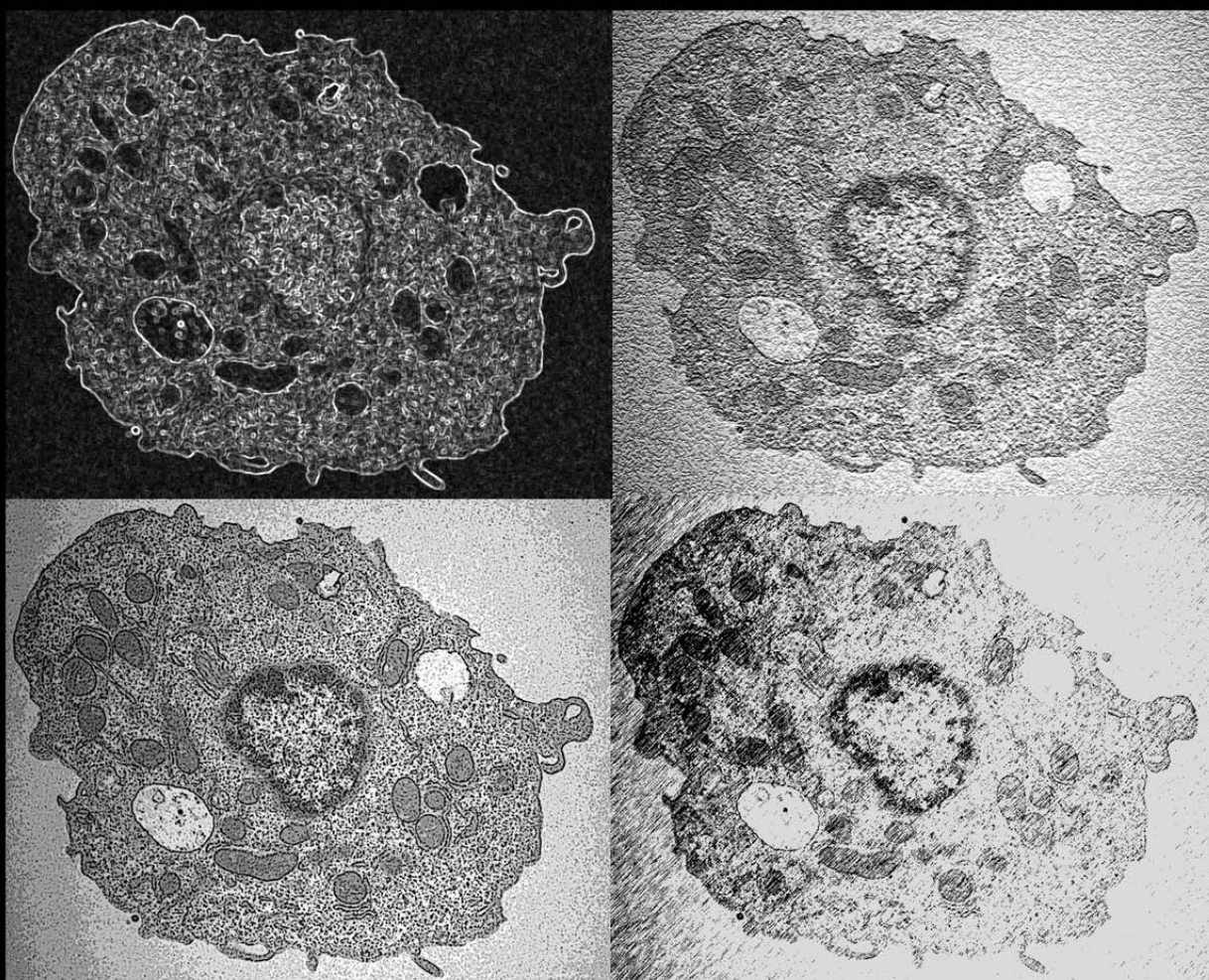


Caracterització de mutacions causants de la malaltia de Gaucher. Aproximació a una teràpia gènica.



Anna Diaz Font
2006

Introducció

PRESENTACIÓ

La malaltia de Gaucher és una malaltia d'herència autosòmica recessiva, causada per mutacions en el gen *GBA*, o en alguns pocs casos, per mutacions en el gen *PSAP*. El gen *GBA* codifica la hidrolasa lisosòmica Glucocerebrosidasa i el gen *PSAP* codifica la proteïna activadora de l'enzim anterior, la Saposina C.

Fins al moment s'han descrit més de 200 mutacions en el gen *GBA* causants de la malaltia de Gaucher, que han permès desenvolupar un diagnòstic molecular de la malaltia, i unes poques en el gen *PSAP*.

Aquestes mutacions produeixen una deficiència en alguna d'aquestes dues proteïnes, la Glucocerebrosidasa o la Saposina C, que estan implicades en la via de degradació dels glicoesfingolípid. Aquesta deficiència enlenteix o anul·la la degradació de la glucosilceramida, que s'acumula en els lisosomes. Per aquest motiu, la malaltia de Gaucher s'inclou dins del grup de malalties anomenades esfingolipidosis, que es caracteritzen per acumular esfingolípid.

Les esfingolipidosis formen part d'un grup més ampli de malalties, que s'anomenen malalties d'acumulació lisosòmica, caracteritzades per tenir una deficiència en un enzim lisosòmic i la conseqüent acumulació del substrat que no es pot degradar en els lisosomes.

La malaltia de Gaucher és la més freqüent d'aquestes malalties. En aquesta malaltia, l'acumulació de glucosilceramida en els lisosomes dels macròfags determina els teixits que es veuran afectats. En la **figura 1.1** es mostra aquest procés d'acumulació en els macròfags en la malaltia de Gaucher.

En la introducció d'aquesta tesi es fa una descripció del lisosoma i els glicoesfingolípid abans d'entrar en la descripció de la malaltia pròpiament dita.

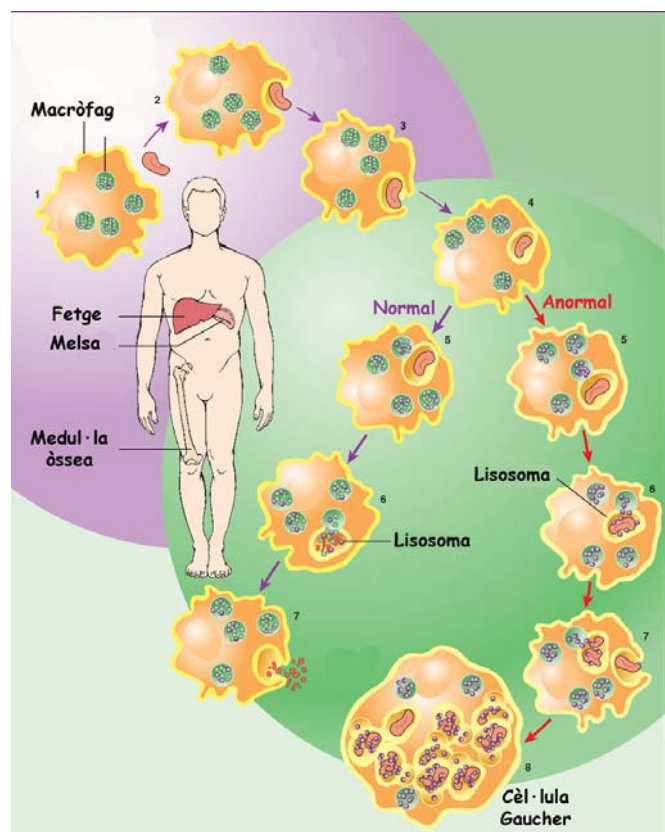


Figura 1.1. Procés d'acumulació de la glucosilceramida en els lisosomes dels macròfags per formar la cèl·lula Gaucher i desenvolupar la malaltia. Els òrgans més afectats seràn el fetge, la melsa i la medulla òssia. Figura modificada de Enderlin i col. (2003).

1. EL LISOSOMA

Un dels trets que caracteritza les cèl·lules eucariotes i que permet el seu manteniment és el reciclatge continu dels components macromoleculars. La cèl·lula de mamífer està equipada per a aquesta activitat amb uns orgànuls membranosos que poden degradar eficientment una gran varietat de macromolècules. Aquests orgànuls són els lisosomes.

Els lisosomes van ser descoberts a principis dels anys 50 per C. de Duve i van ser definits en base a dos criteris: la existència d'una membrana que els limita i la presència dins de l'orgànul d'hidrolases àcides (De Duve i col., 1955).

Si ens basem només en la seva aparença, el lisosoma és un dels orgànuls cel·lulars més simples (**Figura 1.2**). Bàsicament és un sac d'enzims digestius. Però aquests enzims són capaços de digerir qualsevol tipus de molècula biològica. Els lisosomes es van anomenar "bosses suïcides", perquè en cas de ruptura accidental podrien causar la completa dissolució de tots els constituents cel·lulars. Originalment el lisosoma es va considerar que només estava implicat en la digestió de materials que la cèl·lula ingeria per fagocitosi o pinocitosi. Més endavant es va veure que tenia altres funcions cel·lulars.

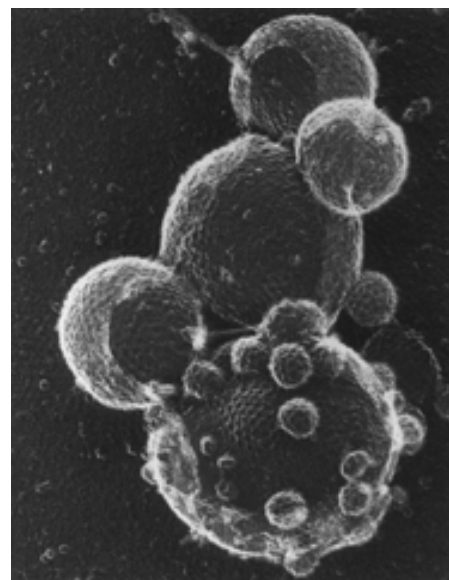


Figura 1.2. Fotografia d'un lisosoma amb microscopia electrònica d'escaneig.

Clàssicament s'havia pensat que les vesícules prelisosòmiques, que es formen a partir de l'aparell de Golgi, maduraven a lisosomes primaris. Recentment s'ha vist que hi ha diferents vies de formació dels lisosomes (Mullins i Bonifacio, 2001). S'han proposat diferents models per explicar la biogènesi dels lisosomes i els orgànuls relacionats, però és un procés que encara no està clar. Tot i això, els diferents models es basen en la fusió de diferents vesícules per arribar a formar els lisosomes.

Els lisosomes són fonamentalment orgànuls rics en enzims hidrolítics que són responsables de la degradació de macromolècules extracel·lulars (via fagocitosi o endocitosi) o del citosol (via autofàgia). Contenen diferents enzims hidrolítics capaços de degradar proteïnes, lípids i diferents polisacàrids. En aquest aspecte, els lisosomes són la destinació final de molts materials cel·lulars que s'han de destruir. En la **figura 1.3** veiem com els lisosomes es fusionen amb diferents vesícules per degradar el material que aquestes contenen. Aquestes vesícules poden portar material de l'interior cel·lular (autofàgia) o extracel·lular (fagocitosi o pinocitosi).

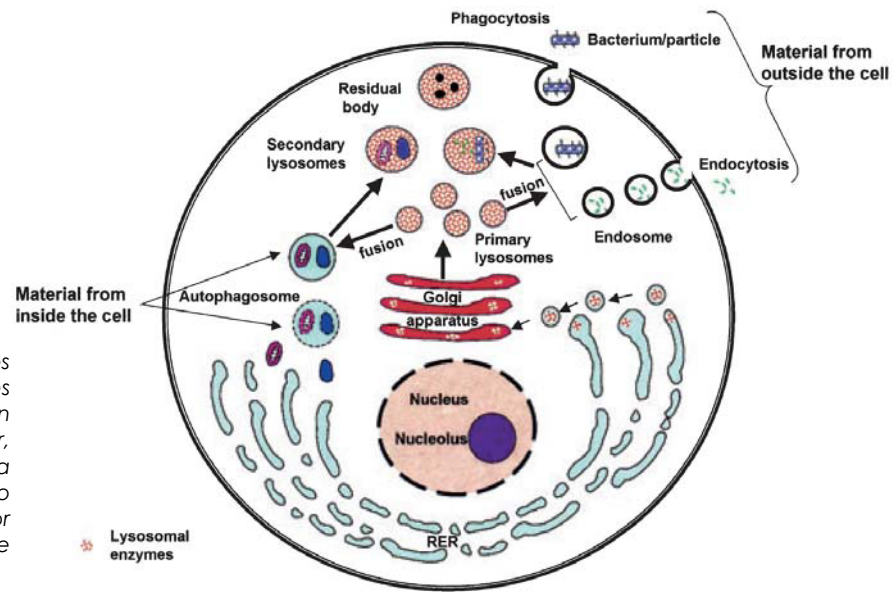


Figura 1.3. Els lisosomes es fusionen amb altres vesícules que porten materials per degradar, tant de l'exterior de la cèl·lula (endocitosi o fagocitosi) com de l'interior (autofàgia). Figura de Vellodi (2005).

Els enzims lisosòmics es sintetitzen en el reticle endoplasmàtic rugós (RER). Llavors passen al lumen del reticle endoplasmàtic, i un cop allà el pèptid-senyal dels enzims lisosòmics és eliminat i uns residus asparagina són específicament glicosilats. Aquestes glicoproteïnes són plegades i exportades al cis-Golgi, on específicament alguns dels seus oligosacàrids són marcats amb una manosa-6-fosfat (M6P) i són empaquetades en vesícules prelisosòmiques. En el trans-Golgi aquestes proteïnes marcades són reconegudes pel receptor de M6P (M6PR), dirigint-les a les vesícules lisosòmiques. La **figura 1.4** és un esquema d'aquest procés de síntesi dels enzims lisosòmics i dels òrgans implicats.

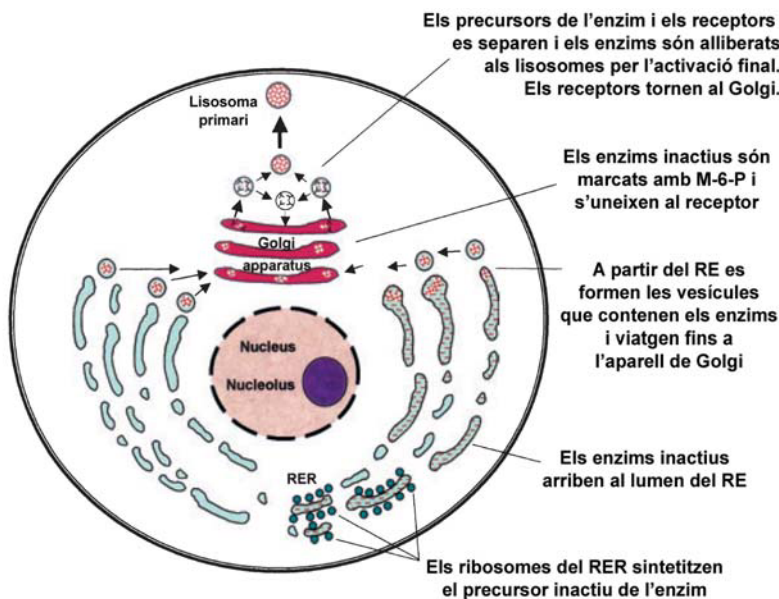


Figura 1.4. Procés de síntesi dels enzims lisosòmics (figura de Vellodi, 2005). En la figura s'expliquen els diferents passos de la síntesi.

No tots els enzims lisosòmics requereixen aquest marcatge de M6P. Per exemple, la glucocerebrosidasa, que està associada a la membrana lisosòmica, no adquireix aquesta M6P, tot i que és marcada per N-glicosilació per un mecanisme desconegut encara (Vellodi, 2005).

La presència de proteïnes transmembrana amb dominis intralisosòmics altament glicosilats protegeixen a la membrana lisosòmica de l'auto-digestió (Peters i von Figura, 1994). De totes maneres aquestes hidrolases no poden actuar fora del lisosoma degut:

- ☛ al seu pH òptim, que és molt àcid: la regulació d'aquest pH és essencial sobretot per l'activació de les hidrolases lisosòmiques, que tenen el seu pH òptim al voltant del 4.5.
- ☛ a que moltes són activades dins el lisosoma, per modificacions proteolítiques o perquè necessiten l'associació a uns cofactors lisosòmics, per l'òptima activitat hidrolítica (Sandhoff i Kolter, 2003).
- ☛ a que les hidrolases sintetitzades *de novo* o les extracel·lulars són transportades molt eficientment al lisosoma (Kornfeld i Mellman, 1989).

El lisosoma conté una gran diversitat d'enzims capaços de digerir molècules molt diferents. Conté unes 60 hidrolases i una dotzena de proteïnes accessories (Sandhoff i Kolter, 2003). Les quantitats i els tipus d'enzims que contenen varien segons els tipus cel·lulars i el seu estat fisiològic.

La degradació lisosòmica és crítica per molts processos fisiològics, com són el recanvi de proteïnes cel·lulars, la destrucció de proteïnes anormals, la regulació de receptors de membrana, l'alliberament de nutrients endocitats i el processament d'antigens.

Però els lisosomes estan implicats en altres funcions, com la coagulació de la sang (McNicol i Israels, 1999), el remodelatge de l'òs (Baron i col., 1985), la regulació de factors de creixement i hormones (Katzmann i col., 2002). Tot això fa que els lisosomes estiguin presents en diferents quantitats en diferents teixits i en diferents tipus cel·lulars.

La importància fisiològica dels lisosomes i els orgànuls relacionats es demostra per la varietat de malalties que s'han descrit per defectes en la seva biogènesi i funció (Dell'Angelica i col., 2000).

1.1. MALALTIES D'ACÚMUL LISOSÒMIC (LSD)

El concepte de malaltia d'acúmul lisosòmic (LSD, '*lisosòmic storage disease*') va ser desenvolupat per Hers (1965) basant-se en la identificació de de Duve dels lisosomes i la seva funció fisiològica.

Existeixen més de 40 malalties hereditàries degudes a defectes fisiològics del lisosoma (Neufeld, 1991). Algunes impliquen proteïnes solubles i altres impliquen proteïnes de membrana. Moltes d'aquestes malalties són degudes a la deficiència d'un enzim lisosòmic específic donant com a resultat l'acumulació lisosòmica d'algun component natural. Altres són degudes al dèficit d'algun activador, del transport insuficient de productes hidrolítics a través de la membrana lisosòmica, de defectes en proteïnes implicades en la biogènesi del lisosoma o en modificacions post-transcripcionals dels enzims lisosòmics. En la **figura 1.5** podem veure un esquema dels diferents nivells on es pot trobar la causa de la malaltia.

