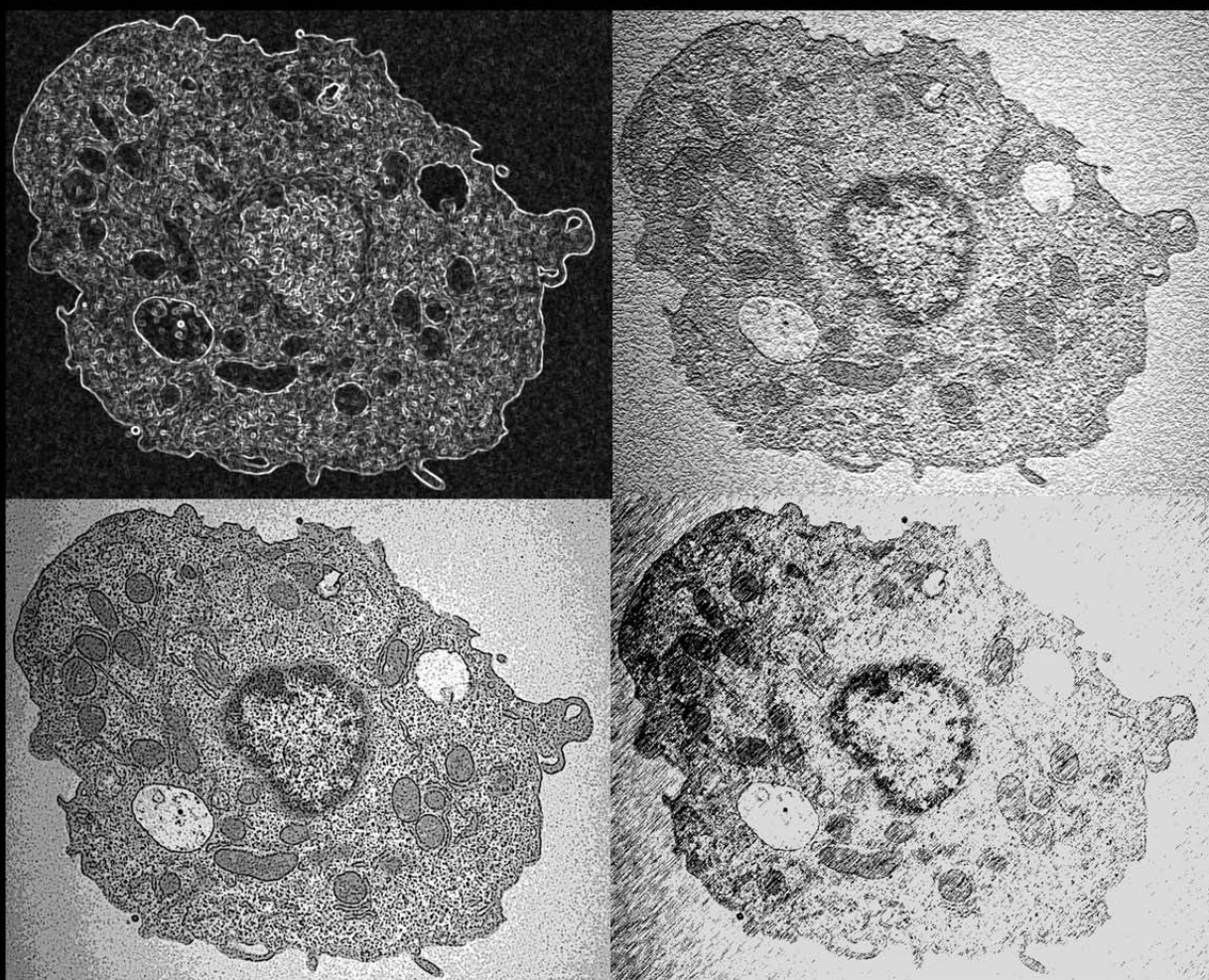


# Caracterització de mutacions causants de la malaltia de Gaucher. Aproximació a una teràpia gènica.



Anna Diaz Font  
2006

*Discussió*



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

El gen *GBA* i el seu pseudogèn (*GBAP*) tenen un elevat grau d'identitat nucleotídica, que és del 96%. Aquesta gran homologia entre ells ha dificultat el diagnòstic molecular de les mutacions causants de la malaltia de Gaucher. El diagnòstic mutacional es realitza mitjançant l'amplificació per PCR i posterior seqüenciació. És necessari el disseny d'uns encebadors específics per al gen *GBA*, per evitar l'amplificació del pseudogèn.

A més de la dificultat que comporta la presència del pseudogèn pel que fa al diagnòstic molecular, el pseudogèn pot ser la causa d'aparició de mutacions en el gen. Degut a l'elevada homologia entre el gen *GBA* i el *GBAP* i també a la poca distància que els separa (només 16 kb), les mutacions que es troben en el pseudogèn poden incorporar-se al gen per mecanismes de conversió gènica o d'entrecreuament desigual, donant com a resultat el que es coneix com a al·lels Rec o al·lels complexos.

Els primers al·lels Rec es van descriure l'any 1990 i van ser el RecNcil i el RecTL (Eyal i col., 1990). Inicialment aquests al·lels es van descriure com al·lels complexos que contenien els diversos canvis presents en el pseudogèn: L444P, A456P i V460V, en el cas de l'al·lel RecNcil, i aquests mateixos canvis més el D409H, en el cas de l'al·lel RecTL. Aquests al·lels es van definir també com a gens 'lepore'-like (referint-se a l'al·lel recombinant del gen de la  $\beta$ -globina anomenat Lepore), ja que estaven formats per una regió 5' del gen funcional i una 3' del pseudogèn (Strasberg i col., 1994).

Des del moment que es van descriure aquests al·lels es va posar de manifest que prèviament s'havien produït errors de diagnòstic. Per exemple es va comprovar que alguns pacients diagnosticats inicialment com homozigots per a la mutació L444P realment eren heterozigots per a aquesta mutació i en l'altre al·lel eren portadors d'un d'aquests al·lels Rec.

Aquests errors de diagnòstic eren deguts a la tècnica utilitzada per a detectar les mutacions. Com que era necessari utilitzar encebadors específics del gen per amplificar la regió genòmica d'interès, els al·lels Rec no es podien amplificar ja que part de la seqüència corresponia al pseudogèn.

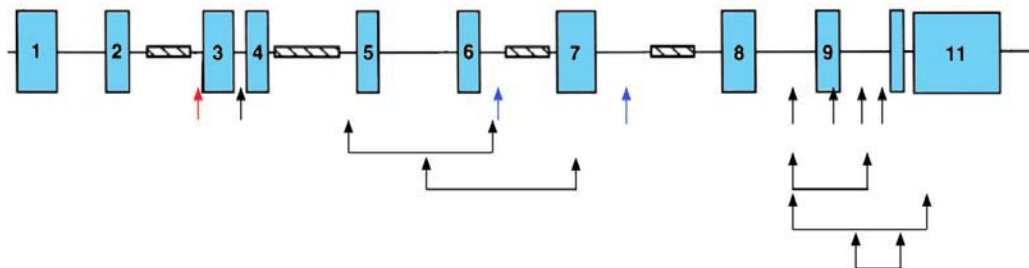
Tot i que els al·lels RecNcil i RecTL són els més freqüents, posteriorment s'han descrit altres al·lels causants de la malaltia de Gaucher deguts a recombinacions entre el gen i el pseudogèn. La majoria dels al·lels complexos s'han generat per entrecreuaments desiguals o conversions gèniques que afecten la regió 3' del gen *GBA*. Sembla ser que en aquesta regió les recombinacions són més freqüents, probablement pel fet que és la regió més homòloga entre el gen i el pseudogèn. Però en alguns pocs casos la recombinació que ha generat l'al·lel complex s'ha produït en la regió 5' del gen. Tots aquests al·lels són difícils de detectar, ja que han incorporat seqüències del pseudogèn des del punt on s'ha produït l'entrecreuament, i per tant, des d'aquest punt els encebadors específics de gen tampoc amplificarien.

