

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

TESI DOCTORAL

Anàlisi de l'expressió de mutacions de *splicing*

en *cis* i *trans* en gens associats a

retinosi pigmentària autosòmica dominant

María José Gamundi Rodríguez

Tesi Doctoral realitzada a l'Àrea de Biologia i Genètica Molecular del

Servei d'Anàlisis Clínic de l'Hospital de Terrassa.

Terrassa, abril de 2006

La present Tesi Doctoral, titulada “**Anàlisi de l’expressió de mutacions de *splicing* en *cis* i *trans* en gens associats a retinosi pigmentària autosòmica dominant**”, que presenta María José Gamundi Rodríguez per a obtenir el Grau de Doctora en Bioquímica, ha estat realitzada a l’Àrea de Biologia i Genètica Molecular del Servei d’Anàlisis Clíniques de l’Hospital de Terrassa, sota la direcció del Dr. José Miguel Carballo Villarino i sota la tutoria del Dr. Jaume Farrés Vicén.

Dr. José Miguel Carballo Villarino

Director de la Tesi

Dr. Jaume Farrés Vicén

Tutor de la Tesi

María José Gamundi Rodríguez

Autora de la Tesi

Terrassa, abril de 2006

A la meva família

AGRAÏMENTS

Gràcies al Dr. Miguel Carballo, per la direcció d'aquesta Tesi Doctoral i pel seu suport en tot moment en la realització de les tasques de recerca.

A les meves companyes del Laboratori de Biologia i Genètica Molecular, Imma, Marta i Gemma pel seu ajut i recolzament diari. Voldria donar les gràcies també a la Maria, per haver-me ajudat en els meus inicis al laboratori, i a l'Abel, per haver aportat els seus coneixements bioinformàtics a la nostra investigació.

A la Dra. Carmen Gimeno, Cap del Servei d'Anàlisis Clíniques de l'Hospital de Terrassa, per haver-me donat la oportunitat de realitzar aquest treball al laboratori. A la resta de companys del Servei d'Anàlisis Clíniques pel seu ajut i per l'interès mostrat en l'evolució de la investigació.

Al Dr. Miquel Maseras, Cap del Servei d'Oftalmologia de l'Hospital de Terrassa i als membres del seu equip, per la seva cooperació en tot moment en els examens i diagnòstics clínics dels pacients.

A la Dra. Carmen Ayuso, Coordinadora de la xarxa EsRetNet, i a tots els membres de la xarxa, per la seva col·laboració en l'enviament de mostres i històries clíniques dels pacients estudiats. Sense la col·laboració de tots ells no hauria estat possible realitzar aquesta Tesi.

A la Dra. Mati Ezquerro, directora de Docència i Recerca de la Fundació Joan Costa Roma i a la direcció del Consorci Sanitari de Terrassa, per les facilitats i continu recolzament a les tasques d'investigació realitzades durant aquests anys.

A la Dra. Ana Dopazo, del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, i als membres de seu equip, per la realització dels *microarrays* de DNA i per l'interès mostrat en la investigació portada a terme.

A l'Excm. Sr. Manel Royes, que, des del seu càrrec com a Alcalde de Terrassa i President de la Diputació de Barcelona, va mostrar gran interès i recolzament en la realització d'aquest treball.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Organización Nacional de Ciegos Españoles (ONCE) i Fundación ONCE per la financiació parcial dels projectes en els quals hem participat.

Al Dr. Jaume Farrés, com a tutor de la Tesi, i per haver mostrat un gran interès en la investigació que hem portat a terme i per haver-me donat suport també en tot moment.

Moltes gràcies als pacients i famílies, per la seva col·laboració desinteressada per a la realització d'aquest treball.

Als meus pares i sogra, i a la meva germana Cristina i al Raúl, per haver estat sempre quan els he necessitat, i per haver-me animat a continuar en el món de la recerca.

Moltes gràcies a tots els meus amics, per haver-me donat ànims en els moments de debilitat, i pel seu interès en l'evolució de l'elaboració d'aquesta Tesi.

I per últim, vull agrair al meu marit, José Antonio, que hagi estat al meu costat durant tots aquests anys, en els moments bons i no tan bons....

Moltes gràcies a tothom!!

ABREVIATURES

A	Adenina
Aa	Aminoàcid
AV	Agudesesa visual
C	Citosina
c/u	Cada un (cadascun)
CA4	<i>Carbonic Anhydrase IV</i>
CD	<i>Cone Dystrophy</i>
cDNA	DNA complementari
cfu	<i>Colony Forming Units</i> (Unitats formadores de colònies)
cM	Centimorgan
CNIC	Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
Cp	<i>Crossing Point</i>
CRD	<i>Cone-Rod Dystrophy</i> (Distròfia de cons i bastons)
CRX	<i>Cone-Rod homeoboX</i>
cSNP	SNP en regió codificant (veure SNP)
CV	Camp visual
ddNTP	Dideoxinucleòsid trifosfat
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> (Electroforesi en gel amb gradient desnaturalitzant)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DNase/DNasa	Desoxiribonucleasa
dNTP	Deoxinucleòsid trifosfat
DO	Densitat òptica
EBV	<i>Epstein Barr Virus</i>

ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
EDTA	Àcid etilendiaminotetracètic
EPR (<i>RPE</i>)	Epiteli pigmentari de la retina
ERG	Electroretinografia
ESE	<i>Exonic Splicing Enhancer</i>
ESS	<i>Exonic Splicing Silencer</i>
FBS	<i>Foetal Bovine Serum</i> (Sèrum boví fetal)
FCS	<i>Foetal Calf Serum</i> (Sèrum de vedella fetal)
FSCN2	<i>Retinal fascin</i>
g	Acceleració gravitatòria
G	Guanina
GC	Guanilat Ciclasa
GC-clamp	Seqüència abraçadora rica en nucleòtids GC
GMPc	Guanosina –3',5'-monofosfat cíclic
GTP	Guanosina-5'-trifosfat
GTPasa	Enzim que hidrolitza GTP
GUCA1B	<i>Guanylate Cyclase Activator 1B</i>
HEPES	<i>N-[2 hydroxyetil] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]</i>
IMPDH1	<i>Inosine Monophosphate Dehydrogenase 1</i>
ISCEV	<i>International Standardization Committee for Electrophysiology of the Vision</i>
ISE	<i>Intronic Splicing Enhancer</i>
ISS	<i>Intronic Splicing Silencer</i>
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
LB	<i>Luria-Bertrani</i>
MAP	<i>Microtubule-associated protein</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>

mRNA	RNA missatger
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMD	<i>Nonsense-Mediated Decay</i>
NRL	<i>Neural Retina Leucine-zipper</i>
OligodT	Oligonucleòtid de T
OMIM	<i>Online Mendelian Human Disease</i>
p/v	Pes per volum
PANTHER	<i>Protein Analysis Through Evolutionary Relationships</i>
PAP-1	<i>Pim-1 Associated Protein 1</i>
pb (bp)	Parell de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacció en cadena de la polimerasa)
poliA	Cua de poliadenina
pre-mRNA	Pre-RNA missatger
PRPF3	<i>PRP3 Pre-mRNA Processing Factor 3 homolog (yeast)</i>
PRPF31	<i>PRP31 Pre-mRNA Processing Factor 31 homolog (yeast)</i>
PRPF8	<i>PRP8 Pre-mRNA Processing Factor 8 homolog (yeast)</i>
PSA	Persulfat amònic
PTC	<i>Premature Termination Codon</i>
r.p.m.	Revolucions per minut
RDS	<i>Retinal Degeneration Slow</i>
RHO	<i>Rhodopsin (opsin 2, rod pigment)</i>
RNA	Àcid ribonucleic
RNAi	RNA d'interferència
RNase/RNasa	Ribonucleasa
ROM1	<i>Rod Outer segment Membrane protein 1</i>
RP	Retinosi Pigmentària

RP1	<i>Retinitis Pigmentosa 1</i>
RPAD	Retinosi Pigmentària Autosòmica Dominant
RPAR	Retinosi Pigmentària Autosòmica Recessiva
RPLX	Retinosi Pigmentària Lligada al cromosoma X
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-PCR</i> (Transcripció inversa-PCR)
SEMA4A	<i>Semaphorin 4A</i>
SMN	<i>Survival of Motor Neuron 1</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
snRNA	<i>Small nuclear ribonucleic acid</i>
snRNP	<i>Small nuclear ribonucleoprotein</i>
SRP	<i>Simplex (sporadic) Retinitis Pigmentosa</i> (Retinosi Pigmentària esporàdica)
STGD	<i>Stargardt disease</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
T	Timina
TAE	Tris-Acetata-EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametilendiamina
U	Unitats ó uracil (depenent del context)
UV	Ultraviolat
VIS	Visible
WT	<i>Wild-type</i>
XMP	Xantosina monofosfat

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Secció sagital vertical de l'ull humà adult.....	3
Figura 2. Capes de la retina.....	4
Figura 3. Esquema dels fotoreceptors: bastó i con.....	5
Figura 4. Cascada de fototransducció als bastons.....	7
Figura 5. Visió d'un individu sa i d'un pacient amb RP.....	12
Figura 6. Fons d'ull típic d'un pacient afectat de RP.....	12
Figura 7. Distribució dels gens associats a RPAD.....	18
Figura 8. Localització del procés de <i>splicing</i> del pre-mRNA en una cèl·lula eucariota.....	23
Figura 9. Senyals de <i>splicing</i> clàssics i auxiliars.....	25
Figura 10. Processament del RNA transcrit primari mitjançant l' <i>spliceosoma</i>	27
Figura 11. El cicle de <i>splicing</i>	29
Figura 12. Estructura del gen <i>PRPF31</i> i de la proteïna que codifica.....	36
Figura 13. Paper de l'hPrp31 en el processament del pre-mRNA.....	38
Figura 14. Estructura del gen <i>PRPF3</i> i de la proteïna que codifica.....	41
Figura 15. Paper de l'hPrp3 en el processament del pre-mRNA.....	42
Figura 16. Estructura del gen <i>PRPF8</i> i de la proteïna que codifica.....	44
Figura 17. Diagrama esquemàtic que mostra l'ensamblatge i el reciclatge dels components de l' <i>spliceosoma</i> respecte a Prp8.....	46
Figura 18. Estratègia seguida per a l'obtenció dels plàsmids recombinants.....	82
Figura 19. "Minigen" <i>RHOSPL2-4</i>	84
Figura 20. "Minigen" <i>RHOSPL3-5</i>	85
Figura 21. Vector d'expressió pCI-neo.....	88
Figura 22. Síntesi de la primera cadena de cDNA per a una RT-PCR de dos passos.....	114
Figura 23. Estudi genètic de la família RPAD S240.....	133
Figura 24. Estudi genètic de la família RPAD M637.....	133
Figura 25. Estudi genètic de la família RPAD M368.....	134
Figura 26. Estudi genètic de la família RPAD M618.....	134
Figura 27. Estudi genètic de la família RPAD M323.....	135
Figura 28. Estudi genètic de la família RPAD V17.....	135
Figura 29. Estudi genètic de la família RPAD SJD1.....	136
Figura 30. Estudi genètic de la família RPAD V541.....	136
Figura 31. Estudi genètic de la família RPAD S269.....	137

Figura 32. Fons d'ulls de portadors de mutació als gens <i>PRPF</i>	140
Figura 33. Diagrama dels minigens construïts per a l'expressió en línies cel·lulars eucariotes.	147
Figura 34. Processament dels minigens <i>RHOSPL2-4 WT</i> i <i>RHOSPL-A3811G</i> en cèl·lules COS-7.	149
Figura 35. Processament dels minigens <i>RHOSPL3-5 WT</i> i <i>RHOSPL-G5167T</i> en cèl·lules COS-7.....	150
Figura 36. Processament dels minigens <i>RHOSPL2-4 WT</i> i <i>RHOSPL-A3811G</i> en les línies limfoblastoides humanes CAR0001 i CAR0003.....	154
Figura 37. Processament dels minigens <i>RHOSPL3-5 WT</i> i <i>RHOSPL-G5167T</i> en les línies limfoblastoides humanes CAR0001 i CAR0003.....	155
Figura 38. Pics de fusió del <i>PRPF8</i> total.	160
Figura 39. Corba d'amplificació del <i>PRPF8</i> total.....	160
Figura 40. Pics de fusió del <i>PRPF8</i> salvatge.	161
Figura 41. Corba d'amplificació del <i>PRPF8</i> salvatge.	161
Figura 42. Classificació del total de gens induïts (n=157) segons la seva funció molecular	166
Figura 43. Classificació del total de gens reprimits (n=244) segons la seva funció molecular	167
Figura 44. Classificació del total de gens induïts (n=157) segons el procés biològic.....	168
Figura 44. Classificació del total de gens induïts (n=157) segons el procés biològic.....	168
Figura 45. Classificació del total de gens reprimits (n=244) segons el procés biològic.....	169

ÍNDIX DE TAULES

Taula I. Gens associats a retinosi pigmentària autosòmica dominant	17
Taula II. Papers funcionals de cadascuna de les snRNPs	28
Taula III. Gens analitzats en aquesta Tesi Doctoral.	66
Taula IV. Encebadors utilitzats per a cadascun dels fragments analitzats i mida dels fragments obtinguts.....	70
Taula V. Rang de separació en gels que contenen diferents quantitats d'agarosa	71
Taula VI. Gradients i temperatures utilitzades en el cribatge de mutacions per DGGE en els gens <i>PRPF</i> estudiats.....	77
Taula VII. Encebadors utilitzats per a amplificar els fragments <i>RHOSPL2-4</i> (salvatge i mutat) i <i>RHOSPL3-5</i> (salvatge i mutat).....	87
Taula VIII. Encebadors utilitzats en la quantificació de l'expressió gènica del l'al·lel salvatge i l'al·lel mutat de <i>PRPF8</i>	120
Taula IX. Funcions moleculars i processos biològics identificats per als gens en l' "Applied Biosystems Human Genome Survey <i>Microarray</i> V2.0"	122
Taula X. Mutacions detectades als gens <i>PRPF</i> en els pacients estudiats.	131
Taula XI. Característiques clíniques de les famílies RPAD portadores de mutació al gen <i>PRPF8</i>	138
Taula XII. Característiques clíniques de les famílies RPAD portadores de mutació al gen <i>PRPF31</i>	139
Taula XIII. Processament del mRNA dels minigens <i>RHO</i> obtingut en les transfeccions sobre la línia cel·lular COS-7.....	151
Taula XIV. Processament del mRNA dels minigens <i>RHO</i> en les transfeccions sobre les línies cel·lulars limfoblastoides humanes utilitzades.....	156
Taula XV. Relacions al·lèliques observades en les tres línies cel·lulars analitzades.....	162

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	3
1. 1. Morfologia i fisiologia de la retina: visió general.....	3
1. 2. Distròfies hereditàries de la retina.....	9
1. 2. 1. Retinosi pigmentària.....	10
1. 2. 2. Genètica molecular de la RPAD	16
1. 3. Processament (<i>splicing</i>) del pre-mRNA.....	23
1. 3. 1. Defectes al mecanisme de <i>splicing</i>	29
1. 4. Estratègies per a analitzar l'expressió gènica.....	47
1. 4. 1. Mesura de l'expressió gènica mitjançant PCR en temps real.....	48
1. 4. 2. Mesura de l'expressió gènica utilitzant <i>microarrays</i> de DNA.....	49
2. OBJECTIUS	53
3. MATERIAL I MÈTODES	57
3. 1. Equipament general	57
3. 1. 1. Instruments i equips	57
3. 1. 2. Material de laboratori.....	58
3. 1. 3. Material fungible	59
3. 2. Pacients i famílies estudiades	61
3. 3. Estudi clínic dels pacients	62
3. 3. 1. Examen oftalmològic	62
3. 3. 2. Examen electrofisiològic.....	65
3. 4. Estudi genètic molecular	66
3. 4. 1. Extracció de DNA genòmic a partir de sang perifèrica	67
3. 4. 2. Quantificació d'àcids nucleics	68
3. 4. 3. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	69

3. 4. 4. Electroforesi en gel d'agarosa.....	71
3. 4. 5. Purificació de producte de PCR	73
3. 4. 6. Electroforesi en gel amb gradient desnaturalitzant (DGGE).....	75
3. 4. 7. Seqüenciació automàtica dels productes de PCR.....	78
3. 4. 8. Clonació de fragments de PCR per a seqüenciació	80
3. 5. Construcció de plàsmids recombinants portadors de "minigens" per a l'estudi <i>in vitro</i> de mutacions de <i>splicing</i>	82
3. 5. 1. Selecció dels inserts.....	84
3. 5. 2. Vector plasmídic utilitzat.....	88
3. 5. 3. Clonació dels inserts dins del vector.....	89
3. 5. 4. Obtenció de DNA plasmídic	92
3. 6. Cultiu de línies cel·lulars eucariotes.....	96
3. 6. 1. Descripció i característiques de les línies cel·lulars utilitzades.....	96
3. 6. 2. Activació de línies cel·lulars congelades.....	99
3. 6. 3. Subcultiu de línies cel·lulars adherents.....	100
3. 6. 4. Subcultiu de línies cel·lulars en suspensió.....	102
3. 6. 5. Quantificació cel·lular	103
3. 6. 6. Criopreservació de línies cel·lulars	105
3. 7. Expressió transitòria <i>in vitro</i> en cultius cel·lulars eucariotes.....	107
3. 7. 1. Transfecció de la línia cel·lular COS-7.....	107
3. 7. 2. Electroporació de línies cel·lulars limfoblastoides humanes.....	109
3. 7. 3. Extracció de RNA a partir de cèl·lules adherents i cèl·lules en suspensió	111
3. 7. 4. Síntesi de la primera cadena de cDNA a partir de RNA.....	114
3. 7. 5. RT-PCR en un sol pas (" <i>One-step RT-PCR</i> ").....	117
3. 8. Mesura de l'expressió gènica.....	119
3. 8. 1. Quantificació de l'expressió gènica mitjançant PCR en temps real.....	119
3. 8. 2. Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant <i>microarrays</i> de DNA.....	122

4. RESULTATS	131
4.1. Cribatge de mutacions en els gens <i>PRPF31</i> , <i>PRPF8</i> i <i>PRPF3</i> en pacients afectats de RPAD.....	131
4. 2. Clíniques dels pacients amb mutació als gens <i>PRPF</i>	138
4. 3. Efecte de mutacions en <i>cis</i> : predicció informàtica de l'efecte de mutacions en senyals de <i>splicing</i> en el gen de la rodopsina	141
4. 4. Minigens <i>RHOSPL2-4</i> i <i>RHOSPL3-5</i> salvatges i mutants per a la transfecció en línies cel·lulars eucariotes.....	147
4. 5. Expressió <i>in vitro</i> de les mutacions de <i>splicing</i> en <i>cis</i> de la rodopsina en la línia cel·lular COS-7	148
4. 6. Expressió <i>in vitro</i> de les mutacions de <i>splicing</i> en <i>cis</i> de la rodopsina en línies cel·lulars limfoblastoides mutants per al <i>PRPF8</i>	153
4. 7. Quantificació de l'expressió de la mutació 6974-6994del21bp (V2325fsX2329) al gen <i>PRPF8</i> en la família ADRP SJD1.....	158
5. DISCUSSIÓ	173
6. CONCLUSIONS	193
7. REFERÈNCIES	197
8. PUBLICACIONS	215

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1. 1. Morfologia i fisiologia de la retina: visió general

La visió, el més fonamental dels nostres sentits, és una facultat per la qual, a través de l'ull, òrgan visual, es percep el món exterior. Molts organismes simples tenen receptors lluminosos capaços de reaccionar enfront determinats moviments i ombres, però la verdadera visió es compon per la formació d'imatges en el cervell. (<http://webvision.med.utah.edu>)

Tot i que totes les parts de l'ull són importants per a percebre una bona imatge, la capa més vital per a la visió és la retina. La retina és, en essència, una peça de teixit cerebral que obté estimulació directa a partir de les llums i les imatges de l'exterior.

Des d'un punt de vista morfològic, l'aparell visual es compon del globus ocular, estructures annexes (parpelles, conjuntiva, aparell llagimal) i vies òptiques.

El globus ocular és una esfera la paret de la qual està formada per tres capes concèntriques superposades (Figura 1):

- Capa fibrosa externa, compresa per l'*escleròtica* i la *còrnia*
- Capa vascular mitja, compresa per la *coroide*, el *cos ciliar* i l'*iris*
- Capa nerviosa interna o *retina*

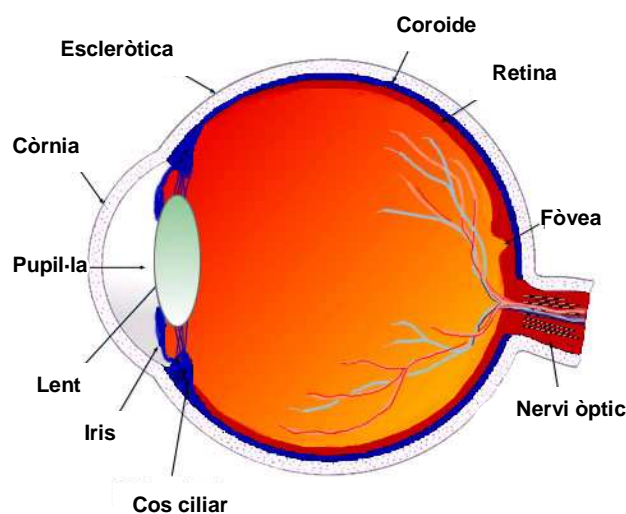


Figura 1. Secció sagital vertical de l'ull humà adult. [De: John Moran Eye Center. University of UTAH]

La retina és una estructura de set capes (Figura 2) implicada en la transducció de senyals. El recorregut del senyal a través de la retina és el següent:

- La llum entra primer des de la capa de cèl·lules ganglionars i ha de penetrar tots els tipus cel·lulars abans d'arribar als fotoreceptors cons i bastons.
- Els segments externs dels cons i bastons transdueixen la llum i envien el senyal a través dels cossos cel·lulars de la capa nuclear externa i fora dels seus axons.
- A la capa plexiforme externa, els axons dels fotoreceptors contacten les dendrites de les cèl·lules bipolars i horitzontals. Les cèl·lules horitzontals són interneurons que ajuden en el processament del senyal.
- Les cèl·lules bipolars en la capa nuclear interna processen l'entrada des dels fotoreceptors i les cèl·lules horitzontals, i transmeten el senyal cap als seus axons.
- En la capa plexiforme interna, els axons bipolars contacten les dendrites de les cèl·lules ganglionars i amacrines, una altra classe d'interneurons.
- Les cèl·lules ganglionars envien els seus axons a través de la capa de fibra òptica cap al disc òptic per tal de fabricar el nervi òptic.

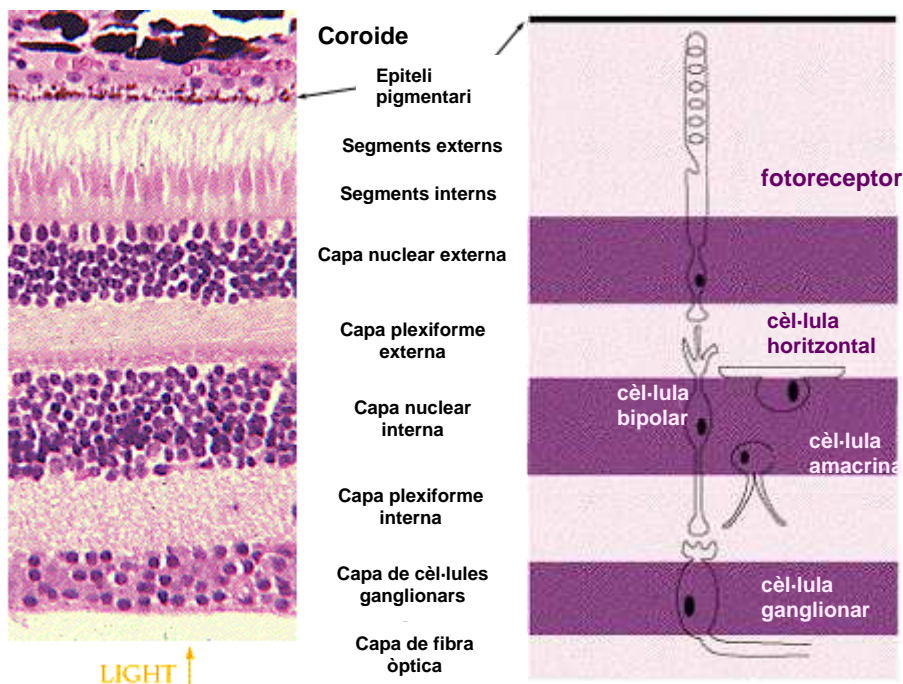


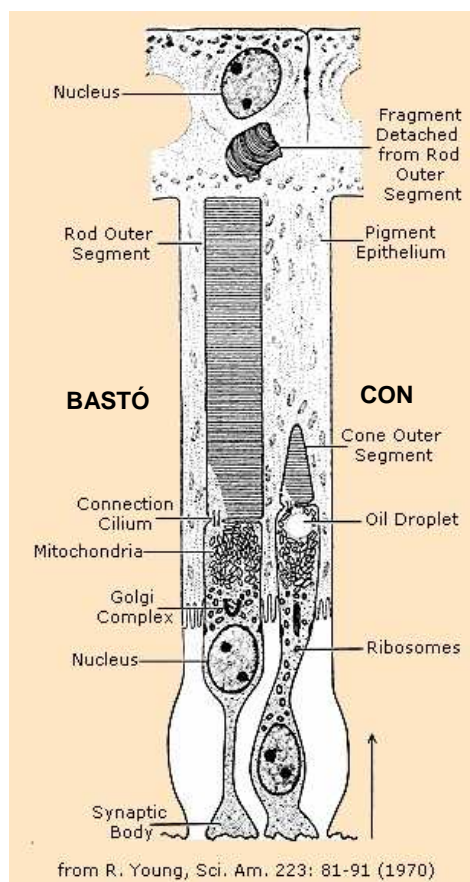
Figura 2. Capes de la retina. Esquema de la distribució de les diferents capes de la retina que travessa la llum quan incideix a l'ull. [De: <http://thalamus.wustl.edu/course/eyeret.html>]

La funció de la retina és capturar la llum externa i transformar-la en estímul visual. Ambdues tasques són molt complexes i no enteses completament. Tot i la seva estructura compacta i mida relativament petita, la morfologia de la retina neural és extraordinàriament complicada.

La captació d'un fotó de llum i la seva conversió en un senyal elèctric s'anomena fototransducció. Té lloc dins dels segments externs de les cèl·lules fotoreceptores: els cons i bastons.

Els fotoreceptors tenen una morfologia comuna (Figura 3) (Ruiz et al. 2001). Anatòmicament, el fotoreceptor ha de considerar-se com la primera neurona de la cascada visual. La disposició dels diferents segments que conformen l'estructura té una important correlació funcional.

El fotoreceptor és la cèl·lula més abundant de la retina. S'estima que cada ull conté al



voltant de 125 milions de fotoreceptors, bàsicament dividits en cons i bastons. A la retina humana existeixen al voltant de 120 milions de bastons i al voltant de 3-10 milions de cons. El segment extern del fotoreceptor és el pol sensorial de la cèl·lula i es troba en íntima relació amb l'epiteli pigmentari, tant des del punt de vista anatòmic com funcional. En aquest segment es verifica la cascada de la fotorecepció (fototransducció). El segment extern és una prolongació cel·lular que adopta la forma de con o bastó; aquesta porció cel·lular és la que diferencia dos tipus principals de cèl·lules fotoreceptores.

Figura 3. Esquema dels fotoreceptors: bastó i con.

Ultraestructuralment, el fotoreceptor està constituït per microvesícules formant uns 1000 discs apilats envoltats per la membrana plasmàtica. Aquestes estructures no són estàtiques, sinó que semblen estar sotmeses a un procés de reciclatge continu. Els discs van migrant cap a l'extremitat del fotoreceptor de manera progressiva i finalment són fagocitats i digerits per l'epiteli pigmentari de la retina (EPR). Aquest procés de migració dura entre 9 i 12 dies i l'EPR fagocita al voltant del 10% de cada segment extern diàriament. Aquest procés suggereix un altíssim requeriment metabòlic a la cèl·lula fotoreceptora.

Les molècules de fotopigment, que constitueixen la base bioquímica de la fototransducció, resideixen en les membranes dels discs del segment extern dels fotoreceptors. Als bastons, la rodopsina és el principal fotopigment, i té el seu màxim d'absorció per als fotons a una longitud d'ona de 500 nm (blau-verd). Els pigments dels cons es refereixen col·lectivament com a iodopsines. Es distingeixen tres tipus, amb pics d'absorció en el blau, verd i groc. Cada con normalment conté només una d'aquestes tres varietats de molècules de pigment. Diverses combinacions estimuladores d'aquests tres tipus de pigments són responsables de la percepció de la visió en color.

La distribució i tipologia dels fotoreceptors varia enormement depenent de la regió de la retina en la que ens trobem. Així, la regió que conté major densitat cel·lular és la fòvea i els tipus cel·lulars que hi apareixen són el con verd i el con vermell de forma gairebé exclusiva. Segons ens allunyem de la fòvea la densitat de fotoreceptors disminueix ràpidament. A la retina perifèrica, el bastó és el fotoreceptor predominant.

La cascada de fototransducció (Figura 4) en els fotoreceptors dels vertebrats ha servit com a sistema de referència on han estat descoberts i elaborats molts dels principis moleculars bàsics de la transducció de senyals desencadenats per receptors acoblats a proteïnes G.

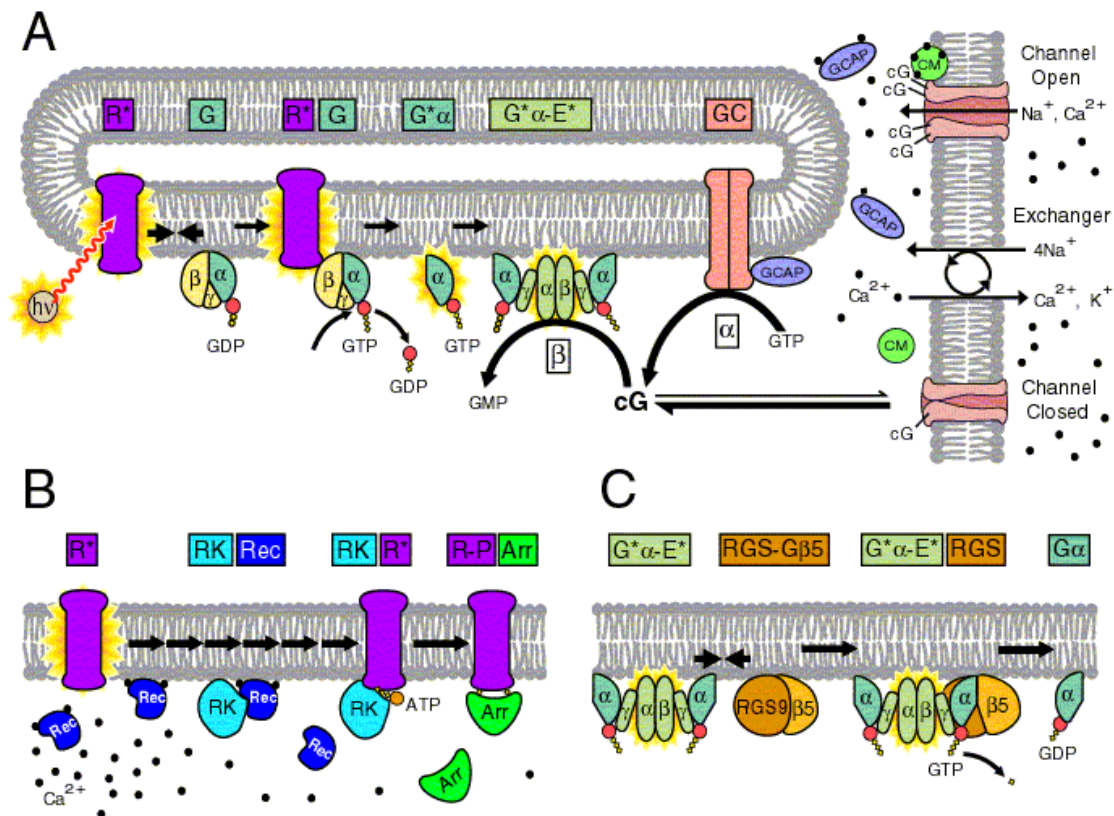


Figura 4. Cascada de fototransducció als bastons. A) Passos d'activació de la cascada. B) Inactivació de la rodopsina activada (R^*). C) Inactivació de $G^*\alpha-E^*$. [De: Pugh et al. Molecular Mechanisms of Vertebrate Photoreceptor Light Adaptation. *Curr Opin Neurobiol.* 1999 Aug;9(4):410-8. Review]

La visió comença amb l'excitació del receptor acoblat a proteïna G, la rodopsina (R) (Figura 4A), que porta a l'activació de múltiples molècules de la proteïna G transducina (G). La transducina activada estimula l'activitat del seu efector, la GMPc fosfodiesterasa (E), que porta a una disminució en el GMPc cel·lular, al tancament dels canals dirigits per GMPc de la membrana plasmàtica i finalment al desenvolupament del senyal elèctric conegut com a fotoresposta. La inactivació de la fototransducció és necessària per a evitar que els fotoreceptors se saturin quan estan exposats a

il·luminació constant. La resolució temporal de la visió també requereix una ràpida inactivació dels components de la cascada de fototransducció per tal que la cèl·lula pugui respondre ràpidament al proper event llumínic. La inactivació de la rodopsina (Figura 4B) s'aconsegueix mitjançant la fosforilació per la rodopsina quinasa (RK) seguida de la unió a l'arrestina (Arr) per evitar completament qualsevol activació posterior de la transducina. La terminació de la hidròlisi del GMPc s'aconsegueix mitjançant l'activitat GTPasa de la transducina, una reacció accelerada enormement per la proteïna activadora de GTPasa, RGS9 (Figura 4C). Finalment, la restauració del GMPc cap al seu estat de fosc per re-obrir els canals dirigits per GMPc és portada a terme per la guanilat ciclasa (GC).

1. 2. Distròfies hereditàries de la retina

Les distròfies hereditàries de la retina són un conjunt de malalties degeneratives i, en general, progressives, que provoquen l'afectació de les cèl·lules fotoreceptores. Aquestes malalties tenen una incidència d'1/4500 individus. Els trets més rellevants d'aquestes malalties són el seu caràcter hereditari, la seva evolució progressiva i el no tenir, en l'actualitat, un tractament ni paliatiu ni curatiu. Tot això condueix a la pèrdua parcial o total de la visió (Rivolta et al., 2002).

L'origen molecular d'aquestes malalties és la presència de mutacions en gens, que es poden transmetre de generació en generació. Els mecanismes moleculars d'aquestes mutacions encara no estan ben definits. En general, aquestes mutacions es presenten, majoritàriament, en gens relacionats amb l'estructura, desenvolupament i funció de la retina i que generalment s'expressen específicament en ella. Tanmateix, darrerament s'ha descobert que mutacions en alguns gens amb expressió ubíqua (McKie et al., 2001; Vithana et al., 2001; Chakarova et al., 2002), o fins i tot sense expressió a la retina (Rebello et al., 2004) provoquen una patologia específica de retina.

Tot i que les distròfies retiniques solen classificar-se segons algun d'aquests tres criteris: símptomes clínics, fenotip electroretinogràfic o patró hereditari (Phelan & Bok, 2000), d'un mode general es poden dividir en:

- **Formes perifèriques**, en les quals s'afecten inicialment i predominantment els bastons de la retina, i un exemple de les quals és la **retinosi pigmentària (RP)**.
- **Formes centrals**, amb degeneració dels cons en el seu inici, podent afectar-se secundàriament o no els bastons (distròfies de cons-bastons, CRD). Entre les distròfies de retina centrals es troben la malaltia de Stargardt (STGD), les distròfies maculars (MD), les distròfies de cons (CD), etc.

1. 2. 1. Retinosi pigmentària

La retinosi pigmentària (OMIM #26800) comprèn un grup hereditari de desordres que provoquen un dany visual sever en gairebé 1.5 milions de pacients arreu del món (Berson et al., 1996). La definició de "Retinosi Pigmentària" (RP) és imprecisa i àmplia per a incloure un grup de malalties hereditàries, produïdes per mutacions en diversos gens, i no una entitat clínica única com es pensava antigament. Totes aquestes malalties tenen en comú la pèrdua primària i progressiva dels fotoreceptors de la retina, i en la majoria dels casos, secundàriament, l'alteració d'altres cèl·lules i capes retinianes.

A més de les formes típiques de RP, hi ha un gran nombre de malalties relacionades. Aquestes poden ser similars en algun dels criteris diagnòstics mencionats amb anterioritat (síntomes clínics, fenotip electroretinogràfic o patró hereditari). També existeixen formes sindròmiques de RP, en les quals la RP està present com a component d'un desordre multisistèmic, ja que a part d'estar afectat l'ull també es poden trobar afectats altres òrgans.

Els primers efectes de la malaltia tenen lloc als fotoreceptors bastons, les cèl·lules fotosensibles de la retina, responsables de la visió en condicions de llum tènue. Quan es produeix la degeneració progressiva dels bastons, els pacients experimenten problemes de visió nocturna i desenvolupen una visió en túnel com a conseqüència de la degeneració de la retina perifèrica rica en bastons. La mort dels fotoreceptors bastons té un efecte secundari i perjudicial en els fotoreceptors cons, que són responsables de la visió diürna, i aquests comencen a morir, donant lloc eventualment a la pèrdua de visió central. La progressiva desaparició dels fotoreceptors també provoca altres símptomes patològics a la retina, que inclouen atenuació de la vascularització retiniana i una acumulació de dipòsits de pigment intra-retinians, fet que dóna nom a la malaltia (Hims et al., 2003; Kalloniatis & Fletcher, 2004).

La RP presenta una gran heterogeneïtat clínica. Podem trobar diferents fenotips amb una aparició més o menys primerenca, una evolució més o menys lenta i diferents graus de gravetat.

Per a establir un diagnòstic clínic precís és necessari realitzar una sèrie de proves oftalmològiques. Normalment s'observa fons d'ull (per detectar la presència de pigments a la perifèria) i es fa un estudi de l'agudesia visual (AV) i del camp visual (CV). Com a prova electrofisiològica, es fa l'enregistrament de l'electroretinograma (ERG), que mesura la resposta dels fotoreceptors a estímuls lluminosos. Una vegada s'ha diagnosticat la malaltia RP al pacient, aquest pot sotmetre's a un estudi genètic per poder determinar l'origen molecular de la malaltia.

Els criteris diagnòstics de RP es van establir internacionalment al 1982 (Marmor i cols., 1983) i són els següents:

1. Bilateralitat (afectació dels dos ulls)
2. Pèrdua de visió perifèrica
3. Disfunció de bastons:
 - a) Adaptació a la foscor: llindar final de bastons elevat
 - b) Electroretinograma: resposta de bastons d'amplitud reduïda i augment de temps implícit o no detectable
4. Pèrdua progressiva de la funció dels fotoreceptors

La forma clínica de presentació clàssica pot aparèixer en qualsevol dels subtipus genètics, tot i que entre ells pugui haver-hi diferències en l'edat de presentació, gravetat dels símptomes i signes, i rapidesa de l'evolució. Les manifestacions clíniques de la RP reflecteixen la pèrdua progressiva de la funció dels fotoreceptors començant pels bastons, ja que la forma més freqüent de presentació és la forma bastons-cons.

Això es tradueix en una mala visió en ambients de baixa il·luminació, dificultat d'adaptació als canvis d'intensitat lluminosa i símptomes de disminució de camp visual.

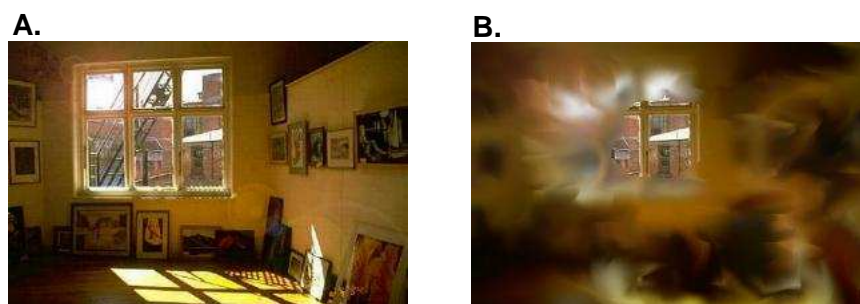


Figura 5. Visió d'un individu sa i d'un pacient amb RP. En aquestes dues imatges podem veure la visió normal d'una persona sana (A) en comparació amb la visió d'un pacient afectat de RP (B), on es pot apreciar la típica visió en túnel, junt amb una pèrdua de l'agudesesa visual.

En l'exploració clínica s'observa una reducció del camp visual, que dona lloc a la "visió en túnel" (Figura 5B), una corba d'adaptació a la foscor patològica i un electroretinograma escotòpic (amb llum feble) alterat. L'exploració del fons d'ull (Figura 6) mostra pal·lidesa papil·lar, estretament de vasos i generalment aparició de dipòsits de pigment en forma d'osteoclasts en mitja perifèria. Amb el temps s'evidencia també l'alteració dels cons i el pacient presenta disminució de visió, alteració en la percepció dels colors, l'electroretinograma fotòpic (amb llum intensa) es fa patològic i l'agudesesa visual empitjora. A més el pacient sovint desenvolupa cataractes subcapsul·lars posteriors i amb freqüència maculopaties.

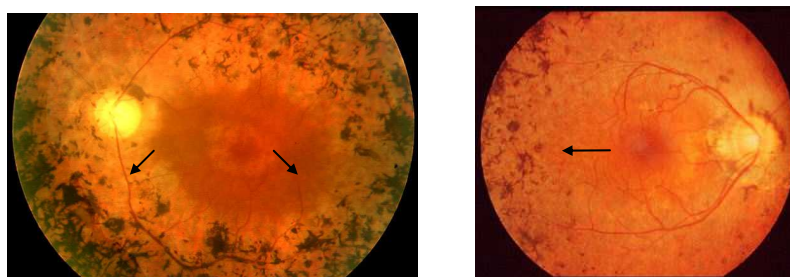


Figura 6. Fons d'ull típic d'un pacient afectat de RP. En les dues imatges podem observar l'acumulació de pigment en forma d'espícules (assenyalat amb les fletxes) en la perifèria de l'ull.

L'edat d'inici de la malaltia és variable, segons el tipus d'herència. Les formes lligades al sexe i les formes recessives solen ser d'inici més precoç, apareixent els símptomes

a la primera infància. Les formes dominants són més variables, solen manifestar-se a la segona dècada i en ocasions de forma tardana apareixen per sobre dels 40 anys.

La RP presenta també una elevada heterogeneïtat genètica. Aquesta es reflecteix en el fet de que diferents gens o loci són responsables de la mateixa malaltia i de que diferents mutacions al mateix gen poden desencadenar el mateix procés degeneratiu. Les primeres classificacions genètiques de la RP van derivar principalment dels patrons d'herència: autosòmica dominant (RPAD), autosòmica recessiva (RPAR), lligada al cromosoma X (RPLX), mitocondrial (Millán et al., 1994) i digènica (Kajiwara et al., 1994). Tot i així, també apareixen casos esporàdics (SRP) i casos no classificats degut a la poca informació del pacient de la qual es disposa. Les característiques de cada tipus d'herència es mostren breument a continuació:

a) Herència autosòmica dominant

Aquest tipus d'herència es caracteritza perquè el gen responsable de la patologia (situat als cromosomes autosomes) presenta una mutació en un dels dos al·lels. Un dels progenitors del pacient està afectat. En aquest tipus de patró d'herència, els afectats poden ser tant homes com dones i el risc de transmissió és del 50% per a cada fill.

b) Herència autosòmica recessiva

Els progenitors són portadors sans de la malaltia (presenten un al·lel normal i l'altre mutat), i aquesta es manifesta quan algun dels fills (home o dona) hereta el gen anòmal tant del pare com de la mare. La malaltia s'hereta per ambdues branques familiars. El risc de transmissió és d'un 25% per a cada fill. La freqüència d'aquest tipus d'herència augmenta en les famílies amb consanguinitat.

c) Herència lligada al cromosoma X

La mutació causant de la RP es produeix en un gen contingut al cromosoma X. En aquest tipus de patró, els homes estan afectats (amb un sol cromosoma X) mentre que les dones poden ser portadores d'un al·lel normal i l'altre mutat. Les dones

portadores de mutacions al cromosoma X associades a RP, solen ser asimptomàtiques per a RP. Tanmateix, en alguns casos es detecta una forta miopia, falta de bilateralitat i de vegades lleu expressió de RP en edats avançades. Aquest tipus d'herència es diferencia de la transmissió familiar dels casos dominants, en l'absència de transmissió d'home a home.

d) Altres tipus d'herència no-mendelianes

d.1) Herència digènica

És una condició gènica provocada per la interacció de dues mutacions recessives en dos gens que codifiquen proteïnes que estan funcionalment connectades. S'ha descrit en famílies dobles heterozigotes amb mutacions en dos gens diferents (*RDS*-periferina i *ROM1*) (Kajiwara et al., 1994)

d.2) Herència mitocondrial

S'ha descrit una herència mitocondrial, però acompanyada d'altres símptomes clínics a més dels clàssics de RP. El DNA contingut als mitocondris presenta una herència característica i típicament materna.

e) Casos aïllats

Denominem casos aïllats o esporàdics (SRP) a aquells casos que apareixen de forma aïllada sense que es puguin establir antecedents familiars. Els casos aïllats poden derivar de dones lleugerament afectades que podrien ser en realitat portadores de RP lligada al cromosoma X. Els casos esporàdics són aquells en els quals han aparegut mutacions "*de novo*" per primera vegada a la família en els casos dominants o una segona mutació *de novo* en els portadors recessius.

Cadascun dels tipus d'herència mencionats porta associat un grup de gens diferents responsables de la malaltia. Aquest fet implica una elevada complexitat en l'estudi d'aquesta malaltia. És per això que a Espanya es va crear l'any 1991 el "Grupo Multicéntrico de Investigación sobre Retinopatías Hereditarias" en el qual estan integrats sis grups (o nodes) d'investigació de diferents ciutats d'Espanya:

Node 1. Fundación Jiménez Díaz (Madrid)

Node 2. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona)

Node 3. Hospital Virgen del Rocío (Sevilla)

Node 4. Hospital de Terrassa (Terrassa, Barcelona)

Node 5. Hospital La Fe (València)

Node 6. Universitat de Vigo (Vigo)

Al seu torn, el “Grupo Multicéntrico de Investigación sobre Retinopatías Hereditarias” s’ha integrat dins del grup de xarxes temàtiques amb la denominació EsRetNet.

L’Hospital de Terrassa s’encarrega d’estudiar els aspectes genètics moleculars de la retinosi pigmentària autosòmica dominant (RPAD).