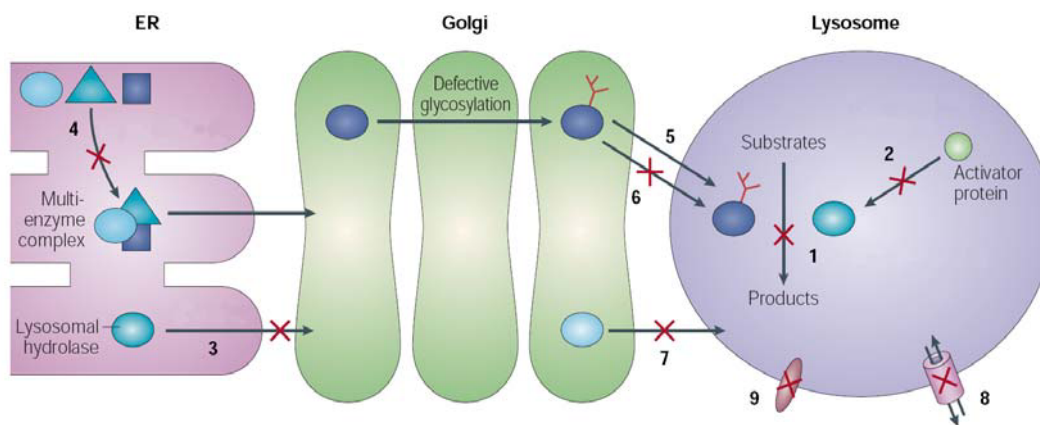


Figura 1.5. Bases bioquímiques de les malalties d'acumulació lisosòmica. La causa de la malaltia pot ser per què l'enzim té una activitat reduïda en els lisosomes per degradar el substrat (1), o perquè l'enzim requereix d'una proteïna activadora que és deficiente (2). També pot ser que la hidrolasa no pugui arribar al lisosoma per un problema de malplegament (3) o perquè necessiti acomplexar-se amb altres per sortir del reticle (4). En l'aparell de Golgi també poden haver problemes de glicosilació, que redueixen la capacitat hidrolítica de l'enzim (5) o que si no es marca amb manosa-6-fosfat no pugui arribar al lisosoma (6) o problemes de transport del Golgi al lisosoma (7). Les LSD també poden estar causades per defectes en proteïnes de membrana, tant transportadors (8) com altres proteïnes reguladores (9). Figura modificada de Futerman i van Meer (2004).

Tenint en compte que s'han descrit unes 60 hidrolases lisosòmics es podria esperar una malaltia per cada proteïna, però per a algunes no s'ha trobat una malaltia associada. Per exemple, no s'ha trobat cap malaltia associada a la ATPasa responsable del manteniment del pH àcid del lisosoma (Mancini i col., 2000), que faria que no poguessin actuar les hidrolases i per tant que no pogués ser funcional el lisosoma. Però un defecte en aquesta ATPasa segurament seria letal a estadis primerencs del desenvolupament.

Les malalties d'acumulació lisosòmic són normalment monogèniques i poc freqüents, tot i que en conjunt presenten una incidència global del grup de 1:5000-1:10000 naixements (Aerts i col., 2003). En determinades poblacions hi ha malalties més freqüents que en la població general degut a processos de deriva gènica i efecte fundador, com passa amb la malaltia de Gaucher en els jueus asquenasis.

Una característica comuna de les malalties d'acumulació lisosòmic és que el material acumulat ho fa només en un determinats tipus cel·lulars, depenent de la capacitat residual de la via metabòlica deficiente.

Les LSDs es classifiquen segons la proteïna o enzim deficient o segons el tipus de material acumulat. En la **Taula 1.1** s'inclouen la majoria de LSDs.

Taula 1.1. Malalties d'acumul lisosòmic (modificada de Futerman i van Meer, 2004).

	Proteïna deficient	Material acumulat majoritari
Esfingolipidosis		
Fabry	α -Galactosidasa A	Globotriasilceramida
Lipogranulomatosi de Farber	Ceramidasa	Ceramida
Gaucher	β -Glucosidasa Saposina C	Glucosilceramida Glucosilceramida
Krabbe	Galactocerebròsid β -Galactosidasa	Galactosilceramida
Leucodistròfia metacromàtica	Arisulfatasa A Saposina B	Glicolípidis sulfatats Glicolípidis sulfatats i Gangliòsid GM1
Niemann-Pick A i B	Esfingomielinasa	Esfingomiolina
Deficiència de l'activador d'esfingolípidis	Proteïna activadora d'esfingolípidis (SAP)	Glicolípidis
Gangliosidosi GM1	β -Galactosidasa	Gangliòsid GM1
Gangliosidosi GM2 (Tay-Sachs)	β -Hexosaminidasa A	Gangliòsid GM2
Gangliosidosi GM2 (Sandhoff)	β -Hexosaminidasa A i B	Gangliòsid GM2
Gangliosidosi GM2	Proteïna activadora de GM2	Gangliòsid GM2
Mucopolisacàridosis (MPS)		
MPS I (Hurler, Scheie)	α -iduronidasa	Dermatà sulfat i Heparà sulfat
MPS II (Hunter)	Iduronat-2-sulfatasa	Dermatà sulfat i Heparà sulfat
MPS IIIA (Sanfilippo tipus A)	Heparà N-sulfatasa (sulfamidasa)	Heparà sulfat
MPS IIIB (Sanfilippo tipus B)	N-Acetil- α -glucosaminidasa	Heparà sulfat
MPS IIIC (Sanfilippo tipus C)	Acetil-CoA: α -glucosamida N-acetiltransferasa	Heparà sulfat
MPS IIID (Sanfilippo tipus D)	N-Acetilglucosamina-6-sulfatasa	Heparà sulfat
MPS IVA (Morquio A)	N-Acetilgalactosamina-6-sulfat-sulfatasa	Queratà sulfat i condroití-6-sulfat
MPS IVB (Morquio B)	β -Galactosidasa	Queratà sulfat
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	Arisulfatasa B	Dermatà sulfat
MPS VII (Sly)	β -Glucuronidasa	Heparà sulfat, Dermatà sulfat i condroití-4 i -6-sulfats
MPS IX	Hialuronidasa	Hialuronà
Oligosacàridosis i glicoproteïnosis		
Aspartilglucosaminuria	Aspartilglucosaminidasa	Aspartilglucosamina
Fucosidosi	α -Fucosidasa	Fucosids i glicolípidis
α -Manosidosi	α -Manosidasa	Oligosacàrids que contenen manosa
β -Manosidosi	β -Manosidasa	Man(β 1 \rightarrow 4)GlcNAc
Pompe	α -Glucosidasa	Glicogen
Sialidosi	Sialidasa	Sialiloligosacàrids i sialilglicopèptids
Schindler	α -N-Acetilgalactosaminidasa	Glico-conjugats que contenen α -N-Acetilgalactosaminil
Lipidosis		
Wolman i malaltia d'acumul de colesterol	Lipasa àcida	Esters de colesterol i triglicèrids
Malalties causades per defectes en proteïnes de membrana		
Cistinosis	Cistinosina	Cistina
Malaltia de Danon	LAMP2	Restes citoplasmàtiques i glicogen
Malaltia de Salla i malaltia infantil d'acumul d'àcid sàlic	Sialina	Àcid sàlic
Mucopolipidosi (ML) IV	Mucolipina-1	Lípids i mucopolisacàrids àcids
Niemann-Pick C (NPC)	NPC1 i 2	Colesterol i esfingolípidis
Ceroide Lipofuscinosi neuronal		
NCL1	Palmitoilproteïnatioesterasa	Tioèsters lipidats
NCL2	Tripeptidilpeptidasa I	Subunitat C de l'ATP sintasa mitocondrial
NCL3(Batten)	Transportador d'arginina	Subunitat C de l'ATP sintasa mitocondrial
Altres		
Galactosialidosi	Catepsina A	Sialiloligosacàrids
ML II i ML III	UDP-N-acetilglucosamina:enzim lisosòmic N-acetilglucosaminil-1-fosfotransferasa	Oligosacàrids, mucopolisacàrids i lípids
Deficiència múltiple de sulfatases	SUMF1	sulfatids
Picnodisostosi	Catepsina K	Proteïnes de l'òs, incloent fibres de col·làgen

El grup més prevalent de les malalties d'acumul lisosòmic són les esfingolipidosis, que es caracteritzen per acumular glicoesfingolípid, i d'aquestes la malaltia de Gaucher és la més freqüent.

2. ELS GLICOESFINGOLÍPIDS

A l'any 1884 el químic Johann Ludwig Wilhelm Thudicum (1829-1901) va descriure per primera vegada una nova classe de lípids que va anomenar esfingolípids (del grec 'sphingos'), per la seva natura enigmàtica que recordava a l'enigma de l'Esfinx. Des de llavors s'ha intentat explicar la seva funció biològica. Degut al ràpid recanvi dels esfingolípids, ha estat difícil esbrinar les proteïnes que interactuen específicament amb ells.

2.1. ESTRUCTURA I FUNCIO DELS GLICOESFINGOLÍPIDS

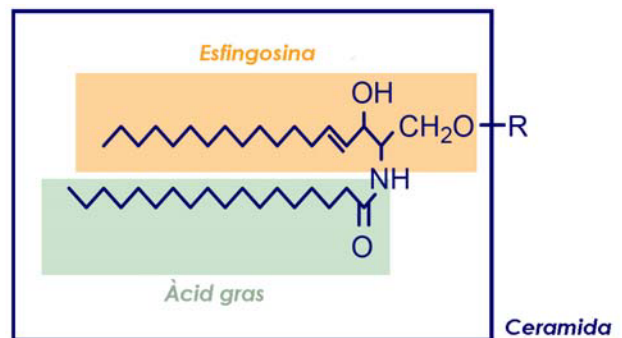
Els esfingolípids són lípids complexos que es troben en cèl·lules de mamífers i estan localitzats majoritàriament en la membrana plasmàtica. Tots ells contenen una esfingosina lligada a un àcid gras per un enllaç amida, formant la ceramida (**Figura 1.6**). En afegir una fosfatidilcolina o un sucre a la ceramida es forma l'esfingomielina o els glicoesfingolípids (GSLs) respectivament.

La ceramida es sintetitza *de novo* en el reticle endoplasmàtic o per degradació dels altres esfingolípids. Aquests es degraden per glicosidases (degradació dels glicoesfingolípids) o per esfingomielinases (degradació de l'esfingomielina). Aquestes hidrolisis es donen en els compartiments àcids de la cèl·lula, com són els lisosomes.

Els esfingolípids en general es troben a les membranes de diferents orgànuls cel·lulars. En particular, en el reticle endoplasmàtic (on es dona la síntesi *de novo* de la ceramida), en l'aparell de Golgi (on la ceramida es converteix en glicoesfingolípids) i en la membrana plasmàtica (on s'integra el metabolisme de la ceramida amb altre vies metabòliques d'altres lípids).

Les variacions en el tipus, nombre i modificacions dels sucres que s'incorporen a la ceramida donen la gran varietat de glicoesfingolípids (GSLs) que existeixen (Kolter i col., 2002).

La quantitat i la composició de GSLs en la cèl·lula varien dependent del tipus cel·lular. A més, els GSLs presenten un patró específic en la membrana cel·lular que canvia segons l'estat de diferenciació de la cèl·lula, el creixement cel·lular, transformació viral, ontogènesi i



R	Esfingolípids
H	Ceramida
Fosfatidilcolina	Esfingomielina
Sucre(s)	Glicoesfingolípids

Figura 1.6. Estructura dels esfingolípids (adaptada de Malagarie-Cazenave i col., 2002).

oncogènesi (Hakomori, 1981). La presència específica dels GSLs per tipus cel·lular i els patrons estables que presenten, indiquen la rigurosa regulació de la seva biosíntesi i del seu transport intracel·lular (van Meer i Lisman, 2002).

En la membrana plasmàtica, els GSLs disposen la part lipídica dins la membrana (la ceramida seria l'ancoratge a la membrana) i la glucídica a la part externa. El fet que la porció lipídica estigui intercalada en la membrana li dóna rigidesa a aquesta i la part glucídica externa protegeix a la cèl·lula d'atacs químics i mecànics (Watts, 2003).

En la membrana plasmàtica els GSLs estan formant uns microdominis, que s'anomenen 'caveolae' i 'rafts' (Simons i Ikonen, 1997). Aquests microdominis es troben enriquits en

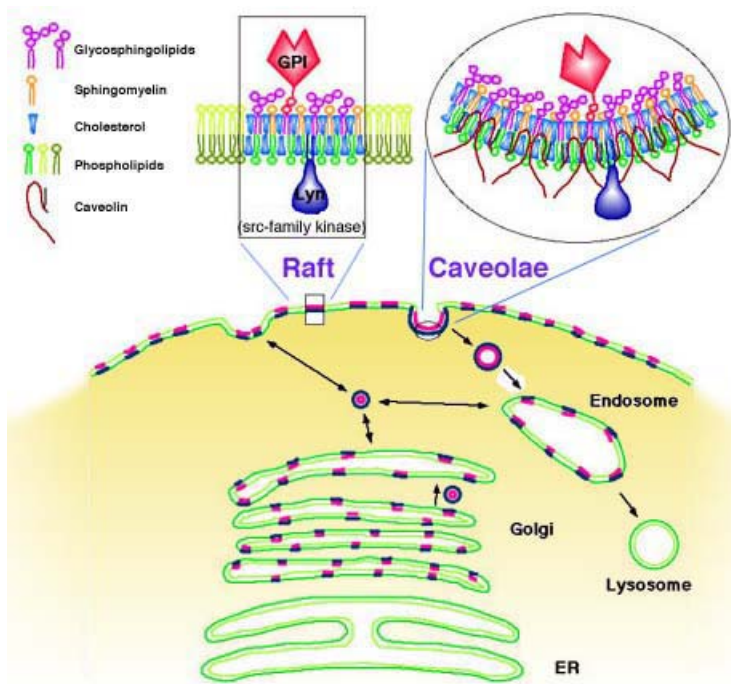


Figura 1.7. Organització dels glicoesfingolípidos en la membrana plasmàtica (adaptada de H. Higashi, Glycoword, <http://www.gak.co.jp/FCCA/glycoword/wordE.html>)

components de la membrana implicats en senyalització, com són altres esfingolípidos i colesterol (**Figura 1.7**). S'ha vist que en aquests microdominis s'inicien processos de transducció de senyal (Kasahara i col., 1997).

Els GSLs estan implicats en processos de transducció de senyal (Simons i Ikonen, 1997) i apoptosi (Merrill i col., 1997), però també influeixen en altres processos fisiològics, com són l'embriogènesi, la diferenciació i l'adhesió cel·lular (Zeller i Marchase, 1992).

Se sap que són també un lloc d'unió de toxines (Smith i col.,

2004), virus (Markwell i col., 1981) i bacteris (Karlsson, 1995). També està descrit que interactuen amb receptors i enzims de membrana (Schnaar, 1991) (**Figura 1.8**).

Els esfingolípidos tenen també un paper important en la barrera implicada en el manteniment de la permeabilitat de la pell. Aquesta barrera està constituïda per una matriu lipídica que conté colesterol, àcids grassos i ceramida. Aquesta ceramida procedeix bàsicament de la degradació de glucosilceramida (Landmann, 1988). Si aquesta degradació és deficient apareixen problemes de permeabilitat de la pell (Yamamoto i col., 1990).

Només en uns pocs casos és evident el seu paper fisiològic. Per exemple, se sap que els GSLs són necessaris per l'embriogènesi d'organismes multicel·lulars. El ratolí knockout per la glucosilceramida sintasa (GCS, que catalitza el pas de ceramida a glucosilceramida) mor el dia 6.5 d'embriogènesi (Yamashita i col., 1999). Aquest efecte pot ser degut a un control positiu de la GCS en el creixement cel·lular o per l'acumulació tòxica d'alguns esfingolípids. Però d'altra banda, els GSLs no són necessaris per la supervivència de les cèl·lules en cultiu.

Tot i que, com s'ha posat de manifest, es coneixen diferents processos on estan implicats els esfingolípids en general, la funció particular de cada esfingolípids concret es molt poc coneguda. La conservació evolutiva dels glicoesfingolípids i els greus fenotips que presenten els models animals amb defectes en la seva via de biosíntesi indiquen la importància biològica que tenen.

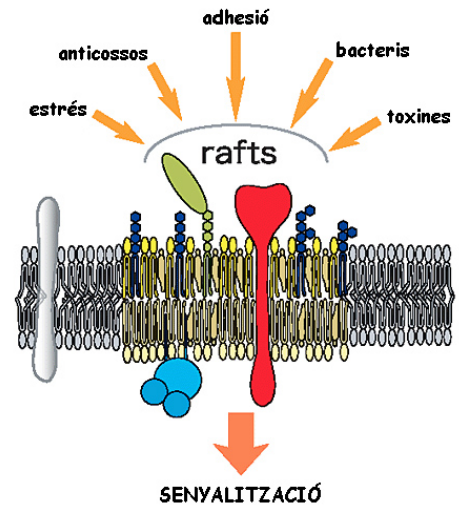


Figura 1.8. Funcions biològiques en les que estan implicades els GSLs en la membrana (GlycoWord, <http://www.gak.co.jp/FCCA/glycoword/wordE.html>).

2.2. METABOLISME DELS GLICOESFINGOLÍPIDS

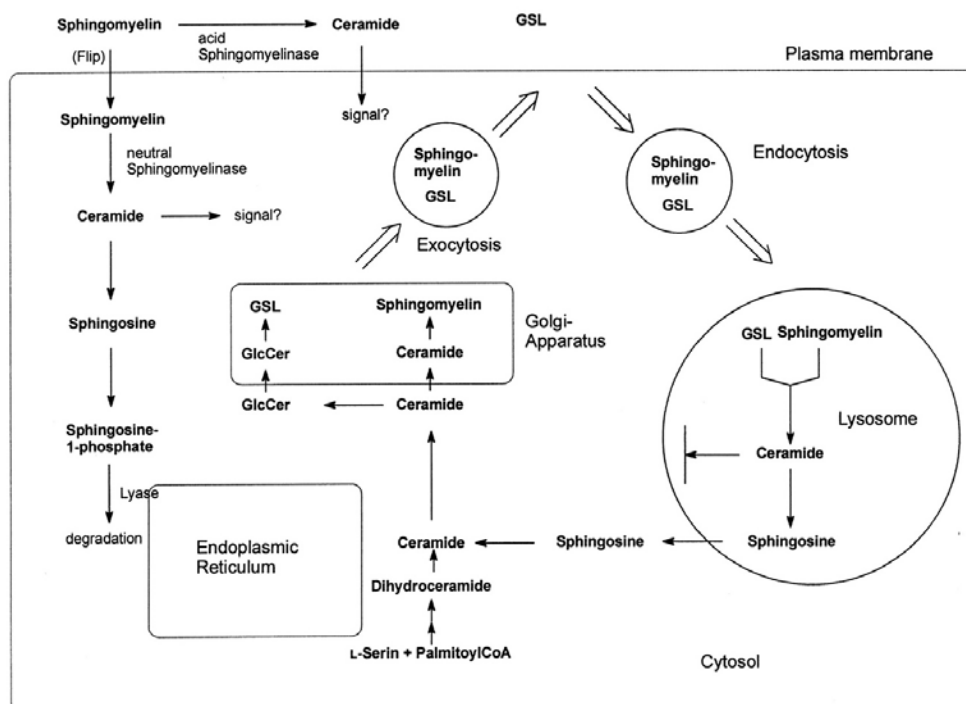


Figura 1.9. Localització cel·lular de la biosíntesi i degradació dels GSLs (figura Huwiler i col., 2000).

Les vies metabòliques dels GSLs impliquen enzims dels compartiments cel·lulars del sistema endocitosi/exocitosi. Aquest metabolisme depèn dels enzims implicats i els seus mecanismes de regulació, del fluxe de les rutes d'endocitosi/exocitosi, de l'estat proliferatiu de la cèl·lula i d'estímuls externs a aquesta que també regulen la degradació de GSLs i la formació de segons missatgers derivats d'esfingosina. A la **figura 1.9** podem veure la localització cel·lular dels diferents passos en les vies de síntesi i degradació dels GSLs.

