

**ESTUDI DE LES BASES MOLECULARS DE LA RETINOSI PIGMENTÀRIA
AUTOSÒMICA RECESSIVA:
ANÀLISI DELS GENS RLBP1, CRBP1, RGR, CRB1 I USH2A**

Memòria presentada per Sara Bernal Noguera
per optar al grau de Doctora en Ciències Biològiques

Barcelona, 2004

Programa de Doctorat Biologia cel·lular
Bienni 2000-2002

Treball realitzat sota la direcció de la Dra. Montserrat Baiget Bastús al Servei de Genètica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, de Barcelona.

Tesi adscrita al Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Tutora: Dra. Rosa Miró Ametller

Dra. M. Baiget
Directora

Dra. R. Miró
Tutora

S. Bernal
Doctoranda

A l'Alfons i als meus pares
pel seu suport incondicional

AGRAÏMENTS

Els anys han passat i el què en un principi semblava una fita llunyana i força inaccessible ha arribat al seu final. Arribar fins aquí no ha estat gens fàcil, sou molts els que d'una forma o altre heu fet possible que aquesta tesi sigui una realitat i per aquest motiu us vull agrair l'ajuda que en tot moment he rebut. Gràcies pels bons moments que m'heu fet viure, no us oblidaré...

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies a la Dra. Montserrat Baiget , per haver-me donat l'oportunitat d'endinsar-me en una aventura difícil però a la vegada tant enriquidora dins el món de la genètica. Després de tant de temps, tinc la mateixa il·lusió que el primer dia, i això és gràcies a la confiança que en tot moment ha dipositat en mi.

Encara que em falta molt per aprendre, tot el què ser és gràcies a les persones que formen o han format part del Servei de Genètica de l'Hospital de Sant Pau (Laura Alias, Alba Freixas, M^aJosé Rodríguez, Pia Gallano, Sara Gutiérrez, Orland Díez, M^aJesús Barceló, Lidia, Manel Baena, Dori, Eduardo Tizzano, Eli Del Rio, Anna Menoyo, Montse Gómez, Vanessa, Pepa, M^a Antonia Díaz, Anna Cotelo, Marta, Neus, Carmen, Blanca Guzman ,Carles de Diego, Joan Cortés...). Cadascun de vosaltres heu contribuït a fer realitat aquesta tesi, sense la vostra col·laboració no hagués estat possible. Gràcies per l'ajuda que en tot moment m'heu proporcionat fent més fàcil el camí a seguir i sobretot per aguantar-me en moments difícils. Us agraeixo la vostra comprensió, animant-me en moments baixos, fent-me riure quant més ho necessitava,... Per totes les vivències compartides, gràcies.

A la Montse Doménech per un començament tant fantàstic en el món de la genètica, te'n recordes del meu inici? mai oblidaré la teva paciència i sobretot et vull donar les gràcies per involucrar-me en un camp tant apassionant. A la Mònica Calaf per la seva ferma col·laboració en una malaltia tant complexa com és la Retinosi pigmentària, ja ho saps... esperit positiu!!!. A la Ivon, Berta i Carol per compartir moments difícils en l'aventura d'una tesi. A la Loreto, Mònica Cornet i Eva Lòpez, gràcies pel recolzament i la vostra amistat durant tots aquests anys.

A la Dra Rosa Miró Ametller per acceptar ser tutora d'aquesta tesi.

Als pacients i familiars afectats de Retinosi Pigmentaria, que sense la seva col·laboració aquest treball no hagués estat possible.

Als serveis d'Oftalmologia i d'Otorrinolaringologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau per la seva ajuda en el diagnòstic clínic dels pacients estudiats en aquesta tesi.

A la Dra. Carmen Ayuso i al seu equip per la seva col·laboració, participant en tot moment i facilitant totes les dades clíniques dels pacients estudiats.

Al Fons d'Investigacions Sanitàries (FIS) i a l'organització FUNDALUCE per concedir els projectes que han permès el finançament d'aquest treball.

Als meus amics per ser tant tolerants, sobretot en aquests darrers anys. I a l'Alfons, Carme, Claudia i Joan per estar sempre allà quan ho he necessitat.

Sobretot als meus pares i a les meves germanes que en tot moment han estat al meu costat, donant-me la seguretat i la força necessària per continuar endavant.

I en especial a l'Alfons, per la seva ajuda durant tots aquests anys, per fer-me sentir bé en moments difícils, per la seva comprensió i pel seu suport moral. Alfons, gràcies per estar sempre al meu costat. Ja ho saps ! Crec que en aquests moments les paraules sobren...

INDEX

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓ | 1 |
| 1.1 ASPECTES FISIOLÒGICS DE LA VISIÓ | 3 |
| 1.2. ANATOMIA DE LA RETINA | 5 |
| 1.2.1. L'Epiteli Pigmentari de la Retina (EPR) | 7 |
| 1.2.2. Els Fotoreceptors | 8 |
| 1.3. PROCÉS DE LA VISIÓ | 10 |
| 1.3.1. Mecanisme de la fototransducció..... | 10 |
| 1.3.2. Mecanismes d'adaptació a la foscor | 14 |
| 1.3.3. Regeneració de la Rodopsina | 17 |
| 1.4. LA RETINOSI PIGMENTÀRIA | 19 |
| 1.4.1. Definició de Retinosi Pigmentària (RP) | 19 |
| 1.4.2. Aspectes clínics de la RP no sindròmica..... | 21 |
| 1.4.2.1. Síntomes..... | 21 |
| 1.4.2.2. Diagnòstic.. | 21 |
| 1.4.3. Classificació clínica i genètica de la RP | 25 |
| 1.4.3.1. RP no sindròmica | 25 |
| 1.4.3.1.1. RP autosòmica dominant (RPAD) | 26 |
| 1.4.3.1.2. RP autosòmica recessiva (RPAR) | 26 |
| 1.4.3.1.3. RP lligada al cromosoma X (RPLX) | 27 |
| 1.4.3.2. RP sindròmica: Síndrome d'Usher | 28 |
| 1.4.4. Epidemiologia de la RP a l'Estat Espanyol | 30 |
| 1.4.5. Bases moleculars de la RP no sindròmica | 31 |
| 1.4.5.1. Gens i loci identificats en la RPAR | 32 |
| 1.5. GENS ANALITZATS EN AQUEST TREBALL | 40 |
| 1.5.1. Gens expressats en EPR implicats en el cicle visual | 40 |
| 1.5.1.1. Gen RLBP1 (<i>Retinaldehyde-binding protein 1</i>) | 40 |
| 1.5.1.2. Gen CRBP1 (<i>Cellular retinol-binding protein 1</i>) | 45 |
| 1.5.1.3. Gen RGR (<i>RPE-G protein-coupled-receptor</i>) | 46 |

| | |
|--|-----------|
| 1.5.2. Gens expressats en la part neural de la retina de funció desconeguda | 50 |
| 1.5.2.1. Gen CRB1 (<i>Crumbs homologue 1</i>) | 50 |
| 1.5.2.2. Gen USH2A (Usher 2A) | 54 |
| | |
| 2. OBJECTIUS | 59 |
| | |
| 3. FAMILIES ESTUDIADAES | 63 |
| | |
| 4. RESULTATS | 77 |
| 4.1. ESTUDI DEL GEN RLBP1 | 79 |
| 4.1.1. “ Evaluation of RLBP1 in 50 autosomal recessive retinitis pigmentosa and 4 retinitis punctata albescens Spanish families”. S. Bernal, M. Calaf, A. Adan, T. Solans, D. Valverde, C. Ayuso, M. Baiget. Ophthalmic Genetics 2001; 22:19-25 | 79 |
| 4.2. ESTUDI DELS GENS CANDIDATS: RGR, CRBP1 I CRB1 | 89 |
| 4.2.1. “ Study of the involvement of the RGR, CRBP1 and CRB1 genes in the pathogenesis of autosomal recessive retinitis pigmentosa”. S. Bernal, M. Calaf. M. Garcia, B. Garcia, J. Rosell, A. Adan, C. Ayuso, M. Baiget. Journal of Medical Genetics 2003; 40: e89 (online mutation report) | 89 |
| 4.3. ESTUDI DEL GEN USH2A | 99 |
| 4.3.1. “ Prevalence of 2314delG mutation in Spanish patients with Usher syndrome type II (USH2)”. M. Beneyto, JM. Cuevas, JM Millan, C. Espinós, E. Mateo, P. Gonzalez, M. Baiget, M. Domènech, S. Bernal, C. Ayuso, B. Garcia, MJ. Trujillo, S. Borrego, G. Antiñolo, M. Carballi, C. Najera. Ophthalmic Genetics 2000; 21:132-128..... | 99 |

| | |
|---|------------|
| 4.3.2. “ Mutations in USH2A in Spanish patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa: high prevalence and phenotypic variation”. | |
| S. Bernal, C. Ayuso, G. Antiñolo, A. Gimenez, S. Borrego, MJ. Trujillo, I. Marcos, M. Calaf, E. del Rio, M. Baiget. Journal of Medical Genetics 2003; 40: e8 (online mutation report) | 107 |
| | |
| 4.4. ESTUDI DEL GEN USH2A EN LA RPAR NO SINDRÒMICA I EN MALALTS AMB LA SÍNDROME D’USHER TIPUS II | 115 |
| | |
| 5. DISCUSSIÓ | 123 |
| 5.1. ESTUDI DEL GEN RLBP1 (<i>Retinaldehyde-binding protein 1</i>)..... | 125 |
| 5.2. ESTUDI DEL GEN CRBP1 (<i>Cellular retinol-binding protein 1</i>)..... | 129 |
| 5.3 ESTUDI DEL GEN RGR (<i>RPE-G protein-coupled-receptor</i>)..... | 130 |
| 5.4 ESTUDI DEL GEN CRB1 (<i>Crumbs homologue 1</i>) | 133 |
| 5.5 ESTUDI DEL GEN USH2A (Usher 2A) | 139 |
| 5.5.1. En famílies amb RP no sindròmica seguint un patró d’herència autosòmic recessiu..... | 139 |
| 5.5.2. En famílies amb la síndrome d’Usher tipus II | 144 |
| | |
| 6. CONCLUSIONS | 151 |
| | |
| 7. REFERÈNCIES | 155 |

1. INTRODUCCIÓ

1.1. ASPECTES FISIOLÒGICS DE LA VISIÓ

La visió és un sistema de neuropercepció que requereix el treball coordinat de l'ull i el cervell. L'ull dels vertebrats està format per diversos teixits, dels quals cal destacar tres capes bàsiques:

- Capa fibrosa (constituïda per la còrnea i l'escleròtica, formant una càpsula fibroelàstica que aguanta el globus ocular)
- Capa vascular (caracteritzada per ser una capa molt vascularitzada que està formada per la coroïdes, el cos ciliat i l'iris)
- Capa nerviosa (formada, bàsicament, per la retina que constitueix una part molt important de l'ull per la percepció de la informació visual i el seu posterior processament)

La llum abans d'arribar a la capa dels fotoreceptors de la retina ha de travessar els diversos teixits que formen l'ull (Figura 1). En aquest recorregut de la llum té lloc el fenomen d'acomodació, que s'inicia quan la llum entra a través de la pupil·la (obertura situada en el centre de l'iris) que actua regulant la quantitat de llum incident. A continuació travessa un teixit transparent i amb capacitat d'enfocar la imatge, el cristal·lí, que serà l'encarregat de concentrar la llum i formar una imatge invertida sobre la retina. Un cop passat aquest punt, la llum ha de travessar l'humor vitri fins arribar a la retina.

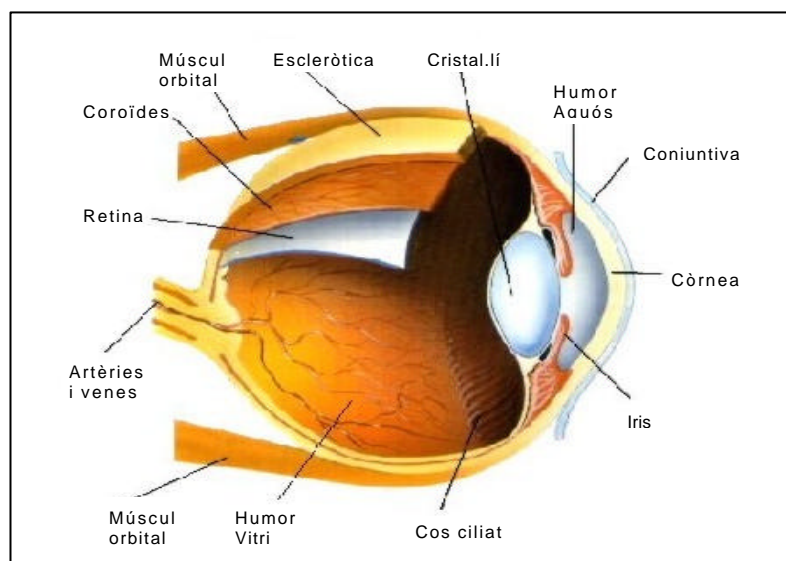


Figura 1. Esquema de l'anatomia d'un ull de mamífer mostrant els teixits que ha de travessar la llum per arribar a incidir sobre la retina.

La retina és la part de l'ull fotosensible, té una funció receptora i integradora de tota la informació visual que rep. En la retina, la llum incident ha de passar a través de diverses capes cel·lulars fins arribar a la capa dels fotoreceptors per iniciar el procés de la transducció visual. La resposta donada pels fotoreceptors en forma d'impuls nerviós ha de seguir el camí invers al recorregut inicial seguit per la llum fins assolir les cèl·lules ganglionars, i d'aquí passarà al nervi òptic per arribar a l'escorça cerebral on tindrà lloc el processament de la informació visual procedent de l'estimulació lluminosa.

La retina conté dos tipus de cèl·lules fotoreceptores, els cons i els bastons. Els cons es concentren principalment en la fòvea (regió central depressionada de la màcula) on es genera la visió aguda i detallada. Per contra, els bastons es concentren principalment a la part perifèrica de la retina produint imatges poc nítides i poc detallades.

Com en la resta de sistemes sensorials dels vertebrats, el sistema visual té lloc per un procés que consta de tres etapes principals:

- La primera etapa, consisteix en la detecció d'estímuls procedents de l'ambient per part dels receptors sensorials corresponents.
- A continuació, té lloc la transducció o conversió d'aquest estímul en un llenguatge intel·ligible pel sistema nerviós.
- I finalment, la transmissió del senyal elèctric des del teixit de percepció sensorial fins al cervell on serà processat per tal de generar la resposta corresponent a l'estímul detectat.

1.2. ANATOMIA DE LA RETINA

La retina és la part de l'ull sensible a la llum. Té la capacitat de codificar l'energia lluminosa emesa pels objectes detectats per l'ull en un senyal elèctric en forma de potencial d'acció, en el qual hi resideix tota la informació visual (forma, lluminositat, color, moviment i entorn). Aquests senyals elèctrics produïts en resposta a la llum seran intel·ligibles pel Sistema Nerviós Central (SNC).

A nivell histològic, la retina està dividida en diverses capes que contenen els diferents tipus cel·lulars, tots ells involucrats en la conversió i transmissió del senyal cap al cervell (Kolb i col., 1994; Guyton i Hall, 1996) (Figura 2).

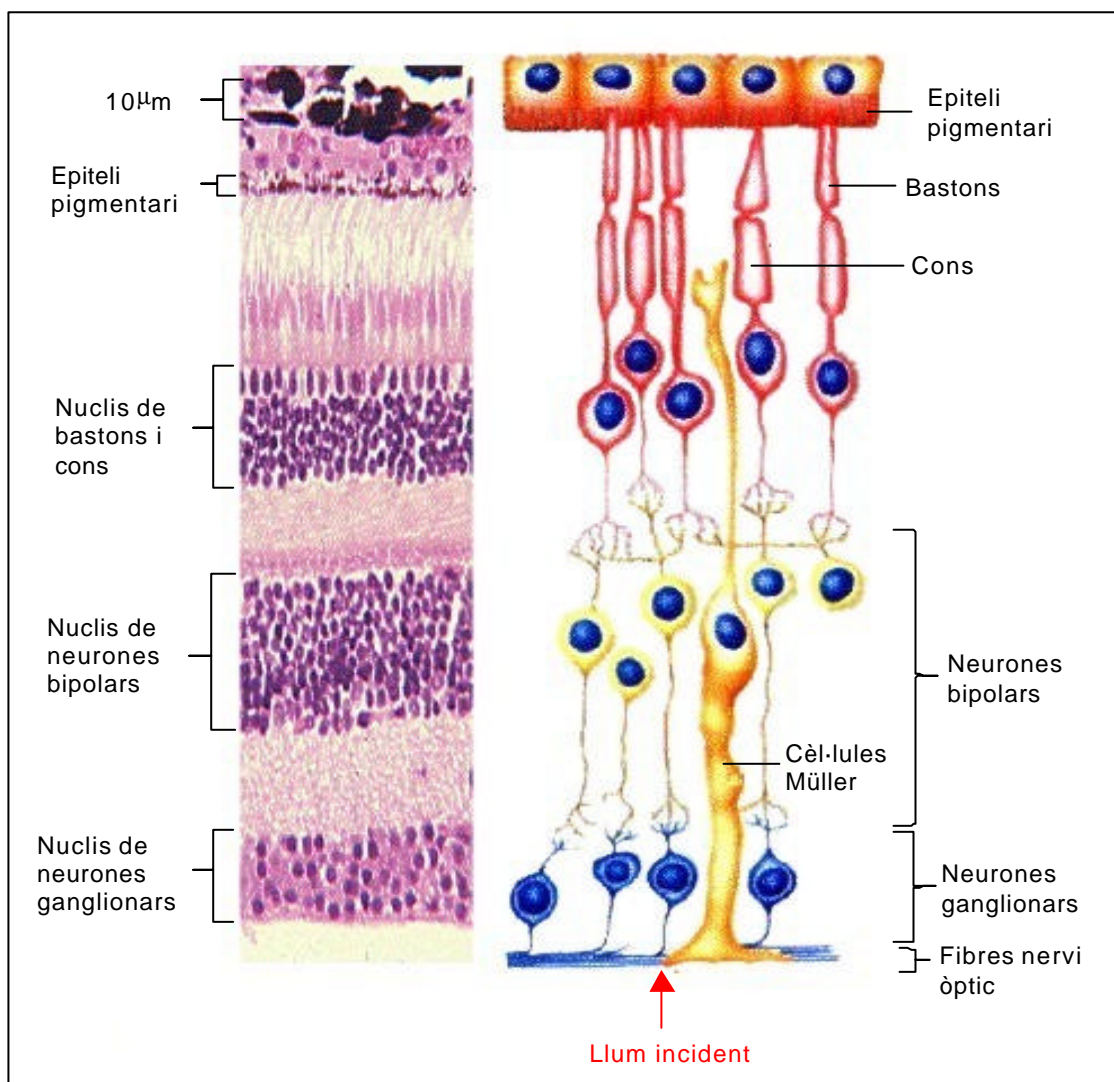


Figura 2. Secció vertical de la retina humana mostrant una estructura estratificada complexa i interconnectada.

L'epiteli pigmentari és la capa més externa de la retina i està separada de la coroïdes per la membrana de Bruch. Es caracteritza per ser una monocapa de cèl·lules epitelials que està en contacte directe amb els segments externs dels fotoreceptors. En el citoplasma d'aquestes cèl·lules epitelials hi ha grànuls de melanina que eviten la reflexió de la llum dins el globus ocular (Fawcett, 1995).

A continuació trobem la part neural de la retina (Figura 2) que està formada per:

- Capa de fotoreceptors: Conté els segments externs dels bastons i cons.
- Membrana limitant externa: Línia d'unió intercel·lular dels fotoreceptors i les cèl·lules de Müller o de suport.
- Capa nuclear externa: Cossos cel·lulars dels fotoreceptors.
- Capa plexiforme externa: Zona on s'estableix les sinapsis entre els axons dels fotoreceptors i les dendrites de les neurones bipolars i horitzontals.
- Capa nuclear interna : Formada pels nuclis cel·lulars de les neurones bipolars, horitzontals i amacrines. Les cèl·lules horitzontals i amacrines formen les vies de direcció lateral que actuen modulant els senyals transmesos per la via vertical de la retina.
- Capa plexiforme interna: És on té lloc la segona sinapsi de la via vertical de la retina que consisteix en el contacte entre els axons de les cèl·lules bipolars i les dendrites de les cèl·lules ganglionars. També hi ha les terminacions de les cèl·lules amacrines que modulen la informació que arriba a les cèl·lules ganglionars.
- Capa de cèl·lules ganglionars: Conté els nuclis de les cèl·lules ganglionars, els axons de les quals formen el nervi òptic.
- Membrana limitant interna: Part més interna de la retina, està formada per la membrana basal de les cèl·lules de Müller que separa la retina de l'humor vitrí fent de barrera entre ambdues.

La resposta de les diferents capes de la retina a l'estímul lluminós es tradueix com una conducció elèctrica, excepte a nivell de la capa de les cèl·lules ganglionars que transmet el senyal en forma de potencials d'acció. Aquesta propietat permet que el senyal de sortida sigui directament proporcional a la intensitat lumínica i no sigui un senyal de tot-o-res com passa quan es tracta d'un potencial d'acció.