Quan l'entrecreuament s'ha produït en la regió 5' del gen, l'al·lel ha incorporat pràcticament tota la seqüència del pseudogèn i es pot confondre amb una deleció completa del gen.

Un exemple d'aquest tipus d'errors és el cas del pacient caracteritzat en aquest treball que va ser diagnosticat erròneament com a homozigot per a la mutació N370S. Però la clínica que presentava era massa greu per a tenir aquest genotip. En analitzar mostres dels pares es va observar que només el pare era portador per a la mutació N370S.

Combinant diferents tècniques, de *Southern blot*, PCRs i seqüenciació hem pogut caracteritzar l'al·lel mutant Rec(int-2) (Cormand i col., 2000). Fins al moment l'al·lel complex descrit amb el punt d'entrecreuament més a 5' era l'al·lel RecA (Reissner i col., 1998), que el presentava a l'intró 3. En el cas del pacient analitzat vam poder descriure un nou al·lel complex amb la recombinació situada entre el final de l'intró 2 i l'inici de l'exó 3 del gen i el lloc homòleg del seu pseudogèn. És l'al·lel Rec amb la recombinació més a 5' descrit fins el moment.

En la **figura D.1** es presenta l'actualització dels al·lels Rec que s'han descrit com a resultat de recombinacions entre el gen i pseudogèn. Com es pot veure, la majoria d'al·lels complexos impliquen una recombinació en la zona 3' del gen, a partir de l'intró 8. Des de la publicació, a l'any 2000, del nostre treball s'han descrit dos nous al·lels Rec (Miocic i col., 2005; Zhao i col., 2003). El lloc on s'ha produït l'entrecreuament en tots dos al·lels està situat més a 3' del descrit per nosaltres (Cormand i col., 2000).



**Figura D.1.** Al·lels Rec descrits causats per recombinacions entre el gen GBA i GBAP responsables de la malaltia de Gaucher. Les fletxes marquen el lloc de l'entrecreuament. Si hi ha doble entrecreuament en la regió del gen es marca amb les dues fletxes i la línia que abarca la regió recombinada. En vermell es marca la mutació Rec del capítol 1.1 i en blau les noves mutacions Rec des de la publicació del treball (Cormand i col., 2000).

Aquestes dades ens demostren que les recombinacions entre el gen i el pseudogèn es poden donar en diferents llocs d'aquests, contràriament al que es pensava en principi, quan només s'havien trobat recombinacions que afectaven la regió 3' del gen. Tot i així, la major homologia entre el gen i el pseudogèn en la regió 3' facilitaria aquestes recombinacions desiguals i faria que fossin més freqüents en aquesta regió.

## De la mutació RecNcil

Com s'ha explicat anteriorment, la majoria d'al·lels Rec descrits es formen per recombinacions en la regió 3' del gen *GBA*, probablement per la major homologia entre aquest i el *GBAP* en aquesta regió. Però una altra dada que va ajudar a explicar això va ser la descripció en la regió propera al gen *GBA* i *GBAP* del gen de la *MTX* i el seu pseudogèn *MTXP*. La presència dels gens *MTX* i *MTXP* es va proposar com un factor que encara afavoriria més la generació d'al·lels Rec, per que es podrien donar entrecreuaments entre el gen *MTX* i *MTXP* que podrien afectar també al gen *GBA* (Tayebi i col., 2000).

Un d'aquests al·lels generats per recombinacions en la regió 3' del *GBA* és l'al·lel RecNcil, que és l'al·lel complex més freqüent, tot i que en la majoria de poblacions la freqüència d'aquest l'al·lel és molt baixa. En la població espanyola representa el 2.8% de les mutacions totals (Cormand i col., 1998a). Però en estudis previs fets en població argentina s'havia vist que la freqüència d'aquesta mutació era més elevada que en altres poblacions (21%) (Cormand i col., 1998b). Per aquest motiu vam analitzar el mecanisme mutacional que havia generat la mutació RecNcil en població argentina i també espanyola.

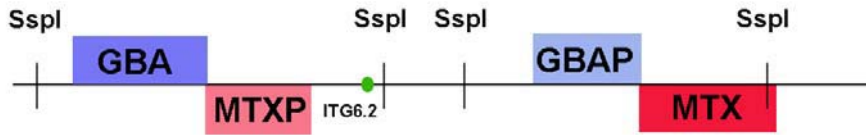
La mutació RecNcil s'havia caracteritzat per la presència en l'al·lel de tres canvis (L444P, A456P i V460V) que són presents en la seqüència del pseudogèn, és a dir, que d'alguna manera s'ha substituït una regió del gen per la seva homòloga del pseudogèn. Aquesta substitució s'hauria pogut donar per mecanismes de conversió gènica o per entrecreuaments desiguals.

En el nostre cas, per caracteritzar els al·lels Rec vam analitzar mostres d'individus que havien estat diagnosticats com a portadors de la mutació L444P. Aquests individus eren candidats a ser portadors d'un al·lel RecNcil.

Per analitzar el mecanisme que havia generat l'al·lel RecNcil vam utilitzar tres mètodes:

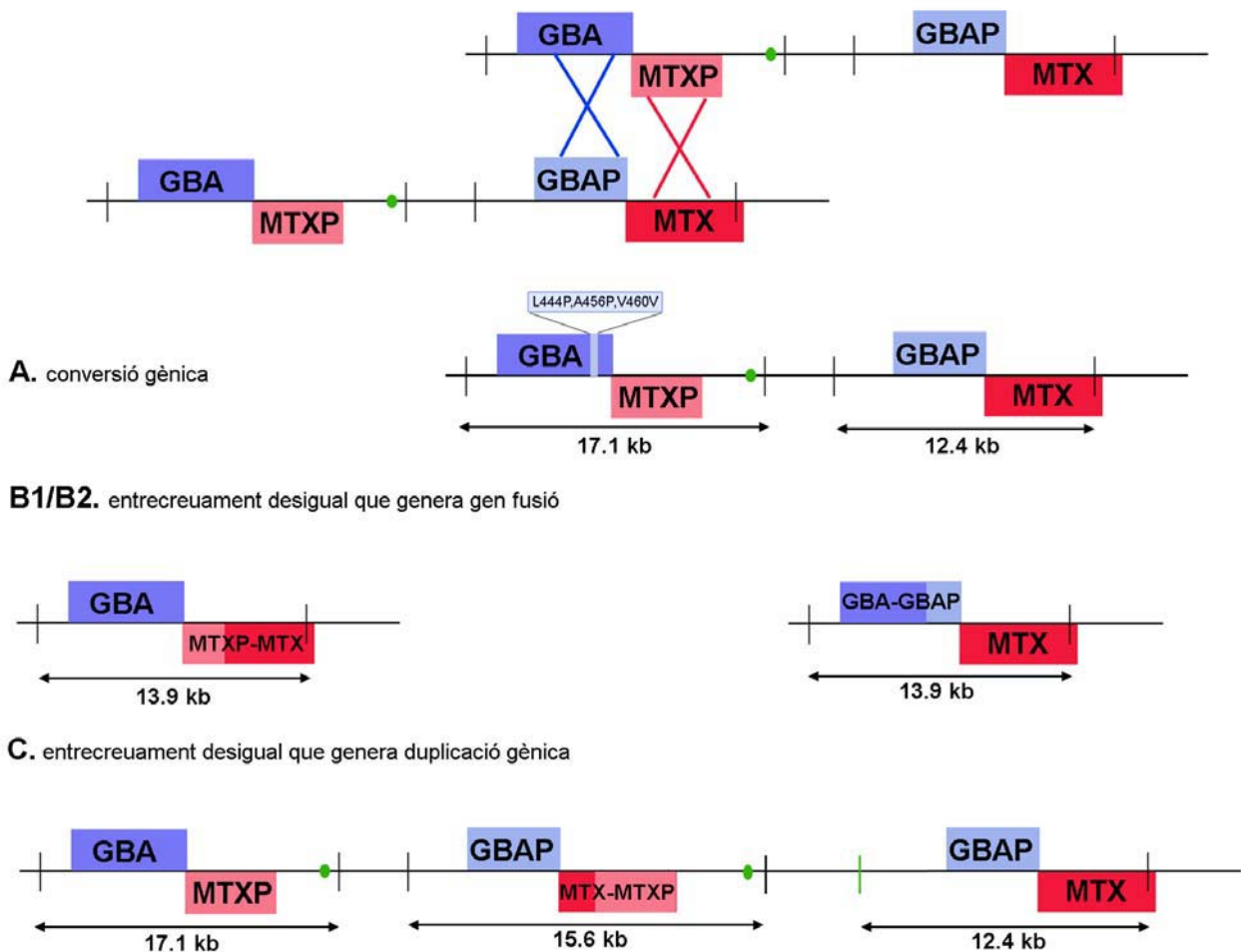
- \* Amplificació per PCR i seqüenciació de l'exó 10, que ens permetia veure quins individus eren portadors només de la mutació L444P o dels tres canvis de l'al·lel RecNcil.
- \* *Southern blot* amb l'enzim *Sspl*, que ens permetia veure reordenaments genòmics que s'haguessin generat.
- \* Anàlisi del polimorfisme ITG6.2 (Lau i col., 1999), que ens donava informació dels reordenaments genòmics a partir del número d'al·lels d'aquest polimorfisme que es trobaven. L'avantatge d'utilitzar l'anàlisi d'aquest polimorfisme era que es necessitava menys quantitat de mostra, i en individus dels que disposàvem de poc material ens va permetre veure si tenien reordenaments genòmics en la regió sense realitzar el *Southern*.

En la **figura D.2** es mostra l'estructura de la regió genòmica analitzada, la situació del gen *GBA* i el pseudogèn *GBAP* i del gen *MTX* i el pseudogèn *MTXP*, la posició de les dianes de l'enzim *Sspl* (utilitzat en el *Southern blot*), i del polimorfisme ITG6.2.



**Figura D.2.** Regió genòmica analitzada, on trobem el gen GBA i el pseudogèn GBAP (en blau), i el gen MTX i el pseudogèn MTXP (en vermell). Es mostren també la posició de les dianes Sspl i del polimorfisme ITG6.2.

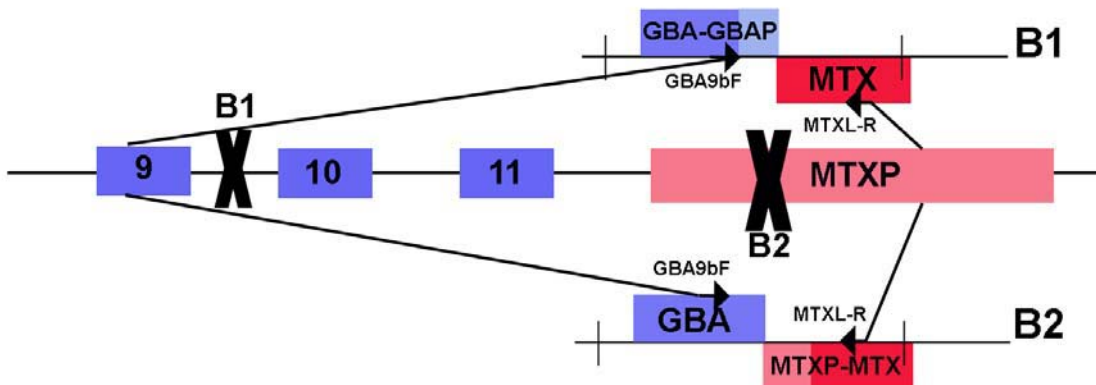
Segons el mecanisme que ha generat la mutació RecNcil en cada cas es van obtenir diferents patrons de Southern i es van poder observar diferents nombres de l'al·lel ITG6.2: conversió gènica (patró 17.1 kb -12.4 kb, que corresponen a la banda del gen i la del pseudogèn; 2 al·lells ITG6.2) i per entrecreuament desigual dos patrons diferents (17.1 kb -12.4 kb i 17.1 kb-13.9 kb -12.4 kb, on a més de les bandes del gen i pseudogèn trobem una banda extra que correspon al gen de fusió o a la duplicació que s'ha generat; trobem també 3 al·lells ITG6.2 o 1 al·lel respectivament). En la **figura D.3** es mostra l'esquema dels possibles reordenaments



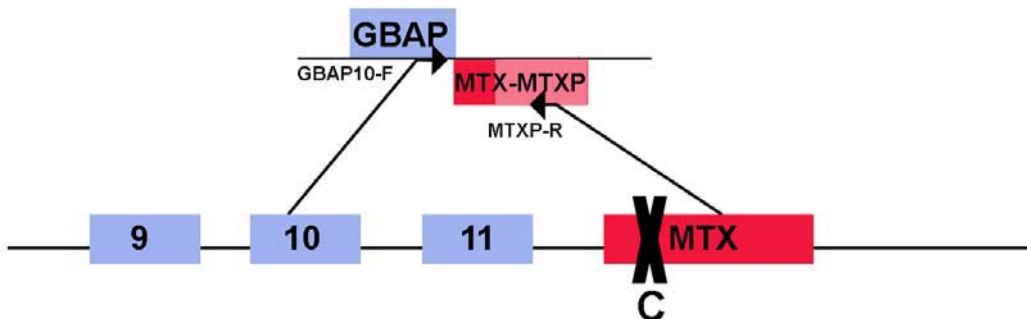
**Figura D.3.** Reestructuracions genòmiques generades pels diferents mecanismes. Podem trobar 3 patrons diferents (A, B i C) generats per conversió gènica o entrecreuament desigual.

A més dels *Southern blot* amb l'enzim *SspI* i l'anàlisi del polimorfisme ITG6.2, per trobar el punt on s'havia donat l'entrecreuament es van dissenyar PCRs que ens permetessin amplificar i seqüenciar aquestes regions on s'havien produït els entrecreuaments. Es van utilitzar encebadors específics del gen o del pseudogèn (tant de *GBA* com de *MTX*), depenent del reordenament que ens interessés analitzar. Així podiem amplificar el gen de fusió format o la duplicació gènica generada. En la **figura D.4** es mostra les regions amplificades.