La biosíntesi dels glicoesfingolípidos es dona en les membranes intracel·lulars (reticle endoplasmàtic i aparell de Golgi) i és catalitzada per enzims de membrana. El transport dels compostos produïts *de novo* cap a la membrana plasmàtica es dur a terme per vesícules que segueixen el fluxe d'exocitosi. La degradació dels GSLs s'inicia en la via d'endocitosi amb vesícules que van als compartiments àcids de la cèl·lula, com són endosomes tardans i lisosomes. Aquestes reaccions de degradació són catalitzades per enzims hidrolítics lisosomals, bàsicament solubles, ajudats per proteïnes activadores.

El metabolisme dels GSLs, tant la síntesi com la degradació, té una funció important en la regulació dels nivells de ceramida. La ceramida és el substrat per la formació dels glicoesfingolípidos, concretament és el substrat de l'enzim glucosilceramida sintasa per formar glucosilceramida, i el producte de la seva degradació, mitjançant la glucocerebrosidasa. L'equilibri entre aquestes dues rutes, la de síntesi i de degradació de GSLs, influeix directament en els nivells de ceramida com es veu en la **figura 1.10**.

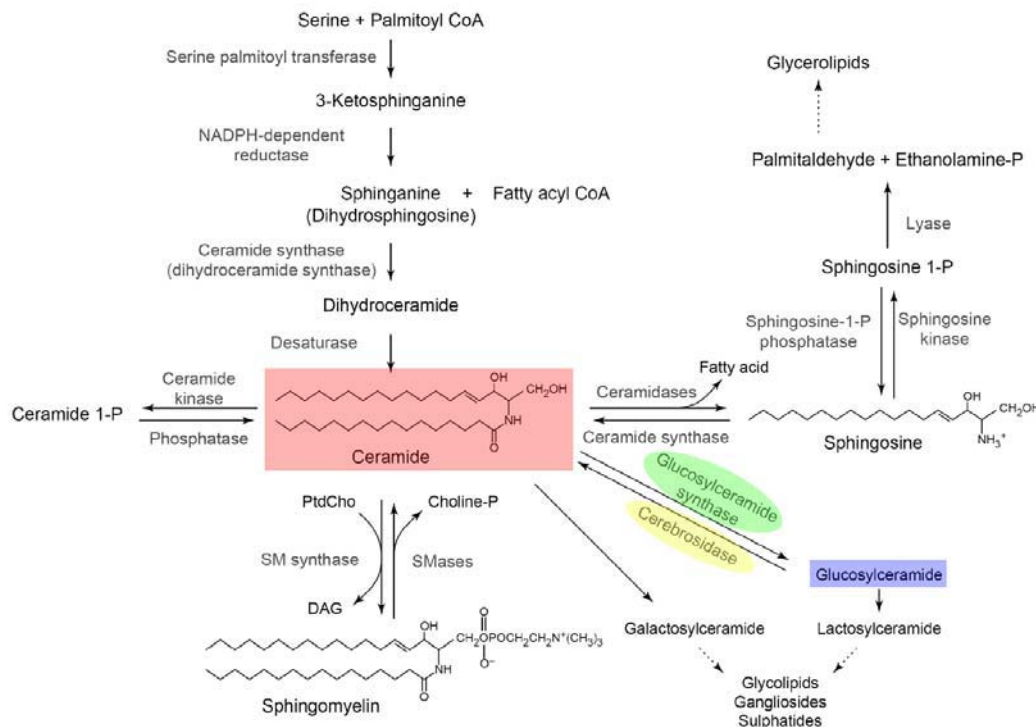


Figura 1.10. Relació entre la síntesi i la degradació dels glicoesfingolípidos amb els nivells de ceramida (figura de Hannun i Luberto, 2000).

2.2.1.1. LA GLUCOSILCERAMIDA SINTASA (GCS)

La Glucosilceramida sintasa (GCS) és un enzim del metabolisme intracel·lular de la ceramida, que transfereix una glucosa a la ceramida, utilitzant UDP-glucosa, per formar glucosilceramida (GlcCer), que és el principal component de la majoria dels glicoesfingolípid.

Segons l'anàlisi de seqüència de la GCS és una proteïna de membrana de tipus III amb una regió N-terminal ancorada a membrana i la resta citoplasmàtica, cosa que és consistent amb els estudis bioquímics. Aquest enzim està situat a la part citosòlica de la membrana de l'aparell de Golgi (Coste i col., 1986).

L'estructura de l'enzim és diferent a la resta de glicosiltransferases implicades en la síntesi de GSLs, que estan orientades al lumen del Golgi. L'orientació de la GCS indica que la GlcCer s'ha de translocar al lumen del Golgi mitjançant una flipasa (Burger i col., 1996; Lannert i col., 1994), tot i que aquesta flipasa no s'ha trobat, per continuar la glucosilació. En la **figura 1.13** es mostra l'esquema de la síntesi de GlcCer mitjançant la GCS i la intervenció de la hipotètica flipasa per a que pugui actuar sobre ella la lactosilceramida sintasa per formar lactosilceramida (LacCer).

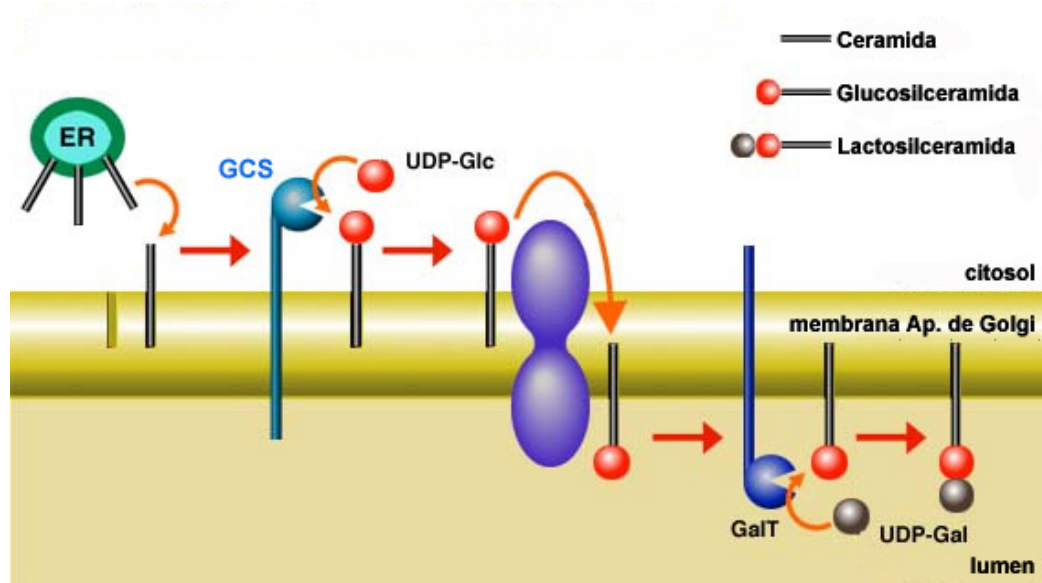


Figura 1.13. Formació de GlcCer a partir de Cer, catalitzada per GCS. Per acció d'una flipasa la GlcCer es transloca al lumen del Golgi, on hi actua la lactosilceramida sintasa per formar LacCer (figura de GlycoWord, <http://www.gak.co.jp/FCCA/glycoword/wordE.html>).

La GCS està formada per monòmers de 38 kDa que s'organitzen formant dimers (Marks i col., 1999). El lloc actiu de l'enzim està a la cara citosòlica de la membrana de l'aparell de Golgi.

S'han descrit diferents compostos, intracel·lulars i extracel·lulars que actuen regulant l'activitat i l'expressió de la GCS. Per exemple com a reguladors positius endògens s'han trobat la testosterona i l'augment intracel·lular de la ceramida.

La funció de la GCS és la glucosilació de ceramida per la síntesi de la GlcCer i dels glicoesfingolípid. Però a més d'aquesta funció, un paper important d'aquest enzim és la

disminució de la ceramida intracel·lular, que s'ha descrit com un factor activador de l'apoptosi cel·lular. De fet l'activitat de la GCS augmenta en augmentar les concentracions de ceramida. La localització citosòlica de la GCS és un avantatge per al control dels nivells citosòlics de la ceramida.

Per conèixer el paper dels GSLs és molt important tenir cèl·lules mutants per la glicosilació. Nozue i col., (1988) van generar una línia cel·lular deficient de GCS. Aquesta línia era una línia de melanoma de ratolí GM-95. Van veure que les cèl·lules deficientes per la GCS tenien una manca de GSLs. Tot i això les cèl·lules no necessitaven GSLs exògens per créixer, cosa que implica que no són essencials per al creixement i la supervivència de les cèl·lules animals. Però que els GSLs no siguin essencials *in vitro* no vol dir que no ho siguin *in vivo*.

El tractament d'animals amb inhibidors de la GCS permeten supervivència de l'animal, tant en ratolí (Platt i col., 1997b) com en embrions de peix medaka (Fenderson i col., 1992).

El model animal amb deficiència de GCS demostra que es necessari per al desenvolupament embrionari, ja que el ratolí mutant per GCS mor en la gastrulació per apoptosi (Yamashita i col., 1999; Yamashita i col., 2002). Però en cèl·lules en cultiu no s'observa ni increment d'apoptosi ni mort cel·lular (Yamashita i col., 1999).

2.2.2. DEGRADACIÓ DELS GLICOESFINGOLÍPIDS

El catabolisme dels GSLs consisteix en l'eliminació seqüencial dels residus sucre, començant pels GSLs més complexos fins arribar a la glucosilceramida, la ceramida i al final l'esfingosina.

La degradació constitutiva dels glicoesfingolípid es dona en els compartiments àcids de la cèl·lula, com són els endosomes tardans i lisosomes. Aquí les estructures de membrana són digerides per hidrolases solubles ajudades per proteïnes activadores també solubles. Els fragments de la membrana que contenen GSLs per degradar són endocitats i transportats pels compartiments endosomals fins arribar al lisosoma, on passen a ser estructures de membrana lisosomal.

Un cop als lisosomes les diferents reaccions de degradació són catalitzades per hidrolases que tenen un pH àcid òptim. Molts d'aquests enzims necessiten cofactors, com les saposines (SAPs, Sphingolípíd Activator Protein), per a catalitzar les seves hidròlisis.

Les hidrolases tallen els sucres seqüencialment fins obtenir ceramida, que s'acaba degradant a esfingosina per una ceramidasa àcida. Els fragments tallats, tant els sucres com els àcids grassos, poden tornar a reincorporar-se a la via de biosíntesi, reciclant-se per formar nous GSLs, o continuar degradant-se.

Els intermediaris lipídics que es van formant durant el procés de degradació queden atrapats en els compartiments lisosomals i no participen en el procés de senyalització de la cèl·lula.

Si algun d'aquests enzims, o dels seus activadors (les SAPs), són deficients el substrat corresponent s'acumula en el lisosoma. En la **figura 1.15** es pot veure la via de degradació dels glicoesfingolípid amb les malalties associades, anomenades esfingolipidosis.

2.3. MALALTIES ASSOCIADES AL METABOLISME DELS GLICOESFINGOLÍPIDS

2.3.1. MALALTIES ASSOCIADES A LA SÍNTESI DE GLICOESFINGOLÍPIDS

Fins al moment només s'ha descrit una malaltia associada a la síntesi de GSLs. Aquesta malaltia és una epilèpsia infantil causada per una deficiència en la sintasa GM3 (Simpson i col., 2004), que s'ha trobat només en una família.

Aquest enzim catalitza la síntesi del gangliòsid GM3 a partir de lactosilceramida. En aquesta malaltia es veu afectada la síntesi de les sèries de gangliòsids a i b (**Figura 1.14**).

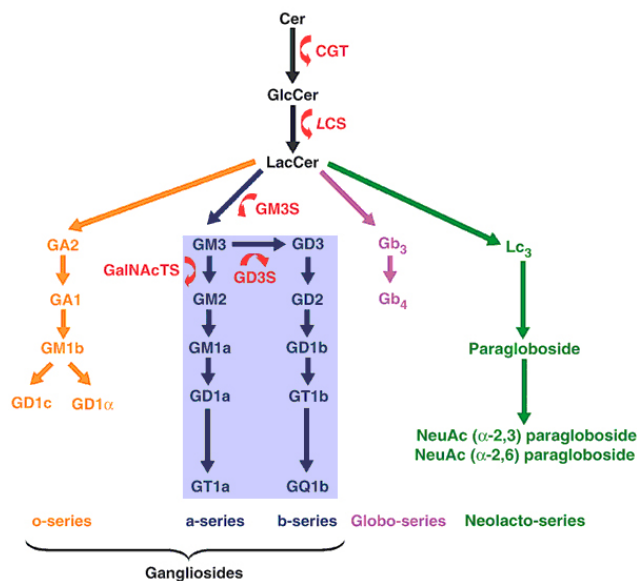


Figura 1.14. Ruta de síntesi dels GSLs. En blau es marquen els gangliòsids que no es poden sintetitzar en absència de la sintasa GM3 (Simpson i col., 2004).

2.3.2. MALALTIES ASSOCIADES A LA DEGRADACIÓ DELS GLICOESFINGOLÍPIDS: LES ESFINGOLIPIDOSIS

Les esfingolipidosi són el conjunt de malalties que es caracteritzen per tenir errors innats del metabolisme on és deficient la degradació d'algun glicoesfingolípíd (Watts, 2003).

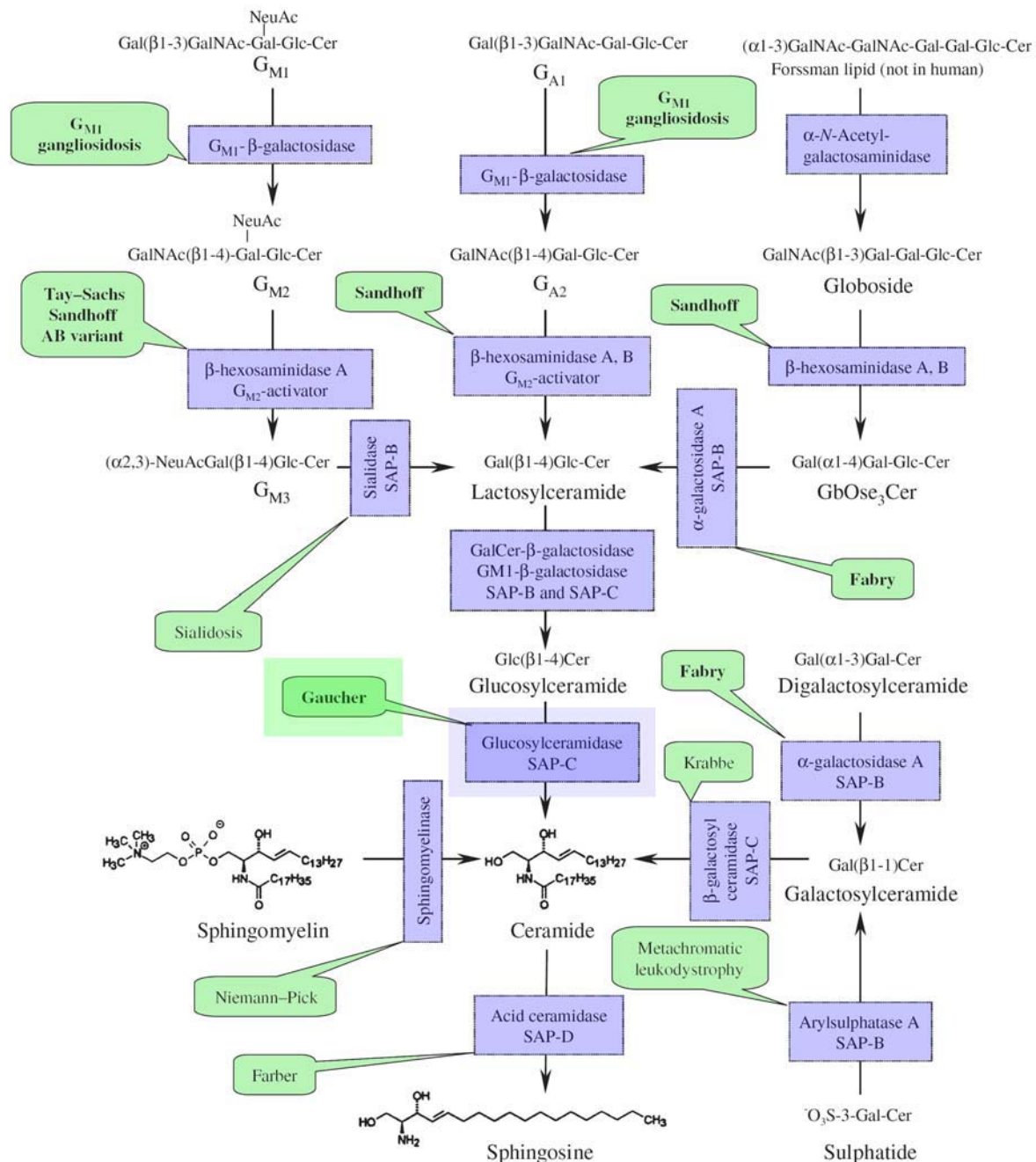


Figura 1.15. Catabolisme dels glicoesfingolípids i malalties associades (figura adaptada de Jeyakumar i col., 2002). En color verd es marquen les esfingolipidosi i en blau l'enzim i, si en tenen, l'activador, que són deficientes en cada malaltia.

La freqüència d'aquestes malalties individualment no és molt elevada, però la conjunta és de 1:18000 naixements. Com que els GSLs són abundants en el sistema nerviós central, el cervell és un dels òrgans afectats en aquestes malalties, que són una de les majors causes de neurodegeneració en pediatria (Meikle i col., 1999). La malaltia de Gaucher de tipus I és la esfingolipidosi més freqüent i es troba en elevada freqüència en jueus asquenasites (Beutler i Grabowski, 2001).

Les malalties són el resultat de la deficiència d'un enzim específic, que fa que s'acumuli un GSL derivat de la GlcCer (**figura I.15**). La majoria són malalties autosòmiques recessives, excepte la malaltia de Fabry que és lligada al cromosoma X (Desnick i col., 1979). També n'hi ha causades per l'acúmul de GSLs derivats de GalCer, com són la malaltia de Krabbe i la Leucodistròfia Metacromàtica (Kaye, 2001).

El nivell d'activitat de l'enzim en els individus afectats correspon en certes malalties amb l'edat d'aparició de la malaltia, la severitat i l'esperança de vida (Conzelmann i Sandhoff, 1983). La malaltia de tipus infantil apareix quan la mutació en el gen responsable produeix nivells molt baixos o nuls d'activitat residual de l'enzim. El tipus juvenil és degut a mutacions que donen una activitat residual major que en el cas anterior, enlentint el ritme d'acúmul, retrassant l'aparició dels símptomes i la progressió de la malaltia. La forma crònica o adulta pot desenvolupar els símptomes en qualsevol moment, des de l'infantesa fins a l'edat adulta i té nivells d'activitat d'enzim apreciables (Rapola, 1994). En aquest tipus de la malaltia el ritme d'acúmul és més lent, és retrassa la presentació de la clínica i s'allarga el procés de la malaltia. És difícil d'establir la freqüència del tipus adult de les malalties degut a que la majoria dels individus no es diagnostiquen bé i es confonen els símptomes amb la presentació clínica d'altres desordres neurològics.

