

Anàlisi Genètica i Molecular de les Malalties Gangliosidosi GM1 i Morquio B

Memòria presentada per:

Raül Santamaria Merino

Per optar al grau de

Doctor per la Universitat de Barcelona

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de
la Dra. **Lluïsa Vilageliu Arquès** i el Dr. **Daniel Grinberg Vaisman**
al **Departament de Genètica** de la **Facultat de Biologia** de la
Universitat de Barcelona

Programa de Genètica (Bienni 2001-2002)

Els directors,

El doctorand,

Dra. Lluïsa Vilageliu Arquès

Dr. Daniel Grinberg Vaisman

Raül Santamaria Merino

Barcelona, Març 2007

ABREVIATURES

4MUB	4-Metilumbeliferil β -galactopiranosid
β -gal	β -galactosidasa
CHX	Cicloheximida
CoIP	Coimmunoprecipitació
CRM	<i>Cross-Reacting Material</i>
EBP	Proteïna d'unió a l'elastina (<i>Elastin-Binding Protein</i>)
ECM	Matriu Extracel.lular
EJC	<i>Exon Junction Complex</i>
ESE	<i>Exonic Splicing Enhancer</i>
ESS	<i>Exonic Splicing Silencer</i>
GAG	Glicosaminoglicà
GALNS	N-Acetilgalactosamina-6-sulfat sulfatasa
GSL	Glicoesfingolípíd
hnRNP	Ribonucleoproteïnes nuclears heterogènies
ISE	<i>Intronic Splicing Enhancer</i>
ISS	<i>Intronic Splicing Silencer</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LMC	Complex Multienzimàtic Lisosòmic (<i>Lysosomal Multienzyme Complex</i>)
LSD	Malalties d'acumulació lisosòmica (<i>Lysosomal Storage Disorders</i>)
M6P	Manosa-6-fosfat
MPS	Mucopolisacaridosi
NAS	<i>Splicing</i> alterat per canvis sense sentit (<i>Nonsense-associated Altered Splicing</i>)
NMD	Degradació d'mRNA deguda a PTCs (<i>Nonsense-Mediated Decay</i>)
PPCA	Proteïna Protectora (<i>Protective Protein/Cathepsin A</i>)
PTC	Codó d'aturada prematur (<i>Premature Termination Codon</i>)
RE	Reticle Endoplasmàtic
SMA	Atròfia Muscular Espinal
SNC	Sistema Nerviós Central
snRNA	RNA nuclear petit
snRNP	Ribonucleoproteïnes nuclears petites
UPR	Resposta a Proteïnes mal plegades (Unfolded Protein Response)

FIGURES

Introducció

1. Estructura d'un lisosoma	5
2. Esquema de la síntesi dels enzims lisosòmics	6
3. Degradació de productes al lisosoma	7
4. Bases bioquímiques i cel.lulars de les LSDs	11
5. Síntomes clínics de la Gangliosidosi GM1	17
6. Estructura del Gangliòsid GM1	21
7. Ruta de degradació del Gangliòsid GM1	22
8. Estructura del Queratà sulfat	23
9. Nivells d'activitat de la β -gal a plasma i leucòcits	30
10. Esquema del gen <i>GLB1</i>	32
11. Funció de l'EBP	33
12. Mecanisme general del procés d' <i>splicing</i>	41
13. Seqüències consens dels llocs donadors i acceptors d' <i>splicing</i>	42
14. Tipus d' <i>splicing</i> alternatiu	43
15. Funcionament del procés d'NMD	49

Discussió

16. Distribució de les noves mutacions al gen <i>GLB1</i> descrites en aquest treball	134
17. Efecte de la mutació c.902C>T	135
18. Model proposat per l' <i>splicing</i> alternatiu pel gen <i>GLB1</i>	146

TAULES

Introducció

1. Llistat de LSDs	10
2. Principals característiques clíniques associades als diferents subtipus de gangliosidosi GM1	16
3. Activitats residuals de la β -gal als diferents pacients	27
4. Llista de mutacions i polimorfismes descrits al gen <i>GLB1</i>	35-36
5. Funcions en les que s'ha descrit que intervien les proteïnes SR	47

Discussió

6. Correlació fenotip-genotip	137
-------------------------------	-----

Índex

Breu presentació	3
1. Malalties d'acumulació lisosòmica	5
1.1 El lisosoma	5
1.2 Les malalties d'acumulació lisosòmica (LSD). Classificació.....	8
1.3 Les malalties d'acumulació lisosòmica (LSD). Clínica i teràpia.....	11
2. La Gangliosidosi GM1 i la malaltia de Morquio B	15
2.1 Gangliosidosi GM1. Aspectes històrics i clínics.....	15
2.2 Malaltia de Morquio B. Aspectes històrics i clínics.....	18
2.3 Un gen. Perquè 2 malalties?.....	19
2.4 Bioquímica	20
2.4.1 Els substrats	20
2.4.1.1 El gangliòsid GM1	21
2.4.1.2 El queratà sulfat	23
2.4.1.3 Els oligosacàrids	24
2.4.2 L'enzim β -galactosidasa	24
2.4.2.1 Síntesi	24
2.4.2.2 Interaccions de la β -galactosidasa	25
2.4.2.3 Activitat de la β -galactosidasa	27
2.5 Patologia cel.lular	28
2.6 Diagnòstic	29
2.7 Genètica	31
2.7.1 El gen <i>GLB1</i>	31
2.7.2 L' <i>splicing</i> alternatiu del gen <i>GLB1</i>	31
2.7.3 Correlacions genotip-fenotip	35
2.8 Teràpia	37
2.9 Models animals	39
3. <i>Splicing</i> i <i>splicing</i> alternatiu	41
3.1 Les proteïnes SR	44
3.2 L' <i>splicing</i> i l'NMD	48
3.3 Els minigens	50
OBJECTIUS	53

Informe sobre la contribució del doctorand en els resultats d'aquesta Tesi Doctoral	59
Capítol 1. Estudi mutacional de diferents poblacions de malalts amb Gangliosidosi GM1 i malaltia de Morquio B	61
1.1 Estudi mutacional de pacients espanyols amb Gangliosidosi GM1 i malaltia de Morquio B.....	63
<u>Treball publicat:</u> "Twenty-one novel mutations in the <i>GLB1</i> gene identified in a large group of GM1-gangliosidosis and Morquio B patients: possible common origin for the prevalent p.R59H mutation among Gypsies."	
1.2 Estudi mutacional de pacients Sudamericans, principalment Argentins, amb Gangliosidosi GM1.....	65
<u>Treball publicat:</u> "Identification of 14 novel <i>GLB1</i> mutations, including five deletions, in 19 GM1-gangliosidosis patients from South-America."	
Capítol 2. Anàlisi funcional de variants proteiques de la β-galactosidasa.	67
2.1 Anàlisi funcional de variants mutades del gen <i>GLB1</i> trobades a pacients amb Gangliosidosi GM1 o malaltia de Morquio B.....	69
<u>Treball en preparació:</u> "Functional Analyses of 14 <i>GLB1</i> Mutant Alleles Found in GM1-gangliosidosis and Morquio B patients: Effect on the Lysosomal Multienzyme Complex ."	
2.2 El cas d'una nova pseudodeficiència: Estudi de la variant p.R595W del gen <i>GLB1</i>	91
<u>Treball sotmès a publicació:</u> "Identification of a novel pseudodeficiency allele in the <i>GLB1</i> gene in a carrier of GM1-gangliosidosis."	

Capítol 3. Estudi del procés d'*splicing* alternatiu del gen *GLB1* 103

3.1 Anàlisi dels mecanismes implicats en el procés d'*splicing*
alternatiu del gen *GLB1*.....105

Treball en preparació: "Analysis of the alternative splicing of
the *GLB1* gene: effect of the NMD and the SR proteins."

DISCUSSIÓ 127

Perquè cerquem mutacions?129

Les mutacions a *GLB1*. Aspectes poblacionals 131

Les mutacions a *GLB1*. Mutacions noves134

Correlació genotip-fenotip137

L'expressió de proteïnes mutades ens informa sobre l'efecte de les
mutacions139

Anàlisi de les interaccions de la β -galactosidasa143

L'estudi dels mecanismes bàsics dels processos post-
transcripcionals, tals com l'*splicing*, ens aporta nova informació
sobre els gens145

La gangliosidosi GM1 i la malaltia de Morquio B.
Avenços d'aquesta tesi150

CONCLUSIONS 153

BIBLIOGRAFIA 159

COL.LABORACIONS EN ALTRES PROJECTES 175

Introducció

Breu presentació

Les malalties gangliosidosi GM1 i Morquio B són dues entitats clíniques descrites originalment com dues malalties diferents però que són causades per mutacions en un mateix gen, el gen *GLB1*. Aquestes mutacions provoquen una pèrdua total o parcial de l'activitat de l'enzim lisosòmic β -galactosidasa. La pèrdua d'activitat d'aquest enzim lisosòmic provoca que en els malalts s'acumulin els substrats que normalment degrada aquest enzim: el gangliòsid GM1, el queratà sulfat i diferents oligosacàrids proteics. És per això que aquestes malalties s'inclouen dins del grup de malalties d'acumulació lisosòmica (LSDs).

La distinció entre les dues malalties es deu a diferències clíniques i bioquímiques, ja que mentre la gangliosidosi GM1 té com a principal tret un retard psicomotor més o menys greu amb gran acumulació del gangliòsid GM1, en la malaltia de Morquio B no hi ha afectació neurològica i els principals símptomes són diferents problemes esquelètics amb gran acumulació de queratà sulfat.

Per altra banda, cal esmentar que el gen *GLB1*, que està format per 16 exons que codifiquen la β -galactosidasa, també pot codificar una altra proteïna, l'EBP (*Elastin Binding Protein*), per un procés d'*splicing* alternatiu. En aquest *splicing* alternatiu s'eliminen 3 exons i un altre queda en una pauta de lectura diferent, pròpia i necessària per al correcte funcionament de l'EBP. La funció que té l'EBP és d'acompanyar la tropoelastina per la cèl.lula i permetre la correcta elastogènesi.

En la introducció d'aquesta tesi es farà una breu descripció de les LSDs abans d'explicar les característiques específiques de la gangliosidosi GM1 i la malaltia de Morquio B. Per últim, es veurà quins són els mecanismes generals que regulen els processos d'*splicing* constitutiu i *splicing* alternatiu, així com la manera d'abordar el seu estudi.

1. Malalties d'acumulació lisosòmica

Les malalties d'acumulació lisosòmica són, com el seu nom indica, un conjunt de malalties en les que una disfunció en el lisosoma acaba provocant l'acumulació d'algun producte que normalment hi seria degradat. És per això que abans de començar a parlar d'aquestes malalties s'explicarà breument quin és el paper del lisosoma a la cèl.lula.

1.1 El lisosoma

Els lisosomes són uns orgànuls membranosos de la cèl.lula que van ser descrits per primer cop per De Duve (1955) com un conjunt de partícules amb propietats lítiques. En realitat, però, hauríem de parlar d'ells com una part del "sistema endosomal-lisosomal" o "aparell vacuolar", com anomenaria posteriorment el propi De Duve junt amb Wattiaux al conjunt de vesícules membranoses cel.lulars que tenen com a principal funció la degradació tant d'elements cel.lulars propis com d'elements extracel.lulars (De Duve i Wattiaux, 1966). Aquestes vesícules inclouen els endosomes primerencs, els endosomes tardans i els lisosomes, i constitueixen una cadena de transport i digestió de les molècules i estructures endocitades i autofagocitades, además de tenir una funció en la classificació i reciclatge de totes aquestes molècules digerides. Són doncs un conjunt de cossos multivesiculars que contenen un complex sistema d'endomembranes i que estan involucrats tant en la degradació com en el reciclatge de proteïnes i lípids (Gruenberg i Stenmark, 2004).

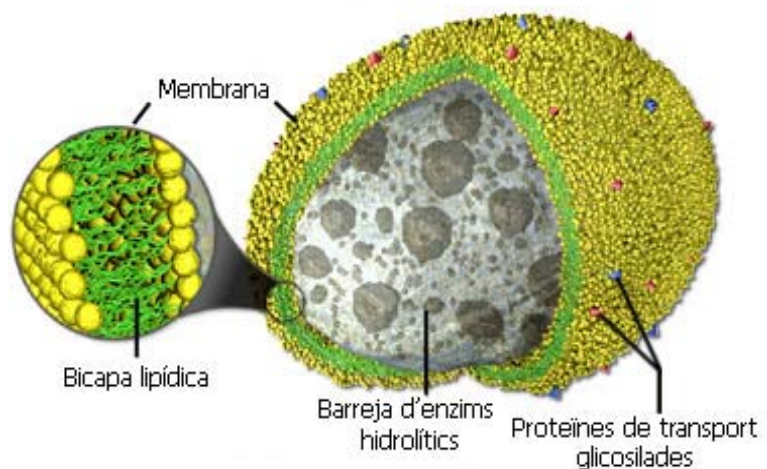


Figura 1.
Estructura d'un lisosoma.

Tot i que encara ara està en discussió si tot aquest conjunt de vesícules són una única estructura en diferents estadis de maduració o si realment són diferents estructures, es pot dir que els lisosomes serien el darrer pas en aquesta cadena digestiva. Aquests estarien formats per una membrana externa que al seu torn envolcallaria un conjunt de vesícules membranoses que inclourien tot un ventall d'enzims amb capacitats lítiques que es trobarien tant al lumen del lisosoma com en la seva membrana (Sandhoff i Kolter, 1996) (Fig.1). Els darrers estudis han comptabilitzat aquests enzims en unes 50-60 hidrolases solubles i com a mínim 7 proteïnes integrals de membrana (Eskelinen i col., 2003). La principal característica bioquímica dels lisosomes rau en el baix pH que hi ha al seu lumen. Aquest baix pH s'aconsegueix gràcies a una bomba ATPasa protònica que amb consum d'ATP permet mantenir el pH acídic necessari per al correcte funcionament dels enzims lisosòmics.

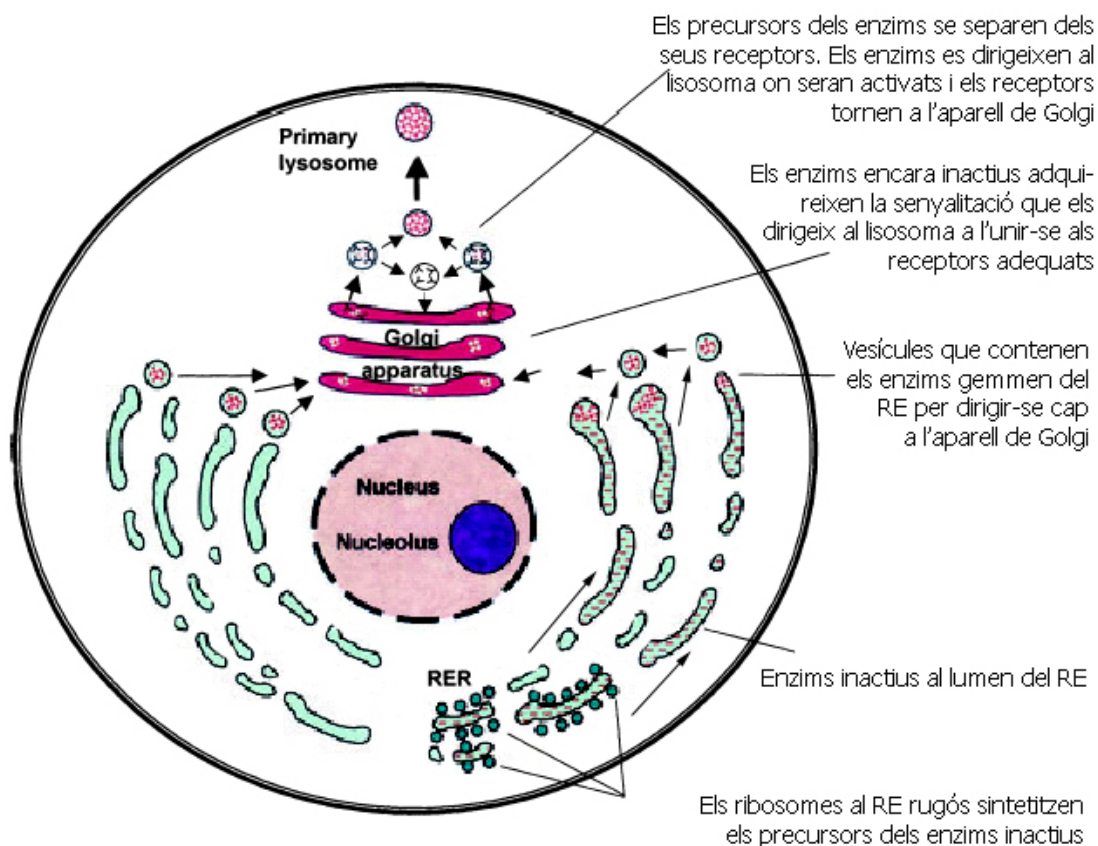


Figura 2. Esquema de la síntesi dels enzims lisosòmics. Els enzims lisosòmics són sintetitzats al RE i després direccionalitzats, a través de l'aparell de Golgi, cap als lisosomes, tal com indiquen les fletxes. Modificat de Vellodi (2005).