Al llarg d’aquests darrers anys l’aplicació dels últims avenços tècnics en genètica molecular ha estat de gran ajut en l’estudi de la retinosi pigmentària i ha permès entendre millor els mecanismes associats a aquesta patologia. Les estratègies per a abordar l’estudi de la retinosi pigmentària són molt variades, ja que en alguns casos podem analitzar directament gens candidats que codifiquen proteïnes que d’alguna manera estan involucrades en el procés bioquímic de la visió, o formen part de l’estructura dels fotoreceptors, etc.; i altres vegades, els estudis indirectes, mitjançant marcadors polimòrfics (anàlisi de lligament), ens poden ajudar a la localització de seqüències que presumiblement contenen un gen involucrat en la patologia. Amb aquest tipus d’anàlisi s’han pogut identificar gens amb expressió sistèmica que només provoquen patologia a la retina, com els factors de *splicing* en els quals centrem aquest treball.

1. 2. 2. Genètica molecular de la RPAD

S'han associat molts gens a la RP, i aquesta presenta extrema heterogeneïtat pel que fa a la seva severitat i tipus d'herència, com ja s'ha comentat anteriorment. Tot i que s'han identificat més de 30 gens d'un total de 47 *loci* trobats, hi ha hagut avenços realment importants pel que fa a l'estudi de la retinosi pigmentària autosòmica dominant (RPAD) (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/home.htm>). Fins a l'actualitat, s'han lligat quinze *loci* a la RPAD i indubtablement hi ha més loci que encara no s'han identificat. Per a cadascuna de les formes conegudes de la malaltia, s'ha pogut identificar el gen i al menys se li ha assignat una funció putativa a les proteïnes codificades. Fins l'any 2001, tots els gens de RPAD que havien estat caracteritzats codificaven proteïnes per a les quals hi havia una clara correlació entre la funció de la proteïna i la malaltia retiniana. Aquestes inclouen proteïnes importants en la via de la fototransducció, en l'estructura cel·lular i en el control transcripcional dels gens dels fotoreceptors. Des de llavors, però, s'han identificat diversos gens addicionals per als quals la relació entre la funció i la malaltia ja no és tan intuïtiva. Tot i que aquests gens es presenten com a un gran repte per als investigadors que intenten entendre la seva implicació en la malaltia retiniana, hi ha hagut un progrés considerable en desxifrar la naturalesa precisa de la patologia de la malaltia a nivell molecular per a tots els gens RPAD identificats.

El conjunt de gens associats a RPAD està contingut en la Taula I:

Taula I. Gens associats a retinosi pigmentària autosòmica dominant

GEN	NOM PROTEÍNA CODIFICADA	LOCUS	FUNCIÓ PROTEÍNA	EXPRESSIÓ
CA4	Anhidrasa carbònica IV	17q22 (RP17)	Hidratació CO ₂ reversible	Coroide i sistèmica
CRX	"Cone-rod homeobox protein"	19q13.3	Factor de transcripció	Fotoreceptors
FSCN2	"Retinal fascin"	17q25	Empaquetament actina	Fotoreceptors
GUCA1B	"Guanilate cyclase activating protein"	6p21.1	Activació guanilat ciclases	Retina
IMPDH1	"Inosine monophosphate dehydrogenase type 1"	7q32.1 (RP10)	Síntesi nucleòtids guanina	Fotoreceptors i sistèmica
NRL	"Neural retina leucine zipper protein"	14q11.2 (RP27)	Factor de transcripció	Fotoreceptors
PAP-1	"Pim-1 associated protein 1"	7p14.3 (RP9)	<i>Splicing</i> pre-mRNA	Fotoreceptors i sistèmica
PRPF3	"PRP3 pre-mRNA processing factor 3 homologue"	1q21.2 (RP18)	<i>Splicing</i> pre-mRNA	Fotoreceptors i sistèmica
PRPF31	"PRP31 pre-mRNA processing factor 3 homologue"	19q13.4 (RP11)	<i>Splicing</i> pre-mRNA	Fotoreceptors i sistèmica
PRPF8	"PRP8 pre-mRNA processing factor 3 homologue"	17p13.3 (RP13)	<i>Splicing</i> pre-mRNA	Fotoreceptors i sistèmica
RDS	"Retinal degeneration slow protein"	6p21.1–cen (RP7)	Estructura discs	Fotoreceptors
RHO	Rodopsina	3q22.1(RP4)	Pigment fotosensible	Fotoreceptors
ROM1	"Retinal outer segment membrane protein 1"	11q12.3	Estructura discs	Fotoreceptors
RP1	"Retinitis pigmentosa RP1 protein"	8q11–q13 (RP1)	Estructura discs i axonema	Fotoreceptors
SEMA4A	"Semaphorin 4A"	1q22	Desenvolupament neuronal i/o resposta immune	EPR, cèls. ganglionars

Com es pot veure a la taula anterior, la majoria dels gens associats a RPAD s'expressen als fotoreceptors, tot i que hi ha alguns que ho fan de forma sistèmica, com són els factors de *splicing*. Sorprenentment, el gen CA4 no s'expressa en la

retina, sinó a la coroide. Hi ha alguns dels gens en els quals no s'ha pogut establir una clara correlació entre mutació i RP, com són *ROM-1*, *GUCA1B* i *SEMA4A* (éssent aquests dos últims els de més recent descobriment). La localització dels principals gens associats amb RPAD la trobem a la següent figura:

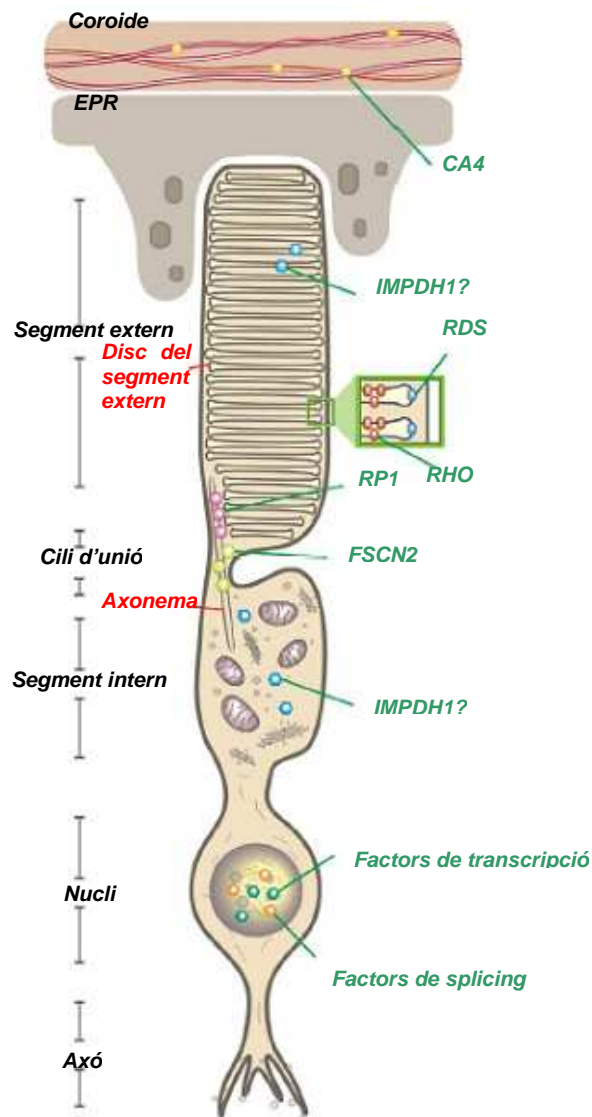


Figura 7. Distribució dels gens associats a RPAD. En aquesta imatge podem veure la localització dels diferents gens associats a RPAD a una cèl·lula fotorreceptora bastó, junt amb l'epiteli pigmentari de la retina (EPR) i la coroide. [De: Kennan A, Aherne A, Humphries P. Light in retinitis pigmentosa. *Trends Genet.* 2005 Feb;21(2):103-10. Review]

1. 2. 2. 1. Gens associats a RPAD amb expressió específica als fotoreceptors

Potser el gen menys sorprenentment associat a la degeneració de les cèl·lules bastons és la rodopsina, la proteïna d'absorció de llum que inicia la cascada de transducció visual. Les mutacions a la rodopsina justifiquen més d'un 25% de les RPAD i s'han identificat aproximadament unes 100 mutacions diferents al llarg del transcrit (Sohocki et al., 2001; Farrar et al., 2002).

A les RPAD, les mutacions de la rodopsina sembla ser que tenen un efecte de guany de funció de la proteïna resultant, això s'ha pogut evidenciar per la patologia retiniana observada en un model de ratolí portador d'una sola còpia funcional del gen de la rodopsina (Humphries et al., 1997).

D'una manera predecible, alguns dels gens RP codifiquen proteïnes que tenen papers principals en la formació i manteniment de l'estructura cel·lular del bastó. La periferina 2 (també coneguda com a *retinal degeneration slow, RDS*), una glicoproteïna transmembrana, va ser una de les primeres proteïnes associades amb RP (Farrar et al., 1991; Kajiwara et al., 1991). Les mutacions a *RDS* provoquen diversos fenotips retinians diferents que inclouen retinosi pigmentària autosòmica dominant, distròfia macular autosòmica dominant, distròfia macular vitel·lifforme en adults i una forma de RP digènica junt amb la proteïna codificada pel gen *ROM-1* (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/home.htm>).

Junt amb rodopsina i *RDS*, un altre gen on s'han trobat també moltes mutacions associades a RPAD és *RP1*, que és responsable d'un 6-10% dels casos (Guillonnet et al., 1999; Pierce et al., 1999; Sullivan et al., 1999; Liu et al., 2002, Gamundi et al., 2006). L'expressió del gen *RP1* està restringida als fotoreceptors, on la proteïna sintetitzada és localitzada a l'axonema (Liu et al., 2002). Estudis realitzats en ratolí amb disrupcions del gen han mostrat que el paper de la proteïna podria ser crucial en la morfogènesi dels fotoreceptors del segment extern (Gao et al., 2002). Estudis més recents han confirmat el fet, que ja se sospitava des de feia temps, de que *RP1* és una

proteïna associada als microtúbuls (*Microtubule-Associated Protein, MAP*) que està associada a l'axonema madur en el segment extern, ajudant-lo en el control de la seva llargada i estabilització (Liu et al., 2004). En pacients amb mutacions a *RP1*, se sospita que la desorganització dels discs del segment extern dóna lloc a la mort dels fotoreceptors.

Una altra proteïna estructural que sembla ser que està implicada en la RPAD, la fascina retiniana, està associada al cili d'unió dels fotoreceptors (Wada et al., 2001). Les fascines són proteïnes d'empaquetament de l'actina i *FSCN2*, la proteïna específica de retina, sembla ser que té un paper molt important en l'ensamblatge de les estructures basades en actina de la membrana plasmàtica del cili d'unió. S'ha suggerit que podria tenir un paper en la morfogènesi dels discs i que, llavors, podria plausiblement causar RP quan no funciona correctament. Tot i així, no s'ha establert una relació unívoca entre les mutacions en el gen *FSCN2* i la patologia retiniana ja que s'ha trobat una gran quantitat de variacions de seqüència que no provoquen la malaltia (Gamundi et al., 2005).

Els processos que tenen lloc en el desenvolupament, diferenciació i manteniment dels fotoreceptors estan sotal control astringent i coordinat de diversos factors de transcripció. Dos d'aquests factors de transcripció, productes dels gens "*Cone-Rod homeobox-containing*" (*CRX*) i "*Neural Retina Leucine zipper*" (*NRL*), han estat associats amb RPAD. *CRX* va ser originalment associat amb les malalties retinianes en una família amb distròfia de cons i bastons, CRD (Freund et al., 1997). *CRX* és membre de la família de factors de transcripció "*homeodomain*" i és important per a la regulació de l'expressió de diversos gens específics de retina (Furukawa et al., 1997.) Sembla ser que, en general, mutacions al gen *CRX* provoquen un efecte perjudicial de la regulació transcripcional mitjançada per *CRX* als fotoreceptors. El segon factor de transcripció que està associat amb la RPAD és *NRL*, una proteïna bàsica amb motius de "cremallera de leucines" (*leucine zipper*) (Bessant et al., 1999), que actua de forma

sinèrgica amb CRX per tal de regular l'activitat de la rodopsina (Chen et al., 1997). Pel que s'ha observat en l'anàlisi de ratolins amb manca de còpies funcionals de *Nrl*, sembla ser que aquesta proteïna és crucial en la determinació i desenvolupament dels fotoreceptors i també en la seva funció i manteniment a l'adult (Mears et al., 2001). En pacients amb mutacions a *NRL*, sembla ser que els efectes perjudicials podrien ser el resultat d'un augment d'expressió de rodopsina i altres gens dels fotoreceptors (Bessant et al., 1999)

1. 2. 2. 2. Gens associats a RPAD amb expressió sistèmica

Se sap que quatre dels gens RPAD identificats, *PRPF3*, *PRPF8*, *PRPF31* i *PAP-1* (*Pim-1 Associated Protein*) codifiquen proteïnes implicades en el processament dels introns del pre-mRNA (McKie et al., 2001; Vithana et al., 2001; Chakarova et al., 2002). Davant de l'evidència, no hi ha dubte de que mutacions als factors de *splicing* provoquen RP; tot i així, el que encara es desconeix és perquè gens expressats de forma ubiqua i amb una funció aparentment tan crucial només provoquen patologia als fotoreceptors.

D'entre ells, s'han identificat tres gens responsables de RP autosòmica dominant (*PRPF3*, *PRPF8* i *PRPF31*) com els ortòlegs humans dels gens de llevat *PRP3*, *PRP8* i *PRP31*, respectivament (McKie et al., 2001; Vithana et al., 2001; Chakarova et al., 2002). Tots tres gens són factors de processament del pre-mRNA i estan implicats en la funció del tri-snRNP U4/U6-U5, el component de l'*esplíceosoma* requerit per a la seva transició a un estat catalíticament actiu. Totes tres proteïnes humanes van ser trobades en *esplíceosomes* funcionals aïllats (Zhou et al., 2002). Mutacions trobades als gens dels factors de processament del pre-mRNA en humans sembla ser que només provoquen patologia a la retina (Chakarova et al., 2002; Martínez-Gimeno et al., 2003; Wada et al., 2004).

Un altre gen amb expressió sistèmica, l'*IMPDH1* (*inosine monophosphate dehydrogenase type 1*), va ser identificat com a responsable de la forma RP10 de RPAD després de l'observació de que, dins de la retina, aquest es presentava en una concentració elevada als fotoreceptors (Bowne et al., 2002; Kennan et al., 2002). La proteïna codificada pel gen és un enzim clau en la via de síntesi de les purines, i és responsable específicament de la conversió de la inosina monofosfat (IMP) a xantosina monofosfat (XMP). La XMP és un precursor dels nucleòtids de guanina, importants per a nombroses funcions biològiques que inclouen senyalització i glicosilació i components clau en els àcids nucleics. Tot i que les cèl·lules poden obtenir nucleòtids de guanina mitjançant diferents mecanismes, estudis d'expressió indiquen que els fotoreceptors depenen altament de l'*IMPDH1* per a la seva provisió (Aherne et al., 2004). S'ha mostrat recentment, tot i així, que ratolins amb manca d'*Impdh1* tenen una retinopatia significativament menys severa i més lenta que l'observada en pacients humans RP10 (Aherne et al., 2004). Aquesta evidència indica que el que provoca la degeneració retiniana no és una manca d'*IMPDH1* sinó que la proteïna mutant té un efecte de guany de funció o efecte dominant negatiu.

El darrer gen identificat més recentment associat a RPAD és potser el més intrigant de tots pel que fa a la seva associació amb la degeneració retiniana perquè sembla ser que no s'expressa a la retina. Aquest gen codifica l'anhidrasa carbònica IV (CA4), un metal·loenzim de zinc ancorat a membrana pel glicosilfosfatidilinositol, i ara se sap que és responsable de la forma RP17 al cromosoma 17q. Va ser identificat com a gen responsable de la RP17 després d'un estudi que va mostrar que la substitució R14W en la seqüència senyal de la proteïna segrega amb el fenotip de la malaltia en una família sud-africana, junt amb l'evidència dels seus efectes perjudicials a la retina obtinguts a partir de diversos estudis en una línia cel·lular de mamífer (Rebello et al., 2004).

1. 3. Processament (*splicing*) del pre-mRNA

Hem parlat dels gens associats a RPAD que s'expressen de forma sistèmica. Hem vist que tres d'ells codifiquen factors de processament del pre-mRNA. Per tal de situar-nos en la funció d'aquests gens a nivell cel·lular, ens introduïrem en el procés de processament o *splicing* del pre-mRNA i veurem quines implicacions poden tenir defectes en aquests gens sobre l'expressió gènica.

El processament del RNA transcrit primari (*pre-mRNA splicing*) és un pas central en l'expressió gènica. Està situat entre la transcripció i la síntesi de proteïnes (Figura 8), i consisteix en l'eliminació de les seqüències no codificants (introns) per tal de construir la molècula de mRNA madura que es traduirà per a donar lloc a una proteïna.

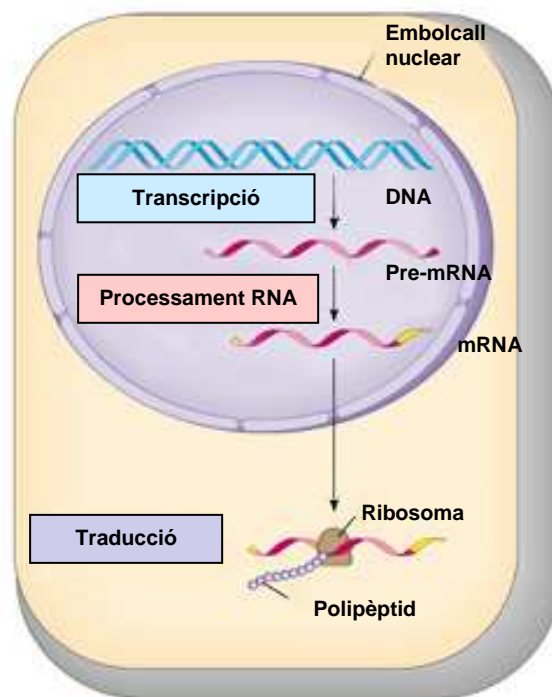


Figura 8. Localització del procés de *splicing* del pre-mRNA (*Processament RNA*) en una cèl·lula eucariota. El procés de *splicing* se situa entre la transcripció del RNA i la síntesi de proteïnes. [De: <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene>]

Els gens estan compostos per dos tipus de seqüències, els exons i els introns. Els exons, en els humans, en general tenen una llargada mitja de 145 nucleòtids. Són seqüències codificants en les quals també trobem elements reguladors, que són requerits per al processament d'exons constitutius i alternatius. Existeixen diferents grups d'elements reguladors utilitzats per diferents gens (Figura 9B) i es divideixen en ESEs (*Exonic Splicing Enhancers*) i ESSs (*Exonic Splicing Silencers*).

Pel que fa als introns, en general són 10 vegades més llargs que els exons. Els introns també contenen elements reguladors, que modulen l'ús específic de cèl·lula d'exons alternatius i actuen per unió amb complexos reguladors multicomponents. Hi ha també dos tipus d'elements reguladors (Figura 9B), que són els ISEs (*Intronic Splicing Enhancers*) i els ISSs (*Intronic Splicing Silencers*).

Per tal que tingui lloc el processament dels introns són necessaris uns senyals en la seqüència del RNA. Aquests senyals estan localitzats en els introns (Figura 9A). Hi ha diferents tipus de senyals intrònics de *splicing*, que es divideixen en:

- **Lloc de *splicing* 5'**. La seva seqüència consens sol ser **AGGuragu**. En aquest lloc s'hi uneix la snRNP U1.
- **Lloc de *splicing* 3'**. La seva seqüència sol ser **yyyyyyynagG** (on y= pirimidina)
- **"Branch site"**. La seva seqüència sol ser **ynyuray** (on r = purina). A aquest lloc s'hi uneix la snRNP U2 per interaccions RNA:RNA entre el snRNA i el pre-mRNA

Normalment els senyals de *splicing* solen ser seqüències curtes i contenen típiques seqüències degenerades.

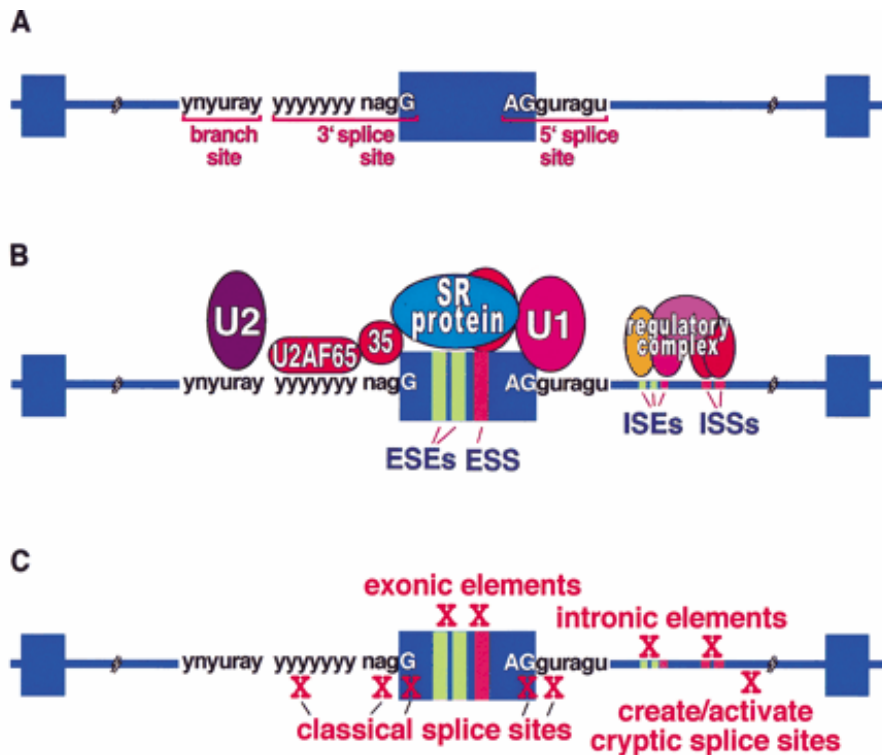


Figura 9. Senyals de *splicing* clàssics i auxiliars (n = G, A, U, o C; y = pirimidina; r = purina). **A)** Senyals de *splicing* clàssics. **B)** Elements clàssics i auxiliars i factors d'unió: Factors que s'uneixen als elements clàssics i auxiliars. **C)** Mutacions de *splicing* que actuen en *cis*. [De: Faustino NA & Cooper TA. Pre-mRNA *splicing* and human disease. Genes Dev. 2003 Feb 15; 17(4):419-37. Review]

Els senyals de *splicing* clàssics (Figura 9A) que es troben en la major part (99%) dels introns humans són requerits per al reconeixement de tots els exons. Tot i així, també hi ha una classe minoritària d'introns que utilitzen seqüències clàssiques diferents i diferents components de l'*spliceosoma* (Tarn & Steitz 1997).

Els elements auxiliars (Figura 9B) dins dels exons (ESEs i ESSs) i dels introns (ISEs i ISSs) són requerits normalment per a un *splicing* eficient dels exons constitutius i alternatius. Els elements intrònics també serveixen per a modular l'ús específic cel·lular d'exons alternatius per unió a un complex regulador multicomponent.

Mutacions que afecten elements que actuen en *cis* (Figura 9C), requerits per al processament del pre-mRNA, poden donar lloc a un *splicing* defectuós que provoqui una malaltia.

El procés de *splicing* té lloc al nucli, i és catalitzat per un complex molt gran de RNA-proteïnes anomenat “spliceosome”, a partir d’ara *esplíceosoma*.

L’ensamblatge dels *esplíceosomes* amb el pre-mRNA és una part coordinada del procés transcripcional (Cramer et al., 2001; Proudfoot et al., 2002) i implica reconeixement, per a cada intró, dels senyals de *splicing* constitutius de la seqüència del RNA: el donador de *splicing* (lloc de *splicing* 5’), l’acceptor de *splicing* (lloc de *splicing* 3’), el “branch site” i la regió rica en pirimidines.

El procés de *splicing* també pot requerir o estar regulat per la presència d’altres elements que actuen en *cis*, com per exemple els ESEs, els ISEs, els ESSs, els ISSs (mencionats anteriorment) i els factors proteics que actuen en *trans* que s’uneixen alls.

Les funcions generals del *splicing* són l’eliminació dels introns i el *splicing* alternatiu. El *splicing* alternatiu es defineix com la unió de llocs de *splicing* 5’ i 3’ diferents dels llocs de *splicing* constitutius. Aproximadament el 80% de *splicing* alternatiu dona lloc a canvis en la proteïna codificada. Com a dada significativa, més del 59% dels gens humans expressen més d’un mRNA per *splicing* alternatiu. L’efecte funcional principal és la generació de diverses formes de mRNA a partir d’un únic gen, el que permet que proteïnes funcionalment diferents s’expressin d’acord a diferents programes reguladors. Els efectes estructurals del *splicing* alternatiu són, entre d’altres, la inserció o eliminació d’aminoàcids, canvis en la pauta de lectura i introducció de codons de terminació. Pel que fa als efectes a nivell d’expressió gènica, el *splicing* alternatiu elimina o inserta elements reguladors que controlen la traducció, l’estabilitat del mRNA o la seva localització. La seva regulació és específica de cèl·lula i les vies de *splicing* estan modulades en funció del tipus cel·lular, estadi de desenvolupament, gènere i estímuls externs.

L’*esplíceosoma*, l’encarregat de realitzar tot aquest procés, és un complex de ribonucleoproteïnes consistent en RNA i ribonucleoproteïnes nuclear petites (*small nuclear ribonucleoproteins, snRNPs*). Està localitzat al nucli i la seva funció principal és

realitzar el *splicing* dels RNAs transcrits primaris per escissió dels introns i lligació dels extrems dels exons (Figura 10), donant lloc a un transcrit de mRNA, que llavors serà traduït als ribosomes.

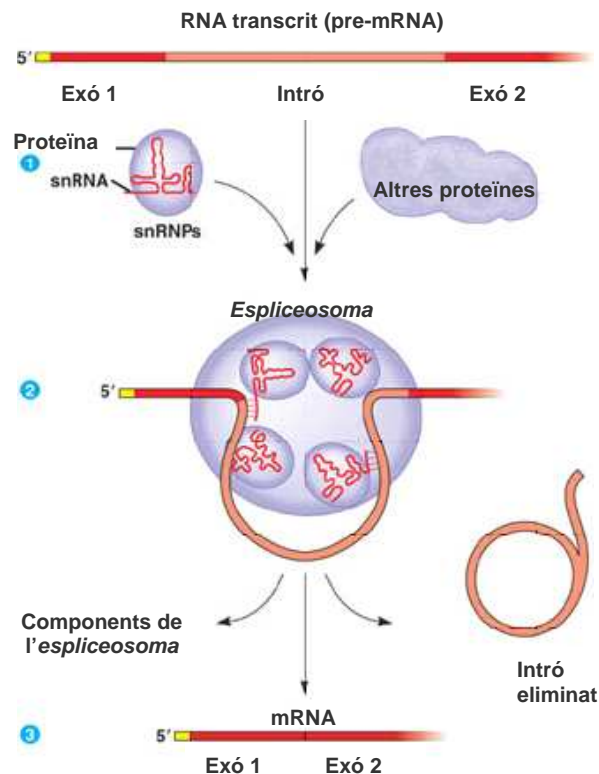


Figura 10. Processament del RNA transcrit primari mitjançant l'esplíceosoma. (1) Formació del complex *esplíceosomal*. A partir de RNA (snRNA) i proteïnes té lloc la formació d'un complex ribonucleoproteic (snRNPs) que junt amb altres proteïnes donarà lloc finalment a l'*esplíceosoma*. (2) Unió de l'*esplíceosoma* a les seqüències intròniques que s'han d'eliminar. (3) Eliminació de l'intró i unió dels dos exons flanquejants [De: <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene>]

Els mecanismes d'acció de l'*esplíceosoma* són el reconeixement de les unions intró/exó -mitjançant les seqüències de *splicing* i molts altres senyals febles- i la catàlisi de les reaccions de "tallar i enganxar" que eliminen els introns i uneixen els exons (Figura 10).

L'*esplíceosoma* conté 5 molècules de RNA petites (*small nuclear RNAs, snRNAs*) que varien en mida de 56 a 217 nucleòtids (Maniatis & Reed, 1987) i que s'anomenen molècules snRNAs U1, U2, U4, U5 i U6. Cadascun d'aquests snRNAs està complexat

amb aproximadament deu proteïnes per produir una snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein*) (Taula II) component de l'*spliceosoma*. El paper de cadascuna de les molècules de snRNA ha estat elucidat, mentre que els papers de les diverses proteïnes implicades encara continua investigant-se.

Taula II. Papers funcionals de cadascuna de les snRNPs

snRNP	Funció
U1	Inicialment unida al lloc de <i>splicing</i> 5' i alliberada en el reclutament d'U4/U5/U6, es postula que pot determinar quin lloc de <i>splicing</i> 5' és utilitzat.
U2	Inicialment unida a la seqüència de reconeixement "branchpoint", forma dos dúplexs amb U6. La seva funció és portar el lloc de <i>splicing</i> 5' de l'intró a prop del branchpoint.
U4	Inicialment complexada amb U5 i U6, manté U6 amb una conformació desplegada i és alliberada després de portar a U6 cap al lloc de <i>splicing</i> 5'. Xaperona d'U6 (¿?)
U5	Inicialment complexada amb U4 i U6, s'uneix a les seqüències exòniques. Es localitza <i>upstream</i> del lloc de <i>splicing</i> 5' i <i>downstream</i> del lloc de <i>splicing</i> 3'. Se suposa seqüència guia per a mantenir junts els exons.
U6	Inicialment complexada amb U4 i U5, desplaça a U1 del lloc de <i>splicing</i> 5', forma dúplexs amb les seqüències intròniques i es complexa amb U2. Portal lloc de <i>splicing</i> 5' de l'intró a prop del "branchpoint" i se suposa que té activitat catalítica.

El cicle de *splicing* del RNA el podem veure en l'esquema següent (Figura 11):

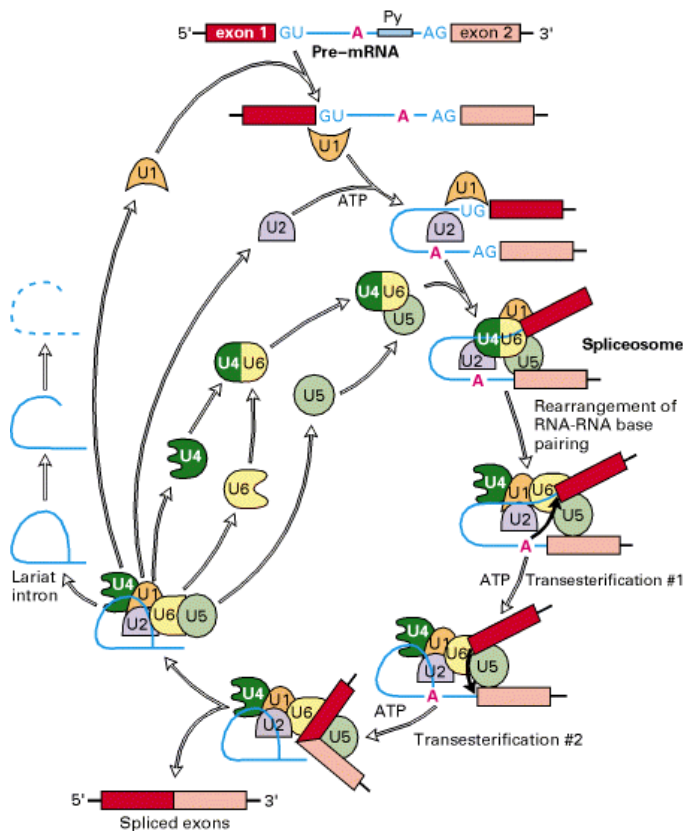


Figura 11. El cicle de *splicing*. Les partícules de *splicing* snRNPs (U1, U2, U4, U5 i U6) s'associen amb el pre-mRNA i entre elles, en una seqüència ordenada per formar l'*spliceosoma*. Aquest gran complex ribonucleoproteic catalitza llavors les dues reaccions de transesterificació que donen lloc al *splicing* dels exons (vermell clar i fosc) i a l'escissió de l'intró (blau) en forma de lariat. Tot i que no es requereix la hidròlisi de l'ATP per a les reaccions de transesterificació, es creu que proporciona l'energia necessària per als reordenaments de l'estructura de l'*spliceosoma* que tenen lloc durant el cicle. Als eucariotes superiors, l'associació de la snRNP U2 amb el pre-

mRNA és assistida per una proteïna hnRNP anomenada U2AF, que s'uneix a la regió rica en pirimidines a prop del lloc de *splicing* 3'. U2AF també interacciona probablement amb altres proteïnes requerides per al *splicing* mitjançant un domini que conté repeticions del dipèptid serina-arginina (el motiu SR). El "branch-point" A al pre-mRNA és indicat en negreta. [S. W. Ruby and J. Abelson, 1991, *Trends Genet.* 7:79; adaptat de M. J. Moore et al., 1993, en R. Gesteland and J. Atkins, eds., *The RNA World*, Cold Spring Harbor Press, pp. 303-357.]

1. 3. 1. Defectes al mecanisme de *splicing*

Hi ha diversos mecanismes pels quals defectes en el procés de *splicing* del pre-mRNA poden donar lloc a una patologia. Podem trobar quatre categories de mutacions que afecten el procés de *splicing*: mutacions en *cis*, mutacions en *trans*, mutacions que provoquen un *splicing* aberrant (expressió de RNAs no naturals) per creació de patrons de *splicing* no naturals i mutacions que provoquen una regulació aberrant del *splicing* (expressió inapropiada de RNAs naturals).

La combinació dels 4 tipus de mutacions dóna lloc a una gran complexitat en l'expressió.

Una mutació en *cis* és aquella que només afecta al fragment de DNA (gen) que la conté físicament. En el cas del *splicing*, les mutacions en *cis* es poden trobar dins de senyals de *splicing* o de seqüències reguladores de *splicing*. Aquestes mutacions poden afectar, per tant, a la unió de factors de *splicing* o de proteïnes reguladores sobre el DNA, això vol dir que poden afectar, finalment, l'expressió del gen portador de la mutació.

Centrant-nos en les mutacions en *cis* que podem trobar en senyals de *splicing*, aquestes poden afectar la utilització de llocs de *splicing* constitutius o llocs de *splicing* alternatius. La disrupció del *splicing* constitutiu normalment dona lloc a la pèrdua d'expressió gènica degut a un *splicing* aberrant. D'altra banda, una mutació que actuï en *cis* que inactivi (o activi) un o dos llocs de *splicing* utilitzats alternativament forçarà l'expressió d'un dels patrons de *splicing* alternatius. Tot i que s'expressa un mRNA natural, la seva expressió en un teixit inapropiat (regulació espacial) o estadi de desenvolupament inadequat (regulació temporal) pot donar lloc a la malaltia. Exemples de mutacions en *cis* els trobem al gen de la rodopsina, en el qual s'han descrit mutacions en llocs de *splicing* que potencialment poden afectar al processament del seu mRNA. (Kim et al., 1993; Jacobson et al., 1994; Rosenfeld et al., 1995; Reig et al., 1996; Whitehead et al., 1998; Greenberg et al., 2003).

Una mutació en *trans* és una mutació que no només afecta al fragment de DNA (gen) que la conté físicament, sinó també a altres seqüències de DNA. S'anomenen mutacions en *trans* a aquelles mutacions en proteïnes que, per unió a una seqüència de DNA, estan afectant a aquesta seqüència. En relació al *splicing*, normalment les mutacions en *trans* es troben en gens que codifiquen proteïnes components de la maquinària de *splicing* o components d'un complex regulador de *splicing*. Aquestes poden afectar, llavors, a múltiples gens que estiguin controlats per la mateixa proteïna. Les mutacions de *splicing* que actuen en *trans* poden afectar la funció de la maquinària basal de *splicing* o a factors que regulen el *splicing* alternatiu. Les mutacions que

afecten la maquinària basal de *splicing* tenen el potencial d'afectar el *splicing* de tots els pre-mRNA, mentre que les mutacions que afecten un regulador del *splicing* alternatiu afectaran només el grup de pre-mRNA que són diana per al regulador.

1. 3. 1. 1. Mutacions en *cis* que afecten al *splicing* associades a RPAD

La majoria de mutacions -detectades actualment- que disrompen el *splicing* són substitucions d'un sol nucleòtid localitzades en els segments exònics o intrònics dels senyals de *splicing* clàssics.

Aquestes mutacions poden donar lloc bàsicament a una d'aquestes alternatives:

- “*Exon skipping*” complet (eliminació d'un o diversos exons)
- Utilització d'un pseudo senyal 3' o 5' proper
- Retenció de l'intró mutat
- Introducció d'un nou senyal de *splicing* dins d'un exó
- Introducció d'un nou senyal de *splicing* dins d'un intró

En casos rars, les mutacions que no disrompen o creen un lloc de *splicing*, activen pseudo-senyals de *splicing* pre-existents distants de la mutació (Pagani et al., 2002), consistent amb la proposta de que els introns contenen seqüències inhibidores del *splicing* (Fairbrother & Chasin, 2000). En la major part dels casos, la utilització de llocs de *splicing* no naturals o retenció d'introns introdueix codons de stop prematurs (“*premature termination codons*”, *PTCs*) al mRNA, resultant típicament en la degradació mediada per mutacions terminadores (“*nonsense-mediated decay*”, *NMD*) i pèrdua de funció de l'al·lel mutat.

A part de les típiques mutacions en llocs de *splicing*, es coneix, també, que una gran part del *splicing* aberrant és degut a mutacions que disrompen els elements de *splicing* exònics (ESEs i ESSs). Després de que s'hagi vist que la majoria d'exons humans contenen ESEs (Liu et al., 2001; Fairbrother et al., 2002), la realitat suggereix que probablement una fracció significativa de les mutacions exòniques que provoquen

malalties són mutacions de *splicing* no reconegudes. La identificació de mutacions causants de malaltia està basada principalment en el lligament de la mutació amb el fenotip de la malaltia, i l'efecte de la mutació en l'expressió gènica és generalment assumida basant-se en la seva localització. Degut a que s'assumeix que les mutacions provoquen malaltia només quan estan afectant la zona codificant d'una proteïna, s'ha ignorat el possible efecte de mutacions silencioses com a possible causa de malaltia. S'ha assumit que les mutacions *missense* (que provoquen un canvi puntual d'un aminoàcid) creen una alteració significativa en la funció de la proteïna i també s'ha assumit que les mutacions *nonsense* (que provoquen un codó de terminació) porten a l'expressió de proteïnes truncades no funcionals o deletèries o pèrdua de funció causada per NMD. De fet, el principal mecanisme de malaltia en una fracció significativa de mutacions és una anormalitat catastròfica de *splicing* en comptes d'un efecte directe en la zona codificant (Cartegni et al., 2002). El test definitiu per comprovar si una mutació causant de malaltia afecta al *splicing* és mitjançant una anàlisi directa de l'estructura linial del mRNA per comprovar el *splicing* correcte i els nivells a l'estat estacionari de mRNA per tal de detectar NMD. D'una forma ideal, el RNA del teixit afectat hauria de ser analitzat perquè les mutacions en *cis* que afecten el *splicing* poden tenir efectes específics de cèl·lula (Slaugenhaupt et al., 2001). Desafortunadament, però, moltes vegades els teixits necessaris per a realitzar aquestes anàlisis no estan disponibles per a poder analitzar el *splicing* de RNAs endògens (com per exemple la retina humana). Com a alternativa, les mutacions que disrompen ESEs o ESSs han estat identificades utilitzant transfecció transitòria de minigens o assajos de *splicing in vitro* comparant el *splicing* dels exons normals i mutants.

La capacitat d'identificar elements exònics auxiliars de *splicing* basant-se només en la seqüència potenciaria la identificació de mutacions causants de malaltia. Hi ha algunes aproximacions computacionals que ens permeten identificar senyals de *splicing*

(<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>, http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html , <http://www1.imim.es/geneid.html>, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>), etc. i elements de *splicing* auxiliars. Alguns d'aquests programes informàtics ens permeten predir, dins d'una seqüència d'un gen, elements exònics de *splicing* com per exemple els ESEs (<http://exon.cshl.org/ESE>). Tot i que són eines empíriques, ens poden donar una idea de si l'existència d'una mutació bé en un lloc de *splicing* o bé en un element exònic o intrònic de *splicing* pot provocar alguna alteració en el processament del pre-mRNA. Les possibles alteracions de seqüència (mutacions) en les regions que putativament formen part d'elements de *splicing* d'un gen, s'han d'analitzar i avaluar amb cura. La utilització dels diferents algorismes ens dona un valor quantitatiu a nivell de *splicing* del canvi introduït per la mutació. En casos significatius han d'analitzar-se mitjançant experiments *in vitro*. És possible, no obstant, que alguns d'aquests canvis tinguin efecte a un nivell subclínic en la major part dels teixits. Així es pot especular si aquestes alteracions poden tenir a la població un efecte similar als polimorfismes intragènics.

Aproximadament el 15% de les mutacions que provoquen malalties genètiques afecten el processament del pre-mRNA (Krawczak et al., 1992), sovint afectant les seqüències potenciadores i silenciadores, així com els senyals de *splicing*, incloent els senyals de *splicing* 3' i 5' i el "branch site". Estudis recents han emfatitzat la importància del que era prèviament caracteritzat com a polimorfismes d'un sol nucleòtid localitzats en zones codificants (cSNPs). De fet, els cSNPs poden afectar directament a diferents elements que influeixen en el reconeixement d'exons, per exemple per disrupció o creació d' ESEs i/o ESSs (Pagani et al., 2004). Un gran nombre de mutacions patològiques i cSNPs que disrompen al menys un dels llocs d'unió per a les proteïnes SR SF2/ASF, SRp40, SRp55 i SC35 han estat trobades en gens com el *BRCA1* (gen associat al càncer de mama) (Liu et al., 2001) i al *SMN*, el gen implicat en l'atròfia muscular espinal (Cartegni & Krainer 2002).

S'han descrit algunes mutacions de *splicing* al gen de la rodopsina associades a RP (Bell et al., 1994; Rosenfeld et al., 1992; Reig et al., 1996; Martínez-Gimeno et al., 2000). Dues d'elles, descrites pel nostre equip investigador, IVS2-2A→G i IVS4-1G→T, estan situades als llocs 3' acceptors de *splicing* (AG) dels introns 2 i 4, respectivament, del gen de la rodopsina (*RHO*). Totes dues mutacions estan associades a RPAD i co-segregen amb la malaltia en les famílies en les quals apareixen, és a dir, que tots els pacients afectats presenten la mutació, mentre que els individus sans no la presenten.

El fet que la rodopsina només s'expressi a la retina fa difícil estudiar el comportament del seu mRNA quan a nivell de DNA existeix alguna mutació que afecti als llocs de *splicing*. L'única manera de comprovar la integritat de la molècula de mRNA sintetitzada seria extraient el RNA total de la retina d'un individu i analitzant el processament que ha patit el mRNA específic de rodopsina. Això no és factible, amb la qual cosa s'ha de buscar una alternativa per tal de poder estudiar el processament del mRNA de rodopsina en el cas que hi hagi alguna mutació que afecti potencialment aquest processament.

Una forma de veure si certes mutacions en llocs de *splicing* en el gen de la rodopsina provoquen disrupció dels llocs de *splicing* i, per tant, una posterior generació d'una molècula de mRNA aberrant és mitjançant la introducció de construccions de minigens de rodopsina -que continguin les mutacions corresponents- dins d'uns sistema de cèl·lules eucariotes que sigui capaç de simular el comportament de *splicing* de la cèl·lula humana. Aquesta aproximació ens dóna una idea de si les mutacions en llocs de *splicing* al gen de la rodopsina fan que el processament del seu mRNA sigui anòmal o bé no tenen cap acció sobre el *splicing*. Tot i que l'heterogeneïtat cel·lular en la que realitzem aquests experiments *in vitro* no ens assegura que el pre-mRNA sigui processat exactament de forma igual a la cèl·lula fotoreceptora (*splicing* específic), sí

ens està indicant el comportament diferencial d'una construcció salvatge i una altra mutada, en un sistema cel·lular de *splicing*.

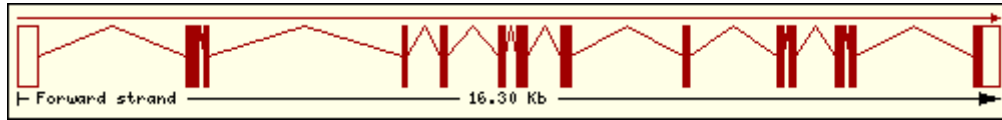
1. 3. 1. 2. Mutacions en *trans* que afecten al *splicing* associades a RPAD

Existeixen diverses malalties en les quals una mutació provoca la disrupció de la maquinària del *splicing*, ja sigui dels components de l'*spliceosoma* o de factors auxiliars que regulen el *splicing* alternatiu. Les mutacions *nonsense* (mutacions que donen lloc a una proteïna truncada) als components de l'*spliceosoma* són generalment letals o letals sintètiques en llevats i sovint letals a nivell cel·lular als metazous. Tot i això, s'ha trobat que mutacions que malmeten l'ensamblatge o funció dels snRNPs de l'*spliceosoma* són responsables de dos malalties humanes en les quals estan afectats dos grups diferents de neurones, una és l'atròfia muscular espinal (SMA) i l'altra la retinosi pigmentària. Pel que fa a la retinosi pigmentària, els gens implicats en la maquinària de *splicing* en els quals s'han trobat mutacions associades a la malaltia són el *PRPF31*, *PRPF3* i *PRPF8* (Chakarova et al., 2002; Martínez-Gimeno et al., 2003; Wada et al., 2004).

Mutacions al factor de *splicing* hPrp31 associades a RPAD

PRPF31 és l'homòleg humà del gen que codifica el factor de processament del pre-mRNA Prp31p de llevat. Està localitzat al locus RP11, a la regió cromosòmica 19q13.4. Comprèn 14 exons, s'estén al llarg de 18 kb de DNA (Figura 12A) i codifica una proteïna de 499 aminoàcids (Figura 12B) amb un pes molecular de 61 kDa (Nicoletti et al., 1995) homòloga a la proteïna Prp31p de llevat.

A.



B.

```

1  MSLADELLADLEEAEEEEEGGSYGEEEEPAIEDVQEETQLDLSGDSVKTIAKLWDSKMF
61  AEIMMKIEEYISKQAKASEVMGPVEAAPEYRVIDANNLTVEIENELNIIHKFIRDKYSK
121 RFPELESVPNALDYIRTVKELGNSLDKCKNNENLQQILT NATIMVSVTASTTQGQQLS
181 EEELERLEEACDMALELNASKHRIYEVESRMSFIAPNLSIIIGASTAAKIMGVAGGLTN
241 LSKMPACNIMLLGAQRKTL SGFSSTSVLPHTGYIYHSDIVQSLPDLRKAARLVAAKCT
301 LAARVDSFHESTEKGKVG YELKDEIERKFDKWQEP PPVKQVKPLPAPLDGQRKRGRRYR
361 KMKERLGLTEIRKQANRMS FGEIEEDAYQEDLGFSLGHLGKSGS GRVRQTQVNEATKARI
421 SKTLQRTLQKQSVVYGGK STIRDRSSGTASSVAFTPLQGLEIVNPQAAEKKVAEANQKYF
481 SSMAEFLKVKGEKSGLMST
    
```

C.