El tractament d'aquestes malalties està enfocat a augmentar els nivells d'enzim per compensar el defecte enzimàtic. Això implica estratègies com són l'administració intravenosa de l'enzim (ERT, '*enzyme replacement therapy*'), transplantament del moll de l'òs (BMT, '*bone marrow transplantation*'), teràpia amb cèl·lules mare i teràpia gènica. L'estratègia d'ERT ha estat utilitzada amb èxit com a tractament de la malaltia de Gaucher (Barton i col., 1990) i de Fabry (Brady i col., 2001; Schiffmann i col., 2001). Els resultats de BMT són variables i depèn de tenir bons donants de medul·la (Rindgen i col., 1995). La teràpia gènica (Barranger i Novelli, 2001) i la teràpia amb cèl·lules mare estan encara en fase experimental (Lynch i col., 1999). Una altra aproximació és la teràpia de reducció de substrat (SRT, '*substrate reduction therapy*'), que pretén compensar la manca de degradació dels GSLs inhibint la biosíntesi (Dwek i col., 2002).

3. LA MALALTIA DE GAUCHER

La malaltia de Gaucher és un error innat del metabolisme dels glicoesfingolípids, heretat com una malaltia autosòmica recessiva i degut a la deficiència de la hidrolasa lisosòmica β -glucosidasa àcida o glucocerebrosidasa (EC 3.2.1.45). La deficiència de l'enzim produeix un acúmulo del seu substrat principal, la glucosilceramida o glucocerebròsid, principalment en els fagòcits mononuclears.

3.1. FITES IMPORTANTS EN LA HISTÒRIA DE LA MALALTIA

La malaltia de Gaucher va ser descrita per primera vegada l'any 1882 per Phillippe Charles Ernest Gaucher, que va presentar el cas d'una pacient amb hepatoesplenomegàlia i símptomes que semblaven leucèmia. Gaucher va pensar que podia ser una forma benigna de leucèmia. La primera vegada que es va fer servir el nom de malaltia de Gaucher va ser Brill l'any 1905.

L'any 1924, Epstein va descriure la presència d'un lípid en les cèl·lules de pacients amb aquesta malaltia i la va classificar com a malaltia d'acúmulo lipídica, però va identificar erròneament el lípid com a galactocerebròsid. L'any 1934 Aghion va identificar correctament el material acumulat com a glucocerebròsid.

El primer que va descriure la transmissió genètica de la malaltia i va suggerir que era una malaltia autosòmica recessiva va ser Groen l'any 1948. L'any 1965, Brady i col., van definir la deficiència enzimàtica com un error en la síntesi de la glucocerebrosidasa. Tres anys més tard, Weinreb va descriure la localització lisosòmica de l'acúmulo de glucocerebròsid (Weinreb i col., 1968).

L'any 1971, O'Brien identifica la presència d'un co-activador de la glucocerebrosidasa, que més tard s'anomenaria saposina C.

L'any 1977 s'aconsegueix purificar glucocerebrosidasa de placenta (Furbish i col., 1977). A partir d'aquell moment es va començar a estudiar la possibilitat d'administrar aquesta glucocerebrosidasa com a teràpia, el que seria la teràpia de reemplaçament enzimàtic.

El mateix any, Burns utilitzant marcadors de superfície demostra que les cèl·lules d'emmagatzematge en la malaltia de Gaucher són del llinatge dels macròfags (Burns i col., 1977). L'any següent Stahl i Sly demostren el reconeixement i la captació de glicoproteïnes per receptors de manosa en la superfície dels macròfags (Sly i col., 1978; Stahl i col., 1978).

L'any 1982 Nilsson i Svennerholm troben en teixit cerebral de pacients de la malaltia de Gaucher que tenen acumulats diferents esfingolípid, proposant que és la causa de la neurotoxicitat.

L'any 1985 es clona el cDNA del gen *GBA* (Sorge i col., 1985) i l'any 1987 s'identifica la primera mutació en aquest gen causant de la malaltia de Gaucher, la mutació L444P (Tsuji i col., 1987). Pocs anys després es caracteritzen el gen *GBA* i el pseudogèn (Reiner i col., 1988; Horowitz i col., 1989).

A partir dels anys 90 s'han fet molts avenços en la teràpia de la malaltia. L'any 1992 es dóna la llicència per utilitzar alglucerasa (glucocerebrosidasa de placenta) per a teràpia i l'any següent es dóna per l'imiglucerasa (glucocerebrosidasa recombinant).

Durant aquests anys comencen les primeres aproximacions a la teràpia gènica amb els primers assajos clínics, tot i que encara no s'ha pogut aplicar amb èxit.

L'any 1998 comencen els primers assajos clínics per utilitzar la teràpia de reducció de substrat, utilitzant inhibidors de la GCS. L'any 2002 es dóna llicència per utilitzar un d'aquests inhibidors, el NB-DNJ (*N*-butyldeoxynojirimycin), com a teràpia de la malaltia de Gaucher.

3.2. PREVALENÇA DE LA MALALTIA

La malaltia de Gaucher és una malaltia poc freqüent, especialment prevalent en la població de jueus asquenases, terme hebreu que vol dir "alemany" amb el que es designa els jueus que emigraren cap a Polònia, Rússia, Lituània i Ucraïna. L'any 1973, Fried va estimar la incidència de la malaltia en la població de jueus asquenases d'Israel en 1:10000. Però el fet que molts pacients de Gaucher no arriben a ser diagnosticats, feia pensar que la incidència seria major de l'estimada.

Posteriorment, a partir d'anàlisis genètics es van establir estimacions més robustes de la freqüència de la malaltia. Així, per exemple, en un estudi realitzat per Beutler i col. (1993) de 2121 individus jueus asquenases normals 121 eren portadors de la mutació N370S i 6 eren homozigots per la mateixa mutació, donant una freqüència gènica de 0.0231. Segons un altre estudi de Zimran i col. (1991) de 2305 individus normals 10 eren heterozigots per la mutació 84GG, donant una freqüència de 0.00217. Aquestes freqüències donen una incidència de la malaltia en jueus asquenases de 1 de cada 855 naixements.

Hi ha poques dades sobre la incidència de la malaltia en poblacions no jueves, on de totes maneres, la freqüència és baixa. Tot i així, existeixen estudis de freqüència de la malaltia en diferents països europeus. Per exemple, en població holandesa s'han descrit uns 200 casos (de 15 milions) (Beutler i Grabowski, 2001). Altres països europeus on s'ha descrit la malaltia amb un nombre de pacients considerable són França (Germain i col., 1998), Alemanya (Le Coutre i

col., 1997), República Txeca (Hodanov i col., 1999), Espanya (Cormand i col., 1995) i Portugal (Amaral i col., 1996). En aquestes dues últimes poblacions la mutació més freqüent és la N370S.

S'ha suggerit que l'elevada freqüència de la malaltia de Gaucher en la població de jueus asquenaites, així com la d'altres lipidosi com Niemann-Pick i Tay-Sachs, es podria explicar per deriva gènica o per avantatge dels heterozigots. Així, es proposa que els heterozigots per alguna d'aquestes malalties podien tenir una major resistència a la tuberculosi (Diamond, 1994; Rotter i Diamond, 1987).

3.3. CLÍNICA DE LA MALALTIA

La malaltia de Gaucher (GD) presenta una simptomatologia de tipus sindròmica. Tot i que té una variabilitat fenotípica molt gran, els trets més característics són l'hepato i l'esplenomegalia. Així es classifica en tres tipus clínics basant-se principalment en l'absència (tipus I) o presència (tipus II i III) d'afectació del sistema nerviós central, i l'edat d'aparició de la malaltia.

3.3.1. MALALTIA DE GAUCHER TIPUS I

GD tipus I (OMIM 230800) és la forma més freqüent de les tres. Per definició, els pacients no tenen afectat el sistema nerviós central com a conseqüència de l'acúmul, i tots els símptomes neuronals observats són secundaris a les complicacions sistèmiques de la malaltia. Aquesta forma crònica no neurològica s'ha descrit també com a forma adulta, tot i que alguns símptomes poden aparèixer durant l'infància.

El tipus I és una malaltia d'acúmul multisistèmica, caracteritzada per una gran variabilitat en l'edat d'aparició de la malaltia, les manifestacions clíniques i la progressió de la malaltia. Els símptomes inicials poden aparèixer en el naixement. En canvi, hi ha malalts que es diagnostiquen a la vuitena dècada de vida (Berrebi i col., 1984) o altres són asimptomàtics, i només se'ls detecta fent un estudi familiar o poblacional.

Les manifestacions viscerals s'expliquen per la distribució de les cèl·lules d'acúmul (cèl·lules Gaucher), que són macròfags on s'acumula el substrat no degradat. Aquestes cèl·lules són responsables de l'hepatoesplenomegalia (o malfuncionament del fetge o la melsa), anèmia, trombocitopènia i manifestacions òssies diverses.

L'esplenomegalia és present en el 90% dels pacients i l'hepatomegalia entre el 70-80% dels casos de tipus I. La trombocitopènia és el símptoma hematològic més freqüent, degut a la invasió de la medulla òssia per cèl·lules Gaucher.

La implicació òssia apareix en un 75% dels casos, tot i que les lesions òssies són variables, des de osteopènia a lesions destructives de l'òs.

3.3.2. MALALTIA DE GAUCHER TIPUS II

És la forma més severa de la malaltia que es caracteritza per l'aparició molt prematura i la ràpida progressió de l'afectació neurològica. Aquesta forma, també coneguda com a forma infantil, és molt rara (1:500000 naixements). La majoria dels casos apareixen al voltant dels 6 mesos d'edat. L'afectació neuronal és predominant i normalment sol ser diagnòstica. Els nens amb el tipus II moren durant els 2 primers anys de vida, amb un deteriorament psicomotor greu.

3.3.3. MALALTIA DE GAUCHER TIPUS III

El tipus III és una forma rara (1:100000) que es caracteritza per tenir una aparició més tardana i una afectació neurològica menor que el tipus II. La forma prototípica d'aquest tipus és la que s'ha vist en la regió de Norbotten (Suècia), amb un curs de la malaltia molt sever, amb demència i atàxia (Erikson, 1986). L'afectació visceral és menor.

Una clínica molt particular que s'ha trobat en pacients d'aquest tipus de la malaltia és l'afectació cardiovascular amb esclerosi vascular i oclusió aòrtica severa (Chabás i col., 1995; Bohlega i col., 2000).

3.4. DIAGNÒSTIC DE LA MALALTIA

3.4.1. DIAGNÒSTIC MORFOLÒGIC

Clàssicament el diagnòstic de la malaltia de Gaucher s'ha basat en la detecció específica de les cèl·lules que acumulen el glucocerebròsid, anomenades cèl·lules Gaucher. Però s'han descrit cèl·lules molt similars en altres malalties, que s'han anomenat cèl·lules pseudo-Gaucher. Això ha fet que s'utilitzin altres tècniques bioquímiques i moleculars que són més específiques i menys invasives.

3.4.2. DIAGNÒSTIC ENZIMÀTIC

El diagnòstic enzimàtic es basa en la mesura de l'activitat de la glucocerebrosidasa (GlcCerasa) a partir de cèl·lules. Els leucòcits de sang perifèrica tenen normalment una activitat

elevada de glucocerebrosidasa que es veu disminuïda en cèl·lules de malalts (Kampine i col., 1967). Per mesurar aquesta activitat s'utilitzen substrats sintètics de la GlcCerasa, com el 4-metilumbeliferil- β -glucòsid. Aquest substrat es digerit a pH 5, però en canvi a pH 4 només es detecta un 10% de l'activitat (Beutler i Kuhl, 1970a, 1970b). També es poden utilitzar fibroblasts, líquid amniòtic o vellositats coriòniques per fer la mesura de l'activitat (Beutler i col., 1971). La demostració de la reducció en l'activitat enzimàtica de la glucocerebrosidasa determina el diagnòstic per a la malaltia.

Pel que fa al diagnòstic de portadors, en leucòcits i fibroblasts trobem la meitat d'activitat normal de l'enzim en els heterozigots, tot i que hi ha solapament entre valors normals i valors de portadors. El diagnòstic enzimàtic tampoc pot distingir entre els tipus neuronopàtics (tipus II i III) i no neuronopàtics (tipus I), ja que hi ha també solapament dels valors d'activitat entre els diferents tipus (Grabowski i col., 1996). En general, en adults malalts trobem que l'enzim té entre el 10-30% de l'activitat normal i en nens el 10% o menys (Grabowski i col., 1996; Enderlin i col., 2003).

En el plasma de pacients de la malaltia de Gaucher es troben augmentades les activitats d'alguns enzims, com són la fosfatasa àcida (Robinson i Glew, 1980; Lam i col., 1982), altres enzims lisosomals com l'hexosaminidasa (Ockerman i Kohlin, 1969), l'enzim convertidor d'angiotensina (Lieberman i Beutler, 1976; Silverstein i Friedland, 1977) i la quitotriosidasa (Hollak i col., 1994; Balicki i Beutler, 1995; Den Tandt i Van Hoof, 1996). Sobretot la quitotriosidasa s'ha establert com un bon marcador per a seguir la progressió de la malaltia i l'efecte de la teràpia, ja que correlacionen molt bé els seus nivells amb la severitat de la malaltia (Beutler i col., 1995). Un altre marcador que s'està utilitzant darrerament per la malaltia de Gaucher és el CCL18/PARC (Boot i col., 2004).

3.4.3. DIAGNÒSTIC GENÈTIC

El diagnòstic basat en l'anàlisi del DNA és un bon complement al diagnòstic enzimàtic. Té certs avantatges respecte el bioquímic, com per exemple que es poden distingir perfectament malalts de portadors.

S'han trobat moltes mutacions causants de malaltia. Les mutacions N370S i 84GG representen entre el 80-90% d'al·lèls causants de la malaltia en la població de jueus asquenaites. En poblacions no jueves les mutacions N370S i L444P representen el 70% d'al·lèls responsables de la malaltia. S'han desenvolupat diferents tècniques basades en la PCR per facilitar la detecció de mutacions (Zimran i col., 1989a; Theophilus i col., 1989b; Mistry i col., 1992; Tayebi i col., 1996) i s'han establert protocols moleculars rutinaris per a les mutacions més freqüents.

En el cas que el pacient sigui portador d'un al·lel poc freqüent es pot realitzar l'anàlisi de marcadors polimòrfics per dur a terme un diagnòstic indirecte (Cormand i col., 1998a).

L'anàlisi mutacional pot tenir un valor predictiu per a determinar la progressió de la malaltia (Theophilus i col., 1989a; Mistry i col., 1992), ja que s'han establert algunes correlacions genotip-fenotip clares, com l'associació de la mutació N370S amb el tipus I de la malaltia, encara que la correlació genotip-fenotip no és absoluta (Sidransky i col., 1992).

3.4.4. DIAGNÒSTIC PRENATAL

El diagnòstic genètic i l'enzimàtic permeten realitzar diagnòstics prenatals, en famílies que presenten algun antecedent amb la malaltia. Aquest diagnòstic es pot fer a partir de diferents teixits fetals, com són vellositats coriòniques o amniòcits.

3.5. PATOLOGIA CEL·LULAR

La malaltia de Gaucher és causada per mutacions en el gen que codifica per la glucocerebrosidasa lisosomal o en alguns pocs casos el seu activador, que dona com a resultat que la glucosilceramida es degradi més lentament que en les cèl·lules normals i s'acumuli en els lisosomes de les cèl·lules. Aquest acúmul té unes conseqüències patològiques.

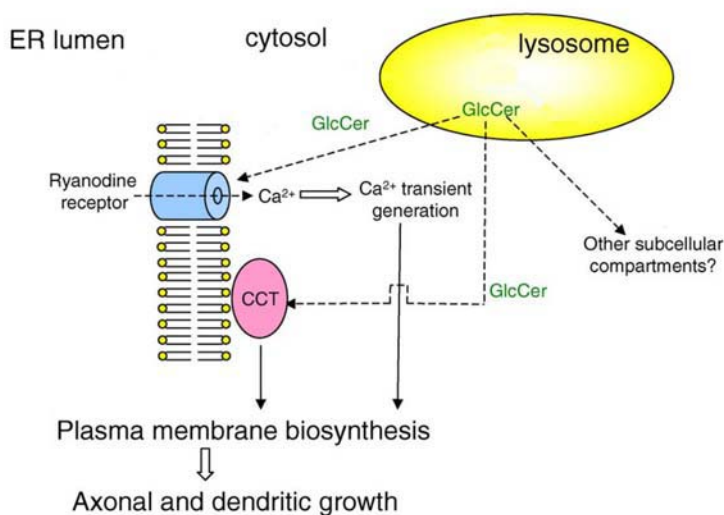


Figura 1.16. Efectes de l'acúmul de GlcCer en el creixement neuronal (figura modificada de Ginzburg i col., 2004). Els GLS podrien sortir del lisosoma i interaccionar amb proteïnes de l'homeostasi del Ca i enzims de la síntesi de fosfolípids, com la CCT, augmentant la síntesi de fosfatidilcolina.

Es coneix molt poc de com l'acúmul de GlcCer en els lisosomes produeix la patologia cel·lular. No se sap per exemple si la GlcCer produeix la patologia des dels lisosomes o si pot sortir una part dels lisosomes i interaccionar amb altres vies cel·lulars i bioquímiques d'altres orgànuls. Alguns estudis recents semblen recolzar la segona hipòtesi. Per exemple s'ha vist que l'acúmul de glucosilceramida augmenta la síntesi de fosfatidilcolina en les neurones, activant la CCT (CTP: fosfatidilcolina citidililtransferasa)

(Bodennec i col., 2002) i en macròfags (Trajkovic-Bodennec i col., 2004). També s'ha vist que està afectada la homeostasi del calci en neurones que acumulen GlcCer (Korkotian i col., 1999). En la **figura 1.16** veiem un esquema de les possibles interaccions de la GlcCer fora del lisosoma.

Com a conseqüència de l'acúmul de GlcCer als lisosomes, aquesta provoca moltes respostes cel·lulars sobretot en les cèl·lules Gaucher, macròfags que fagociten altres cèl·lules, especialment cèl·lules sennescents de la circulació sanguínia (Bitton i col., 2004). L'origen macrofàgic de les cèl·lules Gaucher s'ha demostrat en molts estudis on s'han detectat marcadors de superfície de macròfags o una activitat fagocítica intensa (Boven i col., 2004).

Les cèl·lules Gaucher mesuren entre 20-100 µm de diàmetre, normalment tenen el nucli no centrat i el citoplasma estriat. En la **figura 1.17** veiem una cèl·lula Gaucher.

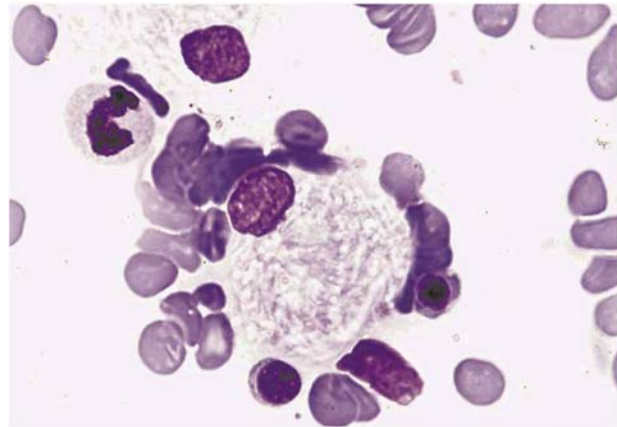


Figura 1.17. Cèl·lula Gaucher en un aspirat de medul·la òssea d' un pacient Gaucher de tipus I.