1.2.1. L'EPITELI PIGMENTARI DE LA RETINA (EPR)

L'EPR és una monocapa de cèl·lules epitelials que contenen grànuls de melanina en el citoplasma i per l'extrem apical emeten unes prolongacions que envolten els segments externs dels fotoreceptors donant lloc al contacte íntim existent entre aquestes dues capes de la retina. Les funcions de l'EPR són molt importants pel manteniment dels diferents tipus cel·lulars que formen la retina neural i també pel propi procés de la visió.

Les principals funcions de l'EPR poden resumir-se en els següents punts:

- Fagocitosi dels components estructurals del segment extern dels fotoreceptors mitjançant digestió lisosomal.
- Regeneració dels pigments visuals necessaris pel mecanisme de fototransducció. Aquesta regeneració comporta una sèrie de reaccions metabòliques que utilitzen com a substrat de partida, tant el derivat alliberat de la rodopsina prèviament excitada durant la fototransducció, com el derivat exogen provinent del cicle de la vitamina A.
- Síntesi de grànuls de melanina per absorbir la llum que no ha estat capturada pels fotoreceptors impedit que sigui disseminada dins el globus ocular.
- Aport de nutrients necessaris pels fotoreceptors i síntesi dels components de la matriu interfotoreceptora.
- L'EPR constitueix una barrera entre la capa vascular (coroïdes) i les capes externes de la retina regulant el transport d'ions, aigua i macromolècules.

La íntima relació coneguda entre les capes de l'EPR i dels fotoreceptors, la mobilització pigmentària entre aquestes dues capes observada en els estudis clínics realitzats amb pacients afectats de Retinosi Pigmentària (RP) i les dades obtingudes en models animals amb degeneració retiniana (Müllen i LaVail, 1975; D'Cruz i col., 2000) reforcen la hipòtesi que determinades degeneracions de la retina podrien ser causades per l'alteració de l'EPR. S'han descrit mutacions relacionades amb la RP i l'amaurosi congènita de Leber (LCA, Leber congenital amaurosi) en gens expressats en l'EPR, que estan implicats en el metabolisme de la vitamina A i en la regeneració dels pigments visuals necessaris pel mecanisme de la fototransducció visual (Nicoletti i col., 1995; Gu i col., 1997; Marlhens i col., 1997; Maw i col., 1997).

1.2.2. ELS FOTORECEPTORS

Els fotoreceptors (cons i bastons) són cèl·lules nervioses molt abundants en la retina i altament especialitzades en la detecció de l'estímul lluminós. Estan localitzats al llarg de la retina posterior i s'estima que en una retina humana hi ha al voltant de 125 milions de fotoreceptors, dels quals aproximadament entre 3-7 milions són cons i la resta bastons. Ambdós tipus tenen la finalitat de convertir la llum en impuls nerviós.

Els cons són les cèl·lules fotoreceptores encarregades de respondre a intensitats elevades de llum generant la visió diürna; també són els responsables de la percepció dels colors i de la agudes visual per obtenir les imatges nítides i detallades. El pigment fotosensible que forma els cons són les opsines que absorbeixen la llum a diferents longituds d'ona dins l'espectre del visible. Segons el tipus de fotopsina que contenen, els cons es poden subdividir en tres tipus: sensible al verd, al blau i al vermell.

Els bastons són les cèl·lules fotoreceptores que responen a intensitats baixes de llum. Són els responsables de la visió nocturna (escotòpica) i de la percepció dels contrastos (visió en blanc i negre), a més de presentar una gran sensibilitat per detectar les variacions de les intensitats lumíniques. El seu fotopigment és la rodopsina.

Pel què fa a la distribució espacial en la retina, els cons es troben localitzats principalment en la fòvea (màcula), mentre que els bastons es situen majoritàriament a la perifèria. Els cons i bastons es consideren les primeres cèl·lules nervioses de la via visual i tenen com a funció principal portar a terme el mecanisme de la fototransducció. Ambdós tipus tenen una estructura comuna formada per un segment extern situat en el pol apical del fotoreceptor en contacte directe amb l'epiteli pigmentari i un segment intern en la part basal de la cèl·lula. Aquests dos segments estan separats entre si per un cili de connexió modificat. Els cons i bastons es diferencien tant a nivell del segment extern per la morfologia i el tipus de fotopigment com a nivell del segment intern pel què fa a les terminacions sinàptiques.

El segment extern és el pol sensorial de la cèl·lula i està en íntim contacte amb l'EPR, tant a nivell anatòmic com funcional. La forma del segment extern dels cons és cònica mentre que en els bastons és allargada (Figura 3). El segment extern està format per membranes organitzades en forma de discs aplanats on es localitzen els

pigments visuals encarregats de fotoactivar-se amb l'arribada de l'estímul lluminós per així iniciar la cascada de la fototransducció. En el cas dels cons, la membrana dels discs presenta continuïtat amb la membrana plasmàtica del fotoreceptor i pel que fa als pigments visuals permeten diferenciar tres tipus de cons segons el tipus d'opsina que contenen, la suma de tots ells dona la visió tricromàtica. Per contra, en els bastons, els discs són independents de la membrana plasmàtica i contenen rodopsina com a únic tipus de fotopigment.

Els fotoreceptors són cèl·lules nervioses que no es divideixen, en canvi els components del segment extern (discs) es renoven contínuament (Travis, 1997). En els bastons aquest recanvi està organitzat en l'espai, de forma que constantment

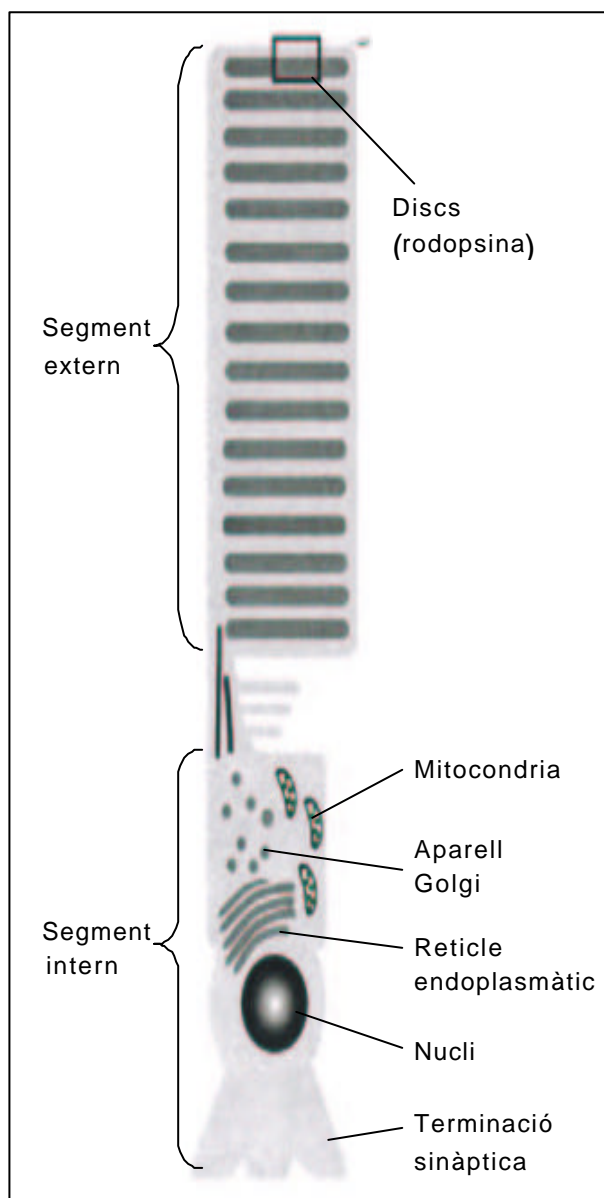


Figura 3. Estructura d'un fotoreceptor tipus bastó.

es sintetitzen prop del nucli noves estructures membranoses que migren cap al segment extern per formar els discs, alhora que, en l'extrem apical dels fotoreceptors, aquests discs són fagocitats per l'epiteli pigmentari de la retina (EPR).

El segment intern dels fotoreceptors està format per mitocondries, la resta d'orgànuls cel·lulars, el nucli i la terminació sinàptica (Figura 3). En aquesta part més distal del fotoreceptor hi ha la maquinària especialitzada en la síntesi, ensemblatge i transport de macromolècules, part proteica dels pigments visuals i proteïnes estructurals entre d'altres components propis del segment extern. El segment intern també contribueix a generar l'energia necessària pel mecanisme de la fototransducció que té lloc en el segment extern.

1.3. PROCÉS DE LA VISIÓ

Els mecanismes de fototransducció en resposta a la llum i els mecanismes implicats en l'adaptació a la foscor tenen lloc en el segment extern del fotoreceptor, mentre que la regeneració del cromòfor del pigment visual es dona principalment en l'EPR. El mecanisme de la fototransducció està constituït per una cascada enzimàtica que amplifica i transforma l'energia de l'estímul lluminós en un senyal elèctric mitjançant canvis de permeabilitat cel·lular que són detectats en la sinapsi per les variacions en l'emissió del neurotransmissor. Aquest mecanisme és molt semblant entre els dos tipus de fotoreceptors, una de les diferències resideix en el fet que l'amplificació de la resposta en els cons és entre 10 i 100 vegades inferior a la que es dona en els bastons, i també existeixen diferències pel què fa a les molècules que hi participen. El procés de la visió en els bastons pot dividir-se en diferents mecanismes d'adaptació a la llum/foscor, els quals són exposats a continuació (Palczewski 1994; Baylor, 1996; Fain i col., 2001).

1.3.1. MECANISME DE LA FOTOTRANSDUCCIÓ

El mecanisme de la fototransducció té lloc en la membrana dels discs on es concentra el pigment fotosensible. Tot aquest procés comença amb la fotoexcitació de la molècula de rodopsina. La rodopsina és el pigment visual dels bastons i està formada per una part proteica integrada en la membrana (l'opsina) i un cromòfor o grup prostètic (l'11-cis-retinal) que s'uneix al residu conservat Lys296 de l'opsina mitjançant un enllaç covalent tipus *Schiff* i que constitueix la part del pigment visual que confereix la capacitat d'absorció de la llum.

La llum provoca la isomerització del cromòfor del pigment visual, l'11-cis retinal, cap a la seva configuració tot-trans-retinal iniciant un procés d'escissió entre la nova configuració del cromòfor i l'opsina. Durant l'escissió es produeixen canvis de conformació de l'opsina que fa que passi per diferents estats energètics fins assolir l'estat activat en forma de metarrodopsina II (Rho*). Aquesta conformació activa, totalment separada del tot-trans-retinal, queda lliure per activar la transducina (Nathans, 1992; Hamm, 2001).

El primer pas d'amplificació de la cascada de fototransducció (Figura 4) és l'acoplament de la rodopsina fotoactivada amb la transducina (T) junt amb la catàlisi d'intercanvi de nucleòtid que té lloc en un temps màxim d'un milisegon. La transducina és una proteïna G associada a la membrana dels discs i formada per tres subunitats (α , β , γ). La subunitat α de la transducina ($T\alpha$) en estat de repòs porta unit GDP; la forma activa de la rodopsina catalitza l'intercanvi del GDP a GTP activant la molècula de transducina, i aquesta adquireix una nova conformació que fa que perdi l'afinitat tant per la metarrodopsina II (Rho^*) com pel dímer format per les subunitats inhibidores β i γ de la transducina. Això fa que, per una banda la rodopsina activa alliberada vagi activant de forma successiva altres molècules de transducina produint l'amplificació del senyal inicial. I per altre banda, la subunitat α de la transducina serà l'encarregada d'activar el següent pas de la cascada.

Aquest segon pas consisteix en l'activació de la fosfodiesterasa (*phosphodiesterase*, PDE), enzim heterotetramèric associat a la membrana dels discs. La PDE està formada per dues subunitats catalítiques α , β i dues subunitats inhibidores idèntiques γ . La interacció de la subunitat inhibidora γ amb el dímer $PDE\alpha\beta$, prèviament activat per la subunitat α de la transducina, és necessària perquè l'enzim sigui actiu i estable (Tsang i col., 1996; Tsang i col., 2002). La fosfodiesterasa s'ancla a la superfície citoplasmàtica de la membrana plasmàtica dels discs del segment extern del fotoreceptor per l'extrem C-terminal de les subunitats $\alpha\beta$, que actuen regulant els nivells intracel·lulars de GMPc en resposta a la llum.

Les subunitats $T\alpha$ -GTP s'uneixen a les subunitats γ de la PDE provocant un canvi conformacional d'aquestes, de forma que s'activa el complex catalític $PDE\alpha\beta$ que actua hidrolitzant el GMPc citoplasmàtic en GMP. Aquesta situació desencadena el tancament dels canals catiónics dependents de GMPc de la membrana plasmàtica del fotoreceptor.

El canal catiónic dependent de GMPc (*cyclic nucleotide-gated channel*, CNG) es localitza en la membrana plasmàtica dels bastons i té un paper important en la fototransducció. Controla el flux d'entrada de cations dins el segment extern com a resposta als canvis dels nivells intracel·lulars de GMPc induïts per la llum (el 85% del flux són ions Na^+ i el 15% ions Ca^{2+}). Aquest canal catiónic és un complex heteromèric format per dues subunitats homòlogues (CNGA i CNGB) (Shammat i col., 1999). En un estudi recent s'ha identificat un domini ric en leucines en la

subunitat α i absent en la subunitat β anomenat domini CLZ (*C-terminal Leucine Zipper*). Aquest domini permet una interacció entre les subunitats α donant una estructura trimèrica. Així, el canal catiònic dependent de GMPc adopta una estequiometria de $3\alpha:1\beta$ (Zhong i col., 2003).

Les subunitats α i β tenen una estructura comuna constituïda per un domini d'unió a GMPc, múltiples segments transmembrana i un porus iònic. La subunitat α (CNGA) té activitat intrínseca i proporciona la pròpia funcionalitat al complex del canal, a diferència de la subunitat β (CNGB) que actua modulant l'activitat del canal mitjançant la interacció amb la calmodulina (CaM). La subunitat α posseeix un domini N-terminal citoplasmàtic, sis segments transmembrana, un porus iònic situat entre el 5è i 6è segment transmembrana i una regió pròxima a l'extrem C-terminal on s'hi uneix el GMPc donant l'activitat intrínseca pròpia d'aquesta subunitat. S'ha descrit que l'expressió reduïda d'aquesta subunitat en models animals transgènics condueix a la degeneració dels fotoreceptors i cèl·lules bipolars (Leconte i Barnstable, 2000). La subunitat β té, a més a més, dos llocs d'unió a la calmodulina en els extrems citoplasmàtics N i C-terminal, tot i que només la regió N-terminal té un paper important en la inhibició exercida per la calmodulina sobre l'activitat del canal catiònic dependent de GMPc en la resposta d'adaptació a la llum (Chen i col., 1994; Hsu i Molday, 1994; Grunwald i col., 1998; Weitz i col., 1998; Molday i Molday, 1998; Warren i Molday, 2002). S'ha descrit una possible interacció entre el canal catiònic dependent de GMPc i la bomba d'intercanvi $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+} - \text{K}^+$ (NCKX) independent de la llum a través de la subunitat α del canal catiònic formant un complex situat en la membrana plasmàtica del segment extern del fotoreceptor (Schwarzer i col., 2000).

La baixada dels nivells citoplasmàtics de GMPc produïda per l'acció de la fosfodiesterasa durant els períodes de llum provoca el tancament dels canals dependents de GMPc (CNG). Com a conseqüència, no hi ha una entrada continuada de Na^+ i Ca^{2+} cap a l'espai intracel·lular dels bastons i per tant es produeix una disminució en la conductància catiònica de la membrana plasmàtica dels fotoreceptors. Aquesta disminució de Ca^{2+} és potenciada per l'acció de la bomba d'intercanvi $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+} - \text{K}^+$ situada en la membrana plasmàtica del segment extern dels fotoreceptors (NCKX), i per altre banda el segment intern del fotoreceptor bombeja Na^+ de forma continuada cap a l'exterior. Com a resultat final es crea un ambient electronegatiu a nivell intracel·lular, desencadenant la hiperpolarització de la membrana plasmàtica del fotoreceptor. Aquesta resposta, en forma de potencial

gradual i no de potencial d'acció que té lloc en dècimes de segon, produeix la disminució del neurotransmissor alliberat per part del pol sinàptic dels bastons iniciant la resposta neural a la llum.

El GMPc és essencial per mantenir oberts els canals catiónics, de forma que durant els períodes de fosc on la concentració de GMPc es recupera, es manté una entrada continuada de cations Na^+ i Ca^{2+} cap a l'espai intracel·lular dels bastons a través dels canals catiónics dependents de GMPc. Aquesta entrada junt amb el flux de cations a través de la bomba d'intercanvi $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+} - \text{K}^+$ independent de la llum genera un balanç electropositiu intracel·lular que es tradueix a nivell de la membrana plasmàtica en un estat de despolarització.

La disminució en la concentració de Ca^{2+} lliure intracel·lular, produïda en condicions de llum, desencadena diferents mecanismes de retroalimentació negativa, fent del Ca^{2+} una molècula important en els fenòmens d'adaptació a la llum/fosc (Polans i col.,1996; Palczewski i col, 2000; Nakatani i col., 2002).

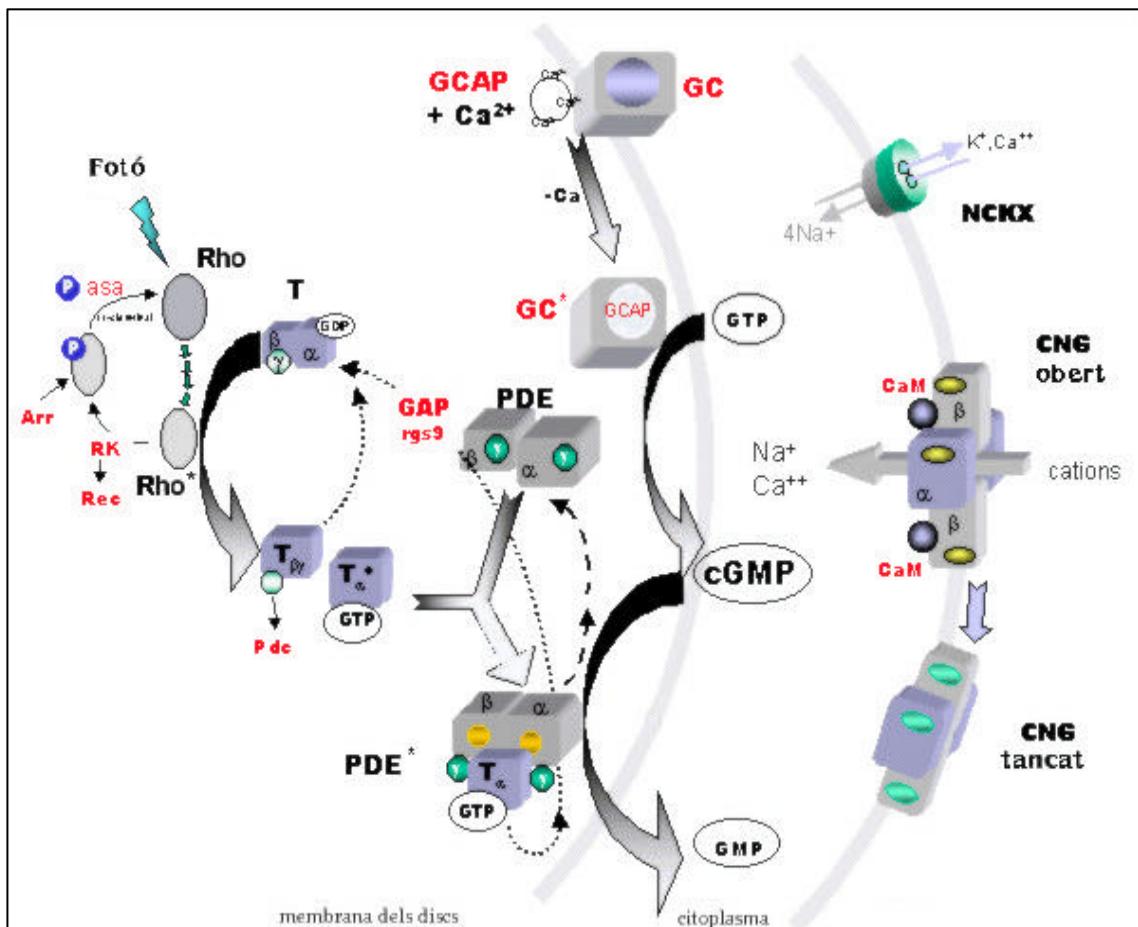


Figura 4. Esquema dels mecanismes bioquímics implicats en els mecanismes de fototransducció i d'adaptació a la foscor.