Els enzims lisosòmics són glicoproteïnes que es mantenen inactives durant el seu procés de síntesi ja que només són actives en el baix pH del lisosoma. La seva síntesi es realitza via reticle endoplasmàtic (RE), com es pot veure a la figura 2. La seva direccionalització cap al lisosoma l'aconsegueixen a l'aparell de Golgi. Concretament al *cis*-Golgi incorporen una manosa-6-fosfat (M6P) que és el senyal que indica que un enzim ha de ser dirigit cap al lisosoma. Més endavant, al *trans*-Golgi, s'uneixen al receptor de M6P que els dirigeix cap a l'endosoma tardà on el baix pH fa que receptor i enzim se separin. Per altra banda, alguns enzims com la glucocerebrosidasa són dirigits cap al lisosoma sense necessitat del senyal M6P per un mecanisme encara no gaire conegut. Els darrers passos en la maduració dels enzims lisosòmics impliquen processos proteolítics, de correcte plegament i d'agregació amb altres proteïnes. Amb tot això s'aconsegueix una direccionalització efectiva dels enzims cap al lisosoma així com una inactivitat de tots aquells que no arribin al lisosoma per l'absència de pH baix, per la manca de la maduració específica o per l'absència de cofactors específics que són en molts casos necessaris per a que els enzims siguin funcionals (revisat a Sandhoff i Kolter, 2003).

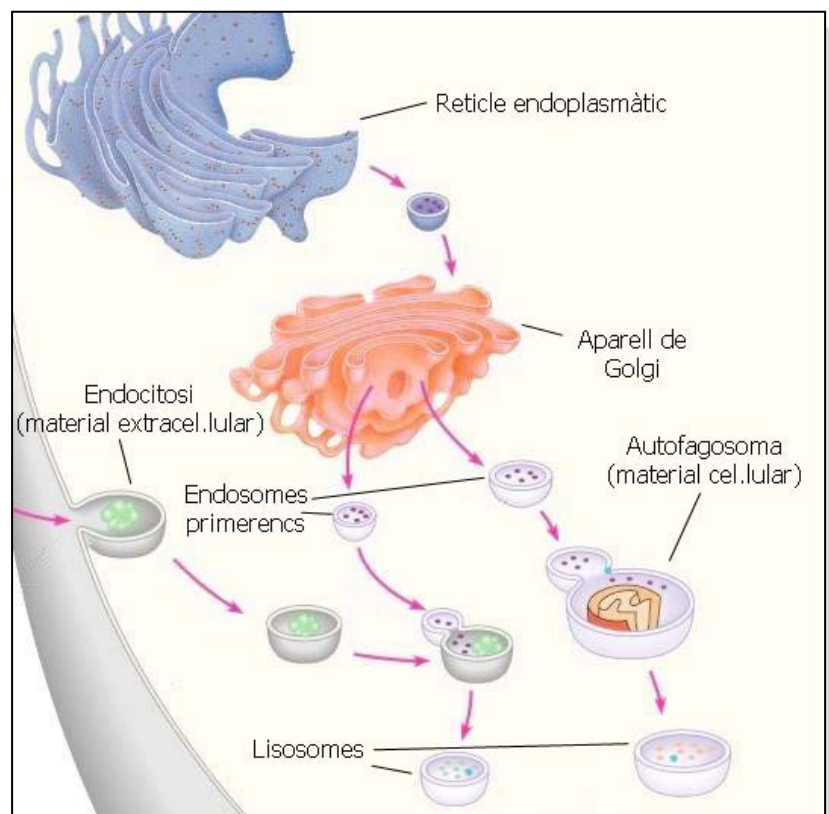


Figura 3.
Esquema mostrant l'origen de les substàncies que són degradades al lisosoma. Aquestes poden tenir un origen intracel·lular o extracel·lular.

En quant a l'origen de les substàncies que són degradades pels enzims del lisosoma, es pot dividir bàsicament entre productes intracel.lulars i extracel.lulars. En el cas dels primers s'anomena autofàgia, mentre que en el cas dels extracel.lulars es pot distingir entre endocitosi i fagocitosi en funció de la molècula degradada (Fig.3).

1.2 Les malalties d'acumulació lisosòmica (LSD). Classificació

Les malalties d'acumulació lisosòmica són un conjunt de patologies hereditàries en les que algun enzim o proteïna lisosòmica no funciona correctament (també hi ha casos de proteïnes no lisosòmiques però que regulen la funció dels enzims lisosòmics) i això provoca que els productes que haurien de ser processats per aquesta proteïna s'acumulin. Per tant, qualsevol proteïna de les que se sap que realitza la seva funció al lisosoma és susceptible de causar una LSD quan es troba alterada. La primera LSD en ser descrita, va ser la malaltia de Pompe o glicogenosi tipus II, el 1963 (Hers, 1963) i des d'aleshores fins ara s'han descrit més de 40 LSDs, la majoria degudes a hidrolases solubles i algunes degudes a proteïnes integrals de membrana del lisosoma.

La incidència de les LSDs a la població general és baixa, cosa que fa que siguin incloses dins del grup de malalties rares, però preses en conjunt la seva incidència pot arribar a ser més important. Un dels pocs estudis on es va analitzar la freqüència global de les malalties lisosòmiques, que es va fer sobre població australiana, va xifrar la incidència del conjunt d'aquestes malalties en 1 de cada 9000 nascuts (Meikle i col., 1999). Per altra banda, les incidències individuals de cada malaltia, tot i ser baixes, poden ser molt variables en funció de les poblacions estudiades de manera que algunes malalties poden arribar a tenir una freqüència d'aparició elevada en determinades poblacions. Aquest és el cas de la malaltia de Gaucher i de la de Tay-Sachs dins els jueus asquenaites (1:900 i 1:3000, respectivament) (revisat a Charrow, 2004).

Les LSDs són classificades bàsicament de dues maneres: en funció de la proteïna defectiva o del substrat acumulat. En classificar-les en funció del substrat acumulat va resultar que algunes malalties foren agrupades erròniament perquè es va conèixer abans el substrat acumulat que l'enzim que mancava. Així, per exemple, originalment es van

descriure 3 formes de la malaltia de Niemann-Pick (A, B i C) com a diferents subclasses de malalties d'acumulació d'esfingomielina, però ara se sap que la forma C es deu a la manca d'un transportador de colesterol i no d'esfingomielinasa (com les formes A i B). Tanmateix, la classificació en funció del substrat acumulat té l'avantatge que moltes LSDs presenten similituds clíniques quan el substrat acumulat és similar i això ens permet fer grups de LSDs amb semblances clíniques. És el cas de les mucopolisacaridosis (MPS), que inclouen totes aquelles LSDs on s'acumulen glicosaminoglicans (mucopolisacàrids), mentre que els enzims defectius poden ser exoglicosidases, sulfatases o en un cas, una transferasa no-hidrolítica. La classificació es veu encara més complicada pel fet que un mateix enzim lisosòmic pot tenir diferents substrats. Aquest és el cas de la β -galactosidasa que té com a substrats el gangliòsid GM1, el queratà sulfat i diferents oligosacàrids. Això faria classificar la gangliosidosi GM1 alhora com una esfingolipidosi, com una MPS i com una oligosacaridosi.

A la taula 1 es pot veure el conjunt de LSDs descrites fins ara i, tot i que aquesta sigui bastant completa, és d'esperar que en els propers anys encara es descriguin noves proteïnes lisosòmiques implicades en patologies que per la seva especial evolució clínica ara no es consideren LSDs. Els principals grups de la taula 1 són les esfingolipidosis (s'acumulen esfingolípid, revisat a Kolter i Sandhoff, 2006), les MPS (s'acumulen mucopolisacàrids), les oligosacaridosis (s'acumulen oligosacàrids), aquelles on la proteïna defectiva és una proteïna de membrana i altres LSDs que no encaixen exactament en cap dels grups anteriors.

Les LSDs són malalties monogèniques. S'han descrit múltiples mutacions en cada gen i aquestes a vegades poden generar diferents fenotips en els pacients. No obstant això és difícil establir correlacions genotip-fenotip i en moltes LSDs no es pot fer una predicció del curs clínic de la malaltia en funció de l'anàlisi mutacional. A més a més també es troben casos d'heterogeneïtat al·lèlica o clínica (com les malalties de Hurler i Scheie que són causades per mutacions en un mateix gen, el gen de l' α -iduronidasa) o casos d'heterogeneïtat gènica o de *locus* (com la malaltia de Gaucher que pot ser causada per mutacions als gens *GBA* i *PSAP*).

Taula 1. Llistat de LSDs segons Futerman i van Meer (2004).

Malaltia	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	Ariilsulfatasa A Saposina B	Glicolípids sulfatats Glicolípids sulfatats i Gangliòsid GM1
Niemann-Pick A i B	Esfingomielinasa	Esfingomielina
Deficiència de l'activador d'esfingolípids	Proteïna activadora d'esfingolípids (SAP)	Glicolípids
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
Mucopolisacaridosis (MPS)		
MPS I (Hurler, Scheie)	α -iduronidasa	Dermatan sulfat i Heparan sulfat
MPS II (Hunter)	Iduronat-2-sulfatasa	Dermatan sulfat i Heparan sulfat
MPS IIIA (Sanfilippo)	Heparan N-sulfatasa (sulfamidasa)	Heparan sulfat
MPS IIIB (Sanfilippo)	N-Acetil- α -glucosaminidasa	Heparan sulfat
MPS IIIC (Sanfilippo)	Acetil-CoA: α -glucosamida N-acetiltransferasa	Heparan sulfat
MPS IIID (Sanfilippo)	N-Acetilglucosamina-6-sulfatasa	Heparan sulfat
MPS IVA (Morquio A)	N-Acetilgalactosamina-6-sulfat-sulfatasa	Queratan sulfat i condroitin-6-sulfat
MPS IVB (Morquio B)	β-Galactosidasa	Queratan sulfat
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	Ariilsulfatasa B	Dermatan sulfat
MPS VII (Sly)	β -Glucuronidasa	Heparan sulfat, Dermatan sulfat i condroitin-4 i -6-sulfats
MPS IX	Hialuronidasa	Hialuronan
Oligosacaridosis i glicoproteïnosis		
Aspartilglucosaminúria	Aspartilglucosaminidasa	Aspartilglucosamina
Fucosidosi	α -Fucosidasa	Fucosids i glicolípids
α -Mannosidosi	α -Mannosidasa	Oligosacàrids que contenen manosa
β -Mannosidosi	β -Mannosidasa	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'acumulació 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'acumulació d'àcid sialic	Sialina	Àcid sialic
Mucolipidosi (ML) IV	Mucolipina-1	Lípids i mucopolisacàrids àcids
Niemann-Pick C (NPC)	NPC1 i 2	Colesterol i esfingolípids
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
Batten (NCL1)	CLN1	Tioèsters lipidats
Batten (NCL2)	CLN2	Subunitat C de l'ATP sintasa mitocondrial
Batten (NCL3)	Transportador d'arginina	Subunitat C de l'ATP sintasa mitocondrial
NCL-like	Catepsina D	Lipofuscina ceroide
Picnodisostosi	Catepsina K	Proteïnes de l'òs, incloent fibres de col·làgen

Com s'ha mencionat, les LSDs són degudes al mal funcionament de proteïnes lisosòmiques, però els mecanismes bioquímics i cel·lulars pels que aquestes no són funcionals poden ser molt diferents, com es mostra a la figura 4. El problema més habitual és que l'enzim implicat no sigui funcional al lisosoma, però hi ha altres possibilitats com que l'enzim no pugui ni tan sols arribar al lisosoma, o que no pugui formar el complexe multienzimàtic necessari per al seu correcte funcionament, o que hi hagi errors en el seu procés de maduració o, fins i tot, que el que falli sigui alguna proteïna o cofactor necessari per a l'activitat enzimàtica.

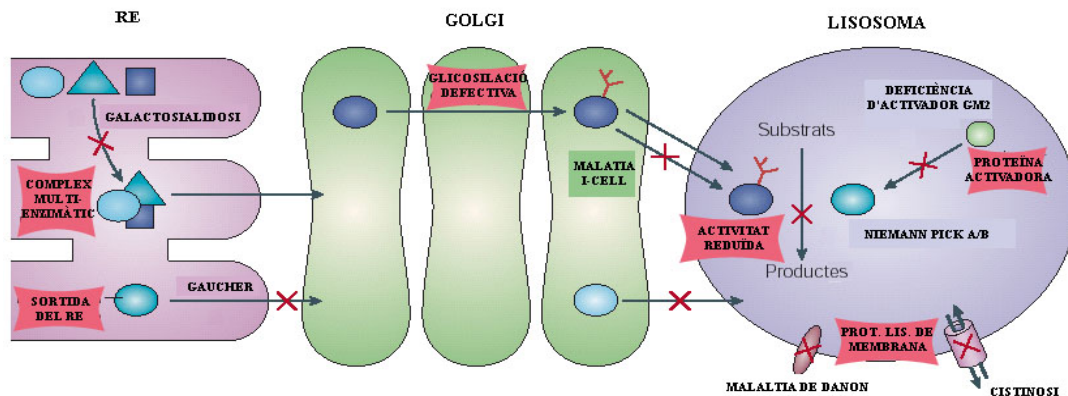


Figura 4. Bases bioquímiques i cel·lulars de les LSDs. Les formes vermelles mostren punts on es pot generar la disfunció enzimàtica. S'indiquen també exemples per a diferents LSDs. Modificat de Futerman i col. (2004).

1.3 Les malalties d'acumulació lisosòmica (LSD). Clínica i teràpia

Les LSDs, com moltes altres malalties metabòliques, mostren un ampli ventall de fenotips. Tot i això alguns símptomes són comuns a diverses LSDs. L'edat d'aparició de la malaltia pot ser des de *in utero* fins a l'edat adulta. En la majoria de pacients, però, l'edat d'aparició acostuma a ser durant el període neonatal després d'uns pocs mesos d'aparent desenvolupament normal. Les formes infantils són les més severes i els primers símptomes impliquen una aturada del desenvolupament normal. Sovint aquestes formes infantils van associades a problemes neurològics que inclouen demència, atacs epilèptics o problemes neuromotors. Alguns símptomes perifèrics freqüents a les LSDs inclouen (Wraith, 2002):

- Hepatoesplenomegàlia: l'engrandiment de la melsa i el fetge és habitual en pacients de LSD per l'acumulació de cèl.lules incapaces de degradar algun substrat.
- Hidropesia fetal (*hydrops fetalis*): moltes poden ser les causes de l'*hydrops fetalis*, però quan les més freqüents són descartades (com problemes immunes, defectes cardíacs,...) aquest pot ser un senyal d'una possible LSD, més encara quan hi ha consanguinitat parental o història familiar d'*hydrops fetalis* recurrent.
- Dismorfismes: la majoria de LSDs que presenten *hydrops fetalis* també acostumen a mostrar diferents dismorfismes. Aquests es poden presentar de diferents maneres, com són per exemple la fàscies Hurleriana o la hipertròfia gingival. Algunes variants mostren alguns dismorfismes molt específics, com és el cas dels nens Gaucher *collodion*.

En quant als tractaments, per a moltes LSDs únicament es disposa d'un tractament pal.liatiu i per al conjunt de formes infantils severes, en general el pronòstic és poc esperançador. Tot i això s'han desenvolupat algunes teràpies més específiques que poden millorar considerablement la vida dels pacients. El transplantament de medul.la òssia va ser de les primeres teràpies específiques en ser desenvolupades i ha tingut resultats irregulars. En canvi, l'administració d'enzims de substitució recombinants en les malalties de Gaucher, Fabry, Pompe, MPSI i MPSVI és fins ara la teràpia que ha donat millors resultats i cada cop s'està ampliant a més malalties. El principal problema d'aquesta teràpia és que l'enzim administrat per via parenteral no té accés al sistema nerviós i, per tant, no soluciona els problemes neurològics dels pacients. En el cas de la malaltia de Gaucher també s'està aplicant una teràpia de reducció de substrat, que consisteix en inhibir parcialment l'enzim que sintetitza el producte acumulat en aquests pacients. També s'ha intentat posar a punt diferents teràpies gèniques sense gaire èxit, tot i que actualment s'estan avaluant vectors retrovirals i lentivirals (Biffi i Naldini, 2005). Un altre tipus de teràpia actualment en estudi és l'ús de xaperones químiques (també conegut com

teràpia d'estímul enzimàtic), que tot i que són prometedores, encara no han estat implantades definitivament (veure Introducció, apartat 2.8).