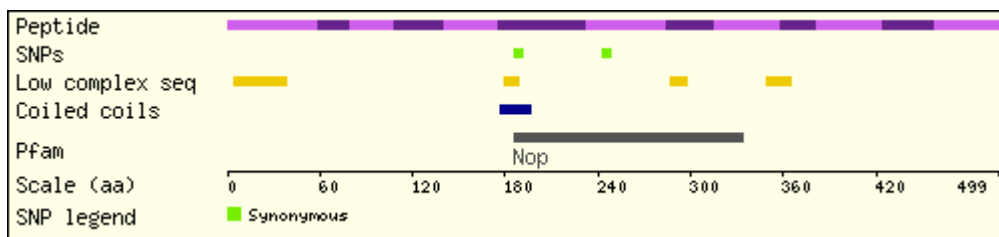


Figura 12. Estructura del gen *PRPF31* i de la proteïna que codifica. (A) Estructura del transcrit del gen *PRPF31* [Ensembl Gene Report for ENSG00000105618]. **(B)** Seqüència de la proteïna codificada i **(C)** Esquema dels diferents dominis de la proteïna hPrp31 i els SNPs trobats [Ensembl Protein Report for ENSP00000324122]

Dels 4 gens dels factors de *splicing* que provoquen RP, la funció del *PRPF31* és la que està millor definida. Prp31p és un factor de *splicing* essencial tant a *S.cerevisiae* (60% de similitud amb l'humà) com a *S.pombe* (68% de similitud amb l'humà; Weidenhammer et al., 1996; Bishop et al., 2000). L' hPrp31 humana és una proteïna associada a la snRNP U4/U6 que promou l'associació entre la snRNP U4/U6 i la snRNP U5 per interaccions directes amb una proteïna de 105 kDa específica d'U5. *Splicing in vitro* utilitzant extractes nuclears de cèl·lules HeLa immunodeplecionades per a hPrp31 (és a dir, en les quals es va dirigir un anticòs contra hPrp31 per eliminar-lo) mostraven una acumulació del complex pre-*spliceosomal* (que conté les snRNPs U1 i U2), impedit així l'associació del tri-snRNP U4/U6-U5 i l'ensamblatge de l'*spliceosoma* actiu. L'addició del *PRPF31* recombinant revertia aquesta inhibició, demostrant que la deficiència del *PRPF31* era responsable del bloqueig (Makarova et al., 2002).

Tot i que diverses mutacions a les proteïnes de les snRNPs inhibeixen la transició del pre-*spliceosoma* a l'*spliceosoma*, hPrp31 és única en quant que és medidora directa de la formació del tri-snRNP U4/U6-U5 més que d'interaccions directes entre el tri-snRNP i el pre-*spliceosoma* (Figura 13).

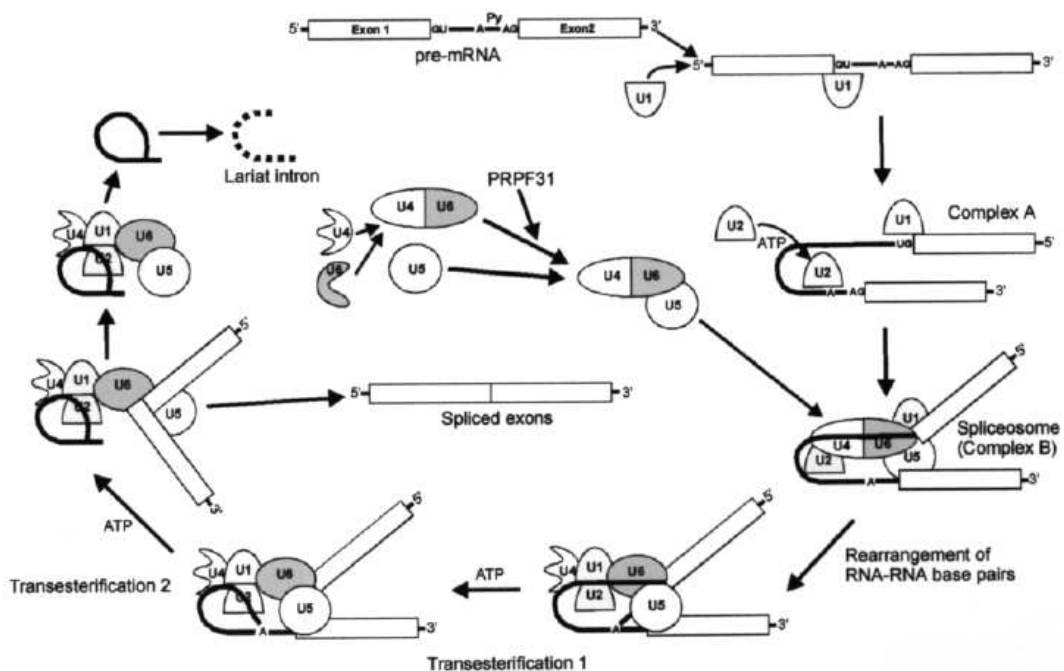


Figura 13. Paper de l'hPrp31 en el processament del pre-mRNA. hPrp31 és un factor de *splicing* específic del snRNP U4/U6 i es creu que el seu paper principal és reclutar i ensamblar a U5 amb U4/U6 per tal de formar el tri-snRNP. [De: Deery et al., Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by mutations in the *splicing* factor gene *PRPF31*. *Hum Mol Genet.* 2002 Dec 1;11(25):3209-19]

En cada ronda de *splicing* del pre-mRNA, el tri-snRNP ha de ser re-ensamblat a partir dels seus components, U4/U6 i U5. hPrp31 és operacionalment definida com a específica d'U4/U6, ja que es manté unida a aquesta partícula a concentracions de sal a les quals es dissocia el tri-snRNP.

Tot i així, tal i com s'ha mostrat en anàlisis de doble híbrid i assajos bioquímics, també interacciona amb una proteïna de 102 kDa associada a U5, hPrp6 (Makarova et al., 2002). Així, es pensa que el paper principal d'hPrp31 és enganxar U5 a U4/U6 per donar lloc al tri-snRNP.

De fet, estudis recents (Schaffert et al., 2004) han demostrat que fent *knock-down* mitjançant RNA d'interferència (RNAi) tant de la proteïna hPrp31 específica d'U4/U6 (61K) com de la proteïna hPrp6 (102K) en cèl·lules HeLa, s'inhibeix la formació del tri-

snRNP i s'acumulen la snRNP U5 i el di-snRNP U4/U6 a la cèl·lula. Per tant, hPrp31 i hPrp6 formen una connexió essencial entre les snRNPs U4/U6 i U5 *in vivo*.

La proteïna hPrp31 és d'interès mèdic degut a que mutacions trobades al gen que la codifica, *PRPF31*, estan associades a la retinosi pigmentària autosòmica dominant (Vithana et al., 2001). Estudis suggereixen que disruptcions en la formació i funció del tri-snRNP provocades per mutacions a la proteïna hPrp31 poden contribuir a la manifestació d'aquesta malaltia (Makarova et al., 2002).

S'han identificat i documentat mutacions patogèniques al *PRPF31* en diverses famílies RPAD i també en casos esporàdics de RP (Vithana et al., 2001; Wang et al., 2003; Xia et al., 2004; Lu et al., 2005). A més, en aquest treball es presenten tres famílies amb mutació en aquest gen, dues d'elles noves (Martínez-Gimeno et al., 2003). Les mutacions identificades inclouen insercions, delecions, mutacions *missense* i mutacions en llocs de *splicing*. Sembla ser que en alguns al·lels mutants, la funció del *PRPF31* està severament afectada, fins i tot completament abolida. Així, mutacions al *PRPF31* sembla ser que provoquen RPAD degut a haploinsuficiència, tot i què no es pot descartar un efecte dominant negatiu per als al·lels que expressen proteïnes truncades.

S'ha trobat que famílies RPAD lligades al locus RP11, amb mutacions al *PRPF31*, presenten un fenotip amb penetrància incompleta. S'està investigant si aquesta penetrància incompleta pot ser deguda a una expressió diferencial dels al·lels salvatges en individus simptomàtics i asimptomàtics (Vithana et al., 2003).

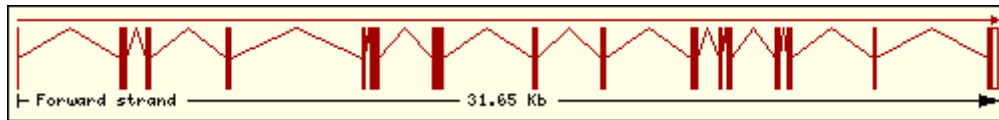
Resultats d'estudis funcionals inicials a *PRPF31* han proporcionat algunes pistes sobre els efectes que poden tenir les seves mutacions *in vivo* (Deery et al., 2002). Anàlisis en cultius cel·lulars han mostrat evidència d'una disminució de la solubilitat de la proteïna quan aquesta presenta mutacions *missense*. Si aquesta observació és veritat sota les condicions fisiològiques dels fotoreceptors, podria ser, llavors, que es formessin agregats de proteïna insoluble que s'acumularien amb el temps, provocant

eventualment apoptosi. Altres dades experimentals també suggereixen, com a explicació alternativa, que la manca de solubilitat podria donar lloc a que es transportés menys proteïna des del citosol cap al seu lloc d'acció al nucli (Deery et al., 2002). Els fotoreceptors fan migrar diàriament els discs del segment extern, on es troba la rodopsina, i, per tant, requereixen nivells suficients de RNA transcrit de rodopsina per tal de reemplaçar la proteïna constantment. Aquests RNA transcrits òbviament requereixen *splicing* abans de ser traduïts a proteïna. Això vol dir que mutacions a *PRPF31*, enlloc de provocar un efecte dominant negatiu, podria ser que donessin lloc a un fenotip relacionat amb els llindars en els nivells de *splicing*. És a dir, els fotoreceptors dels pacients sobreviurien fins que els nivells de *splicing* del mRNA de rodopsina o altres mRNA caiguessin per sota d'un nivell llindar, punt en el qual la cèl·lula seria danyada irreversiblement, i portada eventualment a l'apoptosi. El que suporta aquesta teoria és que, famílies amb mutacions a *PRPF31* presenten un mode de penetrància incompleta de "tot o res". Aquest tipus de mecanisme de la malaltia seria sensible a una teràpia en forma d'una sobre-producció de la proteïna hPrp31, sense la necessitat d'eliminar la proteïna mutada (Deery et al., 2002).

Mutacions al factor de *splicing* hPrp3 associades a RPAD

hPrp3 és una de les proteïnes estretament associades amb la snRNP U4/U6, i mutacions al seu ortòleg en llevat (Prp3p) causen inestabilitat del snRNA U6 impedit el procés de *splicing*. El gen per al factor de *splicing* associat a U4/U6 (*PRPF3*) va ser mapat (Heng et al., 1998) a la regió cromosòmica 1q21.1. Conté 16 exons (Figura 14A) que codifiquen una proteïna de 682 aminoàcids (Figura 14B) amb un pes molecular de 77 kDa.

A.



B.

```

1  MALSKRELDDELKPWIEKTVKRVLGFSEPTVVTAALNCVGGKMDKKAADHLKPFLDDSTL
61  RFVDKLF EAVEEGRSSRHSSSSDRSRKRELKEVFGDDSEISKESGKRRRIPRFEEVE
121 EEPEVIPGPPSESPGMLTKLQIKQMMEAATRQIEERKKQLSFISPPTPQKTPSSSQPER
181 LPIGNTIQPSQAATFMNDAIEKARKAAELQARIQAQLALKPLIGNANMVGLANLHAMGI
241 APPKVELKDQTKPTPLILDEQGRTVDATGKEIELTHRMPMLKANIRAVKREQFKQQLKEK
301 PSEDMESNTFFDPRVSIAPSQRRTFKFHDKGKFEKIAQRLRTKAQLEKLAEISQAAR
361 KTGIIHSTRLALIAPKKELKEGDIPEIEWDSYIIPNGFDLTEENPKREDYFGITNLVEH
421 PAQLNPPVDNDTPVTLGVYLTKEQKKLRRQTRREAQKELQEKVRLGLMPPPEPKVRISN
481 LMRVLGTEAVQDPTKVEAHVRAQMAKRQKAHEEANAARKLTAEQRKVKKIKKLEKEDISQG
541 VHISVYVRNLSNPAKKFKIEANAGQLYLTGVVVLHKDVNVVVVEGGPKAQKFKRLMLH
601 RIKWDEQTSNTKGDDDEESDEEAVKKTNKCVLVWEGTAKDRSFGEMKFKQCPTENMAREH
661 FKKHGAEHYWDLALSESVLESTD
    
```

C.

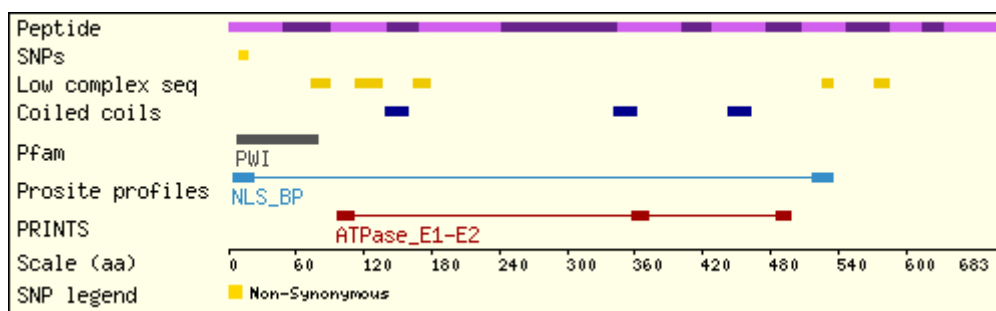


Figura 14. Estructura del gen *PRPF3* i de la proteïna que codifica. (A) Estructura del transcrit del gen *PRPF3* [Ensembl Gene Report for ENSG00000117360]. **(B)** Seqüència de la proteïna codificada, on es marca en gris el domini PWI (la presència dels motius PWI en factors de *splicing* ha suggerit que aquest podria ser important per a múltiples interaccions dins dels complexos de *splicing*); i **(C)** Esquema dels diferents dominis de la proteïna hPrp3 i els SNPs trobats [Ensembl Protein Report for ENSP00000236015]

PRPF3 està localitzat al locus RP18, identificat per primer cop en una família danesa (Xu et al., 1996). Els pacients d'aquesta família mostraven un fons d'ull de RP clàssica amb pigmentació perifèrica en forma d'espícules, constricció de les arterioles retinianes i pèrdua del camp visual. L'inici de la malaltia era precoç i sense evidències de no-penetrància. S'ha trobat que mutacions al *PRPF3* són causa de RP en diverses famílies i 3 casos esporàdics (Chakarova et al., 2002; Wada et al., 2004); i en aquest treball es presenta una nova família amb una mutació ja descrita. Totes les mutacions anteriors estan localitzades en codons adjacents altament conservats situats a l'exó 11. Aquest domini proteic és únic a les bases de dades, i la seva funció específica és desconeguda. Com hPrp31, hPrp3 és un component del snRNP U4/U6 (Wang et al., 1997). En mamífers, es pensa que hPrp3 recluta a hPrp4 cap a la snRNP U4/U6 (Figura 15) (González- Santos et al., 2002).

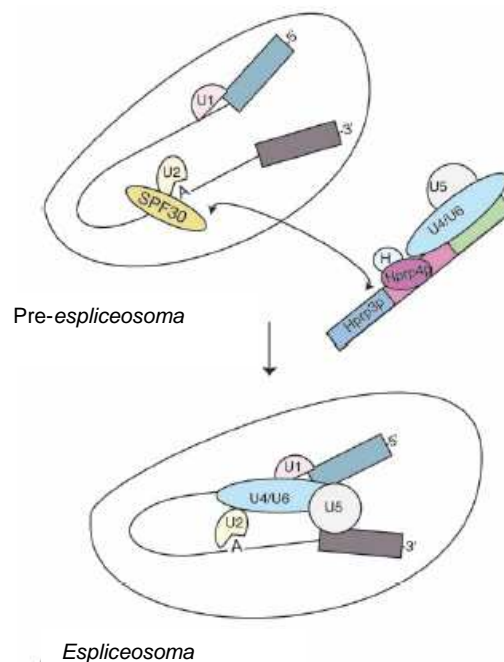


Figura 15. Paper de l'hPrp3 en el processament del pre-mRNA. Diagrama que mostra una representació simplificada de la transició del pre-esplíceosoma fins a l'esplíceosoma, indicant el possible paper de l'Hprp3p en aquest procés a través de la seva associació amb altres components de l'esplíceosoma. [De: Gonzalez-Santos et al. Central region of the human *splicing* factor Hprp3p interacts with Hprp4p. *J Biol Chem.* 2002; 277(26):23764-72.]

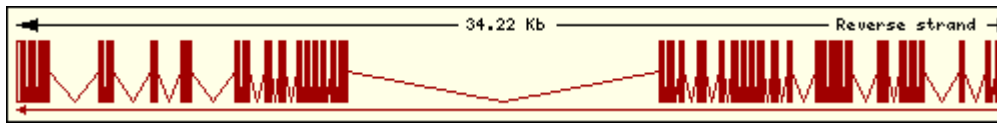
hPrp3 i hPrp4 són homòlegs de les proteïnes de llevat específiques de la snRNP U4/U6. En llevat, *PRP3* i *PRP4* interaccionen genèticament, i es requereixen les interaccions físiques entre les proteïnes Prp3p i Prp4p per a l'associació de Prp3p i Prp4p amb U4/U6 (Ayadi et al., 1998).

Altres estudis recents (Maita et al., 2005) han mostrat que una altra proteïna associada a *splicing*, PAP-1, interacciona amb hPrp3 però no amb hPrp31 en cèl·lules humanes i llevats, i que la regió bàsica de PAP-1 i la regió terminal d'hPrp3, regions on s'han trobat mutacions associades a RPAD, són necessàries per a la unió. A més a més, es va trobar que tant hPrp3 com una part de PAP-1 eren components del complex tri-snRNP U4/U6.U5, una de les formes de l'*spliceosoma*, en cèl·lules Ba/F3 i K562, suggerint que PAP-1 està unida dèbilment a l'*spliceosoma*. Això també suggereix que els factors de *splicing* implicats en RPAD contribueixen sols o mútuament a un *splicing* adequat a la retina i que la pèrdua de les seves funcions porta al desencadenament de la RPAD.

Mutacions al factor de *splicing* hPrp8 associades a RPAD

El gen *PRPF8* és l'homòleg del factor de processament del pre-mRNA Prp8p de llevat. Està localitzat al locus RP13, a la regió cromosòmica 17p13. Consta de 43 exons (Luo et al., 1999) (Figura 16A), però el primer exó no es tradueix. Els 42 exons restants codifiquen una proteïna de 2335 aminoàcids (Figura 16B) i 220 kDa. Com a referència, anomenem exó 1 al primer exó que es tradueix.

A.



B.

```

1  MAGVFPYRGPGNPVPGLAPLPDYMSEEEKLQEKARKWQQLQAKRYAEKRKFGFVDAQKED
61  MPPEHVRKIIRDHGDMTNRKFRHDKRVYLGALKYMPHAVLKLLENMMPWQEQRDVPVLY
121 HITGAISFNEIPWVIEPVYISQWGSWIMMRREKRDRRHFKRMRFPPFDDDEEPLDYAD
181 NILDVEPLEAIQLELDPEEDAPVLDWFYDHDQPLRDSRKYVNGSTYQRWQFTLPMSTLYR
241 LANQLLTDLVDNDFYFLFDLKAFFTSKALNMAIPGGPKFEPLVRDINLQDEDDNEFNNDIN
301 KIIIRQPIRTEYKIAFPYLYNNLPHHVHLTWYHTPNVVFIKTEDPDLPAFYFDPLINPIS
361 HRHSVKSQEPLPDDDEEFELPEFVPEFLKDTPLYTDNTANGIALLWAPRPFNLRSRTRR
421 ALDIPLVKNWYREHCPAGQPVKVRVSYQKLLKYVNLALKHRPPKAQKKRYLFRSFKATK
481 FFQSTKLDWVEVGLQVCRQGYNMLNLLIHRKNLNLVHLDYFNFLKPVKTLTKERKRSR
541 GNAFHLCREVLRLTKLVVDSHVQYRLGNVDAFQLADGLQYIFAHVQQLTGMRYKYKLMR
601 QIRMCKDLKHLIYRFNTGPVKGPGCGFWAAGWRVWLFPMRGIPTLLERWLGNLLARQF
661 EGRHSGVAKTVTKQRVESHFDELRRAVMHDILDMMPGKIQNKARTIQLHLSSEAWRCW
721 KANIPKVPGLPTPIENMILRYVKAKADWWTNTAHYNRERIRRGATVDKTVCKKNLGRLL
781 RLYLKAEQERQHNYLKDGPYITAEAEAVVYTTVHWLESRRFSPFPFPLSYKHDTKLLI
841 LALERLKEAYSVKSRNLNQSREELGLIEQAYDNPHEALSRIKRHLLTQRAFKEVGI EFMD
901 LYSHLPVVDVEPLEKITDAYLDQYLWYEA DKRRLFPWPWKPADTEPPPLLVYKWCQGIN
961 NLQDVWETSEGECEVMLESRFEKMYEKIDLTLLNRLRLRIVDHNIAIDYMTAKNNVVINYK
1021 DMNHTNSYGIIRGLQFASFIVQYYGLVMDLLVGLHRASEMAGPPQMPNDFLSFQDIATE
1081 AAHPIRLFCRYIDRIHIFRFTADEARDLIQRYLTEHPDPNNENIVGYNNKCCWPRDARM
1141 RLMKHVDVNLGRAVFDWIKNRLPRSVTTVQWENSFVSYSKDNPNLLFNMGFECEIRLIPKC
1201 RTSYEEFTHKDGWVNLQNEVTKERTACFLRVDDDESMQRFHNRVRQILMASGSTTFTKIV
1261 NKWNTALIGLMTYFREAVVNTQELLDLLVKCENKIQTRIKIGLNSKMPSRFPVVVYTPK
1321 ELGGLGMLSMGHVLI PQSDLRWSKQTDVGI THFRSGMSHEEDQLIPNLRYIQPWESEFI
1381 DSQRVWAEYALKRQEAIQAQNRRLTLEDLEDSDWRGIPRINTL FQKDRHTLAYDKGWRVRT
1441 DFKQYQVLKQNPFWWTHQRHDGKLWNLNRYRTDMIQALGGVEGILEHTLFGTYFPTWEG
1501 LFWEKASGFEEEMKWNKLTNAQRSGLNQIPNRRFTLWWSPTINRANVYVGFQVQLDLTGI
1561 FMHGKIPTLKI SLIQIFRAHLWQKIHESI VMDLCQVFDQELDALEIETVQKETIHPKSY
1621 KMNSCADILLFASYKWNVSRPSLADSKDVMDSSTTQKYWIDIQLRWGDYDSDHIERYA
1681 RAKFLDYTTDNMSIYPSPTGVLIAIDLAYNLHSAYGNWFPGSKPLIQQAMAKIMKANPAL
1741 YVLRERIRKGLQLYSSEPT EPYLSSQNYGELFSNQI IWFVDDTNVYRVTIHKTFEGNLT
1801 KPINGAIFIFNPRTGQLFLKI IHTSVWAGQKRLGQLAKWKTAEVAALIRSLPVEEQPKQ
1861 IIVTRKGMLDPLEVHLLDFPNIVIKGSELQLPFQACLKVEKFGDLILKAT EPQMVLFNLY
1921 DDWLKTISSYTAFSRLILILRALHVNNDRAKVILKPKD TTI TEPHHIWP TLTDEEWIKVE
1981 VQLKDLILADYGKKNVNVASLTQSEIRDILGMEI SAPSQQRQQAIEIEKQTKEQSOLT
2041 ATQTRTVNKHGDEIITSTTSNYETQTFSSKTEWRVRAISAANLHLRTNHIYVSSDDIKET
2101 GYTYILPKNVLKKFICISDLRAQIAGYLYGVSPDPNPQVKEIRCI VMVPQWGTHTVHLP
2161 GQLPQHEYLKEMEP LGWIHTQPNESPQLSPQDVTTHAKIMADNPSWDGEKTIITCSFTP
2221 GSCTLTAYKLTPSGYEWGRQNTDKGNPKGYLPSHYERVQMLLSDRFLGFFMVPQAQSSWN
2281 YNFMGVRHDPNMKYELQLANPKEFYHEVHRPSHFLNFAL LQEGEVYSADREDLYA
    
```

C.

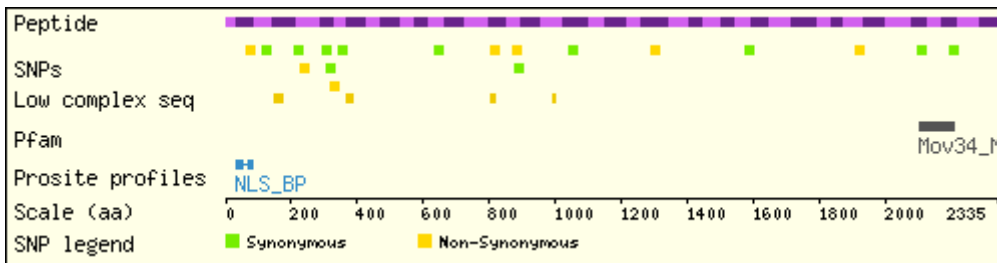


Figura 16. Estructura del gen *PRPF8* i de la proteïna que codifica. (A) Estructura del transcrit del gen *PRPF8* [Ensembl Gene Report for ENSG00000174231]. (B) Seqüència de la proteïna codificada i (C) Esquema dels diferents dominis de la proteïna hPrp8 i els SNPs trobats [Ensembl Protein Report for ENSP00000304350]

El locus RP13 va ser identificat per primer cop per mapatge de lligament (Kojis et al., 1996) en una família sud-africana d'ancestres britànics. Es va confirmar més tard amb la identificació de dues famílies més, lligades a RP13, una dels Estats Units i l'altra del Regne Unit (Tarttelin et al., 1996). El fenotip de la família anglesa eral de RP clàssica amb inici de la malaltia relativament precoç i un pronòstic sever en comparació amb altres formes de RP. Els individus afectats presentaven ceguesa nocturna i pèrdues de camp visual als 5 anys de vida, perdent completament la visió cap als 30 anys. Anàlisis d'haplotip a la família sud-africana van localitzar el locus RP13 en un interval de 3 cM, el que distingia genèticament aquest locus d'altres *loci* responsables de malalties de l'ull localitzats en aquesta regió.

Mutacions al *PRPF8* provoquen una forma severa de RP (McKie et al., 2001). Han estat identificades set mutacions diferents en tres famílies i quatre individus amb un historial de RP autosòmica dominant (McKie et al., 2001; van Lith-Verhoeven et al., 2002). A més, en el nostre grup (Martínez-Gimeno et al., 2003) hem trobat quatre mutacions noves en quatre famílies i una ja descrita recentment. Totes aquestes mutacions estan localitzades a l'exó 42.

Prp8 és una de les proteïnes nuclears més grans i més conservades essent idèntica en un 62% en humans i *S.cerevisiae*. Ocupa una posició central en el core catalític de l'*spliceosoma* i està implicada en diversos reordenaments que hi tenen lloc. Prp8p és un component del snRNP U5 (Lossky et al., 1987; Stevens et al., 2001) i del tri-snRNP U5·U4/U6 (Teigelkamp et al., 1997; Gottschalk et al., 1999; Stevens & Abelson 1999). Se sap que fa contacte directe amb ambdós llocs de *splicing* 5' i 3' i també amb els snRNAs U6 i U5 (Wyatt et al., 1992; Teigelkamp et al., 1995; Vidal et al., 1999). Es pensa que Prp8 proporciona suport estructural general per al core catalític i modula les activitats RNA helicases que controlen els extensius reordenaments d'aparellaments RNA:RNA requerits per a activar l'*spliceosoma* (Collins & Guthrie, 2000).

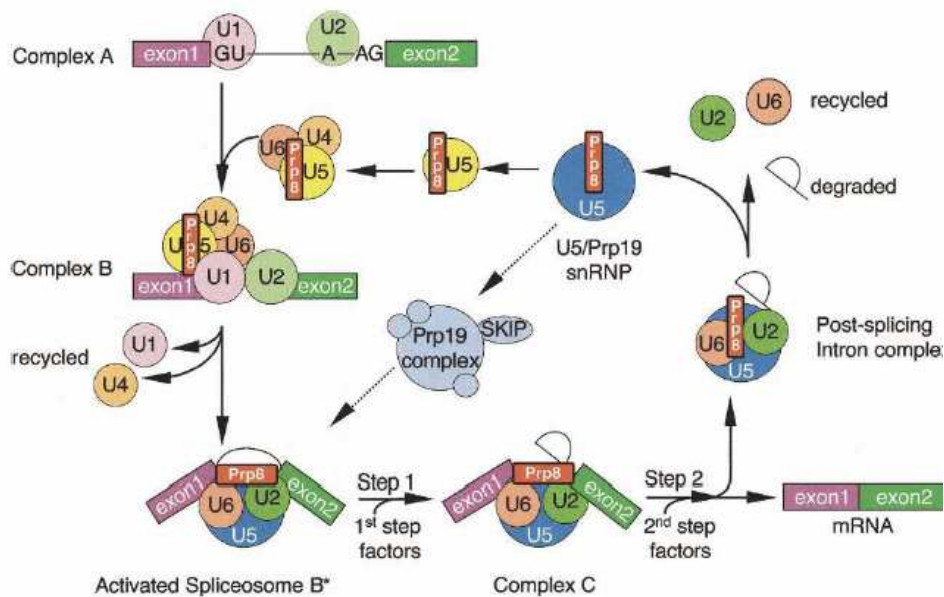


Figura 17. Diagrama esquemàtic que mostra l'ensamblatge i el reciclatge dels components de l'esplíceosoma respecte a Prp8 (rectangular, taronja). Els llocs de *splicing* 3' i 5' conservats representen els residus U2 cis-esplíceosomals GU i AG, respectivament. Prp8 ha estat trobat en dos complexes U5 diferents: al snRNP U5 (petit, groc) i al snRNP més gran U5/Prp19 (gran, blau). [De: Grainger and Beggs. Prp8 protein: At the heart of the spliceosome. *RNA*. 2005; 11: 533-557]

Prp8p està present en molts confòrmers de l'esplíceosoma durant el cicle de *splicing* i també és funcional en tres tipus diferents d'esplíceosomes: L'esplíceosoma clàssic U2, l'esplíceosoma U12 (Luo et al., 1999) (que processa introns del tipus U12, amb senyals de *splicing* no canònics, AU-AC en comptes dels senyals canònics GU-AG), i el trans-esplíceosoma en el qual el snRNP U1 és reemplaçat funcionalment pel snRNP "spliced leader" (SL) (Maroney et al., 1996, 2000; Lucke et al., 1997; Mair et al., 2000). No hi ha evidència de cap altre domini proteic específic d'U12 o trans-*splicing* addicional, suggerint que Prp8p funciona d'una forma similar en cada tipus d'esplíceosoma.

El remarcable "clustering" de les mutacions documentades fins a l'actualitat identifica un domini funcional específic, però encara està per determinar si aquestes mutacions inactiven l'al·lel o bé creen una proteïna amb funció dominant negativa.

1. 4. Estratègies per a analitzar l'expressió gènica

L'expressió gènica, també coneguda com a *expressió proteica* o de vegades simplement *expressió*, és el procés mitjançant el qual la informació d'un gen es converteix en les estructures i funcions d'una cèl·lula.

L'expressió gènica és un procés amb molts passos, començant per la transcripció, modificacions post-transcripcionals i traducció, seguit pel plegament de proteïnes, modificacions post-traduccionals i processos diana. La quantitat de proteïna que expressa una cèl·lula depèn del teixit, estadi de desenvolupament de l'organisme i estat metabòlic o fisiològic de la cèl·lula.

Mesura de l'expressió gènica

Indirectament, l'expressió de determinats gens pot ser assajada amb la tecnologia dels *microarrays* de DNA, que ens pot donar un esborrany de la mesura de la concentració cel·lular de diferents mRNA, en alguns casos fins i tot de milers d'ells alhora.

Normalment a aquest tipus d'assaig se'l denomina perfil d'expressió. Aquest nom no és del tot correcte ja que tot i que se sap que l'expressió de molts gens està regulada després de la transcripció, un augment de la concentració del mRNA no sempre implica un augment de l'expressió.

Un mètode més sensible i més exacte per a mesurar l'expressió gènica relativa és la PCR en temps real. Aquest mètode de vegades ens permet, amb una corba estàndard cuidadosament construïda, realitzar una quantificació absoluta de l'expressió (és a dir, en nombre de còpies de mRNA per nanolitre de teixit homogeneïtzat, per exemple, o en número de còpies de mRNA per RNA-poliA total).

Regulació de l'expressió gènica

La regulació de l'expressió gènica és el control cel·lular de la quantitat i temps d'aparició del producte funcional d'un gen. Qualsevol pas de l'expressió gènica pot estar modulats, des de la transcripció de DNA a RNA fins a la modificació post-traduccionals d'una proteïna. La regulació gènica dóna control cel·lular sobre l'estructura i la funció, i és la base per a la diferenciació cel·lular, la morfogènesi i la versatilitat i adaptabilitat de qualsevol organisme.

Sobreexpressió

La proteïna codificada per un gen pot ser expressada en una quantitat incrementada més del normal. Això es pot produir per un increment del nombre de còpies del gen o bé per un augment en la força d'unió de la seva regió promotora.

1. 4. 1. Mesura de l'expressió gènica mitjançant PCR en temps real

El sistema de PCR en temps real es basa en la detecció i quantificació d'un *reporter* fluorescent. Teòricament, hi ha una relació quantitativa entre la quantitat de mostra diana inicial i la quantitat de producte de PCR a qualsevol n^o de cicle. El senyal del *reporter* augmenta en una proporció directa a la quantitat de producte de PCR en una reacció.

Per tant, enregistrant la quantitat d'emissió de fluorescència en cada cicle, és possible monitoritzar la reacció de PCR durant la fase exponencial, on el primer augment significatiu en la quantitat de producte de PCR correlaciona amb la quantitat inicial de diana motlle.

La tècnica de PCR en temps real fa que la quantificació de DNA i RNA sigui més fàcil i més precisa que amb altres mètodes més antics.

1. 4. 2. Mesura de l'expressió gènica utilitzant *microarrays* de DNA

La seqüenciació automàtica del genoma humà ha permès que hi hagi un gran desenvolupament en la medicina molecular. Tot i així, no només s'ha de conèixer la seqüència dels gens sinó que també és necessari conèixer la funció d'aquests, com funciona la cèl·lula, com les cèl·lules formen els organismes, quins canvis condueixen a una malaltia, etc. Una forma d'aprofundir en aquests coneixements és mitjançant estudis comparatius de l'expressió gènica. Només una fracció dels gens que conté una cèl·lula estan actius o "s'expressen" en un determinat moment, i diferències en l'expressió gènica són responsables de diferències morfològiques i fenotípiques.

En els darrers anys, els "bioxips" o *microarrays* de DNA s'han convertit en les eines que més universalment s'utilitzen per a l'anàlisi comparada de l'expressió gènica.

Un "*microarray*" (Schena, 2003) és un petit mecanisme analític que permet l'exploració amb una velocitat i precisió sense precedents a la història de la biologia. S'utilitzen uns xips de vidre que contenen desenes de milers de gens per tal d'examinar mostres fluorescents preparades mitjançant marcatge del mRNA de cèl·lules, de teixits, i d'altres mostres biològiques. Les molècules de la mostra fluorescent reaccionen amb seqüències conegudes del xip, provocant que cada punt llueixi amb una intensitat proporcional a l'activitat del gen expressat. L'enorme capacitat d'aquests mecanismes en miniatura permet l'anàlisi de tot el genoma humà en un sol experiment. Degut a que els patrons d'expressió gènica correlacionen fortament amb la funció, els *microarrays* en donen una informació sense precedents en les malalties humanes, envelliment, acció d'hormones i drogues, malalties mentals, dieta, i moltes altres qüestions clíniques. Els *microarrays* també poden ser utilitzats per a trobar alteracions en seqüències gèniques, obrint pas a una nova era del "screening" genètic, tests i diagnòstic.

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

Els objectius d'aquest treball s'inscriuen dins de la línia d'investigació sobre retinopaties hereditàries que es desenvolupa a l'Hospital de Terrassa. Recentment s'ha descobert que mutacions en gens d'expressió ubiqua, com els gens *PRPF*, que codifiquen factors de processament del pre-mRNA ("*splicing*") i formen part del complex "*esplíceosoma*", produeixen retinosi pigmentària autosòmica dominant (RPAD). Sorprenentment, aquestes mutacions només són patològiques a la retina. Així, es posa de manifest un nou mecanisme patològic que produeix retinosi pigmentària. El treball desenvolupat s'ha dirigit a investigar la presència d'aquestes mutacions a la població espanyola, així com els mecanismes patològics associats a RP provocats per diversos mutants del sistema de "*splicing*" cel·lular. El coneixement dels mecanismes patològics dels diferents mutants és el camí per a desenvolupar teràpies gèniques o farmacològiques per tal de curar la retinosi pigmentària, malaltia actualment incurable.

Els objectius concrets d'aquest treball són:

1. Anàlisi mutacional dels gens de *splicing* *PRPF3*, *PRPF8* i *PRPF31* en els pacients RPAD i SRP, quedant exclosos aquells pacients que ja presenten mutació en algun altre gen associat a RP (*RHO*, *RDS*, *NRL*, *CRX*, *RP1*, *FSCN2*). Correlació fenotip-genotip en els pacients que presenten mutació en els gens *PRPF* estudiats.
2. Estudi *in vitro* en cèl·lules eucariotes (COS-7) de l'efecte de mutacions en *cis* situades en llocs de *splicing* del gen *RHO* sobre el processament del pre-mRNA de *RHO*.
3. Establiment de línies limfoblastoides humanes a partir de sang de pacients que presenten mutació en el gen *PRPF8* per tal de poder esbrinar el mecanisme

patològic d'aquestes mutacions. En aquestes línies limfoblastoides es pretèn realitzar:

- a. Estudi *in vitro* del processament del gen *RHO* i els seus mutants en *cis* en les línies limfoblastoides portadores de mutacions en el gen *PRPF8*.
- b. Quantificació de l'expressió al·lèlica del gen *PRPF8* en les línies portadores de mutació.
- c. Estudi, mitjançant *microarrays*, de diferències quantitatives en l'expressió gènica en línies cel·lulars de pacients amb mutacions al gen *PRPF8* i d'individus control.

3. MATERIAL I MÈTODES

3. 1. Equipament general

3. 1. 1. Instruments i equips

Agitador magnètic Micromix (Ovan)

Autoclau (Spriand Española, S.A.)

Balança P1210 (Mettler)

Bany Termostàtic Frigiterm (P. Selecta)

Bany Termostàtic Ultraterm (P. Selecta)

Bloc tèrmic Tem-Bloc (P. Selecta)

Bomba peristàltica Minipuls 2 (Gilson)

Cabina de flux laminar de classe II. NU-425-400E (Nuaire)

Càmera fotogràfica UV GelCam (Polaroid)

Centrífugues de taula (Heraeus / Megafuge 1.0 / Hermle Z300)

Congeladors (-20°C / -80°C). (Edesa, Zanussi / Nuaire)

Contenedor de nitrogen líquid GT18 (Air Liquide)

Cubetes d'electroforesi per a gels d'agarosa (Ecogen)

Cubetes per alectroforesi vertical SE 600 (Hofer)

Espectrofotòmetre UV/Visible V-530 (Jasco)

Estufa B6760 (Heraeus)

Fonts d'alimentació. EPS Pegaso 100 (Genenco) / Atom 500 (Atom)

Formador de gradients SG Series (Hofer Scientific Industries)

Incubador de CO₂ NU-4750E (Nuaire)

LightCycler (Roche)

Microcentrífuga 202M (Sigma)

Microones (Micrologic)

Micropipetes de diferents volums (Nichiryo / Gilson)

Microscopi invertit AE300 (Motic)

Nucleofector™ II (Amaxa)

Seqüenciador Long-Read Tower™ System (Visible Genetics, Inc.)

Termociclador “Programmable Thermal Controller” (MJ Research, Inc.)

Termociclador de gradient DNA Engine PTC-200 (MJ Research, Inc.)

Termociclador Techne FPROG05D (Progene).

Transil·luminador Fluo-Link TFL-20M (Vilber Lourmat)

Vortex Genie 2 G-560E (Scientific Industries, Inc.)

3. 1. 2. Material de laboratori

Ampolles per a esterilització de 200 i 400 ml (Schott Duran / Simax)

Aspiradors de pipetes de seguretat per a 10 i 25 ml (Eurotubo, Deltalab)

Cambra de Neubauer (Marienfeld)

Flascons de cultiu cel·lular de 25 i 80 cm². Nunclon Surface (Nunc)

Flascons de cultiu cel·lular de 70 i 260 ml. Non-treated flasks (Nunc)

Microtubs de 0.2, 0.6 i 1.5 ml. (Multi / QSP)

Nanses de Digiralsky per a extensions (poliestirè) (Eurotubo, Deltalab)

Nanses de Kolle calibrades (Eurotubo, Deltalab).

Pipetes de serologia estèrils de 5,10 i 25 ml (Eurotubo, Deltalab)

Plaques de cultiu cel·lular. Multidishes Nunclon Surface, 6-wells (Nunc)

Plaques de cultiu cel·lular. Multidishes-non treated, 6-wells (Nunc)

Plaques de Petri estèrils. (Soria Genlab, S.A.)

Probetes peu hexagonal de diferents volums (polipropilè) (Azlón)

Puntes estèrils amb filtre (Sorenson / Bioscience, Inc.)

Tubs de centrifuga de 15 ml (polibutadiè estirè) i 50 ml (polipropilè) (Nunc)

Vasos de precipitat de diferents volums (polipropilè). (Azlón)

3. 1. 3. Material fungible

40% Acrilamida/Bisacrilamida (37.5:1) (Bio-Rad)

Acetat sòdic 3 M pH5.0 (Merck)

Agarosa (Ecogen / Cambrex)

Aigua destil·lada (BBraun)

Ampicil·lina sòdica (Normon)

Blau Tripà (Gibco)

Bromur d'etidi (Amresco)

Cèl·lules competents "JM-109 Competent Cells" (Promega)

Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade (Roche)

DMEM High Glucose with L-Glutamine (PAA Laboratories)

DMSO (Amresco)

Encebadors sintètics varis (Tib Molbiol, Roche)

Enzims de restricció varis (Fermentas/ New England Biolabs)

Etanol absolut (Merck)

FCS "Gold" (PAA Laboratories)

Formamida líquida (Roche)

Fosfatasa Alcalina (Roche)

Glicerol (Boehringer Mannheim)

Isopropanol (AppliChem)

Kit d'aïllament de DNA plasmídic a gran escala "Hi Speed Plasmid Purification Kit"
(QIAGEN)

Kit d'aïllament de DNA plasmídic a petita escala "QIAprep Miniprep Kit" (QIAGEN)

Kit d'electroporació "Human B Cell Nucleofector Kit" (Amaxa)

Kit d'extracció de DNA "Generation Capture Column Kit" (Gentra Systems)

Kit d'extracció de RNA "Total RNA Isolation Kit, Purescript" (Gentra Systems)

Kit de clonació "TOPO TA Cloning Kit For Sequencing" (Invitrogen)

Kit de lligació "Rapid DNA Ligation Kit" (Roche)

Kit "Ecotaq" (Ecogen)

Kit "Expand Long Template PCR System" (Roche)

Kit de purificació de producte de PCR "QIAquick Gel Extraction Gel" (QIAGEN)

Kit de purificació de producte de PCR "QIAquick PCR Purification Kit" (QIAGEN)

Kit de retrotranscripció "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" (Roche)

Kit de RT-PCR "OneStep RT-PCR Kit" (QIAGEN)

Kit de seqüenciació "Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit" (Amersham Biosciences)

Kit de transfecció cel·lular "FuGENE 6 Transfection Reagent" (Roche)

LB Agar, pols (Lennox L Agar)(Invitrogen)

L-Glutamina 200 mM (PAA Laboratories)

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche)

Línia cel·lular COS-7 (ECACC No. 87021302)

Línies cel·lulars limfoblastoides transformades amb EBV, CAR0001, 0002, 0003, 0004, 0005 (ECACC)

Marcadors de pes molecular de 100 pb i 1 kb (Biotools)

PBS (Amresco)

Penicil·lina/estreptomicina 100X (PAA Laboratories)

PSA (Amresco)

RPMI 1640 with L-Glutamine (PAA Laboratories)

RQ1 RNase-Free DNase I (Promega)

S.O.C. Medium (Invitrogen)

Tampó de càrrega per electroforesi "6x Agarose Gel Loading dye" (Amresco)

Tampó TAE (Amresco)

Tampó TE (Amresco)

TB, pols (Gibco BRL®)

TEMED (Sigma)

Tripsina-EDTA (PAA Laboratories)

Urea (Roche)

Vector d'expressió "pCI-neo Mammalian Expression Vector" (Promega)

3. 2. Pacients i famílies estudiades

L'estudi s'ha realitzat amb pacients afectats de retinosi pigmentària que es van visitar a l'Hospital de Terrassa. A l'estudi també es van incloure mostres de DNA de casos índex de famílies amb retinosi pigmentària autosòmica dominant que van ser remesos des dels centres de la xarxa EsRetNet: Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona), Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona), Ciutat Sanitària i Universitària Vall d'Hebron (Barcelona), Fundación Jiménez Díaz (Madrid), Hospital Virgen del Rocío (Sevilla), Hospital Universitario La Fe (València), i des d'altres centres hospitalaris d'Espanya: Hospital Miguel Servet (Zaragoza) i Hospital de Basurto (Bilbao). A més també van participar 50 pacients de l'Escheie Eye Institute de la Universitat de Pennsylvania (USA).

Tots els pacients van ser estudiats pel que fa als aspectes genètics com oftalmològics i electrofisiològics segons els protocols del Grup Internacional d'Estudi de la RP.

Per a l'estudi genètic molecular, es va extreure DNA a partir de sang perifèrica de tots els pacients. L'anàlisi de mutacions es va dur a terme en els casos índex de cada família. En els casos en els quals es va detectar alguna mutació es va procedir a l'estudi de la co-segregació de la mutació amb la malaltia en la resta de familiars.