1.3.2. MECANISMES D'ADAPTACIÓ ALA FOSCOR

La capacitat que té el sistema visual per ajustar la seva funció segons les diferents intensitats de llum que rep es defineix com el procés d'adaptació a la llum/foscor. L'adaptació a la foscor implica per una banda mecanismes dirigits a desactivar els diferents passos de la cascada de fototransducció que han estat prèviament activats com a resposta a la llum i per una altra banda implica el metabolisme dels retinoids per generar una eficient restauració del pigment visual necessari per l'absorció de posteriors fotons de llum.

Els mecanismes que tenen lloc en condicions de foscor i dirigits a la recuperació dels nivells intracel·lulars de GMPc i Ca^{2+} desencadenats en resposta a la llum, es poden agrupar en: 1) Mecanismes de retroalimentació dependents de Ca^{2+} . 2) Mecanismes independents de la concentració de Ca^{2+} .

1) Mecanismes de retroalimentació dependents de Ca^{2+} (Figura 4):

a) En el primer mecanisme de retroalimentació s'inclou la interacció entre les proteïnes activadores de la guanilat ciclase (GCAPs, *Guanylyl Cyclase Activating Proteins*) i els enzims guanilat ciclase específics de retina (retGC, *retinal Guanylyl Cyclase*).

Les GCAPs pertanyen a un grup de proteïnes específiques de neurones d'unió al calci (NCBPs, *Neuronal Ca(2+)-Binding Proteins*). Les GCAPs (GCAP1, GCAP2 i GCAP3) tenen tres dominis funcionals amb estructures d'afinitat al calci i es caracteritzen per interactuar amb les guanilat ciclase específiques de retina (Dizhoor i col., 1995; Gorczyca i col., 1995; Haeseleer i col., 1999; Gorczyca i Solkal, 2002). Fins al moment, s'han identificat dues isoformes dins la família de les guanilat ciclases específiques de retina (retGC1 i retGC2). Cada isoforma s'ha descrit per expressar-se preferentment en forma d'homòmers. Ambdues posseeixen una estructura similar, formada per un extrem N-terminal extracel·lular situat dins l'espai intracel·lular dels discs de funció desconeguda, un domini transmembrana i una part intracel·lular situada en l'espai citosòlic del fotoreceptor que està constituïda per un domini quinasa, un domini catalític i un domini de dimerització (Dizhoor i col., 1994; Lowe i col., 1995; Yang i col., 1995; Yang i Garbers, 1997).

Les GCAPs són importants tant en els processos implicats en l'adaptació a la llum com en l'adaptació a la foscor. En resposta a condicions de llum la concentració lliure intracel·lular de Ca^{2+} baixa (50-100nM), com a conseqüència la GCAP1 estimula la isoforma retGC1 mentre que les GCAP2 i GCAP3 estimulen les dues isoformes retGC1 i retGC2. En canvi, quan les concentracions de Ca^{2+} lliure generades en una situació de foscor són elevades (entre 500-600 nM) les GCAPs són inactives.

Els resultats d'una estimulació lumínica són la hiperpolarització de la membrana plasmàtica del fotorceptor i la disminució de la concentració intracel·lular de Ca^{2+} . Aquesta reducció de Ca^{2+} en el fotorceptor és detectada per les GCAPs que s'encarreguen d'activar la guanilat ciclasa específica de retina (ret-GC). Aquesta activació té lloc perquè les GCAPs actuen com sensors del calci, de forma que quan detecten la baixada de Ca^{2+} perden els dos ions de calci i interaccionen amb els dominis quinasa i catalític de la part intracel·lular de la ret-GC. Això afavoreix la seva dimerització i l'intercanvi de GTP a GMPc, restaurant-se els nivells de GMPc necessaris per l'obertura dels canals catiónics dependents de GMPc (CNG) (Laura i col., 1998; Yu i col., 1999; Palczewski i col, 2000). Com a resultat, l'homeostasi dels cations (Ca^{2+} i Na^+) es restaura i pertant es recupera l'estat inicial de despolarització de la membrana plasmàtica del fotorceptor.

b) Un altre mecanisme dependent de calci que es produeix en resposta a la llum i que intervé en l'adaptació a la foscor vindria determinat per l'acció moduladora de la calmodulina (CaM) sobre el canal catiónic dependent de GMPc. La interacció entre les subunitats β i α del canal catiónic dependent de GMPc és interrompuda per la unió de la CaM en la regió pròxima a l'extrem N-terminal de la subunitat β . La reducció de la concentració Ca^{2+} intracel·lular en condicions de llum fa que la CaM deixi d'interaccionar amb l'extrem N-terminal de la subunitat β (CNG β) del canal dependent de GMPc, permeten la interacció de la subunitat β amb les subunitats α , i afavorint l'obertura del canal CNG. Aquest mecanisme facilita la restauració dels nivells de Ca^{2+} interns contribuïnt de forma accelerada a la recuperació de l'estat inicial de repòs de la membrana plasmàtica en una situació de foscor (Trudeau i Zagotta, 2002).

c) L'últim dels mecanismes de retroalimentació dependents de calci és mediat per la interacció recoverina - rodopsina quinasa i l'acció posterior de l'arrestina.

L'acció combinada d'aquestes molècules va dirigida a la desensibilització de la rodopsina prèviament activada per la llum en el mecanisme de la fototransducció.

La recoverina (Rec) junt amb les GCAPs i la calmodulina pertanyen al grup de proteïnes específiques de neurones d'unió al calci (NCBPs). La rodopsina quinasa (RK o GRK1) pertany a una família de receptors quinasa acoplats a proteïnes G expressats en retina (Zhao i col., 1998). L'activitat d'aquest enzim depèn de la recoverina que és la proteïna que detecta les variacions de calci intracel·lular.

Els fotoreceptors responen a la il·luminació amb una disminució dels missatgers intracel·lulars d'excitació i adaptació, GMPc i Ca^{2+} respectivament. En situacions de llum intensa la recoverina uneix ions calci, canvia de conformació passant a la seva forma activa i queda unida a la membrana dels discs. Aquesta interacciona amb la rodopsina quinasa (RK) inhibint-la, i prolongant la vida mitja de la rodopsina fotoexcitada. En l'adaptació a la foscor, la concentració de calci és baixa com a resposta a la llum i la recoverina lliure de calci deixa d'inhibir la rodopsina quinasa que fosforil·la a la rodopsina fotoexcitada (Pulvermüller i col., 1993; Palczewski, 1997). Posteriorment aquesta rodopsina fosforil·lada és segrestada per l'arrestina (Arr) que la inactiva, bloquejant completament la unió de la rodopsina amb la transducina (Gibson i col., 2000; Chen, 2002). La rodopsina fosforil·lada s'allibera de l'arrestina quan s'hi uneix una nova molècula d'11-cis-retinal i els grups fosfats prèviament incorporats per la rodopsina quinasa (RK) són eliminats per mitjà de l'acció d'una fosfatasa 2A (Stryer, 1991).

2) Mecanismes independents de la concentració de Ca^{2+} (Figura 5):

L'últim mecanisme implicat en l'adaptació a la foscor requereix la inactivació de la PDE, que té lloc quan la molècula de GTP unida a la subunitat α de la transducina és hidrolitzada a GDP per l'activitat GTPasa intrínseca de la transducina. Aquesta activitat intrínseca de la transducina està potenciada per l'acció conjunta del complex RGS9-1/G β 5 (*regulators of G protein signaling / Long variant splice of G protein beta-5*) i de la subunitat γ de la PDE que estimulen la hidròlisis del GTP (He i col., 1998; Makino i col., 1999; He i col., 2000). Recentment, s'ha especulat un nou model d'adaptació a la foscor basat en la fosforil·lació de RGS9-1 per part de proteïnes quinases específiques de fotoreceptors que s'activarien en resposta a la llum (Hu i col., 2001).

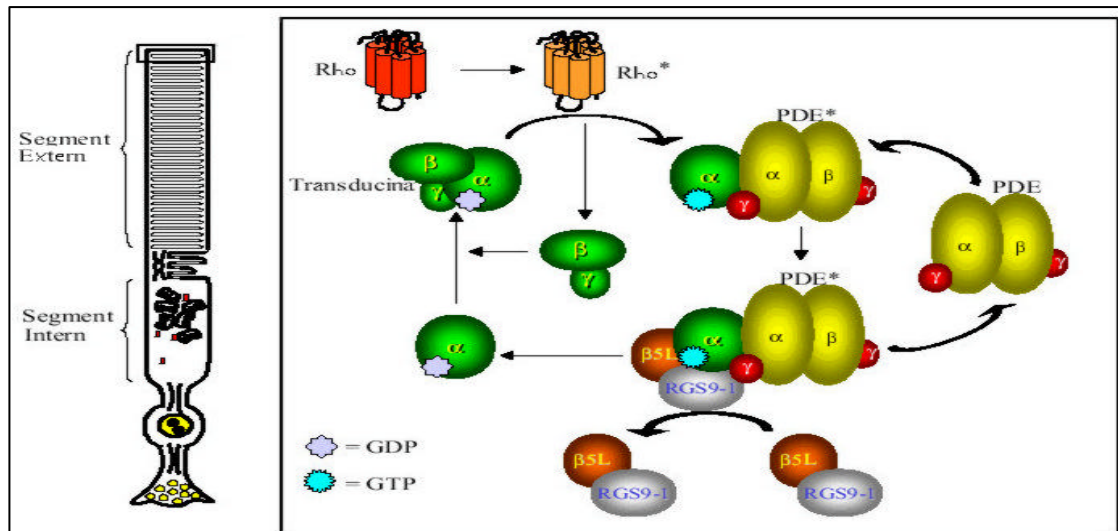


Figura 5. Esquema dels mecanismes independents de calci implicats en l'adaptació a la foscor.

1.3.3. REGENERACIÓ DE LA RODOPSINA

La rodopsina es regenera mitjançant una ruta metabòlica que té dos orígens diferents (Figura 6) i en la que hi participa de forma molt activa l'EPR (Wright, 1997; Saari, 2000; McBee i col., 2001). Un dels orígens és l'isòmer tot-trans-retinal alliberat durant la fototransducció, i l'altre origen és el tot-trans-retinol exogen que prové del cicle de la vitamina A.

La ruta metabòlica s'inicia en el segment extern del fotorreceptor a partir de la configuració tot-trans-retinal alliberada de la hidròlisi de l'enllaç tipus *schiff* entre el cromòfor 11-cis-retinal i l'opsina en la isomerització produïda per la llum. El tot-trans-retinal és transportat fora dels discs del segment extern dels fotorreceptors per simple difusió o per mitjà del transportador d'unió a ATP (ABCR, *ATP-binding cassette transporter*), i és reduït per acció de l'enzim tot-trans-retinal deshidrogenasa dependent del cofactor NADPH a la forma alcohòlica tot-trans-retinol. Aquest és transferit a l'EPR per mitjà del seu transport a través de la proteïna interfotorreceptora d'unió a retinoides (IRBP, *Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein*). Posteriorment el tot-trans-retinol és transportat per la proteïna d'unió al retinol (CRBP1, *Cellular Retinol-Binding Protein 1*) que alhora afavoreix la interacció d'aquest substrat amb l'enzim LRAT (*Lecithin Retinol AcylTransferase*). Aquest tot-trans-retinol junt amb el

que prové del cicle de la vitamina A són esterificats per l'enzim LRAT. La forma esterificada tot-trans-retinil és convertida a 11-cis-retinol per l'acció d'una isomerohidrolasa encara desconeguda que requereix la proteïna de 65kd específica de l'EPR (RPE65, *Retinal Pigment Epithelium-Specific Protein, 65-Kd*) (Saari JC, 2001; Mata i col., 2004). Recentment s'ha descrit vies alternatives per generar l'11-cis-retinol ja sigui a partir de la hidròlisi dels ésters amb configuració 11-cis o a partir de la isomerització directe del tot-trans-retinol que prové de la hidròlisi dels ésters amb configuració tot-trans (McBee i col.,2000). L'11-cis-retinol obtingut és oxidat a 11-cis-retinal per acció de l'enzim 11-cis-retinol deshidrogenasa dependent del cofactor NADP junt amb la proteïna cel·lular d'unió al retinaldehid (CRALBP, *Cellular Retinaldehyde-Binding Protein*) que afavoreix el transport del substrat i la reacció d'oxidació (Saari i col.,1994). A continuació, l'11-cis-retinal és transportat cap al segment extern dels fotoreceptors mitjançant la unió amb IRBP i finalment l'11-cis-retinal és reincorporat en l'opsina per regenerar la rodopsina.

S'ha postulat una via alternativa per generar l'11-cis-retinal que implicaria una fotoisomerització directa del tot-trans-retinal, reacció en la que estaria participant el receptor localitzat en l'EPR acoplat a proteïna G (RGR, *RPE G-protein-coupled receptor*).

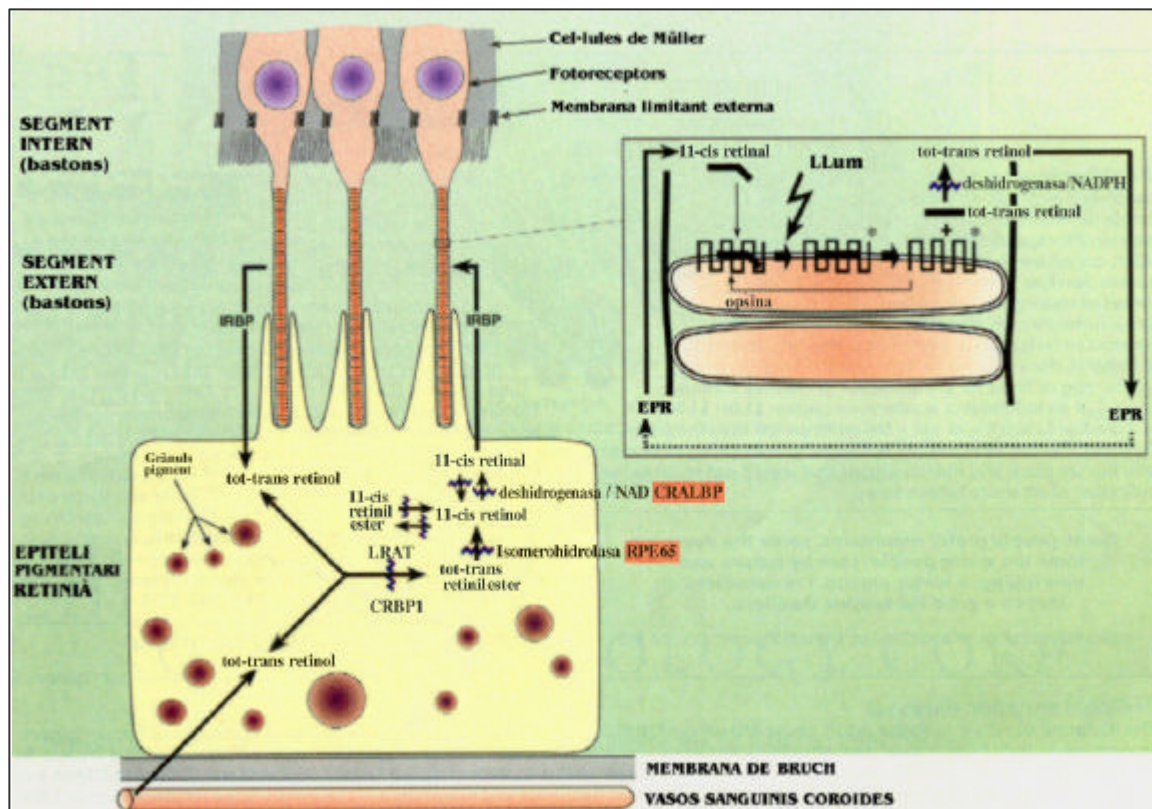


Figura 6. Principals reaccions implicades en el cicle visual (Wright, 1997 modificat).

1.4. LA RETINOSI PIGMENTÀRIA

1.4.1. DEFINICIÓ DE RETINOSI PIGMENTÀRIA (RP)

Retinosi pigmentària (RP) és un terme que engloba un grup de trastorns hereditaris i progressius de la retina que es caracteritzen per una degeneració dels fotoreceptors amb afectació de l'epiteli pigmentari de la retina. Els símptomes clínics més destacats són la ceguesa nocturna i la reducció perifèrica concèntrica del camp visual que progressa donant una pèrdua severa de la visió.

La RP és una malaltia de distribució universal i amb una prevalença variable. S'estima que la prevalença de la RP té un valor mig de 1:4000, tot i que aquest valor depèn del grau de consanguinitat present en les diferents poblacions i de l'àrea geogràfica de procedència. La RP és una de les principals causes de retinopaties hereditàries i representa el 30% de totes les cegueses, afectant aproximadament a 1.5 milions de persones d'arreu del món (Kaplan i col., 1990; Humphries i col., 1992; Berson, 1993).

Un gran nombre de malalties hereditàries cursen amb degeneracions de la retina i dels teixits adjacents. Molts d'aquests trastorns presenten símptomes que condueixen de forma directe o indirecte a la mort dels fotoreceptors, ja que la retina és un teixit complex però amb un repertori limitat de respostes davant de les diverses anomalies. Per aquest motiu, és molt important el diagnòstic diferencial entre la RP i les diverses malalties hereditàries que cursen amb una degeneració de la retina. Encara que, en els estadis avançats de la majoria de les distròfies retinianes progressives hi ha l'afectació d'ambdós tipus de fotoreceptors, les degeneracions retinianes es poden agrupar en perifèriques o centrals (maculars), segons presentin afectació primària dels bastons o dels cons respectivament.

En el grup de les distròfies perifèriques (Taula 1) trobem clarament identificada la RP, junt amb la coroïderèmia i la distròfia cristal·lina de Bietti, aquestes dues amb fons d'ull característics que les diferencien de la RP. També hi ha en aquest grup, la ceguesa estacionària congènita i la retinosi punctata albescens similars a la RP però amb la diferència que no són progressives (Bird, 1995).

La RP es caracteritza per presentar una gran heterogeneïtat tant a nivell genètic com a nivell clínic. Encara que la variabilitat del quadre clínic complica el diagnòstic

de la malaltia, una primera classificació clínica permet diferenciar la RP aïllada o no sindròmica (afectació exclusiva de la visió) de la RP sindròmica (afectació del sistema ocular i altres sistemes extraoculars).

A nivell genètic, la RP no sindròmica es pot heretar de forma autosòmica dominant, autosòmica recessiva, lligada al cromosoma X o de forma digènica, mentre que la RP sindròmica es transmet seguint els diferents patrons d'herència mendelians (autosòmic dominant, autosòmic recessiu i lligat al cromosoma X), el patró d'herència mitocondrial i recentment també s'ha descrit l'herència trial·lèlica. A nivell molecular, dins de cada patró d'herència s'ha descrit heterogeneïtat al·lèlica i no al·lèlica (Lindsay i col.,1992; Humphries i col., 1992; Kajiwara i col., 1994; Dryja i Berson, 1995; Dryja i Li, 1995; Phelan i Bok, 2000; Katsanis i col., 2001a; Rivolta i col., 2002).

Taula 1. Degeneracions hereditàries de la retina classificades com a perifèriques.

| Malaltia | Herència | MIM | Trets principals |
|----------------------------------|----------|--------|--|
| Ceguesa Nocturna | AD | 163500 | - ceguesa nocturna congènita i no progressiva |
| Estacionària i Congènita | XL | 300071 | - Afectació exclusiva dels bastons |
| | | 310500 | - Visió diürna correcte - Nistagme i miopia freqüents |
| Distròfia cristal·lina de Bietti | AR | 210370 | - Abundants taques lluent disperses en retina - Ceguesa nocturna i constricció del camp visual progressius - Alta prevalença a la Xina |
| Coroïderèmia | XL | 303100 | - Ceguesa nocturna i visió central reduïda - Constricció camp visual - Pèrdua de la visió progressiva (ceguesa als 50 anys) - Atròfia progressiva de la coroïdes i retina - Esclerosi coroïdal |
| Retinosi punctata albescens | AD | 136880 | - Taques blanques en el fons d'ull |
| | AR | | - Ceguesa nocturna estacionària - No afectació macular |

1.4.2. ASPECTES CLÍNICS DE LA RP NO SINDRÒMICA

1.4.2.1. SÍMPTOMES

En un estadi inicial de la RP s'observa una pèrdua de la funció dels fotoreceptors, principalment els bastons, manifestant les primeres evidències clíniques de la malaltia, com són la ceguesa nocturna i la pèrdua de la visió perifèrica (visió en túnel), amb afectació bilateral i simètrica del sistema visual. Amb el temps, hi ha una progressió de la malaltia degut a una degeneració generalitzada de la retina que implica l'afectació de l'epiteli pigmentari de la retina (EPR) i de l'altre tipus de fotoreceptor, els cons. La disfunció dels cons produeix una disminució de l'agudesesa visual i alteració de la visió diürna afectant la visió central (màcula). Per altre banda, la degeneració de l'EPR comporta una acumulació en dipòsits d'espícules de pigment al voltant dels vasos de la retina. L'atrofia de la retina dóna l'aspecte atenuat dels vasos que contribueix a la pal·lidesa del nervi òptic típic de la RP. La distribució dels dipòsits de pigment a la perifèria de la retina, observada en la RP, es correspon amb les àrees de màxima concentració de bastons (Li i col., 1995). Malgrat que el grau d'afectació és variable, el resultat final sol ser una ceguesa total manifestant-se en un rang d'edat variable (Holopigian i col., 1996).