2. La Gangliosidosi GM1 i la malaltia de Morquio B

Les mutacions en el gen de la β -galactosidasa lisosòmica (*GLB1*) poden provocar dues malalties diferents, la gangliosidosi GM1 i la malaltia de Morquio B, degut a la multiplicitat de substrats sobre els que pot actuar aquest enzim. A continuació es descriuen les principals característiques d'aquestes dues malalties.

2.1 Gangliosidosi GM1. Aspectes històrics i clínics.

L'any 1959, Norman i col.laboradors descriuen un pacient com malalt de Tay-Sachs amb implicació visceral. Més endavant, després de l'anàlisi de múltiples pacients on s'observa que el producte acumulat al cervell i a les viscères és el gangliòsid GM1, O'Brien i col. (1965) proposen el nom de gangliosidosi generalitzada per aquesta nova malaltia metabòlica hereditària. Finalment, serà el 1967 quan s'usi per primer cop el terme gangliosidosi GM1 per aquesta malaltia (Suzuki i Chen, 1967). Gràcies a l'establiment de la causa bioquímica de la malaltia (deficiència de β -galactosidasa) fou possible identificar les formes adultes i d'altres casos atípics que inicialment no es consideraven malalts de gangliosidosi GM1 (Okada i O'Brien, 1968).

La gangliosidosi GM1 és una malaltia rara amb una baixa incidència a la població general. S'han trobat pacients en múltiples poblacions però de totes maneres no s'han realitzat estudis exhaustius per conèixer la seva prevalença. Una de les poques poblacions on s'ha estudiat degut a la seva elevada incidència és l'illa de Malta, on es va establir una incidència d'1 de cada 3700 nascuts vius (Lenicker i col., 1997). Altres casos d'elevada prevalença són el cas d'un poble de Xipre (Pelendri), on s'establí una freqüència del 8,3 % de portadors de la mutació p.R482H (Georgiou i col., 2005); o el cas de Brasil, on s'observà una prevalença més elevada que en altres poblacions, estimant-se la seva incidència en 1:17000 (Coelho i col., 1997; Severini i col., 1999), que no deixa de ser elevada si es compara amb estimacions generals fetes prèviament que estableixen incidències de 1:100000 (Whitley, 1993), 1:200000 (Beattie i Harvey, 1992) o 1:320000 (Meikle P.J. i col., 1997).

La varietat de fenotips en pacients amb acumulació de gangliòsid GM1 fou palesa des del primer moment i aviat es va proposar dividir els pacients en diferents subtipus clínics en funció de l'edat d'aparició de la malaltia i de la seva severitat: tipus I (o forma infantil), tipus II (o forma infantil tardana/juvenil) i tipus III (o forma adulta). Tot i que la frontera entre els diferents subtipus no és sempre evident, es poden establir els principals símptomes associats a cadascun d'ells tal i com es mostra a la taula 2, on es pot veure que en comú tenen l'acumulació del gangliòsid GM1 en major o menor grau i la implicació neurològica tant a nivell mental com a nivell motor.

Taula 2. Principals característiques clíniques associades als diferents subtipus de gangliosidosi GM1. Modificat de Suzuki i col. (2001).

Tipus clínic	Tipus I	Tipus II	Tipus III
Fenotip principal	Neurosomàtic generalitzat	Neurovertebral generalitzat	Neurovertebral localitzat
Inici	0-6 mesos	7 mesos-3 anys	3-30 anys
Progressió	< 2 anys	1-5 anys	10-30 anys
Implicació del SNC	generalitzada	generalitzada	localitzada
Mental	severa	moderada	+/-
Motor	piramidal	piramidal	extrapiramidal
Taques vermell-cirera	+	+/-	-
Hepatoesplenomegàlia	+	+/-	-
Dismorfismes	+/-	+/-	-
Problemes esquelètics	generalitzats	localitzats	localitzats
Acumulació			
Gangliòsid GM1	elevat	moderat	lleu
Oligosacàrids	elevat	moderat	lleu
Queratà sulfat	lleu	lleu	no descrit

Les principals característiques clíniques dels diferents subtipus són (Suzuki i col., 2001):

⇨ Tipus I: la majoria dels casos descrits a totes les poblacions pertanyen al tipus infantil que és el tipus més sever. Aquest subtipus es caracteritza per una aturada del desenvolupament normal entre els 3 i 6 mesos d'edat seguida d'un deteriorament progressiu del sistema nerviós central (SNC). Els símptomes més freqüents en la majoria dels pacients inclouen hipotonia muscular, opacitat corneal, hepatoesplenomegàlia, taca

vermell-cirera de la retina de l'ull (Fig.5C), dismorfismes múltiples (pell grollera, canvis facials, hipertròfia gingival) (Fig.5A) o una displàsia esquelètica generalitzada que inclou cifoescoliosi. Finalment el pacient arriba a un estat vegetatiu amb manca total de moviments. La mort acostuma a esdevenir als pocs mesos o anys de vida.

⇨ Tipus II: el tipus juvenil es va descriure originalment en veure que dins els pacients que es consideraven adults, alguns tenien una edat d'aparició més primerenca i una progressió més severa. Aquest grup inclou pacients de severitat intermitja entre els altres dos subtipus, alhora que les manifestacions fenotípiques d'aquests pacients són bastant heterogènies. Aquí s'inclouen pacients que en els primers anys de vida poden tenir un desenvolupament normal però que tot d'una comencen a tenir problemes en l'aprenentatge general, esquelètics (Fig. 5B), en el caminar o en altres processos relacionats amb el desenvolupament del SNC. La mort pot esdevenir en 4 o 5 anys. Darrerament Caciotti i col. (2003) han proposat anar més enllà i distingir dins d'aquest tipus entre pacients "infantils tardans" i pacients "juvenils", però establir clares fronteres entre aquests no és sempre possible. Aquesta distinció es faria bàsicament en funció de l'edat d'aparició de la malaltia, però això podria dur a error perquè un pacient "juvenil" que en teoria seria més lleu que un "infantil tardà", pot acabar tenint una progressió més severa tot i haver tingut els primers símptomes més tard.

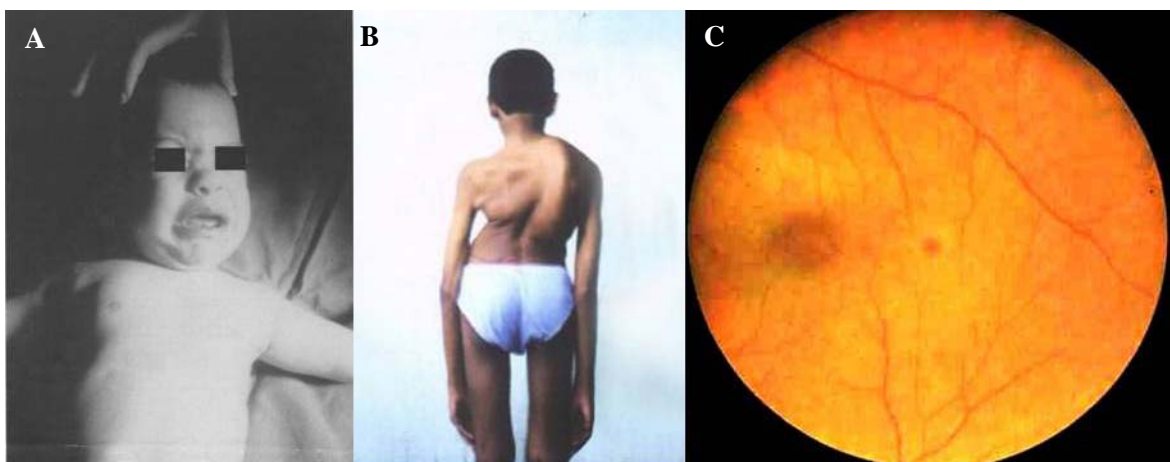


Figura 5. A. Pacient infantil on es veu la fàscies característica. B. Pacient juvenil on es pot apreciar la cifoescoliosi. C. Aspecte d'una retina de pacient amb taca vermell-cirera.

⇨ Tipus III: aquest tipus, que també es coneix com a forma crònica, va ser descrit al principi únicament en pacients japonesos. Inclou pacients que desenvolupen la malaltia ja en edat adulta i no acostuma a ser letal. Els principals símptomes són problemes en el caminar (distonia que acaba impedit caminar) o en la parla (sovint comença com quequeig). Tot i que la progressió és variable segons els pacients, n'hi ha que desenvolupen altres problemes de tipus esquelètic o corneal.

Per últim cal destacar que s'han descrit manifestacions atípiques que també semblen estar associades a la malaltia com són telangiectasies, *hydrops fetalis*, angioqueratomes o diferents cardiomiopaties congènites. De fet, aquest darrer símptoma actualment ja no es considera tan atípic i és normal trobar-lo en pacients tipus I (Caciotti i col., 2005b).

2.2 Malaltia de Morquio B. Aspectes històrics i clínics.

La malaltia de Morquio B, o mucopolisacaridosi IVB, va ser descrita originalment com una variant lleu de la malaltia de Morquio A (MPS IVA) (Arbisser i col., 1977; O'Brien i col., 1976). Totes dues comparteixen el fet de ser displàsies esquelètiques generalitzades amb opacitat de la còrnia i amb elevada queratà sulfatúria, però mentre la malaltia de Morquio A es deu a una deficiència de l'enzim *N*-acetilgalactosamina-6-sulfat sulfatasa, la de Morquio B es deu a mutacions al gen de la β -galactosidasa.

Clínicament, el que bàsicament diferencia els malalts de Morquio B dels de gangliosidosi GM1 és l'absència de problemes del SNC en els primers. Els malalts de Morquio B tenen els primers símptomes de la malaltia cap als 5-10 anys d'edat i aquests consisteixen en una aturada del creixement marcada per la baixa estatura. Els problemes esquelètics seran aleshores freqüents: enanisme del tronc, *pectus carinatum*, cifoescoliosi, *genu valgum*,... Altres característiques pròpies de la gangliosidosi GM1, com els dismorfismes, la cardiopatia o la visceromegàlia normalment són absents en pacients Morquio B. Un altre tret característic dels malalts de Morquio B és la queratà sulfatúria, és a dir, elevats nivells de queratà sulfat a l'orina dels pacients, superiors fins i tot als dels pacients amb gangliosidosi GM1 (Trojak i col., 1980). Com s'explicarà més endavant, en

la queratà sulfatúria està l'explicació de perquè mutacions en un mateix gen (*GLB1*) poden provocar dues malalties aparentment diferents. I diem aparentment perquè aquesta clara distinció entre els malalts de gangliosidosi GM1 i els malalts Morquio B ha resultat en alguns casos no ser tan evident. Així, alguns pacients originalment descrits com malalts Morquio B (degut a la manca de símptomes neurològics) han acabat finalment desenvolupant problemes psicomotors o pèrdua de la capacitat de parlar (Caciotti i col. 2005a; Paschke i col., 2001), cosa que ha fet reclassificar-los com pacients amb gangliosidosi GM1.

La incidència de la malaltia de Morquio B és encara més baixa que la de la gangliosidosi GM1. Fins el 2001 únicament s'havien descrit 18 pacients a tot el món (Suzuki i col., 2001). Aquell mateix any un article feia pujar aquest nombre a 32 (Paschke i col., 2001).

2.3 Un gen. Perquè dues malalties?

Des del moment en que es va veure que mutacions en un mateix gen podien provocar dues malalties diferents, la gangliosidosi GM1 i la malaltia de Morquio B, es va voler esbrinar quina era la causa que generava aquesta heterogeneïtat clínica. La principal diferència que permetia distingir-les en dues malalties diferents va ser l'absència de deteriorament neurològic en els pacients de Morquio B. Aquests però també presenten altres símptomes propis, com són una displàsia esquelètica generalitzada o una elevada queratà sulfatúria, que gairebé no són presents o, fins i tot, són absents en pacients amb gangliosidosi GM1. Amb l'anàlisi molecular es va poder observar que les mutacions que causaven cada malaltia eren específiques, és a dir, que mutacions trobades en homozigosi en pacients Morquio B només apareixien en pacients Morquio B. Es podia parlar, per tant, d'especificitat al·lèlica en aquestes malalties.

Van sorgir múltiples explicacions per entendre aquesta diversitat clínica (es pot veure un resum a Callahan, 1999), però la resposta definitiva es va fer esperar fins l'any 2003, quan Okumiya i col.laboradors van fer estudis de cinètica enzimàtica per a diferents versions mutades de la β -galactosidasa. Amb l'ús d'anàlegs bioquímics dels dos

substrats principals de l'enzim (el gangliòsid GM1 i el queratà sulfat) van trobar que els enzims amb mutacions que provoquen la malaltia de Morquio B pateixen una pèrdua d'afinitat específica pel queratà sulfat, podent mantenir certa activitat residual envers el gangliòsid GM1. Probablement, i això es podrà saber si s'aconsegueix cristal·litzar la proteïna per establir la seva estructura, les mutacions que causen la malaltia de Morquio B són aquelles que alteren aminoàcids essencials en la unió de la proteïna amb el queratà sulfat. Així, tot i que pugui haver altres elements en joc que acabin d'explicar les diferències entre les dues malalties, sembla que la principal causa de la diversitat fenotípica es troba en una pèrdua d'activitat enzimàtica específica de substrat, on els pacients Morquio B mostren uns símptomes deguts sobretot a l'acumulació de queratà sulfat mentre que els pacients amb gangliosidosi GM1 mostren els efectes de l'acumulació de gangliòsid GM1.

D'ara endavant en parlar de "malalties" s'estarà fent referència indistintament a les dues malalties, excepte en aquells casos en que es tracti d'un aspecte concret d'alguna de les dues, on s'especificarà degudament.

2.4 Bioquímica

En aquest apartat es volen mostrar els aspectes bioquímics d'aquestes malalties, és a dir, de l'enzim que en elles és deficitari, la β -galactosidasa (β -gal), i de la seva activitat enzimàtica al lisosoma.

2.4.1 Els substrats

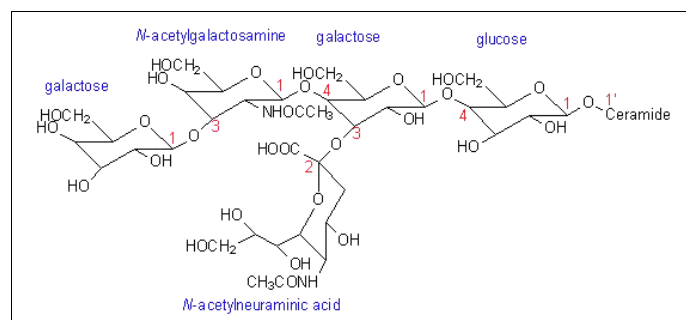
La β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) és un enzim lisosòmic que, com el seu nom indica, té la capacitat d'hidrolitzar galactoses terminals unides per un enllaç tipus β . No s'ha de confondre amb un segon enzim lisosòmic que també hidrolitza galactoses terminals unides per enllaç β conegut com galactocerebrosidasa, que actua sobre substrats diferents als de la β -gal i la deficiència del qual provoca la malaltia de Krabbe. Els substrats de la β -gal són sobretot el gangliòsid GM1, el queratà sulfat, diferents oligosacàrids proteics que contenen galactoses i la lactosilceramida. La manca de la β -gal provoca l'acumulació dels

3 primers perquè la lactosilceramida és l'únic substrat que també pot ser degradat per la galactocerebrosidasa (Suzuki i col., 2001).

2.4.1.1 El gangliòsid GM1

El gangliòsid GM1 (Fig. 6) és un glicoesfingolípíd (GSL). Els GSLs són els principals glicolípid dels animals i són esfingolípid als que s'ha afegit algun sacàrid. Al seu torn, els esfingolípid són lípid que tenen com a molècula bàsica la ceramida a la que s'afegeixen altres molècules. De GSLs n'hi ha de diferents tipus en funció dels sucres que s'afegeixen a la ceramida. Per exemple, quan l'únic sucre afegit és una glucosa, s'anomena glucocerebròsid, mentre que quan entre els sucres afegits hi ha l'àcid siàlic (o àcid *N*-acetilneuramínic), es parla de gangliòsids. Els GSLs tenen una funció estructural a les membranes cel·lulars formant microdominis essencials en la regulació dels processos cel·lulars (van Meer i Lisman, 2002). En les membranes segueixen patrons específics de composició per cada espècie i per cada tipus cel·lular, i aquests patrons poden variar amb el creixement cel·lular, la diferenciació, l'ontogènesi i l'oncogènesi (Hakomori, 1981). També són essencials, entre d'altres funcions, en el control de la permeabilitat de la pell a l'aigua (Wertz i den Bergh, 1998) o en la transducció de senyals extracel·lulars (Huwiler i col., 2000). La importància dels GSLs en els animals queda palesa en els fenotips severs que desenvolupen els ratolins amb defectes hereditaris en la seva síntesi o en el fet que fins ara únicament s'ha descrit una malaltia hereditària en humans deguda a mutacions en un gen implicat en la síntesi d'algun glicolípid, en concret en el de la GM3 sintasa (Simpson i col., 2004).