En la malaltia de Gaucher es veuen afectats els macròfags del fetge (cèl·lules de Kupfer), de l'òs (osteoclasts), del sistema nerviós central (microglia), dels pulmons (macròfags alveolars), la melsa, la medul·la òssea i d'altres teixits.

Des de que es van descriure els macròfags com a principals cèl·lules afectades en la malaltia de Gaucher s'ha intentat esbrinar com s'altera la biologia del macròfag en la malaltia. Sembla que la patologia no es produeix només per l'acúmul de GlcCer, sinó també per l'activació del macròfag. En el plasma dels pacients s'han vist augmentats els nivells de molts factors, com ara IL-1β, IL-6, TNFα, sIL-2R (Barak i col., 1999), CD14 i M-CSF (Hollak i col., 1997) com a conseqüència d'aquesta activació del macròfag. Aquests canvis podrien contribuir a l'activació d'alguns trets patològics, com són l'osteopènia o els problemes de coagulació (trombocitopènia).

3.6. BIOQUÍMICA DE LA MALALTIA

En la malaltia de Gaucher està bloquejada la degradació de la glucosilceramida (**Figura 1.18**). Però per a què aquesta reacció es produeixi han d'intervenir-hi dues proteïnes: una hidrolasa, la glucocerebrosidasa, i un activador, la saposina C. Totes dues proteïnes permeten la degradació de la glucosilceramida en glucosa i ceramida.

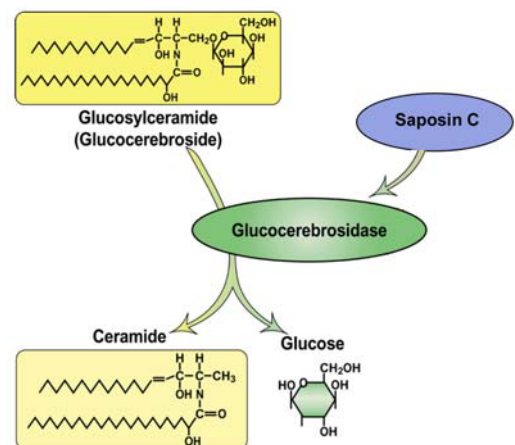


Figura 1.18. Reacció catalitzada per la Glucocerebrosidasa (figura modificada de Sidransky, 2004).

3.6.1. EL SUBSTRAT: LA GLUCOSILCERAMIDA (GlcCer)

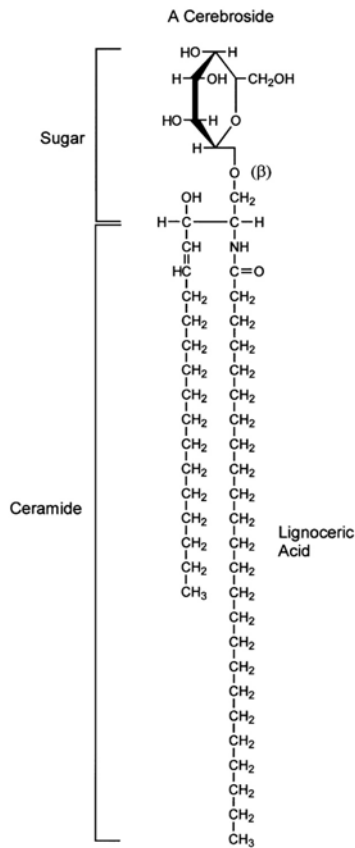


Figura 1.19. Estructura química del glucocerebròsid o glucosilceramida.

La Glucosilceramida (GlcCer) o glucocerebròsid és el nucli de l'estructura de la majoria dels glicoesfingolípids. Aquest glicoesfingolípide conté un grup hidrofílic (D-glucosa) i una cadena lipídica hidrofòbica (**Figura 1.19**). Els cerebròsids són els glicoesfingolípids més simples que hi ha, formats per ceramida i glucosa (glucocerebròsid) o ceramida i galactosa (galactocerebròsid).

La glucosilceramida es troba bàsicament en mamífers, tot i que també s'ha descrit en algunes plantes amb una estructura diferent (Sullards i col., 2000).

La GlcCer s'ha descrit no només com a intermediari de la ruta de síntesi i degradació dels GSLs, sinó també és un component de les membranes implicat en diferents processos cel·lulars, com són proliferació (Hannun i Bell, 1989), transformació oncogènica i metastasi tumoral (Morton i col., 1994), i diferenciació (Schwarz i col., 1995). També està implicada en trombosi venosa i en l'activitat anticoagulant de la proteïna C (Deguchi i col., 2001).

3.6.2. L'ENZIM: LA GLUCOCEREBROSIDASA

La glucocerebrosidasa o β-glucosidasa àcida (GlcCerasa, EC 3.2.1.45) és una proteïna perifèrica de membrana (Erickson i col., 1985) que hidrolitza l'enllaç β-glucosil de la glucosilceramida en els lisosomes. Aquesta proteïna requereix l'acció coordinada de la saposina C i de lípids carregats negativament per la seva màxima activitat (Grabowski i col., 1990).

Segons la seva seqüència la GlcCerasa es va classificar com un membre de la família de les glicosil hidrolases 30, que inclou les hidrolases presents en mamífers. Segons el plegament, que en aquestes proteïnes està més conservat que la seqüència, formen part del 'clan' de les glicosil hidrolases A (GH-A, *glycoside hydrolase A*).

La proteïna madura humana té 497 aminoàcids i un pes molecular de 55 kDa. Conté un pèptid senyal que pot tenir 19 o 39 aminoàcids degut a la presència de dos inicis de traducció funcionals (Sorge i col., 1987) i que li permet a la proteïna translocar-se al lumen del reticle endoplasmàtic. La forma glicosilada de la proteïna té un pes molecular de 65 kDa.

Recentment s'ha establert la seva estructura amb raigs-X (Dvir i col., 2003). S'ha vist que el plegament de la proteïna genera 3 dominis, que en la **figura 1.20** es marquen en blau, verd i rosa.

El primer domini (rosa) es troba estructurat en 4 làmines β , el segon (verd) està format per dues làmines β i el tercer domini (blau), que és el catalític, conté 8 hèlix α i 8 làmines β .

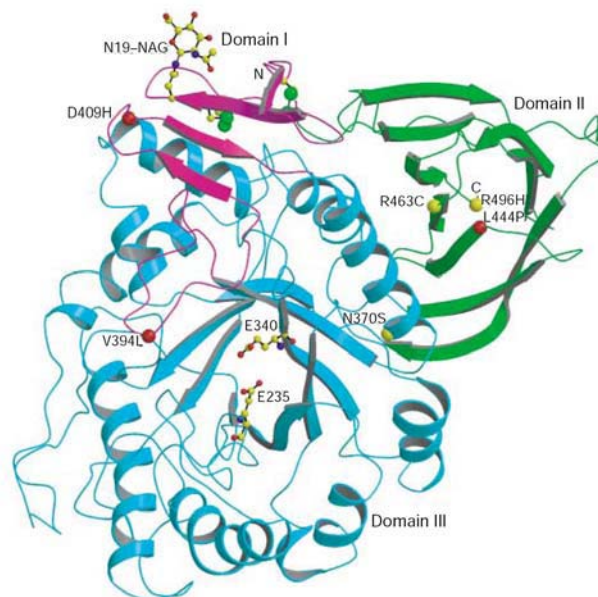


Figura 1.20. Estructura tridimensional de la Glucocerebrosidasa (figura de Dvir i col., 2003).

3.6.3. L'ACTIVADOR: LA SAPOSINA C

Les proteïnes activadores d'esfingolípids (SAPs, *sphingolipid activator proteins*) són glicoproteïnes enzimàticament inactives, que són cofactors essencials en la degradació dels glicoesfingolípids de cadena curta d'oligosacàrids. Aquests cofactors permeten la interacció entre les hidrolases solubles i els seus substrats units a membrana.

Hi ha 4 saposines, la A, B, C i D, que es produeixen per un processament proteolític a partir d'un mateix precursor, la prosaposina (PSAP). El precursor de 70kDa és una glicoproteïna que és processada proteolíticament fins a obtenir les 4 proteïnes madures. Les 4 SAPs A-D són petites proteïnes d'uns 80 aminoàcids. Contenen sis cisteïnes altament conservades i un lloc de N-glicosilació (Kishimoto i col., 1992). Concretament la saposina C té el lloc de N-glicosilació en el residu asparagina 22 (Asn 22).

La Saposina C es va aïllar de la melsa de pacients amb la malaltia de Gaucher (Ho i O'Brien, 1971). És necessària per la degradació lisosomal de la glucosilceramida per la GlcCerasa. La SAP C a més li confereix a la GlcCerasa més resistència a les proteases de la cèl·lula (Sun i col., 2003).

La seva estructura tridimensional es va establir l'any 2003 (de Alba i col., 2003) (**Figura 1.21**). La estructura de la Saposina C consisteix en 5 hèlixs alfa que formen mitja esfera. Els aminoàcids carregats queden exposats, mentre que els residus hidrofòbics queden dins el nucli de la proteïna.

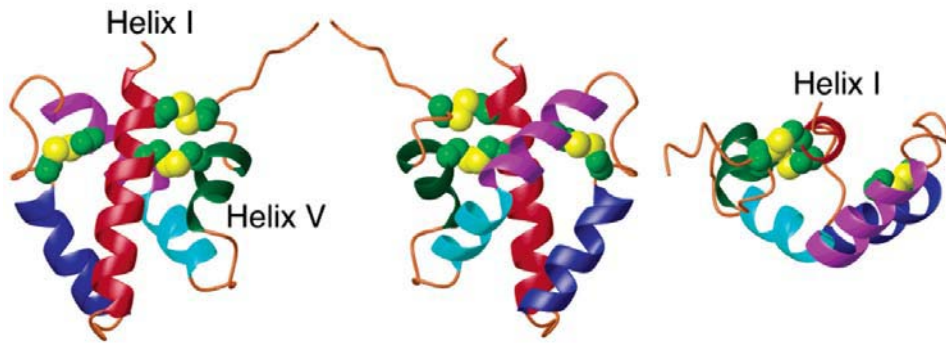


Figura 1.21. Diagrama de la Saposina C humana, des de tres angles diferents (figura de deAlba i col., 2003). Els àtoms de sofre dels ponts disulfur estan marcats amb groc. Trobem 5 helix α : Helix I (vermell), Helix II (blau fosc), Helix III (lila), Helix IV (blau clar) i Helix V (verd).

3.6.4. MECANISME CATALÍTIC

El mecanisme d'acció de la saposina C implica una interacció proteïna-proteïna (**Figura 1.22**), formant un complex 1:1 amb la glucocerebrosidasa (Berent i Radin, 1981; Morimoto i col., 1990). Sembla que la saposina C adquireix propietats hidrofòbiques a pH àcid, augmentant la seva afinitat d'unió a la membrana. Provablement per aquest mecanisme facilita l'associació de la glucocerebrosidasa a la membrana per degradar la glucosilceramida (Vaccaro i col., 1999).

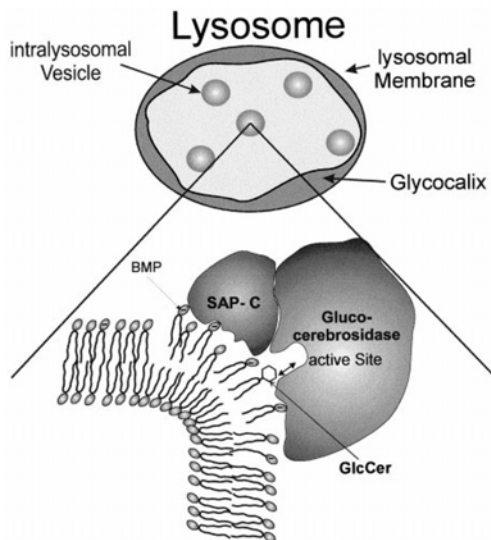


Figura 1.22. Model per al mecanisme de degradació de la GlcCer per GlcCerasa i sapC (figura de Wilkening i col., 1998).

La interacció de la saposina C amb la membrana produiria defectes en la capa lipídica que afavoririen l'atac de les hidrolases per la degradació de la GlcCer (Wilkening i col., 1998).

Les propietats de la saposina C també estarien afavorides per la presència en la membrana de lípids àcids, com bis(monoacil)glicerofosfat (BMP). Sembla que en afegir BMP als liposomes augmenta de 4 a 20 vegades la degradació de la glucosilceramida (Wilkening i col., 1998; Linke i col., 2001).

3.7. GENÈTICA DE LA MALALTIA

La malaltia de Gaucher és una malaltia d'herència autosòmica recessiva, causada principalment per mutacions en el gen que codifica la glucocerebrosidasa, el gen *GBA*. En uns pocs casos les mutacions causants de la malaltia s'han trobat en el gen que codifica l'activador de l'enzim, la saposina C, que és el gen de la prosaposina (*PSAP*).

3.7.1. EL GEN *GBA* I EL SEU PSEUDOGÈN (*GBAP*)

El gen que codifica la hidrolasa àcida glucocerebrosidasa és el gen *GBA*, situat en el cromosoma 1 en la banda q21 (Ginns i col., 1985). El gen té aproximadament 7.6 kb i conté 11 exons. Les caixes TATA- i CAAT-like del promotor s'han identificat a 260 pb upstream de l'ATG inicial (Reiner i col., 1988).

El cDNA de *GBA* té unes 2,5 kb (Sorge i col., 1985; Tsuji i col., 1986; Reiner i col., 1987). Sorge a l'any 1987 va demostrar que el cDNA contenia dos ATG (Sorge i col., 1987). No s'ha establert encara la funció que poden tenir aquests dos ATG, però sembla que els pèptids senyals generats per cada ATG tenen una hidrofobicitat diferent i els dos ATG donen un enzim actiu.

Existeix un pseudogèn (*GBAP*) localitzat a 16 kb a 3' del gen funcional *GBA* (**Figura 1.23**). L'any 1988 es van caracteritzar el gen i el pseudogèn (Reiner i col., 1988).

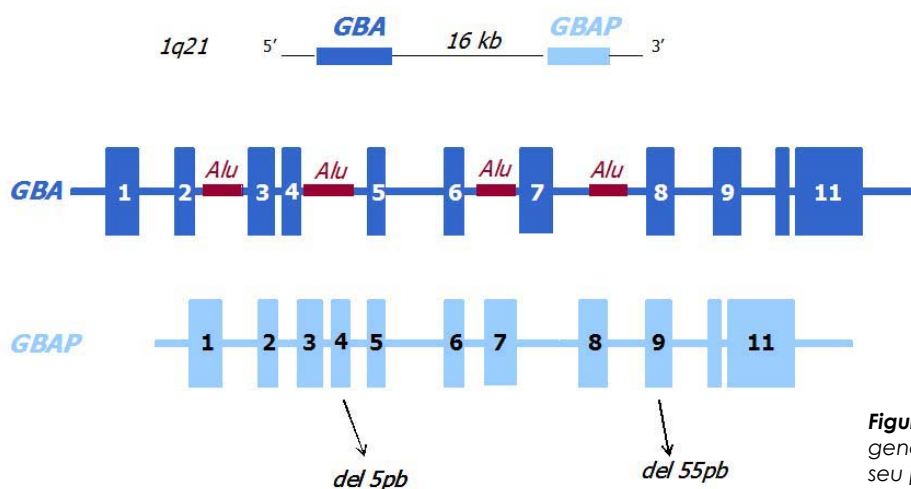


Figura 1.23. Estructura genòmica del gen *GBA* i del seu pseudogèn (*GBAP*)

Tots dos comparteixen una gran homologia de seqüència. El gen *GBA* humà ocupa 7.6 kb en el DNA genòmic i el pseudogèn 5.5 kb (Horowitz i col., 1989). La identitat de nucleòtids entre el gen i el pseudogèn és del 96% (Horowitz i col., 1989). L'estructura del gen i el pseudogèn són molt semblants. Tots dos tenen 11 exons i 10 introns. Els exons van de 88 pb fins a 648 pb i els introns des de 104 pb fins a 956 pb.

A més dels canvis puntuals, les diferències més importants entre el gen i el pseudogèn són dues delecions en els exons 4 i 9 del pseudogèn, de 5 pb i 55 pb respectivament, i la presència de 4 seqüències *Alu* en els introns 2 (313pb), 4 (626pb), 6 (320pb) i 7 (277pb) del gen (Horowitz i col., 1989).

Tots aquests canvis fan que el pseudogèn, encara que es transcriu, no es tradueixi per falta d'una pauta de lectura oberta (Sorge i col., 1990).

Així com el gen *GBA* s'ha trobat en diferents espècies, com són ratolí, porc o cavall, el *GBAP* només s'ha trobat en espècies de primats i probablement va aparèixer a partir d'una duplicació del gen *GBA* fa uns 40 milions d'anys (Wafaei i Choy, 2005).

La regió on es troba el gen *GBA* i el *GBAP* és una regió rica en gens, alguns amb la funció coneguda i altres no (**Figura 1.24**). Immediatament a 5' de *GBA* es troba el gen *COTE1* i després *PROPIN1*, que són gens de funció desconeguda. Després trobem *CLK2*, que sembla que és una serina/treonina quinasa (Winfield i col., 1977). A 3' del gen *GBA* trobem primer el pseudogèn de la metaxina (*MTXP*) i després del pseudogèn *GBA* trobem el gen de la metaxina (*MTX*), que està implicat en transport de proteïnes a la mitocondria (Armstrong i col., 1997). Aquests dos gens (*MTX* i *MTXP*) es troben orientats en sentit contrari a *GBA*.



Figura 1.24. Regió genòmica flanquejant del gen *GBA* i el pseudogèn (figura modificada de Winfield i col., 1997).

Sembla que hi ha un gran bloc genòmic que conté el gen *GBA* i *MTX* que va patir una duplicació, donant com a resultat els pseudogèns *GBAP* i *MTXP* (Winfield i col., 1997), i que no va afectar als gens propers.

Més a 3' del pseudogèn *GBAP*, a una posició més centromèrica que el gen *MTX*, trobem el gen *THBS3* i el gen *MUC1*.

Molt més cap a 5' del gen *GBA*, cap al telòmer del braç llarg del cromosoma 1, trobem el gen de la piruvat quinasa (*PKLR*). Entre aquest gen i el gen *GBA* hi ha unes 70 kb i els polimorfismes que es troben en aquesta regió estan en desequilibri de lligament. Moltes mutacions causants de Gaucher es troben en un mateix haplotip de *PKLR*, indicant que les mutacions de Gaucher han aparegut recentment dins l'evolució humana (Mateu i col., 2002).