Existeixen altres símptomes clínics comuns a la RP encara que no decisius pel seu diagnòstic com són les cataractes, la miopia i l'astigmatisme (Heckenlively i col., 1988).

1.4.2.2. DIAGNÒSTIC

El diagnòstic clínic junt amb una bona descripció del patró d'herència permeten una millor classificació des del punt de vista genètic, i per tant una millor organització per l'estudi de les bases moleculars de la malaltia. Encara que la RP presenta una gran variabilitat clínica, tant per l'edat d'aparició com per la progressió i la severitat, hi ha una sèrie de símptomes clínics comuns de la RP clàssica o típica, i a partir d'aquesta existeixen variants fenotípiques amb característiques pròpies.

L'any 1982, a l'*International Symposium of Ophthalmology* es van establir una sèrie de criteris bàsics pel diagnòstic de la RP (Marmor i col., 1983):

- 1- Bilateralitat

- 2- Disfunció dels bastons (ceguesa nocturna i alteració o absència de la resposta escotòpica en l'electroretinograma)
- 3- Reducció concèntrica del camp visual
- 4- Pèrdua progressiva de la funció dels fotoreceptors
- 5- En estadis avançats s'observa acumulació de pigments, atenuació dels vasos de la retina i pal·lidesa del nervi òptic

Les proves clíniques més rellevants són: l'electroretinograma (ERG), l'avaluació del camp visual i l'examen del fons d'ull.

L' electroretinograma (ERG) és el registre que mesura l'activitat elèctrica de la retina després de ser sotmesa a un estímul lluminós. Existeixen varis tipus d'ERG segons el tipus d'estimulador. Aquesta prova és útil en el diagnòstic clínic i diferencial de la RP ja que dóna informació de la pèrdua de funcionalitat dels fotoreceptors, de la severitat de la malaltia i en alguns casos permet fer un diagnòstic precoç abans de l'aparició dels símptomes (Berson , 1993). L'ERG mesura la relació entre la longitud d'ona i la freqüència de l'estímul amb la capacitat d'adaptació de la retina a la llum o a la foscor, quan s'il·lumina de forma homogènia tota la retina. L'ERG permet mesurar la resposta separada dels bastons, dels cons i la resposta combinada d'ambdós tipus de fotoreceptors, sempre en forma de potencials elèctrics (Pagon,1988; Marmor i Zrenner, 1995).

Taula 2. Electroretinograma: Estímul/Resposta dels fotorreceptors

| Estímul | Resposta |
|---|-----------------------|
| Estimulació amb llum blava (o blanca tènue) en condicions escotòpiques | Resposta dels bastons |
| Estimulació amb una llum blanca SF (<i>Standard Flash</i>) en condicions fòtiques | Resposta dels cons |
| Estimulació amb una llum blanca SF sota condicions escotòpiques | Resposta mixta |

El resultat de l'ERG en pacients amb RP varia segons l'estadi en què es troba la malaltia. En els estadis inicials de la malaltia, sota condicions escotòpiques, hi ha una reducció o absència de l'amplitud d'ona de la llum i una disminució en el temps de resposta a l'estímul, reflexant la manca de funcionalitat dels bastons típica de la RP. En estadis avançats, s'observa una abolició total de la resposta dels bastons i dels cons (Figura 7).

L'avaluació de la campimetria ens permet tenir informació sobre la integritat funcional de la retina i la progressió de la malaltia al llarg del temps. L'alteració del camp visual comença per una disminució generalitzada i difosa de la sensibilitat, amb la posterior aparició d'àrees del camp visual on la visió és feble o nul·la (escotomes) formant un anell al voltant del camp central que coincideix amb la zona de major densitat de bastons (Figura 8). Amb aquesta prova s'observa la reducció concèntrica del camp visual típica de la RP, que ja apareix en l'inici de la malaltia i que progressa de la perifèria a la part central de la retina donant el què es coneix com visió "en túnel" o "canó d'escopeta".

La funduscòpia és la prova de diagnòstic emprada per avaluar el fons d'ull. Els canvis observats en el fons d'ull no es solen detectar en els estadis inicials de la RP. En estadis més avançats ja s'aprecien trets característics de la malaltia, com són pal·lidesa papil·lar, importants acúmul·s en forma de dipòsits de pigments a nivell intraretinal, atenuació i disminució del diàmetre dels vasos sanguinis de la retina i pal·lidesa del nervi òptic (Figura 9).

Existeixen altres proves diagnòstiques complementaries com són la mesura dels potencials evocats, la fluorofotometria, l'electrooculograma, i l'angiografia amb fluorescència.

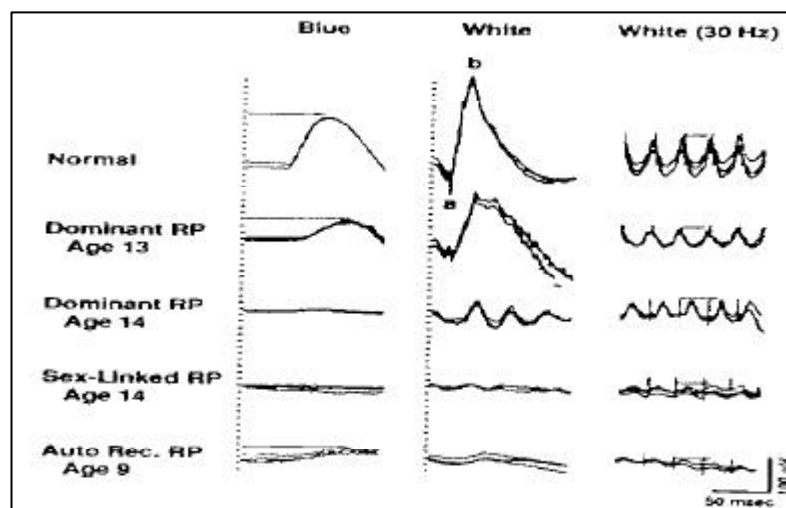


Figura 7. Electroretinogrames d'un individu control i quatre pacients afectats de RP amb diferents patrons d'herència (Berson, 1993). Comparant els ERG dels pacients RP amb el control s'observa una alteració dels dos paràmetres que mesuren la funcionalitat dels fotoreceptors (amplitud de les longituds d'ona i el temps de resposta a l'estímul). La primera columna correspon a la resposta dels bastons, la segona columna a la resposta conjunta de cons i bastons i l'última columna a la resposta dels cons.

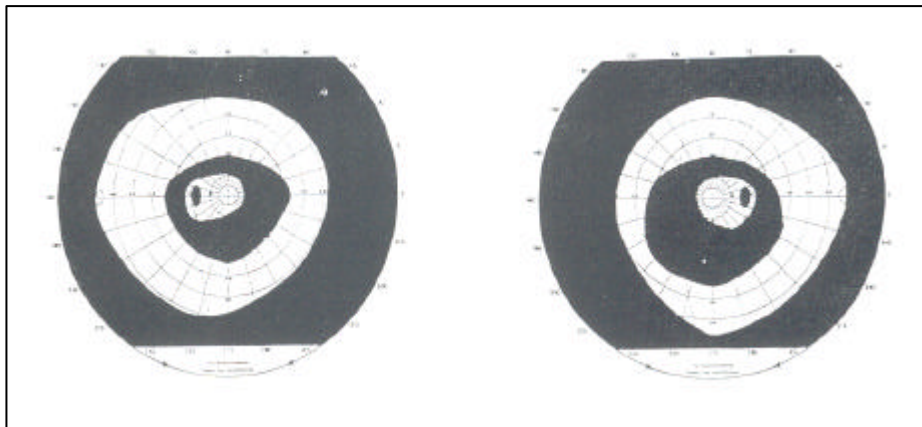


Figura 8. Camps visuals de l'ull esquerre i dret d'un pacient amb RPAR en un estadi avançat de la malaltia.

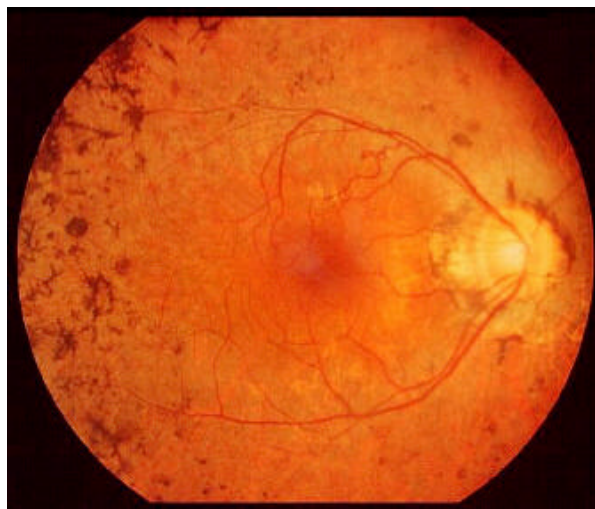


Figura 9. Imatge que correspon al fons d'ull d'un pacient en un estadi avançat de RPAR mostrant l'aspecte típic dels dipòsits de pigment en la retina.

1.4.3. CLASSIFICACIÓ CLÍNICA I GENÈTICA DE LA RP

La combinació de criteris clínics i genètics com són el grau de severitat de la malaltia i els patrons d'herència, respectivament, poden ser emprats per establir una classificació més precisa de la RP, encara que la gran heterogeneïtat clínica, genètica i molecular presentada per la malaltia de la RP compliquen extraordinàriament aquesta classificació (Heckenlively i col., 1988; Kaplan i col., 1990; Haim 1993).

La classificació de la RP de forma ampla i general considera la divisió entre:

- RP aïllada o no sindròmica (afectació exclusiva del sistema ocular)
- RP sindròmica (afectació del sistema ocular i altres sistemes extraoculars)

1.4.3.1. RP NO SINDRÒMICA

La RP no sindròmica pot subdividir-se segons els diferents patrons d'herència i dins de cadascuna d'aquestes entitats genètiques es poden agrupar atenent a característiques clíniques particulars, encara que hi ha un solapament important dels símptomes.

La RP no sindròmica es pot transmetre de forma autosòmica dominant (RPAD), autosòmica recessiva (RPAR) o lligada al cromosoma X (RPLX). A més de les formes de transmissió mendeliana anteriors, Kajiwara i col. (1994) van descriure per primera vegada l'herència digènica. En aquest cas, el fenotip patològic apareix quan s'hereten simultàniament mutacions en dos gens diferents.

Quan l'herència de la malaltia es difícil d'establir segons els criteris mendelians, els pacients s'agrupen en casos símplex (famílies que presenten un sol afectat sense presentar consanguinitat ni símptomes indicatius de possibles dones portadores i sense antecedents de la patologia a nivell familiar) o casos múltiplex (famílies amb més d'un membre afectat però amb un component genètic poc definit). La presència de casos símplex, i l'existència de penetrància incompleta i d'expressivitat variable compliquen la classificació genètica de la RP.

1.4.3.1.1. RP autosòmica dominant (RPAD)

S'inclouen en aquesta categoria els arbres familiars amb una transmissió vertical de la malaltia en un mínim de dos o tres generacions. Es considera la forma més benigna ja que en la majoria de pacients els primers símptomes es manifesten en edats més avançades, la progressió de la malaltia és lenta i hi ha una preservació durant més temps de la visió central i de l'agudesa visual (Merin, 1991). Alguns autors han classificat la RPAD en dos tipus (Fishman i col.,1985; Farber i col., 1985; Kaplan i col.,1990; Lyness i col.,1985):

- El tipus 1 o tipus D es caracteritza per una progressió més ràpida de la malaltia, un registre ERG dels bastons absent, amb una pèrdua difosa i severa de la funció dels bastons a una edat més precoç. En una edat més avançada també hi ha pèrdua regional dels cons amb una afectació de la visió macular. La ceguesa nocturna es manifesta de la infància a l'edat adulta.
- El tipus 2 o tipus R és de progressió més lenta i amb un grau de severitat moderat. Presenta canvis de pigmentació regional en el fons d'ull i una pèrdua regional de bastons i cons a una edat molt variable. El registre de l'ERG dels bastons és detectable fins una edat més avançada i la ceguesa nocturna és d'aparició més tardana. En aquest grup la preservació de l'agudesa visual pot superar la cinquena dècada de vida.

1.4.3.1.2. RP autosòmica recessiva (RPAR)

Els arbres familiars inclosos en aquesta categoria poden presentar un sol membre afectat amb pares sans i consanguinis o bé més d'un afectat per generació amb pares assíptomàtics no consanguinis.

La forma autosòmica recessiva es considera més greu que la forma autosòmica dominant tot i presentar un rang variable de severitat. Els símptomes de la malaltia en la forma recessiva solen aparèixer en l'adolescència, amb una pèrdua més ràpida de les funcions visuals, amb registres plans dels ERG (Merin, 1991), amb una aparició dels dipòsits de pigment en el fons d'ull i una evolució de la malaltia més ràpida que en la forma de transmissió anterior.

S'ha descrit algunes entitats clíniques que es poden diferenciar de les formes clàssiques de RPAR :

- Amaurosi congènita de Leber (LCA). És una de les formes més severa i agressiva. Té una progressió ràpida i una aparició dels símptomes en el naixement o en els primers anys de vida.
- RP amb preservació para-arteriolar de l'epiteli pigmentari (PPRPE, *preserved para-arteriolar retinal pigment epithelium*). Aquesta variant fenotípica, també designada com RP12, presenta hipermetropia enlloc de la miopia típica de la RP i conserva l'epiteli pigmentari al voltant de les arterioles de la retina sense alteracions (Heckenlively i col., 1982; Porta i col., 1992; Van den Born i col., 1994).
- RPAR moderada o senil: Correspon a la forma més lleu i de progressió més lenta dins de la RPAR ja que els símptomes clínics solen aparèixer en edat adulta (Kaplan i col., 1990; Merin, 1991).

1.4.3.1.3. RP lligada al cromosoma X (RPLX)

Les famílies incloses en aquesta categoria presenten com a mínim dues generacions d'homes afectats i la transmissió sempre es dona per via materna, considerant aquestes com a portadores de la malaltia i manifestant un fons d'ull típic sense ser afectades de RP.

La RP lligada al sexe és la forma més greu i de progressió més ràpida dins de totes les entitats genètiques de la RP, presenta ceguesa nocturna en la primera dècada de vida, pèrdua del camp visual en la segona dècada i ceguesa legal als 30-40 anys (Merin, 1991).

Cal destacar dins la RPLX l'existència d'un quadre clínic per les dones portadores de la malaltia. Poden presentar un espectre ampli de fenotips que depèn del fenomen d'inactivació a l'atzar d'un dels dos cromosomes X, donant el mosaïcisme corresponent. El fenotip de les dones portadores en la RPLX pot anar des de ser asimptomàtiques fins a presentar una forma severa de la malaltia, en funció de la proporció de cèl·lules de la retina que tenen activat el cromosoma X portador de la mutació (Fishman i col., 1986; Rivolta i col., 2002).

Es va proposar la classificació de la RPLX en dos subgrups atenent a l'edat d'inici de la malaltia i als símptomes inicials (Kaplan i col., 1992):

- El subtipus genètic RP2, es caracteritza per presentar una miopia alta i una edat promig d'inici de la malaltia de 3-4 anys, mentre que
- El subtipus RP3 presenta com a símptoma inicial una ceguesa nocturna i l'edat d'inici és als 10 anys.

En ambdós casos hi ha una afectació profunda de l'agudesesa visual entre els 5-25 anys, i la ceguesa total sol aparèixer abans dels 30-40 anys.

1.4.3.2. RP SINDRÒMICA: SÍNDROME D'USHER

El terme de RP sindròmica s'aplica quan la RP es presenta associada amb altres alteracions patològiques en òrgans extraoculars formant el què es coneix com síndrome o malaltia multisistèmica. Les alteracions més comunes són la pèrdua d'oïda, afectacions neurològiques i defectes metabòlics. En totes aquestes síndromes també hi ha una clara heterogeneïtat clínica, genètica i molecular. En la RP sindròmica hi ha la presència de totes les formes d'herència mendeliana, i a més cal destacar dues formes de transmissió no descrites en la RP no sindròmica, la forma d'herència mitocondrial que presenta la síndrome de Kearns-Sayre i l'herència digènica tri-al·lèlica recentment identificada en la síndrome de Bardet-Biedl (Katsanis i col., 2001a).

La síndrome d'Usher és la RP sindròmica més freqüent. La prevalença s'estima entre 2.2:100.000 i 4.4:100.000 en funció de la població estudiada (Boughman i col, 1983; Grondahl, 1987; Hope i col., 1997; Rosenberg i col., 1997). Es caracteritza per manifestar simultàniament retinosi pigmentària i hipoacúsia bilateral neurosensorial congènita, amb presència o no de la funció vestibular alterada segons el tipus de síndrome d'Usher. El patró d'herència de la síndrome d'Usher segueix sempre una forma de transmissió autosòmica recessiva.

A nivell clínic la síndrome d'Usher es classifica en tres categories: Tipus I (USH1), Tipus II (USH2) i Tipus III (USH3) (Smith i col., 1994). Clínicament aquests tres tipus es diferencien principalment pel grau de severitat de la hipoacúsia, per l'alteració o no de la funció vestibular i per la presència o no de progressió en la

sordesa al llarg del temps. El tipus I presenta hipoacúsia neurosensorial congènita profunda a severa, disfunció vestibular i evolució estacionària de la malaltia. El tipus II es caracteritza per presentar hipoacúsia neurosensorial congènita moderada a severa, funció vestibular normal i és estable al llarg del temps, mentre que el tipus III presenta una pèrdua progressiva de l'audició i la presència ocasional de disfunció vestibular.

Pel què fa a la RP associada a la síndrome d'Usher presenta les característiques comunes a la RP típica, i en general no es considera un bon indicador per discriminar els tres tipus existents en la síndrome d'Usher, encara que més recentment s'ha vist que l'afectació de l'agudesa visual i del camp visual és més gran en el tipus I que en el tipus II a partir de la tercera o quarta dècada de vida (Edwards i col., 1998). En un estudi posterior, s'ha determinat que l'aparició de la ceguesa nocturna típica de la RP en els pacients amb la síndrome d'Usher tipus I és més precoç que en els casos amb el tipus II, malgrat no existir diferències molt significatives (Tsilou i col., 2002).

La síndrome d'Usher és una patologia caracteritzada per presentar heterogeneïtat genètica, de manera que cadascun dels tres tipus clínics es subdivideix en varis subtipus genètics determinats pels diferents loci o gens identificats. En la síndrome d'Usher tipus I trobem 7 subtipus genètics (1A,1B,1C,1D,1E ,1F i 1G), en el tipus II s'han descrit 3 subtipus (2A,2B i 2C) i en el tipus III s'ha identificat, fins al moment, el subtipus genètic 3A (Petit, 2001, Mustapha i col., 2002).

1.4.4. EPIDEMIOLOGIA DE LA RP A L'ESTAT ESPANYOL

La incidència de la RP a l'Estat Espanyol s'estima en 1/2500-3000 recent nascuts vius (Ayuso i col., 1995). Les formes de RP no sindròmiques representen el 85% de la RP total, mentre que el 15% restant correspondria a les formes sindròmiques de la RP. Dins el grup de la RP síndròmica, el 75% correspon als tipus I i II de la síndrome d'Usher (destacant que el tipus II representa el 52% d'aquest percentatge), el 10% equival a la síndrome de Bardet-Biedl i el 15% restant inclou tota la resta de síndromes associats a la RP. Com s'observa en la figura 10, les formes majoritàries de la RP no sindròmica són la RP simplex (40%) i la forma RPAR (38%), considerant que segurament molts dels casos classificats com RP simplex poden emmascarar casos d'herència autosòmica recessiva (Ayuso i col., 1997; Ayuso, 2001).

En comparació amb altres poblacions, la freqüència de la forma RPLX (6%) és de les més baixes, destacant la taxa més alta de Gran Bretanya (16%) i la més baixa de Noruega (2%). Per contra, la freqüència de la RPAR a l'Estat Espanyol és considerada de les més altes, si tenim en compte la freqüència més baixa presentada per Gran Bretanya (12%) i la més elevada detectada a Noruega (47%).

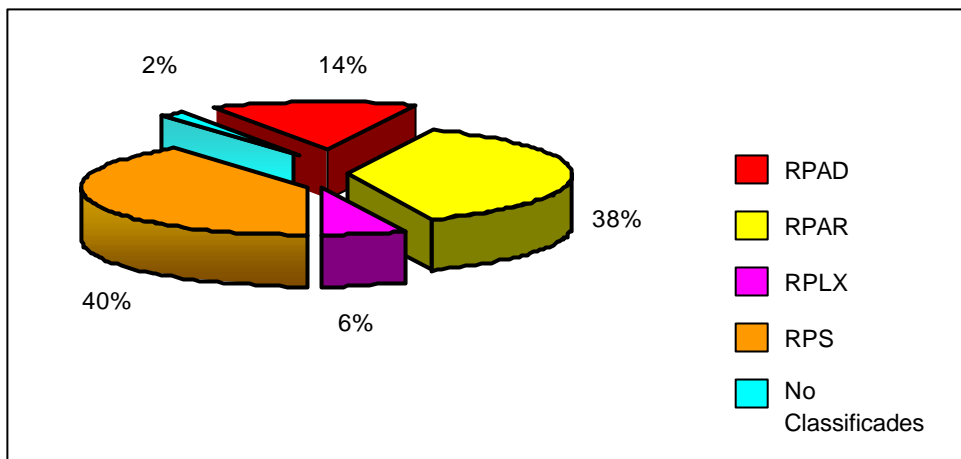


Figura 10. Epidemiologia de la RP no sindròmica a l'Estat Espanyol.