Figura 6.
Estructura del gangliòsid GM1



En el cas concret dels gangliòsids se sap que són essencials en el desenvolupament del SNC dels vertebrats i la seva síntesi és màxima durant el procés de mielinització. El gangliòsid GM1 és present gairebé a totes les cèl·lules dels vertebrats però és particularment abundant a les neurones, on constitueix un component principal de les membranes neuronals i participa en molts dels processos cel·lulars que controlen la seva diferenciació i funció (Ferrari i Greene, 1998), així com en el fluxe del calci a través de la membrana nuclear durant el desenvolupament neuronal (Ledeen i col., 1998).

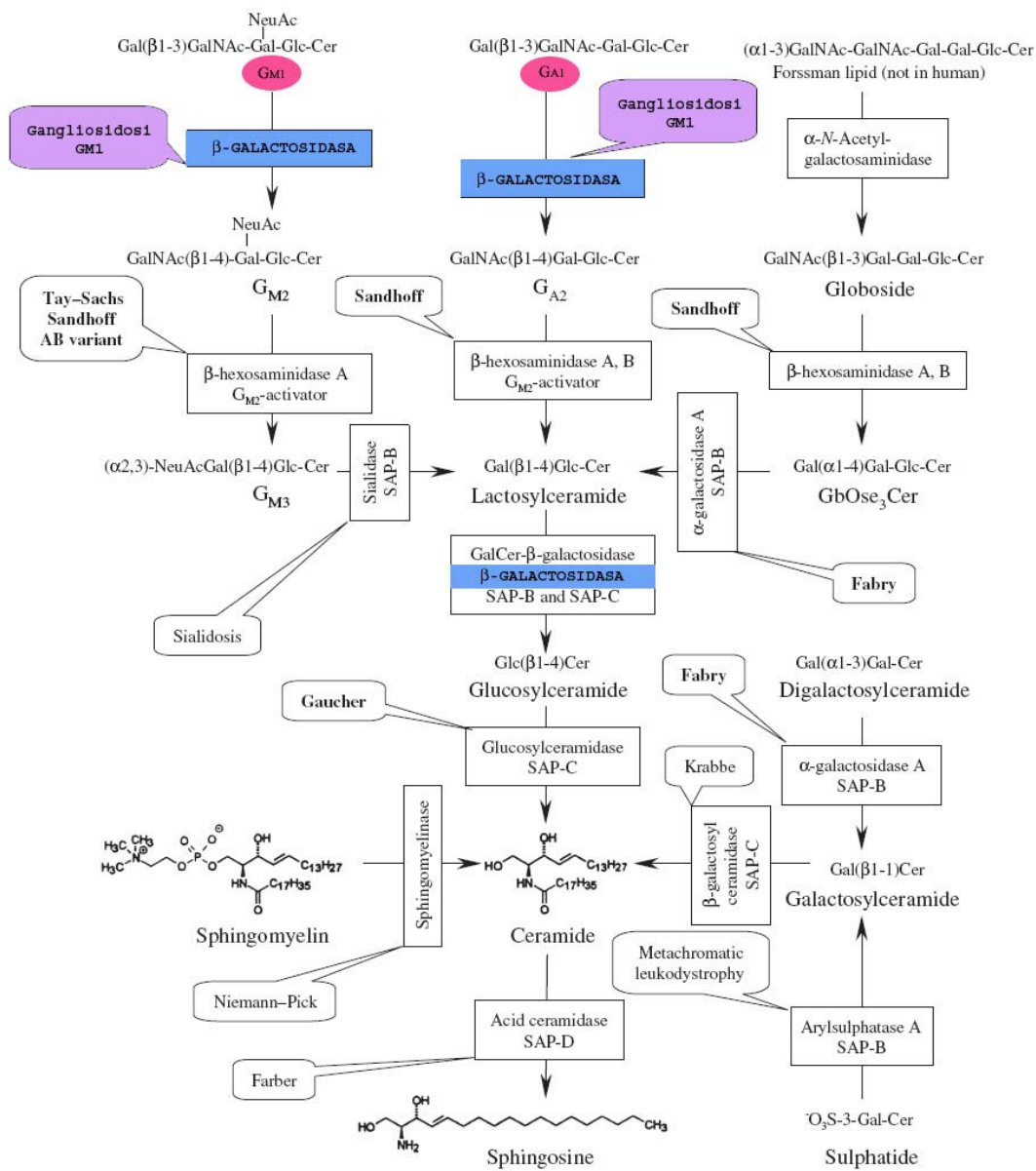


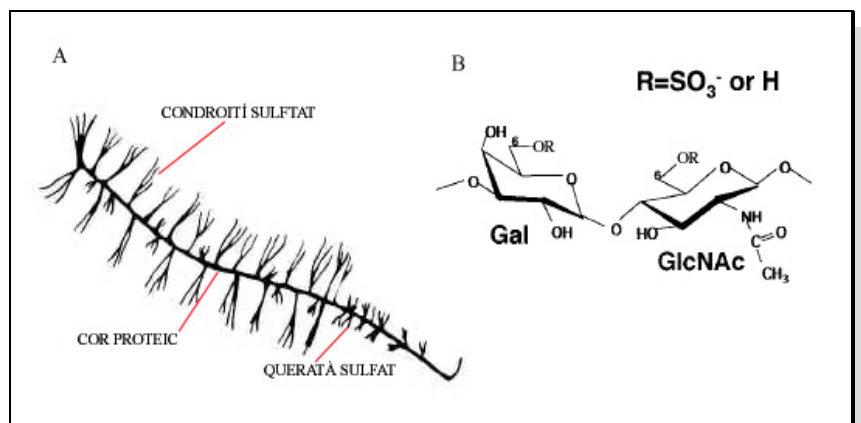
Figura 7. Ruta de degradació del gangliòsid GM1. En blau podem veure els punts on intervé la β-gal i en morat els punts d'acumulació en malats de gangliosidosi GM1. També s'indiquen quins són els punts d'acumulació en altres LSDs. Modificat de Jeyakumar i col. (2002).

Aquest paper essencial del gangliòsid GM1 a les neurones explica perquè la manca de β -gal provoca la seva acumulació principalment a les neurones i com a conseqüència, un mal funcionament del SNC. La β -gal hidrolitza la galactosa terminal del gangliòsid GM1 permetent l'inici de la degradació d'aquesta molècula que acabarà de ser degradada per altres enzims, com es pot veure en la ruta de degradació del gangliòsid GM1 de la figura 7. En aquesta figura també es pot veure com l'asialo-derivat del gangliòsid GM1, el gangliòsid GA1 també s'acumula als pacients, ja que també és substrat de la β -gal.

2.4.1.2 El queratà sulfat

Els mucopolisacàrids o glicosaminoglicans (GAG) són macromolècules formades generalment per la repetició d'un disacàrid que alhora consisteix en una hexosamina i un àcid urònic. Els glicosaminoglicans es poden agregar unint-se covalentment a un nucli proteic i així formar proteoglicans (Fig.8.A). El queratà sulfat és un dels GAG on el disacàrid no conté un àcid urònic sinò que està constituït per una galactosa i una *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) unides per enllaços β . Ambdós sacàrids poden estar sulfatats en els seus carbonis 6, però és la GlcNAc la que ho està més freqüentment (Fig.8.B).

Figura 8.
A. Proteoglicà de cartílag.
B. Disacàrid del queratà sulfat.



Ja des d'un principi es van descriure dos tipus de queratà sulfat (Meyer, 1969). Aquests es diferencien en el tipus d'enllaç del GAG amb el nucli proteic. Mentre el queratà sulfat tipus I s'uneix a la proteïna per un enllaç *N*-glicosídic amb un residu asparagina, el de tipus II ho fa per un enllaç *O*-glicosídic amb un residu serina.

Els GAG són molècules que es troben a les matrius extracel.lulars de diferents teixits, essent específic de cada teixit quin o quins GAG s'hi troben. D'aquesta manera,

trobem cada tipus de queratà sulfat com a component principal de la matriu extracel·lular d'algun teixit. En concret, el tipus I es troba sobretot a la còrnia de l'ull (Baker i col., 1975), mentre que el de tipus II és exclusiu de teixits esquelètics i cartilaginosa (Bray i col., 1967). A la figura 8.A es pot observar l'estructura d'un proteoglicà típic de cartílag on es combinen els GAG condroití sulfat i queratà sulfat. La presència de nombrosos grups sulfat dona al teixit la seva consistència ja que actuen com una "esponja" per l'aigua per a que tot el teixit quedi hidratat.

L'enzim β -gal actua en la degradació del queratà sulfat eliminant les galactoses després de l'acció de les sulfatases, quan la galactosa està sulfatada. És per això que en els malalts en els que hi ha una deficiència de la β -gal hi ha acumulació de queratà sulfat a cartílags i còrnia, just els teixits que es veuen més afectats en malalts Morquio B.

2.4.1.3 Els oligosacàrids

El tercer substrat més acumulat als pacients amb gangliosidosi GM1 està format pel conjunt de diferents oligosacàrids que contenen galactoses unides amb enllaç tipus β . Aquests són sobretot els oligosacàrids que es troben a les glicoproteïnes perquè tant els oligosacàrids units per enllaç *N*-glicosídic com els units per enllaç *O*-glicosídic inclouen β -galactoses. S'han trobat fins a 42 oligosacàrids diferents a l'orina de pacients amb gangliosidosi GM1 tipus I i II (Strecker i col., 1988; Suzuki i col., 2001; Yamashita i col., 1981). Tot i aquesta acumulació evident d'oligosacàrids, no s'ha establert cap relació directa entre aquests i la simptomatologia d'aquestes malalties.

2.4.2 L'enzim β -galactosidasa

2.4.2.1 Síntesi

El gen de la β -gal codifica una proteïna de 677 aminoàcids que és en realitat un preprolipèptid que en entrar al RE perd la seqüència senyal de 23 aminoàcids a N-terminal. Queda un propolipèptid de 654 aminoàcids que pot ser glicosilat (fent un pèptid de 84 kDa) i fosforilat (88 kDa). Aquest té 8 cisteïnes i 7 llocs putatius d'*N*-glicosilació, tot i que alguns són incompatibles entre si (Zhang i col., 1994). Com altres enzims

lisosòmics, és dirigit cap al compartiment endosòmic-lisosòmic gràcies a un receptor de M6P. Un cop al lisosoma l'enzim segueix un procés de maduració que consisteix en el tall de l'extrem C-terminal, quedant així una forma madura de 64 kDa. Originalment es creia que aquest fragment C-terminal escindit es perdia, però més endavant es va comprovar que en realitat aquest fragment de 20 kDa roman unit no covalentment a la resta de la proteïna, desconeixent-se la seva importància en el correcte funcionament de l'enzim (van der Spoel i col., 2000).

2.4.2.2 Interaccions de la β -galactosidasa

Gairebé des del descobriment del lisosoma es va proposar que alguns dels enzims que hi funcionaven havien d'interaccionar entre si per realitzar la seva funció correctament (Koenig, 1962). Això ha estat comprovat per a 4 proteïnes que formen el que es coneix com el Complex Multienzimàtic Lisosòmic (LMC). Aquest complex es va descobrir en voler purificar la β -gal de teixits de mamífer. Es va veure que aquesta apareixia en diferents formes oligomèriques que incloïen monòmers de 70-80 kDa, dímers de 110-170 kDa, tetràmers de 250 kDa i multímers de 600-700 kDa (Norden i col., 1974). Poc a poc es va intentar anar establint quines proteïnes formaven aquest complex i quina era la seva estequiometria (per una revisió, veure Pshezhetsky i Ashmarina, 2001). Actualment se sap que aquest complex el formen 4 proteïnes diferents: la β -gal, la Neuraminidasa, l'*N*-Acetilgalactosamina-6-sulfat sulfatasa (GALNS) i la Proteïna Protectora/Catepsina A (PPCA). Però les interaccions que mantenen no són encara gaire conegudes ja que algunes d'aquestes proteïnes encara no han estat cristal·litzades i es desconeixen, per tant, les seves estructures.

Les principals característiques d'aquestes altres 3 proteïnes del LMC són:

⇨ GALNS (EC 3.1.6.4): aquesta és la proteïna deficitària en els malalts de Morquio A. És la sulfatasa que elimina els grups sulfat dels GAG queratà sulfat i condroití sulfat. Va ser la darrera de les proteïnes que es va descobrir al LMC. Com que la β -gal i la GALNS catalitzen reaccions consecutives en la degradació del queratà sulfat, s'ha

proposat que la seva unió en un mateix complex afavoreixi la transferència dels productes intermediaris entre els diferents enzims (Pshezhetsky i Potier, 1996).

⇒ Neuraminidasa (EC 3.2.1.18): aquesta és una proteïna d'uns 415 aminoàcids que té activitat sialidasa, és a dir, pot tallar residus d'àcid siàlic de diferents glicoconjugats al lisosoma. Per exemple, catalitza una de les reaccions de degradació del gangliòsid GM1 posterior a la β -gal. Poc després de la seva síntesi s'associa, al mateix RE, a la PPCA. Aquesta actua com a xaperona de la Neuraminidasa acompanyant-la fins al lisosoma. Mutacions en el gen de la Neuraminidasa provoquen la sialidosi.

⇒ PPCA (EC 3.4.16.5): aquesta proteïna és la Carboxipeptidasa A o Catepsina A. En trobar-la al LMC es desconeixia quina proteïna era, però se sabia que realitzava una funció de protecció de les altres proteïnes del complex, per això també se la va anomenar Proteïna Protectora. Aquesta proteïna se sintetitza com un pèptid de 54 kDa que al lisosoma s'escindeix en dos fragments de 32 i 20 kDa que es mantenen units per ponts disulfur, perdent-se un fragment de 2 kDa (Rudenko i col., 1995). Aquest tall és necessari per l'activació de l'enzim (Bonten i col., 1995) podent així exhibir al lisosoma una activitat serina-carboxipeptidasa. Al principi, com s'ha comentat, a la PPCA li va ser atorgada una funció únicament xaperona i "protectora" de la digestió intralisosòmica de la β -gal i la Neuraminidasa, però ara se sap que també es necessària per a la maduració de la β -gal, ja que és la PPCA qui fa el tall de maduració de la β -gal (Bonten i d'Azzo, 2000; Morreau i col., 1992). Mutacions al gen de la PPCA provoquen galactosialidosi, una malaltia on els pacients tenen deficient tant l'activitat β -gal com l'activitat Neuraminidasa, cosa que confirma la necessitat d'aquesta proteïna per al correcte funcionament d'ambdues proteïnes.

Totes aquestes proteïnes interaccionen formant un complex de 1,27 MDa que està en equilibri dinàmic amb un altre complex de 680 kDa, que conté únicament la β -gal i la PPCA (inclou 4 molècules β -gal i 8 de PPCA) on les 4 β -gal semblen situar-se en un nucli protegit de les proteases lisosomals. L'estructura de tot el complex encara no es coneix, però sí s'ha vist que totes les proteïnes aconseguixen una major estabilitat dins d'ell i que és necessari per al correcte funcionament de totes elles. Per exemple, als malalts de

Morquio B o als de galactosialidosi que acumulen queratà sulfat s'ha vist que el complex de 1,27 MDa no hi és present (Pshezhetsky i Potier, 1996).

2.4.2.3 Activitat de la β -galactosidasa

Com s'ha dit, l'enzim β -gal catalitza la hidròlisi de residus β -galactosa de diferents molècules i és la deficiència d'aquesta activitat la que provoca les malalties gangliosidosi GM1 i Morquio B. Aquesta reducció d'activitat es pot comprovar per assaig *in vitro* de l'enzim de diferents teixits sobre els substrats naturals (bàsicament el gangliòsid GM1) o sobre substrats artificials, en concret el 4-metilumbeliferil β -galactopiranòsid (4MUB). Si s'analitza aquesta activitat residual per als diferents pacients, s'obtenen diversos valors en funció del subtipus de la malaltia, com es pot comprovar a la taula 3.