3.7.1.1. POLIMORFISMES EN EL GEN GBA

Dins la regió genòmica del gen *GBA* s'han trobat 13 polimorfismes, és a dir, canvis de nucleòtids que no tenen cap efecte a nivell de la proteïna (Beutler i col., 1992b). Aquests 13 polimorfismes estan en desequilibri de lligament entre ells produint només dos haplotips majoritaris, anomenats haplotip Pv1.1+ (o +) i haplotip Pv1.1- (o -). També hi ha 2 haplotips més, que són minoritaris, anomenats africà, que difereix només en una posició respecte l'haplotip - i que s'ha trobat en població africana, i rar, que difereix en una posició respecte l'haplotip + (Zimran i col., 1990a)(Figura 1.25).

S'ha trobat també un altre polimorfisme en l'intró 7, descrit només en població espanyola i portuguesa (Amaral i col., 1997; Rodriguez-Marí i col., 2001).

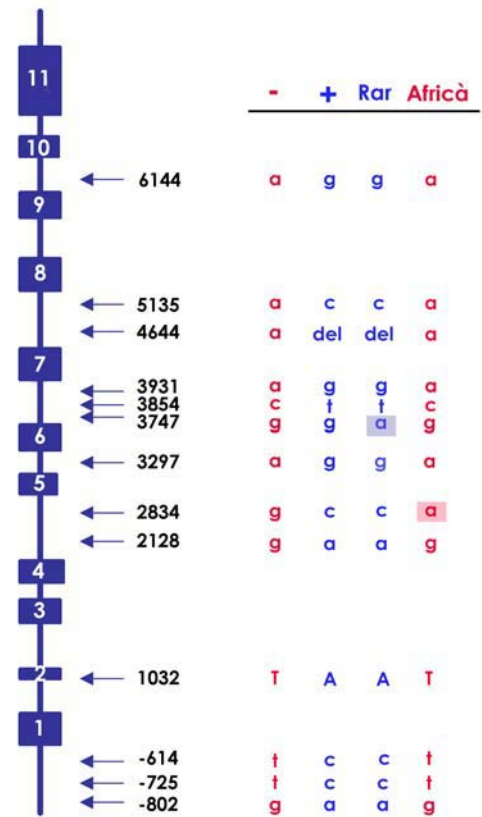


Figura 1.25. Polimorfismes presents en el gen *GBA* i els haplotips que presenten. Les posicions de l'haplotip rar i africà diferents del + i - estan marcades amb un recuadre blau i vermell respectivament

3.7.1.2. MUTACIONS EN EL GEN GBA CAUSANTS DE LA MALALTIA DE GAUCHER

Fins al moment s'han descrit més de 200 mutacions en el gen *GBA* causants de la malaltia de Gaucher (Beutler i col., 2005; HGVS, Human Genome Variation Society, <http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/>). Trobem mutacions que produeixen canvis d'aminoàcids, canvis de pauta de lectura, canvis en llocs de *splicing* o que són degudes a recombinacions entre el gen i el pseudogèn.

A la **taula 1.2** es mostren les mutacions més freqüents en la població espanyola. En la taula apareix la nomenclatura clàssica de les mutacions (que es la que s'utilitza en aquest treball), la nova nomenclatura recomanada per a HGVS (tant a nivell de cDNA com de proteïna), l'exó on es troben en el gen i l'interés que tenen en aquest treball.

Taula I.2. Mutacions descrites en el gen GBA que apareixen en aquest treball. En la taula apareix la nomenclatura clàssica de la mutació, l'exó on se situa la mutació, la nova nomenclatura a nivell de cDNA i de proteïna, i l'interés que tenen per aquest treball.

Nomenclatura clàssica de la mutació	exó	cDNA (nova nom.)	Proteïna (nova nom.)	Aspectes d'interés
N370S	9	c.1226A>G	p.N409S	Correlacions genotip-fenotip establertes: associada al tipus I
D409H	9	c.1342G>C	p.D448H	Correlacions genotip-fenotip establertes: associada a calcificacions vasculares. Forma part de l'al·lel Rec TL
L444P	10	c.1448T>C	p.L483P	Primera mutació descrita en el gen GBA. Correlacions genotip-fenotip establertes: associada als tipus neuronopàtics II i III. Forma part de l'al·lel Rec TL i del RecNcil.

3.7.1.2.1. MUTACIONS MÉS FREQUËNTS

De les moltes mutacions descrites fins al moment, només algunes tenen elevades freqüències en determinades poblacions. La més comú és la transició A→G a la posició 1226 del cDNA, que produeix la substitució Asn→Ser a l'aminoàcid 370 (N370S). Aquesta mutació és present en un 6% de la població jueva asquenasa (Beutler i col., 1992) i és la principal causa de l'elevada incidència d'aquesta malaltia en aquest grup ètnic.

Una inserció d'una G en la posició 84 del cDNA és la segona mutació més freqüent en població jueva (84GG). Es troba aproximadament en un 0.6% de la població jueva. Com que produeix un corriment de la pauta de lectura en la regió que codifica per al pèptid senyal, l'al·lel que porta aquesta mutació no produeix la proteïna (Beutler i col., 1991).

La transició T→C al nucleòtid 1448, que produeix una substitució Leu→Pro a l'aminoàcid 444 de la proteïna madura (L444P) és present en una elevada freqüència en la població Norrbottnian de Suècia (Dahl i col., 1990). Aquesta mutació es troba també en altres poblacions amb menor freqüència.

Algunes mutacions, com la L444P i d'altres, estan presents en el pseudogèn. Això fa que s'incorporin en el gen GBA per recombinacions entre el gen funcional i el pseudogèn. Aquestes mutacions s'anomenen mutacions Rec (de recombinant) (Eyal i col., 1990) o al·lells complexos (Latham i col., 1990).

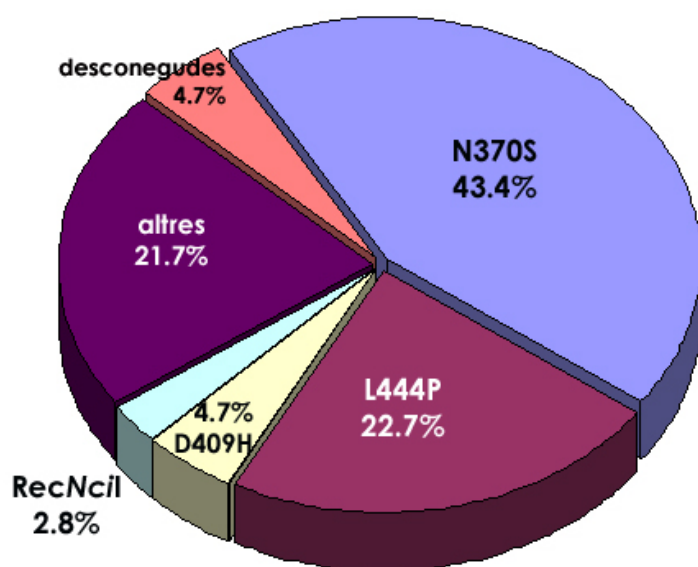


Figura 1.26. Freqüència de les mutacions causants de la malaltia de Gaucher en la població de pacients espanyols (Cormand i col., 1998a).

Pel que fa a la població de pacients espanyols les mutacions més freqüents són la N370S, que representa el 43,4% del total de mutacions, seguida per la L444P, en un 22,7% dels al·lels mutats (**Figura 1.26**). Juntament amb la D409H (4,7%) i la RecNcil (2,8%) representen més del 70% de les mutacions (Cormand i col., 1998a).

L'elevada freqüència de la N370S en diferents poblacions ha fet permès que es pugui estudiar l'origen d'aquesta mutació. En concret, es van utilitzar microsatèl·lits propers al gen GBA per establir un haplotip comú en

pacients portadors de la mutació N370S, tant d'origen espanyol com jueu (Diaz i col., 1999; Diaz i col., 2000; Rodriguez-Marí i col., 2001). A partir d'aquest haplotip comú es dedueix que la mutació té un origen comú en les dues poblacions.

3.7.1.2.2. MUTACIONS PRODUÏDES PER RECOMBINACIONS ENTRE EL GEN I EL PSEUDOGÈN: AL·LELS RECS O AL·LELS COMPLEXOS

Els al·lels complexos s'anomenen així per contenir varies mutacions. Són canvis puntuals del pseudogèn que s'han incorporat en el gen. Podríem dir que en el gen s'ha substituït una determinada regió per la seva homòloga del pseudogèn. Aquests al·lels es formarien com a conseqüència de recombinacions entre les zones homòlogues del gen i del pseudogèn. Per això també s'anomenen al·lels Rec.

Aquests al·lels només es troben en heterozigosi. Els pocs casos descrits en homozigosi han provocat morts neonatals (Strasberg i col., 1994; Sidransky i col., 1996; Tayebi i col., 1997; Reissner i col., 1998), per tant són mutacions que en homozigosi són letals.

Els primers al·lels complexos que es van descriure van ser l'al·lel RecNcil (Eyal i col., 1990; Zimran i col., 1990b) i RecTL (Eyal i col., 1990; Zimran i Horowitz, 1994). Els canvis puntuals que caracteritzen l'al·lel RecNcil són la L444P (c.1448T>C), la A456P (c.1483G>C) i la V460V (c.1497G>C) situades a l'exó 10. De les posicions diferents entre el gen i el pseudogèn, aquestes són les que es troben més a 3'. En l'al·lel RecTL a més de les tres anteriors hi trobem també la mutació D409H (c.1342G>C) situada en l'exó 9.

L'al·lel complex més freqüent és l'al·lel RecNcil. La freqüència d'aquest al·lel varia segons la població, però en la majoria és baixa. Per exemple en el cas dels jueus asquenaites aquest al·lel complex és molt rar, i pràcticament no apareix en la població (Beutler i col., 1992a; Horowitz i col., 1993). En la població espanyola representa el 2.8% de totes les mutacions trobades en els pacients (**Figura I.23**) (Cormand i col., 1998a). En canvi, és molt freqüent entre els pacients argentins, on s'ha descrit una freqüència del 21% (Cormand i col., 1998b).

La detecció de la mutació RecNcil es realitza analitzant l'exó 10. Els al·lells portadors dels canvis L444P, A456P i V460V són considerats al·lells RecNcil. Aquest al·lel es pot generar per diferents mecanismes, com són la conversió gènica o l'entrecreuament desigual entre el gen i el pseudogèn. Com a conseqüència d'aquest entrecreuament desigual es produeixen reordenaments gènics que impliquen fusió o duplicació d'alguna regió (**Figura I.27**).

Posteriorment a la descripció dels al·lells RecNcil i RecTL s'han descrit altres al·lells recombinants (Filocamo i col., 2000; Sinclair i col., 1998). En la majoria d'aquests al·lells la regió implicada en la recombinació és la regió 3' del gen. En aquesta zona l'homologia entre el gen i el pseudogèn és més gran, i això podria afavorir els entrecreuaments desiguals.

La existència d'al·lells complexos, no totalment caracteritzats, ha portat a diagnòstics erronis. Aquests errors s'han donat per limitacions tècniques, sobretot quan aquests nous al·lells impliquen recombinacions en la regió 5' del gen. Els encebadors que s'utilitzen per amplificar el gen són específics d'aquest, és a dir, no amplifiquen el pseudogèn. Per tant, els al·lells Rec que incorporen regions del pseudogèn tampoc es poden amplificar i poden passar desapercebuts.

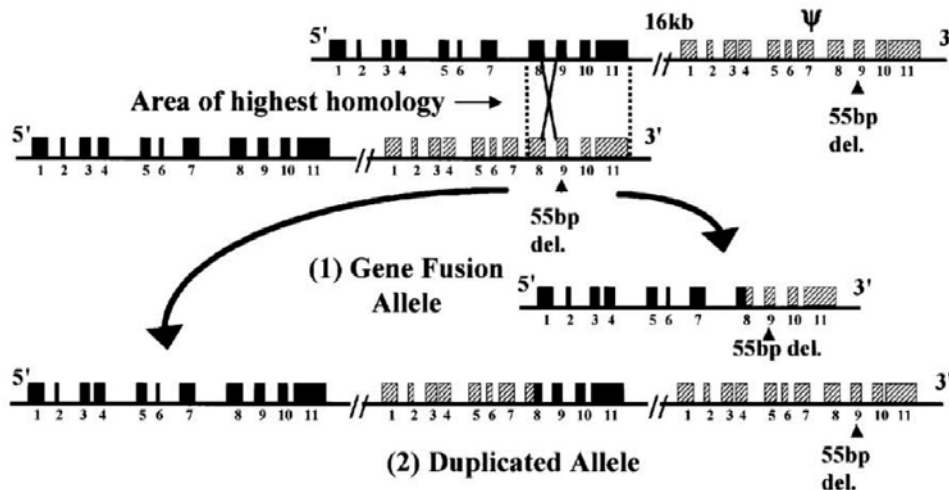


Figura I.27. Reestructuracions gèniques com a conseqüència d'entrecreuament desigual entre el gen GBA i el seu pseudogèn (figura de Tayebi i col., 2003a).

3.7.1.3. CORRELACIONS GENOTIP-FENOTIP

Amb les mutacions descrites en el gen *GBA* causants de la malaltia de Gaucher s'han pogut establir algunes relacions genotip-fenotip. Això permet que en alguns casos es pugui deduir el procés que seguirà la malaltia segons la mutació causant d'aquesta.

Les mutacions es poden classificar en tres categories segons el fenotip que s'ha vist que produeixen:

- ✗ Mutacions lleus: són mutacions que no s'han trobat mai en pacients amb afectació del sistema nerviós central. La N370S és el prototip d'aquest tipus de mutacions. L'enzim que es sintetitza té una activitat residual relativament elevada.
- ✗ Mutacions greus: són aquelles que s'han associat amb un fenotip neuronopàtic, que generen un enzim però poc funcional. La L444P és un exemple per aquest grup.
- ✗ Mutacions nul·les: són aquelles que impedeixen que es formi l'enzim. La més comú d'aquestes és la 84GG, o per la població espanyola la RecNcil. Aquestes mutacions no s'han trobat mai en homozigosi o dos mutacions nul·les juntes, pel que es dedueix que són letals.

La mutació L444P en homozigosi s'associa amb un fenotip neuronopàtic II o III. A la població Norrbottnian (Dahl i col., 1990), que es caracteritzen per ser portadors d'aquesta mutació, el fenotip que presenten és de tipus III.

La presència de la mutació N370S comporta que el pacient no desenvolupi el tipus II o III de la malaltia. A més, és més suau el fenotip de la malaltia si es presenta en homozigosi que no si ho fa amb heterozigosi amb una severa, com per exemple la L444P (Zimran i col., 1989b; Theophilus i col., 1989a). Sobretot, el fet que aparegui en homozigosi la mutació N370S influeix en l'edat d'aparició dels símptomes, que es retrasa més que si està en heterozigosi (Beutler, 1992). De fet, alguns homozigots per la N370S no s'arriben a diagnosticar. Per exemple, en un estudi que es va fer amb població de jueus asquenasites (Beutler i col., 1993), 4 de 1528 adults aparentment no malalts van ser genotipats com a homozigots per la mutació N370S.

Hi ha altres mutacions que s'han associat al tipus lleu de la malaltia com són la I402T i la V375L (Cormand i col., 1997a).

Una altra correlació genotip-fenotip que s'ha establert és l'associació entre la presència de la mutació D409H i l'aparició d'una forma atípica de la malaltia de tipus III amb calcificacions cardiovasculars (Abrahamov i col., 1995; Bohlega i col., 2000; Chabás i col., 1995; George i col., 2001).

Tot i aquestes correlacions hi ha variacions considerables de fenotip entre pacients amb un mateix genotip (Sibille i col., 1993), que poden ser degudes a l'influència de factors ambientals o d'altres factors genètics, com poden ser l'existència de polimorfismes, com és el

cas del polimorfisme modificador E326K, (Montfort i col., 2005; Chabás i col., 2005), l'expressió de la saposina C o d'altres hidrolases (Goker-Alpan i col., 2005).

3.7.2. EL GEN DE LA PROSAPOSINA (PSAP)

El gen que donarà lloc a la saposina C és el gen que codifica la prosaposina (PSAP, precursor de les saposines), que cobreix una regió de quasi 35 kb en la regió q21-23 del cromosoma 10. El gen va ser mapat inicialment a 10q22.1 (Bar-Am i col., 1996) i més tard es va fer la localització més fina utilitzant polimorfismes de la regió (Cormand i col., 1997b).

El cDNA del gen PSAP codifica un polipèptid de 524 aminoàcids, començant per un pèptid senyal i que conté 4 dominis homòlegs d'uns 80 aminoàcids cadascun (Furst i col., 1988; Nakano i col., 1989; O'Brien i col., 1988; Rorman i Grabowski, 1989). Aquests dominis corresponen a la saposina A, saposina B, saposina C i saposina D, respectivament. El grau d'identitat entre aquestes proteïnes va del 23 al 39%, amb 15 aminoàcids conservats entre les 4 proteïnes. Aquests 15 aminoàcids inclouen 6 residus cisteïna i una senyal de N-glicosilació.

El gen de la PSAP té 15 exons. La posició dels introns, dels residus cisteïna i dels llocs de N-glicosilació estan molt conservats en diferents espècies. Els residus cisteïna i els llocs de N-glicosilació també estan conservats entre els diferents dominis SAP (**figura 1.28**). Això reforça la idea que el gen PSAP prové de dos duplicacions en tàndem d'un gen ancestral que codificava per un sol domini SAP (Hazkani-Covo i col., 2002).

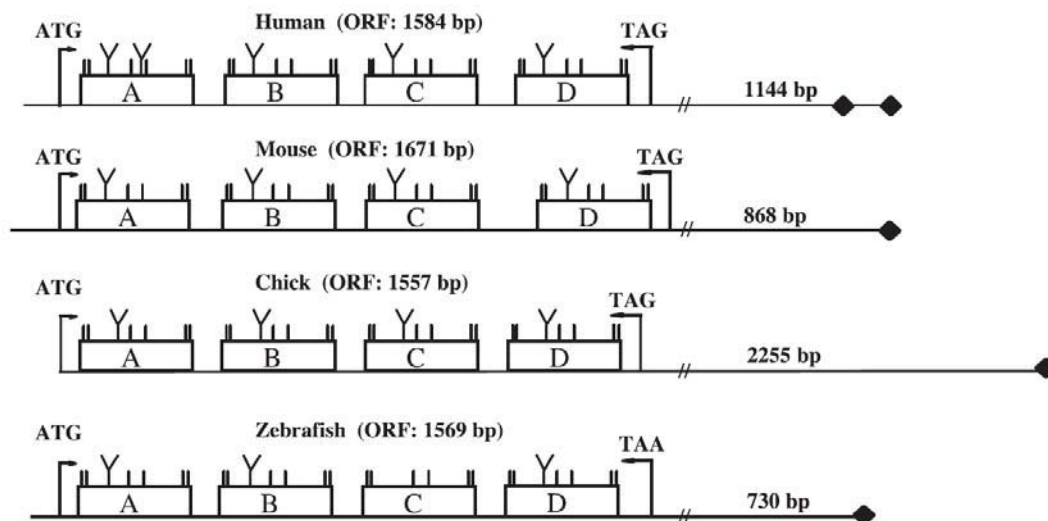


Figura 1.28. Comparació del gen PSAP en humà, ratolí, pollastre i peix zebra. En totes aquestes espècies es troben conservades les 6 cisteïnes (marcades com a Y) i un lloc de N-glicosilació (marcat com a a) en cada domini SAP. Figura de Cohen i col. (2004).