1.4.5. BASES MOLECULARS DE LA RP NO SINDRÒMICA

La dificultat en l'estudi de les bases moleculars implicades en el desenvolupament de la patologia en cada una de les famílies afectades s'atribueix a la gran heterogeneïtat genètica no al·lèlica que caracteritza la RP (Taula 2). Des de 1984, existeix un increment important pel què fa al número de loci i gens relacionats amb la RP.

Gràcies a l'estudi del genoma humà, a la disposició de mapes de marcadors altament polimòrfics i a l'aplicació dels grans avenços tecnològics en el camp de la genètica molecular es disposa d'una gran quantitat d'informació que facilita la localització i identificació de nous gens responsables de la RP. Les dues principals estratègies a seguir en l'estudi molecular de la RP són el clonatge posicional o estudi de l'anàlisi de lligament i el clonatge funcional o l'anàlisi de gens candidats. L'aplicació combinada d'aquestes dues estratègies en la RP no sindròmica ha permès identificar en l'actualitat fins un total de 38 loci dels quals, alguns ja s'ha identificat el gen associat a la patologia de la RP (Taula 3).

Del total de loci descrits, 13 loci estan implicats en les formes dominants de la RP i només en 1 d'aquests no s'ha identificat el gen responsable de la malaltia. El gen de la rodopsina explica el percentatge més elevat de casos amb RPAD (20-25%) (Gal i col., 1991; Dryja i col., 1991; Inglehearn i col., 1992; Antiñolo i col., 1997; Dryja i col., 2000). La suma de tots aquests loci i gens no arriben a explicar el 50% dels casos amb RPAD.

En la forma autosòmica recessiva de la RP s'han identificat 21 loci, dels quals 4 es desconeix el gen associat a la malaltia. En aquesta forma, cal destacar el gen de la subunitat beta de la fosfodiesterasa que explica entre un 5-8% dels casos de RPAR segons la població estudiada (Riess i col., 1992; Mclaughlin i col., 1993; Mclaughlin i col., 1995; Dancinger i col., 1995; Bayés i col., 1995; Dancinger i col., 1996; Valverde i col., 1996a; ; Valverde i col., 1996b; Piriev i col., 1998; Baiget i col., 1998). La suma de tots aquests loci expliquen com a molt el 20-30% de tots els casos de RP autosòmica recessiva.

En la RP lligada al cromosoma X s'han descrit 5 loci, dels quals només s'han identificat 2 gens (RP2 i RPGR) que expliquen aproximadament el 79% dels casos RPLX (Sharon i col.,2003).

La RP es considera una malaltia complexa i això queda totalment reflectit a nivell molecular, per la seva gran heterogeneïtat al·lèlica i no al·lèlica. No es pot predir el número de gens associats a la RP que falten per identificar, encara que com va inferir Dryja i col. (1990), es podria donar una situació similar a la del model animal de *Drosophila melanogaster*, en la que estarien implicats més de 70 loci.

1.4.5.1. GENS I LOCI IDENTIFICATS EN LA RPAR

Les dues estratègies que han fet possible la identificació de tots els gens i loci descrits en la RPAR són: 1) el clonatge posicional i 2) el clonatge funcional.

1) El clonatge posicional consisteix en aïllar el gen responsable de la malaltia a partir de la seva localització genètica o física en el genoma humà. Aquesta estratègia presenta diverses metodologies com són l'anàlisi de lligament, l'observació d'alteracions cromosòmiques o l'estudi de la pèrdua d'heterozigositat. En el cas de la RP, una limitació per aquesta estratègia és la seva gran heterogeneïtat genètica creant possibles dades errònies en l'anàlisi de lligament. Per evitar aquest possible error, l'estudi de lligament s'ha de fer en cada família per separat, per això calen famílies grans, de varies generacions. El fet que les famílies amb RP autosòmica recessiva solen ser de poques generacions d'afectats, complica de forma extraordinària l'aplicació d'aquest tipus d'estratègia.

L'anàlisi de lligament en la RP autosòmica recessiva ha permès la identificació de com a mínim 9 loci, en alguns dels quals ja s'hi han descrit gens associats a la malaltia (Taula 3).

El locus RP12 situat en 1q31-q32.1 va ser el primer locus genètic per la RPAR descrit en dues famílies multigeneracionals (van Soest i col., 1994; Leutelt i col., 1995). Aquestes famílies presentaven dos fenotips diferents a nivell intrafamiliar: la RPAR clàssica i la RPAR amb PPRPE (preservació para-arteriolar de l'epiteli pigmentari). L'anàlisi va confirmar lligament entre el locus RP12 i el fenotip de RP amb PPRPE en les dues famílies estudiades. Estudis posteriors van identificar en el locus RP12 el gen CRB1 (*Crumbs homologue-1*) per la seva localització cromosòmica. L'anàlisi mutacional del gen CRB1 ha revelat mutacions associades als fenotips de RPAR amb o sense PPRPE i de LCA (den Hollander i col., 1999; den

Hollander i col., 2001; Lotery i col., 2001a; Lotery i col., 2001b; Gerber i col., 2002; Khaliq i col., 2003; Hanein i col., 2004).

L'anàlisi de lligament en una família amb RPAR, de diverses generacions va permetre mapar el locus RP14 a la regió 6p21.3 (Knowles i col., 1994). Per hibridació *in situ* van demostrar que el gen TULP1 estava localitzat dins el locus RP14 (North i col., 1997). Altres estudis han identificat mutacions en el gen TULP1 en pacients afectats de RPAR procedents de diferents àrees geogràfiques (Hagstom i col., 1998; Banerjee i col., 1998; Paloma i col., 2000).

Gu i col. (1997) van demostrar l'existència de lligament amb marcadors genètics de la regió 1p22-p31 (locus RP20) en una família que presentava un fenotip caracteritzat per una distròfia de la retina agressiva, severa i infantil, a més dels símptomes típics de RP. En aquesta regió genòmica es localitza el gen RPE65 (Hamel i col., 1994). Aquest gen codifica una proteïna que s'expressa de forma exclusiva en l'epiteli pigmentari, que està implicada en el cicle de la vitamina A (Nicoletti i col., 1995). Les mutacions trobades en diversos estudis confirmen que el gen RPE65 estaria associat a RPAR i LCA (Gu i col., 1997; Marlhens i col., 1997; Morimura i col., 1998).

L'anàlisi d'una família consanguínia d'origen espanyol amb RPAR va revelar lligament a la regió cromosòmica 2q31-q33, definint el locus RP26 (Bayés i col., 1998). Tuson i col. (2004) han reduït la regió candidata a 2q31.2-q32.3, identificant el gen CERKL en la regió crítica definida pel locus RP26. L'anàlisi mutacional ha permès identificar una mutació en homozigosi que crea l'aparició d'un codó de parada (R275X) en dues famílies espanyoles amb RPAR.

Finalment, l'anàlisi de lligament o l'estudi d'homozigositat amb diversos marcadors polimòrfics han contribuït a determinar la presència de diversos loci lligats a la RPAR (RP22, RP25, RP28 i RP29), tot i que fins al moment, no s'ha identificat el gen responsable de la malaltia en les famílies que presentaven lligament amb aquests loci (Ruiz i col., 1998; Khaliq i col., 1999; Marcos i col., 2000; Finckh i col., 1998; Gu i col., 1999; Hameed i col., 2001).

2) El clonatge funcional consisteix en l'anàlisi directe de gens candidats. Són seleccionats com a candidats aquells gens que presenten una posició en el genoma que colocalitza amb algun loci descrit en la RP, els gens que codifiquen proteïnes expressades en retina i amb una funció important en el procés visual, i per últim,

aquells gens humans que són homòlegs als gens involucrats en el desenvolupament de la malaltia en models animals (Dryja i Berson, 1995; Phelan i Bok, 2000; Farrar i col., 2002).

Els gens que s'han estudiat en la RPAR seguint l'estratègia de l'anàlisi directe dels gens candidats es poden agrupar segons la implicació de les proteïnes codificades dins el procés de la visió en:

A) Gens que codifiquen proteïnes que participen en el procés visual

a) Cascada de la fototransducció

Malgrat que la majoria de les mutacions identificades en el gen de la rodopsina (RHO) s'associen a la forma dominant de la RP, s'ha descrit dues mutacions en homozigosi (E249X i E150K) en pacients de dues famílies consanguínies amb RP autosòmica recessiva (Rosenfeld i col. 1992 i Kumaramanickavel i col., 1994). Més recentment, s'ha identificat dues mutacions en el gen RHO en dos casos de RP simplex (Sohocki i col., 2001).

Els estudis en un model animal de fenotip similar a la retinosi pigmentària humana (ratolins *rd*, *retinal degeneration*) revelaven una acumulació important de GMPc en els fotoreceptors abans de la seva degeneració (Farber i Lolley 1974 i 1976) i aquesta era produïda per mutacions identificades en el gen de la pde β de ratolí (Bowes i col. 1990). Per aquest motiu, el gen humà que codifica per la subunitat β de la fosfodiesterasa (PDEB) va ser considerat com gen candidat de la RP. Els diversos estudis d'aquest gen en un número elevat de pacients amb RPAR de poblacions nord-americanes i europees ha revelat un total de 20 mutacions diferents (Riess i col., 1992; McLaughlin i col., 1993; McLaughlin i col., 1995; Dancinger i col., 1995; Bayés i col., 1995; Dancinger i col., 1996;; Valverde i col., 1996a; Valverde i col., 1996b; Piriev i col., 1998; Baiget i col., 1998). En el gen PDEB també s'ha identificat la mutació H258N associada a un altre tipus de distròfia perifèrica, la ceguesa estacionària congènita autosòmica dominant (Gal i col., 1994).

L'existència de mutacions en el gen PDEB suggeria que defectes en les altres subunitats de la fosfodiesterasa (PDEA i PDEG) també podien causar RP. L'anàlisi mutacional del gen de la subunitat α de la fosfodiesterasa (gen PDEA) en un total de 267 pacients amb RPAR, va permetre identificar 3 mutacions puntuals en els pacients de dos famílies que presentaven una forma greu de RPAR (la mutació

Y583X en homozigosi i les mutacions S344R i W561X en forma de doble heterozigot). S'ha postulat que aquestes mutacions alterarien l'activitat catalítica de l'enzim (Huang i col., 1995).

El canal catiònic dependent de GMPc és l'últim component de la fototransducció. El gen de la subunitat α d'aquest canal (gen CNGA1) va ser considerat com a gen candidat de RPAR. Fins ara, en el gen CNGA1 s'ha identificat un total de 6 mutacions causants de la RPAR. De les cinc mutacions descrites per Dryja i col. (1995), tres alteren la pauta de lectura, afectant la funcionalitat de la proteïna per la pèrdua del domini transmembrana i de la regió que forma el porus iònic. De les dues restants, una produeix un canvi d'aminoàcid (S316F) i l'altre (R654del1bp) una proteïna truncada. Els resultats de l'expressió *in vitro* d'aquests darrers al·lels mutants indicaven que ambdues alteracions interferirien en el transport de la subunitat α del canal catiònic a la membrana plasmàtica. L'última mutació (R28X) descrita en el gen CNGA1 ha estat identificada en homozigosi en una família espanyola afectada de RPAR (Paloma i col., 2002).

Els resultats obtinguts en el gen CNGA1 van justificar l'estudi del gen que codifica per la subunitat β del canal catiònic (gen CNGB1). Per anàlisi d'homozigositat, van localitzar a la regió 16q13-q21 el gen causant de la malaltia en una família consanguínia amb RPAR. L'anàlisi mutacional del gen CNGB1 en aquesta família va permetre identificar la mutació de canvi d'aminoàcid (G993V) que afectaria el domini d'unió a GMPc (Baireil i col., 2001).

b) Mecanismes d'adaptació a la foscor

Només s'ha descrit associat a la RPAR el gen de l'arrestina o antigen S (gen SAG). L'estudi del gen SAG va permetre identificar una deleció en homozigosi (1147delA) en pacients que pertanyien a tres famílies japoneses (Nakazawa i col., 1998). Aquesta mutació havia estat descrita com a freqüent en la ceguesa nocturna estacionària autosòmica recessiva (o malaltia d'Oguchi) (Fuchs i col., 1995).

c) Cascada de regeneració del pigment visual

S'ha identificat mutacions associades a la RPAR en el gen RPE65 (ja mencionat anteriorment), en el gen que codifica per la proteïna CRALBP (*cellular retinaldehyde binding protein*), en el gen que codifica per l'enzim LRAT (*Lecithin retinol*

acyltransferase) i en el gen que codifica per un receptor de l'EPR acoplat a proteïna G (RGR).

El gen RLBP1 codifica per la proteïna CRALBP que s'expressa en EPR i té afinitat per l'11-cis-retinal i el seu precursor l'11-cis-retinol. Maw i col. (1997) van detectar una mutació de canvi de sentit (R150Q) en homozigosi en els afectats d'una família consanguínia. Aquesta mateixa mutació ha estat identificada en pacients amb fundus albipunctata amb possible progressió a retinosi punctata albescens (RPA) (Katsanis i col., 2001b). S'han descrit altres mutacions en el gen RLBP1 associades a retinosi punctata albescens, distrofia retinal de Bothnia i distrofia de bastons-cons de Newfoundland posant de manifest la gran heterogeneïtat al·lèlica que caracteritza la RP (Morimura i col., 1999a; Burstedt i col., 1999; Burstedt i col., 2001; Eichers i col., 2002; Fishman i col., 2004).

L'enzim codificat pel gen LRAT catalitza en l'EPR l'esterificació de la molècula tot-trans-retinol a la forma d'àcids grassos. El gen LRAT mapa a la regió cromosòmica 4q31.2 (Ruiz i col., 2001), i s'ha identificat un canvi d'aminoàcid (S175R) en homozigosi en dos pacients amb RPAR i una deleció de 2pb (396delAA) en heterozigosi en un tercer pacient (Thompson i col., 2001).

En un estudi que incloïa pacients amb diferents degeneracions retinianes, Morimura i col. (1999b) van identificar en el gen RGR una mutació en homozigosi, associada a la RPAR (S66R). El gen RGR es localitza a la regió 10q23 (Chen i col., 1996) i codifica per una proteïna amb 7 dominis transmembrana que presenta homologia amb la rodopsina.

Fins al moment, no s'ha identificat mutacions associades a la RPAR en els gens que codifiquen per les tres subunitats de la transducina, subunitat gamma de la PDE, proteïna activadora de la guanilat ciclase, Guanilat ciclase, rodopsina quinasa, recoverina, proteïna de transport de la matriu interfotoreceptora i l'enzim 11-cis-retinol deshidrogenasa. En algun d'aquests gens s'han descrit mutacions associades a altres formes d'herència de la RP o a altres degeneracions de la retina diferents.

B) Gens que codifiquen proteïnes estructurals dels discs dels fotoreceptors

Kajiwara i col. (1994) van demostrar una nova forma d'herència dins la RP, l'herència digènica, considerant per primera vegada la RP com una malaltia poligènica. En aquestes famílies amb herència digènica només els membres que

eren dobles heterozigots pels al·lels mutants dels dos gens, el gen RDS/periferina i el gen ROM1, manifestaven la malaltia. Els estudis en famílies amb RPAR no han evidenciat cap tipus de mutació en el gen RSD/periferina ni en el gen ROM1.

C) Gens que codifiquen per proteïnes de transport

En una família espanyola consanguínia que presentava RPAR amb atròfia de la coroïdes en un estadi avançat de la malaltia (fenotip RP19) van detectar lligament a la regió 1p21-p13 (Martínez-Mir i col., 1997), posició on es localitza el gen ABCA4 associat a la malaltia de Stargardt. El gen ABCA4 pertany a una superfamília de gens que codifiquen proteïnes transmembrana implicades en el transport de diferents substrats. En la mateixa família, mitjançant l'anàlisi mutacional del gen ABCA4 van identificar una mutació en homozigosi que alterava la pauta de lectura (1847delA) (Martínez-Mir i col., 1998). Rozet i col. (1999) van detectar una mutació que afectava el lloc acceptor del mecanisme d'*splicing* de l'intró 13 en el gen ABCA4 en una família caracteritzada per la presència de dos fenotips diferents (RP19 i malaltia de Stargardt). Els resultats obtinguts mostren associació entre la mutació i el fenotip RP19. Recentment s'ha identificat tres mutacions en pacients afectats de RPAR d'origen Turc, una d'elles ja descrita per alterar el procés normal de l'*splicing* (c.4253+4C>T) i les altres dues són identificades per primera vegada (c.973-6C>A, p.T829M) (Köksal Özgül i col., 2004). Els diferents estudis amb el gen ABCA4 demostren la presència d'heterogeneïtat clínica per un determinat locus en la RP.

D) Gens que codifiquen per proteïnes de funció desconeguda en la visió

S'inclouen en aquest apartat gens que codifiquen proteïnes de funció desconeguda però que s'expressen en els teixits afectats per la RP: un factor de transcripció (NR2E3), una proteïna tirosina quinasa (MERTK) i una proteïna de membrana basal (Usherina).

El gen NR2E3 o PNR codifica per un receptor nuclear retinal que pertany a una família de factors de transcripció implicats en diverses vies de senyalització. El gen PNR es localitza en la posició 15q22.3-q23, i s'expressa en la capa nuclear externa de la retina neurosensorial (Kobayashi i col., 1999 ; Rendtorff i col., 2000; Haider i col., 2000). Els estudis en un model de ratolí (locus rd7, caracteritzat per una degeneració retinal hereditària similar als desordres retinals humans) van mostrar que l'expressió de PNR era important pel desenvolupament i la funció dels

fotoreceptors (Akhmedov i col., 2000; Haider i col., 2001). L'anàlisi del gen PNR realitzat en 400 pacients amb diferents degeneracions retinianes, va permetre identificar 12 mutacions en els pacients afectats de ESCS (*Enhanced S Cone Syndrome*) (Haider i col., 2000). Per estudis d'homozigositat en una població endogàmica altament consanguínia amb RPAR, Gerber i col. (2000) van trobar lligament entre la malaltia i la regió cromosòmica 15q22.3-q23 on es localitza el gen PNR. L'anàlisi mutacional del gen PNR va permetre identificar una mutació de canvi de sentit en homozigosi (R311Q) associada a la RP.

L'estudi d'un model animal de rata RCS amb degeneració retiniana, desencadenada per la mort dels fotoreceptors a causa d'un mal funcionament de la fagocitosis dels segments externs dels fotoreceptors per part de l'EPR, va permetre identificar mitjançant clonació posicional una deleció que afectava el gen *Mertk* (D'Cruz i col., 2000). En humans, el gen *MERTK* es localitza a 2q14.1. El seu anàlisi mutacional en 328 pacients amb diferents distròfies retinals va revelar 3 canvis patològics en tres pacients afectats de RPAR: Una deleció de 5pb en homozigosi en una família consanguínia, un canvi d'aminoàcid per un codó de parada (R651X) en heterozigosi i un canvi puntual en el lloc acceptor d'*splicing* de l'intró 10 (IVS10-2A>G). Aquesta última mutació, aparentment en estat homozigot, correspon a una isodisomia paterna del cromosoma 2 (Gal i col., 2000). En un treball posterior s'han descrit casos en distròfies retinals produïts per isodisomies paternes sense contribució materna del cromosoma 1 o 2, amb presència d'homoal·lisme per mutacions en els gens *RPE65* o *MERTK* respectivament (Thompson i col., 2002).

Aproximadament entre el 74-90% de les famílies amb síndrome d'Usher tipus II presenten lligament a la regió cromosòmica 1q41. Eudy i col. (1998) van trobar tres mutacions en el gen *USH2A*, prèviament aïllat de la regió crítica identificada pels estudis de lligament en pacients amb síndrome d'Usher tipus II. Posteriorment, s'ha descrit un ampli espectre de mutacions del gen *USH2A* associades a aquest fenotip, destacant la mutació c.2299delG que explica entre un 22-52% dels pacients Usher II (Liu i col., 1999; Weston i col., 2000; Dreyer i col., 2000; Dreyer i col., 2001; Leroy i col., 2001; Najera i col. 2002). Aquesta mutació també s'ha detectat en pacients amb RP no sindròmica en un estudi fet per Rivolta i col. (2000), on van descriure que la mutació p.C759F explicava el 4,5% dels pacients amb RP no sindròmica autosòmica recessiva.