Taula 3. Activitats residuals de fibroblasts de pacients expressades com a % de l'activitat control respecte quantitat de proteïna (mínim-màxim) (adaptat de Suzuki i col., 2001).

Substrat	GM1-infantil	GM1-juvenil	GM1-adult	Morquio B
4MUB	0,07-1,3	0,3-4,8	0,6-8,9	1,5-12,3
Gangliòsid GM1	0,1-0,6	0,6-2,0 4,6-9,4*	1,1-4,4	2,9-25*

*Activitat expressada com % de l'activitat control respecte la quantitat de CRM (material immunoreactiu).

A la taula s'observa que els rangs tenen valors parcialment solapats entre els diferents tipus de pacients però que els valors màxims són superiors quant més lleu és la malaltia, de manera que pacients amb la forma adulta de la malaltia tenen tendència a tenir activitats residuals superiors (fins un 5-10 % dels controls).

L'anàlisi d'aquestes activitats residuals en teixits de pacients (fibroblasts i leucòcits) té d'aquesta manera una funció diagnòstica. Però només en aquells casos on l'individu és homozigot per a la mutació patogènica es pot veure l'efecte específic del canvi genòmic en l'activitat enzimàtica. En els casos on el pacient és heterozigot compost, l'activitat resultant serà la combinació de les activitats residuals de les dues mutacions. Per aquest motiu s'han utilitzat diferents sistemes d'expressió heteròloga de la β -gal per poder conèixer els efectes de les diferents mutacions.

A la taula 4 (veure Introducció, apartat 2.7.3) es pot veure un resum de les activitats de les mutacions expressades fins el moment de presentar aquest treball. En general es veu una bona correlació entre les activitats detectades i el fenotip associat, de manera que canvis que permeten una certa activitat residual es troben en pacients de tipus juvenil o adult, mentre que els individus infantils són portadors de dues mutacions amb una activitat residual nul·la. També les mutacions associades a la malaltia de Morquio B acostumen a tenir una certa activitat enzimàtica residual.

Cal dir, per últim, que també s'ha descrit que la β -gal necessita coactivadors com la saposina B per funcionar correctament, però no se sap quant d'importants són aquests factors *in vivo* ja que la seva manca no sembla provocar l'acumulació del gangliòsid GM1 (Wilkening i col., 2000).

2.5 Patologia cel·lular

Fins ara s'ha explicat que la principal causa de la patologia als malalts de gangliosidosi GM1 és l'acumulació dels substrats no degradats per la β -gal, sobretot el gangliòsid GM1. Alhora, la principal característica clínica d'aquests malalts és el deteriorament neurològic. Es pot, per tant, afirmar que la causa de la neurodegeneració és l'acumulació de gangliòsid GM1? Ja fa temps que hi havia una pista que semblava indicar que la resposta era afirmativa, i era el fet que el gangliòsid GM1 fos especialment abundant a les neurones. Però va ser amb el treball de Tessitore i col.laboradors (2004) que va arribar la confirmació definitiva. En aquest treball es descriu el mecanisme pel qual el gangliòsid GM1 acumulat a les neurones acaba provocant l'apoptosi de les mateixes.

Ja s'ha mencionat anteriorment que el gangliòsid GM1, entre d'altres funcions, té la capacitat de regular el fluxe de calci a través de la membrana nuclear durant el desenvolupament neuronal. Per aquesta raó els autors es van plantejar la possibilitat que el gangliòsid GM1 també jugués un paper en el control de l'homeostasi del calci del RE. Van demostrar com l'acumulació del gangliòsid GM1 a les neurones provoca una desregulació del control del calci que alhora desencadena una resposta coneguda com

UPR (*Unfolded Protein Response*). Aquesta resposta cel·lular és un sistema de control de qualitat que monitoritza l'estat del RE i rep aquest nom perquè el mal funcionament d'aquest orgànul afecta al correcte plegament de les proteïnes que s'hi sintetitzen, de manera que és el mal plegament de les proteïnes el que desencadena la resposta UPR. Aquesta resposta té inicialment una funció d'evitar el mal plegament de les proteïnes al RE, però si es manté molt de temps pot acabar induint l'apoptosi cel·lular. Aquest seria el cas dels malalts amb gangliosidosi GM1, on el gangliòsid GM1 s'aniria acumulant fins provocar la mort neuronal i també la mort dels propis macròfags que intenten eliminar les neurones mortes. Els autors proposen també que aquest podria ser el mecanisme patològic en varies de les LSDs on hi ha afectació neurològica.

2.6 Diagnòstic

El diagnòstic dels pacients amb gangliosidosi GM1 i malaltia de Morquio B comença per una acurada descripció de la simptomatologia dels malalts per part dels seus metges que permeti classificar-los dins del grup de malalties metabòliques i més concretament, d'una LSD. En el cas dels malalts amb gangliosidosi GM1 el procés començarà amb un pacient amb manifestacions neurosomàtiques d'origen desconegut on hi ha un deteriorament neurològic progressiu i alhora presència de canvis somàtics generals, com poden ser esquelètics o viscerals. Altres senyals com l'*hydrops fetalis* o les taques vermell-cirera són indicadors d'una possible LSD. En el cas dels malalts de Morquio B, les especials deformitats esquelètiques poden ser una bona indicació d'aquesta malaltia.

En tot cas, el diagnòstic definitiu serà el diagnòstic bioquímic. Per una banda està l'anàlisi dels substrats acumulats, habitualment analitzats en l'orina. Per altra banda, hi ha l'anàlisi de l'activitat enzimàtica. Normalment davant de la sospita d'una LSD, com que els símptomes per si sols no acostumen a ser clars i suficients per indicar una única malaltia, el que s'acostuma a fer és l'anàlisi d'una sèrie d'enzims candidats, començant pels més probables (per simptomatologia i per freqüència a la població) i seguint pels altres que també són compatibles.

En el cas de la β -galactosidasa el diagnòstic enzimàtic és clar i definitiu i, com ja s'ha explicat, actualment es fa utilitzant com a substrat un substrat artificial fluorogènic (el 4MUB) amb el sucre terminal anàleg al del gangliòsid GM1, que permet un diagnòstic senzill i rutinari. A la figura 9 es pot veure com es poden distingir els pacients dels portadors tant en el plasma com en els leucòcits. En canvi, hi ha un cert solapament entre els portadors i els individus control tant en leucòcits com en plasma que impedeix una clara distinció entre aquests.

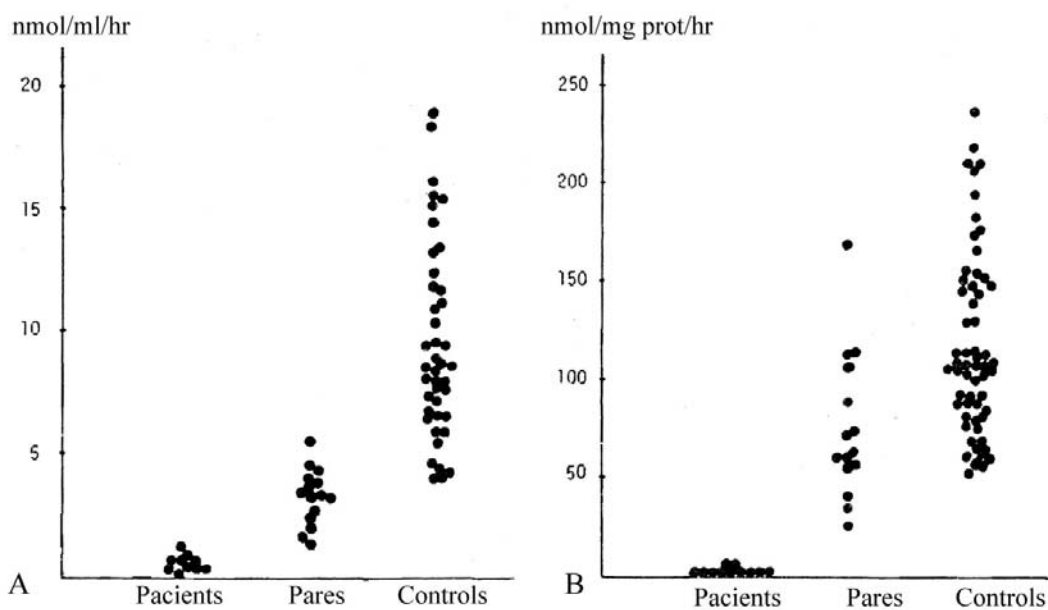


Figura 9. Activitat β -galactosidasa a plasma (A) i leucòcits (B) en pacients, pares de pacients i individus control. Modificat de Suzuki i col. (2001).

La darrera comprovació per al diagnòstic definitiu és l'anàlisi de l'activitat de la Neuraminidasa, per descartar la possibilitat que es tracti d'un malalt de galactosialidosi, ja que aquests pacients tenen un dèficit en l'activitat tant de la Neuraminidasa com de la β -gal degut a mutacions al gen de la PPCA.

Una darrera possibilitat seria el diagnòstic genètic, ja que tant la gangliosidosi GM1 com el Morquio B són causades per mutacions en un únic gen, el *GLB1*. Aquesta és una eina que en el cas d'aquestes malalties no s'utilitza per a fer el diagnòstic rutinari dels pacients. Això és perquè en la majoria de poblacions estudiades no s'han trobat mutacions molt prevalents que representin un elevat percentatge dels malalts i que, per tant, puguin

ser buscades de manera habitual en nous pacients. No obstant, és recomenable fer una anàlisi genètica ja que així, un cop identificades les mutacions d'un pacient, es pot fer un millor diagnòstic o prevenció en altres familiars del pacient.

2.7 Genètica

2.7.1 El gen *GLB1*

Que la gangliosidosi GM1 i la malaltia de Morquio B eren malalties hereditàries autosòmiques recessives degudes a la deficiència de l'enzim lisosòmic β -galactosidasa es va saber bastant aviat en l'estudi d'aquestes malalties però la localització i descripció del gen que les causava no va esdevenir fins l'any 1988. El gen de la β -galactosidasa humana es troba al cromosoma 3, a la posició 3p21.33 (Yamamoto i col., 1990). El cDNA de la β -gal va ser clonat i caracteritzat fa uns 20 anys (Morreau i col., 1989; Morreau i col., 1991; Nanba i Suzuki, 1990; Oshima i col., 1988; Yamamoto i col. 1990). El gen s'expandeix més de 120 kb i està format per 16 exons codificants. El promotor té característiques de gen *housekeeping* amb múltiples fragments rics en GC i 5 llocs putatius d'unió del factor SP1. La principal activitat promotora es troba en un fragment de 236 pb davant l'ATG, mentre que un segon fragment més llunyà, de 851 pb, sembla tenir una capacitat inhibidora de la transcripció (Morreau i col., 1991).

El cDNA descrit originalment va ser el que incloïa els 16 exons, amb una mida de 2,5 kb, i que codificava la β -gal. Però ben aviat es va veure l'existència d'un segon transcrit minoritari de 2 kb (Morreau i col., 1989).

2.7.2 L'*splicing* alternatiu del gen *GLB1*

En estudiar els transcrits del gen *GLB1* a partir de clons d'una llibreria de cDNA de testicle humà, Morreau i col. (1989) van trobar l'existència de dos transcrits generats a partir del gen *GLB1*. Aquests dos transcrits es generen per un procés d'*splicing* alternatiu on un d'ells, el majoritari, està format per 16 exons, mentre que l'altre ha perdut els exons 3, 4 i 6. D'aquesta manera l'exó 5 queda en una pauta de lectura diferent en aquest segon transcrit que la que té en el transcrit de la β -gal, mentre que la resta d'exons tenen la

mateixa pauta de lectura en els dos transcrits. Això es pot veure a la figura 10, on es comprova que la suma dels exons 3, 4 i 6 ($151+61+181=393$) és múltiple de 3 i, per tant, permet mantenir la pauta de lectura.

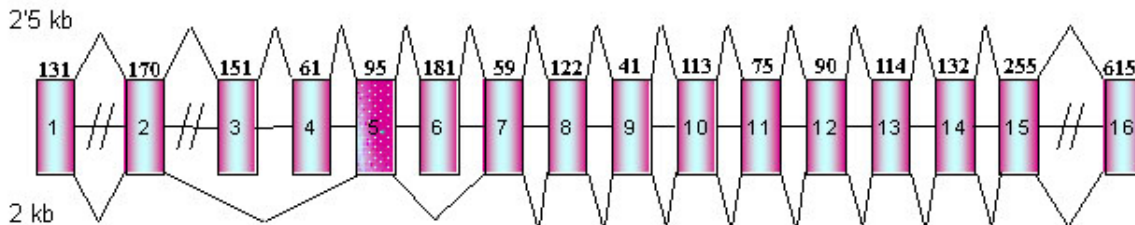


Figura 10. Esquema del gen *GLB1*. Es mostren els 2 transcrits generats per *splicing* alternatiu i a sobre dels rectangles dels exons, la mida de cadascun en pb. L'exó 5 mostra diferent color ja que és l'únic amb diferent pauta de lectura entre els 2 transcrits.

Originalment a la proteïna produïda pel transcrit minoritari (es va descriure com 10 vegades menys abundant que el transcrit de la β -gal) enzimàticament inactiva se l'anomenà *β -gal-related* al ser desconeguda la seva possible funció. No va ser fins l'any 1998 que es va descobrir que la proteïna produïda pel transcrit de 2 kb era una proteïna ja coneguda, l'*Elastin binding protein* (EBP) (Privitera i col., 1998). D'aquesta manera es comprovà que la pauta de lectura de l'exó 5 específica del transcrit de l'EBP generava una seqüència única de 32 aminoàcids que constitueixen un domini exclusiu d'unió a l'elastina i a la laminina capaç de conferir-li una funció pròpia a l'EBP.

L'EBP és una proteïna de 546 aminoàcids amb un pes molecular de 67 kDa que, excepte en la zona de l'*splicing* diferencial, és idèntica a la β -gal. La seva principal funció és la de facilitar la formació de la matriu extracel·lular d'elastina unint-se a la tropoelastina intracel·lular com a xaperona (impedint la seva agregació intracel·lular o l'associació amb serina-proteases) (Hinek i Rabinovitch, 1994; Zhu i col., 1994) i acompanyant-la a la superfície cel·lular facilitant el seu ensamblatge (elastogènesi). La presència de galactosucres a la matriu extracel·lular (ECM) que interaccionen amb l'EBP fan que aquesta alliberi l'elastina. L'EBP forma part d'un complex anomenat receptor cel·lular de tipus no-integrina o receptor de l'elastina, que s'expressa a totes les cèl·lules

productores d'elastina com són els fibroblasts, les cèl.lules del múscul llis, els condroblasts o els leucòcits (Hinek i col., 1988).

Aquest complex s'ha vist que també té capacitat d'interaccionar amb proteïnes G i actuar com a transductor de senyals inductors de proliferació. Aquests senyals serien pèptids derivats de l'elastina que en interaccionar amb l'EBP provocarien un canvi conformacional que alhora duria a la interacció amb les proteïnes G (Mochizuki i col., 2002).

En aquest complex a més de l'EBP hi ha la Neuraminidasa i la PPCA (Hinek i col., 2006; Pshezhetsky i Ashmarina, 2001). Mentre que la Neuraminidasa permet l'ancoratge del complex a la membrana plasmàtica, la PPCA realitza una funció protectora de l'EBP. Aquest complex no passa pel lisosoma, de manera que l'EBP no és activa enzimàticament ja que necessitaria "madurar" al lisosoma per ser enzimàticament activa (Bonten i col.,

Elastogènesi

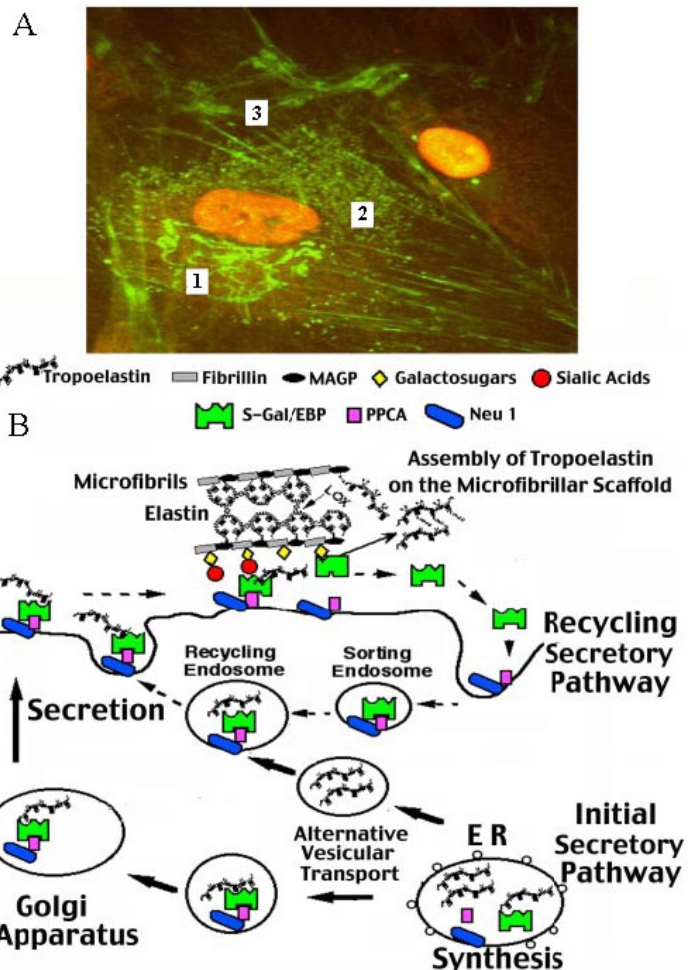


Figura 11.