En total es van estudiar 200 pacients pertanyents a famílies amb RP autosòmica dominant.

3. 3. Estudi clínic dels pacients

Els pacients van acudir als serveis d'Oftalmologia, en els quals se'ls va realitzar un estudi complet per tal de poder determinar el tipus de patologia retiniana present.

L'estudi clínic consta d'un examen oftalmològic i d'un examen electrofisiològic.

3. 3. 1. Examen oftalmològic

L'examen oftalmològic consisteix en una anamnesi familiar (a), que ens permet averiguar els antecedents oftalmològics i generals del pacient, i una exploració oftalmològica del pacient (b).

a) Anamnesi familiar

1. Antecedents oftalmològics relacionats amb RP:

1. Edat de diagnòstic
2. Edat d'inici de la ceguesa nocturna
3. Edat d'inici dels símptomes de disminució del camp visual
4. Edat d'inici de la disminució de l'agudesa visual
5. Altres símptomes (fotofòbia, alteració dels colors, fotòpsies,...)
6. Altres antecedents oftalmològics (cataractes, etc...)

2. Antecedents sistèmics: Antecedents generals, i específicament hipoacúsies, endocrinopaties, obesitat, malformacions congènites i altres malalties associades a les formes sindròmiques de RP.

b) Exploració oftalmològica del pacient:

- **Agudesa visual:** La mesura es realitza mitjançant un projector d'optotipus de lluminositat variable de la casa comercial General Óptica, model EP 615-R calibrat per tal de prendre la visió a una distància equivalent a 5 m.

- **Refracció:** Els pacients l'agudesa visual dels quals estava per sota de 0.05 van ser explorats mitjançant refractòmetre automàtic Luneau L 60 Keratoref, per tal de poder conèixer en tots els casos el defecte de refracció dels pacients.
- **Biomicroscòpia del segment anterior:** Només s'han inclòs a l'estudi les troballes del cristal·lí (tot i que s'hagin explorat les parpelles, conjuntiva, còrnia, cambra anterior, iris i cristal·lí). S'han descrit la localització de les opacitats o tipus de cataracta. El model de làmpara utilitzat és el Takagi SM-12H.
- **Motilitat ocular extrínseca:** A tots els pacients se'ls va explorar realitzant-los un *cover test*, estudi de duccions, versions i vergències.
- **Pupil·les:** S'ha estudiat la forma, mida, simetria, reflex fotomotor directe i consensual de les pupil·les de tots els pacients.
- **Pressió intraocular:** Als pacients més gran de 15 anys se'ls va mesurar la pressió intraocular mitjançant la tonometria d'aplanament amb un tonòmetre Perkins, prèvia instil·lació de gotes Fluortest® .
- **Camp visual:** S'ha explorat el camp visual amb el programa nº 24 del campímetre Octopus 500, que realitza una campimetria estàtica; primer dels 30º centrals , amb la correcció que necessiti el pacient per a prop, i després fins als 60º nasals i 90º temporals. Utilitza estímul supraumbral i una densitat homogènia de punts en tot el camp. Els resultats s'exposen en valors absoluts, valors comparats amb el patró normal en cada edat i escala de grisos.
- **Fons d'ull :** S'ha realitzat amb l'oftalmoscopi indirecte model Clement Clarke Ultra 50 i lents de 20 i/o 28 en tots el casos. Sempre després de dil·latar amb col·liri de tropicamida i de vegades també fenilefrina o amb

ciclopègic en els casos en els que s'havia de realitzar una refracció en les condicions esmentades.

La descripció dels dipòsits de pigment en els casos on hi eren presents es classifica segons la forma de pigment, la seva localització i la quantitat:

- Forma del pigment:
 - Osteoclasts o espícules
 - Arrodonit
- Localització:
 - Difós / regional
 - Mitja perifèria / perifèria
 - Pol posterior / quadrants
 - Paravascular
- Quantitat:
 - Escàs / mig / abundant

Notes:

Anomenem “difós” a una disposició generalitzada del pigment en 360°, si bé no necessàriament ocupa la totalitat de la retina (pol posterior, mitja perifèria i perifèria), sinó que en qualsevol d'aquestes localitzacions o en més d'una es troba en tots els quadrants.

“Regional” es refereix a una localització restringida a dos quadrants com a màxim, en qualsevol de les seves localitzacions.

Anomenem “sectorial” a la disposició que només es troba en un quadrant, sobretot a l'inferonasal i es manté així sense estendre's.

- **Test de colors:** S'han utilitzat els tests 28 HUE de Roth i 15 HUE Désaturé de Lanthon, ambdós segons Farnsworth- Munsell. Només es van realitzar en els pacients que presentaven alteració en la percepció de colors.
- **Angiofluoresceingrafia i SLO (Oftalmoscòpia d'escàner làser):** Va ser realitzada quan es va considerar necessari per al diagnòstic de maculopatia.

3. 3. 2. Examen electrofisiològic

- **ERG (electroretinografia):** L'estudi protocolaritzat inclou un electroretinograma de camp complet i estímul difós amb flash a la cúpula de Ganzfeld seguint les normes internacionals del "*International Standarization Committee for Electrophysiology of the Vision*" (ISCEV)

Els tipus de respostes enregistrades van ser:

- Resposta de bastons
 - Resposta màxima o mixta de bastons i cons
 - Potencials oscil·latoris
 - Resposta de cons o flashos aïllats
 - Resposta de flicker de 30 Hz
- **Altres:** En alguns casos es va realitzar electrooculograma i potencials evocats visuals (en alguns casos d'ERG no enregistrable, com a mesura de la funció visual residual)

3. 4. Estudi genètic molecular

El protocol seguit per a l'estudi genètic directe de gens de *splicing* associats a RP en pacients afectats de RPAD va ser el següent:

- Extracció de DNA genòmic a partir de sang perifèrica del pacient.
- Amplificació, mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), dels exons o fragments escollits.
- Cribatge de mutacions i polimorfismes mitjançant la tècnica de *DGGE* (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*).
- Seqüenciació automàtica en els casos que es va detectar un patró alterat a la *DGGE*.

Els gens que es van sotmetre a l'estudi genètic directe presentats en aquesta Tesi Doctoral són els següents:

Taula III. Gens analitzats en aquesta Tesi Doctoral.

Gen	Locus	Nº accés (GenBank)	Proteïna codificada
<i>PRPF3</i>	1q21.2	NM_004698	hPrp3; Homòleg humà del factor 3 de processament del pre-mRNA de llevat
<i>PRPF8</i>	17p13.3	NM_006445	hPrp8; Homòleg humà del factor C8 de processament del pre-mRNA de llevat
<i>PRPF31</i>	19q13.42	NM_015629	hPrp31; Homòleg humà del factor 31 de processament del pre-mRNA de llevat

3. 4. 1. Extracció de DNA genòmic a partir de sang perifèrica

L'extracció de DNA a partir de sang perifèrica es va realitzar segons el protocol del kit "Generation® Capture Column Kit" de la casa comercial Gentra Systems:

Preparació

1. Pre-escalfar un bloc tèrmic a 99°C.
2. Per a cada mostra que s'ha de processar és necessari: 1 columna "Generation® Capture Column" continguda en un tub blau de residus "Waste Collection Tube", 1 tub blau addicional "Waste Collection Tube" i un tub col·lector "DNA Collection Tube". Cal retolar tots els tubs.

Purificació de la mostra

1. Afegir 200 µl de sang a la columna, tocant el centre de la matriu amb la pipeta. Deixar absorbir la mostra a temperatura ambient al menys durant 1 minut i com a màxim fins a 1 hora. La mostra no ha de saturar completament la columna.
2. Afegir 400 µl de la Solució 1 (DNA Purification Solution) i incubar 1 minut a temperatura ambient. La solució començarà a caure dins del tub blau durant la incubació.
3. Centrifugar 10 segons a 2000-12000 g. Recollir un residu de 600 µl al tub blau.
4. Transferir la columna al segon tub blau.
5. Afegir 400 µl més de Solució 1 i incubar 1 minut a temperatura ambient.
6. Centrifugar 10 segons a 2000-12000 g; es recull un residu de 400 µl. La matriu de la columna hauria de ser blanca o gairebé blanca.
7. Afegir 200 µl de Solució 2 (DNA Elution Solution); no es requereix incubació.
8. Centrifugar 10 segons a 2000-12000 g per a recollir 200 µl més de residu. La matriu que conté el DNA purificat ha de ser blanca.

Elució de la mostra

1. Transferir la columna a un tub d'1,5 ml i descartar el segon tub blau que conté 600 µl de solució residual.
2. Afegir 50-200 µl de Solució 2 i incubar durant 10 minuts en un bloc pre-escalfat a 99°C. Col·locar el tub de tal manera que la columna estigui completament continguda dins del bloc tèrmic per a assegurar un escalfament adient.
3. Centrifugar 20 segons a 2000-12000 g immediatament després del pas d'escalfament per a alliberar el DNA purificat de la columna. Els 200 µl de solució de DNA haurien d'aparèixer transparents.
4. Descartar la columna. El DNA purificat està llavors preparat per a ser analitzat.

3. 4. 2. Quantificació d'àcids nucleics

Els àcids nucleics absorbeixen llum a longituds d'ona d'entre 250-270 nm, amb un màxim a 260 nm. La lectura a 260 nm permet el càlcul de la concentració d'àcid nucleic a una mostra de DNA o RNA.

Una DO (densitat òptica) de valor 1 correspon aproximadament a 50 µg/ml de DNA de doble cadena i a 40 µg/ml de DNA de cadena senzilla o RNA.

La relació entre les lectures a 260 nm i 280 nm ens dóna una estimació de la puresa de l'àcid nucleic. Les preparacions pures de DNA i RNA tenen relacions de 1.8 i 1.95, respectivament. Un DNA amb una relació 260/280 per sota de 1.6 hauria de ser re-purificat.

3. 4. 3. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) es van amplificar les regions codificants i seqüències flanquejants dels exons dels gens analitzats. El volum de reacció va ser, en tots el casos, de 50 µl. Els reactius utilitzats a la reacció de PCR es mostren a continuació:

Component	Volum	Conc. final
Tampó de reacció (10x)	5 µl	1x
MgCl ₂ (50mM)	1.5 µl	1.5 mM
Mescla dNTPs (10 mM)	1 µl	0.2 mM
Encebadors F/R (25µM)	1 µl c/u	0.5 µM c/u
DNA polimerasa (5 U/µl)	0.5 µl	2.5 unitats
Aigua destil·lada	Variable	-
DMSO (optatiu)	5 µl	10%
DNA motlle	2 µl	10 pg-1µg
Volum total	50 µl	

Es van analitzar els exons 11, 42 i 8 dels gens *PRPF3*, *PRPF8* i *PRPF31*, respectivament.

Es van dissenyar encebadors específics de les regions a amplificar. Les característiques del encebadors es mostren a continuació:

Taula IV. Encebadors utilitzats per a cadascun dels fragments analitzats i mida dels fragments obtinguts.

Gen	Exó	Amplicó (pb)	Encebadors
<i>PRPF3</i>	11	344	<i>Sense: 5'-GC-TCCAGCTGGAGAAGTGA</i> <i>Antisense: 5'-CCACAAGTGAGAAAGGCATT-3'</i>
<i>PRPF8</i>	42	344	<i>Sense: 5'-GC-GATAGCAGTAGGGATAAGGTGAG-3'</i> <i>Antisense: 5'-GCTGAAGCAGGAGGCAGGGAAAC-3'</i>
<i>PRPF31</i>	8	282	<i>Sense: 5'-GC-CCCCACCTCTCTGCTTTCTTCT-3'</i> <i>Antisense: 5'-GGAGGGGCCATGACGCAGTG-3'</i>

(GC: 5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCGC-3')

Les condicions de PCR van ser les mateixes per a tots tres exons:

- 1) Pre-incubació "Hot start" a 94°C, 5 minuts
 - 2) Desnaturalització a 94°C, 30 segons
 - 3) Anellament a 58°C, 30 segons
 - 4) Extensió a 72°C, 30 segons
 - 5) Desnaturalització a 94°C, 5 minuts
 - 6) Extensió final a 72°C, 5 minuts
 - 7) Final a 15°C
- durant 40 cicles

3. 4. 4. Electroforesi en gel d'agarosa

L'electroforesi en gel d'agarosa s'utilitza per a separar molècules de DNA segons el seu pes molecular. El rang de separació de les molècules de DNA depèn de la concentració d'agarosa utilitzada (Taula V).

Taula V. Rang de separació en gels que contenen diferents quantitats d'agarosa [De: Sambrook, Fritsch & Maniatis. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989]

Quantitat d'agarosa al gel (% p/v)*	Rang eficient de separació de molècules de DNA linials (kb)
0.3	5 - 60
0.6	1 - 20
0.7	0.8 - 10
0.9	0.5 - 7
1.2	0.4 - 6
1.5	0.2 - 3
2.0	0.1 - 2

*(% p/ v): percentatge en pes per volum.

Preparació d'un gel d'agarosa:

1. Segellar el suport (on prepararem el gel) amb cinta adhesiva.
2. Col·locar una pinta, amb el nombre de pous necessaris, en un dels extrems del suport, deixant aproximadament un centímetre de distància respecte el marge superior.
3. Peser la quantitat d'agarosa necessària per a un determinat % i dissoldre-la en 50 ml de TAE 1X. Les quantitats d'agarosa necessàries per a cada % es mostren a continuació.

	0.7%	1.0%	1.5%	2.0%
Agarosa	0.35 g	0.5 g	0.75 g	1 g
TAE 1X	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
Volum total	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml

4. Escalfar la dissolució fins que l'agarosa hagi quedat totalment dissolta.
5. Afegir 1.5 µl de Bromur d'etidi (10 mg/ml) a la mescla i barrejar.
6. Abocar la mescla dins del motlle que hem preparat prèviament i deixar solidificar (aproximadament 15-20 minuts).
7. Un cop solidificat, treure la pinta i les cintes adhesives.
8. Col·locar el gel dins la cubeta d'electroforesi (que prèviament haurem omplert amb tampó TAE 1X). Cal assegurar-se de que el tampó cobreixi el gel.
9. Afegir tampó de càrrega a les mostres que volem analitzar i carregar uns 10-15 µl de mostra a cada pouet. A més carregarem també un marcador de pes molecular de 100 pb o d'1 kb, depenent de la mida esperada del fragment a analitzar.
10. Connectar la cubeta d'electroforesi a una font de voltatge (entre 80 i 100 volts) fins que s'ha aconseguit la separació desitjada.
11. Col·locar el gel sobre un transil·luminador UV i visualitzar les bandes obtingudes.
12. Fotografiar amb una càmera Polaroid (pel·lícula tipus 667) i analitzar el resultat obtingut.

3. 4. 5. Purificació de producte de PCR

S'han utilitzat alternativament dos tipus de purificació de producte de PCR. En el primer tipus s'utilitza unalectroforesi en gel d'agarosa per a purificar la banda que desitgem (en el cas que hi hagi bandes inespecífiques que volem eliminar) i en el segon es purifica el producte de PCR directament. Aquest últim s'ha utilitzat quan el producte de PCR obtingut és molt específic i no presenta, en un gel d'agarosa, bandes contaminants.

a) Purificació de producte de PCR a partir d'un gel d'agarosa

El producte de PCR que s'ha de purificar es fa córrer en unalectroforesi en gel a l'1,5% d'agarosa de baixa temperatura de fusió. S'utilitza el kit "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN). El protocol següent és el següent:

1. Tallar el fragment de gel que conté la banda de DNA desitjada amb un bisturí net i introduir-lo en un microtub d'1,5 ml.
2. Afegir 3 volums de tampó QG per cada volum de gel (100 mg ~ 100 µl).
3. Incubar a 50°C durant 10 minuts (o fins que el gel s'ha dissolt completament). Per tal de facilitar la dissolució del gel, aplicar vòrtex cada 2-3 minuts durant la incubació.
4. Una vegada s'ha dissolt el gel completament, comprovar que el color de la barreja és groc (similar al tampó QG sense agarosa dissolta). Si el color de la barreja és taronja o violat, afegir 10 µl d'acetat sòdic 3M, pH 5.0 i barrejar. L'adsorció del DNA a la membrana QIAquick és eficient només a pH $\leq 7,5$. El tampó QG conté un indicador de pH que és groc a pH $\leq 7,5$ i taronja o violat a pH més elevat, permetent la fàcil determinació del pH òptim per a la unió del DNA.
5. Afegir un volum d'isopropanol a la mostra i barrejar.
6. Col·locar una columna QIAquick en un tub col·lector de 2 ml.

7. Per tal d'unir el DNA, aplicar la mostra a la columna i centrifugar durant 1 minut.

Nota: Tots els passos de centrifugació es porten a terme a 13000 r.p.m.

8. Descartar el sobrenedant i col·locar la columna de nou al mateix tub col·lector

9. (Opcional): Afegir 0,5 ml de tampó QG a la columna per eliminar qualsevol resta d'agarosa, i centrifugar durant 1 minut.

10. Per rentar, afegir 0,75 ml de tampó PE a la columna i centrifugar durant 1 minut.

11. Descartar el sobrenedant i centrifugar la columna durant 1 minut més.

12. Col·locar la columna dins d'un microtub d'1,5 ml.

13. Per eluir el DNA, afegir 50 µl de tampó EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) o aigua al centre de la membrana i centrifugar la columna durant 1 minut.

b) Purificació directa de producte de PCR

S'utilitza "QIAquick PCR Purification Kit" per tal de purificar el producte de PCR directament sense haver de passar per una electroforesi en gel d'agarosa.

1. Afegir 5 volums de Buffer PB a 1 volum de la mostra de PCR i barrejar.

2. Col·locar una columna QIAquick en un tub col·lector de 2 ml proporcionat al kit.

3. Per tal d'unir el DNA, aplicar la mostra en la columna QIAquick i centrifugar durant 30-60 segons.

Nota: Tots els passos de centrifugació es porten a terme a 13000 r.p.m.

4. Descartar el volum sobrant. Col·locar la columna de nou en el mateix tub.

5. Per a rentar, afegir 0.75 ml de Buffer PE a la columna QIAquick i centrifugar durant 30-60 segons.

6. Descartar el volum sobrant i col·locar la columna de nou en el mateix tub.
Centrifugar la columna durant 1 minut més

Important: L'etanol residual del Buffer PE no serà completament eliminat a menys que el volum sobrant sigui totalment descartat abans de la centrifugació addicional.

7. Col·locar la columna QIAquick en un microtub d'1.5 ml net.
8. Per aluir el DNA, afegir 50 µl de Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) o aigua en el centre de la membrana de la columna i centrifugar durant 1 minut. Alternativament, per augmentar la concentració de DNA, afegir 30 µl de tampó d'elució en el centre de la membrana de la columna, deixar reposar durant 1 minut i després centrifugar.

3. 4. 6. Electroforesi en gel amb gradient desnaturalitzant (DGGE)

Els gels amb gradient desnaturalitzant es preparen barrejant dues dissolucions amb un percentatge d'agent desnaturalitzant conegut. En els nostre cas, els preparem a partir de dissolucions mare al 0%, 80% i 100% desnaturalitzant. Els reactius necessaris per a preparar 100 ml de dissolució són els següents:

Reactiu stock	Sol. 0%	Sol. 80%	Sol. 100%
Acrilamida 40% (acrilamida:bis-acrilamida 37,5:1)	20 ml	20 ml	20 ml
Tampó TAE 10X	10 ml	10 ml	10 ml
Formamida	-----	32 ml	40 ml
Urea	-----	34 g	42 g
Aigua destil·lada	fins a 100 ml	fins a 100 ml	fins a 100 ml

Notes:

100% desnaturalitzant equival a una concentració 7 M d'urea i 40% v/v de formamida.

Aquestes dissolucions mare han de ser emmagatzemades en recipients de vidre fosc a 4°C.

Preparació del gel:

1. Muntar la cambra amb els vidres i els espaiadors en el suport adequat. Els vidres han estat prèviament netejats amb detergent i etanol.

2. Netejar el formador de gradients i el tub de la bomba peristàltica amb aigua destil·lada i buidar-la completament.
3. Col·locar una punta de pipeta al final del tub de la bomba i col·locar-la a dins de l'espai que queda entre els vidres.
4. Preparació de les dissolucions d'acrilamida:
Preparar les concentracions òptimes del gradient barrejant les dissolucions de 0% i 80% o de 0% i 100% de tal manera que el volum final de cada dissolució sigui de 19 ml. P.ex si volem fer un gradient de 40-70% prepararem una dissolució al 40% desnaturalitzant (9.5 ml de sol. 80% + 9.5 ml de sol. 0%) i una altra dissolució al 70% desnaturalitzant (16.6 ml de sol. 80% + 2.4 ml de sol. 0%).
5. Afegir a cadascuna de les barreges els catalitzadors, 10 µl de TEMED (N, N, N', N'- tetrametiletilendiamina) i 100 µl de PSA (persulfat amònic) al 10% (p/v). Barrejar immediatament.
6. Abocar les dissolucions al formador de gradients (col·locat a sobre d'un agitador magnètic) de tal manera que la dissolució de % més baix quedi al dipòsit esquerre i la de % més alt quedi al dipòsit dret. Connectar de seguida l'agitador magnètic i obrir la clau de pas del formador de gradients.
7. Omplir a una velocitat lenta la cambra del gel amb les dissolucions, que formaran un gradient creixent de dalt a baix.
8. Una vegada s'ha omplert tota la cambra, col·locar la punta addient amb els pous necessaris i deixar solidificar al menys durant 60 minuts.
9. Passat el temps de solidificació, rentar els pous 2 vegades amb tampó TAE 1X i omplir-los amb tampó TAE 1X net.
10. Muntar la cambra en la cubeta corresponent i introduir-la en un tanc que contingui tampó TAE 1X, a la temperatura corresponent (normalment entre 50-60°C). La part superior de la cubeta ha d'estar plena de tampó.

11. Carregar les mostres de PCR (a les quals hem afegit tampó de càrrega per alectroforesi) als pous del gel. Es carreguen uns 15-20 μ l per pou.
12. Connectar la cubeta a una font a 100 V i deixar córrer tota la nit (16-17 hores).
13. Al dia següent, desconnectar la font de voltatge i desmuntar la cambra del gel.
14. Tenyir el gel amb bromur d'etidi 0,5 μ g/ml en tampó TAE 1X i observar el resultat obtingut amb un transil·luminador UV. Fotografiar si és necessari.

Les condicions utilitzades en les DGGE dels fragments estudiats es troben a la taula VI.

Taula VI. Gradients i temperatures utilitzades en el cribatge de mutacions per DGGE en els gens *PRPF* estudiats.

Gen	Exó	Gradient	Temperatura
PRPF31	8	55-90%	60°C
PRPF8	42	40-70%	60°C
PRPF3	11	50-75%	50°C

3. 4. 7. Seqüenciació automàtica dels productes de PCR

La reacció de seqüenciació de productes de PCR purificats es va realitzar amb un seqüenciador automàtic “Long-Read Tower™ System” (Visible Genetics) mitjançant la tècnica dels dideoxinucleòtids marcats terminadors de cadena. Es va utilitzar el kit “Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit” (Amersham BioSciences). El protocol utilitzat va ser el següent:

Reacció de seqüenciació

1. Marcar quatre tubs com A, C, G i T per a les respectives reaccions de terminació.
2. Afegir 1 µl de la corresponent mescla de terminació-Cy5.5 ddNTP a cadascun dels tubs. Tapar els tubs per evitar l'evaporació.
3. Per a cada mostra de DNA motlle que s'ha de seqüenciar, preparar la següent solució mare en un microtub:

Component	Volum
DNA motlle (mínim 50-250 fmol)	Fins a 24 µl
Tampó de reacció (concentrat)	3.5 µl
Encebador 1µM	2.0 µl
Thermo Sequenase DNA polymerase (10 U/µl)	2.0 µl
H ₂ O destil·lada	Fins a 31.5 µl

Nota: Si es fa una reacció control, utilitzar 4 µl de DNA control (pUC19 doble cadena; 0.50 µg/µl i 1 µl de l'encebador control (-40 M13 primer forward; 2.0 pmol/µl)

4. Barrejar el contingut de la solució mare amb la pipeta i centrifugar breument.
Aliquotar 7 µl de la solució mare a cada tub marcat a l'apartat 1.
5. Barrejar cada reacció de seqüència i centrifugar els tubs si és necessari. Tapar els tubs i col·locar-los al termociclador.
6. Iniciar el programa de seqüenciació:

94°C – 30''		durant 30-60 cicles
60°C – 30''		
72°C – 60-120''		
7. Després de la finalització del programa, centrifugar els tubs breument per recollir qualsevol condensació i col·locar-los en gel.

Eliminació dels terminadors marcats no incorporats utilitzant precipitació amb etanol

1. Afegir 2 µl d'Acetat Amònic 7.5 M i 30 µl (≈ 3 volums de reacció) d'etanol fred a cada tub. Mesclar vigorosament amb vòrtex i col·locar els tubs en gel durant 20 minuts per a precipitar el DNA.
2. Centrifugar els tubs en una microcentrífuga a 12000 r.p.m. durant 20-30 minuts a temperatura ambient o 4°C.
3. Eliminar amb cura cada sobrenedant i rentar els "pellets" amb 200 µl d'etanol 70% fred.
4. Centrifugar durant 5 minuts. Eliminar els sobrenedants i assecat els "pellets" evitant el sobre-assecat, ja que això dificulta la resuspensió.
5. Resuspendre cada "pellet" en 6 µl de "Formamide loading dye" i fer vòrtex vigorosament (10-20 s) per assegurar la completa resuspensió. Centrifugar breument per recollir les mostres al fons dels tubs.
6. Just abans de carregar les mostres al gel, escalfar cada mostra a 70°C durant 2-3 minuts per a desnaturalitzar-les i després col·locar les mostres en gel.

7. Carregar 1.5-2 µl de cada mostra als carrils del gel de seqüenciació i iniciar el programa.
8. Realitzar la lectura de la seqüència i analitzar els resultats.

3. 4. 8. Clonació de fragments de PCR per a seqüenciació

Es va utilitzar aquest mètode en els casos en els quals les mutacions detectades en heterozigosi eren difícils de resoldre amb la seqüenciació dels productes de PCR, per la presència de dobles pics en el cromatograma de seqüenciació. Aquest fet es va produir, sobretot, en mutacions del tipus inserció, deleció o de totes dues.

En aquests casos es va utilitzar el sistema de clonació "TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing" de la casa comercial Invitrogen™

Preparació de la "TOPO cloning reaction" (6 µl)

Es barregen, en un tub, els següents components:

Producte de PCR (preferiblement recent)	0,5-4 µl
Solució de sal (1.2M NaCl; 0.06M MgCl ₂)	1 µl
Aigua destil·lada	fins a 5 µl
TOPO® vector	1 µl

1. Barrejar la reacció i incubar durant 5 minuts a temperatura ambient
2. Col·locar la reacció en gel i procedir a la transformació de cèl·lules E.coli competents.

Transformació de cèl·lules E.coli competents (veure especificacions en el punt 3. 5.

3., apartat c)

1. Afegir 2 µl de la TOPO® Cloning reaction a un vial de cèl·lules E.coli competents i barrejar. No mesclar per pipeteig amunt i avall.
2. Incubar en gel durant 5-30 minuts.
3. Fer un shock tèrmic a les cèl·lules durant 30 segons a 42°C sense agitar.

4. Transferir els tubs immediatament a gel.
5. Afegir 250 µl de medi S.O.C. a temperatura ambient.
6. Tapar el tub ben fort i agitar-lo horitzontalment (200 r.p.m.) a 37°C durant 1 hora.
7. Sembrar 10-50 µl de cada transformació en una placa selectiva pre-escalfada i incubar o/n a 37°C
8. Una reacció TOPO Cloning eficient produirà centenars de colònies. Picar aproximadament 10 colònies per a l'anàlisi.

Anàlisi dels clons positius

1. Agafar les 10 colònies i cultivar-les o/n en medi SOC o LB (TB) que contingui 50-100 µg/ml ampicil·lina o 50 µg/ml kanamicina.
2. Aïllar el DNA plasmídic (veure punt 3. 5. 4.)
3. Analitzar els inserts dels plàsmids per screening de PCR/ DGGE. També es pot procedir directament a la seqüenciació.

3. 5. Construcció de plàsmids recombinants portadors de “minigens” per a l’estudi *in vitro* de mutacions de *splicing*

Es va realitzar la construcció de minigens de *RHO*, que es van clonar en vectors d’expressió eucariotes, seguint la següent estratègia:

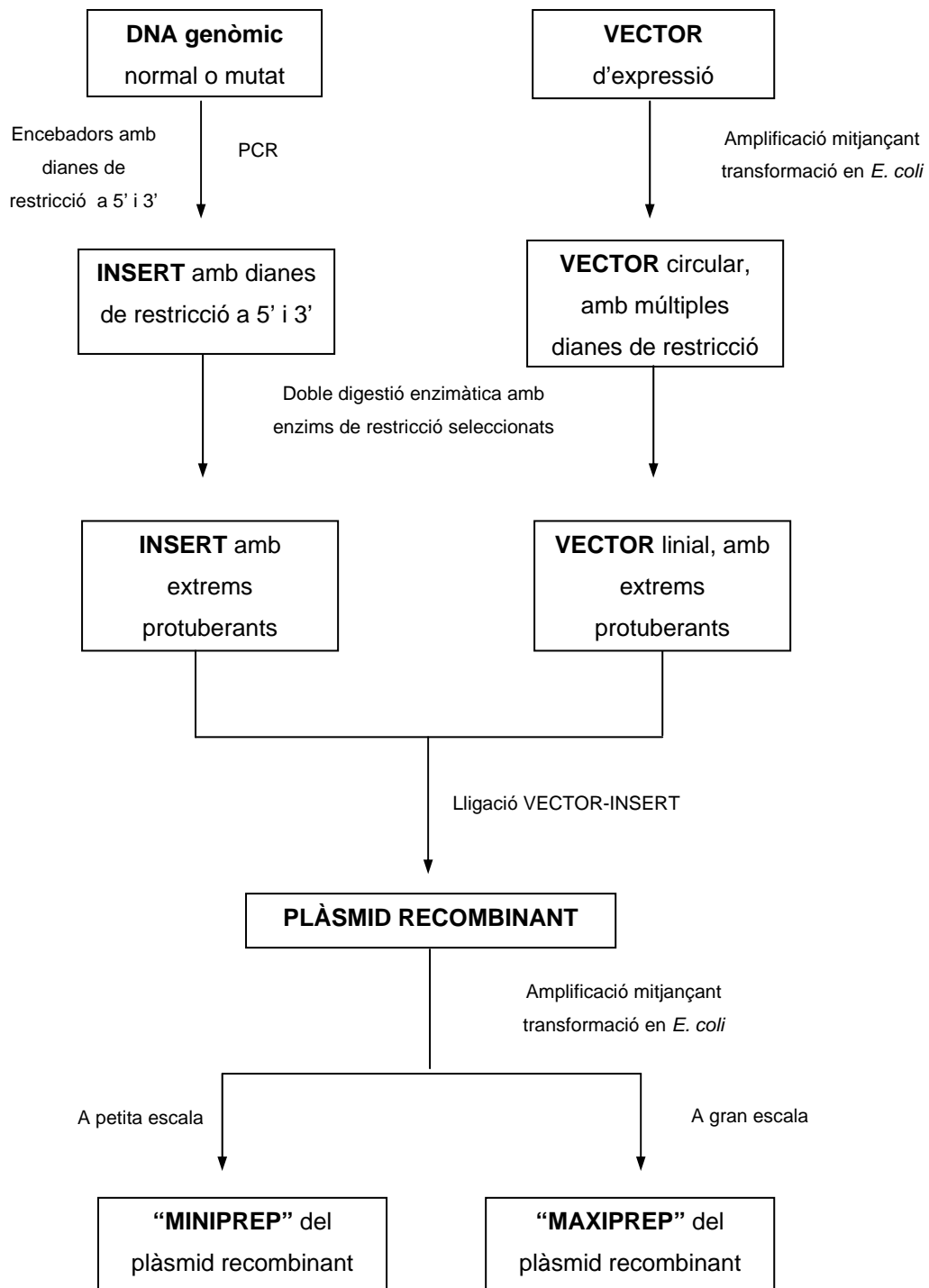


Figura 18. Estratègia seguida per a l’obtenció dels plàsmids recombinants

Un cop s'obté el plàsmid recombinant que conté el minigen de *RHO* sintètic, aquest es transfecta dins d'una cèl·lula eucariota.

Una vegada el plàsmid es troba dins de la cèl·lula, la maquinària de la cèl·lula és capaç de transcriure el minigen cap a pre-mRNA. Posteriorment, la maquinària de *splicing* cel·lular processa aquest pre-mRNA cap a mRNA madur.

L'objectiu de la transfecció cel·lular d'aquests plàsmids portadors de minigens de *RHO* és estudiar el mRNA resultant per poder determinar si mutacions situades en llocs de *splicing* al gen de la rodopsina estan provocant alguna alteració a nivell del processament del seu RNA.

Els experiments de transfecció dels plàsmids es van realitzar en la línia cel·lular COS-7 i en cèl·lules limfoblastoides transformades amb EBV d'individus tant sans com malalts, pertanyents a famílies portadores de mutacions al gen *PRPF8*. La utilització d'aquestes últimes línies cel·lulars ens permet estudiar si existeixen diferències de processament del mRNA entre un individu sa i un portador de mutació al gen *PRPF8* quan realitzem la transfecció dels diferents plàsmids recombinants dins la cèl·lula.

3. 5. 1. Selecció dels inserts

- Estudi de la mutació **IVS2-2A→G**

Construcció dels minigens salvatge i mutat:

- Minigen **RHOSPL2-4 WT** corresponent al fragment *RHOSPL2-4 salvatge*
- Minigen **RHOSPL-A3811G** corresponent al fragment amb la *mutació A3811G (IVS2-2A→G)*

compostos, tots dos, per: EXÓ 2 parcial + INTRÓ + EXÓ 3 + INTRÓ + EXÓ 4 parcial:

RHOSPL-F→

```

2461 ggtggtcctg gccatcgagc ggtacgtggt ggtgtgtaaag cccatgagca acttccgctt
2521 cggggagaaac catgccatca tgggcggttg cttcacctgg gtcatggcgc tggcctgcgc
2581 cgcaccccca ctgcccggct ggtccagGTa atggcactga gcagaagggga agaagctccg
2641 ggggctcttt gtagggctct ccagtcagga ctcaaaccga gtagtgctg gttccaggca
2701 ctgaccttgt atgtctcctg gccaaaatgc ccaactcaggg taggggtgta gggcagaaga
2761 agaaacagac tctaatggtg ctacaagggc tggccccatc tcctgagccc catgtcaaac
2821 agaatccaag acatcccaac ccttcacctt ggctgtgccc ctaatcctca actaagctag
2881 gcgcaaattc caatcctcct tggcttagta ccccgggggc agccccctct aaccttgggc
2941 ctcagcagca ggggaggcca caccttctca gtgcagggtg ccatattgtg gcccttggga
3001 actgggtccc actcagcctc taggcgattg tctcctaata gggctgagat gagactcagt
3061 ggggacagtg gtttggacaa taggactggg gactctggtc cccagaggcc tcatgtccct
3121 ctgtctccag aaaattccca ctctcacttc cctttcctcc tcagtcttgc tagggctccat
3181 ttctaccctt tgctgaattt gagcccacc cctggacttt ttccccatct tctccaactt
3241 cccttagttc tatcctctgg aagcagagcc gctggacgct ctgggtttcc tgggcccgt
3301 ccaactgtcac caatatcagg aaccattgcc acgtcctaata gacgtgcgct ggaagcctct
3361 agtttccaga agctgcacaa agatccctta gatactctgt gtgtccatct ttggcctgga
3421 aaatactctc accctggggc taggaagacc tcggtttgta caaacttctt caaatgcaga
3481 gcctgagggc tctccccacc tcctcaccaa cctctgcgct ggcatagccc tagcctcagc
3541 gggcagtgga tgctggggct gggcatgcag ggagaggctg ggtggtgtca tctggtaacg
3601 cagccaccaa acaatgaagc gacactgatt ccacaaggtg catctgcac cccatctgat
3661 ccattccatc ctgtcaccca gccatgcaga cgtttatgat ccccttttcc agggagggaa
3721 tgtgaagccc cagaaagggc cagcgcctcg cagccacctt ggctgttccc aagtccctca
3781 caggcagggt ctccctacct gcctgtctc Ggtacatcc ccgagggcct gcagtgtctg
3841 tgtggaatcg actactacac gctcaagccg gaggtcaaca acgagtcctt tgtcatctac
3901 atgttcgtgg tccacttcac catccccatg attatcatct ttttctgta tgggcagctc
3961 gtcttcaccg tcaaggagGT acgggcgggg ggtggggcg cctcacggct ctgagggctc
4021 agccccagc atgcatctgc ggctcctgct cctggagga gccatggtct ggaccgggt
4081 ccctgtcct gcAGgccgct gcccagcagc aggagtcagc caccacacag aaggcagaga
4141 aggaggtcac ccgcatggtc atcatcatg tcatcgctt cctgatctgc tgggtgcct

```

←RHOSPL-R

Figura 19. “Minigen” *RHOSPL2-4*. En fons groc es marquen els exons. Els senyals de *splicing* 5' donadors (GT) i 3' acceptors (AG) es marquen en blau i delimiten els introns, amb fons blanc. La localització de la mutació *IVS2-2A→G* es marca amb fons vermell. Subratllats i en negreta es marquen els oligonucleòtids utilitzats en la PCR per a amplificar el fragment (a aquests oligonucleòtids se'ls hi han d'afegir unes cues a 5' que continguin les dianes de restricció necessàries per a poder insertar el fragment en el vector d'expressió corresponent; veure taula VII).

- Estudi de la mutació IVS4-1G→T

Construcció dels minigens salvatge i mutat:

- Minigen **RHOSPL3-5WT** corresponent al fragment *RHOSPL3-5* salvatge
- Minigen **RHOSPL-G5167T** corresponent al fragment amb la mutació G5167T (IVS4-1G→T)

compostos, tots dos, per: EXÓ 3 parcial + INTRÓ + EXÓ 4 + INTRÓ + EXÓ 5:

RHOSPL3-5-F→

```

3841 tgtggaatcg actactacac gctcaagccg gaggtcaaca acgagtcttt tgtcatctac
3901 atgttcgtgg tccacttcac catccccatg attatcatct tttctgcta tgggcagctc
3961 gtcttcaccg tcaaggagGT acgggcccgg ggggtggcgg cctcacggct ctgagggtcc
4021 agccccagc atgcatctgc ggctcctgct ccctggagga gccatggctt ggaccggggt
4081 cccgtgtcct gcAGgccgct gcccagcagc aggagtcagc caccacacag aaggcagaga
4141 aggaggtcac ccgcatggtc atcatcatgg tcatcgcttt cctgatctgc tgggtgccct
4201 acgccagcgt ggcatctac atcttcacc accagggctc caacttcggg cccatcttca
4261 tgaccatccc agcgttcttt gccaagagcg ccgccaatcta caaccctgtc atctatatca
4321 tgatgaacaa gcagGTgcct actgcgggtg ggagggcccc agtgccccag gccacaggcg
4381 ctgcctgcca aggacaagct actcccaggg cagggggaggg gctccatcag ggttactggc
4441 agcagtcttg ggtcagcagt cccaatgggg agtgtgtgag aaatgcagat tcctggcccc
4501 actcagaact gctgaatctc aggggtgggccc caggaacctg cattccagc aagccctcca
4561 cagggtggctc agatgctcac tcagggtggga gaagctccag tcagctagtt ctggaagccc
4621 aatgtcaaag tcagaaggac ccaagtcggg aatgggatgg gccagtctcc ataaagctga
4681 ataaggagct aaaaagtctt attctgaggg gtaaaggggt aaagggttcc tcggagaggt
4741 acctccgagg gtaaacagt tgggtaaacac gtctctgaag tcagctctgc cattttctag
4801 ctgtatggcc ctgggcaagt caatttctct ctctgtgctt tggtttctct atccatagaa
4861 aggtagaaag ggcaaacac caaactcttg gattacaaga gataatttac agaacaccct
4921 tggcacacag agggcaccat gaaatgtcac gggtgacaca gcccccttgt gctcagtccc
4981 tggcatctct aggggtgagg agcgtctgcc tagcagggtc ccaccaggaa gctggatttg
5041 agtggatggg gcgctggaat cgtgagggggc agaagcaggc aaagggtcgg ggccaacctc
5101 actaacgtgc cagttccaag cacactgtgg gcagccctgg cctgactca agcctcttgc
5161 cttccAttc cggaactgca tgctcaccac catctgctgc ggcaagaacc cactgggtga
5221 cgatgaggcc tctgctaccg tgtccaagac ggagacgagc caggtggccc cggcctaaga
5281 cctgcctagg actctgtggc cgactatagg cgctctcccat ccctacacc tccccagc

```

←RHOSPL3-5-R

Figura 20. “Minigen” *RHOSPL3-5*. En fons groc es marquen els exons. Els senyals de *splicing* 5' donadors (GT) i 3' acceptors (AG) es marquen en blau i delimiten els introns, amb fons blanc. La localització de la mutació IVS4-1G→T es marca amb fons vermell. Subratllats i en negreta es marquen els oligonucleòtids utilitzats en la PCR per a amplificar el fragment (a aquests oligonucleòtids se'ls hi han d'afegir unes cues a 5' que continguin les dianes de restricció necessàries per a poder insertar el fragment en el vector d'expressió corresponent; veure taula VII).

Amplificació dels inserts

Les amplificacions, a partir de DNA genòmic, dels fragments *RHOSPL2-4* (salvatge i mutat) i *RHOSPL3-5* (salvatge i mutat) es van realitzar amb el kit “Expand Long Template PCR System”. Aquest kit està compost per una barreja que conté la Taq DNA polimerasa i la Tgo DNA polimerasa, una DNA polimerasa termoestable amb activitat correctora. Aquesta barreja de polimerases està dissenyada per donar una elevada quantitat de producte de PCR a partir de DNA genòmic. Aquest sistema està especialment optimitzat per amplificar eficientment fragments de DNA genòmic de fins a 22 kb. La taxa d'error és de 4.8×10^{-6} (tres vegades menys que la Taq polimerasa).

Per a la PCR, preparar una barreja que contingui els següents reactius:

Component	Volum	Concentració final
dNTPs (10 mM)	2.5 µl	500 µM
Encebador <i>sense</i> (25 µM)	1 µl	500 nM
Encebador <i>antisense</i> (25 µM)	1 µl	500 nM
10X PCR Buffer amb MgCl ₂ (1.75 mM)	5 µl	1X
DNA motlle	X µl	fins a 500 ng
Enzim	0.75 µl	
Aigua	Fins a 50 µl	

Es va sintetitzar una parella d'oligonucleòtids per a cada fragment a amplificar. A l'extrem 5' de cada oligonucleòtid s'hi va afegir una seqüència que conté una diana per a l'enzim de restricció que vam seleccionar per a poder introduir-lo al *polylinker* del

vector seleccionat. Aquesta diana ha d'estar protegida per alguns nucleòtids, per la qual cosa és necessària l'addició d'una cua de 8-10 nucleòtids a l'extrem 5' de la diana. Es van seleccionar els enzims EcoRI per a l'encebador *sense* i SalI per a l'encebador *antisense*.

Els encebadors utilitzats es presenten en la taula següent.

Taula VII. Encebadors utilitzats per a amplificar els fragments *RHOSPL2-4* (salvatge i mutat) i *RHOSPL3-5* (salvatge i mutat).

Fragment	Mida (pb)	Oligonucleòtids encebadors
<i>RHOSPL2-4</i> (WT i A3811G)	1700	RHOSPL-F: 5'-CAAGACTTATG ^A AATTCAGCGGTACGTGGTGGTGTGTGT-3' EcoRI RHOSPL-R: 5'-GATCCATTATG ^A TCGACCTCCTTCTCTGCCTTCTGTG-3' Sal I
<i>RHOSPL3-5</i> (WT i G5167T)	1493	RHOSPL3-5-F: 5'-GTCAGGTACG ^A AATTCGGGAGGTCAACAACGAGTCT-3' EcoRI RHOSPL3-5-R: 5'-GCATATTATG ^A TCGACAGGTGTAGGGGATGGGAGAC-3' Sal I

El programa de PCR utilitzat va ser el següent:

- 1) 94°C, 5'
- 2) 94°C, 1'
- 3) 65°C (*RHOSPL2-4*) ó 58°C (*RHOSPL3-5*), 1'
- 4) 68°C, 1'
- 5) "Go To 2" x 30 cicles
- 6) 68°C, 8'
- 7) 14°C

3. 5. 2. Vector plasmídic utilitzat

Es va fer servir el vector “pCI-neo Mammalian Expression Vector” de Promega. Aquest és un vector seleccionable per a estudiar expressió constitutiva de gens en cèl·lules de mamífer. Aquest vector pot ser utilitzat tant per a expressió transitòria com per a expressió estable quan les cèl·lules transfectades són seleccionades amb l'antibiòtic G-418.

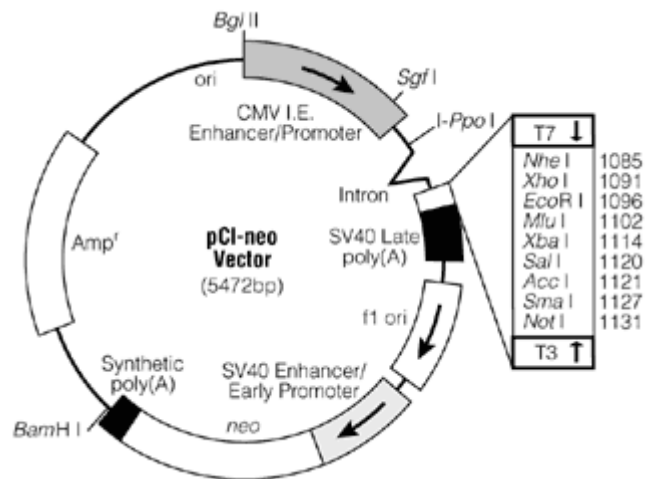


Figura 21. Vector d'expressió pCI-neo. En aquesta imatge podem veure el vector utilitzat per a clonar els fragments *RHOSPL2-4* i *RHOSPL3-5*. El lloc de múltiples clonatge està situat entre els promotors T7 i T3.

Cada fragment amplificat es va clonar al lloc de múltiples clonatge o *polylinker* (*multiple cloning site, MCS*), on existeixen dianes úniques per als enzims EcoRI i Sal I, enzims seleccionats per a insertar els fragments escollits.

3. 5. 3. Clonació dels inserts dins del vector

a) Doble digestió enzimàtica del vector i de l'insert

Digestió i defosforilació* del vector pCI-neo

Reactiu	Volum
Buffer Y+/ Tango 10X	10 µl
EcoRI	1 µl
Sal I	1 µl
Fosfatasa alcalina	1 µl
Vector pCI-neo	25 µl
Aigua	12 µl
Volum total	50 µl

*La fosfatasa alcalina defosforilals extrems 5'fosfat del vector, evitant així la auto-ligació i recircularització.