Taula 3. Gens i loci relacionats amb la RP no sindròmica.

| Localització cromosòmica | Gen/Locus | Herència | MIM |
|--------------------------|----------------------|----------------|--------|
| 1p31 | RPE65 / RP20 | RPAR | 180069 |
| 11p21-1p22 | ABCA4 / RP19 | RPAR | 601691 |
| 1q13-q23 | HPRP3 / RP18 | RPAD | 607301 |
| 1q31-q32.1 | CRB1 / RP12 | RPAR | 604210 |
| 1q41 | USH2A | RPAR | 276901 |
| 2q14.1 | MERTK | RPAR | 604705 |
| 2p11-p16 | RP28 | RPAR | 606068 |
| 2q31.2-q32.3 | CERKL / RP26 | RPAR | 608381 |
| 2q37.1 | SAG | RPAR | 181031 |
| 3q21-q24 | RHO / RP4 | RPAD, RPAR | 180380 |
| 4p16.3 | PDEB | RPAR | 180072 |
| 4p12-cen | CNGA1 | RPAR | 123825 |
| 4q31.2 | LRAT | RPAR | 604863 |
| 4q32-q34 | RP29 | RPAR | - |
| 5q31.2-q34 | PDE6A | RPAR | 180071 |
| 6p21.3 | TULP1 / RP14 | RPAR | 602280 |
| 6p21.2-cen | RDS-periferina / RP7 | RPAD, digènica | 179605 |
| 6q14-q21 | RP25 | RPAR | 602772 |
| 7p14.2 | PIM1K / RP9 | RPAD | 607331 |
| 7q31.3-q32 | IMPDH1 / RP10 | RPAD | 146690 |
| 8q11-q13 | RP1 | RPAD | 603937 |
| 10q23 | RGR | RPAR | 600342 |
| 11q13 | ROM1 | RPAD, digènica | 180721 |
| 14q11.1-q11.2 | NRL / RP27 | RPAD | 162080 |
| 15q23 | NR2E3 | RPAR | 604485 |
| 15q26 | RLBP1 | RPAR | 180090 |
| 16p12.1-p12.3 | RP22 | RPAR | 602594 |
| 16q13 | CNGB1 | RPAR | 600724 |
| 17p13.3 | PRPF8 / RP13 | RPAD | 607300 |
| 17q22 | RP17 | RPAD | 600852 |
| 17q25 | FSCN2 / RP30 | RPAD | 607643 |
| 19q13.3 | CRX | RPAD | 120970 |
| 19q13.4 | PRPF31 / RP11 | RPAD | 606419 |
| Xp22 | RP23 | RPLX | 300424 |
| Xp21.3-p21.2 | RP6 | RPLX | 312612 |
| Xp21.1 | RPGR / RP3 | RPLX | 312610 |
| Xp11.3 | RP2 | RPLX | 312600 |
| Xq26-q27 | RP24 | RPLX | 300155 |

1.5. GENS ANALITZATS EN AQUEST TREBALL

1.5.1. GENS EXPRESSATS EN EPR IMPLICATS EN EL CICLE VISUAL

L'epiteli pigmentari de la retina presenta diferents funcions essencials pels fotoreceptors, destacant la síntesi de la rodopsina mitjançant el reciclatge de l'11-cis-retinal. Aquesta regeneració del pigment visual que és necessària per la fototransducció té lloc durant el cicle visual, on el metabòlit de partida pot provenir de dos orígens diferents: 1) a partir de la configuració tot-trans-retinol alliberada per la rodopsina prèviament fotoactivada en la fototransducció i 2) a partir del tot-trans-retinol provinent del metabolisme de la vitamina A.

El cicle visual està compost per una sèrie d'interaccions acoplades de forma competitiva entre els enzims que catalitzen les diferents reaccions enzimàtiques i les proteïnes responsables del transport intracel·lular dels diferents intermediaris del metabolisme dels retinoids. Aquest transport intracel·lular és facilitat per les diferents proteïnes d'unió a substrat, entre elles la proteïna CRALBP (*cellular retinaldehyde-binding protein*) i la proteïna CRBP1 (*cellular retinol-binding protein 1*). Recentment s'ha identificat una nova proteïna expressada en EPR, anomenada receptor RGR (*RPE-G protein-coupled-receptor*), a la que se li ha assignat un paper funcional en una possible ruta alternativa destinada a la regeneració de la rodopsina.

1.5.1. 1. Gen RLBP1 (*retinaldehyde-binding protein 1*)

A partir d'extractes de retina bovina es van identificar els lligands amb afinitat per la proteïna CRALBP, definint CRALBP com una proteïna soluble amb capacitat per unir-se a l'11-cis-retinal i al seu precursor 11-cis-retinol, molècules conegudes per estar implicades en el cicle visual (Saari i col 1982).

Els resultats obtinguts *in vitro* en l'estudi de la unió de la proteïna CRALBP pel lligand endogen van permetre deduir que la proteïna CRALBP presentava una gran habilitat estereoselectiva per unir-se als isòmers dels retinoids amb configuració cis, principalment per l'11-cis-retinal i en menor grau pel seu precursor, l'11-cis-retinol. Amb l'anàlisi de les propietats fotoquímiques van demostrar que aquesta unió de

l'11-cis-retinal amb la proteïna CRALBP presentava una baixa fotosensibilitat. En base a les característiques atribuïdes a la proteïna CRALBP es va postular que el seu paper fisiològic en el cicle visual estaria relacionat amb la solubilitat que confereix al lligand que transporta de forma específica i amb un paper protector sobre el lligand respecte a la fotoisomerització, evitant el possible pas a la configuració tot-trans, situació que difereix del que passa en condicions de llum (Saari i Bredberg, 1987).

A partir de cDNAs de retina humana i bovina, Crabb i col. (1988) van clonar el gen RLBP1 que codifica per la proteïna CRALBP. Comparant les proteïnes CRALBP, humana i bovina, van determinar que la composició d'aminoàcids i la corresponent seqüència de nucleòtids de la regió codificant eren idèntiques en un 90% i 92% respectivament, i que estarien constituïdes per 316 residus similars, presentant diferències a nivell dels extrems N i C-terminal. Els estudis immunocitoquímics van detectar expressió de la proteïna CRALBP a nivell de l'EPR i cèl·lules de Müller de la retina, reforçant la idea de la seva implicació en el cicle visual com a proteïna de transport de substrats i/o agent estereoselectiu en el metabolisme de la vitamina A.

En un estudi *in vitro* basat en determinar el paper funcional de la proteïna CRALBP en el cicle visual, s'observa que la presència de l'11-cis-retinol unit a la proteïna CRALBP comporta: i) una activació de la reacció d'oxidació de l'11-cis-retinol catalitzada per l'enzim 11-cis-retinol deshidrogenasa i ii) una reducció en la reacció d'esterificació de l'11-cis-retinol catalitzada per l'enzim LRAT (Figura 11). Aquests resultats suggereixen que la proteïna CRALBP actuaria modulant la interacció del lligand que transporta amb enzims del metabolisme dels retinoids, postulant un paper important per la proteïna CRALBP en determinar la direcció del flux del lligand que transporta en el cicle visual (Saari i col., 1994). En un treball posterior es va determinar que la proteïna CRALBP no inhibia l'acció catalitzada per l'enzim LRAT sinó que estimulava la hidròlisi dels ésters amb configuració 11-cis incrementant la formació de l'11-cis-retinol i pertant l'11-cis-retinal (Stechert i col., 1999).

Diversos estudis *in vitro* (Winston i Rando, 1998; Stechert i col., 1999; McBee i col., 2000; McBee i col., 2001) han proposat que la unió de la proteïna CRALBP amb l'11-cis-retinol estimula les diferents reaccions d'isomerització per l'obtenció d'aquest isòmer alhora que evita la reacció d'isomerització inversa de l'11-cis-retinol cap a la configuració tot-trans. Tots aquests estudis bioquímics *in vitro* han demostrat la

implicació de la proteïna CRALBP en el cicle visual afectant les propietats cinètiques de diferents enzims, i atribuïnt a la proteïna CRALBP un paper important en la determinació del flux dels retinoids per la regeneració del pigment visual.

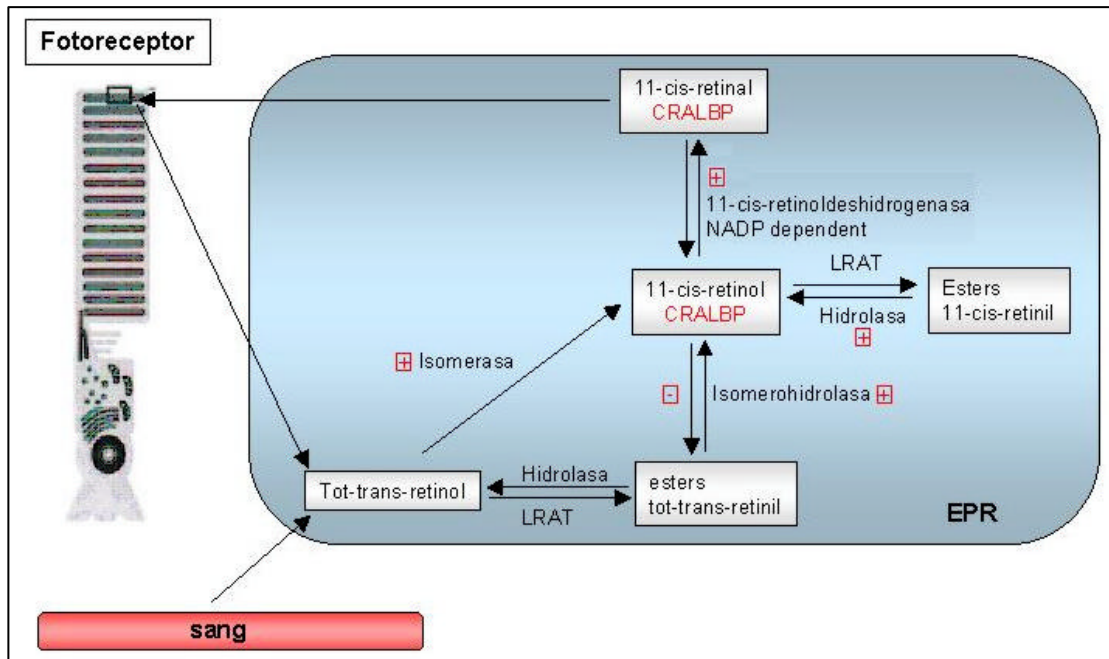


Figura 11. Esquema de les reaccions enzimàtiques del cicle visual, la cinètica de les quals és dependent de la proteïna CRALBP.

Un model amb ratolins *knockout* pel gen *rlbp1* ha permès identificar la funció de la proteïna CRALBP *in vivo* (Saari i col. 2001). El model generat es caracteritza per presentar absència d'expressió de la part funcional de la proteïna CRALBP que determina la unió amb el lligand. Aquests ratolins presenten alteracions en la producció de l'11-cis-retinal, en la regeneració de la rodopsina, i en l'adaptació a la foscor. Els resultats obtinguts *in vivo* complementen les dades obtingudes *in vitro*, confirmant el compromís de la proteïna CRALBP en el cicle visual.

La proteïna CRALBP a part d'expressar-se en EPR i cèl·lules de Müller de la retina, també es troba present en el cos ciliar, còrnea, glàndula pineal, nervi òptic i cervell. Es postula que la proteïna CRALBP expressada en cervell i altres teixits no implicats en el cicle visual pot presentar altres funcions no relacionades amb la regeneració de la rodopsina i també pot unir-se a altres substrats encara desconeguts (Saari i col., 1997).

L'anàlisi d'hibridació *in situ* va permetre determinar la localització del gen *RLBP1* humà a la regió cromosòmica 15q26 (Sparkes i col., 1992). S'ha establert l'existència

d'una única còpia del gen humà RLBP1 que codifica per la proteïna CRALBP ocupant una extensió genòmica de 29Kb. El gen RLBP1 està dividit en 8 exons i 7 introns, l'organització dels quals segueix les regles estàndard del mecanisme de l'*splicing* en els vertebrats. El rang de tamany dels exons varia entre 111pb i 555pb, i pel què fa als introns està comprès entre 255pb a 3152pb. El primer exó i part del segon i del vuitè no són traduïts a proteïna (Figura 12). L'anàlisi molecular de la regió proximal 5' del gen RLBP1 va determinar l'absència de seqüències *consensus* relacionades amb la regulació de la transcripció en les posicions habituals (*TATA* i *CCAAT boxes*, segments rics en GC) (Intres i col., 1994).

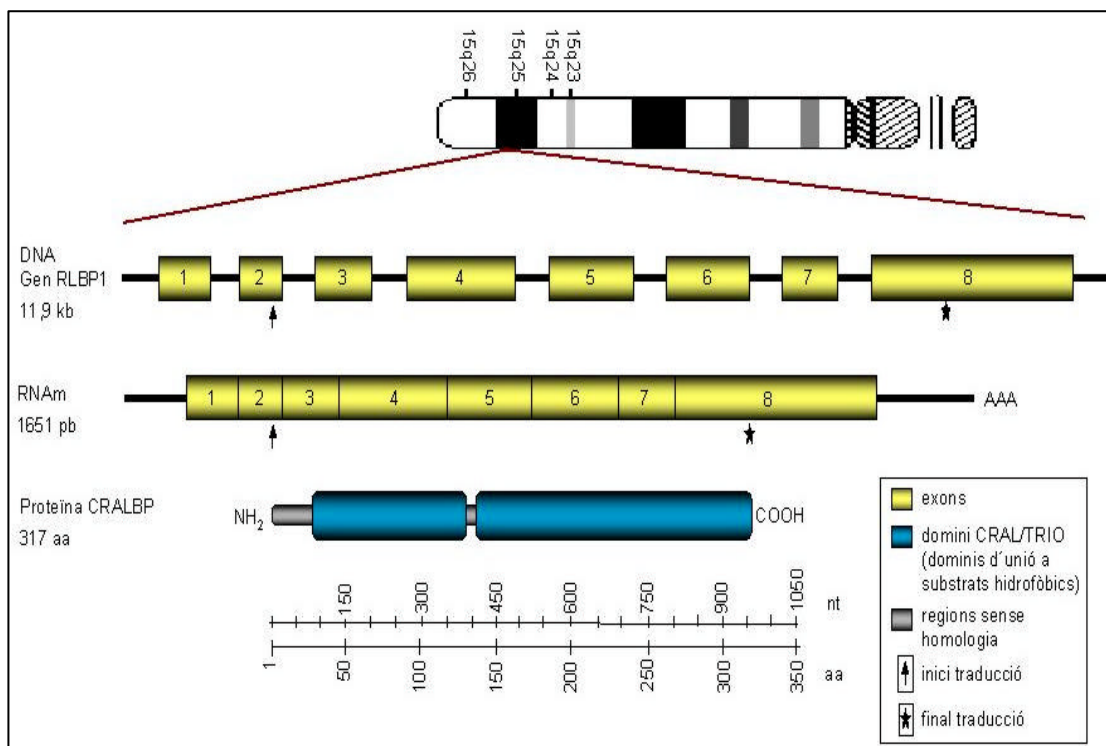


Figura 12. Estructura del gen RLBP1 i la seva correlació amb els dominis de la proteïna CRALBP.

Els experiments de transfecció amb diferents regions del promotor del gen RLBP1 en línies cel·lulars humanes de l'EPR, han permès identificar regions del promotor relacionades amb una activitat reguladora de l'expressió específica de la proteïna CRALBP en l'EPR, a diferència del què passava en línies cel·lulars humanes procedents de sistemes no oculars, on no es detectava expressió d'aquesta proteïna. L'anàlisi molecular d'aquestes regions del promotor del gen RLBP1 ha determinat dos seqüències conservades i homòlogues als elements *consensus* dels fotoreceptors (*photoreceptor consensus element-1*, PCE-1). La presència d'aquests elements s'ha descrit en gens que s'expressen de forma

específica en els fotoreceptors de la retina de vertebrats: arrestina, IRBP, rodopsina, opsina verda i vermella. Els elements PCE-1 localitzats entre -170pb i -141pb de l'inici de transcripció, i definits com regions d'unió a factors de transcripció, podrien ser importants en determinar l'expressió específica de la proteïna CRALBP en l'EPR. Flanquejant les regions PCE-1 van trobar 2 seqüències idèntiques de 6pb (GCAGGA) anomenades BCE (*binding CRALBP element*), importants en la formació del complex de transcripció amb les proteïnes d'unió a PCE-1. Aquest estudi també va mostrar l'existència d'altres regions conservades localitzades en el part distal del promotor del gen RLBP1 (*enhancer element* i *repressor element*) (Kennedy i col., 1998a). L'anàlisi funcional del promotor del gen RLBP1 en diferents línies cel·lulars (cèl·lules de Müller, de l'epiteli ciliat i de l'EPR) suggereix l'existència d'una similar regulació de la transcripció del gen RLBP1 entre l'epiteli ciliat i l'EPR, mentre que en cèl·lules de Müller aquesta és diferent i desconeguda. Aquest estudi també determina una localització més precisa de les regions (*enhancer element* i *repressor element*) implicades en el mecanisme de la transcripció en els intervals de la part distal del promotor del gen RLBP1 compresos entre (-1826pb, -1749pb) i entre (-702pb, -635pb), respectivament (Kennedy i col., 2003).

Kennedy i col. (1998b) van caracteritzar el gen homòleg en un model animal de ratolí (*rlbp1*), revelant un tamany, número i organització dels exons i introns similar al gen humà RLBP1. El 87% de la seqüència de nucleòtids que forma la part codificant del gen humà i de ratolí és idèntica. A diferència del gen humà, en el gen *rlbp1* de ratolí s'identifica una única regió amb seqüència conservada corresponent a les regions PCE-1 descrites en el gen humà, que determinarà l'expressió de la proteïna CRALBP en l'EPR.

Diversos treballs basats en l'anàlisi de lligament o l'estudi d'homozigositat han evidenciat la presència de lligament de la malaltia a la regió cromosòmica 15q, on es localitza el gen RLBP1. Altres estudis, han optat per l'estratègia de l'anàlisi directe del gen RLBP1 per la seva implicació en el cicle visual, considerant aquest gen com a candidat per l'estudi de les degeneracions de la retina. L'anàlisi mutacional del gen RLBP1 en famílies amb diferents distròfies de la retina, ha permès identificar mutacions associades a RPAR, retinosi punctata albescens (RPA), fundus albipunctata (FA), distròfia de Bothnia (DB) i distròfia de bastons-cons de l'illa de Newfoundland (NFRCD). (Maw i col., 1997; Morimura i col., 1999a; Katsanis i col., 2001b; Burstedt i col., 1999; Burstedt i col., 2001; Eichers i col., 2002; Fishman i col., 2004).

1.5.1.2. Gen CRBP1 (*cellular retinol-binding protein 1*)

La vitamina A i els seus derivats, indispensables per la regeneració de la rodopsina en els fotoreceptors, són molècules insolubles en medi aquós i per aquest motiu el seu transport intracel·lular requereix la unió a proteïnes específiques. La proteïna CRBP1 (*cellular retinol-binding protein 1*) pertany a una família de proteïnes citosòliques amb capacitat d'unir lligands hidrofòbics. Aquesta proteïna CRBP1 s'uneix de forma específica al derivat tot-trans-retinol i és responsable del seu transport intracel·lular en l'EPR.

La proteïna CRBP1 codificada pel gen CRBP1 està constituïda per 132 aminoàcids amb una massa molecular de 15.7 kD. Aquesta proteïna pertany a una família de proteïnes solubles que s'uneixen als diferents intermediaris del metabolisme dels retinoids. S'ha identificat expressió de la proteïna CRBP1 en l'EPR i les cèl·lules de Müller. L'estudi citogenètic amb cèl·lules somàtiques híbrides va permetre mapar el gen que codifica per la proteïna CRBP1 en el cromosoma 3. Per la tècnica d'hibridació *in situ* amb fluorescència es va determinar una localització més precisa del gen RBP1 en la regió cromosòmica 3q21-q22 (Colantuoni i col., 1985; Colantuoni i col., 1986; De Baere i col., 1998).

Nilson i col. (1988) van determinar la seqüència de nucleòtids que componen el gen CRBP1 exceptuant la que correspon a l'intró 2, establint l'organització genòmica d'aquest gen. La regió codificant del gen CRBP1 està constituïda per 4 exons de 24, 59, 33 i 16 aminoàcids respectivament i 3 introns, ocupant una extensió genòmica de 21 Kb, de les quals 19Kb corresponen a l'intró 2 (Figura 13). En la regió 5' del gen CRBP1, implicada en la regulació de la transcripció, s'ha identificat una regió rica en C i G amb l'existència de múltiples còpies d'hexanucleòtids (CCGCCC) bidireccionals amb homologia a llocs d'unió a factors de transcripció (SP1).

Per tal de determinar l'afectació del cicle visual en absència de la proteïna CRBP1, Saari i col. (2002) van generar un model de ratolí *knockout* (*crbp1^{-/-}*). Els resultats obtinguts d'aquest model animal mostren que en absència d'aquesta proteïna la regeneració del pigment visual no està alterada de forma severa. En aquests ratolins es va demostrar que hi havia una acumulació del tot-trans-retinol en la part neural de la retina i una reducció dels nivells de retinoids esterificats en l'EPR. Aquestes dades suggereixen que la proteïna CRBP1 participa en un procés de difusió del tot-trans-retinol des dels fotoreceptors fins l'EPR i que el mecanisme

estaria implicat en facilitar els substrats derivats de la vitamina A vers l'enzim LRAT per la seva esterificació.

