malaltia de Gaucher	23
3.2. Prevalença de la malaltia	24
3.3. Clínica de la malaltia	25
3.3.1. Malaltia de Gaucher Tipus I	25
3.3.2. Malaltia de Gaucher Tipus II	26
3.3.3. Malaltia de Gaucher Tipus III	26
3.4. Diagnòstic de la malaltia	26
3.4.1. Diagnòstic morfològic	26
3.4.2. Diagnòstic enzimàtic	26
3.4.3. Diagnòstic genètic	27
3.4.4. Diagnòstic prenatal	28
3.5. Patologia cel·lular	28

3.6. Bioquímica de la malaltia.....	29
3.6.1. El substrat: la glucosilceramida (GlcCer)	30
3.6.2. L'enzim: la Glucocerebrosidasa	31
3.6.3. L'activador: la Saposina C	31
3.6.4. Mecanisme catalític	32
3.7. Genètica de la malaltia.....	33
3.7.1. El gen GBA i el seu pseudogèn (GBAP)	33
3.7.1.1. Polimorfismes en el gen GBA	35
3.7.1.2. Mutacions en el gen GBA causants de la malaltia de Gaucher	35
3.7.1.2.1. Mutacions més freqüents	36
3.7.1.2.2. Mutacions causades per recombinacions entre el gen i el pseudogèn: al·lels Recs o al·lels complexos	37
3.7.1.3. Correlacions genotip-fenotip	39
3.7.2. El gen de la prosaposina (PSAP)	40
3.7.2.1. Mutacions en el gen PSAP	41
3.8. Models animals.....	42
3.8.1. Models animals per a la malaltia de Gaucher que afectin el gen GBA	42
3.8.2. Models animals que afectin el gen PSAP	43
3.9. Teràpia.....	44
3.9.1. Teràpia de suport	44
3.9.2. Transplantament de medul·la òssia	45
3.9.3. Teràpia de substitució enzimàtica	45
3.9.4. Teràpia de reducció de substrat	46
3.9.5. Teràpia de transferència gènica	47
3.9.6. Teràpia basada en la utilització de xaperones	48
4. Noves metodologies de teràpia gènica.....	49
4.1. Tècniques de reparació gènica dirigida : els quimeroplasts	49
4.2. Tècniques d'interferència d'RNA	51

Resultats **57**

Capítol 1: Anàlisi i caracterització de mutacions produïdes per recombinacions entre el gen GBA i el pseudogèn causants de la malaltia de Gaucher.....**59**

1.1. Caracterització de nous al·lels causants de la malaltia de Gaucher produïts per recombinacions entre el gen GBA i el pseudogèn.....61

Treball publicat:

A new gene-pseudogene fusion allele due to a recombination in intron 2 of the glucocerebrosidase gene causes Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules and Diseases* (2000) 26(5): 409-416.

1.2. Caracterització del mecanisme de generació de l'al·lel RecNcil en població argentina i espanyola71

Treball publicat:

Gene rearrangements in the glucocerebrosidase-metaxin region giving rise to disease-causing mutations and polymorphisms. Analysis of 25 RecNcil alleles in Gaucher disease patients. *Human Genetics* (2003) 112: 426-429.

Capítol 2: Anàlisi del gen PSAP en pacients de la malaltia de Gaucher.....**77**

2.1. Anàlisi de mutacions en el gen PSAP en un pacient de la malaltia de Gaucher.....79

Treball publicat:

A mutation within the saposin D domain in a Gaucher disease patient with normal glucocerebrosidase activity. *Human Genetics* (2005) 117: 275-277.

2.2. Dades suplementàries: Anàlisi del gen de la PSAP en pacients candidats de la malaltia de Gaucher.....85

Capítol 3: Utilització de tècniques de reparació gènica com a possible teràpia de la malaltia de Gaucher: els quimeroplasts.....**89**

3.1. Utilització de quimeroplasts com a possible teràpia de la malaltia de Gaucher.....91

Treball publicat:

Unsuccessful chimeroplast strategy for the correction of a mutation causing Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules and Diseases* (2003) 31: 183-186.

Capítol 4: Utilització de tècniques d'interferència d'RNA com a possible teràpia de la malaltia de Gaucher.....97

4.1. Inhibició de la Glucosilceramida Sintasa (GCS) mitjançant la utilització de siRNAs.....99

Treball sotmès a publicació:

RNAi-mediated inhibition of the glucosylceramide synthase (GCS) gene: a possible therapeutic strategy for Gaucher disease.

4.2. Dades Suplementàries: Detecció de l'acúmul de glucosilceramida en macròfags de ratolí amb microscopia electrònica.....125

Discussió.....131

De les mutacions causades per recombinacions entre el gen GBA i el pseudogèn 133

De la mutació RecNcil 135

Del gen de la prosaposina (PSAP) 140

De la teràpia gènica 142

Dels quimeroplasts com a eina de teràpia gènica 143

De l'RNAi com a eina de teràpia gènica 146

De la malaltia de Gaucher i la feina presentada en aquesta tesi 149

Conclusions.....151

Bibliografia.....155

Addenda.....175

ABREVIATURES

BMT	transplantament de medul·la òssia (Bone Marrow Transplantation)
CBE	epòxid- β -conduiritol (Conduiritol-β-Epoxide)
ERT	teràpia de substitució enzimàtica (Enzyme Replacement Therapy)
GBA	gen que codifica la glucocerebrosidasa
GBAP	pseudogèn de GBA
GCS	gen que codifica la glucosilceramida sintasa en humans
GD	malaltia de Gaucher (Gaucher Disease)
GalCer	galactosilceramida
GlcCer	glucosilceramida
GlcCerasa	glucosilceramidasa o glucocerebrosidasa
GSL	glicoesfingolípíd
LacCer	lactosilceramida
LSD	malaltia d'acúmul lisosòmic (Lysosomal Storage Disease)
M6P	manosa-6-fosfat
M6PR	receptor de la manosa-6-fosfat
NB-DNJ	N-butyldeoxynojirimycin
NMD	degradació del mRNA degut a la presència d'un codó sense sentit (Nonsense Mediated mRNA-Decay)
PSAP	prosaposina, precursor de la proteïna activadora d'esfingolípid
PSAP	gen que codifica la prosaposina
PTC	codó de parada prematura (Premature Termination Codon)
Rec	recombinant
RNAi	interferència d'RNA
SAP	saposina, proteïna activadora d'esfingolípid (Sphingolipid Activator Protein)
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	small interfering RNA
SRT	teràpia de reducció de substrat (Substrate Reduction Therapy)
Ugcg	gen que codifica la glucosilceramida sintasa en ratolí