**B1/B2.** Entrecreuament a nivell de *GBA* o de *MTX* amb gen de fusió



**C.** Entrecreuament a nivell de *MTX* amb duplicació gènica



**Figura D.4.** Regions amplificades per PCR que ens van permetre identificar el lloc d'entrecreuament. Amb **X** es marca el lloc on vam determinar que s'havia produït l'entrecreuament. Es mostren també els encebadors utilitzats (→).

Amb tota aquesta informació hem pogut relacionar els diferents patrons de *Southern*, els resultats de l'ITG6.2 i la informació de les regions amplificades per PCR i seqüenciades, amb el mecanisme que ha generat els diferents al·lels complexos:



🔗 **Estructura A** (patró 17.1-12.4 / 2 al·lells ITG6.2): aquest resultat el trobem en cromosomes controls, però també en individus que tenen les tres mutacions. En aquest cas les mutacions haurien passat del pseudogèn al gen per un mecanisme de conversió gènica.

Aquests al·lells, tot i ser al·lells complexos perquè són portadors de diferents canvis, a nivell genòmic no tenen cap reordenament. Possiblement per aquest mecanisme és com han passat al gen moltes de les mutacions que es troben al pseudogèn.

🔗 **Estructura B1/B2** (patró 17.1-13.9-12. / 1 al·lel ITG6.2): aquest tipus d'al·lel és el resultat d'una recombinació entre el gen i el pseudogèn amb la qual es produeix una deleció que inclou la regió 3' del gen fins la 3' del pseudogèn (aproximadament unes 20 kb), per això es perd 1 al·lel de l'ITG6.2. S'obté un gen de fusió, que en el *Southern* dóna una banda de 13.9 kb, format per pràcticament tot el gen menys la regió 3' que és del pseudogèn.

Aquest patró el trobem tant en individus que tenen les tres mutacions com en individus que només tenen la L444P. En aquest últim cas l'entrecreuament s'hauria produït més a 3' d'on es troben les tres mutacions en el pseudogèn i per això no les trobem. La L444P es podia haver donat per conversió gènica o per un altre mecanisme mutacional (independent del pseudogèn, mutació recurrent).

Els al·lells d'aquest patró serien els equivalents a altres al·lells complexos descrits, com el Rec(int-2) (al·lel Rec descrit en el capítol 1.1), però amb el punt de recombinació en la zona 3' del gen. Depenent d'on es produeixi aquesta recombinació trobarem unes mutacions o altres en el gen, que seràn totes les que hi ha en el pseudogèn a partir del punt de la recombinació fins a 3'. Si s'ha produït, com en el pacient A48, en l'intró 9 serà portador de les tres mutacions que caracteritzen els al·lells RecNcil.

De totes maneres són més freqüents els al·lells Rec de la regió 3'. Això podria ser perquè és en aquesta zona on el gen i el pseudogèn són més semblants. A més, és en aquesta zona on s'encavalquen les seqüències del gen i pseudogèn de GBA i amb el gen i pseudogèn de la metaxina (MTX i MTXP), que són també molt semblants, és a dir, que és una regió molt gran amb una alta homologia de seqüència que pot afavorir els entrecreuaments desiguals.

En alguns casos la recombinació que ha generat el gen de fusió s'hauria produït a nivell de MTX. Aquests al·lells els podem amplificar mitjançant una PCR, utilitzant un encebador específic del gen GBA i un específic del gen MTX. Així podem detectar al·lells complexos generats per una recombinació produïda entre la regió 3' del gen GBA i el gen MTX. En el cas que la recombinació s'hagués produït a nivell de MTX el fenotip patològic el causaria l'altra mutació que trobem el gen GBA, sigui la L444P o les mutacions que caracteritzen l'al·lel RecNcil.

✚ **Estructura C** (patró 17.1-15.6-12.4 / 3 al·lels ITG6.2): aquest al·lel complex és també conseqüència d'un entrecreuament desigual. De fet, és el cas recíproc del que origina la estructura B2. Però en aquest cas es produeix una gran inserció (unes 25 kb) que inclou la regió entre el gen i el pseudogèn, per això es guanya un al·lel de l'ITG6.2, obtenint una duplicació, que en el *Southern* té un tamany de 15.6 kb, formada per pràcticament tot el pseudogèn menys la regió 3' que és del gen.

Aquest patró l'hem trobat en cromosomes que tenen només la mutació L444P, en cromosomes que tenen els tres canvis i en cromosomes controls (no eren portadors de cap mutació). En aquest cas no depèn del punt on s'ha donat la recombinació, perquè tinguin la mutació que tinguin la trobem en el gen i no en la duplicació que es genera, és a dir, que serien fenòmens independents la recombinació i la mutació que porten en el gen.

Ja s'havia descrit la presència d'aquests al·lels en controls. En un estudi fet es van analitzar per *Southern blot* amb l'enzim *SspI* individus controls i es van trobar un 3.5% de cromosomes que portaven aquest tipus d'al·lel (Tayebi i col., 2000), que de fet és la mateixa freqüència que troben d'aquests al·lels, que es consideren al·lels *RecNcil*, en les poblacions de malalts analitzades. En el nostre cas vam trobar 1 cromosoma de 86 cromosomes analitzats (1,2%).

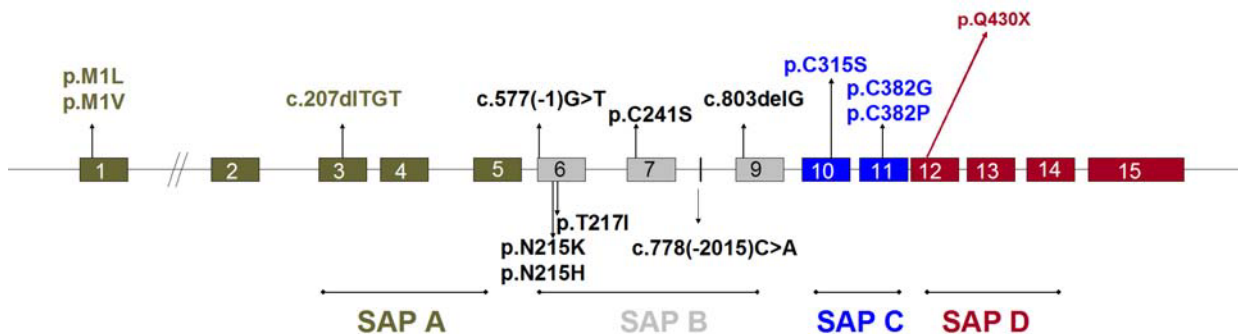
En aquest cas el lloc on s'ha produït la recombinació és entre el gen i el pseudogèn de la metaxina.

La presència de reordenaments en cromosomes d'individus controls fa pensar que possiblement no causen cap patologia, tant si és a nivell de *GBA* com a nivell de *MTX*. El fenotip patològic el causaria la mutació que detectem en el gen *GBA* del mateix cromosoma. El gen de la metaxina per la posició genòmica que ocupa es veuria afectat pels entrecreuaments que es donessin a nivell de *GBA*. Però també si es produeixen entrecreuaments a nivell de *MTX* afectarien al gen *GBA*.

S'ha volgut relacionar la presència d'un reordenament amb un fenotip amb Parkinson (Tayebi i col., 2001), justificant que el gen de la *MTX* està relacionat amb transport de proteïnes a la mitocondria i en els malalts de parkinson aquesta funció està alterada. Però aquesta associació no s'ha pogut demostrar.