Digestió del fragment

Reactiu	Volum
Buffer Y+/ Tango 10X	10 µl
EcoRI	1 µl
Sal I	1 µl
Fragment PCR	25 µl
Aigua	13 µl
Volum total	50 µl

1. Afegir, en un microtub, tots els components de la barreja
2. Incubar 1h30' a 37°C
3. Inactivar els enzims 20' a 65°C

b) Lligació vector-insert

Es va utilitzar el “Rapid DNA Ligation Kit” de Roche. Aquest kit permet la lligació de fragments de DNA amb extrems cohesius o en romo en només 5 minuts a 25°C. Depenent de la concentració de DNA, es formen productes lligats tant amb DNA circular (concentració baixa de DNA) com amb concatemers (alta concentració de DNA).

1. Diluir el vector i l'insert (provar diferents relacions; per exemple 1:3 (1 µl de vector + 3 µl d'insert) i 2:4 (2 µl de vector + 4 µl d'insert) en “DNA Dilution Buffer 1X” fins a un volum final de 10 µl.
2. Barrejar el “T4 Ligation Buffer”. Afegir 10 µl del “T4 Ligation Buffer” al tub de reacció. Barrejar.
3. Afegir 1 µl de “T4 DNA Ligase”. Barrejar.
4. Incubar durant 5 minuts a 15-25°C.
5. La barreja de reacció de lligació pot ser utilitzada directament per a la transformació de cèl·lules competents o bé emmagatzemar-la sense inactivar a -25°C.
6. El DNA lligat pot ser analitzat en un gel d'agarosa.

c) Transformació del plàsmid recombinant en cèl·lules competents

Per a realitzar la clonació dels diferents plàsmids es va utilitzar com a hoste la soca JM109 d'*Escherichia Coli* (*Promega*). Són cèl·lules ja competents que presenten un mínim d'eficiència de transformació de 1×10^8 cfu/µg de DNA control en ser sembrades en plaques amb LB-agar que continguin 100 µg/ml d'ampicil·lina.

Les cèl·lules s'emmagazemen a -80°C evitant grans fluctuacions de temperatura.

Els medis de cultiu tant sòlid com líquid es va preparar de la següent forma:

- **Medi LB sòlid** (per a preparar cultius sòlids en plaques de Petri)
 1. Dissoldre 32 g de LB agar (Lennox L Agar / Invitrogen) per cada litre d'aigua destil·lada.
 2. Autoclavar.
 3. Afegir 50 µg/ml d'ampicilina sòdica.
 4. Repartir en plaques de Petri (20 ml / placa).

- **Medi TB líquid** (per a realitzar cultius líquids de nit)
 1. Dissoldre 47 g de TB (Terrific Broth / Gibco BRL) per cada litre d'aigua destil·lada.
 2. Autoclavar.
 3. Afegir 50 µg/ml d'ampicil·lina sòdica.

Nota: Als assajos s'utilitza l'antibiòtic ampicil·lina per a la selecció de les colònies que han incorporat el plàsmid, aprofitant que el vector porta un gen de resistència a l'ampicil·lina (Amp^r)

Els cultius d'*E. Coli* tant sòlids com líquids s'incuben a 37°C o/n. En el cas dels cultius líquids, la incubació ha de ser amb agitació constant per a evitar l'agregació cel·lular, que impediria el seu creixement normal.

La transformació de les cèl·lules competents es realitza segons el següent protocol:

1. Transferir les cèl·lules que estaven emmagatzemades a -80°C (100 µl cèl·lules/transformació), a un bany de gel, durant 5 minuts.
2. Agitar suaument el vial per tal de resuspendre les cèl·lules.
3. Afegir de 1-50 ng de DNA a la suspensió cel·lular (fins a 10 µl de solució de DNA per transformació)
4. Agitar suaument la barreja. En afegir el DNA no pipetejar, per tal d'evitar el trencament de les cèl·lules en passar per la punta de la pipeta.

5. Incubar en gel durant 10 minuts.
6. Realitzar un “shock” tèrmic a 42°C durant 45-50 segons.
7. Incubar de nou en gel durant 2 minuts.
8. Afegir 900 µl de medi S.O.C. o LB (a 4°C) per transformació.
9. Incubar a 37°C amb agitació permanent de 225 r.p.m. durant 60 minuts.
10. Sembrar la suspensió en plaques de Petri que continguin LB agar + 50 µg/ml ampil·lina. Incubar o/n a 37°C i 5% CO₂.
11. Al dia següent, observar les plaques i comprovar que han crescut colònies.
12. Seleccionar uns 10-25 clons aïllats i fer cultius de nit en uns 5 ml de medi TB líquid amb 50 µg/ml ampil·lina. Incubar o/n a 37°C i agitació constant.
13. Al dia següent, comprovar que els cultius han crescut.
14. Per tal de seleccionar els clons positius, es pot fer una PCR de l'insert -agafant uns microlitres directament del cultiu líquid- que ens indicarà si el vector ha incorporat l'insert o no.
15. Una vegada hem seleccionat els clons positius d'interès, realitzarem una reacció de seqüenciació (veure apartat 3. 4. 7.) sobre el producte de PCR amplificat a partir del cultiu de nit.

Després de comprovar que el clon seleccionat conté el plàsmid recombinant d'interès, podem realitzar un aïllament del DNA plasmídic a petita escala (“miniprep”) o bé a gran escala (“maxiprep”), si necessitem molta més quantitat de plàsmid.

3. 5. 4. Obtenció de DNA plasmídic

3. 5. 4. 1. Obtenció de DNA plasmídic a petita escala, “miniprep”

Aquesta preparació es va realitzar amb el kit “QIAprep Spin Miniprep Kit” de QIAGEN. Aquest protocol està dissenyat per a la purificació de DNA plasmídic a partir d'un cultiu de nit d'*E. coli* d'1-5 ml.

1. Resuspendre el pellet bacterià en 250 µl de Buffer P1 i transferir a un microtub d'1.5 ml.
2. Afegir 250 µl de Buffer P2 i invertir el tub 4-6 vegades.
3. Afegir 350 µl de Buffer N3 i invertir el tub immediatament 4-6 vegades.
4. Centrifugar 10 minuts a 13000 rpm en una microcentrífuga.
5. Aplicar els sobrenedants del pas anterior a una columna "QIAprep spin column" per decantació o pipeteig.
6. Centrifugar durant 30-60 segons. Descartar el líquid residual.
7. (Opcional): Rentar la columna amb 0.5 ml de Buffer PB i centrifugar durant 30-60 segons. Descartar el líquid residual.
8. Rentar la columna amb 0.75 ml de Buffer PE i centrifugar durant 30-60 segons.
9. Descartar el líquid residual i centrifugar durant 1 minut més per tal d'eliminar el tampó de rentat.
10. Col·locar la columna QIAprep en un microtub d'1.5 ml net. Per tal d'eluir el DNA, afegir Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) o aigua al centre de la columna, deixar reposar 1 minut i centrifugar durant 1 minut.

3. 5. 4. 2. Obtenció de DNA plasmídic a gran escala "maxiprep"

La purificació de DNA plasmídic a gran escala es va realitzar amb el kit "Hi Speed Plasmid Purification Kit" de QIAGEN. Es parteix d'un volum de cultiu de 150-200 ml.

1. Centrifugar el cultiu a 6000 g durant 15 minuts a 4°C, per tal de recollir les cèl·lules. Eliminar el sobrenedant invertint el tub fins que s'hagi buidat tot el medi sobrant.
2. Resuspendre el pellet bacterià en 10 ml de Buffer P1. El pellet ha de ser resuspès completament per vòrtex o pipetejant amunt i avall fins que no es vegi cap agregat.
3. Afegir 10 ml de Buffer P2, barrejar invertint 4-6 vegades, i incubar 5 minuts a temperatura ambient.

Durant la incubació preparar el QIAfilter Cartridge:

Roscar el tap al filtre QIAfilter Maxi Cartridge. Col·locar el QIAfilter Maxi Cartridge en un recipient adequat.

4. Afegir 10 ml de Buffer P3 fred al llisat i barrejar immediatament invertint de 4-6 vegades. Procedir directament al pas 5. No incubar el llisat en gel.
5. Abocar el llisat en el barril del QIAfilter Cartridge. Incubar a temperatura ambient durant 10 minuts. No insertar l'èmbol.
6. Equilibrar una HiSpeed Maxi Tip aplicant 10 ml de Buffer QBT i permetre que la columna es vagi buidant per gravetat.
7. Treure el tap del QIAfilter. Insertar l'èmbol al QIAfilter Maxi Cartridge i filtrar el llisat cel·lular dins de la HiSpeed Tip prèviament equilibrada.
8. Permetre que el llisat entri a la reïna per gravetat.
9. Rentar la HiSpeed Maxi Tip amb 60 ml de Buffer QC.
10. Eluir el DNA amb 15 ml de Buffer QF.
11. Precipitar el DNA per addició de 10.5 ml (ó 0.7 volums) d'isopropanol a temperatura ambient al DNA eluït. Barrejar i incubar a temperatura ambient durant 5 minuts.
12. Durant la incubació, treure l'èmbol a una xeringa de 30 ml i enganxar-li el QIAprecipitator Maxi Module.
13. Col·locar el QIAprecipitator sobre un recipient de residus, transferir l'eluat/barreja d'isopropanol a la xeringa de 30 ml i insertar l'èmbol. Filtrar l'eluat/barreja d'isopropanol a través del QIAprecipitator aplicant pressió constant.
14. Treure el QIAprecipitator de la xeringa de 30 ml i treure l'èmbol. Tornar a enganxar el QIAprecipitator i afegir 2 ml d'etanol 70% a la xeringa. Rentar el DNA insertant l'èmbol i fent passar l'etanol a través del QIAprecipitator amb pressió constant.

15. Treure el QIAprecipitator de la xeringa de 30 ml i treure l'èmbol. Enganxar de nou el QIAprecipitator a la xeringa de 30 ml, insertar l'èmbol i assecar la membrana fent passar aire pel QIAprecipitator ràpidament i amb força. Repetir aquest pas.
16. Assecar el QIAprecipitator amb paper absorbent per tal d'evitar l'arrossegament d'etanol.
17. Treure l'èmbol a una nova xeringa de 5 ml i enganxar-hi el QIAprecipitator. Posar el QIAprecipitator sobre un microtub d'1.5 ml. Afegir 1 ml de Buffer TE a la xeringa de 5 ml. Insertar l'èmbol i eluir el DNA en el tub utilitzant una pressió constant.
18. Treure el QIAprecipitator de la xeringa de 5 ml, treure l'èmbol i tornar a enganxar-hi el QIAprecipitator.
19. Transferir l'eluat del pas 17 a la xeringa de 5 ml i eluir per segona vegada dins del mateix tub d'1.5 ml.
20. Quantificar el DNA obtingut amb un espectrofotòmetre UV/VIS (veure punt 3. 4. 2.). Aquest DNA plasmídic estarà llest per ser transfectat en cèl·lules de mamífer.

3. 6. Cultiu de línies cel·lulars eucariotes

3. 6. 1. Descripció i característiques de les línies cel·lulars utilitzades

3. 6. 1. 1. Línia cel·lular COS-7

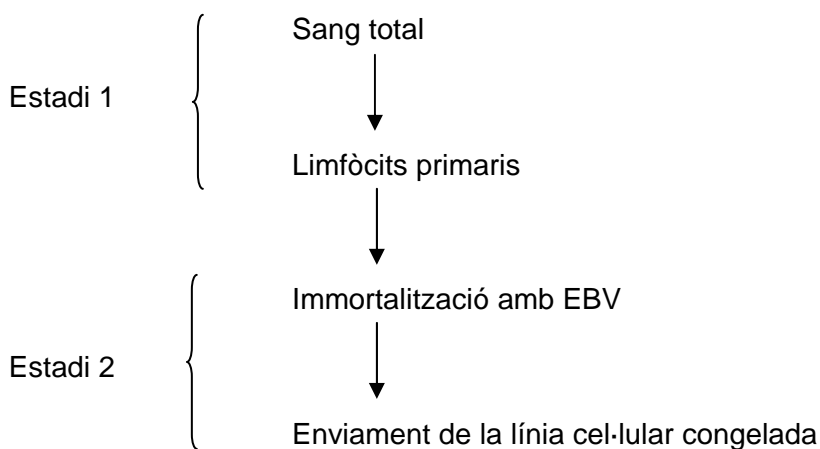
Nom de la línia :	COS-7
ECACC No.	87021302
Descripció:	Cèl·lules de ronyó de mico verd africà, transformades amb SV40.
Medi de cultiu:	DMEM + 2 mM Glutamina + 10 % FBS + Penicil·lina G-sodi 100 U/ml i Estreptomicina-sulfat 100 µg/ml.
Rutina de subcultiu:	Dividir cultius sub-confluent (70-80%) 1:3 fins a 1:10, sembrant $1-3 \times 10^4$ cèl·lules / cm ² utilitzant 0.25% tripsina ó tripsina/EDTA. Incubar a 37°C, 5% CO ₂ .
Morfologia:	Fibroblast.
Forma de creixement:	Adherent en monocapa.
Riscos d'aquesta línia:	COS-7 és una línia cel·lular que porta SV40. Aquests cultius són potencialment infecciosos o tòxics per als humans, per la qual cosa han de ser manipulats sota una cabina de seguretat de classe II.

Com a recipients de cultiu s'utilitzen flascons de poliestirè (de 25 cm² i de 75 cm²) per al manteniment del cultiu cel·lular i plaques de poliestirè de 6 pous per a les transfeccions dels plàsmids. Tots els flascons utilitzats tenen superfície tractada Nunclon™.

3. 6. 1. 2. Línies cel·lulars limfoblastoides transformades amb EBV

Nom de les línies:	CAR0001,0002,0003,0004,0005, pertanyents a pacients portadors de mutacions al gen <i>PRPF8</i> (CAR0001, 2, 4 i 5) i un individu control sense mutació (CAR0003)
Descripció:	Cèl·lules B limfoblastoides humanes transformades amb l'EBV.
Medi de cultiu:	RPMI 1640 + 2 mM Glutamina + 10% FBS + 100 U/ml Penicil·lina G-sodi i 100 µg/ml Estreptomicina-sulfat.
Tipus cel·lular:	Suspensió
Riscos d'aquesta línia:	Línia cel·lular d'origen humà, immortalitzada amb EBV. Cultius potencialment infecciosos en humans. Manipular en cabines de seguretat de classe II.

Per a l'obtenció d'aquestes línies, es va partir de sang perifèrica de pacients afectats de RP amb mutació al gen *PRPF8* i d'un individu sa, que es van oferir a participar en l'estudi. Les mostres de sang-EDTA (4 ml aproximadament) es van remetre a l'ECACC (European Collection of Cell Cultures), on les van processar de la següent forma:



Els passos següents impliquen la immortalització com a resultat de la transformació amb EBV.

1. Inici del cultiu dels limfòcits de sang perifèrica.
2. Infecció amb l'EBV.
3. Infecció de les cèl·lules pel virus.
4. Divisió cel·lular en resposta a la transformació.
5. Creixement en agregats cel·lulars en resposta a la transformació induïda per EBV. Els agregats cel·lulars es poden observar a primera vista.

Una vegada s'ha obtingut un nombre considerable de cèl·lules transformades, es congelen en criotubs i s'envien al seu receptor.

Quan aquestes cèl·lules arriben al laboratori en forma de vials congelats es processen de la següent forma:

- Han de ser crescudes en medi RPMI 1640 amb 10% FBS i HEPES (o cultivar en incubador de CO₂), en un flascó de 25 cm².
- Després de 18-24 hores i si les cèl·lules tenen bon aspecte, afegir 5-10 ml de medi.
- Continuar afegint medi cada 2-3 dies fins que s'assoleix un volum de 30 ml, moment en el qual han de ser transferides a un flascó de 75 cm² en 50 ml de medi.
- Les cèl·lules limfoblastoides creixen en suspensió i apareixeran en forma d'agregats visibles a l'ull. Un medi sa hauria de ser taronja o groc.

3. 6. 2. Activació de línies cel·lulars congelades

Molts cultius obtinguts a partir d'una col·lecció de cultius, com l'ECACC, arriben al destinatari congelats, i per tal de poder-los utilitzar, les cèl·lules han de ser descongelades i posades en cultiu. És vital descongelar les cèl·lules correctament per tal de mantenir la viabilitat i permetre que el cultiu es recuperi més ràpidament. Alguns crioprotectors, com el DMSO, són tòxics per sobre de 4°C, per tant és essencial que els cultius siguin descongelats ràpidament i diluïts en medi de cultiu per tal de minimitzar els efectes tòxics.

El procediment és el següent:

1. Llegir el fulletó tècnic de la línia cel·lular per tal d'establir els requeriments específics per a la línia cel·lular.
2. Preparar els flascons de manera adequada; marcar-los amb el nom de la línia cel·lular, número de "pas" i data.
3. Treure el criotub de cèl·lules del contenidor de nitrogen líquid.
4. Col·locar el tub en un bany d'aigua a 37°C. Submergir només la part baixa del tub. Deixar que es descongeli fins que quedi una mica de gel al vial. Transferir a una cabina de seguretat de classe II.
5. Netejar l'exterior del vial amb etanol al 70%.
6. Lentament i gota a gota, pipetejar les cèl·lules en medi de cultiu pre-escalfat per tal de diluir el DMSO que contenen com a crioprotector.
7. Incubar a la temperatura i concentració de CO₂ adequades. En el cas de les COS-7 i les cèl·lules limfoblastoides, les condicions òptimes són una temperatura de 37°C i 5% CO₂.
8. Examinar les cèl·lules amb un microscopi invertit després de 24 hores i subcultivar quan sigui necessari.

3. 6. 3. Subcultiu de línies cel·lulars adherents

Les línies cel·lulars adherents creixen *in vitro* fins que han cobert la superfície disponible o quan al medi s'han esgotat els nutrients. En aquest punt les cèl·lules han de ser subcultivades per tal d'evitar la mort del cultiu. Per tal de subcultivar, les cèl·lules necessiten ser portades a una suspensió. El grau d'adhesió varia d'una línia cel·lular a una altra, però en la majoria dels casos s'utilitzen proteases com la tripsina per tal de desenganxar les cèl·lules del flascó de cultiu. Tot i així, això pot ser inapropiat per a algunes línies on l'exposició a les proteases és perjudicial o on els enzims utilitzats eliminen marcadors o receptors de membrana d'interès. En aquests casos les cèl·lules han de ser portades a suspensió en un volum petit de medi mecànicament amb l'ajuda de espàtules cel·lulars ("cell scrapers").

El procediment de subcultiu de línies cel·lulars adherents és el següent:

1. Observar els cultius amb un microscopi invertit per a comprovar el grau de confluència i confirmar l'absència de contaminació fúngica i bacteriana.
2. Eliminar el medi esgotat de nutrients. (El medi de cultiu porta com a marcador de pH el "phenol red", per tant notarem que el medi està esgotat quan hi ha hagut un canvi de color de vermell a groc, que indica l'acidesa del cultiu; en aquest moment és necessari eliminar el medi vell i afegir-hi medi fresc quan estem realitzant manteniment del cultiu)
3. Rentar la monocapa de cèl·lules adherents amb PBS sense $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ utilitzant un volum equivalent a mig volum del medi de cultiu. Repetir aquest pas si sabem que les cèl·lules s'adhereixen fortament a la placa.
4. Pipetejar tripsina /EDTA a la monocapa de cèl·lules rentades utilitzant 1 ml per cada 25 cm^2 de superfície. Rotar el flascó per tal de cobrir la monocapa amb tripsina. Decantar l'excés de tripsina.
5. Retornar el flascó a l'incubador i deixar-lo durant 2-10 minuts.

6. Examinar les cèl·lules amb el microscopi per assegurar-se que totes les cèl·lules estan desenganxades i surant. Donar cops als costats del flascó per tal d'alliberar qualsevol resta de cèl·lules enganxades.
7. Resuspendre les cèl·lules en un volum petit de medi fresc que contingui FBS per tal d'inactivar la tripsina. Per tal de realitzar el recompte cel·lular (veure punt 3. 6. 5.), agafar 100-200 µl de suspensió cel·lular.
8. Transferir el nombre desitjat en un flascó nou retolat que contingui medi de cultiu pre-escalfat.
9. Incubar a 37°C, 5% CO₂.
10. Repetir aquest procés segons ho requereixi el creixement de la línia cel·lular.

3. 6. 4. Subcultiu de línies cel·lulars en suspensió

En termes generals, els cultius derivats de la sang (p.ex. limfòcits) creixen en suspensió. Les cèl·lules poden créixer com a cèl·lules aïllades o bé formant grups (p.ex. línies cel·lulars limfoblastoides transformades amb EBV). Per a les primeres, el subcultiu per dilució és relativament fàcil. Però per a les línies que creixen en agregats, és necessari portar les cèl·lules fins a una suspensió de cèl·lules aïllades per centrifugació i resuspensió pipetejant en un volum més petit abans de comptar.

El procediment de subcultiu de línies cel·lulars en suspensió és el següent:

1. Observar els cultius utilitzant un microscopi invertit. Les cèl·lules en fase de creixement exponencial haurien de ser brillants, rodones i refràctils. Les cèl·lules transformades amb EBV poden créixer en agregats molt grans que són molt difícils de comptar i els centres del agregats grans poden ser inviables.
2. No centrifugar per a subcultivar a menys que el pH del medi sigui àcid ("phenol red"= groc), el que indica que les cèl·lules han sobrecregut i ja no es poden recuperar. Si passa això, centrifugar a 150g durant 5 min, resembrar a una densitat lleugerament major (normalment de $3-5 \times 10^5$ cèl·lules/ml) i afegir 10-20% de medi condicionat (sobrenedant) al medi fresc.
3. Agafar una petita mostra de les cèl·lules de la suspensió cel·lular (100-200 μ l). Calcular el nombre de cèl·lules/ml (veure punt 3. 6. 5.) i resembrar el nombre desitjat de cèl·lules (sense centrifugar) en flascons acabats de preparar, per dilució de les cèl·lules.
4. Repetir això cada 2-3 dies. Per a les línies limfoblastoides, mantenir els cultius a una densitat d'entre $5 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ cèl·lules/ml.

3. 6. 5. Quantificació cel·lular

Per a la majoria de manipulacions que es realitzen als cultius cel·lulars, com les transfeccions, tècniques de fusió cel·lular, criopreservació i rutines de subcultiu, és necessari quantificar el nombre de cèl·lules abans de la seva utilització. Utilitzant un nombre consistent de cèl·lules es mantindrà un creixement òptim i ajudarà també a estandaritzar procediments que utilitzen cultius cel·lulars. Això, al seu torn, dona resultats amb millor reproducibilitat.

El procediment per a la quantificació cel·lular és el següent:

1. Portar les cèl·lules adherents fins a una suspensió utilitzant tripsina/EDTA i resuspendre en un volum de medi fresc al menys equivalent al volum de tripsina. Per a cèl·lules que creixen en grups, centrifugar i resuspendre en un volum petit i pipetejar per tal de trencar els agregats.
2. Agafar, sota condicions estèrils, 100-200 μ l de suspensió cel·lular.
3. Afegir blau Tripà (p.ex si afegim un volum equivalent a la suspensió, el factor de dilució=2) i barrejar per pipeteig.
4. Netejar la cambra de recompte cel·lular (cambra de Neubauer).
5. Humitejar el cubreobjectes amb aigua o alè. Lliscar els cubreobjectes sobre la cambra amb pressió fins que apareguin els anells de refracció de Newton (es veuen com un arc de Sant Martí sotal cubreobjectes)
6. Omplir tots dos costats de la cambra (aprox. 5-10 μ l) amb la suspensió cel·lular i observar sota un microscopi visible utilitzant un augment de x20.
7. Comptar el nombre de cèl·lules viables (s'observen com a cèl·lules brillants) i no viables (blaves). És ideal comptar >100 cèl·lules per tal d'augmentar l'exactitud del recompte. Anotar el nombre de quadres comptats per tal d'obtenir un recompte >100.
8. Calcular la concentració de cèl·lules viables i no viables i el percentatge de cèl·lules viables utilitzant les equacions següents:

A= Mitja de cèl·lules viables comptades= Cèl·lules viables totals comptades / n^o de quadres

B= Mitja de cèl·lules no viables comptades= Cèl·lules no viables totals / n^o de quadres

C= Factor de dilució

D= Factor de correcció (subministrat pel fabricant de l'hemocitòmetre)*

Per tant:

- Concentració de cèl·lules viables (cèls/ml)= A x C x D
- Concentració de cèl·lules no viables (cèls/ml)= B x C x D
- Nombre total de cèl·lules viables= concentració de cèl·lules viables x volum
- Nombre total de cèl·lules= nombre de cèl·lules viables + nombre de cèl·lules mortes
- Percentatge de viabilitat= (N^o de cèl·lules viables/ N^o total de cèl·lules) x 100

*En el cas de la cambra de Neubauer el factor de correcció es calcula de la següent forma:

La superfície de recompte (16 quadres) és d'1 mm² i la profunditat és de 0.1 mm

Cèls/ μ l= N^o cèl·lules comptades/ (superfície (mm²) x profunditat (mm) x dilució)

Per tant,

Cèls/ml= (N^o cèl·lules comptades/ (1 mm² x 0.1 mm x dilució)) x 10³= N^o cèl·lules comptades x factor de dilució x **10⁴**, on 10⁴ és el factor de correcció.

3. 6. 6. Criopreservació de línies cel·lulars

El protocol següent descriu la utilització de mètodes passius que impliquen un congelador elèctric per a la criopreservació de cultius cel·lulars.

1. Observar els cultius amb un microscopi invertit per a comprovar la densitat cel·lular i confirmar la presència o absència de contaminants fúngics o bacterians.

Nota: Per a la congelació, és essencial que els cultius estiguin sans i a la fase logarítmica de creixement. Això pot aconseguir-se utilitzant cultius sub-confluents i canviant el medi de cultiu 24 hores abans de la congelació.

2. En el cas de línies cel·lulars adherents, després de rentar amb PBS, portar les cèl·lules a una suspensió utilitzant tripsina/EDTA i resuspendre en un volum de medi fresc al menys equivalent al volum de tripsina. Les línies cel·lulars en suspensió poden ser utilitzades directament.
3. Agafar una petita quantitat de cèl·lules (100-200 μ l) i realitzar un recompte cel·lular (veure punt 3. 6. 5.). Seria ideal que la viabilitat cel·lular fós superior al 90% per tal d'aconseguir una bona recuperació després de la congelació.
4. Centrifugar el cultiu restant a 150g durant 5 minuts.
5. Resuspendre les cèl·lules a una concentració de $2-4 \times 10^6$ cèl·lules/ml en medi de congelació.

Nota: El crioprotector utilitzat normalment és el dimetilsulfòxid (DMSO), tot i així, aquest no és apropiat per a totes les línies cel·lulars. En aquests casos ha d'utilitzar-se una alternativa com el glicerol. Tant per a la línia cel·lular COS-7 com per a les línies limfoblastoides transformades amb EBV, el medi de congelació sol ser medi de cultiu complet amb 5-10% DMSO.

6. Pipetejar aliquotes d'1 ml de cèl·lules en vials crioprotectors que han estat retolats amb el nom de la línia cel·lular, n^o de pas, concentració cel·lular i data.

7. Col·locar els vials en un recipient congelador passiu com el "Mr. Frosty" (Nalgene). Omplir el recipient congelador amb isopropanol i col·locar-ho a -80°C durant tota la nit.

Nota: La velocitat de refredament pot variar però en general una velocitat entre -1°C i -3°C per minut és adequada per a la majoria de cultius cel·lulars.

8. Els vials congelats han de ser transferits a la fase vapor d'un contenidor de nitrogen líquid i les seves posicions han de ser anotades.

3. 7. Expressió transitòria *in vitro* en cultius cel·lulars eucariotes

La transfecció és el procés pel qual s'introdueix DNA exogen en cèl·lules en cultiu, i normalment va seguit de l'expressió dels gens del DNA introduït.

Depenent del tipus cel·lular utilitzat, el procés de transfecció serà més o menys complicat. Existeixen diferents mètodes de transfecció comuns: co-precipitació amb fosfat càlcic, electroporació, i la utilització de vectors virals. Darrerament s'hi han afegit mètodes de transfecció mediats per liposomes catiónics (lipofecció, citofecció). Altres classes de compostos que medien transfecció inclouen lipopoliamines i dendrímers.

En el nostre cas, la transfecció en cèl·lules COS-7 s'ha realitzat amb el reactiu de transfecció "FuGENE 6 Transfection Reagent" (Roche), una barreja de lípids (no liposomal) que es complexa amb i transporta DNA cap a l'interior de la cèl·lula.

Pel que fa a la transfecció de les línies cel·lulars limfoblatoïdes humanes s'ha utilitzat l'electroporació, amb l'aparell "Nucleofector" (Amaxa) i el kit d'electroporació específic de cèl·lules B "Human B Cell Nucleofector Kit".

3. 7. 1. Transfecció de la línia cel·lular COS-7

Es va utilitzar el reactiu de transfecció "FuGENE 6 Transfection Reagent" de Roche.

Per a realitzar la transfecció es necessita:

- Medi de cultiu lliure de sèrum, estèril, sense additius o suplementos.
- Solució de DNA plasmídic (entre 0.02 µg/µl i 2.0 µg/µl) en tampó TE estèril o aigua estèril.

1. Preparació de les cèl·lules adherents: Un dia abans de l'experiment de transfecció, tripsinitzar, ajustar la concentració cel·lular i sembrar les cèl·lules en el flascó de cultiu escollit. Per a la majoria de tipus cel·lulars, sembrant 1-3 x 10⁵ cèl·lules per pou en una placa de 6 pous amb 2 ml de medi i incubant tota la nit, s'aconsegueix una confluència del 50-80%.

2. Preparació del complex FuGENE 6 Reagent : DNA i transfecció de les cèl·lules. Preparació per a cèl·lules adherents en plaques de 6 pous: Per a la optimització inicial, utilitzar relacions FuGENE : DNA de 3:1, 3:2 i 6:1 (μl , per al reactiu FuGENE i μg , per al DNA, respectivament). Aquestes relacions funcionen molt bé per a cèl·lules adherents i en suspensió utilitzades normalment.

IMPORTANT: El complex ha de ser preparat en medi que no contingui sèrum, fins i tot si les cèl·lules són transfectades en presència de sèrum.

Preparació del complex per a una placa de 6 pous, amb tres proporcions diferents de reactiu:DNA

Tub	Medi sense sèrum (μl)	Reactiu FuGENE (μl)	DNA (μg)
3:1	97	3	1
3:2	97	3	2
6:1	94	6	1

El procediment de transfecció és el següent:

1. Diluir el reactiu FuGENE amb medi sense sèrum (sense antibiòtics ni fungicides):
 - Per a cada relació, en tubs separats, pipetejar primer el volum de medi sense sèrum i afegir-hi el reactiu al medi sense permetre que la punta de la pipeta toqui les parets del tub, ja que això pot afectar l'eficiència de la transfecció.
 - Fer vórtex durant 1 segon i incubar durant 5 minuts a temperatura ambient.
2. Afegir el DNA al reactiu FuGENE diluït. El volum de DNA afegit ha d'estar entre 0.5 i 50 μl .
3. Barrejar i incubar el complex durant un mínim de 15 minuts i un màxim de 45 minuts.
4. Afegir el complex gota a gota a les cèl·lules i sense haver retirat el medi de cultiu. Moure la placa per tal que tot es reparteixi bé.

5. Retornar les cèl·lules a l'incubador fins que es realitzi l'assaig per a l'expressió gènica (normalment després de 24-48 hores). No és necessari canviar el medi. Si s'ha utilitzat medi sense sèrum en el pas de la transfecció, reemplaçar-lo per medi amb sèrum després de 3-8 hores de la transfecció.

3. 7. 2. Electroporació de línies cel·lulars limfoblastoides humanes

Es va utilitzar l'electroporador "Nucleofector" de la casa comercial Amaxa. Per alectroporar les línies limfoblastoides transformades amb EBV es va utilitzar el kit "Human B Cell Nucleofector Kit".

El protocol utilitzat per a la l'electroporació és el següent:

Preparació de la "Nucleofection Solution"

Afegir 0.5 ml de "Supplement" a 2.25 ml de "Nucleofection Solution" i barrejar. La solució de nucleofecció està preparada per al seu ús i és estable durant 3 mesos a 4°C.

Una mostra alectroporar conté:

- 1-5 x 10⁶ cèl·lules
- 1-5 µg de DNA plasmídic (en 1-5 µl d'H₂O o TE) o bé 2 µg de plàsmid control pmaxGFP.
- 100 µl de "Human B Cell Nucleofector Solution"

El n^o mínim de cèl·lules és de 2 x 10⁵ cèl·lules ja que un nombre menor pot portar a un major increment de la mortalitat cel·lular. El nombre màxim de cèl·lules ha de ser 2 x 10⁷.

1. Preparar el nombre requerit de cèl·lules B.
2. Preparar d'1-5 µg de DNA per a cada mostra.
3. Pre-escalfar a temperatura ambient la "Human B Cell Nucleofector Solution" suplementada.

4. Preparar plaques de 6 pous amb 2 ml de cultiu per pou i pre-escalfar-les en un incubador a 37°C i 5% CO₂, de tal manera que hi hagi 1 pou per a cada mostra a electroporar.
5. Agafar una al·lquota de suspensió cel·lular i realitzar un recompte (veure punt 3.6.5.) per determinar la densitat cel·lular.
6. Centrifugar el nombre requerit de cèl·lules (d'1-5 x 10⁶ cèl·lules per a cada mostra a electroporar) durant 10 minuts a 200g. Descartar el sobrenedant completament de tal forma que no quedi PBS/BSA cobrint el *pellet* cel·lular.
7. Resuspendre el *pellet* en la "Human B Cell Nucleofector Solution", fins a una concentració d'1-5 x 10⁶ cèl·lules / 100 µl. Evitar tenir la suspensió cel·lular durant més de 20 minuts en la "Human B cell Nucleofector Solution", ja que això redueix la viabilitat cel·lular i l'eficiència de transferència gènica.

Important: Els passos 8-12 han de realitzar-se separatament per a cada mostra.

8. Barrejar 100 µl de suspensió cel·lular amb 1-5 µg de DNA.
9. Transferir la mostra a una cubeta certificada per Amaxa. Assegurar-se de que la mostra cobreix el fons de la cubeta, i evitar formar bombolles d'aire per pipeteig. Tancar la cubeta amb el tap blau subministrat.
10. Insertar la cubeta en el suport de l'aparell i seleccionar el programa U-15 (veure el manual de l'aparell "Nucleofector"). Pressionar el botó "X" per tal d'iniciar el programa.
11. Per tal d'evitar dany a les cèl·lules, retirar les mostres de la cubeta immediatament després de que finalitzi el programa (a la pantalla es mostra "OK"). Treure la cubeta de l'aparell. Per a transferir les cèl·lules de les cubetes, es recomana utilitzar les pipetes de plàstic subministrades al kit per tal d'evitar el dany i la pèrdua de les cèl·lules. Afegir 500 µl del medi de cultiu pre-escalfat a 37°C a la cubeta i transferir la mostra a un pou de la placa de 6 pous.

12. Pressionar el botó “X” per tal de reiniciar l'aparell.
13. Repetir els passos 8-12 per a les mostres restants.
14. Incubar les plaques en un incubador a 37°C i 5% CO₂. Després de la nucleofecció, l'expressió gènica pot ser analitzada a diferents temps. Depenent del gen, l'expressió normalment pot ser detectable al cap de 3-8 hores.

3. 7. 3. Extracció de RNA a partir de cèl·lules adherents i cèl·lules en suspensió

S'utilitza el kit “Total RNA Isolation Kit, PURESRIPT®, RNA Isolation Kit” de la casa comercial Gentra Systems.

Recollida de les mostres

Les mostres han de ser fresques o els pellets cel·lulars han de ser emmagatzemats congelats a –70°C fins a –80°C. Recollir les cèl·lules en cultiu o altres cèl·lules en suspensió i col·locar-les en gel. Determinar el nombre de cèl·lules utilitzant un hemocitòmetre o un altre comptador cel·lular (veure punt 3.6.5.). Aïllar el RNA tan aviat com sigui possible.

Protocol de l'extracció de RNA per a mostres d'1-2 milions de cèl·lules

Lisi cel·lular:

1. Afegir 1-2 milions de cèl·lules en suspensió en fluïd corporal, solució equilibrada de sal o medi de cultiu en un microtub d'1.5 ml i col·locar en gel.
2. Centrifugar a 13000-16000g durant 5 segons per tal de pelletejar les cèl·lules. Eliminar el sobrenedant amb una pipeta, deixant visible el pellet cel·lular més 10-20 µl de líquid residual.
3. Fer vòrtex al tub vigorosament per tal de resuspendre les cèl·lules en el sobrenedant residual (invertir el tub per tal de comprovar que el pellet ha desaparegut per complet). Això facilita molt la lisi cel·lular al pas 4.

4. Afegir 300 µl de Cell Lysis Solution a les cèl·lules resuspeses i pipetejar amunt i avall no més de 3 vegades per tal de llisar les cèl·lules. Alternativament, les cèl·lules en cultiu adherent poden ser llisades directament a la placa, eliminant primer el medi de cultiu i afegint després 300 µl de **Cell Lysis Solution**. Agitar fins a cobrir la placa i pipetejar les cèl·lules amunt i avall 3 vegades abans de transferir-les a un microtub d'1,5 ml.

Precipitació de DNA i proteïnes:

1. Afegir 100 µl de **Protein-DNA Precipitation Solution** al llisat cel·lular.
2. Invertir el tub unes 10 vegades i col·locar-lo en un bany de gel durant 10 minuts.
3. Centrifugar a 13000-16000g durant 3 minuts. El precipitat de DNA i proteïnes formarà un pellet blanc compacte.

Precipitació del RNA:

1. Abocar el sobrenedant que conté el RNA (deixant a sotal pellet de precipitat de DNA i proteïnes) en un nou microtub d'1,5 ml que contingui 300 µl d'isopropanol 100%
2. Barrejar la mostra invertint-la unes 50 vegades.
3. Centrifugar a 13000-16000g durant 3 minuts; el RNA serà visible com a un pellet petit i translúcid.
4. Eliminar el sobrenedant i escórrer el tub en paper absorbent. Afegir 300 µl d'etanol 70% i invertir el tub diverses vegades per tal de rentar el pellet de RNA.
5. Centrifugar a 13000-16000g durant 1 minut . Buidar amb cura l'etanol.
6. Invertir i escórrer el tub en paper absorbent net i deixar que s'assequi a l'aire durant 10-15 minuts.

Hidratació del RNA:

1. Afegir 50 µl de RNA Hydration Solution (50 µl donaran una concentració de 200 µg/ml si el producte total és 10 µg de RNA)
2. Rehidratar el RNA en gel durant al menys 30 minuts. Alternativament, emmagatzemar a -70°C o -80°C fins a la seva utilització.
3. Abans d'utilitzar, fer vòrtex a la mostra durant 5 segons i fer un pols de centrífuga. Pipetejar la mostra amunt i avall diverses vegades per assegurar una correcta barreja.
4. Emmagatzemar la mostra de RNA purificat a -70°C o -80°C.

Tractament amb DNasa I

Per evitar contaminar amb DNA les mostres de RNA extretes -fet que pot interferir en les reaccions posteriors de RT-PCR, per exemple- les mostres de RNA poden tractar-se amb DNasa I abans de fer una síntesi de la primera cadena de cDNA per a assajos posteriors.

Es va utilitzar la RQ1 RNase-Free DNase de la casa comercial Promega:

1. Preparar la reacció de digestió següent:

RNA en aigua o tampó TE	1-8 µl
RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer	1 µl
RQ1 RNase-Free DNase	1U/µg RNA
Aigua, lliure de nucleases	Fins a 10 µl
2. Incubar a 37°C durant 30 minuts.
3. Afegir 1 µl de RQ1 DNase Stop Solution per tal de finalitzar la reacció
4. Incubar a 65°C durant 10 minuts per tal d'inactivar la DNasa.
5. Afegir una porció o tot el contingut del RNA tractat a una reacció de RT-PCR.

3. 7. 4. Síntesi de la primera cadena de cDNA a partir de RNA

Es va utilitzar el kit “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit” (Roche) per a la síntesi de la primera cadena de cDNA a partir de RNA. En aquesta reacció el RNA és retrotranscrit a cDNA de cadena simple que pot ser directament utilitzat per a la posterior amplificació per PCR amb encebadors específics de gen en un termociclador convencional i/o instruments de PCR en temps real (p.ex. l'instrument LightCycler), o per a altres aplicacions.

La figura següent descriu la síntesi de la primera cadena de cDNA per a una RT-PCR de dos passos.

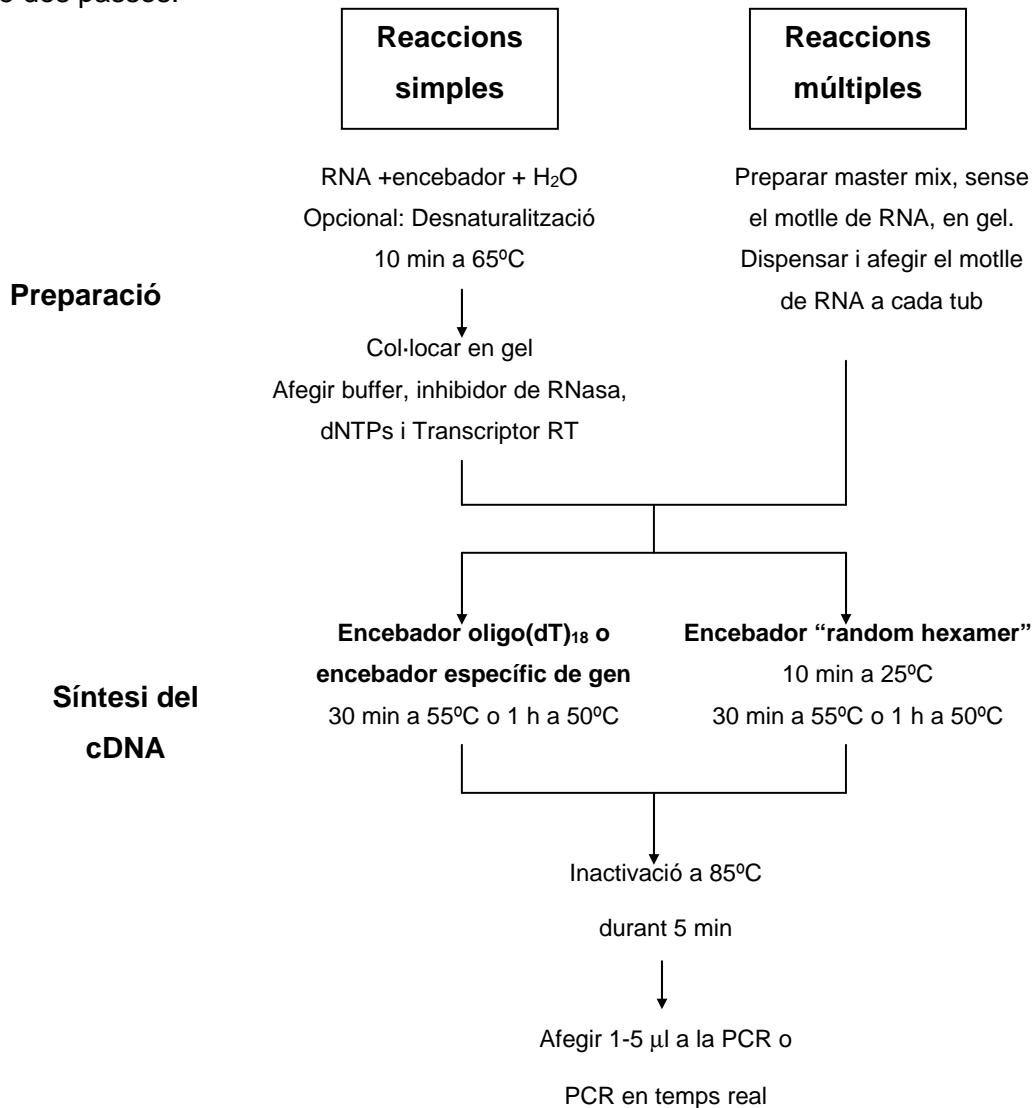


Figura 22. Síntesi de la primera cadena de cDNA per a una RT-PCR de dos passos.

El protocol és el següent:

1. Descongelar tots els components necessaris i col·locar-los en gel. Centrifugar breument els reactius abans de començar.
2. Pipetejar en un tub *thin wall* i lliure de DNasa i RNasa, fins a un volum total de 20 µl de reacció de RT, en gel, els següents components:

Reactiu	Volum	Quantitat final
Aigua, grau PCR	fins a 13 µl	
RNA total	variable	1 µg (10 ng-5 µg)
Encebador Oligo(dT)18 (50pmol/µl)	1 µl	2.5 µM
ó <i>random hexamer primer</i> (600 pmol/µl)	2 µl	60 µM
ó encebador específic de gen	X µl	0.5-2.5 µM
Volum final	13 µl	

3. **Opcional:** Incubar a 65°C durant 10 minuts i col·locar el tub immediatament en gel. Aquest pas assegura la desnaturalització de possibles estructures secundàries de RNA.
4. Afegir-hi els següents components:

Reactiu	Volum	Quantitat final
Transcriptor RT Reaction Buffer (5X)	4 µl	1X
Protector RNase Inhibitor (40 U/µl)	0.5 µl	20 U
Deoxinucleotide Mix (10 mM)	2 µl	1 mM cadascun
Transcriptor Reverse Transcriptase	0.5 µl	10 U
Volum final	20 µl	

5. Incubar 30 minuts a 55°C. Si el motlle de mRNA és més gran de 4 kb, es recomana incubar a 50°C durant 1 hora.

Nota: Quan s'utilitzin els "random hexamer primers", incubar primer 10 minuts a 25°C.

6. Inactivar la "Transcriptor Reverse Transcriptase" escalfant a 85°C durant 5 minuts. Col·locar el tub en gel.
7. En aquest punt el tub de reacció pot ser emmagatzemat a 2-8°C durant 1-2 h o a -15°C fins a -25°C durant períodes més llargs.

El cDNA de cadena simple resultant pot ser amplificat mitjançant PCR utilitzant encebadors específics de seqüència. El cDNA pot ser afegit directament a la PCR sense purificar.

- Utilitzar 1-5 µl de la reacció de cDNA a la següent reacció de PCR en un volum final de 50 µl.
- Utilitzar 2-5 µl de la reacció de de cDNA o dilucions d'aquesta en un volum final de reacció de PCR de 20 µl a l'instrument LightCycler

3. 7. 5. RT-PCR en un sol pas (“*One-step RT-PCR*”)

Es va utilitzar el kit “QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit” en els casos en el que no es van obtenir bons resultats amb el protocol anterior.