A. Cèl.lules de múscul llis tenyides amb anticòs anti-tropoelastina (verd) mostrant els 3 estadis de l'elastogènesi: acumulació a aparell de Golgi i a endosomes (1), transport en petites vesícules de secreció (2) i ensamblatge microfibril·lar inicial al voltant de la superfície cel·lular (3). B Model de funcionament de l'EBP, on el complex format per EBP, PPCA i neu-1 acompanyen la tropoelastina a la membrana plasmàtica. Un cop allà la Neuraminidasa fa accessibles molècules de galactosa que en interaccionar amb l'EBP provoquen l'alliberament de la tropoelastina. Tot el complex és reciclat per tornar-se a unir a noves molècules de tropoelastina. Modificat de Hinek i col., 2006.

1995). La que sí sembla ser enzimàticament activa és la Neuraminidasa (no necessita passar pel lisosoma per ser activa), perquè se sap que la seva activitat és necessària per a la correcta deposició de l'elastina (Hinek i col. 2006). Es pot veure un esquema de la intervenció de l'EBP a l'elastogènesi a la figura 11.

Des del moment en que es va conèixer la síntesi d'aquesta segona proteïna a partir del gen *GLBI* es va qüestionar quin paper jugaria en l'aparició i severitat de les malalties causades per aquest gen, ja que totes les mutacions que no afectin els exons 3, 4 i 6 també afectaran a l'EBP. Diferents estudis han demostrat que mutacions a *GLBI* poden provocar incapacitat de fer l'elastogènesi correctament en fibroblasts de pacients amb aquestes malalties (Hinek i col., 2000b; Tatano i col., 2006). Tanmateix, també s'ha vist que aquesta elastogènesi reduïda pot ser una conseqüència secundària de l'acumulació del queratà sulfat a l'ECM, ja que fibroblasts de pacients amb mutacions a l'exó 6 també tenien problemes de deposició de l'elastina (Caciotti i col., 2005a).

Aquesta incapacitat de realitzar l'elastogènesi correctament s'ha correlacionat amb alguns dels problemes de tipus connectiu que mostren alguns dels pacients. Un dels trets clínics sobre els que s'ha fet més èmfasi en aquesta correlació és la cardiomiopatia. Els problemes cardíacs no van ser considerats en un principi com símptomes típics de malalts amb gangliosidosi GM1, però amb el temps s'ha vist que molts pacients presentaven diferents alteracions cardíques i aquestes es presentaven en pacients amb algunes mutacions concretes. Aquestes mutacions eren sempre mutacions que afectaven tant a la β -gal com a l'EBP i això ha fet proposar que les cardiopaties dels pacients es deuen al mal funcionament de l'EBP (Morrone i col., 2000).

A part de la gangliosidosi GM1 també s'ha vist que l'EBP pot estar alterada en altres malalties. Malalties com la síndrome de Costello o la malaltia de Hurler mostren alteracions de l'EBP de manera secundària i, com a conseqüència, tenen alterada l'elastogènesi (Hinek i col., 2000a; Hinek i Wilson, 2000).

La possibilitat de que hi hagi una malaltia deguda únicament al funcionament incorrecte de l'EBP no es pot descartar, però les possibilitats de que això passi són realment moltes baixes ja que únicament les mutacions a l'exó 5 que fossin sinònimes per a

la pauta de lectura de la β -gal afectarien exclusivament a l'EBP. L'existència d'una malaltia d'aquesta mena és de moment, si és que realment existeix, desconeguda.

2.7.3 Correlacions genotip-fenotip

La seqüenciació del gen *GLB1* en els pacients afectats ha estat essencial per poder assignar una causa molecular a l'existència dels diferents subtipus de gangliosidosi GM1 i a l'existència de la malaltia de Morquio B. Fins aquest treball s'havien descrit més de 60 alteracions diferents a *GLB1* causants d'aquestes malalties, com es pot veure a la taula 4.

Taula 4. Llista de mutacions i polimorfismes descrits al gen *GLB1*.

Canvi de nucleòtid ^a	Canvi proteic o d'mRNA	Exo/Intró	Tipus clínic ^b	Activitat expressada ^c	Referència
c.29T>C	p.L10P	1	Pol	NE	Callahan i col.1999
c.34C>T	p.L12L	1	Pol	NE	Silva i col. 1999
c.75+2insT	ins intrònica de 20 pb	1	I	NE	Callahan i col.1999
c.145C>T	p.R49C	2	I	NE	Callahan i col.1999
c.152T>A	p.I51T	2	III	26,7%	Callahan i col.1999
c.155T>C	p.S52P	2	II?	NE	Callahan i col.1999
c.161G>A	p.S54N	2	I	0,1%	Caciotti i col. 2005a
c.171C>G	p.Y57X	2	I	0.56%	Georgiou i col.2004
c.175C>T	p.R59C	2	I	0%	Caciotti i col. 2005b
c.176G>A	p.R59H	2	I	0%	Callahan i col.1999
c.202C>T	p.R68W	2	I	0%	Caciotti i col. 2003
c.245C>T	p.T82M	2	III	3-4%	Callahan i col.1999
c.246-1G>A	<i>Splicing</i> incorrecte	3	MB?	NE	Callahan i col.1999
c.252T>C	p.Y83H	3	MB	2-5%	Callahan i col.1999
c.254_276dup	Inserció	3	I	NE	Callahan i col.1999
c.363G>T	p.R121S	3	I	NE	Callahan i col.1999
c.367G>A	p.G123R	3	I	0,3%	Callahan i col.1999
c.442C>A	p.R148S	4	I	11%	Callahan i col.1999
c.451G>T	p.D151Y	4	I	0%	Georgiou i col.2004
c.601C>T	p.R201C	6	II	3-10%	Callahan i col.1999
c.602G>A	p.R201H	6	II,III,MB	46,5%	Callahan i col.1999
c.622C>T	p.R208C	6	I	<1%	Callahan i col.1999
c.588_591insT	p.D198X	6	I	NE	Callahan i col.1999
c.647T>C	p.V216A	6	I	NE	Callahan i col.1999
c.689G>A	p.C230Y	6	I	0,1%	Caciotti i col. 2005a
c.716C>T	p.T239M	6	I	0,06%	Caciotti i col. 2005b
c.718G>A	p.V240M	6	I	NE	Callahan i col.1999
c.733+2T>C	<i>Splicing</i> incorrecte	6	I	NE	Caciotti i col. 2005b
c.787C>T	p.P263S	7	I	0.0%	Callahan i col.1999
c.808T>G	p.Y270D	8	MB?	NE	Paschke i col. 2001
c.817_818TG>CT	p.W273L	8	MB	7,9%	Callahan i col.1999
c.841C>T	p.H281Y	8	MB?	NE	Paschke i col. 2001
c.845_846insC	p.T283HfsX12	8	I	NE	Callahan i col.1999

c.914+2T>C	<i>Splicing</i> incorrecte	8	I	NE	Morrone i col. 2000
c.914+4G>A	<i>Splicing</i> incorrecte	8	I	NE	Georgiou i col.2004
c.947A>G	p.Y316C	9	I	NE	Callahan i col.1999
c.952C>A	p.N318H	9	II/MB?	NE	Callahan i col.1999
c.985A>G	p.T329A	10	III?	1%	Caciotti i col. 2005a
c.994G>A	p.D332N	10	I	1%	Callahan i col.1999
c.1051C>T	p.R351X	10	I	NE	Callahan i col.1999
c.1069_1233dup	mRNA més llarg	11-12	I	0,7-1,6%	Callahan i col.1999
c.1223A>G	p.Q408P	12	MB?	NE	Paschke i col. 2001
c.1306C>T	p.L436F	13	Pol	100%	Caciotti i col. 2003
c.1309delA	Trencament pauta	13	I	NE	Caciotti i col. 2005b
c.1313G>A	p.G438E	13	MB	NE	Bagshaw i col.2002
c.1325G>A	p.R442Q	13	III	5,7%	Caciotti i col. 2005a
c.1369C>T	p.R457X	14	I	NE	Callahan i col.1999
c.1369C>A	p.R457Q	14	I	0,6%	Callahan i col.1999
c.1445G>A	p.R482H	14	I	NE	Callahan i col.1999
c.1452C>G	p.N484K	14	MB?	NE	Bagshaw i col.2002
c.1471G>A	p.D491N	14	I	NE	Callahan i col.1999
c.1480-2A>G	<i>Splicing</i> incorrecte	14	I	NE	Morrone i col. 2000
c.1480G>T	p.G494C	15	I	NE	Callahan i col.1999
c.1498A>G	p.T500A	15	MB	NE	Bagshaw i col.2002
c.1527G>T	p.W509C	15	MB?	NE	Callahan i col.1999
c.1561C>T	p.R521C	15	III /Pol	24%	Caciotti i col. 2005b
c.1572_1577insG	p.W527LfsX5	15	I	NE	Callahan i col.1999
c.1594A>G	p.S532G	15	Pol	75-95%	Callahan i col.1999
c.1733A>G	p.K578R	15	I	<4%	Callahan i col.1999
c.1736G>A	p.G579D	16	II?	NE	Morrone i col. 2000
c.1769G>A	p.R590H	16	II?	<1%	Callahan i col.1999
c.1771T>A	p.Y591N	16	I	NE	Morrone i col. 2000
c.1772A>G	p.Y591C	16	I	NE	Morrone i col. 2000
c.1828A>G	p.T610A	16	II?	NE	Callahan i col.1999
c.1895A>G	p.E632G	16	II?	<1%	Callahan i col.1999
c.1953A>G	p.K655R	16	II?	NE	Callahan i col.1999

^a Numeració prenent l'A de l'ATG inicial com a posició +1

^b ?vol dir que la mutació s'ha trobat en pacients amb aquest tipus clínic, però no s'ha comprovat que la mutació sigui la causant del mateix. Pol: polimorfisme

^c Activitat de la mutació expressada en algun sistema *in vitro*. NE: no expressada

A la taula 4 es pot observar com la majoria de les mutacions descrites són mutacions de sentit erroni (*missense*), o sigui, de canvi d'aminoàcid i que es troben distribuïdes per tot el gen, excepte l'exó 5 i l'11, on no n'hi ha cap de descrita. Tampoc hi ha descrites mutacions que impliquin grans reordenacions gèniques, excepte un parell de duplicacions no gaire "grans".

Pel que fa als tipus clínics associats, la majoria de les mutacions són causants de la forma infantil de la gangliosidosi GM1, que és la més greu. Això fa pensar que totes les parts de la proteïna són essencials per al seu correcte funcionament i que són pocs els canvis que permeten que la proteïna romangui amb certa activitat residual. De fet, únicament hi ha descrits 4 polimorfismes codificants, dels que un es troba al pèptid senyal (p.L10P) i un altre es posa en dubte que realment sigui un polimorfisme (p.R521C) (Caciotti i col., 2005b). De totes maneres és important observar com a la majoria de mutacions se'ls ha pogut assignar un tipus clínic i aquelles en les que no s'ha pogut fer és perquè no s'han trobat mai en homozigosi o no s'han expressat per comprovar si mantenen certa activitat residual. D'això s'extreu que conèixer les mutacions dels pacients té importància per poder establir un pronòstic de la malaltia.

2.8 Teràpia

Fins al moment no s'han desenvolupat teràpies específiques per aquestes malalties i únicament es disposa de teràpies de tipus pal·liatiu. El transplantament de medulla òssia en gos no modificà el curs clínic de la malaltia (O'Brien i col., 1990). També es provà el transplantament de teixit amniòtic en un pacient Morquio B sense millora aparent (Tylki-Szymanska i col., 1985). La teràpia enzimàtica de substitució, molt eficient en altres LSDs, no sembla que pugui tenir grans resultats a la gangliosidosi GM1 ja que els principals símptomes afecten el SNC, no accessible pels enzims recombinants.

Per totes aquestes raons s'han començat a posar a punt teràpies que puguin ser efectives en aquestes malalties, tot i que de moment només s'han provat al laboratori i no en pacients. Aquestes teràpies consisteixen en:

⇨ Xaperones químiques: s'ha descrit que petites molècules químiques anàlogues als substrats naturals dels enzims, denominades xaperones químiques, tenen la capacitat d'estabilitzar-los. Hi ha mutacions que provoquen un plegament incorrecte de la proteïna que fa que sigui degradada en el mateix RE o a l'aparell de Golgi (Ishii i col., 1996; Okumiya i col., 1995). Aquestes xaperones, que inhibeixen l'enzim a altes concentracions *in vitro*, a baixes concentracions *in vivo* es poden unir intracel·lularment

a l'enzim mutant per formar un complex que l'estabilitza, que facilita el seu plegament correcte i que permet el seu transport cap al lisosoma (on pot ser actiu enzimàticament al separar-se la xaperona pel baix pH). Per a la gangliosidosi GM1, s'ha provat una molècula, la *N*-octil-4-epi- β -valienamina (NOEV) tant en models murins com en cultius de fibroblasts humans amb resultats esperançadors en ambdós casos (Iwasaki i col., 2006; Matsuda i col., 2003). Els avantatges d'aquesta teràpia en front de la de substitució enzimàtica serien la possibilitat d'administrar-la oralment i la capacitat que aquestes molècules tenen teòricament de travessar la barrera hematoencefàlica.

⇨ Teràpia de reducció de substrat: aquesta teràpia té com a objectiu reduir l'acumulació de productes no degradats mitjançant la inhibició parcial de l'enzim que els sintetitza. En el cas de la gangliosidosi GM1 es voldria reduir la síntesi del gangliòsid GM1 inhibint la Glucosilceramida sintasa (GCS). Aquest és un enzim que es troba al començament de la ruta sintètica de tots els derivats de la glucosilceramida i, per tant, la seva inhibició parcial serviria potencialment per tractar totes les LSDs on s'acumula algun dels productes posteriors de la ruta (Butters i col., 2003a i 2003b). Actualment l'iminosucre MB-DNJ (*N*-butyldeoxynojirinomycin) està aprovat com a tractament per a pacients de Gaucher, com a tractament d'ús compassiu per a malalts de Niemann-Pick C i està en procés d'avaluació un assaig per a malalts de Tay-Sachs. Per a la gangliosidosi GM1 s'ha provat amb l'MB-DGJ (*N*-butyldeoxygalactonojirinomycin), que actua sobre el mateix enzim però que sembla que podria ser més indicat per al tractament de neonats, freqüents en aquesta malaltia. Fins ara, únicament s'han fet proves amb models murins, però s'ha vist que el tractament en ratolins neonats amb aquest inhibidor redueix significativament l'acumulació de gangliòsid GM1 en el SNC (Kasperzyk i col., 2005).

⇨ Teràpia gènica: aquesta teràpia té com a objectiu introduir el gen correcte en aquelles cèl.lules del pacient on el mal funcionament del mateix acaba provocant els símptomes clínics observats. Aquesta mena de teràpia s'ha intentat posar a punt per a moltes malalties però problemes en la correcta arribada del gen a les cèl.lules específiques o la seva expressió adequada han fet que sigui difícil aplicar-la. En el cas de la gangliosidosi GM1 hi ha diferents estudis realitzats tant en cultius cel.lulars humans

(per exemple, fibroblasts humans transfectats amb retrovirus, descrits a Sena-Esteves i col., 2000) com en models animals (com és el cas de ratolins injectats amb vectors adenovírics descrits a Broekman i col., 2007) amb resultats positius. L'aplicació d'aquesta teràpia a pacients, però, encara està en desenvolupament.

2.9 Models animals

L'existència de models animals naturals o creats intencionadament per a malalties és important per a poder desenvolupar tractaments eficients. Cal tenir sempre en compte però les diferències entre aquests animals i l'ésser humà, i per a cada malaltia comprovar les similituds i diferències entre l'evolució i progressió de la malaltia en cada espècie.