## Del gen de la prosaposina (PSAP)

Fins al moment, només s'han descrit 14 mutacions en el gen de la PSAP responsables de diferents malalties (**figura D.5**). Sis d'elles, localitzades en el domini de la Saposina B, causen leucodistròfia metacromàtica (MLD), ja que la saposina B estimula la hidròlisi del grup sulfat del sulfàtid per l'Arilulfatasa A (Henseler i col., 1996; Holtschmidt i col., 1991; Kretz i col., 1990; Regis i col., 1999; Wrobe i col., 2000; Zhang i col., 1990). Aquestes mutacions s'han trobat en homozigosi.



**Figura D.5.** Mutacions descrites en el gen de la PSAP.

Dues altres mutacions, trobades també en homozigosi, estan associades a una deficiència combinada de totes les saposines. Una d'aquestes mutacions és la descrita en el codó d'iniciació ATG, que impedeix la formació del polipèptid prosaposina, el precursor de totes les saposines (Schnabel i col., 1992). L'altra mutació, una deleció d'1 parell de bases en el domini SAP-B, produeix una degradació del mRNA, segurament per un mecanisme de degradació del mRNA, conegut com a NMD ('nonsense-mediated decay'). Aquesta mutació es va trobar en la mare d'un pacient, que era homozigot per aquesta mutació (Hulkova i col., 2001).

La darrera mutació descrita ha estat una deleció del triplet TGT en el domini de la Saposina A (Spiegel i col., 2005). Aquesta mutació es troba en homozigosi en el pacient produint-li la malaltia de Krabbe.

S'han descrit tres pacients amb mutacions en el domini de la saposina C associades a la malaltia de Gaucher (Rafi i col., 1993; Schnabel i col., 1991; Amsallem i col., 2005). Això concorda amb el fet que la saposina C és l'activador de la glucocerebrosidasa. El darrer pacient descrit (Amsallem i col., 2005) té una mutació en el domini de la SAP C, p.C315S, i una segona mutació en la meteonina de l'inici (p.M1V), que afecta al tot el gen. Els dos primers pacients tenen cadascun d'ells dues mutacions diferents que afecten el mateix codó, la p.C382G i la p.C382F, i la segona mutació estava encara per identificar fins al moment. En aquest treball presentem la identificació de la segona mutació d'un d'aquests pacients.

Aquest pacient va heretar la mutació p.C382G del seu pare. La mutació materna s'esperava que fos també en el domini de la saposina C, perquè era un pacient diagnosticat

---

com a malalt de Gaucher. Però no es va identificar cap canvi en els exons 10 i 11 del gen de la PSAP, que són els que codifiquen per a la saposina C.

El següent pas va ser la seqüenciació de la regió promotora, perquè s'havia descrit prèviament que la mare d'aquest individu tenia la meitat de mRNA i això feia pensar que en la regió promotora hi pogués haver un canvi que no deixés que el gen es transcrivís. Però no vam trobar cap mutació patogènica en aquesta regió.

Finalment, la seqüenciació de la regió codificant sencera ens va permetre trobar una transició C>T en la posició 1288 del cDNA (c.1288C>T), donant lloc a un codó de parada prematur en l'exó 12 (p.Q430X). Aquest exó correspon al domini de la saposina D, on no s'ha descrit cap mutació fins ara. En principi no s'esperaria que una mutació en la saposina D causés la malaltia de Gaucher. Però la presència d'un codó de parada prematura podria portar a la degradació del mRNA per un mecanisme de NMD.

S'ha demostrat que els codons de parada prematura (PTC, 'premature termination codon') han d'estar com a mínim a 50 nucleòtids a 5' de la última unió exó-exó del gen per a desencadenar el procés de NMD (Nagy i Maquat, 1998). El PTC generat per la mutació p.Q430X compleix aquest requisit. Encara que no disposàvem de mostra per demostrar el NMD, l'observació que el mRNA de la PSAP en fibroblasts de la mare del malalt estava reduït al 50%, analitzat mitjançant un *Northern blot* (Rafi i col., 1993), recolza aquesta hipòtesi.

A més a més del pacient on vam trobar la mutació en el gen de la PSAP, vam analitzar dos pacients més que eren candidats a ser portadors de mutacions en el gen de la PSAP. Aquests pacients tenien un fenotip que semblava Gaucher tipus I, però tenien una activitat glucocerebrosidasa normal, cosa que feia pensar que les mutacions causants de la malaltia podien estar en el gen *PSAP*. Després de seqüenciar tot el gen no es va identificar cap mutació en aquests pacients causant de la malaltia. No obstant, en un d'aquests pacients vam identificar una nova variant polimòrfica en la posició IVS12+5G>A.

Vam analitzar aquest polimorfisme perquè s'havia descrit que el canvi en la posició +5 de la zona donadora d'*splicing* d'una G per una A podia ser una mutació patogènica (Danckwardt i col., 2002; Baralle et al., 2003; Diaz-Font i col., 2005). El fet de que aquest canvi no produís cap efecte a nivell de mRNA i que el trobéssim també en cromosomes d'individus control, confirmava que no es tractava d'una variant patogènica.

S'han descrit pocs casos de pacients amb mutacions en el gen de la *PSAP*. Només s'han descrit 14 mutacions en 12 pacients, i cadascuna s'ha trobat en un cas. En el cas de Gaucher només s'han descrit tres mutacions en el domini de la saposina C (C315S, C382F i C382G), les tres en les cisteïnes que es troben conservades en cadascun dels dominis SAPs.

## De la teràpia gènica

La teràpia gènica es va dissenyar amb la intenció que fos la correcció permanent del defecte en les malalties monogèniques, mitjançant la transferència del gen normal corresponent.

L'esforç que s'ha invertit en aquest camp es veu amb el gran nombre de assajos clínics que s'han desenvolupat. Com es pot comprovar en la **taula D.1**, s'han desenvolupat quasi 600 protocols de transferència gènica per a ús terapèutic, entre els quals en trobem 3 per a la malaltia de Gaucher. En un d'aquests protocols s'han utilitzat retrovirus aconseguint mantenir l'expressió del gen de la glucocerebrosidasa exògen durant 3 mesos (Dunbar i col., 1998).

Bàsicament, els vectors clàssics utilitzats han estat retrovirus i adenovirus. Però aquests vectors han generat diferents problemes en la seva aplicació. Els retrovirus poden produir problemes en integrar-se a l'atzar en el genoma, com es va descriure en el cas d'un noi tractat per a una immunodeficiència combinada severa lligada al cromosoma X (SCID-X1) que va desenvolupar una leucèmia (Hacein-Bey-Abina i col., 2003). En el cas dels adenovirus, un dels principals problemes que planteja es que es pot desencadenar una resposta immune, com es va descriure en el cas d'un pacient tractat per la deficiència d'ornitina transcarbamilasa (OTCD), que va morir com a conseqüència d'aquesta resposta immune (Raper i col., 2003). Però el principal problema és que el gen exògen es deixa d'expressar, s'acaba silenciant.

Amb l'objectiu de solucionar aquests problemes es continua treballant molt en aquest camp, sobretot en la millora de la transferència gènica, del disseny del vector i de les noves aplicacions terapèutiques. Actualment s'estan utilitzant nous vectors, com són els lentivirus i AAV ('adeno-associated virus'). No obstant, també s'estan desenvolupant altres tècniques no virals que permetin ser utilitzades com a eina terapèutica.