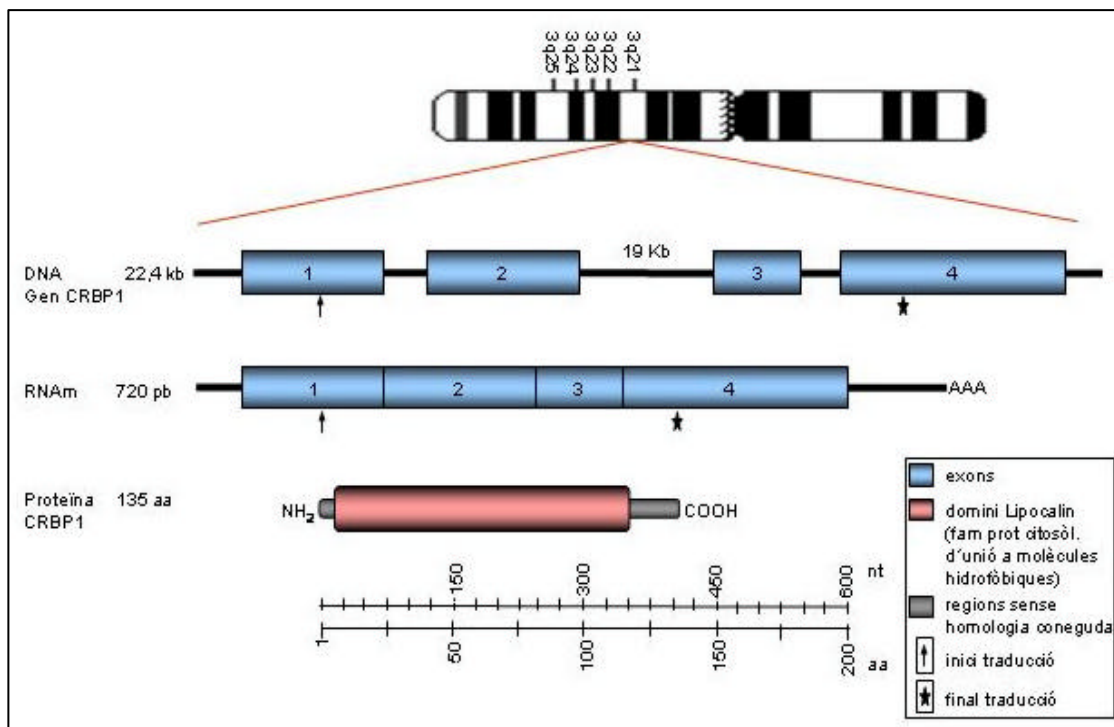


Figura 13. Organització genòmica del gen CRBP1 i correlació amb l'estructura de la proteïna codificada per aquest gen.

1.5.1.3. Gen RGR (*RPE-G protein-coupled-Receptor*)

A partir d'estudis *in vitro* amb extractes de retina d'origen boví es va identificar una nova proteïna unida a membrana (RGR), caracteritzada per presentar homologia a la família de receptors acoplats a proteïna G, i constituïts per 7 dominis transmembrana. El receptor RGR s'expressa en EPR i en cèl·lules de Müller de la retina neural. La seva localització, la seva elevada expressió en EPR i en retina neural i la seva homologia amb les opsines dels pigments visuals dels vertebrats i amb els retinocroms dels invertebrats, són característiques que suggereixen una funció important pel receptor RGR en el procés del cicle visual (Jiang i col., 1993; Pandey i col., 1994).

S'ha identificat l'existència de diversos aminoàcids conservats en el setè domini transmembrana del receptor RGR, destacant la presència d'un residu hidrofílic de

lisina, que és anàleg al residu de lisina conservat en tots els pigments visuals, caracteritzat en la rodopsina per ocupar la posició 296 i estar implicat en el lloc d'unió amb el cromòfor (l'11-cis-retinal). S'ha postulat que el gen RGR ha evolucionat a partir d'una branca separada i allunyada de la família dels gens que codifiquen per les opsines dels vertebrats (Shen i col.,1994).

Per hibridació *in situ* amb fluorescència (FISH) es va localitzar el gen RGR humà en la regió cromosòmica 10q23 (Chen i col. ,1996). El gen del receptor RGR ocupa una extensió genòmica de 14.8Kb. La regió codificant està dividida en 7 exons, existint una bona correlació amb els set segments transmembrana que formen la proteïna (Figura 14). Comparant la seqüència d'aminoàcids que componen la proteïna RGR, humana i bovina, s'observa que són idèntiques en un 86%. Aquestes proteïnes estan formades per 291 aminoàcids i presenten homologia pel què fa als extrems N- i C-terminal. Els estudis d'expressió van detectar la presència de com a mínim sis transcrits que derivaven d'una sola copia del gen, suggerint que el patró d'expressió del gen RGR en retina humana és més complex que en el cas de retina bovina (Shen i col., 1994).

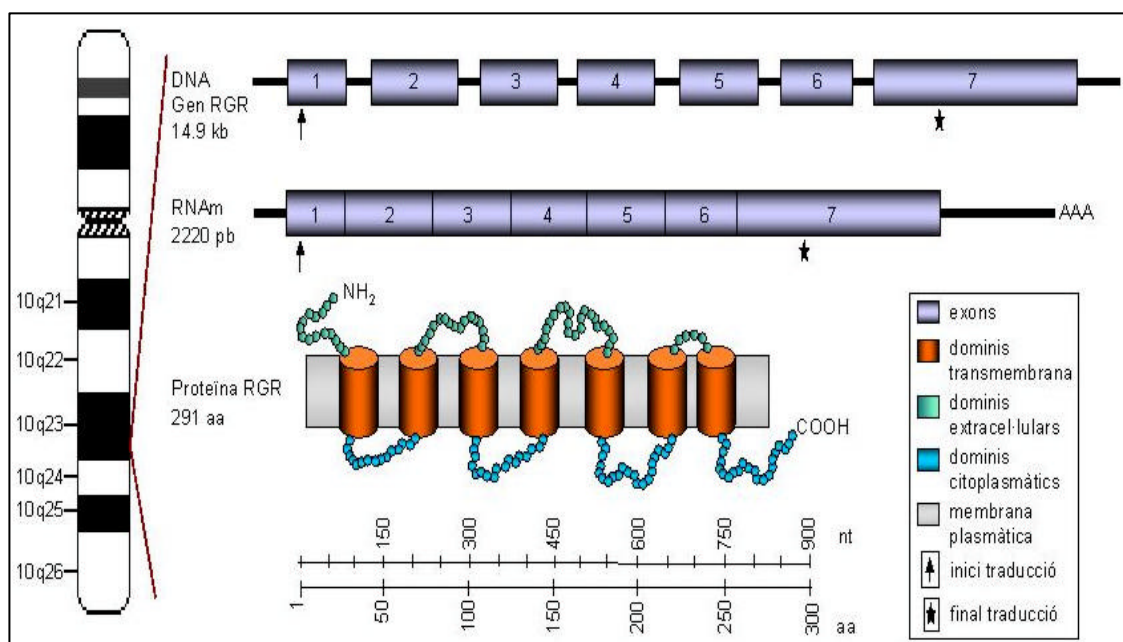


Figura 14. Correlació entre l'organització genòmica del gen RGR i l'estructura proteica del receptor RGR. El primer exó codifica per l'extrem N-terminal i part del primer segment hidrofòbic de la proteïna; el segon exó codifica la resta del primer i el segon domini transmembrana; els exons 3, 4, 5 i 6 codifiquen pels segments transmembrana III, IV, V i VI respectivament i l'últim exó codifica pel VIIè segment hidrofòbic i la part C-terminal de la proteïna (Shen i col., 1994).

L'estudi de les propietats espectrals d'absorció de llum evidencien la capacitat de la proteïna RGR per unir de forma covalent la configuració tot-trans-retinal (Hao i Fong, 1996). Els estudis *in vitro* mostren que aquest receptor s'uneix preferencialment a la configuració tot-trans-retinal en la foscor. En condicions de llum, s'observa una conversió del precursor tot-trans-retinal unit a RGR cap a la configuració 11-cis-retinal, reacció inversa a la que es dona en la rodopsina. Malgrat no existir evidències que en presència de llum l'isòmer 11-cis-retinal es dissociï del receptor RGR per entrar en la via de regeneració dels pigments visuals, aquests resultats argumenten que el receptor RGR funciona com una fotoisomerasa que actua de forma estereoespecífica en l'EPR i en cèl·lules de Müller (Hao i Fong, 1999). El procés d'unió i de dissociació del cromòfor amb el receptor RGR és reversible i el mecanisme pel qual funciona RGR *in vivo* vindria determinat per la seva interacció amb altres proteïnes, existint una possible ruta alternativa per la formació de l'11-cis-retinal en el cycle visual sota condicions de llum (Figura 15).

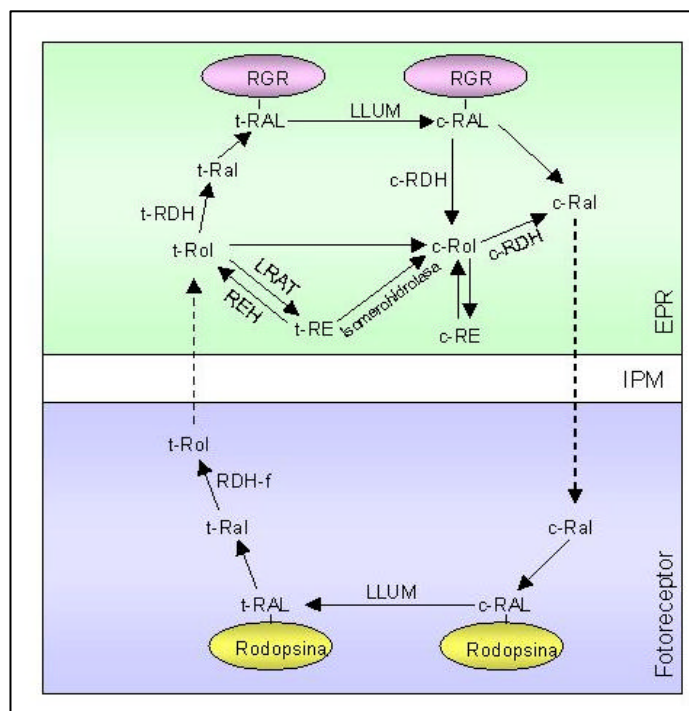


Figura 15. Model proposat per la via fòtica del cycle visual en la que hi participa l'opsina RGR de l'EPR. RGR actua interaccionant amb els enzims tot-trans-retinol deshidrogenasa (t-RDH) i 11-cis-retinol deshidrogenasa (c-RDH), aquest últim amb una dualitat pel què fa a la seva funció. Altres components que participen en la via fòtica proposada són: t-RAL: tot-trans-retinal; t-Rol: tot-trans-retinol; c-RAL: 11-cis-retinal; c-Rol: 11-cis-retinol; c-RE: 11-cis-retinil ester; t-RE: tot-trans-retinil ester; RDH-f: retinol deshidrogenasa del fotoreceptor; LRAT: lecithin-retinol aciltransferasa; REH: retinil ester hidrolasa (Chen i col., 2001b; Haeseleer i col., 2002; Yang i Fong, 2002).

El 78% de la seqüència d'aminoàcids que conformen les proteïnes RGR humana i de ratolí són idèntiques. En el model animal de ratolí s'ha observat que el gradient d'expressió del receptor RGR en l'EPR va de la perifèria a la part central de la retina durant el desenvolupament, coincidint amb un estadi avançat de maduració de la retina (Tao i col., 1998).

En un model animal de ratolí caracteritzat per absència d'expressió del receptor RGR (amb genotip *rgr* *-/-*) i sotmès a una exposició continuada a la llum, s'observa un dèficit en la síntesi de l'11-cis-retinal i una taxa més lenta de regeneració de la rodopsina respecte als ratolins amb expressió normal del receptor RGR (*rgr* *+/+*); en canvi quan ambdues línies de ratolins estan adaptades a la foscor o sotmeses a petites exposicions de llum no existeixen diferències pel que fa als nivells d'11-cis-retinal i de rodopsina. Tot i que a nivell morfològic es va confirmar absència de degeneracions de la retina en els ratolins *rgr* *-/-*, els resultats d'aquest estudi *in vivo* mostren que el receptor RGR està implicat en la producció de l'isòmer 11-cis-retinal per la regeneració de la rodopsina en una via del cicle visual que és dependent de la llum (cicle fòtic), corroborant d'aquesta forma els resultats prèviament obtinguts *in vitro* (Chen i col., 2001a).

En un treball recent basat en l'estudi de la interacció entre el receptor RGR i l'enzim RDH5 (11-cis-retinol deshidrogenasa) que intervé en el cicle visual que té lloc en la foscor, es plantejava que l'alteració dels dos productes hauria de suposar un fenotip més sever ja que es veurien afectades les vies del cicle visual que són dependents i independents de la llum. Comparant ratolins *knockout* pel gen *rgr* (*rgr* *-/-*) i ratolins *knockout* pels 2 gens (*rgr* *-/-* i *rdh5* *-/-*) sota iguals condicions de llum es va descartar el fenotip més sever pels ratolins *rgr* *-/-* i *rdh5* *-/-*. En condicions de llum intensa, es va detectar la producció dels isòmers 9-cis i 13-cis-retinoids en els ratolins *rgr* *-/-*, a diferència dels ratolins amb expressió normal del receptor *rgr*. A partir d'aquests resultats es va postular que el paper del receptor RGR estaria implicat en evitar la formació d'aquests isòmers o en la seva eliminació. Semblaria, doncs, que el receptor RGR participaria en el cicle dels retinoids però sense ser essencial per la regeneració de la rodopsina (Maeda i col., 2003).

Morimura i col (1999b) van considerar la implicació del gen RGR en la gènesi de diferents distròfies de la retina en humans, identificant dues mutacions causants de la degeneració de la retina característica de la RP en dos pacients amb patrons d'herència diferents.

1.5.2. GENS EXPRESSATS EN LA PART NEURAL DE LA RETINA DE FUNCIO DESCONEGUDA

1.5.2.1. Gen CRB1 (*crumbs homologue 1*)

Heckenlively JR. (1982) va descriure un nou fenotip caracteritzat per aparèixer com una forma severa de RP autosòmica recessiva amb presència de preservació de l'EPR adjacent a les arterioles retinals, i manifestant hipermetropia en lloc de la miopia existent en la RP. En una família multigeneracional i procedent d'una àrea geogràfica aïllada genèticament, es va observar la presència de dos fenotips en branques familiars diferents, RPAR i RP amb PPRPE. L'heterogeneïtat clínica detectada a nivell intrafamiliar permetia inferir en l'existència d'heterogeneïtat genètica no al·lèlica a nivell molecular. L'anàlisi de lligament en aquesta família va revelar lligament entre les branques familiars afectades de RP amb PPRPE i els marcadors localitzats en la regió cromosòmica 1q31-q32.1 (locus RP12) (van Soest i col., 1994). Una situació similar va ser detectada en una ampla família consanguínia Pakistanesa, on també existia lligament entre els membres afectats de RP amb PPRPE i el locus RP12 (Leutelt i col., 1995). Estudis posteriors han descartat el gen de la fosducina i el gen RGS16 com causants del fenotip RP12 (RP amb PPRPE) en les famílies que presentaven lligament amb el locus RP12 (van Soest i col., 1996; Bessant i col., 2000).

Estudis de clonació molecular han identificat el gen CRB1 en la regió cromosòmica 1q31-q32.1, coincidint amb el locus associat al fenotip RP12. Aquest gen codifica per una proteïna designada *Crumbs homologue 1* (CRB1) per la seva homologia amb la proteïna *crumbs* de *Drosophila melanogaster* (gen *crb*). El gen humà CRB1 s'expressa específicament en retina neural i cervell adult i fetal. Una primera aproximació en la descripció del gen CRB1 humà determinava que estava format per 11 exons, ocupant una extensió genòmica de 40kb. La proteïna codificada pel gen CRB1 estava constituïda per 1376 aminoàcids i formada per 19 dominis EGF (*epidermal growth factor*), 3 dominis laminina AG i un domini C-tipus lectina, quedant definida com una proteïna extracel·lular. Per l'elevada homologia presentada amb la proteïna *crumbs* de *Drosophila melanogaster* es va postular que la funció de la proteïna CRB1 humana estaria relacionada amb la interacció intercel·lular i en el manteniment de la polaritat cel·lular de la retina (den Hollander i col., 1999).

En un estudi posterior es va determinar l'existència d'*splicing* alternatiu localitzat en l'extrem 3' del gen CRB1 humà definint la presència de 4 transcrits diferents (I,II,III i IV), que codifiquen per 4 isoformes proteiques. L'expressió detectada en retina i cervell la van atribuir únicament als transcrits I i II (Figura 16). L'expressió dels transcrits III i IV no era detectada per la tècnica de la RT-PCR, especulant que la possible expressió d'aquests transcrits podia ser específica d'algun estadi del desenvolupament o d'un grup minoritari de cèl·lules de la retina i cervell. L'absència d'un lloc de poliadenilació en l'extrem 3' del transcrit I suggeria que fós considerat com un possible artefacte. Aquests resultats determinen que la regió codificant del gen CRB1 humà està dividida en 12 exons. Les proteïnes codificades pels transcrits I i II consten de 1376 i 1406 aminoàcids respectivament. Aquestes proteïnes presenten una estructura comuna formada per un senyal peptídic, 19 dominis EGF i 3 dominis laminina AG. La diferència entre les isoformes proteiques I i II resideix en la regió C-terminal. La proteïna codificada pel transcrit II té en el seu extrem C-terminal un domini transmembrana i un domini citoplasmàtic de 37 aminoàcids amb una alta homologia amb el domini citoplasmàtic de la proteïna *crumbs* de *Drosophila*, quedant definida com una proteïna transmembrana amb dominis intracel·lulars i extracel·lulars (den Hollander i col., 2001b).

El gen CRB1 per la seva co-localització cromosòmica amb el locus RP12, i pel seu patró d'expressió present en retina neural va ser considerat com a gen candidat per l'estudi del fenotip RP12. Diversos treballs basats en l'anàlisi mutacional del gen CRB1 han descrit un total de 50 mutacions diferents identificades en un rang de distròfies retinals severes i d'aparició precoç, quedant incloses la RPAR, la RP amb PPRPE (o RP12), el LCA, i la RP amb presència d'una complicació associada caracteritzada per anormalitats vasculars, dipòsits de lipids extravasculars i desprendiment de retina (*coats-like exudative vasculopathy*) (den Hollander i col., 1999; den Hollander i col., 2001a; Lotery i col., 2001a; Lotery i col., 2001b; Gerber i col., 2002; Khaliq i col., 2003; Hanein i col., 2004).

Diferents estudis han contribuït a caracteritzar a nivell molecular el gen *crumbs* (*crb*) de *Drosophila melanogaster*, que codifica per una proteïna que es localitza en les membranes apicals de les cèl·lules epitelials i sobretot en les zones de connexió entre cèl·lules. Els resultats observats en embrions *crb* mutats de *Drosophila* demostren una pèrdua de la morfologia polaritzada de les cèl·lules epitelials seguida de defectes en l'organització de l'epiteli i en alguns casos també s'observa presència de mort cel·lular (Tepass i col., 1990). Un estudi posterior argumenta que l'eliminació

dels 37 aminoàcids de l'extrem C-terminal que formen el domini citoplasmàtic de la proteïna, és suficient per abolir la funció de la proteïna *crumbs* (Wodarz i col., 1993). Altres estudis confirmen aquestes dades i, per altra banda, observen que la sobreexpressió de *crb* comporta una expansió del domini apical acompanyada per una reducció del domini basolateral de la membrana plasmàtica, induint de forma global a una reorganització del citoesquelet (Wodarz i col., 1995).