L'exó 8 del gen *PSAP* humà consta només de 9 parells de bases, que codifiquen 3 aminoàcids prop de l'extrem C-terminal de la saposina B (Holt Schmidt i col., 1991). Normalment el mRNA no conté aquest exó, però s'han trobat mRNAs que contenen 6 o 9 bases de l'exó, és a dir, afegeixen 2 o 3 aminoàcids a la proteïna. El paper fisiològic del splicing alternatiu d'aquest exó s'ha estudiat, però així com *in vitro* sembla que aquests aminoàcids canvien l'afinitat per unir alguns substrats, *in vivo* sembla que no hi ha diferències (Henseler i col., 1996a). De fet, l'splicing alternatiu d'aquest exó s'ha descrit també en ratolí, rata i pollastre (Cohen i col., 2004)

Els exons del gen *PSAP* que codifiquen la saposina C són el 10 i el 11, com es mostra en la **Figura I.29**.

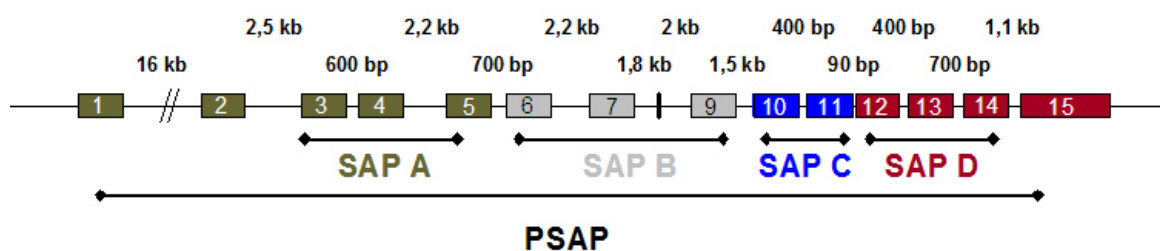


Figura I.29. Estructura del gen de la *PSAP*, que codifica per a les quatre saposines.

3.7.2.1. MUTACIONS EN EL GEN *PSAP*

El fet que el gen *PSAP* codifiqui les quatre saposines A-D fa que mutacions en aquest gen puguin causar diferents patologies. Així, mutacions en el gen de la *PSAP* poden causar la malaltia de Gaucher, però ho faràn si afecten la saposina C. En canvi, el fenotip serà diferent si és una altra saposina l'afectada o si ho és tot el gen sencer.

Segons això, i basant-nos en les mutacions descrites fins al moment, podem trobar mutacions que donin els diferents fenotips:

- mutacions que afecten tota la *PSAP*: en aquest cas es produeix una deficiència de totes les saposines. El fenotip que provoca és una esfingolipidosi complexa, ja que hi ha diferents activitats deficientes.
- mutacions que afecten només la saposina A: una deficiència en la saposina A provoca la malaltia de Krabbe, perquè la sap A actua com a activador de la galactocerebrosidasa i la deficiència d'aquesta activitat causa la malaltia de Krabbe.
- mutacions que afecten només la saposina B: la sap B actua com a activador de l'arilsulfatasa A. Per tant una deficiència de sap B produeix leucodistròfia metacromàtica (MLD), que és la malaltia causada per una deficiència de l'activitat arilsulfatasa A.
- mutacions que afecten només la saposina C: una deficiència en la saposina C provoca la malaltia de Gaucher, igual que la deficiència de glucocerebrosidasa, sobre la que actua.

e) mutacions que afecten només la saposina D: aquesta saposina és necessària per a la degradació de ceràmida per la ceramidasa àcida. Fins al present treball, no s'havia descrit cap mutació en aquesta saposina ni que afecti només a aquesta saposina.

A la **Taula 1.3** es recullen les mutacions descrites en el gen *PSAP*. Fins al moment de presentar aquest treball se n'han descrit 13. D'aquestes només tres mutacions causen la malaltia de Gaucher. Aquestes tres mutacions afecten dues de les 6 cisteïnes conservades en les saposines.

Taula 1.3. Mutacions descrites en el gen de la PSAP. En la taula es descriu el domini saposina on es troba la mutació, l'exó o intró on es localitza, la posició en el cDNA, el canvi aminoacídic que provoca i el fenotip que produeix la mutació.

Sap	exó/intró	cDNA	aminoàcid	fenotip	referència
	Exó 1	c.1A>T	p.M1L	def. PSAP	Schnabel i col., 1992
	Exó 1		p.M1V	def. PSAP	Amsallem i col., 2005
A	Exó 3	c.207delTGT		Krabbe	Spiegel i col., 2005
B	Intró 5	c.577(-1)G>T		MLD	Henseler i col., 1996b
B	Exó 6	c.643A>C	p.N215H	MLD	Wrobe i col., 2000
B	Exó 6	c.645C>A	p.N215K	MLD	Regis i col., 1999
B	Exó 6	c.650C>T	p.T217I	MLD	Kretz i col., 1990
B	Exó 7	c.722G>C	p.C241S	MLD	Holtzschmidt i col., 1991
B	Intró 7	c.778(-2015)C>A		MLD	Zhang i col., 1990
B	Exó 9	c.803delG		def. PSAP	Hulkova i col., 2001
C	Exó 10		p.C315S	Gaucher	Amsallem i col., 2005
C	Exó 11	c.1144T>G	p.C382G	Gaucher	Rafi i col., 1993
C	Exó 11	c.1145G>T	p.C382F	Gaucher	Schnabel i col., 1991

3.8. MODELS ANIMALS

3.8.1. MODELS ANIMALS PER LA MALALTIA DE GAUCHER QUE AFECTIN EL GEN *GBA*

El primer model animal per a la malaltia de Gaucher va ser un model caní que va aparèixer naturalment (Van De Water i col., 1979), però es va perdre.

L'any 1992 es va generar el primer model murí per a la malaltia de Gaucher, utilitzant tècniques de disrupció dirigida (targeted disruption) en el gen de la glucocerebrosidasa murina (Tybulewicz i col., 1992). Es va crear un al·lel nul en cèl·lules mare embrionàries i aquestes cèl·lules modificades genèticament van ser utilitzades per establir el ratolí portador de la mutació. El ratolí

homozigot *knock-out* tenia menys del 4% de l'activitat glucocerebrosidasa normal i moria 24 hores després de néixer. Mostrava un acúmulo de glucosilceramida als lisosomes.

L'any 1998 es generen ratolins amb mutacions puntuals específiques utilitzant tècniques de mutagènesi dirigida (Liu i col., 1998). El fet de generar unes mutacions concretes permetia fer models murins per als diferents tipus de la malaltia. Van generar ratolins portadors de les mutacions L444P i RecNcil. L'homozigot per la mutació L444P tenia més activitat glucocerebrosidasa i acumulava menys glucosilceramida que l'homozigot RecNcil. Però els dos morien durant les primeres 48 h de vida, sembla que per la pèrdua de permeabilitat de la barrera epidèrmica com a conseqüència de la no degradació de la glucosilceramida.

S'han generat també ratolins mutants per les mutacions N370S, V394L, D409H i D409V (Xu i col., 2003). Contràriament al que s'esperava el ratolí homozigot per la mutació N370S presentava letalitat neonatal. Els altres mutants tenien una activitat reduïda de la GlcCerasa i als pocs mesos presentaven acúmulo de GlcCer en el fetge, però cap en el cervell.

3.8.2. MODELS ANIMALS QUE AFECTIN EL GEN *PSAP*

Fins al moment no s'ha generat cap animal model de la malaltia de Gaucher per deficiència de saposina C. El que si s'han generat són models animals per la deficiència total de les saposines i per la deficiència de la saposina A.

L'any 1996 es va generar un ratolí mutant per al gen *PSAP* per recombinació homòloga (Fujita i col., 1996). Una part d'aquests ratolins morien abans de néixer. El que arribaven a néixer presentaven un fenotip d'esfingolipidosi complexa, amb símptomes neurològics. El catabolisme de la ceramida s'entenia i s'acumulava ceramida en el cervell, fetge i ronyó. En el cervell, a més de l'acúmulo de ceramida i gangliòsids, apareixia una hipomielinització.

L'any 2001 es va generar un ratolí transgènic amb una mutació puntual en el domini de la saposina A (Matsuda i col., 2001). Aquest ratolí desenvolupava un fenotip semblant a la malaltia de Krabbe, degut a la deficiència de galactosilceramidasa.

Recentment s'han generat ratolins mutants pel gen *GBA* i pel gen *PSAP* (Sun i col., 2005). Aquests ratolins són nuls per al gen *PSAP* i homozigots per les mutacions D409H o V394L en el gen *GBA*, però a més expressen una còpia transgènica del gen *PSAP*. Aquests ratolins presenten llavors un fenotip semblant al dels mutants *GBA* però a més presenten afectació del sistema nerviós central.

3.9. TERÀPIA

S'han desenvolupat diferents teràpies per a la malaltia de Gaucher i les malalties lisosòmiques en general. En la **figura 1.30** es presenta un esquema de les diferents teràpies desenvolupades indicant els punts on s'està treballant per millorar-les. Bàsicament s'estàn utilitzant tractaments de suport, teràpia enzimàtica i teràpia de reducció de substrat, i s'està treballant en la millora d'aquestes teràpies: millora dels enzims per administrar en la teràpia enzimàtica, síntesi de nous inhibidors per a la teràpia de reducció de substrat o buscant noves metodologies (com el disseny de xaperones per corregir la hidrolasa deficient).

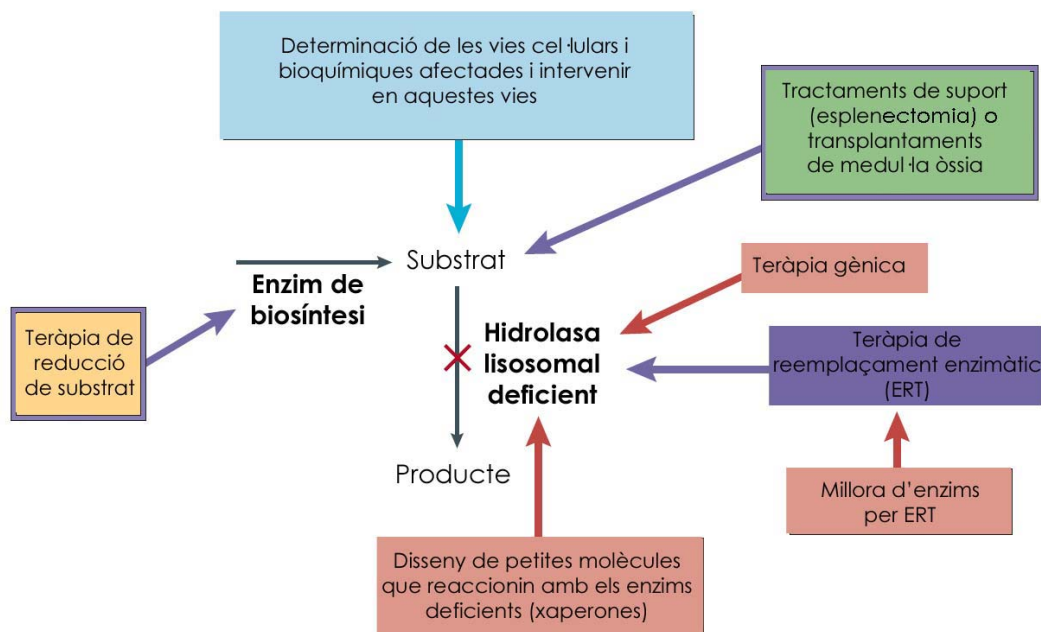


Figura 1.30. diferents estratègies terapèutiques utilitzades en la malaltia de Gaucher (figura adaptada de Futerman i van Meer, 2004).

3.9.1. TERÀPIA DE SUPORT

Els primers tractaments que es van aplicar en la malaltia de Gaucher van ser teràpies simptomàtiques, és a dir, la finalitat era pal·liar els símptomes que provocava la malaltia. Encara ara s'utilitzen en alguns casos o com a complement d'altres teràpies, com pot ser l'enzimàtica.

Un dels tractaments que s'han aplicat és la esplenectomia, o extracció de la melsa, que pot ser total o parcial. Aquest tractament està molt indicat en casos on l'augment de la melsa és molt gran i interfereix amb el desenvolupament i creixement normal. Ha estat molt efectiu contra la trombocitopènia i anèmia (Fleshner i col., 1991).

Per als problemes ossis s'utilitza la implantació de protesis, amb intervencions ortopèdiques, o per substituir la part afectada (Goldblatt i col., 1988), encara que aquest tipus d'intervencions no són molt aconsellables en nens perquè pot interferir en el creixement.

3.9.2. TRANSPLANTAMENT DE MEDULLA ÒSSIA

El fenotip de la malaltia de Gaucher es manifesta perquè es veuen afectats els macròfags derivats de les cèl·lules hematopoietiques. Aquestes cèl·lules es generen en la medulla òssia. Per aquest motiu s'han provat de fer transplantaments de medulla òssia.

Tot i que ha donat bons resultats en alguns casos (Ringden i col., 1995) i que és més barata que la enzimàtica, presenta alguns problemes greus. El principal inconvenient d'aquesta teràpia és trobar bons donants que siguin compatibles per fer el transplantament. S'ha descrit que un 10% dels pacients moren després del transplantament (Beutler, 1991).

3.9.3. TERÀPIA DE SUBSTITUCIÓ ENZIMÀTICA

La idea que les malalties d'acúmul lisosomal es podien tractar reemplaçant l'enzim que era defectiu per un enzim actiu va ser suggerit per primera vegada per de Duve l'any 1964.

Experiments realitzats amb fibroblasts de pacients de diferents malalties lisosomals havien demostrat que, en afegir l'enzim actiu corresponent al medi, les cèl·lules eren capaces de guanyar la funció que era deficient i degradar els substrats acumulats (Cantz i Kresse, 1974; O'Brien i col., 1973; Porter i col., 1971). També es va veure en aquests estudis que només amb un 1-5% de l'activitat enzimàtica es corregia el defecte enzimàtic en les cèl·lules.

Els primers intents d'aplicació d'aquesta teràpia, es van fer utilitzant glucocerebrosidasa de placenta no modificada (Brady i col., 1974). A les 24 hores de l'injecció de l'enzim es va aconseguir reduir el glucocerebròsid hepàtic en un 26% i els nivells en sang de l'enzim es van reduir fins a 4 vegades, arribant al rang normal, a les 72 h. Però el problema principal era que es necessitava molta quantitat d'enzim per a que fes el seu efecte en els macròfags i que era difícil obtenir-ne grans quantitats purificant-lo a partir de teixit placentari humà.

El descobriment de que les glicoproteïnes lisosomals sintetitzades *de novo* eren dirigides al lisosoma via receptors de manosa-6-fosfat (M6P) va permetre dirigir la glucocerebrosidasa als macròfags, millorant els efectes de la teràpia i establint la base del tractament de les malalties lisosomals per teràpia de reemplaçament enzimàtic (ERT) (Sly i col., 1978; Stahl i col., 1978).

En el cas de la glucocerebrosidasa per dirigir-la als macròfags, que eren les cèl·lules afectades, es va modificar l'enzim per a que quedessin els residus manosa esposats a l'exterior, que van veure que eren reconeguts pels macròfags (Furbish i col., 1981). Aquesta modificació augmentava 50 vegades la captació de l'enzim pels macròfags (Doebber i col., 1982).

A l'any 1991 es va aprovar aquesta teràpia per poder revertir l'acúmul de glucosilceramida.

El primer fàrmac administrat va ser la Ceredase® (infusió d'αglucerasa, Genzyme Corporation), que es purificava a partir de la glucosidasa placentària humana. Sobre aquest enzim purificat es modificava la cadena d'oligosacàrids, quedant els residus manosa-6-P exposats per a que fos reconeguda pels macròfags.

Posteriorment es va administrar el fàrmac Cerezyme® (infusió d'imiglucerasa, Genzyme Corporation), que s'utilitza des de l'any 1994. Aquest enzim es sintetitza per enginyeria genètica i també s'ha modificat per a que quedin els residus manosa exposats.

Aquest tipus de teràpia és adequada sobretot per malalts de tipus I, que no tenen afectació del sistema nerviós central, per què l'enzim administrat no pot creuar la barrera hematoencefàlica. Bàsicament actua reduint el tamany del fetge i la melsa, augmenta els nivells d'hemoglobina i plaquetes i millora la mineralització de l'òs.

La resposta al tractament es variable en cada pacient segons la manifestació de la malaltia. S'han descrit també alguns efectes secundaris, com són nausees, vòmits, diarrea, febre, dolor abdominal, etc. Per al cas de l'enzim recombinant, la l'imiglucerasa, aproximadament el 15% dels pacients desenvolupen anticossos contra l'enzim administrat. Per tots aquests motius el tractament es fa sota un estricte control mèdic. No obstant a l'actualitat hi ha més de 4300 pacients tractats (Brady, 2005). La majoria presenten una clara millora.

Els principals desavantatges d'aquesta teràpia és l'elevat preu del tractament i que no és una cura definitiva, sinó que implica un tractament per a tota la vida.

3.9.4. TERÀPIA DE REDUCCIÓ DE SUBSTRAT

Aquesta aproximació es basa en la reducció de la síntesi de GSLs fins al nivell que l'activitat residual de l'enzim permeti degradar els GSLs que entren en el lisosoma, és a dir, igualar la síntesi a la degradació per a que així no s'acumulin els GSLs no degradats.

Els inhibidors del primer pas de la síntesi dels GSLs poden ser utilitzats potencialment com a teràpia de malalties que acumulen productes derivats de la GlcCer. Això permet que aquests inhibidors es puguin utilitzar no només com a teràpia de la malaltia de Gaucher, sinó també en altres malalties on el substrat que s'acumula forma part d'aquesta via, com per exemple Fabry, Tay-Sachs, Sandhoff o gangliosidosi GM1.

Fins al moment s'han identificat dos grans grups d'inhibidors de la GCS, que és l'enzim que catalitza el primer pas de la síntesi dels GSLs, és a dir, la transferència de UDP-glucosa a la ceramida per formar la glucosilceramida.

El primer grup d'inhibidors és el format pel PDMP (D,L-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol) i els seus derivats, com el PPMP (D,L-threo-1-phenyl-2-

hexadecanoylamino-3-morpholino-1-propanol) (Vunnam i Radin, 1980) (**Figura 1.31**). Aquests compostos actuen competint amb la ceramida. Els anàlegs del PDMP no estan disponibles per a l'administració oral, ja que és citotòxic degut a la acumulació de ceramida que provoca.

El segon grup d'inhibidors identificats són els imino sucres. Fins al moment la majoria d'estudis per avaluar la teràpia de reducció de substrat s'han fet utilitzant com a inhibidor el NB-DNJ (*N*-butyldeoxynojirimycin). Aquests compostos també actuen competint amb la ceramida, però a més, sembla que pot evitar els canvis conformacionals de la GCS que requereix per a ser activa (Platt i Butters, 2000). El NB-DNJ no té efecte citotòxic en cèl·lules en cultiu, i s'excreta pels ronyons intacte *in vivo* (Platt i Butters, 1998).