En el nostre cas, vam utilitzar mètodes no virals, com són els quimeroplasts i les tècniques de RNAi, com a possible estratègia terapèutica per a la malaltia de Gaucher.

<i>Trial type</i>	<i>Total*</i>
Marking	41
Nontherapeutic	6
Therapy	590
Infectious disease	41
Human immunodeficiency virus	38
Other viral disease	3
Monogenic diseases	59
Cystic fibrosis	23
Severe combined immunodeficiency	6
Hemophilia	5
Fanconi anemia	4
Alpha-1-antitrypsin deficiency	3
Canavan disease	3
Chronic granulomatous disease	3
Gaucher disease	3
Other†	9
Other diseases	73
Peripheral artery disease	26
Coronary artery disease	21
Eye disorders	4
Arthritis	4
Arterial restenosis	3
Ulcer	3
Renal disease	3
Other‡	12
Cancer (therapeutic approach)	417
Immunotherapy/in vivo transduction	151
Immunotherapy/in vitro transduction	120
Pro-drug/HSV-TK and ganciclovir	44
Tumor suppressor gene	38
Vector-cell directed lysis	27
Chemoprotection	12
Oncogene downregulation	10
Antisense	7
Other§	8
Total gene transfer protocols	637

**Taula D.1.** Protocols que existeixen de transferència gènica (taula de (Raper, 2005).

## **Dels quimeraplasts com a eina de teràpia gènica**

La primera vegada que es va parlar de quimeraplasts i la seva possible utilització com a eina de teràpia gènica va ser l'any 1996 (Yoon i col., 1996), on es describien els quimeraplasts com a molècules que eren capaces de corregir un gen mutat transfectat en cèl·lules en cultiu. El mateix any, en un article publicat a *Science*, el mateix grup descrivia la utilització dels quimeraplasts per corregir una mutació causant d'anèmia falcèmica (Cole-Strauss i col., 1996).

A partir d'aquell moment els quimeraplasts es van començar a utilitzar en el camp de la teràpia gènica, com a correctors de mutacions en diferents malalties (Li i col., 2001; Rando i col., 2000). També es van aplicar en el camp de la genètica de plantes, per generar resistència a herbicides (Beetham i col., 1999; Zhu i col., 1999), així com també es van utilitzar com a agents mutagènics, és a dir, utilitzaven els quimeraplasts per introduir una mutació en un punt concret (Ellis i col., 2001; Graham i Dickson, 2002).

En aquell moment, que va ser quan es va començar aquest treball, la utilització dels quimeraplasts semblava una tècnica amb un gran potencial terapèutic. És per això que ens vam plantejar utilitzar-los en el nostre cas. L'objectiu era corregir les mutacions causants de la malaltia de Gaucher. En el cas de la malaltia de Gaucher aquesta tècnica podia ser molt útil, ja que unes poques mutacions són les responsables de la majoria de casos de la malaltia. Per exemple, en el cas de la població espanyola, només amb 3 mutacions, que són la N370S, L444P i la D409H, s'expliquen més del 70% dels al·lèls Gaucher.

Una altra avantatge és que per evitar la patologia no cal tenir un 100% de l'activitat de l'enzim. De fet, molts individus homozigots per la mutació N370S se sap que poden ser assintomàtics. Això permet que encara que la eficiència de correcció sigui baixa pot ser suficient per corregir el problema enzimàtic.

Vam pensar que la mutació que seria més adequada per intentar la correcció podria ser la L444P, perquè en el cas de la població espanyola era la segona més freqüent (22.7% dels al·lèls). Tot i que la N370S és la més prevalent ens semblava que corregir la L444P era més útil, perquè la N370S està associada a fenotips més lleus mentre que la presència de la L444P dona fenotips greus.

Així, vam decidir fer l'assaig de correcció en fibroblasts d'un pacient que era homozigot per la mutació L444P. El fet que les cèl·lules fossin homozigotes per la mutació ens facilitava la feina, en quant a la detecció de la correcció, és a dir, per baixa que fos la eficiència de correcció havia de ser més fàcil detectar-la en un homozigot, que en individus heterozigots.

Tot i que vam aconseguir introduir els quimeraplasts i que aquests arribessin al nucli del fibroblasts (ho vam comprovar utilitzant un quimeraplast fluorescent) no aconseguíem detectar correcció de la mutació. Havíem analitzat quin era el mínim de correcció que es podia detectar utilitzant amplificació per PCR i digestió, i havíem comprovat que detectàvem a partir d'un 3% de presència de l'al·lel normal. Això volia dir que, si teníem correcció, havia de ser menor d'un

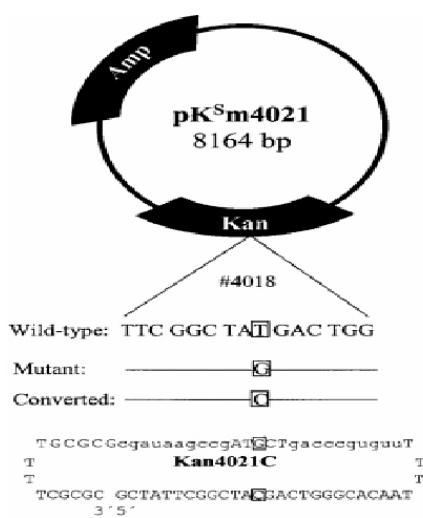
3%, ja que no la detectàvem. Fins aquell moment s'havien descrit eficiències de correcció d'entre un 20-40 % en animals *in vivo* (Kren i col., 1998; Rando i col., 2000), i entre un 11-35 % en cultius cel·lulars, que era el nostre cas (Yoon i col., 1996) (Tagalakis i col., 2001). En la **taula D.2** es presenten alguns exemples d'utilització dels quimeraplats i les eficiències de correcció descrites.

Gene	Syndrome	System used	Conversion rate quoted (%)
Alkaline phosphatase		CHO cells	30
$\beta^s$ globin	Sickle cell anaemia	Lymphoblastoid cells	
Alkaline phosphatase		Hepatoma cells	11
Factor IX	Haemophilia B	Rat, in vivo	40
Kanamycin-resistance		Cell-free extract	0.1
UGT1A1	Crigler-Najjar syndrome	Gunn rat, in vivo	20
Acetolactate synthase	Herbicide resistance	Tobacco Maize	
Tyrosinase	Albinism	Mouse, in vivo	
Dystrophin	DMD	<i>mdx</i> mouse, in vivo GRMD dog, in vivo	20
Apolipoprotein E	Atherosclerosis	CHO cells	35

**Taula D.2.** Diferents exemples d'aplicació dels quimeraplats i les eficiències de correcció obtingudes en cada cas. En blau es marca els exemples on s'han utilitzat en cèl·lules i en vermell on s'han utilitzat *in vivo* (figura adaptada de Graham i Dickson, 2002).

Vam pensar que un dels motius pels que no havia funcionat la correcció podia ser que les cèl·lules que estavem utilitzant no eren les adequades per obtenir freqüències elevades de correcció. Per comprovar-ho vam decidir utilitzar un mètode de correcció *in vitro* descrit, on es corregia una mutació incorporada en un plàsmid utilitzant l'extracte proteic de les cèl·lules que es volien provar (Cole-Strauss i col., 1999). Concretament, s'intentava corregir una mutació en el gen de resistència a la kanamicina incorporada en un plàsmid, que permetia discriminar les

cèl·lules corregides de les que no ho havien estat, perquè les primeres creixien en medi amb kanamicina.