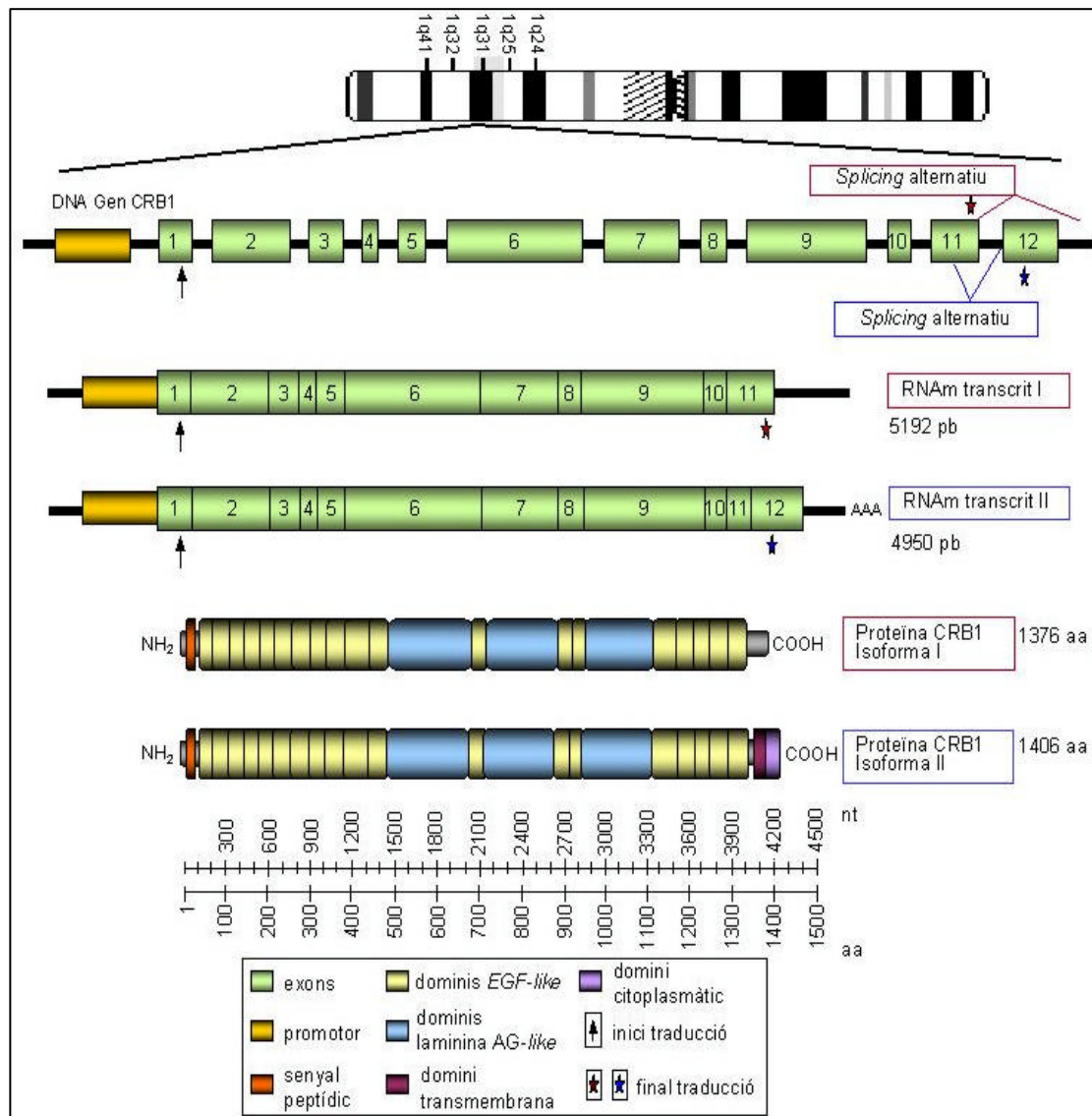


Figura 16. Organització genòmica del gen CRB1 i la seva correlació amb l'estructura de la proteïna codificada.

La proteïna transmembrana *crumbs* observada en embrions normals de *Drosophila*, presenta una localització predominant prop de les zones on s'establiran les unions d'adhesió intercel·lular formant la *zonula adherents* (ZA), suggerint una

funció de la proteïna *crb* en la biogènesi i en el manteniment de la integritat d'aquests tipus d'unions especialitzades, contribuïnt de forma important en la polaritat i adhesió cel·lular (Grawe i col., 1996; Tepass, 2001; Tepass i col., 2001).

Treballs recents han identificat múltiples funcions per la proteïna *crb* en retina de *Drosophila*. Les cèl·lules fotoreceptores (PRCs) són considerades un tipus de cèl·lules epitelials per la seva arquitectura polaritzada, determinada per la subdivisió de la membrana apical i basolateral degut a la presència de diferents complexos proteics. En *Drosophila*, la proteïna *crb* és important per la integritat de la ZA i per la formació de la membrana de suport coneguda com *stalk* durant la morfogènesi dels fotoreceptors de la retina, estructures que són importants en determinar la polaritat cel·lular, la morfogènesi i l'orientació de les membranes dels orgànuls fotosensibles, les *rabdomeres* (Pellikka i col., 2002; Izaddost i col., 2002). El defecte primari d'aquestes estructures causa un aspecte anormal dels fotoreceptors. Una característica atribuïda a la part extracel·lular de la proteïna *crumbs* en *Drosophila* és la inhibició de la degeneració dels fotoreceptors induïda per la llum, mentre que la correcta morfogènesi és depenent de la part intracel·lular de la proteïna *crumbs* (Johanson i col., 2002). Totes aquestes propietats associades a la proteïna *crumbs* de *Drosophila* suggereixen que la proteïna CRB1 humana pot ser important en determinar la integritat de la ZA de la retina neural i en el desenvolupament normal de la morfogènesi dels segments intern i extern del fotoreceptor, que determinen la subdivisió de la membrana apical dels fotoreceptors i que es corresponen en *Drosophila* amb la membrana del *stalk* i amb les estructures fotosensibles, les *rabdomeres*, respectivament.

Altres treballs realitzats en el model animal de *Drosophila* han caracteritzat el gen *stardust* (*sdt*), que interacciona amb *crb* formant part d'un complex subapical (SAC) que participarà en regular la formació de la ZA i en la polaritat cel·lular (Knust i col., 1993; Bachmann i col., 2001). Els resultats de l'estudi funcional basat en el sistema del *two-hybrid* indiquen que la pèrdua del domini citoplasmàtic de *crb* aboleix la interacció *sdt/crb*. En aquest complex s'ha descrit la participació d'un tercer component proteic anomenat *Discs Lost* (*Dlt*) que interacciona amb el complex *crb-sdt* a través de la proteïna *sdt*. En mamífers, s'ha identificat un complex multiproteic CRB1-Pals1-Patj, conservat en l'evolució i amb homologia al complex *crb-sdt-Dlt* descrit en *Drosophila*. S'ha proposat per aquests complexos una funció relacionada amb la gènesi d'una arquitectura polaritzada característica dels fotoreceptors (Hong i col. 2001; Medina i col., 2002; Roh i col., 2002).

Recentment s'ha aïllat el gen homòleg en ratolí (*crb1*). El 76% de la seqüència d'aminoàcids que conforma la proteïna codificada pel gen *crb1* és idèntica a la proteïna humana, ambdues proteïnes presenten la mateixa composició estructural. L'expressió de *crb1* en ratolí s'observa a nivell de l'ull i de cervell, coincidint amb el patró detectat per la proteïna humana. L'estudi de *crb1* en ratolí durant el desenvolupament embrionari i estadis post-natals revela nivells elevats d'expressió en les cèl·lules progenitores de la retina en estadis inicials del desenvolupament, mentre que en estadis més avançats l'expressió queda restringida als fotoreceptors, que es manté activa en estadis de l'adult (den Hollander i col., 2002)..

En un treball posterior s'ha identificat un model animal de ratolí amb degeneració retinal produïda per una deleció d'un nucleòtid en el gen *crb1* (*retinal degeneration, rd8*). Aquesta mutació que altera la pauta de lectura causa la pèrdua del domini transmembrana i del domini citoplasmàtic, generant una proteïna truncada i majoritàriament extracel·lular. Els defectes observats en els ratolins mutants *crb1^{rd8}* són molt similars als causats en mutants *crb1* de *Drosophila*. Tot i que CRB1 és essencial per la integritat de la membrana limitant externa i la morfogenesi dels fotoreceptors en la retina de mamífers, existeixen discrepàncies en les característiques fenotípiques observades en la retina entre ratolins i humans (Mehalow i col., 2003). Tots els avenços realitzats en models animals poden ser de gran ajuda per determinar la funció de la proteïna CRB1 en la visió i així establir la patogènia de les distròfies que cursen amb una degeneració severa de la retina.

1.5.2.2. Gen USH2A (Usher 2A)

La síndrome d'Usher, caracteritzada per una deficiència auditiva neurosensorial i congènita acompanyada de RP és un desordre amb un patró d'herència autosòmic recessiu. Existeixen tres formes diferenciades clínicament: tipus I, II i III. La síndrome d'Usher tipus II presenta una moderada a severa hipoacúsia neurosensorial congènita amb resposta vestibular normal i amb una RP de caràcter progressiu.

Diversos estudis van detectar lligament entre la síndrome d'Usher tipus II i un locus localitzat a la regió cromosòmica 1q41 (locus USH2A) (Kimberling i col., 1990;

Lewis i col., 1990; Kimberling i col., 1995; Bessant i col.,1998). Per clonació posicional es va identificar el gen USH2A en la regió crítica definida pels estudis de lligament. Més del 50% dels casos amb síndrome d'Usher corresponen al tipus II, i dins d'aquesta categoria clínica s'estima que entre el 10-26% dels casos no presenten lligament al locus USH2A (Kimberling i col., 1995; Hopes i col., 1997; Rosenberg i col., 1997; Eudy i col., 1998; Weston i col.,2000).

El gen USH2A esta dividit en 21 exons i ocupa una extensió genòmica mínima de 105 kb. El tamany del transcrit generat a partir del gen USH2A és de 6332 pb. El primer exó, part del segon i de l'últim exó del gen no són traduïts a proteïna. El gen USH2A codifica una proteïna anomenada usherina que presenta un pes molecular aproximat de 171.5 kD i una seqüència formada per 1546 aminoàcids (Weston i col.,2000).

La proteïna codificada pel gen USH2A (usherina) es caracteritza per tenir dominis que són homòlegs amb altres proteïnes components de matriu extracel·lular i lamina basal. L'estructura bàsica dels diferents dominis que conformen aquesta proteïna es mostra en la figura 17. L'usherina està formada per quatre tipus de dominis estructurals. En l'extrem N-terminal de la proteïna hi ha una regió hidrofòbica constituïnt un senyal peptídic. A continuació, es defineix un domini format per aproximadament 300 residus que es caracteritza per presentar homologia a la família de proteïnes tromboposdines (Tn). El segueix un domini laminina N-terminal IV (LamN) format per uns 200 aminoàcids i amb homologia als dominis laminina de la família de glicoproteïnes de membrana basal. La seqüència de la proteïna compresa entre els aminoàcids 518 i 1052, determina la presència de 10 dominis LE (*laminin-epidermal growth factor*) distribuïts en tàndem i formats cadascun d'ells per aproximadament 50 aminoàcids. Aquests dominis són presents en moltes proteïnes que formen part de la matriu extracel·lular de les membranes basals de la majoria de teixits. En l'extrem C-terminal de l'usherina s'ha detectat la presència de 4 dominis repetits en tàndem amb similitud als dominis de fibronectina tipus III (FN3) presents en proteïnes implicades en l'adhesió cel·lular (Bhattacharya i col., 2002).

A més, cal destacar que els sistemes afectats en la síndrome d'Usher tenen zones caracteritzades per ser particularment riques en proteïnes de matriu extracel·lular. En la retina aquestes àrees comprenen la membrana de Bruch i la matriu interfotoreceptora, i en l'oïda la part de la coclea.

La detecció immunohistoquímica va confirmar expressió de l'usherina en les membranes basals que conformen la retina i la coclea. En la retina, aquesta proteïna es localitza en les membranes basals que constitueixen principalment la membrana de Bruch i la coroïde, i en la coclea s'observa co-localització de l'usherina amb el colagen tipus IV, suggerint que es tracta d'una proteïna de membrana basal però sense quedar definida la seva precisa localització en aquest teixit. En base al patró d'expressió obtingut i a l'homologia estructural presentada respecte a altres proteïnes de funció coneguda es postula que la proteïna usherina és un component crític de la membrana basal que facilitaria el desenvolupament i l'homeostasi dels teixits tant en l'orella interna com en la retina, reflexant la importància de les membranes basals en el desenvolupament i manteniment de la funcionalitat dels teixits. S'ha demostrat també expressió de la proteïna en un ampli rang de teixits no afectats en la síndrome d'Usher II (Bhattacharya i col., 2002; Bhattacharya i col., 2004).

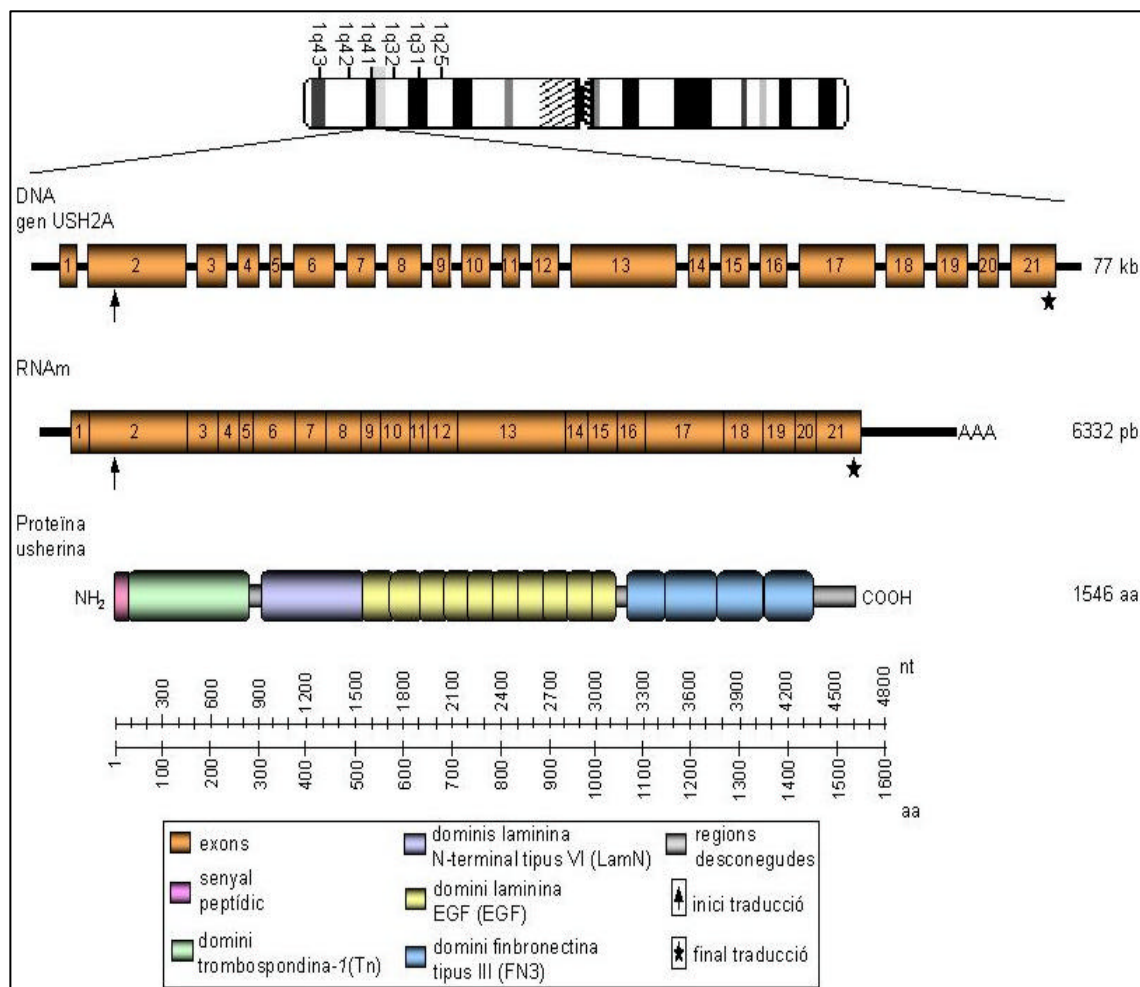


Figura 17. Organització genòmica del gen USH2A i la seva correlació amb l'estructura de l'usherina.

S'ha observat que el patró d'expressió de l'usherina en humans és consistent amb la distribució observada en el model animal de ratolí i de rata, suggerint que la regulació de l'expressió específica de teixit de l'usherina està conservada al llarg de l'evolució. Experiments d'hibridació *in situ* a partir de teixits oculars humans, de ratolí i de rata van permetre visualitzar la presència exclusiva dels transcrits USH2A en el citoplasma perinuclear de les cèl·lules fotoreceptores en la capa nuclear externa de la retina, descartant la presència de transcrits USH2A en l'EPR i en la capa nuclear interna de la retina (Pearsall i col., 2002; Huang i col., 2002).

Estudis d'hibridació *in situ* basats en un model animal de rata, han detectat expressió de l'usherina en estadis avançats del desenvolupament embrionari coincidint amb una etapa del desenvolupament en la que l'EPR ja s'ha diferenciat de la retina neural, proposant un paper important per aquesta proteïna en el desenvolupament de la part neural de la retina. La gènesi dels bastons culmina en un període del desenvolupament que inclou estadis embrionaris avançats i estadis postnatsals inicials. S'especula que aquesta detecció d'expressió de la proteïna coincideix amb el període del desenvolupament embrionari en el que es dona la formació dels fotoreceptors, encara que es continua observant expressió de l'usherina en estadis adults. Per aquest motiu es postula que l'usherina podria tenir un paper important en la morfogènesi dels bastons o en el manteniment de la part neural de la retina (Huang i col., 2002).

Fins al moment s'han identificat 36 mutacions patològiques en el gen USH2A, i segons el canvi produït en la seqüència del gen s'agrupen en: 12 mutacions de canvi de sentit, 11 sense sentit, 2 canvis que afecten els llocs de l'*splicing* i 11 que alteren la pauta de lectura (Taula 4). S'estima que les mutacions en el gen USH2A són responsables aproximadament del 70-80% dels casos amb síndrome d'Usher II. La mutació c.2299delG destaca per l'elevada freqüència detectada en famílies afectades de síndrome d'Usher II procedents de diferents poblacions (Eudy i col., 1998; Dreyer i col., 2000; Weston i col., 2000; Leroy i col., 2001). Aquesta mutació també s'ha descrit en casos atípics de la síndrome d'Usher (Liu i col., 1999). En un estudi de pacients amb RP no sindròmica amb una herència autosòmica recessiva es va identificar la presència d'una mutació de canvi de sentit (p.C759F) en el gen USH2A en el 4,5% dels casos (Rivolta i col., 2000). Aquests resultats il·lustren el fet de que mutacions en un mateix gen es manifesten fenotípicament de forma molt heterogènia, tant en RP no sindròmica com en RP sindròmica amb una deficiència auditiva neurosensorial.

Taula 4. Mutacions identificades en el gen USH2A.

| Tipus mutació | Nucleòtid alterat | Aminoàcid alterat | Fenotip associat descrit |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------|
| Canvi de sentit | | | |
| 1 | c.488 G>A | p.C163Y | S. Usher II |
| 2 | c.653 T>A | p.V218E | S. Usher II |
| 3 | c.688 G>A | p.V230M | S. Usher II |
| 4 | c.956 G>A | p.C319Y | S. Usher II |
| 5 | c.1000 C>T | p.R334W | S. Usher II |
| 6 | c.1036 A>C | p.N346H | S. Usher II |
| 7 | c.1256 G>T | p.C419F | S. Usher II |
| 8 | c.1606 T>C | p.C536R | S. Usher II |
| 9 | c.1663 C>G | p.L555V | S. Usher II |
| 10 | c.2137 G>C | p.G713R | S. Usher II |
| 11 | c.2276 G>T | p.C759F | S. Usher II i RP no sindròmica |
| 12 | c.4544 C>T | p.T1515M | S. Usher II |
| Sense sentit | | | |
| 1 | c.100 C>T | p.R34X | S. Usher II |
| 2 | c.187 C>T | p.R63X | S. Usher II |
| 3 | c. 779 T>G | p.L260X | S. Usher II |
| 4 | c.1227 G>A | p.W409X | S. Usher II |
| 5 | c.1696 C>T | p.Q566X | S. Usher II |
| 6 | c.1876 C>T | p.R626X | S. Usher II |
| 7 | c.2023 C>T | p.Q675X | S. Usher II |
| 8 | c.2541 C>T | p.C847X | S. Usher II |
| 9 | c.2797 C>T | p.Q933X | S. Usher II |
| 10 | c.3840_1 GA>CT | p.MR1280IX | S. Usher II |
| 11 | c.3883 C>T | p.R1295X | S. Usher II |
| Canvi de pauta de lectura | | | |
| 1 | c.239_42insCGTA | p.T80fs | S. Usher II |
| 2 | c.377_8delGT | p.S126fs | S. Usher II |
| 3 | c.921_22insCAGC | p.H308fs | S. Usher II |
| 4 | c.1679delC | p.P560fs | S. Usher II |
| 5 | c.1965delT | p.L654fs | S. Usher II |
| 6 | c.2299delG | p.E767fs | S. Usher II i RP no sindròmica |
| 7 | c.2431_32delAA | p.K811fs | S. Usher II |
| 8 | c.2878delAA | p.V959fs | S. Usher II |
| 9 | c.2898delG | p.T967fs | S. Usher II |
| 10 | c.4338_9delCT | p.L1447fs | S. Usher II i RP no sindròmica |
| 11 | c.4510_11insA | p.R1504fs | S. Usher II |
| Splicing | | | |
| 1 | c.2052 A>G | p.Q684Q | S. Usher II |
| 2 | IVS12+5 G>C | - | S. Usher II |