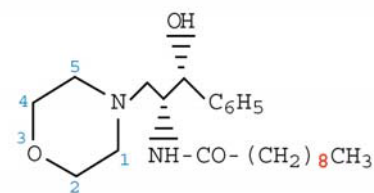
El NB-DNJ es va provar en cultius cel·lulars de cèl·lules model per a la malaltia de Gaucher i en animals model per la malaltia de Tay-Sachs (Platt i col., 1997a) i Sandhoff (Jeyakumar i col., 1999). En tots els casos s'aconseguia reduir els nivells de substrat acumulat. A més, en el cas dels animals model també s'aconseguia reduir aquest nivell en el sistema nerviós central, ja que aquest compost pot travessar la barrera hematoencefàlica.

El NB-DNJ va ser desenvolupat prèviament com a fàrmac antiviral. S'han fet estudis clínics en malalts de SIDA, provant que és ben tolerat en adults humans i que es pot aplicar com a teràpia en altres malalties.

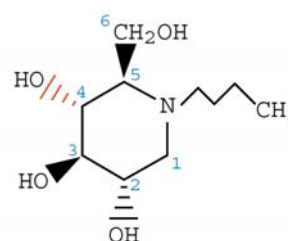
L'any 2003 es va aprovar el fàrmac, per al tractament de Gaucher Tipus I (Elstein i col., 2004) i per com teràpia d'ús compassiu s'ha aplicat en pacients de Niemann-Pick tipus C (Lachmann i col., 2004). El nom genèric del fàrmac és OGT918 o miglustat (Zavesca®). L'administració d'aquest fàrmac és oral, i s'indica per a aquells pacients a qui no es recomana la teràpia de reemplaçament enzimàtica o com a complement d'aquesta.

3.9.5. TERÀPIA DE TRANSFERÈNCIA GÈNICA

L'aplicació de la teràpia gènica com a tractament per a malalts de Gaucher comportaria la extracció de cèl·lules mare hematopoietiques del malalt provinents de sang perifèrica o de medul·la òssia, modificar-les *ex vivo*, és a dir, introduir el cDNA de la glucocerebrosidasa per reestablir la funció, i reintroduir aquestes cèl·lules que ara expressen l'enzim funcional en el malalt.



PDMP
(D,L-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol)



NB-DNJ
(*N*-butyldeoxynojirimycin)

Figura 1.31. Estructura molecular dels inhibidors PDMP i NB-DNJ (figura adaptada de Platt i Butters, 2000).

Els primers intents d'aplicació d'aquesta teràpia es van fer utilitzant retrovirus per introduir el cDNA del gen *GBA* normal en cèl·lules de pacients (Schuening i col., 1997; Dunbar i col., 1998). Es van començar a fer els primers assajos clínics amb pacients de la malaltia de Gaucher, però el principal problema era que no es mantenia l'efecte. La quantitat de cèl·lules transduïdes era massa baixa per augmentar l'activitat enzimàtica. A més, l'expressió gènica es mantenia només uns 3 mesos.

Per millorar l'eficiència de transducció i d'expressió es van provar altres vectors virics com són lentivirus o adenovirus, que sembla que són més eficients per transduir cèl·lules (Tsai i col., 2000; Luther-Wyrsh i col., 2001).

No obstant, els problemes més greus que planteja aquest tipus de teràpia són els generats pels vectors utilitzats. En el cas de retrovirus s'han produït problemes d'inserció a l'atzar en el genoma (Hacein-Bey-Abina i col., 2003) i en el cas dels adenovirus es generen problemes de resposta autoimmune (Raper i col., 2003).

3.9.6. TERÀPIA BASADA EN LA UTILITZACIÓ DE XAPERONES

Una altra estratègia que s'està posant a punt com a possible teràpia per a la malaltia de Gaucher es la utilització de xaperones químiques que afavoririen el plegament de la GlcCerasa mutada, augmentant la seva activitat.

S'ha descrit que *N*-(*n*-nonyl)deoxynojirimycin (NN-DNJ), administrat a fibroblasts de pacients portadors de la mutació N370S, afavoreix el plegament de l'enzim mutat i augmenta la seva activitat (Sawkar i col., 2002). De moment s'ha comprovat que aquestes xaperones funcionen també amb la mutació G202R, però no amb la L444P (Sawkar i col., 2005).

4. NOVES METODOLOGIES DE TERÀPIA GÈNICA

Com a conseqüència dels problemes plantejats per la teràpia de transferència gènica, en les diferents malalties en les que s'ha utilitzat, s'estàn desenvolupant noves alternatives que es podrien aplicar per a la teràpia gènica. Algunes d'aquestes són tècniques basades en reparació gènica, que es basen en la correcció de la mutació causant de la malaltia, o tècniques basades en la interferència d'RNA, que permeten inhibir l'expressió d'un gen.

4.1. TÈCNIQUES DE REPARACIÓ GÈNICA DIRIGIDA: ELS QUIMERAPLASTS

Les tècniques de reparació gènica es basen en la capacitat que té una cèl·lula de reparar un error en el DNA, per exemple, una mutació en un gen. Una de les tècniques utilitzades són els quimeraplasts, molècules quimèriques de RNA-DNA capaces de mitjançar el reemplaçament d'un nucleòtid per un altre.

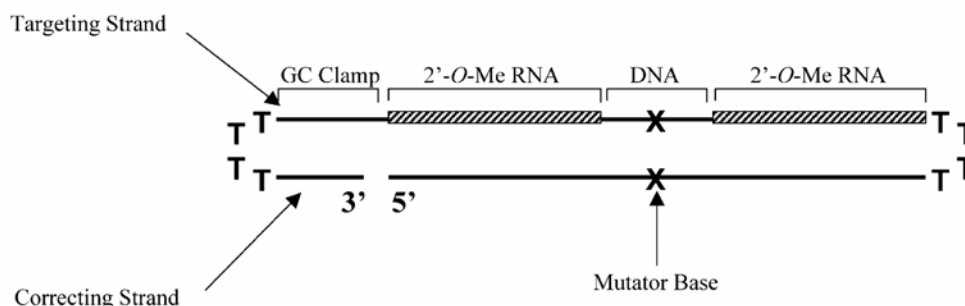


Figura 1.32. Estructura del quimeraplasts (Graham i Dickson, 2002)

La molècula utilitzada, el quimeraplasts o oligonucleòtid de RNA-DNA (RDO, 'RNA-DNA oligonucleotide'), és un oligonucleòtid de 68 nt de doble cadena, on una cadena és tota de DNA i l'altra està formada per 10 nucleòtids de 2'-O-methyl (2'-O-Me) RNA, seguida de 5 de DNA i 10 de 2'-O-Me RNA (**Figura 1.32**). La regió d'aquests 25 nucleòtids de DNA-RNA és homòloga a la regió que es vol corregir. El nucleòtid que es vol canviar està just al mig dels 5 nt de DNA. En principi la regió de RNA permet que la hibridació amb el DNA que es vol corregir sigui més estable.

El mecanisme d'acció d'aquestes molècules no està clar, però en principi es basaria en la capacitat que tindrien el quimeraplasts per induir la recombinació homòloga amb el DNA que es vol corregir, on estarien implicades proteïnes necessàries per aquest procés, com RecA (Gamper i col., 2000). Com es veu en la **Figura 1.33**, el quimeraplast s'intercala en el DNA,

hibridant-se amb la seqüència diana per la regió d'RNA i per la de DNA. L'aparellament erroni que es forma activa els sistemes de reparació de la cèl·lula, substituint el nucleòtid pel correcte.

L'utilització de quimeroplasts per induir la correcció de mutacions puntuals va ser proposat per primera vegada l'any 1996 (Yoon i col., 1996). El mateix any aquest grup van utilitzar els quimeroplasts per corregir una mutació responsable de l'anèmia de cèl·lules falciformes en cultius cel·lulars (Cole-Strauss i col., 1996).

En el moment de començar aquest treball, s'havia descrit la utilització d'aquesta tècnica amb èxit per introduir resistències a herbicides en plantes de tabac (Beetham i col., 1999) i de blat de moro (Zhu i col., 1999). S'havia utilitzat per corregir mutacions puntuals causants de malalties en cèl·lules en cultiu (Cole-Strauss i col., 1996; Yoon i col., 1996; Kren i col., 1997). També s'havia utilitzat *in vivo* en animals models per a diferents malalties, com per exemple en ratolí mutant per la distrofina (causant de distrofia muscular de Duchenne en humans) (Rando i col., 2000) o modificant el gen causant d'hemofília B (factor IX de coagulació) en rata (Kren i col., 1998).

Les avantatges d'aquesta tècnica com a eina de teràpia serien que no té cap limitació en quant al tamany del gen que es vol corregir i, a més, permet que el gen s'expressi a partir del seu propi promotor, en el lloc, moment i nivells adequats. El principal inconvenient però és que només pot corregir mutacions puntuals i insercions o delecions d'una sola base.

Basant-se amb la reparació gènica s'han utilitzat també oligonucleòtids de cadena senzilla (ssODN, single-stranded oligonucleotides) per corregir canvis puntuals utilitzant extractes cel·lulars (Igoucheva i col., 2001). Els ssODN són oligonucleòtids de DNA d'entre 25-60 nucleòtids que produirien aquesta correcció per un mecanisme similar al dels quimeroplasts, però hibridant-se només en una de les dues cadenes com es veu en la **figura 1.34**.

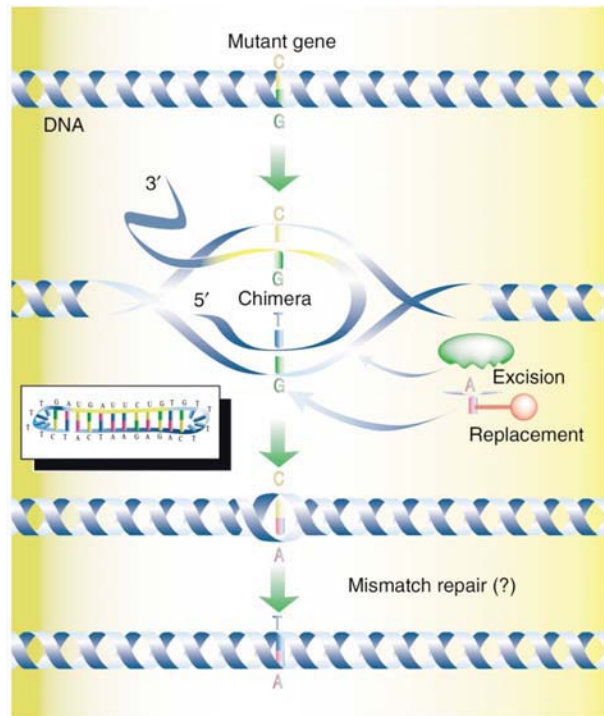


Figura 1.33. Mecanisme d'acció proposat per als quimeroplast (figura de Kmiec, 2003).

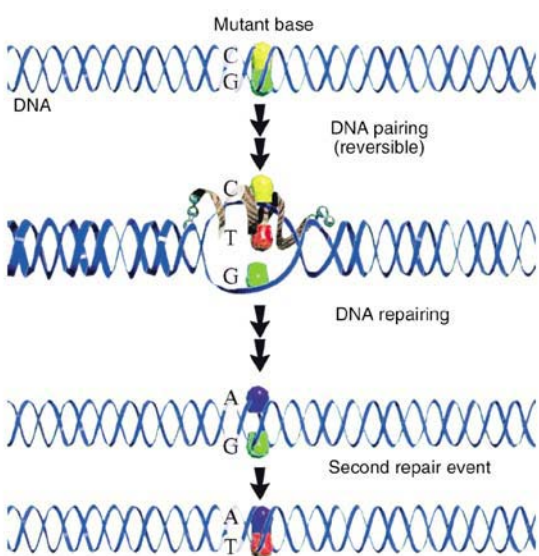


Figura 1.34. Mecanisme proposat per a l'acció correctora dels ssODN (figura adaptada de Kmiec, 2003).

4.2. TÈCNiques D'INTERFERÈNCIA D' RNA

El recent descobriment del fenomen de la interferència d'RNA (RNAi, 'RNA interference') ha estat una revolució com a tècnica d'estudi en biologia. Fa uns deu anys es va observar per primera vegada que un RNA de doble cadena (dsRNA, 'double-stranded RNA') exògen podia induir el silenciament de l'expressió d'un gen endògen en *Caenorhabditis elegans* (Fire i col., 1998). A partir d'aquest moment es va començar a estudiar aquest fenomen de regulació de l'expressió gènica mitjançant dsRNA i es va veure que estava conservat a la majoria d'organismes des de plantes a humans.

Per RNAi s'entén el procés pel qual un dsRNA pot reprimir, a nivell de transcripció i traducció, l'expressió d'un gen homòleg. Aquest dsRNA es processa en fragments de 21-28 nucleòtids de doble cadena, que s'anomenen siRNAs. Aquests siRNAs són els que reconeixen la diana. La seqüència nucleotídica del gen diana ha de ser exactament igual a la del siRNA per a que funcioni el silenciament. Hi ha dos maneres de que es generin aquests RNAs petits: a partir

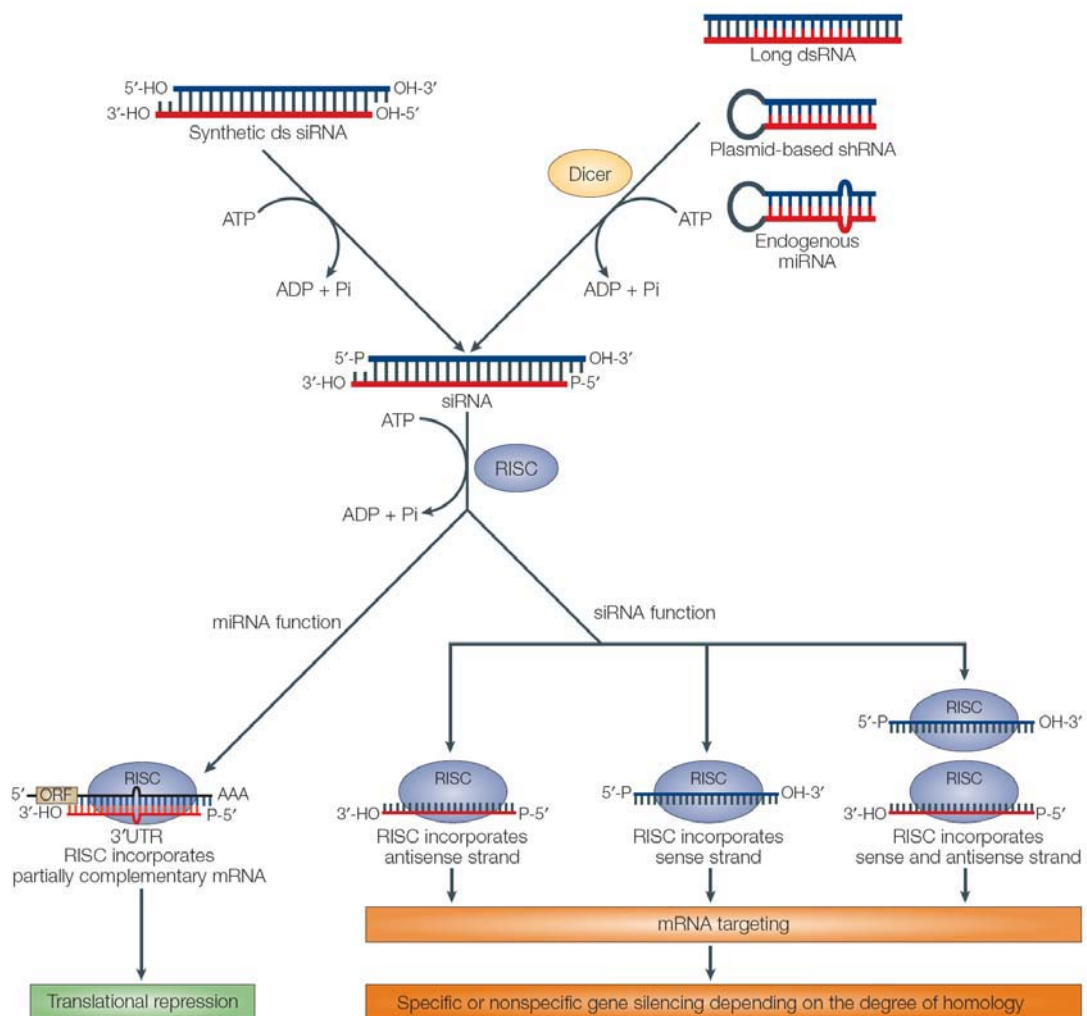


Figura 1.35. Procés de formació dels siRNAs i mecanisme d'acció de la interferència d'RNA (figura de Mittal, 2004).

del propi genoma (miRNAs o microRNAs) o a partir d'un dsRNA exògen (siRNA, 'small-interfering RNA').

El procés que segueix el dsRNA per generar la interferència d'RNA es mostra en la **figura 1.35**. El dsRNA es talla per a formar els siRNAs per una proteïna que s'anomena Dicer (Bernstein i col., 2001), que és capaç d'unir-se al dsRNA i tallar-lo. Aquests siRNAs poden inhibir la transcripció o la traducció d'un gen formant un complex amb ribonucleoproteïnes que s'anomena RISC (*RNA-induced silencing complex*) que permet a més degradar el mRNA (Hammond i col., 2000).

Quan es va començar a utilitzar aquesta tècnica en cèl·lules de vertebrats es va veure que la introducció en aquestes cèl·lules d'un dsRNA desencadenava una resposta interferent portant a la cèl·lula a l'apoptosi (Stark i col., 1998). Més tard es va veure que introduint directament a les cèl·lules de vertebrats petits RNAs de doble cadena, és a dir, siRNAs, s'aconseguia inhibir també l'expressió d'un gen (Elbashir i col., 2001).

A partir d'aquest moment de seguida es va pensar en poder aplicar les tècniques de RNAi en el camp de la teràpia.

Intentant millorar la tècnica es va descriure també una altra manera d'introduir els siRNAs en les cèl·lules de vertebrat, utilitzant un plàsmid que generi aquest petit RNA de doble cadena, que llavors s'anomena shRNA (*short-hairpin RNA*) (Brummelkamp i col., 2002).

Aquestes tècniques s'han utilitzat en el camp de la teràpia gènica des de diferents enfocaments i a diferents nivells.

D'una banda, a nivell de cultius cel·lulars, s'han utilitzat en malalties hereditàries dominants per inhibir només els al·lels mutats, ja que el siRNA pot reconèixer les diferències de l'al·lel mutat i el WT. És el cas de la demència frontotemporal amb parkinson lligada al cromosoma 17 (FTDP-17), que està causada per mutacions dominants en el gen Tau (Miller i col., 2003). També s'ha utilitzat per inhibir isoformes d'splicing aberrants, com en el cas de la deficiència d'hormona del creixement on s'aconsegueix inhibir la isoforma mutant i permetre que s'expressi només la WT (Ryther i col., 2004). En el camp on s'està aplicant més com a teràpia és en el del tractament de càncer. El RNAi pot ser una eina per inhibir aquells gens que se sobreexpressen en molts càncers, com s'ha fet inhibint el gen de fusió BCR/ABL causant de la leucèmia crònica mieloide (Wilda i col., 2002).

D'altra banda s'han utilitzat també *in vivo* en animals model per a diferents malalties. Per exemple s'ha aplicat amb èxit en animals models de la malaltia de Huntington (Harper i col., 2005) o en animal model per a esclerosi lateral amiotròfica (Ralph i col., 2005).

Darrerament s'han començat a desenvolupar els primers assajos clínics en humans utilitzant siRNAs per distrofia macular relacionada amb l'edat (AMD) (Check, 2005; Whelan, 2005).