Per a la gangliosidosi GM1 es coneixen molts models naturals que han aparegut espontàniament en gats, gossos o ovelles. D'aquests potser el més estudiat ha estat el model caní. De fet, s'han descrit gossos de múltiples races amb aquesta malaltia i fins i tot es poden adquirir assajos de diagnòstic específics per a gossos d'aigua portuguesos per un mòdic preu (<http://www.healthgene.com/canine/C132.asp>).

L'únic model que ha estat creat intencionadament ha estat el murí. Inicialment es va generar un model KO de *Mus musculus* per *gene targeting* l'any 1997 (Hahn i col., 1997; Matsuda i col., 1997a i 1997b). Més recentment s'ha creat un model transgènic que vol reproduir la forma juvenil humana. Aquest model es realitzà introduint al model KO una variant de la β -gal humana que duia la mutació p.R201C i que clarament manifesta un fenotip menys sever que el model KO (Ichinomiya i col., 2006; Matsuda i col., 2003).

Els animals homozigots del model KO neixen amb normalitat i es mantenen aparentment sans fins als 4 mesos, tot i que s'ha observat que ja amb un mes d'edat hi ha acumulació de gangliòsid GM1. A partir dels 4 mesos comença una regressió on el moviment es va reduint fins arribar a una paràlisi general i a una mort als 7-10 mesos. No desenvolupen hepatoesplenomegàlia o deformacions òssies. Són models reals de la malaltia (recapitulen el tipus I humà) perquè mostren manca d'activitat β -gal, acumulació de gangliòsid GM1 a cervell i hiperexcreció d'oligosacàrids a l'orina. No obstant això, existeixen diferències específiques en la progressió de la malaltia entre els éssers humans i

el ratolí, que podrien ser explicades per diferències bioquímiques i/o genètiques entre les dues espècies, com per exemple:

⇒ *In vivo* a humans la GM1 sintasa és inhibida pel propi gangliòsid GM1 mentre que a ratolí no (Sano i col., 2005).

⇒ Al sistema esquelètic murí no hi ha queratà sulfat (Venn i Mason, 1985), cosa que justificaria la manca de GAG a l'orina dels ratolins amb gangliosidosi GM1 o l'absència de displàsies esquelètiques en aquests ratolins.

⇒ Als ratolins l'*splicing* alternatiu del gen de la β -gal no existeix, ja que la pauta de lectura de l'exó 5 si s'eliminen els exons 3 i 4 queda trencada per un codó de terminació. Això vol dir que l'EBP, si és que existeix a ratolí, ha de ser codificada per un altre gen.

3. *Splicing* constitutiu i *splicing* alternatiu

El procés d'*splicing* (que també es pot anomenar com “tall i empalmament”, però que té en la versió anglesa l'ús més habitual del terme) és ara conegut des de fa més de 25 anys (Berget i col., 1977) i tot i així segueix aportant contínues sorpreses a la comunitat científica. L'*splicing* constitueix un dels passos de maduració que han de seguir la majoria dels pre-mRNAs eucariòtics per esdevenir els mRNAs definitius capaços de fer la seva funció. Consisteix en el tall i empalmament d'unes seqüències del pre-mRNA (exons), eliminant les seqüències que les separen (introns). Aquest procés és dut a terme per un conjunt de més de 100 proteïnes i RNAs nuclears petits (snRNA). Aquests snRNAs s'associen a proteïnes per formar les ribonucleoproteïnes nuclears petites (snRNPs) que conjuntament amb altres proteïnes (factors d'*splicing*) formen l'spliceosoma, el complex catalíticament actiu en l'*splicing*, on l'activitat catalítica és realitzada pels snRNAs.

De forma resumida (Fig.12), la formació de l'spliceosoma comença per un complex primerenc on es reconeix el lloc d'*splicing* 5' (o lloc donador d'*splicing*) per part de

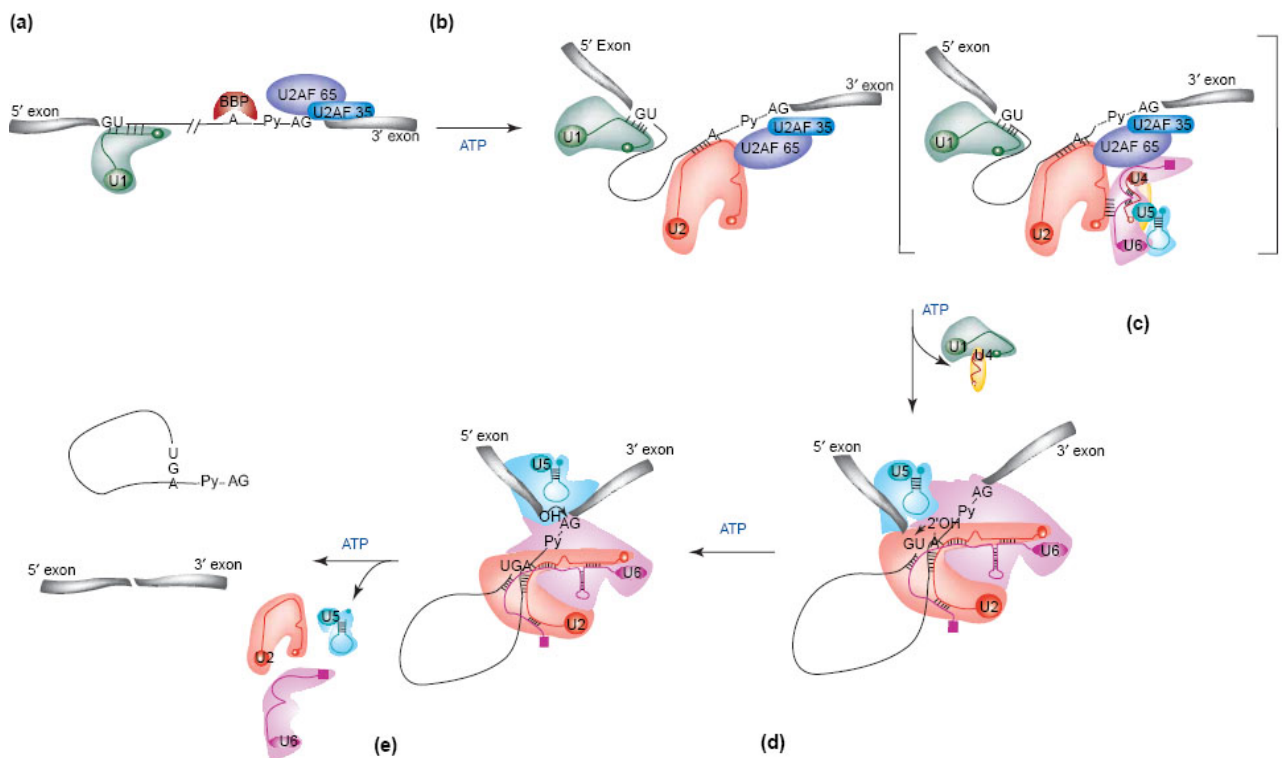
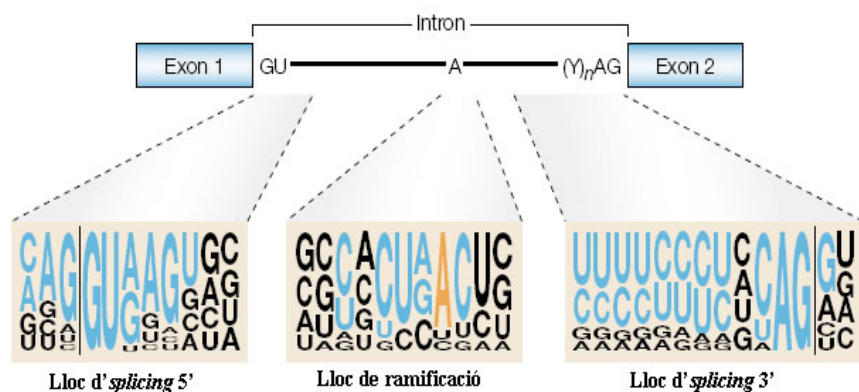


Figura 12. Mecanisme d'*splicing* pel que mitjançant les diferents snRNPs i altres proteïnes s'eliminen els introns i s'uneixen els exons inicialment separats. Modificat de Tazi i col. (2005).

l'snRNP U1 mitjançant interaccions RNA-RNA i la col.laboració de diferents factors. Alhora, el lloc d'*splicing* 3' (o lloc acceptor d'*splicing*) i el lloc de ramificació (*branch site*) són reconeguts per l'U2AF i la proteïna d'unió al *branch site* (BBP). Aquestes proteïnes, junt amb les proteïnes de la família SR, estableixen ponts entre els llocs 5' i 3' d'un mateix exó (definició d'exó) o d'exons diferents a través de l'intró que els separa (definició d'intró). Més endavant s'uneix l'snRNP U2 al *branch site* per permetre la unió del complex triple de snRNP U4/U6 i U5. Amb la unió de totes les snRNPs el complex esdevé catalíticament actiu i es procedeix al tall i l'empalmament dels dos exons (Burge i col., 1999), en un mecanisme de dos passos catalítics de transesterificació (Fig.12.d, e) (Sharp, 1994).

Encara ara no es coneix completament com la maquinària d'*splicing* reconeix les seqüències que seran exons i les que seran introns, però sí que des d'un principi es va veure que les seqüències intròniques que flanquejaven immediatament els exons seguien uns patrons que van permetre establir unes curtes seqüències consens que s'anomenen llocs donadors (o lloc 5') i acceptors (o lloc 3') d'*splicing* (Berget, 1995; Reed, 1996). Aquestes seqüències consens no són idèntiques en tots els organismes, tot i estar relativament conservades. A la figura 13 podem veure les seqüències conservades a l'ésser humà, on és fàcil observar que el grau de degeneració d'aquestes seqüències és relativament elevat.

Figura 13. Senyals d'*splicing* clàssics mostrant les seqüències consens humanes com una matriu de nucleòtids on la mida de cadascun és proporcional a la freqüència d'aquest nucleòtid en cada posició. Modificat de Cartegni i col. (2002).



Com ho fa doncs la maquinària d'*splicing* per distingir els exons enmig d'un mar de nucleòtids ple de llocs d'*splicing* críptics, a partir d'aquestes seqüències poc

conservades? Aquestes seqüències consens no poden ser suficients per si soles per a “definir” els exons ja que hi ha moltes seqüències presents en els pre-mRNAs que segueixen aquests patrons i que no són considerades com a tals per la maquinària d'*splicing*. Són necessaris altres motius menys conservats, adjacents als llocs donadors i acceptors d'*splicing* que també participen en el procés. Són els llocs exònics o intrònics estimuladors de l'*splicing* (ESE i ISE, respectivament) i els llocs exònics o intrònics inhibidors de l'*splicing* (ESS i ISS, respectivament) (Hastings i Krainer, 2001; Smith i Valcarcel, 2000). Aquestes seqüències són necessàries si es té en compte que l'exó mitjà humà mesura uns 150 nucleòtids, mentre que per terme mig els introns fan 3500 nucleòtids (Deutsch i Long, 1999). Aquestes seqüències interaccionen amb un grup de proteïnes, les proteïnes SR, que actuen com a lloc d'ancoratge de les altres proteïnes que intervenen en l'*splicing* i permeten l'estructuració de tot l'spliceosoma al seu voltant (Graveley, 2000; Reed, 1996).

Aquesta mena de divisió modular (exons) dels gens deguda a l'existència de l'*splicing* ha resultat ser una nova font de diversitat proteòmica, ja que d'un mateix pre-mRNA es poden generar múltiples RNAs madurs per mecanismes com els que es poden veure a la figura 14 i que es coneixen com *splicing* alternatiu.

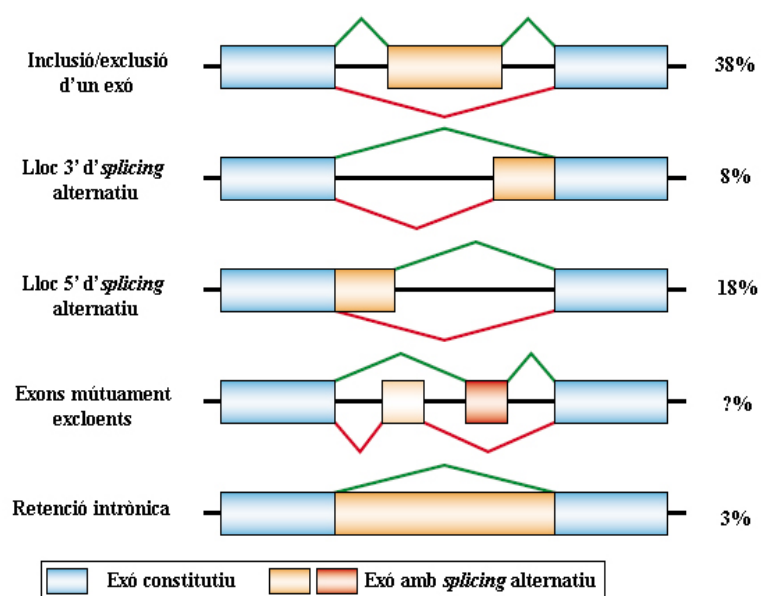


Figura 14.
5 tipus d'*splicing* alternatiu habituals. A la dreta es veu el % de tipus d'*splicing* alternatiu conservat entre els transcriptomes d'humà i de ratolí (Sugnet i col., 2004). Modificat de Cartegni i col. (2002).

D'aquesta manera, l'*splicing* alternatiu ha esdevingut una possible explicació per al major nivell de complexitat d'organismes amb un nombre de gens aparentment igual al d'altres menys complexos. Tot plegat concordaria amb les propostes de que fins un 40-60% de gens humans tinguin *splicing* alternatiu (Boue i col., 2003; Brett i col., 2002; Kan i col., 2002; Quackenbush i col., 2001), o de que hi ha més gens amb *splicing* alternatiu a mamífers que a invertebrats (Kim i col., 2004).

Els diferents *splicings* alternatius poden succeir alhora o ser incompatibles en un mateix tipus cel·lular, en un mateix temps de desenvolupament o en certes condicions fisiològiques, cosa que dificulta encara més la definició de què és un exó, doncs en unes ocasions una seqüència ho serà i en altres no (Lopez, 1998). És per tot això i pel mencionat més amunt que encara ara no s'han aconseguit programes informàtics que amb un elevat percentatge de fiabilitat puguin predir si una seqüència serà exònica o intrònica (tot i ser cada cop més eficients), perquè a més a més de les seqüències en *cis* també és important l'acció dels elements en *trans*. És aquí on de nou prenen importància les proteïnes SR ja mencionades prèviament.

3.1 Les proteïnes SR

Les proteïnes SR constitueixen una família homogènia de polipèptids que juguen un paper essencial en el reconeixement tant dels llocs d'*splicing* constitutiu com dels d'*splicing* alternatiu (Graveley, 2000; Sanford i col., 2003). Es caracteritzen per la presència d'un domini RS i un o dos dominis d'unió a l'RNA del tipus RRM. El domini RS, que és el que dóna nom a aquestes proteïnes, és un domini ric en arginines (R) i serines (S), sovint presents en forma de dipèptids, que poden arribar a ser un 80% del domini. Aquest domini és el que acostuma a permetre la interacció amb altres proteïnes de l'*splicing* i a través d'ell són regulades les proteïnes SR, ja que les serines poden ser fosforilades en múltiples llocs (Bourgeois i col., 2004).

Des de l'any 1991 als mamífers s'han descobert 10 proteïnes SR diferents (veure taula 5 més endavant) amb pesos moleculars de 20 a 75 kDa que es troben relativament

ben conservades a la resta dels regnes animal i vegetal (Sanford i col., 2003). Per a que una proteïna sigui considerada del tipus SR cal que compleixi els següents criteris:

- Presència d'un domini RS i d'un o dos dominis RRM.
- El domini RS ha de tenir una elevada proporció de dipèptids RS, i només un nombre limitat de dipèptids E/D-K/R.
- Cal que tingui la capacitat de complementar un extracte deficient en proteïnes SR.

Aquest darrer criteri es deu al fet que les proteïnes SR intervenen en l'*splicing* constitutiu, afavorint la captació i estabilització de l'U1snRNP i l'U2AF als llocs d'*splicing* 5' i 3', respectivament. Per tant, com a factors d'*splicing* essencials que són, han de tenir la capacitat de restablir completament l'activitat d'*splicing* d'un extracte mancat de proteïnes SR, com és l'extracte S100 (incapaç de produir l'*splicing per se*). Això permet diferenciar les proteïnes SR de les "*SR-related*", que són més de 50 proteïnes diferents que també tenen dominis RS o *RS-like* però no tenen la capacitat de complementar un extracte mancat de proteïnes SR (tot i que la seva funció també pugui estar relacionada amb el processament del pre-mRNA).