**Figura D.6.** Esquema del plàsmid utilitzat per fer l'assaig de correcció *in vitro* i la seqüència de la regió amb la mutació, la WT i la corregida.

Es podia diferenciar el plàsmid corregit del WT perquè el nucleòtid mutat es substituïa, no pel WT que era una T, sinó per una C, que permetia que la proteïna funcionés igualment. Així per seqüència es podia distingir el plàsmid corregit (**Figura D.6**).

Aquest assaig s'havia descrit que funcionava amb cèl·lules hepàtiques, amb una eficiència de correcció del 0.1%. Tot i que era una correcció baixa permetia posar de manifest fàcilment el resultat, per la presència d'unes poques colònies en plaques amb kanamicina per cada 1000 que apareixien en plaques amb ampicilina. Per això vam utilitzar també, a més de

fibroblasts, una línia cel·lular hepàtica (HepG2) com a control positiu de l'experiment.

Però tampoc vam aconseguir cap resultat positiu amb aquest experiment. Les poques colònies obtingudes en kanamicina normalment eren contaminacions, que no vam poder arribar a seqüenciar mai per comprovar la correcció.

En aquest moment va aparèixer un article en la revista *Science* posant en dubte els resultats positius de correcció que s'havien obtingut durant aquests 6 anys (Taubes, 2002). Els autors remarcaven que la majoria d'articles que s'havien publicat eren del mateix grup, o de grups que col·laboraven o havien anat a realitzar els experiments en el laboratori on havien descrit la tècnica. Posaven en dubte la repetitivitat dels experiments, ja que a més a més, la revista havia entrevistat a uns 30 grups que havien treballat amb quimeroplasts i cap havia obtingut resultats positius.

Tot això concordava amb els nostres resultats negatius. A partir d'aquest moment es van publicar altres articles amb resultats negatius on havien utilitzat quimeroplasts, a més del nostre (Manzano i col., 2003; Rüter i col., 2003; Tagalakis i col., 2005).



## De l'RNAi com a eina de teràpia gènica

Fins al moment s'han utilitzat les tècniques de RNAi per inhibir l'expressió de diferents gens, tant exògens com endògens. En aquest treball s'han utilitzat per inhibir l'expressió del gen GCS, com a possible estratègia alternativa per a la teràpia gènica. De fet, la inhibició del enzim GCS ja s'està aplicant com a teràpia, utilitzant inhibidors de l'enzim, exactament el NB-DNJ. És la base de la teràpia de reducció de substrat.

El fet que la inhibició de l'enzim GCS s'estigui aplicant com a teràpia i estigui donant bons resultats reforçava la utilització de la interferència d'RNA per inhibir l'expressió del gen GCS i que això pogués ser aplicat terapèuticament.

La primera aproximació va ser la inhibició del gen GCS utilitzant siRNAs, bàsicament perquè ens permetia provar diferents seqüències diana sobre les que actuar i decidir llavors quina era la millor. Vam dissenyar i sintetitzar quatre siRNAs diferents situats en quatre exons diferents del gen que vam anomenar siRNA11 (en l'exó 2), siRNA34 (en l'exó 4), siRNA48 (en l'exó 6) i siRNA68 (en l'exó 8).

La selecció de les quatre seqüències diana es va fer seguint les regles que s'havien descrit fins al moment (Elbashir i col., 2002). Els criteris que es van tenir en compte van ser: la posició de la seqüència diana en el cDNA (no es van utilitzar seqüències situades en les regions 5'UTR o 3'UTR), el percentatge de nucleòtids GC en la seqüència (s'havia descrit que el contingut de GC havia de ser al voltant del 50%) i que l'estructura de les seqüències s'aproximin a l'estructura 5'-AA-(19nt)-UU-3'.

Un altre factor a tenir en compte en el disseny dels siRNAs era la posició de la seqüència diana en el context de l'estructura secundària del RNA. En principi, si aquesta seqüència es trobava en una regió on l'estructura era un *loop*, afavoria la unió del siRNA al RNA, millorant la seva eficiència d'inhibició.

La estratègia que vam seguir va ser transfectar cèl·lules HeLa, on prèviament havíem confirmat que el gen GCS s'expressava a uns nivells fàcilment detectables, amb els diferents siRNAs. Vam provar diferents reactius com a vehicles de transferència, determinant que la lipofectamina era el producte que ens donava millors resultats.

Dels quatre siRNAs sintetitzats, amb dos vam aconseguir reduir l'expressió del gen GCS: el siRNA11 i el siRNA68. Aquests dos siRNAs, a més de complir les regles descrites anteriorment, també tenien com a seqüències diana regions que adoptaven una estructura secundària en forma de *loop*.

L'expressió del gen GCS la vam quantificar primer a nivell de mRNA. Per fer-ho, vam utilitzar la Real Time PCR. Tot i que aquesta tècnica ens va permetre identificar quins dels siRNAs funcionaven, el problema que ens plantejava era que obteníem una gran variabilitat en els resultats. Per aquest motiu vam realitzar RT-PCRs semiquantitatives, per confirmar amb un altre mètode els resultats obtinguts amb la Real Time PCR.

Aquestes tècniques ens van permetre veure no només que els siRNAs 11 i 68 eren capaços de reduir l'expressió del gen GCS, sinó també que el siRNA11 era capaç de fer-ho més eficientment, perquè amb concentracions menors d'aquest siRNA ja obteníem reduccions en l'expressió del gen. Aquesta dada es va tenir en compte, perquè ens interessava utilitzar la mínima quantitat possible de siRNA, ja que està descrit que concentracions elevades de siRNAs poden produir una inhibició inespecífica (Jackson i col., 2003).

Per aquest motiu vam continuar treballant només amb el siRNA11. Per comprovar l'efecte del siRNA11 a nivell de proteïna, vam realitzar un assaig d'activitat *in vitro* de l'enzim GCS. Segons els resultats obtinguts en aquest assaig també aconseguíem reduir l'activitat de l'enzim.

Mitjançant els siRNAs vam aconseguir disminuir l'expressió del gen GCS. No era convenient que l'expressió s'anul·lés totalment, perquè la inhibició total de la GCS podria ser perjudicial. Com ja s'ha descrit, els GSLs són necessaris *in vivo* per al correcte desenvolupament i, a més, la inhibició total d'aquest enzim podria ser perjudicial per l'excés de ceramida que es podria acumular.

Se sap que la ceramida està relacionada amb processos d'apoptosi (Hannun i Luberto, 2000), tot i això en els cultius cel·lulars on havíem inhibit la GCS les cèl·lules creixien normalment i no es veia un augment d'apoptosi. Aquests resultats eren coherents amb el que ja s'havia descrit que en cultius cel·lulars semblava que els GSLs no eren necessaris, o almenys que les cèl·lules amb la GCS inhibida (o anul·lada) no morien (Yamashita i col., 1999).

També vam provar d'inhibir l'expressió del gen GCS utilitzant shRNAs, és a dir, siRNAs transcrits a partir de la seqüència introduïda en un plàsmid. L'avantatge de fer servir els shRNAs és que es poden seleccionar les cèl·lules transfectades, ja que el plàsmid conté un gen seleccionable, assegurant que totes les cèl·lules han rebut el shRNA, i que la inhibició del gen d'interès es pot mantenir durant tot el temps que convingui. En canvi, amb els siRNAs a partir del tercer dia des de la transfecció la inhibició es va perdre.