Aquest kit proporciona un format convenient per a RT-PCR específiques altament eficients utilitzant qualsevol RNA. El kit conté components optimitzats que permeten que tant la transcripció inversa com l'amplificació per PCR tinguin lloc en el que s'anomena reacció d'un pas (“one-step” reaction). A més a més, es va optimitzar amb la solució “Q-Solution”. La “Q-Solution” canvia el comportament de fusió dels àcids nucleics i pot ser utilitzada per a sistemes de RT-PCR que no funcionen sota condicions estàndards.

El protocol és el següent:

1. Descongelar tots els reactius necessaris per a la reacció i deixar-los en gel.
2. Preparar una solució mare, per a una reacció, segons la taula:

Component	Volum	Concentració final
Aigua lliure de RNases (subministrat)	Variable	--
5X QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	10 µl	1X
dNTP Mix (que conté 10 mM de cada dNTP)	2 µl	400 µM
5X Q-Solution	10 µl	1X
Encebador A (<i>forward</i>)	Variable	0.6 µM
Encebador B (<i>reverse</i>)	Variable	0.6 µM
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2 µl	--
Inhibidor de RNases (opcional)	Variable	5 U/reacció
RNA motlle, afegit al pas 4	Variable	1 pg- 2 µg
Volum total	50 µl	--

3. Barrejar la solució mare, i dispensar els volums apropiats en tubs de PCR.
4. Afegir el RNA motlle ($\leq 2 \mu\text{g}$ / reacció) a cada tub de PCR.
5. Programar el termociclador segons el programa següent:
 - **Transcripció inversa:** 30 minuts a 50°C (si els resultats no són satisfactoris, es pot pujar la temperatura fins a 60°C)
 - **Pas d'activació inicial de la PCR:** 15 minuts a 95°C (La "HotStarTaq DNA Polymerase" s'activa en aquest pas; a la vegada s'inactiven les transcriptases reverses i es desnaturalitza el cDNA motlle sintetitzat en el pas anterior)
 - **25-40 cicles amb els següents passos** (depenent de la quantitat de RNA motlle i abundància de transcrit diana):
 - Desnaturalització: 0.5-1 minut a 94°C
 - Anellament: 0.5 –1 minut a $50-68^{\circ}\text{C}$ (aproximadament 5°C per sota de les T_m dels encebadors)
 - Extensió: 1 minut a 72°C (Per a productes d'1-2 kb, augmentar el temps d'extensió en 30-60 segons)
 - **Extensió final:** 10 minuts a 72°C
6. Iniciar el programa de RT-PCR mantenint els tubs encara en gel. Esperar fins que el termociclador hagi assolit la temperatura de 50°C . Col·locar llavors els tubs de PCR al termociclador.

Nota: Després de l'amplificació, les mostres poden ser emmagatzemades tota la nit a $2-8^{\circ}\text{C}$ o bé a -20°C per a un emmagatzematge més llarg.

3. 8. Mesura de l'expressió gènica

3. 8. 1. Quantificació de l'expressió gènica mitjançant PCR en temps real

Es va utilitzar el kit "LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I". Aquest kit és una barreja de reacció "Hot Start" per a PCR llesta per a ser utilitzada, que conté FastStart Taq Polymerase i el colorant SYBR Green I específic de doble cadena per a la detecció. Aquest kit està específicament adaptat per aplicacions de PCR amb "Hot Start" en capil·lars de vidre utilitzant l'instrument LightCycler (Roche)

1. Col·locar els capil·lars necessaris (depenent del nombre total de mostres) en adaptadors de centrífuga prèviament refredats.
2. Preparar la solució mare, en un tub d'1.5 ml, segons la taula següent:

Component	Volum	Concentració final
Aigua, grau PCR	11.6 µl	--
MgCl ₂ , solució stock	2.4 µl	4 mM
Encebador A (<i>forward</i>) 10 µM	1 µl	0.5 µM
Encebador B (<i>reverse</i>) 10 µM	1 µl	0.5 µM
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	2 µl	1X
Volum total	18 µl	

Es va realitzar una RT-PCR en temps real (en dos passos) a partir de RNA de línies limfoblastoides de la família RPAD SJD1, portadora de la mutació 6974-6994del 21pb en el gen *PRPF8*. Els nivells de mRNA de l'al·lel salvatge i del *PRPF8* total (salvatge + mutat) es van quantificar utilitzant encebadors específics de l'al·lel salvatge i del total, respectivament:

Taula VIII. Encebadors utilitzats en la quantificació de l'expressió gènica del l'al·lel salvatge i l'al·lel mutat de *PRPF8*

Encebador*	Seqüència	Tm (°C)
FRP1-WT-F	5'-CAGGAGGGGGAGGTTTAC-3'	48.1
FRP1-comú-F	5'-GCCCTCTCACTTCCTCAAC-3'	48.3
FRP1-comú-R	5'-AGCAGGAGGCAGGGAAAC-3'	51.4

*L'encebador FRP1-WT-F s'uneix només a l'al·lel salvatge del gen *PRPF8*, mentre que FRP1-comú-F i FRP1-comú-R s'uneixen tant a l'al·lel salvatge com a l'al·lel mutat. Realitzant la combinació FRP1-WT-F/FRP1-comú-R obtenim la quantificació de l'al·lel salvatge, mentre que si realitzem la combinació FRP1-comú-F/FRP1-comú-R obtenim la quantificació dels dos al·lells, tant normal com mutat. Fent les relacions entre la primera PCR i la segona, obtenim la relació de l'al·lel salvatge respecte del total.

3. Barrejar la solució i repartir 18 µl a cada capil·lar.
4. Afegir 2 µl de cDNA motlle.
5. Tapar els capil·lars amb els taps subministrats i col·locar els adaptadors de centrífuga amb els capil·lars a una microcentrífuga. Centrifugar a 700 g durant 5 segons (3000 rpm en una centrífuga de taula)
6. Col·locar els capil·lars al rotor de l'instrument LightCycler.
7. Iniciar el programa de PCR, que en aquest cas va ser el següent:

	Segment	Temp.(°C)	t(seg.)	°C/segon	Lectura
Pre-incubació	1	95	600	20	No
Amplificació (30-45 cicles)	1	95	10	20	No
	2	55	5	20	No
	3	72	10	20	Senzilla
Corba de fusió	1	95	0	20	No
	2	65	15	20	No
	3	95	0	0.1	Contínua
Refredament	1	40	30	20	No

La lectura de la fluorescència es realitza pel canal 1 (F1).

Generació de corbes estàndard

La quantificació de l'expressió gènica del gen *PRPF8* en línies cel·lulars limfoblastoides es va dur a terme interpolant els Cp (*crossing point*, o cicle llindar de PCR) obtinguts en les mostres en una corba estàndard del gen *PRPF8*. Per a realitzar la corba patró, es va partir d'una mostra de RNA retrotranscrita a cDNA, a la qual se li va assignar un valor arbitrari de 10^4 i es van realitzar dilucions seriades, que es van utilitzar per a la reacció de PCR en temps real. La corba estàndard es va obtenir representant el logaritme de la concentració respecte del cicle llindar (Cp). La concentració de les mostres desconegudes va ser calculada a partir de la línia de regressió automàticament. Els nivells d'expressió del gen *PRPF8* es van representar en unitats arbitràries, i es va calcular la relació entre l'expressió de l'al·lel salvatge respecte del mutat.

3. 8. 2. Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant *microarrays* de DNA

El sistema utilitzat per a l'anàlisi de l'expressió gènica dels pacients afectats de RPAD va ser l' "Applied Biosystems Human Genome Survey Microarray V2.0". Aquest *microarray* conté 32,878 sondes per a la interrogació de 29,098 gens, fent que sigui la cobertura genòmica més informativa i comprensible de totes les plataformes de *microarrays*. El conjunt de dades inclou tant gens de la base de dades pública com de la base de dades de *Celera Genomics*. Utilitzant el sistema de classificació PANTHER, el total de gens representats al *microarray* es pot classificar segons la funció molecular del producte del gen i segons el procés biològic en el qual el gen participa (Taula IX).

Taula IX. Funcions moleculars i processos biològics identificats per als gens en l' "Applied Biosystems Human Genome Survey Microarray V2.0". [De: Applied Biosystems Human Genome Survey Microarray V2.0, Product Bulletin]

Biological Processes	%	Molecular Function	%
Coenzyme and prosthetic group metabolism	0.2	Cell junction protein	0.2
Non-vertebrate process	0.2	Ion channel	0.2
Apoptosis	0.4	Ligase	0.2
Electron transport	0.4	Select calcium binding protein	0.2
Homeostasis	0.4	Synthase and synthetase	0.2
Carbohydrate metabolism	0.6	Transfer/carrier protein	0.4
Protein targeting and localization	0.6	Cell adhesion molecule	0.6
Sulfur metabolism	0.6	Chaperone	0.6
Amino acid metabolism	0.8	Extracellular matrix	0.6
Cell adhesion	1.0	Isomerase	0.6
Muscle contraction	1.0	Membrane traffic protein	0.6
Neuronal activities	1.0	Hydrolase	0.8
Cell proliferation and differentiation	1.3	Lyase	0.8
Oncogenesis	1.3	Phosphatase	0.8
Transport	1.3	Viral protein	0.8
Lipid, fatty acid and steroid metabolism	1.5	Protease	1.1
Cell cycle	1.9	Signaling molecule	1.1
Sensory perception	3.1	Kinase	1.3
Cell structure and motility	3.8	Oxidoreductase	1.7
Developmental processes	4.0	Select regulatory molecule	1.7
Immunity and defense	5.8	Transferase	1.9
Signal transduction	7.5	Miscellaneous function	3.4
Protein metabolism and modification	8.8	Defense/immunity protein	4.0
Nucleoside, nucleotide, and nucleic acid metabolism	13.8	Cytoskeletal protein	4.5
Total classified	64.5	Transcription factor	8.1
		Receptor	8.3
		Nucleic acid binding	13.2
		Total classified	59.2
Biological process unclassified	36.5	Molecular function unclassified	40.8

Els experiments es van dur a terme utilitzant oligo-*microarrays* humans d'un color de la casa comercial Applied Biosystems (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600950&tab=DetailInfo>).

Cada *microarray* va ser hibridat amb una mostra de RNA marcada amb digoxigenina. Els arrays hibridats van ser escanejats utilitzant l' "Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer" per tal de produir imatges que després van ser processades i quantificades.

Disseny:

L'experiment es va dissenyar per tal d'estudiar el perfil d'expressió gènica de quatre pacients afectats de RPAD amb mutació al gen *PRPF8*. Els pacients CAR0001 i CAR0002 són portadors de la mutació 6974-6994 del 21 pb (V2325fsX2329), mentre que els pacients CAR0004 i CAR0005 són portadors de la mutació 6893-6896 del ins 7 pb (L2298fsX2337). El pacient CAR0003 no és portador de cap de les dues mutacions ni pateix RPAD, per tant es va utilitzar com a individu control (normal).

Es va extreure el RNA total (veure punt 3.7.3.) a partir de les les cèl·lules limfoblastoides transformades amb EBV dels 5 individus. Aquests RNAs es van enviar al CNIC (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares), on es van processar de la següent forma:

1. Els RNAs van ser transformats en cRNA marcat amb digoxigenina (cRNA-DIG).
2. Aquest cRNA-DIG (10 µg per *microarray*) va ser injectat en cada cambra d'hibridació de *microarray*.
3. Després de la hibridació a 55°C durant 16 hores, es va realitzar un rentat per tal d'eliminar el material no unit al *microarray*.
4. Els punts que van retenir el cRNA-DIG van ser visualitzats utilitzant el kit de detecció "Applied Biosystems Chemiluminescence Detection Kit". El kit utilitza una fosfatasa alcalina anti-DIG que hidrolitza un substrat quimioluminescent per tal de

generar llum a 458 nm que llavors pot ser analitzada utilitzant l'analitzador "Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent *Microarray Analyzer*".

L'anàlisi de les dades obtingudes amb els *microarrays* és força complexa. Els mètodes d'anàlisi general de les dades (Knudsen, 2004) es poden dividir, a grans trets, en:

- Anàlisi de les imatges
- Normalització
- Anàlisi de la significància
- PCA
- *Clustering*
- Predicció de funció
- Classificació

Anàlisi de les imatges

L'anàlisi de les imatges de l'*array* escanejat intenta extreure una intensitat per a cada punt o característica de l'*array*. L'anàlisi pot dividir-se en diferents passos: *gridding* (aliniació d'un entramat establert amb els punts obtinguts), segmentació (separació dels punts identificats del soroll de fons), extracció de la intensitat (extracció de la intensitat de cada punt obtingut respecte del soroll de fons) i correcció del soroll de fons.

Normalització

Normalització significa ajustar les dades del *microarray* per als efectes que apareixen degut a la variació en la tecnologia més que per diferències biològiques entre les mostres de RNA o entre les sondes impreses. L'equilibri dels colorants varia normalment amb la intensitat del punt i la posició espacial en l'*array*. La normalització *loess* proporciona un mètode general de normalització comprovat, que ha donat bons resultats en una gran varietat d'*arrays*. El mètode pot ser refinat utilitzant pesos de qualitat per a punt individuals. El mètode es combina millor amb gràfiques

diagnòstiques de les dades que mostren les característiques espacials i d'intensitat. Quan les gràfiques mostren que les tendències (*bias*) encara resten a les dades després de la normalització, han de realitzar-se altres passos de normalització com la “*plate-order normalization*” o la “*scalenormalization*” entre els *arrays*. Es pot utilitzar una normalització composta quan hi ha punts control que se sap que no estan diferencialment expressats.

Significància

Quan s'ha observat que, per exemple, un gen se sobreexpressa doble en una mostra respecte d'una altra ($\log_{10} \text{fold} = 0.3$), ens hem d'asegurar que això no sigui un error experimental. Per tant, s'ha de determinar si la sobreexpressió és significant o no. Hi ha moltes formes d'estimar la significància en experiments de xips de DNA. Bàsicament, per tal d'assajar l'error experimental s'ha de repetir l'experiment i mesurar la variació. Si es repeteix tant el control com la mostra, es pot utilitzar un “*t-test*” per tal de determinar si l'expressió d'un gen particular és significativament diferent entre el control i la mostra. El “*t-test*” es fixa en la mitja i la variança de les distribucions de la mostra i del control i calcula la probabilitat de que la diferència observada en la mitja tingui lloc quan la hipòtesi nul·la és certa (la hipòtesi nul·la diu que la mitja de les dues distribucions és igual). Quan s'utilitza “*t-test*”, sovint s'assumeix que hi ha la mateixa variança entre la mostra i el control. Això permet ajuntar la mostra i el control per a l'estimació de la variança. Si la variança no pot ser assumida igual, es pot utilitzar el “*Welch's t-test*” que assumeix variances desiguals en les dues poblacions. Però, quan s'utilitza “*t-test*” per a l'anàlisi de les dades dels *microarrays*, és un problema que hi hagi un nombre baix de mostres. Com més baix és el nombre de mostres, més difícil és estimar la variança. Amb només dos replicats, és pràcticament impossible. Hi ha diverses solucions a això. La solució més simple és tenir en compte l'increment (“*fold-change*”) per a experiments amb baix nombre de replicats (menys de 3) i no considerar gens amb un increment de l'expressió gènica inferior a 2. L'altra possibilitat és basar

l'estimació de la variança no només en la mesura d'un únic gen, sino incloent estimacions de variança de la població sencera. S'han descrit molts mètodes per a aquest fi.

Si es tenen més de dues condicions, el “*t-test*” no és el millor mètode a escollir, perquè el nombre de comparacions creix si es realitzen totes les possibles comparacions entre condicions. El mètode d'anàlisi de variança (ANOVA, Analysis Of VAriance) calcula la probabilitat de trobar les diferències observades en les mitges entre dues o més condicions, quan no hi ha diferències entre les mitges.

PCA (Principal Component Analysis)

Si volem mostrar les dades en dues dimensions, volem capturar la major variança possible en les dades en aquestes dues dimensions. El PCA s'ha desenvolupat per a aquesta fi.

Clustering

Si només es té un experiment i un control, les primeres anàlisis de dades es limitaran a una llista de gens regulats ordenats segons la magnitud de sobreexpressió o repressió, o ordenats segons la significància de la regulació determinada en un “*t-test*”. Però si es tenen més experiments –que mesurin els mateixos gens sota diferents condicions, en diferents mutants, en diferents pacients, o a diferents temps durant un experiment- té sentit agrupar els gens que han canviat significativament en *clusters* que es comporten de manera similar en les diferents condicions. Existeixen diferents formes de realitzar *clusters* (els “*hierarchical clusters*” i els “*K-means clusters*” són els més comuns).

Els *clusters* normalment es visualitzen amb arbres. En anàlisis de xips de DNA es comú visualitzar-los representant el nivell d'expressió o canvis en l'expressió (“fold-change”) en cada experiment amb una matriu codificada per colors.

Predicció de funció

Els gens que apareixen al mateix *cluster* tenen similars respostes de transcripció a diferents condicions. És probable que això sigui causat per alguna cosa en comú en la seva funció o paper. Si un *cluster* està poblat per gens amb una funció coneguda – i aquesta funció és similar - es pot deduir la funció de gens “orfes” en el mateix *cluster*.

Una altra eina valuosa per assignar funcions, en particular per a *clusters* on no hi ha gens amb funció coneguda, és la predicció de funció. La predicció de funció entra en joc quan no trobem homologia de seqüències amb altres proteïnes amb funció coneguda. En el seu lloc, es poden utilitzar un gran nombre de propietats i característiques predites de la proteïna que poden ser utilitzades per predir una possible classe de funció. Resulta que proteïnes amb funció similar també comparteixen algunes similituds en la llargada de la seqüència d'aminoàcids, modificació post-transcripcional, senyal de destinació cel·lular, etc. Agafades per separat, cadascuna d'aquestes característiques és una predictora de categoria de funció. Agafades juntes, un nombre suficientment gran de característiques pot ser utilitzat per fer prediccions exactes de la classe de funció.

Potser l'aplicació més prometedora dels *microarrays* de DNA és per a la classificació molecular. Particularment en medicina, on els *microarrays* de DNA poden definir perfils que caracteritzen fenotips específics (diagnosi), predir el resultat de la clínica d'un pacient (prognosi), o predir quin tractament és el que probablement pot beneficiar més al pacient (tractament a mida). L'única limitació sembla ser el fet de que es requereixi una mostra del teixit afectat per a l'elaboració del xip. Això limita l'aplicació a malalties que afecten a cèl·lules que poden ser fàcilment obtingudes: malalties de la sang on una mostra de sang pot ser fàcilment obtinguda, o tumors en els quals s'obté per rutina una biòpsia, o bé tumors en els quals s'elimina el tumor sencer per cirurgia. En conseqüència, en els darrers anys, la majoria de *microarrays* han estat aplicats a qualsevol tipus de càncer humà conegut, i en la majoria de casos ha estat possible

distingir fenotips clínics basats només en l'*array*. En el cas de malalties degeneratives de la retina com la retinosi pigmentària, l'elaboració de *microarrays* per a l'anàlisi del perfil d'expressió és pràcticament impossible en els teixits afectats, ja que s'hauria de disposar de teixit retinià del pacient a analitzar i d'individus control. Tot i així, per a estudiar el perfil d'expressió en pacients amb mutacions en factors de *splicing* amb expressió sistèmica, es pot realitzar una aproximació prenent com a mostres els limfòcits de sang perifèrica.

Quan han estat disponibles dades de resultats a llarg termini, també ha estat possible predir un resultat utilitzant els *microarrays*. La clau de l'èxit dels *microarrays* de DNA en aquest camp és que no és necessari conèixer la biologia molecular de la malaltia en qüestió. El que és millor, és un pur exercici estadístic que relaciona un patró determinat d'expressió a una determinada diagnosi o prognosi. Això és el que s'anomena classificació i junt amb un camp ben establert com és l'estadística, es poden crear una gran quantitat de mètodes per a realitzar-ho.

RESULTATS

4. RESULTATS

4.1. Cribatge de mutacions en els gens *PRPF31*, *PRPF8* i *PRPF3* en pacients afectats de RPAD

150 pacients espanyols i 50 pacients nord-americans, de diferents ètnies, afectats de RPAD, prèviament exclosos de tenir mutacions a altres gens coneguts responsables de RPAD (*RHO*, *RDS*, *CRX*, *NRL*, *RP1* i *FSCN2*), es van analitzar per cribatge de mutacions mitjançant DGGE a l'exó 8 del gen *PRPF31*, l'exó 42 del gen *PRPF8* i l'exó 11 del gen *PRPF3*. Es van caracteritzar les variacions de seqüència detectades en la DGGE per seqüenciació automàtica. En els casos on no es va poder resoldre bé la mutació en la seqüència en heterozigosi degut a la presència d'insercions, delecions o totes dues, es va procedir a la clonació directa dels productes de PCR. Es van seqüenciar una vintena dels clons obtinguts que corresponien tant a l'al·lel normal com el mutat. Les mutacions detectades als gens *PRPF* dels pacients estudiats es presenten en la següent taula.

Taula X. Mutacions detectades als gens *PRPF* en els pacients estudiats.

Família	Gen	Exó	Mutació (cDNA)	Alteració proteica
RPAD S240	<i>PRPF31</i>	8	732-737delins 20 bp	M244fsX248
RPAD M637	<i>PRPF31</i>	8	769-770insA	K257fsX277
RPAD M368	<i>PRPF31</i>	8	828-829delCA	H276fsX277
RPAD M323	<i>PRPF8</i>	42	6928A→G	R2310G
RPAD V17	<i>PRPF8</i>	42	6943-6944delC	L2315fsX2358
RPAD SJD1	<i>PRPF8</i>	42	6974-6994del 21 bp	V2325fsX2329
RPAD M618	<i>PRPF8</i>	42	6893-6896delins 7 bp	L2298fsX2337
RPAD V541	<i>PRPF8</i>	42	7006T→C	Stop2336fsX2377
RPAD S269	<i>PRPF3</i>	11	1482C→T	T494M
RPAD USA28	<i>PRPF3</i>	11	1482C→T	T494M

Es van identificar tres alteracions del tipus inserció/deleció a l'exó 8 del gen *PRPF31*: 732-737delins20bp (Met244fsX248), 769-770insA (K257fsX277) i 828-829delCA (H276fsX277). Totes tres alteracions prediuen una proteïna hPrp31 truncada.

A l'exó 42 del gen *PRPF8* es van detectar tres alteracions del tipus inserció/deleció: 6893-6896delins7pb (L2298fsX2337), 6943-6944delC (L2315fsX2358) i 6974-6994del21bp (V2325fsX2329) i dues mutacions puntuals: 6928 A→G (Arg2310Gly) i 7006 T→C (X2336fsX2377). Quatre d'elles prediuen un canvi de sentit de la proteïna donant lloc a una proteïna hPrp8 aberrant més llarga o més curta que la salvatge, mentre que la cinquena produeix un canvi puntual d'un aminoàcid per un altre.

L'anàlisi de les mutacions a l'exó 11 del gen *PRPF3* va donar lloc a la detecció de dues mutacions, una d'elles intrònica (IVS11+82G→A) (que no va mostrar co-segregació familiar), i l'altra ja documentada anteriorment en altres famílies angleses, 1482 C→T (Thr494Met), que es va trobar en una família espanyola i en un pacient nord-americà d'ètnia oriental.

Una vegada identificades les mutacions en els pacients, es va procedir a l'estudi de la co-segregació de la RP amb la mutació en la resta de familiars mitjançant DGGE. En tots els casos els pacients afectats de RPAD presentaven mutació. No obstant, en el cas de les famílies RPAD M637 i RPAD M368, alguns portadors de la mutació en el gen *PRPF31* eren asimptomàtics (dos individus en la família M637 i un individu en la família M368). Aquest resultat suggereix una penetrància incompleta per a mutacions en aquest gen. No es va observar penetrància incompleta per als gens *PRPF8* i *PRPF3*.

L'anàlisi genètic de les mutacions en les famílies estudiades es mostra en les figures 23-31.

1. Mutacions al gen *PRPF31*

Família RPAD S240; mutació 732-737delins20bp (M244fsX248)

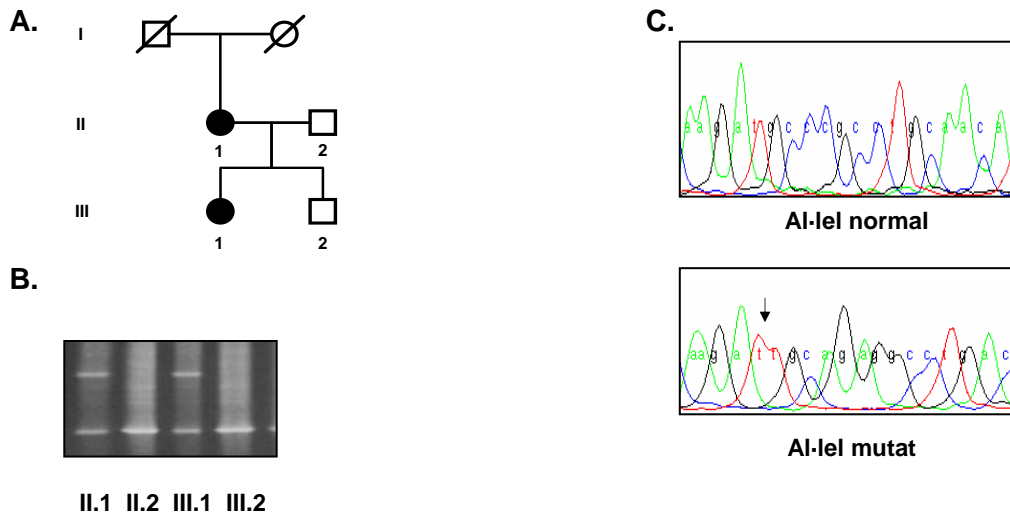


Figura 23. Estudi genètic de la família RPAD S240. Arbre genealògic (A) i anàlisi per DGGE (B), on s'observa un patró electroforètic de migració anormal en les mostres dels pacients afectats de RPAD (a l'arbre, en negre) indicant la presència de la mutació en heterozigosi, mentre que els individus sans són portadors dels al·lells normals. (C) Seqüència de DNA de l'al·lel normal i mutat, obtinguts mitjançant clonació del fragment de PCR mutat.

Família RPAD M637; mutació 769-770insA (K257fsX277)

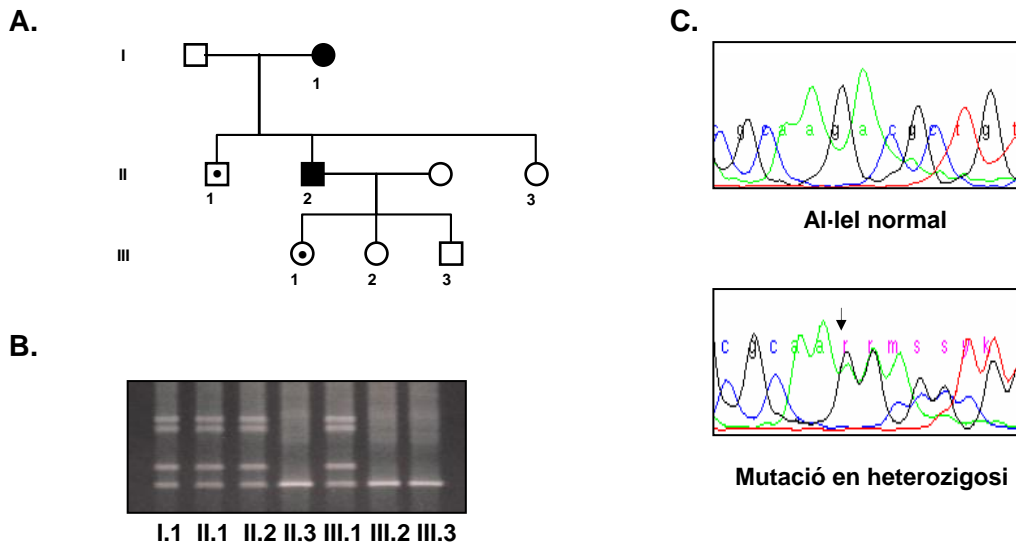


Figura 24. Estudi genètic de la família RPAD M637. Arbre genealògic (A) i anàlisi per DGGE (B), on s'observa la presència de la mutació en heterozigosi en els dos pacients afectats de RPAD (a l'arbre, en negre) i en els pacients asimptomàtics II.1 i III.1 (marcats amb un punt negre a l'arbre), indicant la penetrància incompleta d'aquesta mutació. (C) Seqüència de DNA de l'al·lel normal i seqüència en heterozigosi de la mutació trobada.

Família RPAD M368; mutació 828-829delCA (H276fsX277)

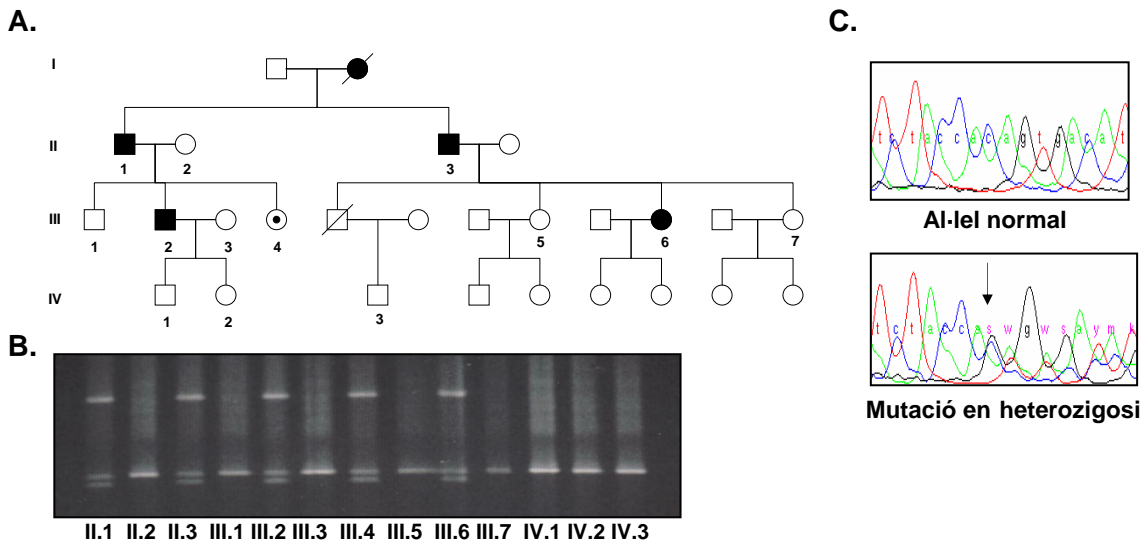


Figura 25. Estudi genètic de la família RPAD M368. Arbre genealògic (A) i anàlisi per DGGE (B), on s'observa la presència de la mutació en heterozigosi en tots els pacients afectats de RPAD (a l'arbre, en negre) i al pacient asimptomàtic III.4 (marcat amb un punt negre a l'arbre); aquest fet també ens indica la penetrància incompleta d'aquesta mutació. (C) Seqüència de DNA de l'al·lel normal i seqüència en heterozigosi de la mutació trobada.

2. Mutacions al gen *PRPF8*

Família RPAD M618; mutació 6893-6896delins7bp (L2298fsX2337)

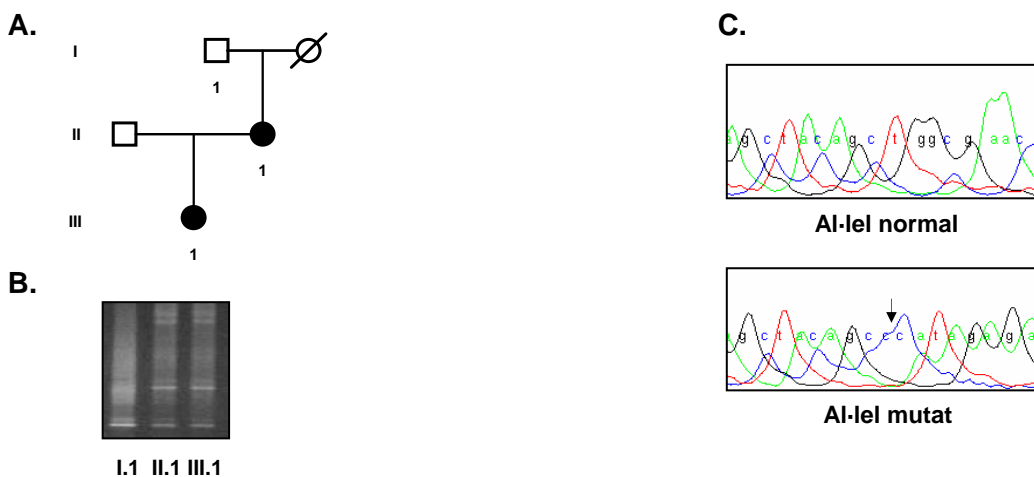


Figura 26. Estudi genètic de la família RPAD M618. Arbre genealògic (A) i anàlisi per DGGE (B), on s'observa la presència de la mutació en heterozigosi en els pacients afectats de RPAD (a l'arbre, en negre) i l'absència de la mutació a l'individu sa. (C) Seqüència de DNA de l'al·lel normal i de l'al·lel mutat, obtinguts mitjançant clonació directa del fragment de PCR mutat.

Família RPAD M323; mutació 6928 A→G (Arg2310Gly)

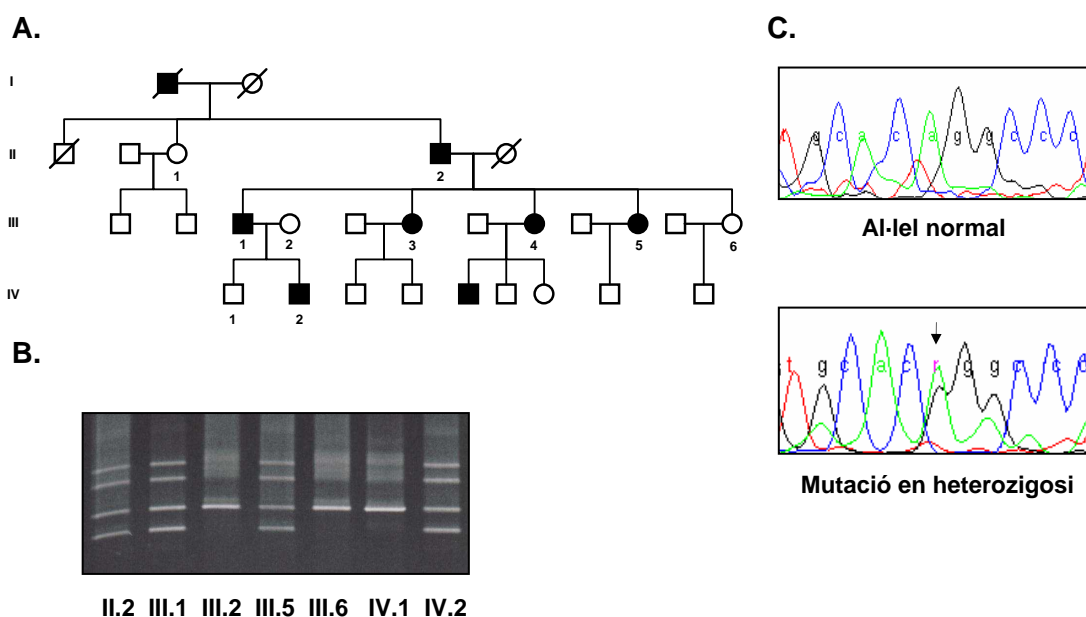


Figura 27. Estudi genètic de la família RPAD M323. Arbre genealògic (A) i anàlisi per DGGE (B), on s'observa la presència de la mutació en heterozigosi en els pacients afectats de RPAD (a l'arbre, en negre) i l'absència de la mutació als individus sans. (C) Seqüència de DNA de l'al·lel normal i seqüència en heterozigosi de la mutació trobada.

Família RPAD V17; mutació 6943-6944delC (L2315fsX2358)

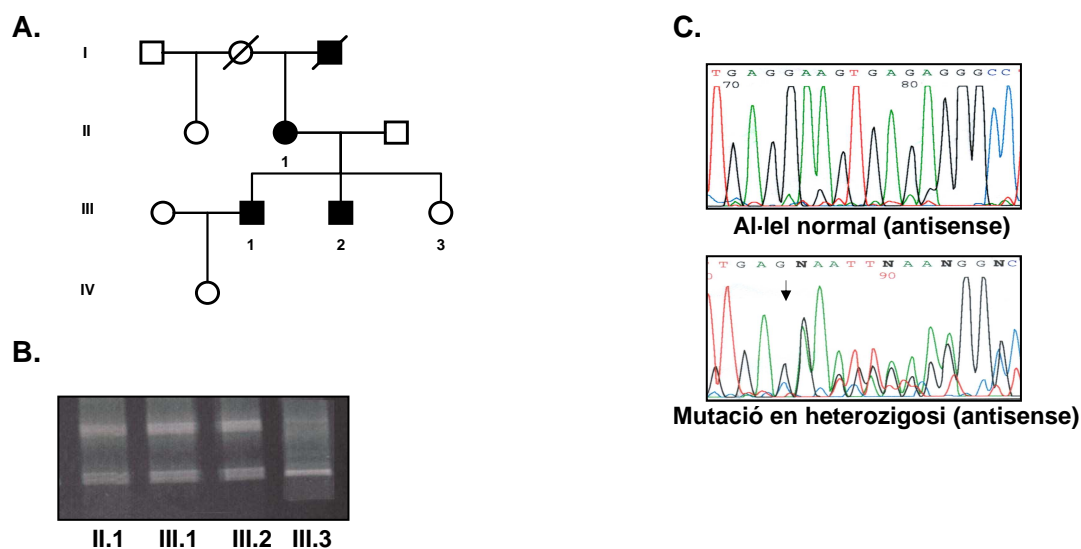


Figura 28. Estudi genètic de la família RPAD V17. Arbre genealògic (A) i anàlisi per DGGE (B), on s'observa la presència de la mutació en heterozigosi en els pacients afectats de RPAD (a l'arbre, en negre) i l'absència de la mutació a l'individu sa. (C) Seqüència de DNA de l'al·lel normal i seqüència en heterozigosi de la mutació trobada, totes dues en antisense (cadena 3'-5').

Família RPAD SJD1; mutació 6974-6994del21bp (V2325fsX2329)

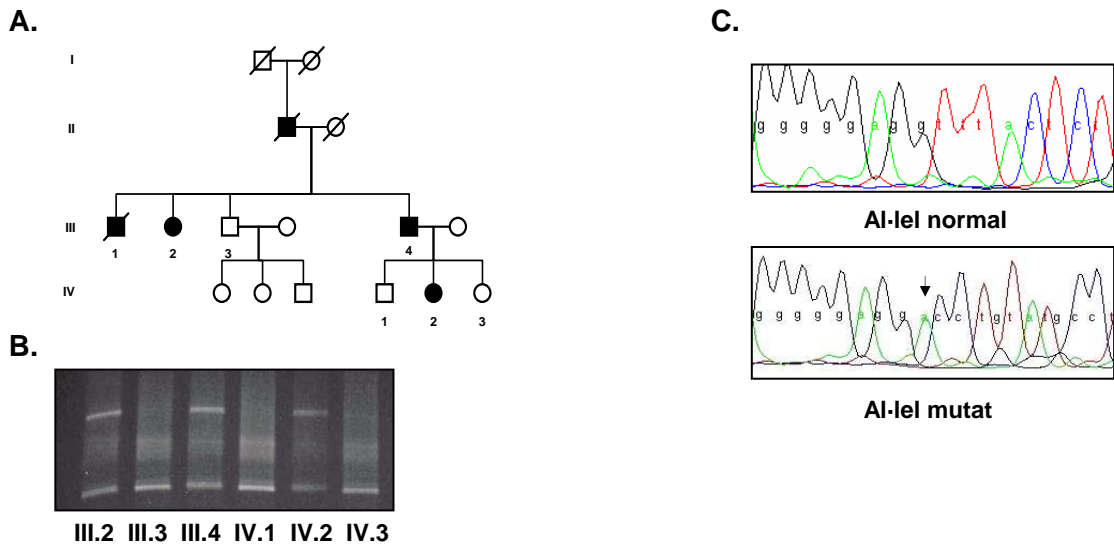


Figura 29. Estudi genètic de la família RPAD SJD1. Arbre genealògic (A) i anàlisi per DGGE (B), on s'observa la presència de la mutació en heterozigosi en els pacients afectats de RPAD (a l'arbre, en negre) i l'absència de la mutació als individus sans. (C) Seqüència de DNA de l'al-lel normal i de l'al-lel mutat, obtinguts mitjançant clonació directa del fragment de PCR mutat.

Família RPAD V541; mutació 7006 T→C (X2336fs2377)

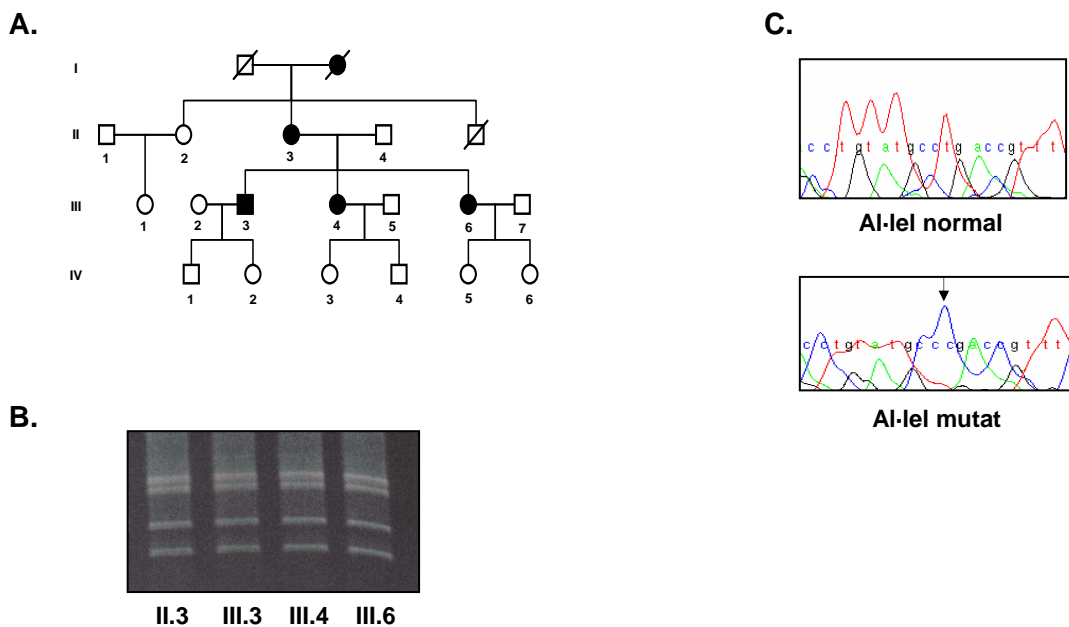


Figura 30. Estudi genètic de la família RPAD V541. Arbre genealògic (A) i anàlisi per DGGE (B), on s'observa la presència de la mutació en heterozigosi en els pacients afectats de RPAD (a l'arbre, en negre). (C) Seqüència de DNA de l'al-lel normal i de l'al-lel mutat, obtinguts mitjançant clonació directa del fragment de PCR mutat.

3. Mutacions al gen *PRPF3*

Família RPAD S269; mutació 1482 C→T (Thr494Met)

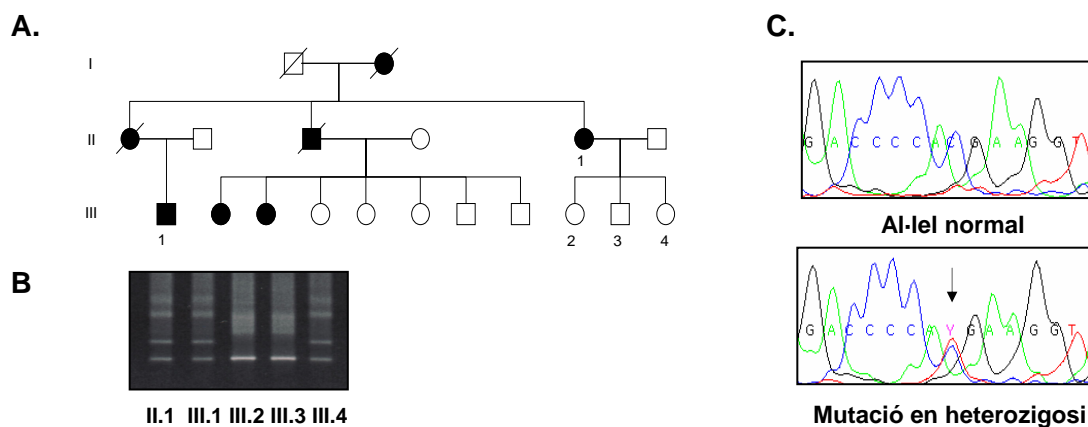


Figura 31. Estudi genètic de la família RPAD S269. Arbre genealògic (A) i anàlisi per DGGE (B), on s'observa la presència de la mutació en heterozigosi en els pacients afectats de RPAD (a l'arbre, en negre) i en un individu no revisat fins ara (III.4). (C) Seqüència de DNA de l'al·lel normal i de la seqüència mutada en heterozigosi.

4. 2. Clíniques dels pacients amb mutació als gens *PRPF*

Els serveis d'Oftalmologia pertanyents a la xarxa EsRetNet van realitzar un estudi clínic complet als individus pertanyents a les famílies portadores de mutació a algun dels gens *PRPF*. Aquest estudi clínic consta d'un examen oftalmològic i d'un examen electrofisiològic, que es van realitzar segons els protocols establerts per a l'estudi de la retinosi pigmentària. Els resultats dels examen oftalmològics i electrofisiològics dels pacients, obtinguts pels diferents serveis d'Oftalmologia, es van avaluar conjuntament amb els resultats obtinguts al laboratori, per a establir la correlació fenotip-genotip.

Els pacients portadors de mutació al gen *PRPF8* presentaven un inici precoç de la malaltia i un alt grau de severitat. En totes les famílies es presenta una penetrància completa de la mutació, és a dir, l'al·lel mutat produeix un efecte patològic en tots els individus. La clínica dels individus examinats es mostra en la taula XI.