Les proteïnes SR a més a més juguen un paper important en l'*splicing* alternatiu gràcies a la seva capacitat d'interaccionar amb l'RNA pels seus dominis RRM. S'han vist diferents mecanismes pels que les proteïnes SR actuen a l'*splicing* alternatiu, com per exemple:

⇒ Un dels més habituals és activar llocs d'*splicing* 3' dèbils unint-se a ESEs propers. La majoria de llocs acceptors d'*splicing* dèbils ho són per un tracte de polipirimidines imperfecte que és reconegut deficientment per l'U2AF65 (una de les dues subunitats del factor U2AF). La presència de proteïnes SR unides a llocs ESE permet una millor unió de l'U2AF65 (Graveley i col., 2001; Zhu i Krainer, 2000).

⇒ Les proteïnes SR també poden regular l'ús de llocs d'*splicing* 5' alternatius. Per exemple, quan hi ha dos llocs 5' en competició, ASF/SF2 afavoreix l'ús del lloc més proximal (Ge i Manley, 1990; Krainer i col., 1990). En aquest cas, en lloc

d'actuar per unió a un ESE, sembla que ASF/SF2 permet una millor unió d'U1snRNP a tots dos llocs 5' afavorint l'ús del lloc proximal com a lloc 5' definitiu.

⇒ En altres casos s'ha descrit que l'activació de llocs 5' específics per part de proteïnes SR sí que és mitjançant llocs ESE. S'ha vist en el cas del transcrit d'E1A de l'adenovirus per la proteïna 9G8 (Bourgeois i col., 1999), o en el cas del gen *Drosophila fruitless*, on el complex proteic format per Tra, Tra2 i 9G8 activa l'ús del lloc 5' femení (Heinrichs i col., 1998; Lam i col., 2003).

⇒ La unió de proteïnes SR a ESEs també pot promoure la inclusió d'un exó alternatiu a l'antagonitzar l'efecte negatiu d'altres proteïnes, com les hnRNPs (Blencowe, 2000; Hastings i Krainer 2001). La família de proteïnes hnRNP (RNPs nuclears heterogènies) tenen la funció general d'unir-se i empaquetar les cadenes naixents d'RNA durant la transcripció de gens de la RNA Polimerasa II, però també es poden unir de forma específica a determinades seqüències d'RNA amb elevada afinitat i actuar en el procés d'*splicing* (Caputi i Zahler, 2001) antagonitzant a les proteïnes SR en funció de la concentració (Caceres i col., 1994; Mayeda i Krainer, 1992).

S'han utilitzat múltiples mètodes (veure revisió a Bourgeois i col., 2004) per intentar establir les seqüències reconegudes per les diferents SR, arribant-se així a unes seqüències consens bastant degenerades per a cada SR. De nou, aquests motius de l'RNA no són suficients per determinar la capacitat d'unió d'una SR sino que les seqüències flanquejants juguen un paper important (*per se* o pel fet que també s'hi puguin unir altres proteïnes SR). Aquest fet ha quedat demostrat en diferents casos, com en el dels gens *SMN1* i *SMN2*. Aquests són dos gens que han estat molt estudiats perquè mutacions a *SMN1* provoquen l'atròfia muscular espinal (SMA), mentre que *SMN2*, que només presenta un canvi sinònim respecte *SMN1*, majoritàriament genera un transcrit erroni en el que manca l'exó 7. L'estudi d'aquests gens va dur a descriure que el canvi present a *SMN2* provocava la destrucció d'un ESE reconegut per ASF/SF2 que duia a que l'exó on es trobava el canvi no fos reconegut com a tal (exclusió de l'exó) (Cartegni i Krainer, 2002). Un estudi posterior va rebutjar aquesta explicació i va mostrar que l'exclusió de l'exó a *SMN2* es deu a la creació d'un nou ESS reconegut per hnRNPA1 que inhibeix la

unió dels altres elements de l'spliceosoma (Kashima i Manley, 2003). Una darrera teoria torna a postular que és l'ESE destruït el causant de l'exclusió de l'exó 7, mentre que l'ESS és present tant a *SMN1* com a *SMN2* (Cartegni i col., 2006). Aquest exemple serveix per il·lustrar el nivell de sensibilitat i complexitat que rau en el mecanisme d'*splicing* i com, de moment, encara és difícil generalitzar el possible efecte de les proteïnes SR sobre una seqüència determinada.

Tanmateix, s'han realitzat diferents aproximacions per poder predir computacionalment l'existència d'ESEs en una seqüència com són els programes *ESE finder* (Cartegni i col., 2003) o *RESCUE* (Fairbrother i col., 2002), però seqüències amb altes puntuacions segons els programes no es correlacionen necessàriament amb la unió real de la proteïna en el context cel·lular.

Per últim, és important esmentar que cada vegada més s'està veient que les proteïnes SR no sols intervenen en el procés d'*splicing* sino que també poden realitzar diferents funcions en altres processos relacionats amb el metabolisme de l'mRNA. Les proteïnes SR serien aleshores uns reguladors multifuncionals capaços d'acoblar els processos d'*splicing*, d'exportació de l'mRNA del nucli i de traducció. A la taula 5 es poden veure els diferents rols post-transcripcionals descrits per a les SRs.

Taula 5. Funcions en les que s'ha descrit que intervenen les proteïnes SR. Obtingut de Sanford i col. (2005).

SR	<i>Splicing</i> constitutiú	<i>Splicing</i> alternatiu	Inhibició de l' <i>Splicing</i>	Exportació d'mRNA	Estabilitat d'mRNA	NMD	Traducció
SRp20	+	+	-	+	NE	-	-
9G8	+	+	-	+	NE	-	+
SRp30c	+	+	-	NE	NE	NE	NE
SF2/ASF	+	+	+	-	+	+	+
SC35	+	+	+	-	NE	+	-
SRp40	+	+	-	NE	NE	+	-
SRp46	+	+	-	NE	NE	NE	NE
SRp54	+	+	-	NE	NE	NE	NE
SRp55	+	+	-	NE	NE	+	NE
SRp75	+	+	-	NE	NE	NE	NE

+ demostrat experimentalment el seu paper en la funció indicada.

- demostrat experimentalment que no participa en la funció indicada

NE: no estudiat

3.2 L'*splicing* i l'*NMD*

El *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) és un mecanisme de control cel·lular que s'ha trobat des dels llevats fins a l'ésser humà. És un mecanisme que permet assegurar la qualitat dels mRNAs degradant selectivament aquells amb codons de terminació prematurs (PTCs) (Hentze i Kulozik, 1999; Maquat, 1995). Inicialment es creia que aquests PTCs únicament eren els que apareixien a l'mRNA com a conseqüència de diferents mutacions: mutacions puntuals, reorganitzacions del DNA, canvis de pauta de lectura per insercions o delecions, etc. Si aquests transcrits amb PTCs no eren eliminats, la seva presència podria dur a la síntesi de proteïnes errònies que podrien fer més mal que bé a la cèl·lula en realitzar un efecte dominant negatiu. S'acceptava d'aquesta manera que la principal funció de l'*NMD* era l'eliminació d'aquests transcrits erronis. Però darrerament s'ha descobert que l'*NMD* també actua sobre transcrits fisiològics no mutats adquirint així una funció més general de regulació post-transcripcional en regular l'expressió de diferents transcrits i eliminant el soroll genòmic que es genera per errors de la maquinària transcripcional i post-transcripcional (He i col., 2003; Mitrovich i Anderson, 2000). Per exemple, Mendell i col. (2004) van trobar que l'eliminació d'aminoàcids del medi de cultiu en cèl·lules HeLa duia a l'aparició de transcrits de gens relacionats amb l'homeostasi dels aminoàcids. Això passa perquè l'absència d'aminoàcids inhibeix la traducció, i la traducció és necessària pel funcionament de l'*NMD*. Per tant, l'*NMD* també queda inhibida davant una situació de manca d'aminoàcids i això permet l'aparició de transcrits relacionats amb el metabolisme dels aminoàcids que normalment són degradats per l'*NMD*.

A mamífers no tots els PTCs poden induir un procés d'*NMD* sino únicament aquells que es troben situats a més de 55 nucleòtids cap a 5' (*upstream*) de la darrera unió exó-exó (Nagy i Maquat, 1998). Són precisament aquestes unions exó-exó que es formen després de l'*splicing* les que serveixen d'ancoratge a un conjunt de proteïnes que, en el cas de no ser alliberades de l'mRNA, acabaran induint l'*NMD* (Fig. 15).

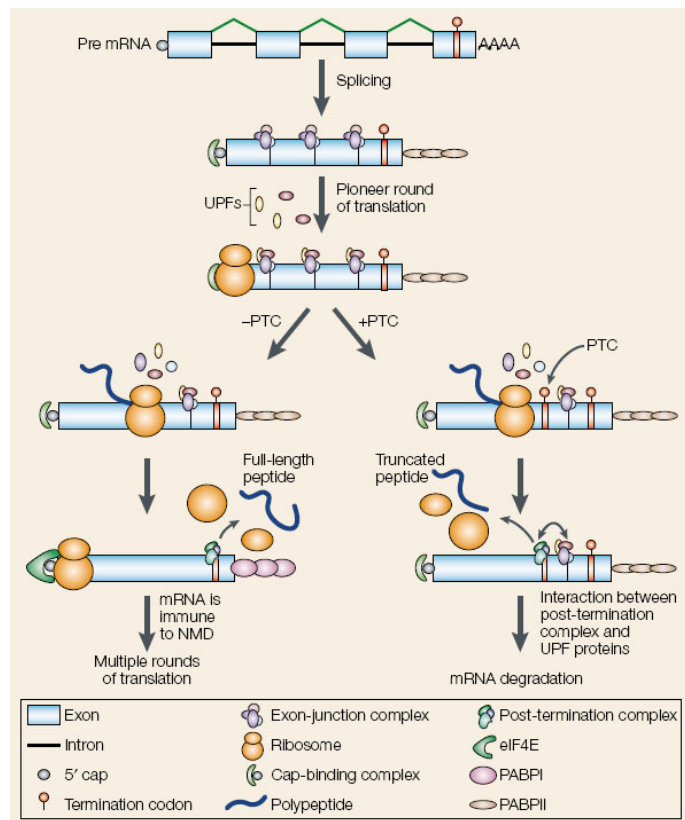


Figura 15.

Perquè hi hagi NMD cal que un PTC es trobi “abans” de la darrera unió exó-exó. Si passa això les proteïnes que hi ha en aquestes unions (EJC) no seran eliminades en passar el ribosoma i podran induir la degradació de l'mRNA. Adaptat de Cartegni i col. (2002).

Com funciona això? Tot i que encara queden punts per aclarir, el mecanisme general de funcionament de l'NMD està començant a ser desenmascarat. Se sap que la traducció és necessària per al reconeixement dels PTCs perquè el tractament amb antibiòtics que inhibeixen la traducció (com la cicloheximida, l'anisomicina, la puromicina,...) inhibeix l'NMD (Carter i col., 1995; Menon i Neufeld, 1994). Per altra banda també s'ha trobat que el procés d'*splicing* “deixa” un complex proteic (*exon junction complex*-EJC) uns 20-24 nucleòtids *upstream* de cada unió exó-exó de l'mRNA. En aquest complex s'acaben unint les proteïnes responsables de l'NMD com l'UPF1, l'UPF2 o l'UPF3 (Lejeune i col., 2002). Una primera ronda de traducció determinarà el destí de l'mRNA ja que si hi ha PTCs, el ribosoma no eliminarà tots els EJC, i aquests podran actuar com a lloc d'ancoratge de les proteïnes que acabaran induint l'NMD (Ishigaki i col., 2001). Un aspecte interessant i sorprenent que va aportar l'estudi de l'NMD va ser el fet que tot i que s'han descrit NMD citoplasmàtics, la majoria d'NMD sembla ocórrer al nucli (o en el procés d'exportació del nucli, encara no està clar) i això té com a conseqüència l'existència de “ribosomes” nuclears, un fet no descrit fins aleshores.

De moment hi ha articles tant a favor com en contra de l'existència de traducció al nucli (revisat a Dahlberg i col., 2003).

El lligam entre l'NMD i l'*splicing* sembla cada cop més clar, ja que l'un depèn de l'altre, i alhora el mateix NMD serveix per regular processos com l'*splicing* alternatiu o l'existència d'*splicings* incorrectes que trenquin la pauta de lectura. En un estudi, per exemple, van trobar que fins un terç dels transcrits que es troben en genoteques d'ESTs són formes alternatives susceptibles de patir NMD (Green i col., 2003; Lewis i col., 2003).

Per últim, cal dir que el que s'havia conegut com a *nonsense-associated altered splicing* (NAS), és a dir, una alteració de l'*splicing* causada específicament per la presència de codons de terminació deguts a mutacions (Hentze i Kulozik, 1999), ja no s'hauria d'entendre com un mecanisme específic sino que hauria acabat reclassificant-se en algun dels dos casos següents:

⇒ El NAS és una conseqüència de l'NMD. Sempre es fan mRNAs amb *splicing* incorrecte en petites quantitats que no detectem. Quan una mutació introdueix un PTC a l'mRNA, aquest és degradat i l'abundància relativa dels transcrits amb *splicing* incorrecte augmenta. En conseqüència, en la nova situació sembla que se sintetitzin uns nous transcrits diferents, si s'està detectant per mètodes no quantitius (Valentine, 1998).

⇒ El NAS es deu a l'alteració de seqüències *cis* essencials per al correcte *splicing*. Aquesta alteració la produeix el PTC, però no pel fet de ser un codó de terminació sino pel fet de canviar la seqüència, que pot ser un ESE o un element necessari per la formació d'una estructura secundària que ara deixa de ser funcional (Muro i col., 1999; Zatkova i col., 2004).

3.3 Els minigens

Els minigens pretenen ser una versió simplificada d'un gen per a poder estudiar l'*splicing* d'aquest gen. Van ser utilitzats per primer cop ja fa més de 20 anys per estudiar l'*splicing* alternatiu del gen de la fibronectina (Vibe-Pedersen i col., 1984) i des d'aleshores han estat essencials en l'estudi del fenomen de l'*splicing*. Encara avui en dia s'utilitzen versions d'aquests primers minigens per seguir coneixent com funciona

l'*splicing* o per analitzar si una mutació determinada és capaç de produir canvis en l'*splicing*.

Un minigèn típic és un plasmidi que conté una versió “simplificada” del gen que es vol avaluar. És una versió simplificada perquè normalment no es clona tot el gen sencer sino únicament aquells introns/exons que es volen analitzar, flanquejats per exons d'un altre gen (si és un minigèn híbrid) o no. En alguns casos, quan els introns dels gens a estudiar són molt llargs, s'inclouen únicament fragments parcials dels mateixos. Els plasmidis inclouen també promotors i llocs de poliadenilació que assegurin la transcripció i l'estabilitat de l'mRNA sintetitzat (Baralle i Baralle, 2005).

El principal desavantatge del sistema dels minigens està en el fet que les seqüències que flanquegen els introns/exons que estudiem no són les del propi gen (ja siguin els altres exons, el promotor o el lloc de poliadenilació) i sabem precisament que l'ambient que envolta un exó concret és un element principal en l'*splicing* subsegüent. Tanmateix aquest és precisament l'avantatge d'aquest sistema, que és el fet de poder evitar haver de treballar amb tot el gen i usar únicament aquells exons que ens interessin, separant-los de la resta de seqüències influents.

A continuació es citen un parell d'exemples de treballs amb minigens:

⇒ Genetta i col.laboradors (2001) van utilitzar el sistema de minigens per estudiar l'*splicing* alternatiu del gen *AMPD*. Aquest *splicing* alternatiu consisteix en la incorporació d'un exó de 12 nucleòtids que influeix en la funció definitiva de l'AMP deaminasa. Mitjançant delecions consecutives de l'intró situat *downstream* de l'exó alternatiu van poder acotar les seqüències reguladores d'aquest *splicing* alternatiu i van definir un nou ISE amb estructura bipartita.

⇒ Pagani i col.laboradors (2002) van descriure un pacient amb ataxia-telangiectasia que presentava una delecio de 4 nucleòtids a l'intró 20 del gen *ATM*. Aquesta delecio genera l'aparicio d'un exó críptic que s'incorpora al transcrit del gen. En analitzar la seqüència afectada per la delecio van trobar que era altament homòloga a la seqüència d'unió de l'snRNA U1. Amb un sistema de minigens híbrid i realitzant diferents mutagènesis dirigides de la seqüència alterada van definir un nou *intron-*

splicing processing element (ISPE) on s'uneix l'snRNP U1 per fer que l'exó críptic romangui com intró.