Vam generar els shRNAs que corresponien als siRNAs 11 i 68, que eren els que ens havien funcionat. Amb els shRNAs no aconseguíem una inhibició tan elevada com amb els siRNAs. Això podria ser degut a que el plàsmid utilitzat no funciona bé o perquè en aquest cas i amb les cèl·lules utilitzades els siRNAs siguin més eficaços que els shRNAs. En aquest sentit, Bantounas i col., (2004) han descrit que l'eficiència dels siRNAs i shRNAs depèn del tipus cel·lular i, en concret, en cèl·lules HeLa ells obtenen inhibició de l'expressió utilitzant siRNAs però no shRNAs.

Pensant en una futura aplicació en un model animal ens interessava posar a punt la inhibició de GCS en ratolí. En ratolí, el gen que codifica aquesta proteïna és l'*Ugcg*. Comparant la seqüència del gen humà i del gen de ratolí vam veure que la seqüència diana per al siRNA68 era idèntica en els dos gens.

Vam transfectar les cèl·lules RAW264.7 i WEHI-3B, ambdues línies cel·lulars de macròfags de ratolí, amb el siRNA68. Utilitzant la Real Time PCR vam veure que aquest siRNA era capaç de reduir l'expressió del gen *Ugcg* però només en les cèl·lules RAW264.7. Tot i utilitzar el mateix siRNA

per inhibir el mateix gen, en les cèl·lules WEHI-3B no observàvem cap efecte. Això podria ser causat per una menor eficiència de transfecció en aquestes cèl·lules o per una diferent capacitat del siRNA d'inhibir el gen en aquestes cèl·lules.

També vam transfectar les cèl·lules amb el shRNA68, però vam obtenir resultats similars als obtinguts en cèl·lules HeLa.

El fet que aquestes cèl·lules fossin macròfags de ratolí ens permetia disposar de cèl·lules on se sap que l'acúmul de glucosilceramida és major. Així doncs, potser es podien utilitzar per visualitzar l'acúmul de glucosilceramida en els lisosomes i la seva posterior desaparició un cop tractades amb el shRNA68.

Com s'havia descrit prèviament, en aquest tipus cel·lular es podia detectar l'acúmul de glucosilceramida, generat per la inhibició de la glucocerebrosidasa per epòxid- $\beta$ -conduiritol (CBE), utilitzant tècniques de microscopia electrònica (Platt i col., 1994a; Platt i col., 1994b). Ens vam plantejar realitzar aquest experiment per veure si podem generar aquest acúmul en les cèl·lules RAW264.7 tractant-les amb CBE i revertir l'acúmul transfectant-les amb el siRNA68, i detectar-ho amb el microscopi electrònic de transmissió. Però, malauradament, aquesta tècnica no ens va ser útil per quantificar aquest acúmul o la seva reducció.

Pensant en la seva possible aplicació com a teràpia, tot i que els resultats obtinguts són preliminars, el fet d'haver posat a punt la inhibició de l'enzim en cèl·lules de ratolí ens permetria provar-ho en animals model. L'avantatge d'utilitzar la inhibició de la GCS com a teràpia permet que es pogués aplicar en altres esfingolipidosis.

Pel que fa a l'administració dels siRNAs o shRNAs per al tractament d'aquestes malalties, darrerament s'estan provant diferents mètodes en animals model per diferents malalties. Entre d'altres, s'està estudiant l'administració de siRNAs en el cervell (Thakker i col., 2005), que podria ser molt útil en el cas de malalts d'esfingolipidosis amb neurodegeneració.

Darrerament s'han aprovat els primers assajos clínics utilitzant siRNAs en malalts d'AMD (Whelan, 2005; Check, 2005). Aquest fet obre un nou camí en l'aplicació d'una teràpia gènica basada en l'utilització de la interferència de RNA.

## **De la malaltia de Gaucher i la feina presentada en aquesta tesi**

La feina realitzada en aquesta tesi ens ha permès posar de manifest que la malaltia de Gaucher, tot i ser una malaltia monogènica, no és una malaltia senzilla. La caracterització de mutacions en el gen de la PSAP, així com la caracterització dels al·lels Rec ens demostra que la malaltia està influenciada per altres gens directa o indirectament.

Les mutacions descrites en el gen de la PSAP indiquen que aquest gen està directament relacionat amb la malaltia. De fet, no només amb la malaltia de Gaucher sinó en moltes malalties lisosomals. Aquest gen ja no s'analitza en pacients de la malaltia de Gaucher que ja han estat genotipats amb mutacions en el gen GBA. Però, és possible que variacions en el gen PSAP puguessin afectar al fenotip de la malaltia. Hi podrien haver canvis en la PSAP que influïssin en la seva funció afectant així el fenotip que manifesta el malalt. Possiblement canvis que afectessin la PSAP, tot i que no l'anul·lèssin totalment, podrien fer que alguna de les saposines, o en concret la saposina C per a la malaltia de Gaucher, tinguessin una afinitat diferent per l'enzim que està activant.

D'altra banda, les SAPs podrien tenir altres funcions o activar altres enzims que podrien afectar també el fenotip de la malaltia.

A més del gen de la PSAP, que afectaria directament al fenotip de la malaltia, hi haurien altres gens implicats, com seria el gen de la MTX, que en pacients portadors d'al·lels Rec podria estar alterat. Aquest gen també podria afectar al fenotip de la malaltia. No obstant, tot i que s'ha intentat relacionar amb la presència de la malaltia de Parkinson en pacients de la malaltia de Gaucher, no s'ha pogut establir una associació total. Si que se sap que en malalts de Gaucher hi ha una freqüència molt elevada de Parkinson (Goker-Alpan i col., 2004; Sidransky, 2005). Podriem dir que el fet de ser portador d'una mutació causant de la malaltia de Gaucher és un factor de risc. Però la causa concreta de perquè aquesta freqüència és més elevada no s'ha pogut establir.

Un altre factor a tenir en compte seria el nivell d'expressió o activitat que cada individu pogués tenir dels diferents enzims de la via de síntesi dels glicoesfingolípid, o concretament en el cas de Gaucher, de l'enzim GCS responsable de la formació de glucosilceramida.

Els gens que codifiquen aquests enzims podrien influir en la gran varietat fenotípica de la malaltia de Gaucher, i encara hi poden haver molts factors més que influeixin en el fenotip. De fet, la causa directa de la patologia encara no és coneix. Es proposa que part de la glucosilceramida acumulada podria sortir del lisosoma i actuar sobre l'homeostasi del Ca (Korkotian i col., 1999) o activar la formació de fosfatidilcolina (Bodennec i col., 2002). La interacció de la GlcCer amb diferents vies bioquímiques podria també influir en les variacions fenotípiques de la malaltia.

L'altre tema que s'analitza en aquest tesi és la utilització de diferents tècniques com a possible estratègia alternativa de teràpia gènica per a la malaltia de Gaucher. El fet que no s'hagi pogut aplicar una teràpia gènica convencional amb èxit, no només en aquesta malaltia sinó en general, ha fet que s'estiguin desenvolupant noves alternatives.

La utilització de quimeroplasts no va donar resultats satisfactoris, i per això vam desenvolupar una altra aproximació basada en la inhibició per RNAi. Aquesta estratègia sí ha donat resultats positius a nivell de cultius cel·lulars, i es podria comparar a la utilitzada en la teràpia actual de reducció de substrat, en la que s'inhibeix l'enzim GCS amb NB-DNJ.