Taula XI. Característiques clíniques de les famílies RPAD portadores de mutació al gen *PRPF8*

Família	Individu	Edat	Inici CN	Inici CV	↓	Inici AV	↓	CV actual	AV actual		ERG	Fons d'ull	Edat cataractes
									Dret	Esq.			
M323	II-2	77	20	35		55		<10°	<0.1	<0.1	N.E.	RP	N.D.
	III-1	50	21	28		N.D.		10°	0.9	0.8	N.E.	RP	N.D.
	IV-2	18	7	N.D.		N.D.		E.A.	0.7	0.7	N.E.	RP	N.D.
M618	II-1	45	5	5		22		10°	0.3	0.3	--	RP	15
	III-1	19	5	5		N.D.		30°	0.5	0.5	--	RP	18
V17	II-1	64	20	30		45		10°	0.1	0.1	N.E.	RP	N.D.
	III-1	40	10	15		28		10°	0.8	0.9	N.E.	RP	N.D.
	III-2	34	57	10		30		10°	0.9	1.0	N.E.	RP	N.D.
	III-3	31	N.D.	N.D.		N.D.		N	1.0	1.0	N	--	N.D.
SJD1	III-2	70	10	15		15		--	--	--	--	RP	N.D.
	III-3	68	N.D.	N.D.		N.D.		N	--	--	--	N	N.D.
	III-4	65	10	15		15		>10°	0.2	0.1	N.E.	RP	N.D.
	IV-1	30	N.D.	N.D.		N.D.		N	1.0	1.0	N	N	N.D.
	IV-2	29	10	15		15		10°	0.3	0.4	N.E.	RP	N.D.
	IV-3	28	N.D.	N.D.		N.D.		N	1.0	1.0	N	N	N.D.

AV: agudesa visual; CN: ceguesa nocturna; CV: camp visual; E.A.: escotoma anul·lar; N: normal; N.D. no disponible; N.E.: no enregistrable; RP: retinosi pigmentària típica.

En el cas de les famílies portadores de mutació al gen *PRPF31* es presenta una variabilitat clínica inter i intra-familiar, amb penetrància incompleta de la mutació en alguns casos. Les característiques clíniques de les famílies analitzades es mostren en la taula XII.

Taula XII. Característiques clíniques de les famílies RPAD portadores de mutació al gen *PRPF31*

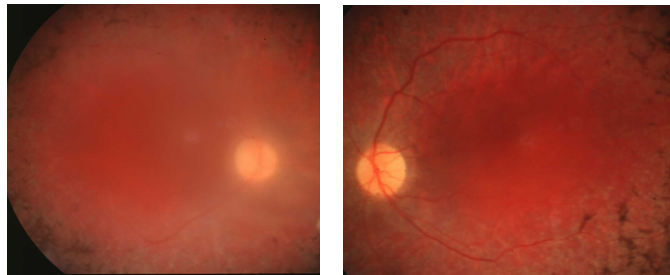
Família	Individu	Edat	Inici CN	Inici CV	↓ Inici AV	↓ CV actual	AV actual	ERG	Fons d'ull	Cataracta
M368	II-1	79	20	20	60	10°	<<0.1	N.E.	RP	56
	II-3	70	20	20	50	10°	<<0.1	N.E.	RP	N.D.
	III-2	43	5	5	40	10°	<<0.1	N.E.	RP	N.D.
	III-6	38	12	12	N.D.	10°	1	N.E.	RP	N.D.
M637	I-1	66	18	24	55	10°	Cd	N.E.	RP	55
	II-1	41	N.D.	N.D.	N.D.	N	1	N	N	N.D.
	II-2	40	10	20	--	10°	0.7	N.E.	RP	N.D.
	II-3	24	N.D.	N.D.	N.D.		1	N	N	N.D.
S240	II-1	70	20	20	50	--	--	N.E.	RP	N.D.
	III-1	30	6	12	20	--	--	N.E.	RP	N.D.

AV: agudesa visual; CN: ceguesa nocturna; CV: camp visual; N: normal; N.D. no disponible; N.E.: no enregistrable; RP: retinosi pigmentària típica.

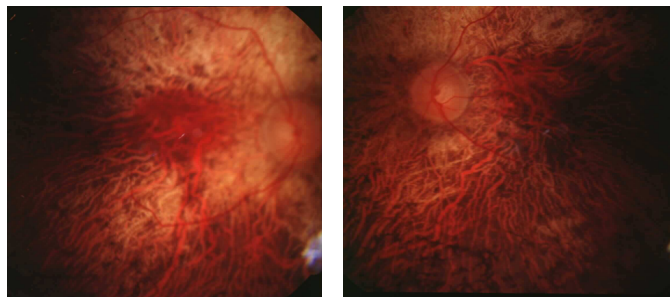
Es van observar els fons d'ull dels pacients portadors de mutació al gen *PRPF8* o *PRPF31*. A la figura 32 es mostren els fons d'ull de dos pacients de la família SJD1, portadors de la mutació 6974-6994del21bp (V2325fsX2329) i d'un pacient de la família M368, portador de la mutació 828-829delCA (H276fsX277).

A. Portador de mutació al gen *PRPF8*

Família RPAD SJD1



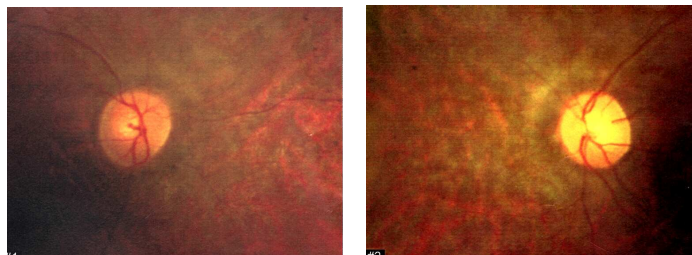
Pacient IV.2 a l'edat de 30 anys



Pacient III.4 a l'edat de 65 anys

B. Portador de mutació al *PRPF31*

Família RPAD M368



Pacient III.6 a l'edat de 38 anys

Figura 32. Fons d'ulls de portadors de mutació als gens *PRPF*. Imatges del fons d'ull de pacients portadors de mutació al gen *PRPF8* (A) i al gen *PRPF31* (B), que mostren l'atenuació de les arterioles, àrees d'atròfia i pigments en forma d'espícules en la perifèria. El fons d'ull del pacient IV.2 de la família SJD1 també mostra vitritis als dos ulls.

4. 3. Efecte de mutacions en *cis*: predicció informàtica de l'efecte de mutacions en senyals de *splicing* en el gen de la rodopsina

Es va utilitzar el programa informàtic de predicció de la localització d'exons "Genscan" per tal d'analitzar empíricament l'efecte de mutacions en senyals de *splicing* en el gen de la rodopsina a nivell del processament del seu mRNA.

Es va procedir a l'estudi de dues mutacions en *cis* localitzades en senyals de *splicing* en el gen de la rodopsina (*RHO*), que van ser detectades en dues famílies RPAD estudiades anteriorment al nostre laboratori. Aquestes dues mutacions, A3811G (IVS2-2A→G) i G5167T (IVS4-1G→T), estan situades en els senyals de *splicing* 3' acceptors (AG) de l'intró 2 i l'intró 4 del gen *RHO*, respectivament. Aquestes mutacions provoquen RPAD, ja que co-segregen amb la malaltia en tots els pacients de RPAD analitzats. Es va voler comprovar si aquestes mutacions alteren el patró de *splicing* del pre-mRNA del gen de la rodopsina. L'expressió del gen *RHO* mitjançant un *splicing* alternatiu podria ser la causa de l'aparició d'una proteïna aberrant en els pacients RPAD portadors d'aquestes mutacions, i això podria induir la RP.

La simulació amb un programa informàtic ens dóna una idea de si aquest canvi pot ser significatiu a l'hora de que la cèl·lula triï un senyal de *splicing* o un altre, però el resultat no té per què coincidir amb el que realment té lloc *in vivo*.

Es va seleccionar la seqüència genòmica del gen *RHO* amb el nº d'accés U49742 (NCBI). Per a l'anàlisi de l'efecte de cada mutació sobre els senyals de *splicing*, es va substituir el nucleòtid mutat en cada cas sobre la seqüència salvatge. Es van comparar les localitzacions dels introns i exons per a cada mutació analitzada, amb les del gen salvatge. Els resultats obtinguts per a cada anàlisi es mostren a continuació.

Anàlisi de la predicció d'exons al gen *RHO* salvatge

GENSCANW output for sequence RHODOPSIN

GENSCAN 1.0 Date run: 24-Nov-2005 Time: 15:12:10

Sequence gi : 6953 bp : 54.91% C+G : Isochore 3 (51 - 57 C+G%)

Parameter matrix: HumanIso.smat

Predicted genes/exons:

Gn.Ex	Type	S	.Begin	...End	.Len	Fr	Ph	I/Ac	Do/T	CodRg	P....	Tscr..
1.01	Init	+	295	655	361	0	1	84	60	660	0.987	60.06
1.02	Intr	+	2439	2607	169	1	1	115	95	332	0.999	36.12
1.03	Intr	+	3813	3978	166	0	1	106	80	387	0.999	40.18
1.04	Intr	+	4095	4334	240	2	0	70	51	433	0.525	36.08
1.05	Term	+	5168	5278	111	1	0	113	47	159	0.983	13.16
1.06	PlyA	+	5642	5647	6							1.05
2.03	PlyA	-	5964	5959	6							-1.75
2.02	Term	-	6141	6056	86	1	2	96	28	34	0.466	-3.69
2.01	Init	-	6522	6465	58	0	1	74	102	74	0.547	8.82

Predicted peptide sequence(s):

>gi|GENSCAN_predicted_peptide_1|348_aa

MNGTEGPNFYVPFSNATGVVRSPFEYPQYYLAEPWQFSMLAAYMFLLIIVLGFPINFLTLY
 VTVOHKKLRTPLNYILLNLAVADLFMVLGGFTSTLYTSLHGYFVFGPTGCNLEGFFATLG
 GEIALWLVVLAIERVVVCKPMSNFRFGENHAIMGVAFTWVMALACAAPPLAGWSRYIP
 EGLQCSCGIDYYTLKPEVNNESFVIYMFVVHFTIPMIIFFCYGQLVFTVKEAAAQQQES
 ATTQKAEKEVTRMVIIMVIAFLICWVPYASVAFYIFTHQGSNFGPIFMTIPAFFAKSAAI
 YNPVIYIMMNKQFRNCMLTTICCGKNPLGDDEASATVSKTETSQVAPA

>gi|GENSCAN_predicted_peptide_2|47_aa

MGLSGKGNWKLGPNNIPKEGLMTASCIPVTVPAYSPPTSPGLALMPS

La predicció dels senyals de *splicing* en el gen *RHO* salvatge és la correcta. El programa preduï els 5 exons en les posicions reals i la mida de la proteïna codificada també és la correcta (348 aminoàcids).

Anàlisi de la predicció d'exons al gen *RHO* amb la mutació A3811G (IVS2-2A→G)

GENSCANW output for sequence RHO-A3811G

GENSCAN 1.0 Date run: 24-Nov-2005 Time: 15:13:45

Sequence gi : 6953 bp : 54.93% C+G : Isochore 3 (51 - 57 C+G%)

Parameter matrix: HumanIso.smat

Predicted genes/exons:

Gn.Ex	Type	S	.Begin	...End	.Len	Fr	Ph	I/Ac	Do/T	CodRg	P....	Tscr..
1.01	Init	+	295	655	361	0	1	84	60	660	0.987	60.06
1.02	Intr	+	2439	2607	169	1	1	115	95	332	0.998	36.12
1.03	Intr	+	3774	3978	205	0	1	22	80	385	0.877	30.83
1.04	Intr	+	4095	4334	240	2	0	70	51	433	0.525	36.08
1.05	Term	+	5168	5278	111	1	0	113	47	159	0.983	13.16
1.06	PlyA	+	5642	5647	6							1.05
2.03	PlyA	-	5964	5959	6							-1.75
2.02	Term	-	6141	6056	86	1	2	96	28	34	0.466	-3.69
2.01	Init	-	6522	6465	58	0	1	74	102	74	0.547	8.82

Predicted peptide sequence(s):

>gi|GENSCAN_predicted_peptide_1|361_aa

MNGTEGPNFYVPPFSNATGVVRSPFEYPQYYLAEPWQFSMLAAYMFLLIIVLGFPIINFLTLY
 VTVQHKKLRTPLNYILLNLAVADLFMVLGGFTSTLYTSLHGYPVFGPTGCNLEGFFATLG
 GEIALWLSLVVLAIERVVVCKPMSNFRFGENHAIMGVAFTWVMALACAAPPLAGWSSPSQ
 AGSPYLPVVLGYIPEGLQCSCGIDYYTLKPEVNNEFVVIYMFVVHFTIPMIIFFCYGQLV
 FTVKEAAAQQQESATTQKAEKEVTRMVIIMVIAFLICWVPYASVAFYIFTHQGSNFGPIF
 MTIPAFFAKSAAIYNPVIYIMMNKQFRNCMLTTCGKNPLGDDEASATVSKTETSQVAP
 A

>gi|GENSCAN_predicted_peptide_2|47_aa

MGLSGKGNWKLGPMMNIPKEGLMTASCIPVTVPAYSPTPSPGLALMPS

En presència de la mutació A3811G (IVS2-2A→G), el programa prediu un canvi en el senyal de *splicing* 3' acceptor de l'intró 2. Segons la predicció, aquest nou senyal de

splicing crea un exó 3 alternatiu situat entre les posicions 3774-3978 en comptes de les posicions 3813-3978 de l'exó 3 del gen RHO salvatge.

Aquest fet, si es donés *in vivo*, podria donar lloc a la síntesi d'una proteïna aberrant amb 13 aminoàcids més que la proteïna rodopsina salvatge.

Anàlisi de la predicció d'exons al gen *RHO* amb la mutació G5167T (IVS4-1G→T)

GENSCANW output for sequence RHO-G5167T

GENSCAN 1.0 Date run: 24-Nov-2005 Time: 15:14:45

Sequence gi : 6953 bp : 54.90% C+G : Isochore 3 (51 - 57 C+G%)

Parameter matrix: HumanIso.smat

Predicted genes/exons:

Gn.Ex	Type	S	.Begin	...End	.Len	Fr	Ph	I/Ac	Do/T	CodRg	P....	Tscr..
1.01	Init	+	295	655	361	0	1	84	60	660	0.987	60.06
1.02	Intr	+	2439	2607	169	1	1	115	95	332	0.999	36.12
1.03	Intr	+	3813	3978	166	0	1	106	80	387	0.999	40.18
1.04	Intr	+	4095	4334	240	2	0	70	51	433	0.471	36.08
1.05	Term	+	5153	5278	126	1	0	-20	47	172	0.823	0.89
1.06	PlyA	+	5642	5647	6							1.05
2.03	PlyA	-	5964	5959	6							-1.75
2.02	Term	-	6141	6056	86	1	2	96	28	34	0.465	-3.69
2.01	Init	-	6522	6465	58	0	1	74	102	74	0.546	8.82

Predicted peptide sequence(s):

>gi|GENSCAN_predicted_peptide_1|353_aa

MNGTEGPNFYVPPFSNATGVVRSPFEYPQYYLAEPWQFSMLAAYMFLLIIVLGFPINFLTLY
 VTVQHKKLRTPLNYILLNLAVADLFMVLGGFTSTLYTSLHGYPVFGPTGCNLEGFFATLG
 GEIALWLSLVVLAIERVVVCKPMSNFRFGENHAIMGVAFTWVMALACAAPPLAGWSRYIP
 EGLQCSCGIDYYTLKPEVNNESFVIYMFVVHFTIPMIIFFCYGQLVFTVKEAAAQQQES
 ATTQKAEKEVTRMVIIMVIAFLICWVPYASVAFYIFTHQGSNFGPIFMTIPAFFAKSAAI
 YNPVIYIMMNKQPLAFHFRNCMLTTICCGKNPLGDDEASATVSKTETSQVAPA

>gi|GENSCAN_predicted_peptide_2|47_aa

MGLSGKGNWKLGPNNIPKEGLMTASCIPVTVPAYSPSPGLALMPS

En presència de la mutació G5167T (IVS4-1G→T), el programa prediu un canvi en el senyal de *splicing* 3' acceptor de l'intró 4. Segons la predicció, aquest nou senyal de

splicing crea un exó 5 alternatiu situat entre les posicions 5153-5278 en comptes de les posicions 5168-5278 de l'exó 5 del gen RHO salvatge.

Això donaria lloc a la possible síntesi d'una proteïna aberrant amb 5 aminoàcids més que la proteïna rodopsina salvatge.

Material adicional del programa Genscan

Explanation

Gn.Ex : gene number, exon number (for reference)
Type : Init = Initial exon (ATG to 5' splice site)
 Intr = Internal exon (3' splice site to 5' splice site)
 Term = Terminal exon (3' splice site to stop codon)
 Sngl = Single-exon gene (ATG to stop)
 Prom = Promoter (TATA box / initiation site)
 PlyA = poly-A signal (consensus: AATAAA)
S : DNA strand (+ = input strand; - = opposite strand)
Begin : beginning of exon or signal (numbered on input strand)
End : end point of exon or signal (numbered on input strand)
Len : length of exon or signal (bp)
Fr : reading frame (a forward strand codon ending at x has frame x mod 3)
Ph : net phase of exon (exon length modulo 3)
I/Ac : initiation signal or 3' splice site score (tenth bit units)
Do/T : 5' splice site or termination signal score (tenth bit units)
CodRg : coding region score (tenth bit units)
P : probability of exon (sum over all parses containing exon)
Tscr : exon score (depends on length, I/Ac, Do/T and CodRg scores)

Comments

The SCORE of a predicted feature (e.g., exon or splice site) is a log-odds measure of the quality of the feature based on local sequence properties. For example, a predicted 5' splice site with score > 100 is strong; 50-100 is moderate; 0-50 is weak; and below 0 is poor (more than likely not a real donor site).

The PROBABILITY of a predicted exon is the estimated probability under GENSCAN's model of genomic sequence structure that the exon is correct.

This probability depends in general on global as well as local sequence properties, e.g., it depends on how well the exon fits with neighboring exons. It has been shown that predicted exons with higher probabilities are more likely to be correct than those with lower probabilities.

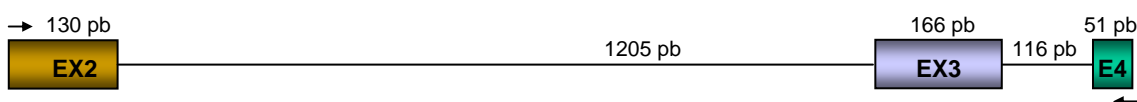
4. 4. Minigens *RHOSPL2-4* i *RHOSPL3-5* salvatges i mutants per a la transfecció en línies cel·lulars eucariotes

Es va partir de DNA genòmic d'un pacient portador de la mutació *IVS2-2A*→*G* i d'un altre amb la mutació *IVS4-1G*→*T*, totes dues situades en senyals de *splicing* del gen *RHO*. Es va amplificar mitjançant PCR la regió genòmica que contenia les mutacions d'interès, en cada cas. Es van construir els minigens salvatges i mutants, per a cada mutació, amb els encebadors addients portadors de cues amb dianes per als enzims *EcoRI*/*SalI*. Els minigens (Figura 33) es van clonar en el vector d'expressió pCI-neo (Promega).

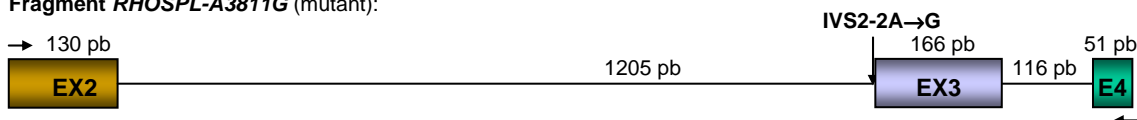
A. Minigens *RHOSPL2-4*

EcoRI / *EX2* parcial (2478-2607) + *Intró 2* (2608-3812) + *EX3* (3813-3978) + *Intró 3* (3979-4094) + *EX4* parcial (4095-4145) / *SalI*

Fragment *RHOSPL2-4* WT (salvatge):



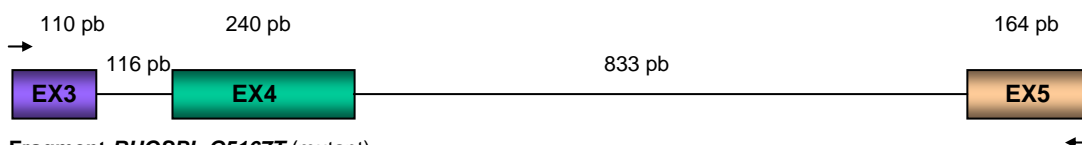
Fragment *RHOSPL-A3811G* (mutant):



B. Minigens *RHOSPL3-5*

EcoRI / *EX3* parcial (3869-3978) + *Intró 3* (3979-4094) + *EX4* (4095-4334) + *Intró 4* (4335-5167) + *EX5* (5168-5331) / *SalI*

Fragment *RHOSPL3-5* WT (salvatge):



Fragment *RHOSPL-G5167T* (mutant):

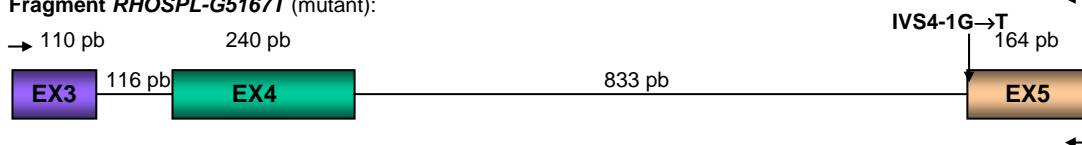


Figura 33. Diagrama dels minigens construïts per a l'expressió en línies cel·lulars eucariotes. A) Els minigens *RHOSPL2-4* comprenen des de l'exó 2 (parcial) fins a l'exó 4 (parcial). B) Els minigens *RHOSPL3-5* comprenen des de l'exó 3 (parcial) fins a l'exó 5. Els números entre parèntesi es refereixen a les posicions de nucleòtid de la seqüència genòmica del gen *RHO* (NCBI, n° d'accés U49742). Les fletxes horitzontals situades en les exons externs indiquen la posició dels encebadors utilitzats per a la posterior amplificació del RNA transcrit, mitjançant RT-PCR.

4. 5. Expressió *in vitro* de les mutacions de *splicing* en *cis* del gen *RHO* en la línia cel·lular COS-7

Per tal d'examinar l'efecte *in vitro* de mutacions en senyals de *splicing* en el gen *RHO* sobre el processament del seu pre-mRNA, els plàsmids recombinants portadors dels minigens de *RHO* salvatges (*RHOSPL2-4 WT* i *RHOSPL3-5 WT*) i mutants (*RHOSPL-A3811G* i *RHOSPL-G5167T*) es van transfectar transitòriament en la línia cel·lular COS-7 mitjançant la utilització d'un reactiu de transfecció lipídica.

24 hores després de la transfecció dels minigens es va realitzar una extracció de RNA total de les cèl·lules i es va analitzar, mitjançant RT-PCR, el mRNA del gen *RHO* resultant. La RT-PCR es va realitzar en dos passos; en un primer pas es va sintetitzar la primera cadena de cDNA amb el kit "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" (Roche) i en el segon pas es va realitzar la PCR sobre el cDNA amb encebadors específics dels minigens de *RHO*, que van ser els mateixos utilitzats en la clonació dels minigens però sense les cues que contenen les dianes de restricció (veure Taula VII, seqüències en negreta).

Els productes de PCR obtinguts es van analitzar en un gel d'agarosa al 2% i es van purificar totes les bandes obtingudes.

Es va realitzar la seqüenciació automàtica dels fragments purificats a partir del gel d'agarosa. Es va comparar la seqüència obtinguda amb la seqüència genòmica del fragment no processat (NCBI, nº d'accés U49742, gi: 1236136) mitjançant una comparació "BLAST 2 Sequences" (<http://genopole.toulouse.inra.fr/blast/wblast2.html>).

Els resultats obtinguts es mostren en les figures 34 i 35.

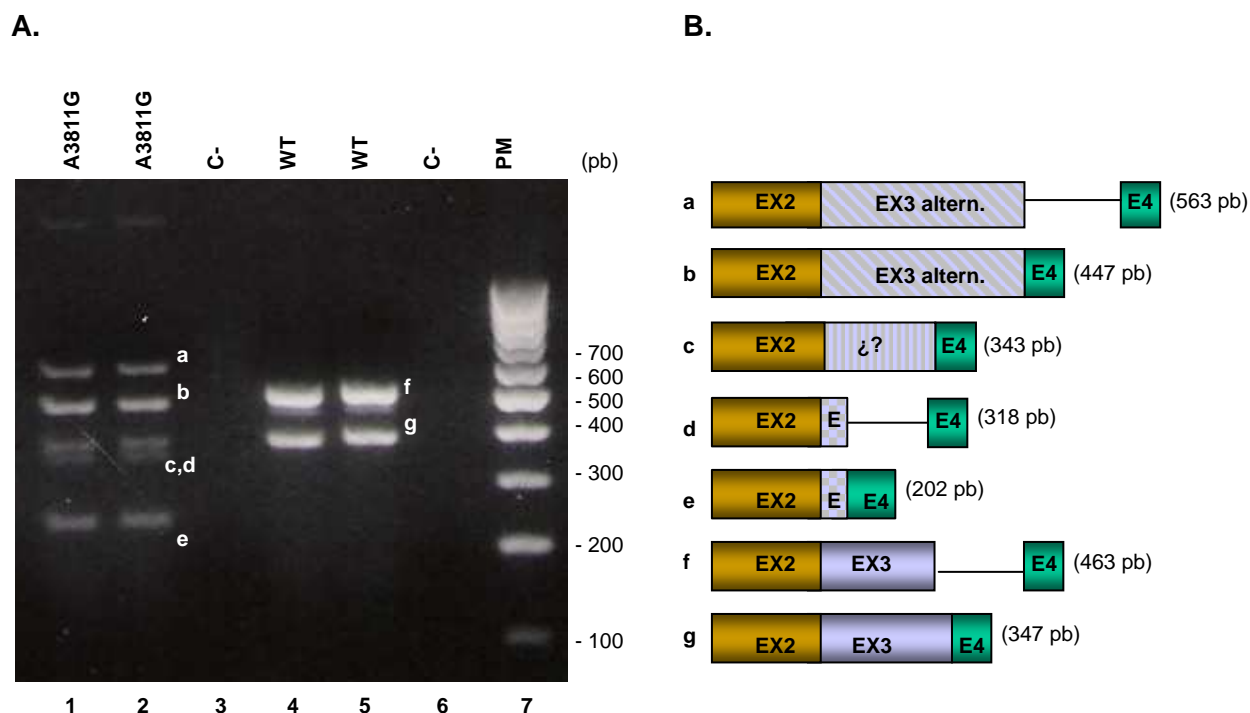


Figura 34. Processament dels minigens *RHOSPL2-4 WT* i *RHOSPL-A3811G* en cèl·lules COS-7. A) Electroforesi en gel d'agarosa de la RT-PCR realitzada sobre extractes de RNA de cèl·lules COS-7 transfectades amb els minigens *RHOSPL2-4 WT* i *RHOSPL-A3811G*. Per a la PCR es va utilitzar una combinació d'un encebador *sense* d'unió a l'exó 2 junt amb un encebador *antisense* d'unió a l'exó 4. En els carrils 1 i 2 (transfecció del minigen mutat, per duplicat) es detecten 5 bandes, mentre que en els carrils 4 i 5 (transfecció del minigen salvatge, per duplicat) apareixen només 2 bandes. Els carrils 3 i 6 corresponen a RNAs controls de cèl·lules sense transfectar i el carril 7 correspon a un marcador de pes molecular de 100 pb. **B)** Diagrama representatiu dels fragments obtinguts després de la seqüenciació automàtica dels productes de PCR purificats a partir de les bandes a-g. En la banda c es va identificar un artefacte del vector d'expressió pCI-neo.

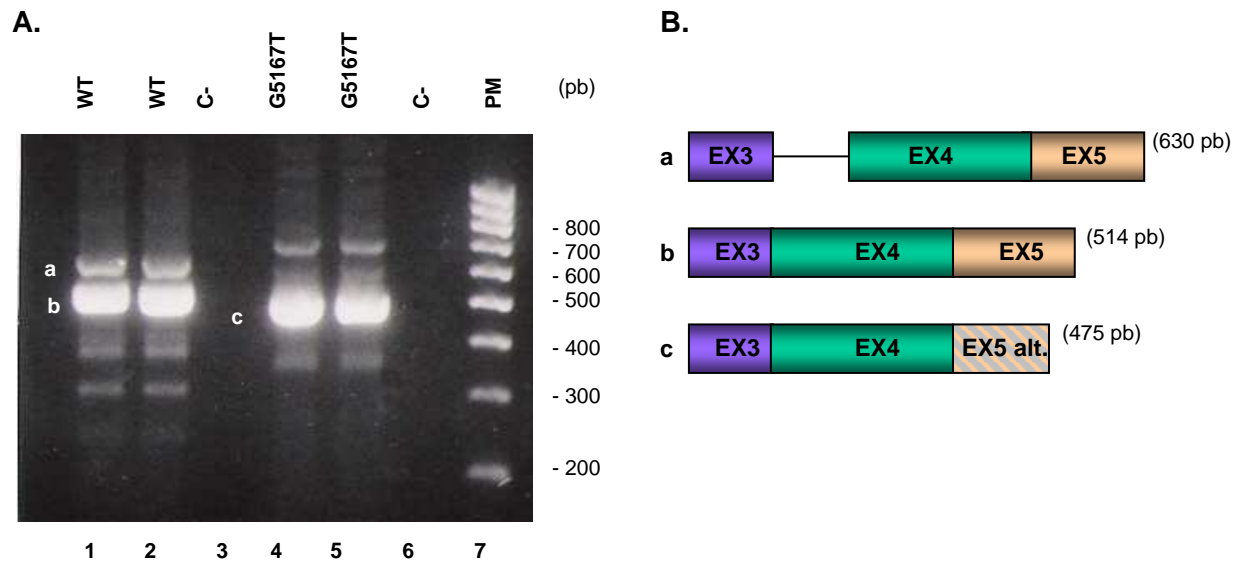


Figura 35. Processament dels minigens *RHOSPL3-5 WT* i *RHOSPL-G5167T* en cèl·lules COS-7. A) Electroforesi en gel d'agarosa de la RT-PCR realitzada sobre extractes de RNA de cèl·lules COS-7 transfectades amb els minigens *RHOSPL3-5 WT* i *RHOSPL-G5167T*. Per a la PCR es va utilitzar una combinació d'un encebador *sense* d'unió a l'exó 3 junt amb un encebador *antisense* d'unió a l'exó 5. Als carrils 1 i 2 (transfecció del minigen salvatge, per duplicat) s'observen dues bandes majoritàries amb un pes molecular diferent a la banda majoritària dels carrils 4 i 5 (transfecció del minigen mutat, per duplicat). Els carrils 3 i 6 corresponen a RNAs controls pertanyents a cèl·lules sense transfectar i el carril 7 correspon a un marcador de pes molecular de 100 pb. **B)** Diagrama representatiu dels fragments obtinguts després de la seqüenciació automàtica dels productes de PCR purificats a partir de les bandes a-c.

Es van comparar els resultats obtinguts en la transfecció de les formes normals i de les formes mutants de cadascun dels minigens, per tal de poder quantificar numèricament les possibles diferències trobades en el processament dels introns del gen *RHO* (Taula XIII).

Taula XIII. Processament del mRNA dels minigens *RHO* obtingut en les transfeccions sobre la línia cel·lular COS-7.

Construcció	Minigen	Processament obtingut
EXONS 2→4	<i>RHOSPL2-4 WT</i>	EX2 parcial +EX3 (3813-3978) + Intró 3 no processat + EX4 parcial
		EX2 parcial + EX3 (3813-3978) + EX4 parcial
	<i>RHOSPL-A3811G</i>	EX2 parcial + EX3 alternatiu (3713-3978) + Intró 3 no processat + EX4
		EX2 +EX3 alternatiu (3713-3978) + EX4
		EX2 + EX3 alternatiu (3958-3978) + Intró 3 no processat + EX4
		EX2 + EX3 alternatiu (3958-3978) + EX4
EXONS 3→5	<i>RHOSPL3-5 WT</i>	EX3 +Intró 3 no processat + EX4 + EX5 (5168-5278)
		EX3 +EX4 + EX5 (5168-5278)
	<i>RHOSPL-G5167T</i>	EX3 + EX4 + EX5 alternatiu (5207-5278)

Pel que fa referència al minigen portador dels exons 2 al 4, es pot observar la diferència entre el processament del minigen salvatge *RHOSPL2-4* i el minigen mutant *RHOSPL-A3811G*. El processament del minigen salvatge és el correcte, tot i que trobem un fragment que reté l'intró 3 del gen de RHO. L'eliminació d'aquest intró, per tant, sembla ser poc eficient. Això es pot explicar perquè l'intró 3 de la rodopsina té la seqüència "U2-branch site" imperfecta (en les posicions 4011-4018 presenta la

seqüència ctgagggt, en comptes de la seqüència canònica ynyuray que se sol presentar normalment; y = pirimidina, r = purina). La retenció de l'intró s'observa tant en la transfecció del minigen salvatge com en el mutant. La presència de la mutació IVS2-2A→G (minigen *RHOSPL-A3811G*) provoca la inactivació del senyal de *splicing* 3' acceptor de l'intró 2 de la rodopsina, creant dues variants de *splicing* de l'intró 2, que provoquen dues variants alternatives de l'exó 3, una amb 100 pb més que l'exó 3 salvatge i l'altra amb 145 pb menys. No es va observar cap fragment indicatiu d'un processament correcte en les transfeccions del minigen mutat, indicant un *splicing* defectuós al 100% en presència de la mutació en homozigosi en el minigen.

En referència a la mutació IVS4-1G→T, es pot comprovar que s'inactiva el senyal 3' acceptor de l'intró 4, provocant també un *splicing* alternatiu del minigen mutat. Amb la mutació es crea un nou senyal de *splicing* que provoca la creació d'un exó 5 alternatiu amb 39 pb menys que l'exó 5 salvatge.

El processament de l'intró 3 de la rodopsina en presència del minigen *RHOSPL3-5 WT* és més eficient en comparació amb el processament observat en l'anàlisi del minigen *RHOSPL2-4 WT*, segons es pot observar en les figures 33 i 34. Aquesta diferència en l'eficiència de processament de l'intró 3 no pot estar relacionat amb cap factor de processament en *trans*, ja que les cèl·lules transfectades són les mateixes en tots dos casos. En conseqüència, les seqüències diferencials dels dos minigens estudiats són les responsables de la diferència en el processament de l'intró 3 de *RHO*.

S'està investigant si existeixen seqüències exòniques o intròniques potenciadores i/o silenciadores del *splicing* (*ESEs*, *ISEs*, *ESSs*, *ISSs*) en aquestes construccions.

4. 6. Expressió *in vitro* de les mutacions de *splicing* en *cis* de la rodopsina en línies cel·lulars limfoblastoides mutants per al *PRPF8*

Es va realitzar el mateix experiment de l'apartat 4.5, però en aquest cas utilitzant dues línies cel·lulars limfoblastoides humanes transformades amb EBV provinents de la família RPAD SJD1, portadora de la mutació 6974-6994 del21pb (V2325fsX2329) en el gen *PRPF8*. Una de les línies (CAR0001) prové d'un pacient afectat de RPAD i portador de la mutació, mentre que l'altra (CAR0003) prové d'un individu sa i no portador de la mutació.

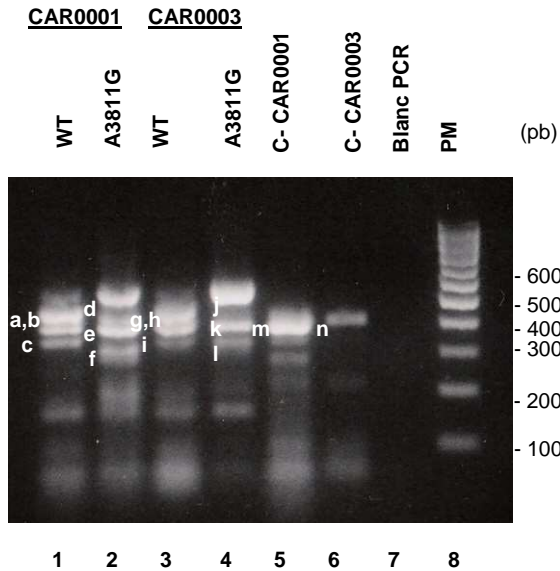
Es va voler comprovar l'efecte de mutacions en el gen *PRPF8* sobre el *splicing* del gen *RHO*. Anteriorment (Yuan et al., 2005) s'havia demostrat que proteïnes hPrp31 mutants inhibeixen significativament el processament de l'intró 3 del gen *RHO*. Si això fos així també per a l'hPrp8, es podria demostrar que mutacions al gen *PRPF8* afecten el processament del pre-mRNA del gen *RHO* i es revelaria una connexió entre el gen *PRPF8* i el gen *RHO*. Per a comprovar-ho, es van electroporar les línies limfoblastoides normal i mutant per al *PRPF8* amb els plàsmids portadors dels minigens *RHO* salvatges (*RHOSPL2-4 WT* i *RHOSPL3-5 WT*) i mutants (*RHOSPL-A3811G* i *RHOSPL-G5167T*). 24 hores després de l'electroporació es va realitzar una extracció de RNA total de les cèl·lules i es va analitzar, mitjançant "One-step RT-PCR", el mRNA del gen *RHO* resultant. La RT-PCR en un pas es va realitzar amb encebadors específics dels minigens de *RHO* (veure taula VII, els encebadors utilitzats corresponen a les seqüències en negreta)

Els productes de PCR obtinguts es van analitzar en un gel d'agarosa al 2% i es van purificar les bandes obtingudes.

Es va realitzar la seqüenciació automàtica de tots els fragments purificats i es va comparar la seqüència obtinguda amb la seqüència genòmica del fragment no processat (NCBI, nº d'accés U49742, gi: 1236136) mitjançant una comparació "BLAST 2 Sequences" (<http://genopole.toulouse.inra.fr/blast/wblast2.html>).

Els resultats obtinguts es mostren en les figures 36 i 37.

A.



B.

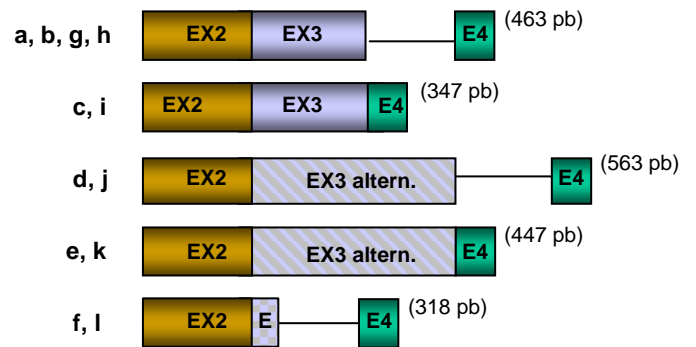


Figura 36. Processament dels minigens *RHOSPL2-4* WT i *RHOSPL-A3811G* en les línies limfoblàstiques humanes CAR0001 i CAR0003. A) Electroforesi en gel d'agarosa de la RT-PCR realitzada sobre extractes de RNA de cèl·lules limfoblàstiques transfectades amb els minigens *RHOSPL2-4* WT i *RHOSPL-A3811G*. Per a la PCR es va utilitzar una combinació d'un encebador *sense* d'unió a l'exó 2 junt amb un encebador *antisense* d'unió a l'exó 4. Els carrils 1 i 2 corresponen a les transfeccions de minigen salvatge i mutat, respectivament, sobre la línia mutant CAR0001. Els carrils 3 i 4 corresponen a les transfeccions de minigen salvatge i mutat, respectivament, sobre la línia normal CAR0003. Els carrils 5 i 6 corresponen als controls sense transfectar de la línia CAR0001 i CAR0003, respectivament. El carril 7 correspon a un control de PCR sense mostra i el carril 8 correspon a un marcador de pes molecular de 100 pb. **B)** Diagrama representatiu dels fragments obtinguts després de la seqüenciació automàtica dels productes de PCR purificats a partir de les bandes a-l. Es van seqüenciar les bandes m i n, i es va comprovar que el fragment corresponia a un artefacte del RNA ribosomal 18S.

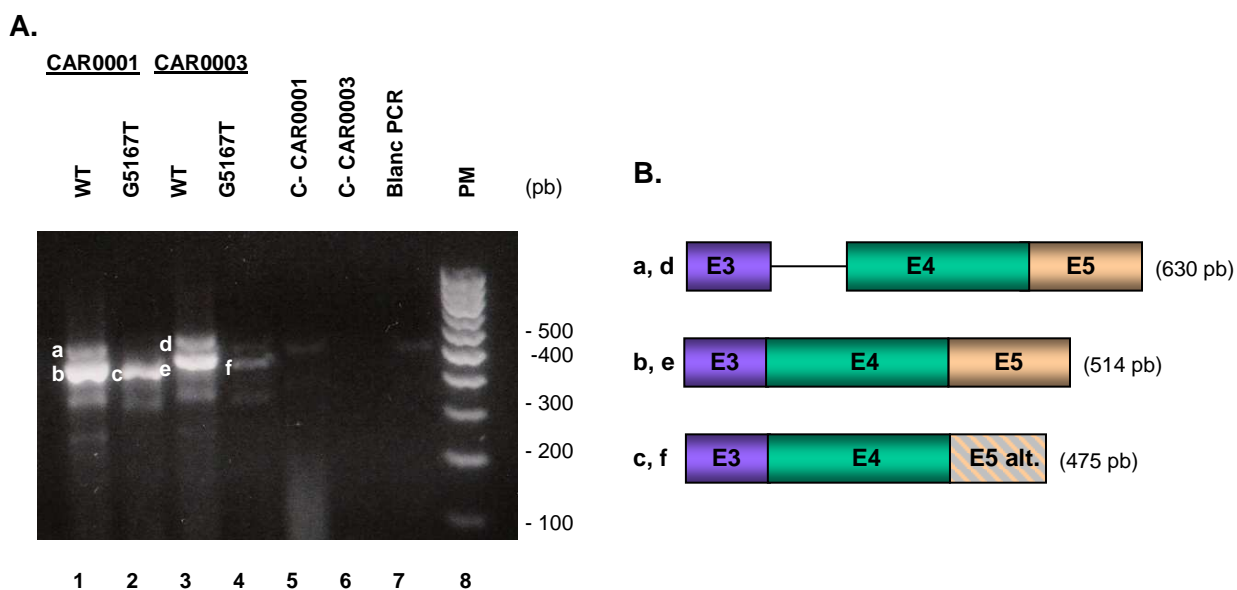


Figura 37. Processament dels minigens *RHOSPL3-5 WT* i *RHOSPL-G5167T* en les línies limfoblàstiques humanes CAR0001 i CAR0003. **A)** Electroforesi en gel d'agarosa de la RT-PCR realitzada sobre extractes de RNA de cèl·lules limfoblàstiques transfectades amb els minigens *RHOSPL3-5 WT* i *RHOSPL-G5167T*. Per a la PCR es va utilitzar una combinació d'un encebador *sense* d'unió a l'exó 3 junt amb un encebador *antisense* d'unió a l'exó 5. Als carrils 1 i 3 (transfecció del minigen salvatge sobre CAR0001 i CAR0003, respectivament) s'observen dues bandes majoritàries diferents a la banda dels carrils 2 i 4 (transfecció del minigen mutat sobre CAR0001 i CAR0003, respectivament). Els carrils 5 i 6 corresponen als controls sense transfectar de les línies CAR0001 i CAR0003, respectivament. El carril 7 correspon a un control de PCR sense mostra i el carril 8 correspon a un marcador de pes molecular de 100 pb. **B)** Diagrama representatiu dels fragments obtinguts després de la seqüenciació automàtica dels productes de PCR purificats a partir de les bandes a-f.

Per tal de poder quantificar numèricament, en aquest experiment, les possibles diferències trobades en el processament dels introns del gen *RHO* (Taula XIV), també es van comparar els resultats obtinguts entre la transfecció de les formes normals i de les formes mutants de cadascun dels minigens.

Taula XIV. Processament del mRNA dels minigens *RHO* en les transfeccions sobre les línies cel·lulars limfoblàstoides humanes utilitzades.

Construcció	Minigen	Processament obtingut en les línies CAR0001 i CAR0003
EXONS 2→4	<i>RHOSPL2-4 WT</i>	EX2 parcial +EX3 (3813-3978) + Intró 3 no processat + EX4 parcial
		EX2 parcial + EX3 (3813-3978) + EX4 parcial
	<i>RHOSPL-A3811G</i>	EX2 parcial + EX3 alternatiu (3713-3978) + Intró 3 no processat + EX4
		EX2 +EX3 alternatiu (3713-3978) + EX4
		EX2 + EX3 alternatiu (3958-3978) + Intró 3 no processat + EX4
		EX2 + EX3 alternatiu (3958-3978) + EX4
EXONS 3→5	<i>RHOSPL3-5 WT</i>	EX3 +Intró 3 no processat + EX4 + EX5 (5168-5278)
		EX3 +EX4 + EX5 (5168-5278)
	<i>RHOSPL-G5167T</i>	EX3 + EX4 + EX5 alternatiu (5207-5278)

En aquest experiment es va obtenir, per tant, el mateix resultat que a l'experiment realitzat en la línia COS-7. Podem observar que la presència de la mutació IVS2-2A→G (minigen *RHOSPL-A3811G*) provoca la destrucció del senyal de *splicing* 3' acceptor de l'intró 2 de la rodopsina, creant dues variants de *splicing* de l'intró 2, que

provoquen dues variants alternatives de l'exó 3, una amb 100 pb més que l'exó 3 salvatge i l'altra amb 145 pb menys (veure taula XIV). No es va observar cap fragment indicatiu d'un processament correcte en les transfeccions del minigen mutat, indicant un *splicing* defectuós al 100% en presència de la mutació en homozigosi en el minigen. Tampoc es van observar diferències entre les transfeccions en la línia mutada CAR0001 i la línia salvatge CAR0003, indicant que probablement la mutació 6974-6994del 21pb en el gen *PRPF8* no té cap efecte sobre el processament del mRNA de *RHO*.

Pel que fa a la mutació IVS4-1G→T, també veiem que es destrueix el senyal 3' acceptor de l'intró 4, provocant també un *splicing* alternatiu del minigen mutant. Amb la mutació es crea un nou senyal de *splicing* que provoca la creació d'un exó 5 alternatiu amb 39 pb menys que l'exó 5 salvatge.

Igualment que el fet descrit en l'experiment realitzat sobre la línia cel·lular COS-7, la diferència de processament de l'intró 3 en les diferents construccions (Figures 36 i 37) pot estar relacionada amb la presència o absència d'elements reguladors de *splicing* (*ESEs*, *ISEs*, *ESSs*, *ISSs*).

4. 7. Quantificació de l'expressió de la mutació 6974-6994del21bp (V2325fsX2329) al gen *PRPF8* en la família ADRP SJD1

Amb la fi de quantificar l'expressió de l'al·lel mutat enfront l'al·lel salvatge del gen *PRPF8* en les línies mutants per al *PRPF8*, es va extreure RNA de les línies cel·lulars CAR0001 (mutant), CAR0002 (mutant) i CAR0003 (control salvatge). Es va retrotranscriure el RNA de les línies cap a cDNA. El cDNA del gen *PRPF8* es va quantificar mitjançant una PCR en temps real en l'aparell LightCycler amb SYBR Green i encebadors específics de seqüència del gen *PRPF8*.

Es va realitzar una quantificació total de l'expressió del gen *PRPF8* i una quantificació de l'expressió del RNA salvatge en les mostres de RNA de les tres línies cel·lulars. Per a la quantificació total de l'expressió del gen *PRPF8* es va utilitzar una parella d'encebadors que s'hibriden a regions comunes a l'al·lel salvatge i al mutat. Per a la quantificació del RNA salvatge es va utilitzar una parella d'encebadors específics del cDNA salvatge.

Es va realitzar una corba patró, amb el programa de PCR utilitzat, amb concentracions conegudes de cDNA, per tal de poder referir les concentracions obtingudes en les corbes de quantificació a un estàndard conegut. La corba es va realitzar amb dilucions seriades d'una mostra de cDNA a la que se li va assignar un valor de 10^4 unitats arbitràries. Es va representar el logaritme de la concentració de les dilucions respecte els C_p (*crossing points*). La corba es va utilitzar com a estàndard extern en les anàlisis de les corbes d'amplificació de les mostres desconegudes a analitzar.

Un cop finalitzat el programa de PCR, les corbes que es van obtenir en l'experiment es van analitzar amb el programa "LightCycler Software 4".

Per a la quantificació del cDNA total de *PRPF8* i del cDNA salvatge de *PRPF8* es van analitzar les corbes de fusió i d'amplificació dels fragments de PCR obtinguts en cada assaig. La primera corba ens permet detectar la temperatura de fusió del fragment

obtingut, per tal de poder comparar el resultat en les mostres analitzades, mentre que la segona ens permet quantificar el cDNA diana inicial, ja sigui de *PRPF8* total o de *PRPF8* salvatge.

Els resultats de l'anàlisi de les corbes de fusió i amplificació es mostren en les figures 38-41.

Quantificació del cDNA total de *PRPF8* en CAR0001, CAR0002 i CAR0003

Es van analitzar les corbes de fusió (Figura 38) i d'amplificació (Figura 39) obtingudes en la PCR en temps real específica del *PRPF8* total (al·lel salvatge + al·lel mutat).

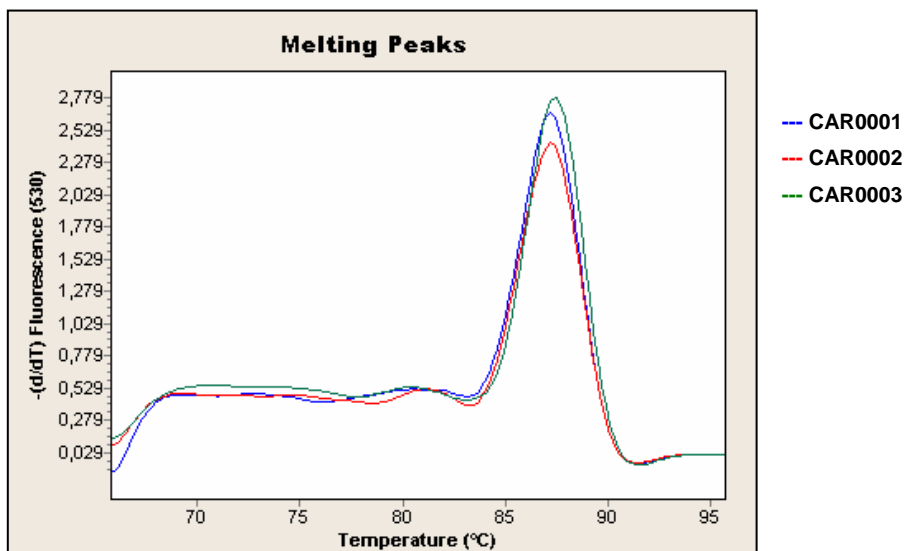


Figura 38. Pics de fusió del *PRPF8* total. En aquesta gràfica es representa la derivada de la corba de fluorescència $-(d/dT)$ Fluorescència 530) respecte a la temperatura. La gràfica ens mostra l'aparició d'un pic a 87,4°C per a les 3 mostres analitzades, que correspon a la temperatura de fusió (T_m) del fragment de PCR obtingut.

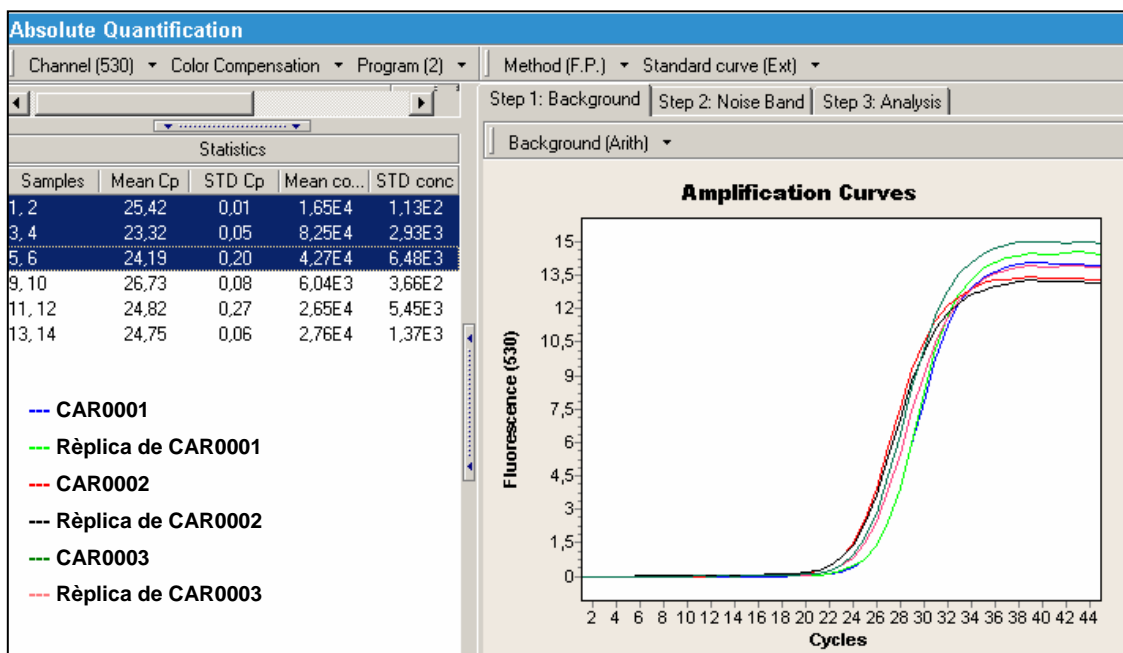


Figura 39. Corba d'amplificació del *PRPF8* total. En aquesta gràfica es representa la corba de fluorescència respecte el nº de cicles per a cadascuna de les 3 mostres analitzades per duplicat. Després d'importar la corba patró externa, es van calcular, en la fase exponencial de l'experiment, les concentracions de cDNA diana inicial de *PRPF8* total per a cadascuna de les 3 mostres analitzades.

Quantificació del cDNA salvatge de *PRPF8* en CAR0001, CAR0002 i CAR0003

Es van analitzar les corbes de fusió (Figura 40) i d'amplificació (Figura 41) obtingudes en la PCR en temps real específica de l'al·lel salvatge de *PRPF8*.

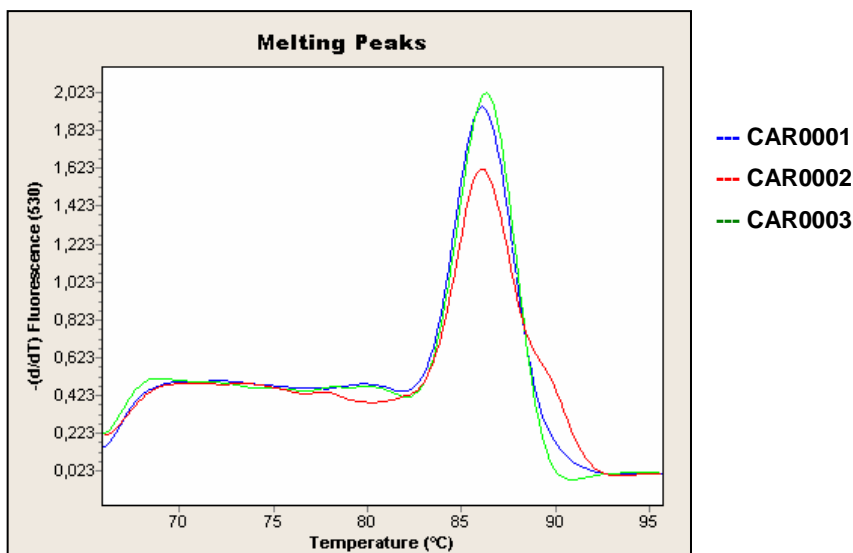


Figura 40. Pics de fusió del *PRPF8* salvatge. En aquesta gràfica es representa la derivada de la corba de fluorescència $-(d/dT)$ Fluorescència 530 respecte a la temperatura. La gràfica ens mostra l'aparició d'un pic a 86.1°C per a les 3 mostres analitzades, que corresponen a la temperatura de fusió (T_m) del fragment de PCR obtingut.

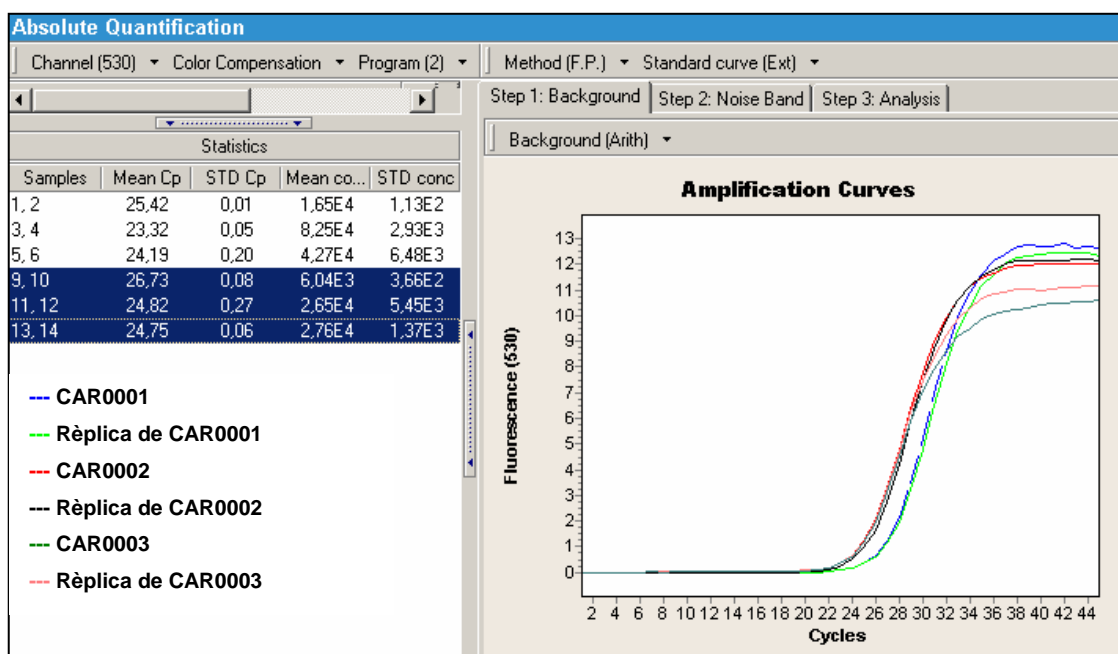


Figura 41. Corba d'amplificació del *PRPF8* salvatge. En aquesta gràfica es representa la corba de fluorescència respecte el nº de cicles per a cadascuna de les 3 mostres analitzades per duplicat. Després d'importar la corba patró externa, es van calcular, en la fase exponencial de l'experiment, les concentracions de cDNA diana inicial de *PRPF8* salvatge per a cadascuna de les 3 mostres analitzades.

Es van obtenir els valors de concentració de cDNA inicial per a cada mostra utilitzant un punt de la corba estàndard elaborada a cada experiment.

Es van calcular les proporcions de cDNA de *PRPF8* salvatge respecte al cDNA de *PRPF8* total. Els resultats es mostren a continuació:

Taula XV. Relacions al·lèliques observades en les tres línies cel·lulars analitzades.

Línia cel·lular	cDNA <i>PRPF8</i> total (unitats arbitràries)	cDNA <i>PRPF8</i> salvatge (unitats arbitràries)	cDNA salvatge/ cDNA total	Relació salvatge/total normalitzada*
CAR0001	1.65 x 10 ⁴	6.04 x 10 ³	0.37	0.58
CAR0002	8.25 x 10 ⁴	2.65 x 10 ⁴	0.32	0.50
CAR0003	4.27 x 10 ⁴	2.76 x 10 ⁴	0.64	1.00

*La normalització s'ha realitzat dividint les relacions obtingudes en les mostres mutades entre el valor obtingut en la mostra salvatge, 0.64, tenint en compte que aquesta relació ha de ser forçosament igual a 1, ja que la mostra CAR0003 és portadora de dos al·lèls salvatges. Amb aquesta normalització s'eliminen les possibles diferències que hagin pogut produir-se en les reaccions de PCR (degut al diferent anellament dels encebadors, eficiència de la reacció, etc.)

L'anàlisi realitzada mostra que tant l'expressió de l'al·lel salvatge com l'expressió de l'al·lel mutat en els pacients analitzats és del 50%, per tant, els dos al·lèls s'estan expressant de forma idèntica.

4. 8. Anàlisi de l'expressió gènica mitjançant *microarrays* de DNA en línies limfoblastoides amb mutació al gen *PRPF8*

Amb la fi d'investigar l'expressió gènica diferencial de les línies mutants respecte a una línia salvatge, es van realitzar experiments de *microarrays* de DNA. El *microarray* de DNA utilitzat va ser el "Human Genome Survey *Microarray* V2.0" d'Applied Biosystems", que consta de 32.878 sondes per a la interrogació de 29.098 gens. Aquest *microarray* va ser realitzat al Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, CNIC. El tractament de les dades obtingudes (normalització i determinació dels canvis en l'expressió gènica diferencial) es va realitzar també al CNIC:

Normalització de les dades obtingudes


Les dades que es van obtenir en brut van ser normalitzades utilitzant el mètode *loess* proporcionat per l'eina DN MAD (<http://dnmad.bioinfo.cnio.es/>). Els valors obtinguts amb la normalització es van transformar logarítmicament.


Per tal d'assajar la variació en l'expressió gènica, el soroll de fons va ser eliminat, utilitzant només aquelles dades amb una relació de senyal/soroll ("signal-to-noise") superior a 2 (és a dir, 2-fold o un canvi d'expressió superior).

Canvis de l'expressió gènica diferencial

Es van analitzar els gens expressats diferencialment als pacients CAR0001, CAR0002, CAR0004 i CAR0005 (portadors de mutació al gen *PRPF8*) respecte de l'individu control CAR0003.

Es va definir la variació en l'expressió gènica segons els següents colors:

 Gens l'expressió dels quals no varia substancialment entre les mostres analitzades

 Gens sobreexpressats

 Gens reprimits

Anàlisi de l'expressió gènica diferencial en les línies estudiades

Comparant els resultats dels *microarrays* de cada pacient respecte a l'individu normal, vam trobar diferències en l'expressió gènica (en almenys un dels pacients), en 3494 gens. D'aquests 3494 gens, 157 gens estaven sobre-expressats en els 4 pacients, mentre que 244 gens estaven reprimits en els 4 pacients.

Classificació dels gens

Es va utilitzar el sistema "PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) Classification System" per a classificar les proteïnes (i els seus gens) per tal de facilitar l'anàlisi a gran escala. En aquest programa, accessible *online*, les proteïnes han estat classificades d'acord amb famílies i subfamílies, funcions moleculars, processos biològics i vies metabòliques. En aquest estudi es va utilitzar la classificació PANTHER per tal d'interpretar ràpidament les dades d'expressió gènica dels estats patològics i normal.

La classificació del total de gens induïts i reprimits segons la seva funció molecular o segons el procés biològic en el qual intervenen es mostra en les figures 42-45.

Anàlisi de l'expressió de gens amb senyals no canònics de *splicing*

Se sap que els introns del tipus U12 -que contenen senyals de *splicing* no canòniques (AU-AC)- són processats més lentament que els introns del tipus U2 -que contenen senyals de *splicing* canòniques (GU-AG) (Patel et al., 2002). Una de les hipòtesis sobre el possible mecanisme patogènic de les mutacions en el gen *PRPF8* en pacients RPAD és la de la dificultat de processament dels introns tipus U12. Degut a que s'ha demostrat que el factor hPrp8 forma part tant de l'*spliceosoma* U2 (que processa introns del tipus U2) com de l'*spliceosoma* U12 (que processa introns del tipus U12), es va voler analitzar, mitjançant *microarrays* de DNA, la variació de l'expressió de gens amb *splicing* no canònic en pacients amb mutació al gen *PRPF8*. Per a això,

es va realitzar una cerca bibliogràfica en la qual es va trobar un llistat amb els 404 gens humans que contenen introns del tipus U12 (Levine & Durbin, 2001). Aquest llistat es va comparar, mitjançant un programa informàtic, amb els gens que presentaven variació en l'expressió en pacients amb mutació a *PRPF8*. No es van detectar variacions en l'expressió gènica dels gens amb *splicing* no canònic.

Anàlisi de la variació d'expressió de gens relacionats amb RP

Quan es van comparar les variacions d'expressió detectades en les línies limfoblastoides amb mutacions al gen *PRPF8* i controls, en gens les mutacions dels quals estan associats amb RP, es va detectar una disminució significativa en el gen *RPGR* en tres de les quatre línies limfoblastoides mutades. Curiosament, aquest gen presenta una complexitat en el processament del RNA, donant lloc a formes alternatives específiques de teixit.

En l'anàlisi de variació d'expressió gènica realitzat, no es va detectar variació en els més de 100 gens associats a retinopaties.

Classificació dels gens amb variació de l'expressió gènica segons la seva funció molecular i segons el procés biològic en el qual participen

Els gens en els quals es va detectar variació en l'expressió gènica es van classificar amb el sistema PANTHER. Els resultats obtinguts es van representar en forma de gràfiques i es mostren a continuació en les figures 42-45.

Figura 42. Classificació del total de gens induïts (n=157) segons la funció molecular dels seus productes

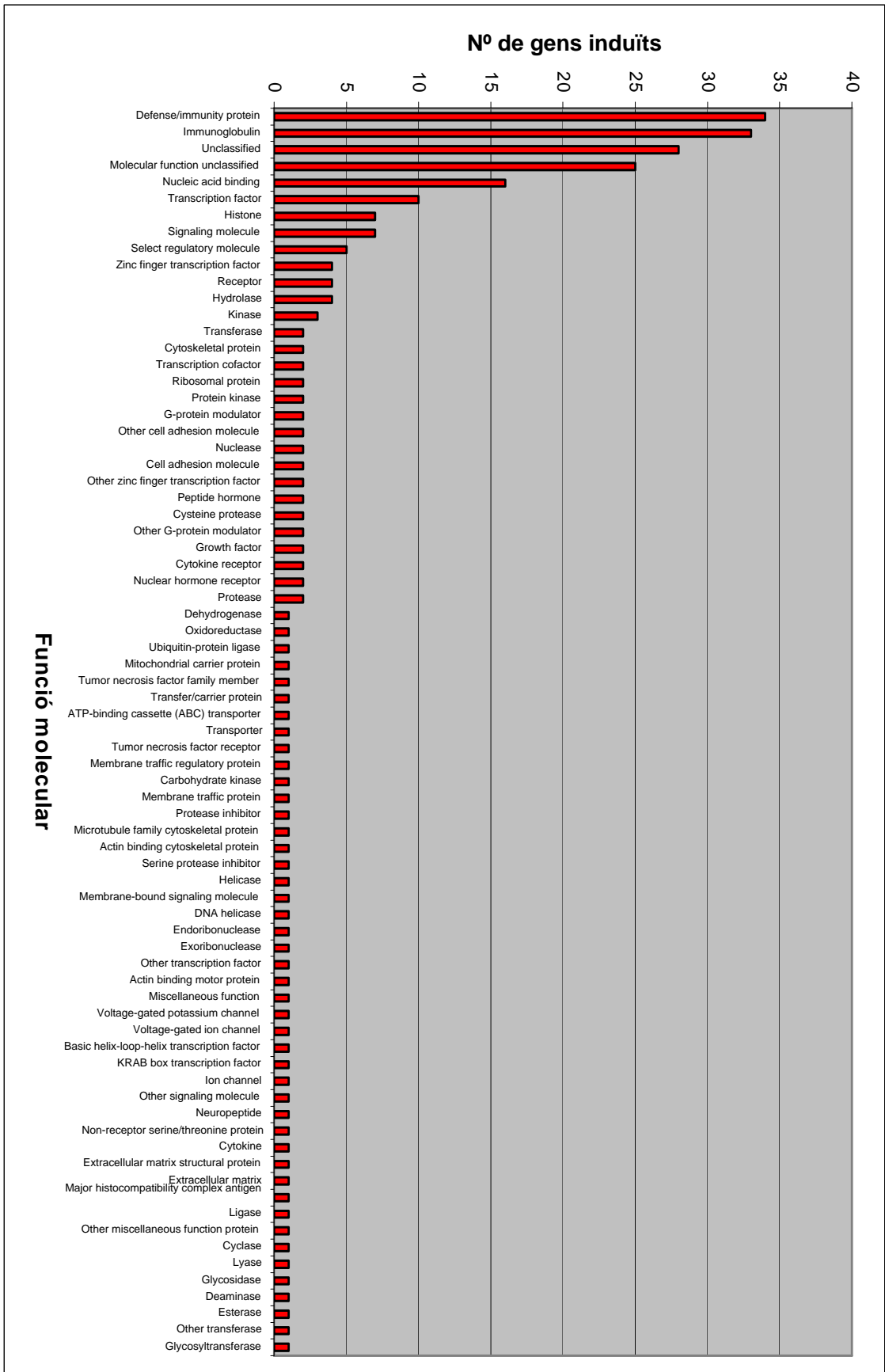


Figura 43. Classificació del total de gens reprimits (n=244) segons la funció molecular dels seus productes

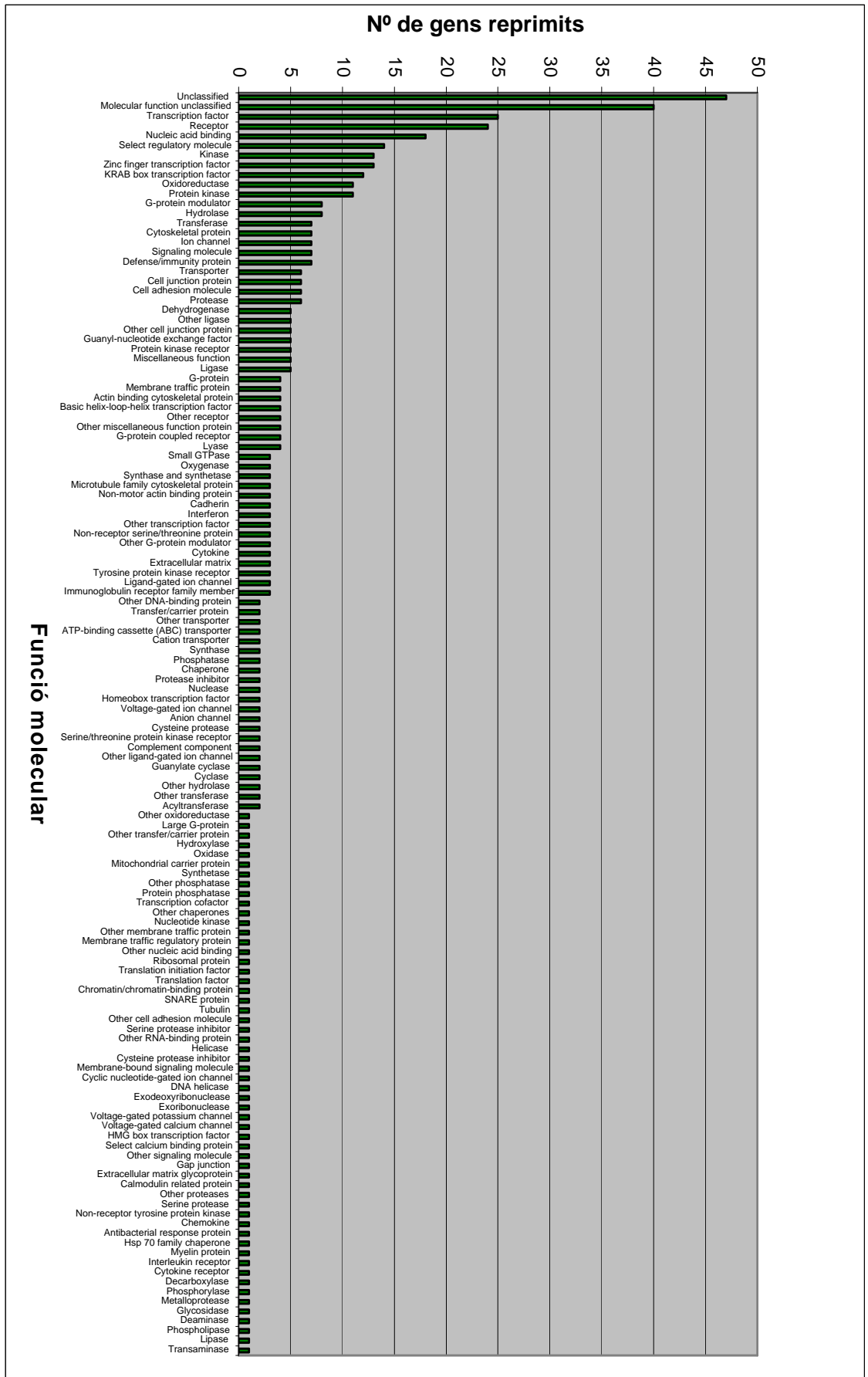


Figura 44. Classificació del total de gens induïts (n=157) segons el procés biològic en el qual participen els seus productes

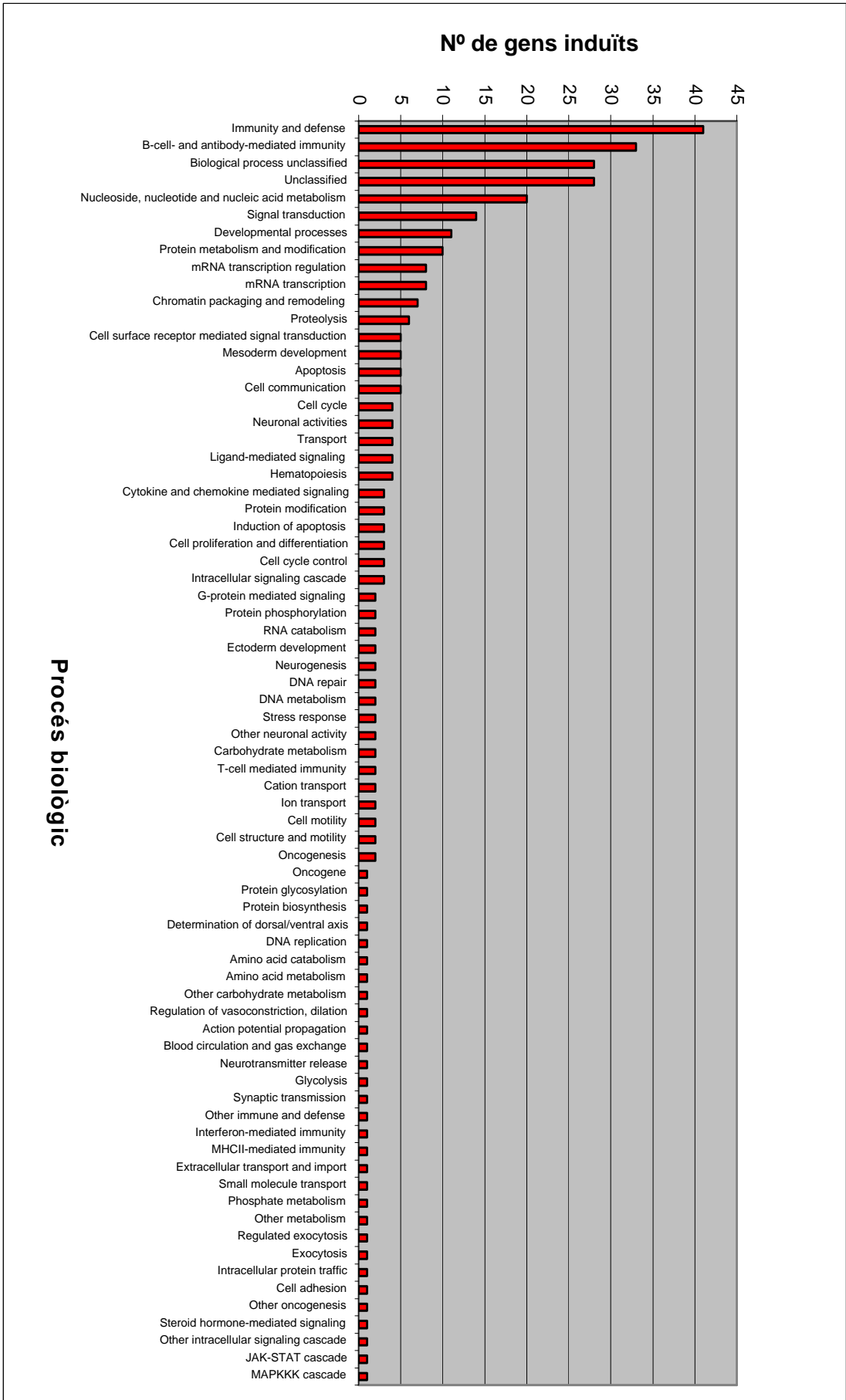
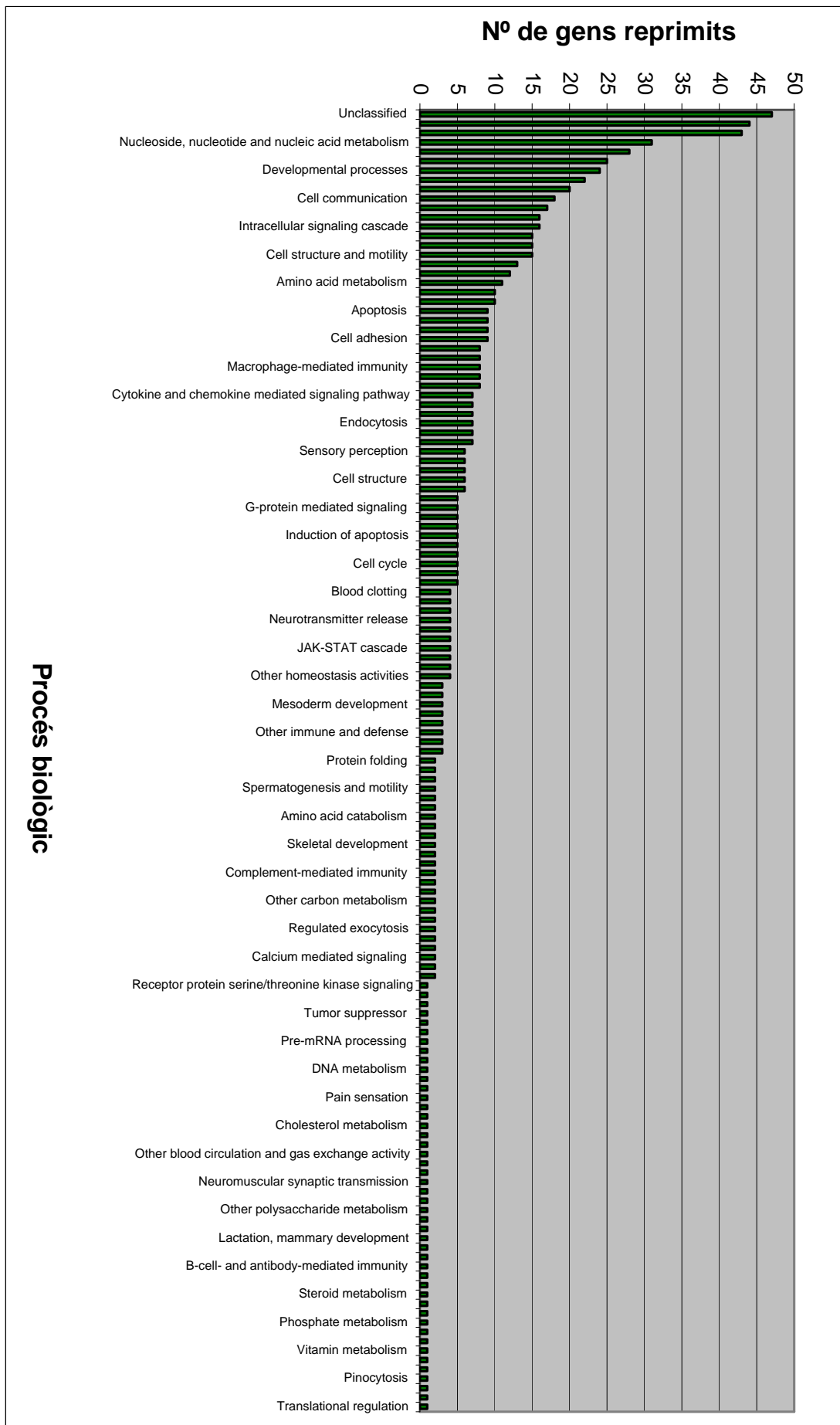


Figura 45. Classificació del total de gens reprimits (n=244) segons el procés biològic en el qual participen els seus productes



DISCUSSION

5. DISCUSSIÓ

La retinosi pigmentària (RP) és una malaltia degenerativa de la retina que està provocada per mutacions en el genoma dels pacients. Una de les formes d'herència d'aquesta malaltia és l'autosòmica dominant (RPAD). La majoria de gens associats amb la RPAD s'expressen específicament en la retina. S'han identificat mutacions en els gens *RHO*, *RDS*, *NRL*, *CRX*, *RP1* i *FSCN2* (<http://www.retina-international.org/sci-news/mutation.htm>). Les mutacions en el gen de la rodopsina (<http://www.retina-international.org/sci-news/rhomut.htm>) justifiquen d'un 20-25% de les RPAD, havent-se identificat més de 100 mutacions de diferents tipus al llarg de tot el gen. Aquestes inclouen mutacions puntuals, insercions, delecions i mutacions en senyals de *splicing*. S'observen diferents fenotips de RP depenent del tipus de mutació en el gen *RHO*, el que indica la gran heterogeneïtat clínica de la malaltia. En general, les mutacions localitzades en la regió transmembrana i C-terminal provoquen un fenotip més sever que les que afecten els llaços intradiscals i intracitoplasmàtics. A part de les mutacions descrites en gens associats a RPAD expressats específicament en retina, en els darrers anys s'han identificat mutacions en gens amb expressió ubiqua, no específics de retina, que provoquen retinosi pigmentària autosòmica dominant (RPAD). Tres d'aquests gens codifiquen factors de processament del pre-mRNA (o factors de *splicing*) que s'anomenen *PRPF3*, *PRPF8* i *PRPF31*.

Aproximadament el 10% de mutacions responsables de malalties hereditàries humanes són conseqüència directa d'un *splicing* defectuós del mRNA (Stenson et al., 2003). Específicament, un fenomen de *splicing* defectuós pot aparèixer, en primer lloc, degut a que un gen associat a una malaltia és portador d'una mutació en seqüències que són importants per al correcte reconeixement exó/intró (o per al processament del pre-mRNA) per l'*spliceosoma*, el que anomenaríem mutació en *cis*. A més, un *splicing* defectuós pot aparèixer també perquè una mutació afecti a un dels molts components de l'*spliceosoma*, el que anomenaríem mutació en *trans*.

En el primer cas es troben incomptables exemples, ja que, virtualment, tots els gens causants de patologia amb més d'un exó són possibles candidats a portar mutacions que afecten el *splicing* del seu pre-mRNA. Més específicament, la majoria d'aquestes mutacions de *splicing* porta a la producció de molècules de mRNA mutants que són degradades per NMD (*nonsense-mediated decay*). El NMD és un procés nuclear de vigilància del mRNA que és responsable de la destrucció de transcrits processats que tenen codons de terminació prematurs o codons d'iniciació defectuosos (Hentze et al., 1999; Welch et al., 1999). S'ha hipotetitzat que el NMD és un mecanisme que protegeix a la cèl·lula de la traducció de molècules de mRNA que poden potencialment donar lloc a proteïnes truncades amb efecte dominant negatiu.

En el segon cas trobem menys exemples d'aquests tipus de mutacions, ja que aquestes afecten molècules requerides per al *splicing* precís de la gran majoria dels transcrits, i per tant, essencials per a la supervivència de la cèl·lula. Aquestes estan limitades, per tant, a exemples en els quals la mutació que afecta una proteïna implicada en el procés de *splicing* altera però no aboleix completament la maduració del pre-mRNA.

En aquest treball s'han estudiat els mecanismes de mutacions en *trans* en factors de processament del pre-mRNA i la seva relació amb RPAD, i l'efecte de mutacions en *cis* localitzades en el gen *RHO*, associat a RPAD.

Es va realitzar un cribatge de mutacions en *trans* en gens de *splicing* associats a RPAD en 200 pacients afectats de RPAD que prèviament havien estat exclosos de tenir mutacions en els gens específics de retina *RHO*, *RDS/periferina*, *RP1*, *NRL*, *CRX* i *FSCN2*.

El mètode utilitzat per a la detecció de les mutacions en els gens analitzats va ser la DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). L'electroforesi en gradient desnaturalitzant (http://humgen.wustl.edu/hdk_lab_manual/dgge/dgge1.html) és una tècnica que ens permet una ràpida visualització dels canvis en la seqüència de DNA

d'un fragment petit de PCR (200-700 pb), fins i tot quan el canvi ha estat només d'un sol nucleòtid. La DGGE es basa en la migració de molècules de DNA a través d'un gel de poliacrilamida que conté un gradient continu creixent desnaturalitzant en sentit paral·lel a la migració de la mostra. Amb l'objecte de permetre la reproducibilitat de la tècnica, la carrera de l'electroforesi se sol realitzar a una temperatura constant de 60°C, tot i que de vegades també es realitza a temperatures més baixes, depenent del contingut en A-T del fragment a analitzar. Aquesta tècnica és extremadament eficaç quan s'utilitza per a l'anàlisi de variants nucleotídiques en heterozigosi en mostres amplificades amb la reacció en cadena de la polimerasa (PCR). En els darrers cicles de desnaturalització i re-anellament d'un programa de PCR sobre una mostra heterozigota mutada es produeix la formació de molècules de DNA homodúplex i heterodúplex. Els aparellaments incorrectes que hi tenen lloc en els heterodúplex fan reduir considerablement la temperatura de fusió del fragment. Aquesta diferència en la temperatura de fusió respecte de la dels homodúplex (normals i mutats) permet la separació electroforètica diferencial, que es pot visualitzar fàcilment en el gel obtingut.

Es van analitzar els exons 8, 11 i 42 dels gens *PRPF31*, *PRPF3* i *PRPF8*, respectivament. La zona que hem estudiat de cada gen és considerada un "hot spot" on estan localitzades la majoria de les mutacions associades a RPAD que s'han identificat. El gen *PRPF8* codifica una de les proteïnes més grans i més altament conservades en els organismes eucariotes (Grainger & Beggs, 2005). En altres grups de recerca s'ha realitzat cribatge de mutacions en tot el gen, però només s'han descrit variacions de seqüència en el darrer exó del gen, totes associades a RPAD. Es pot especular que variacions en altres zones del gen podrien ser letals, fins i tot en heterozigosi. De fet, tot i que la funció precisa de tots tres factors de *splicing* (hPrp31, hPrp8 i hPrp3) és poc coneguda, mutacions que provoquen pèrdua de funció en els gens ortòlegs de llevat *PRPF31*, *PRPC8* i *HPRP3* són letals.

Mitjançant l'anàlisi per DGGE dels fragments *PRPF31-8* (exó 8 del gen *PRPF31*), *PRPF3-11* (exó 11 del gen *PRPF3*) i *PRPF8-42* (exó 42 del gen *PRPF8*) es van identificar nou mutacions. Una d'elles es va trobar en una família espanyola i en un pacient nord-americà d'ètnia oriental. La resta de mutacions es van trobar en pacients espanyols (d'un total de 150 pacients índex), el que significa que aproximadament el 6% de famílies afectades de RPAD són portadores d'alguna mutació en aquests gens de *splicing* que codifiquen proteïnes components del complex *esplíceosomal*.

L'*esplíceosoma* és un gran complex de proteïnes i molècules de RNA que catalitza l'eliminació dels introns del pre-mRNA per tal de sintetitzar la molècula de mRNA madura que finalment s'unirà als ribosomes per tal de sintetitzar una proteïna. S'han identificat més de 40 proteïnes que processen el pre-mRNA en llevats i s'ha demostrat que moltes d'elles són vitals per a l'ensamblatge de l'*esplíceosoma in vitro* (Brown & Beggs, 1992). No obstant, es calcula en més de 100 les que poden intervenir en el procés. Així, cap esperar que un major nombre de mutacions en gens relacionats amb el procés de *splicing* pot ser causant de RP.

La formació de l'*esplíceosoma* comporta l'ensamblatge de les quatre snRNPs U1, U2, U4/U6 i U5, i molts altres factors de *splicing* d'una manera dinàmica. Per tal de formar l'*esplíceosoma*, les partícules de *splicing* snRNP U1, U2, U4, U5 i U6 s'associen amb el pre-mRNA i entre elles, en una seqüència ordenada. A l'inici del cicle, les snRNPs U4 i U6 estan fortament associades mitjançant aparellaments de bases RNA:RNA, formant una única partícula U4/U6. Aquest complex, al seu torn, s'associa amb la snRNP U5 per formar la partícula tri-snRNP U4/U6-U5 (anomenat complex B). Aquest tri-snRNP s'uneix llavors al complex format anteriorment pel pre-mRNA i les partícules U1 i U2 (anomenat complex A), per tal que tingui lloc un reordenament d'aparellament de bases RNA:RNA i el posterior processament de la molècula de pre-mRNA. Després del processament, el tri-snRNP U4/U6-U5 es dissocia a nivell de snRNP, donant lloc a

U4, U5 i U6, que llavors tornaran a ensamblar-se per tornar a prendre part en un nou cicle de *splicing*.

Els productes dels gens *PRPF3*, *PRPF8* i *PRPF31*, les mutacions dels quals estan associades a RPAD, són components del complex tri-snRNP U4/U6-U5, per tant tenen una funció crucial dins del processament del RNA.

El gen *PRPF31* humà codifica una proteïna de 499 aminoàcids i un pes molecular de 61 kDa que està associada a la snRNP U4/U6. La proteïna hPrp31 promou l'associació entre la snRNP U4/U6 i la snRNP U5 per interaccions directes amb una proteïna de 105 kDa específica d'U5. Experiments *in vitro* (Makarova et al., 2002) van demostrar que l'hPrp31 és essencial per a la generació de l'*spliceosoma* actiu. Tot i que diverses mutacions a les proteïnes de les snRNPs inhibeixen la transició del pre-*spliceosoma* a l'*spliceosoma*, hPrp31 és única en quant que és medidora directa de la formació del tri-snRNP U4/U6-U5 més que d'interaccions directes entre el tri-snRNP i el pre-*spliceosoma*. És operacionalment definida com a específica d'U4/U6, ja que es manté unida a aquesta partícula a concentracions de sal a les quals es dissocia el tri-snRNP. Les mutacions trobades al gen *PRPF31* a la població espanyola són delecions-insercions nucleotídiques que en tots els casos donen lloc a proteïnes truncades. Si aquestes variants proteiques són traduïdes de forma estable o no a la retina, encara no està establert, però el que sembla estar clar és que cap d'aquests mutants promouria la formació d'una tri-snRNP funcional. Conseqüentment, amb mutacions en heterozigosi, el resultat a nivell de proteïna podria ser la disminució al 50% de la tri-snRNP funcional, que donaria lloc a una disminució en la velocitat del procés de *splicing* a la cèl·lula. En les famílies RPAD M637 i RPAD M618 presentades en aquest estudi es van identificar dos pacients portadors de la mutació i asimptomàtics, suggerint una penetrància incompleta en aquestes famílies. Una d'aquestes mutacions, 769-770insA, ja havia estat detectada en un pacient esporàdic de RP (Vithana et al., 2001). També s'ha observat penetrància incompleta en dues

famílies RPAD descrites anteriorment (Vithana et al., 2001), portadores de delecions al gen *PRPF31*. Per tal d'explicar la penetrància incompleta en les famílies lligades a aquest locus (RP11), s'ha suggerit que unalevada expressió de l'al·lel salvatge podria ser capaç de compensar l'al·lel mutant presumiblement no funcional (McGee et al., 1997; Vithana et al., 2001). Així doncs, les mutacions al gen *PRPF31* sembla ser que induirien un mecanisme patogènic per haploinsuficiència en comptes d'un efecte dominant negatiu. Un altre possible mecanisme (Yuan et al., 2005) és l'existència de gens modificadors que podrien eliminar o antagonitzar funcionalment proteïnes hPrp31 mutants, afectant així la penetrància o expressivitat de les mutacions a *PRPF31*.

El gen *PRPF8* codifica una proteïna de 2335 aminoàcids component del *core* catalític de l'*esplíceosoma* (Brown et al., 1992) i juga un paper important en l'alineació dels exons 5' i 3' del pre-mRNA per a la seva lligació, ja que fa contacte directe amb ambdós llocs de *splicing* 3' i 5' i també amb els snRNAs U6 i U5 (Wyatt et al., 1992; Teigelkamp et al., 1995; Vidal et al., 1999). En el nostre grup de treball hem detectat 5 mutacions al gen *PRPF8* en famílies RPAD espanyoles. Tres d'elles són mutacions *nonsense* -és a dir, que provoquen un codó de terminació prematur (PTC)- degudes a petites delecions o insercions en la zona codificant de l'exó 42 del gen. En totes tres famílies portadores d'aquest tipus de mutació es va observar la perfecta co-segregació entre la mutació i la malaltia. Totes tres mutacions prediuen una variant proteica no funcional. Si aquestes variants són sintetitzades i es mantenen de forma estable a la retina o no, encara està pendent de determinar. Es van detectar, a més a més, dues mutacions que comporten un canvi d'un nucleòtid per un altre. Una d'elles prediu un codó de terminació i l'altra provoca una canvi d'una Arg per una Gly a nivell de proteïna. Aquesta darrera mutació (Arg2310Gly) ja va ser identificada també en una família holandesa (McKie et al., 2001).

La proteïna codificada per *PRPF3*, hPRP3, també és un component de la snRNP U4/U6 (Wang et al., 1997). Al gen *PRPF3* vam detectar la mutació *missense* -és a dir,

amb un canvi de sentit – Thr494Met, que ja havia estat descrita anteriorment en un altre grup (Chakarova et al., 2002) i que posteriorment també s'ha identificat en una família japonesa (Wada et al., 2004). Cal remarcar que totes les mutacions descrites en aquest gen per altres grups de recerca estan localitzades en codons adjacents altament conservats (el 493 i 494) situats a l'exó 11 (Xu et al., 1996; Chakarova et al., 2002; Wada et al., 2004). S'ha suggerit que aquesta regió terminal de l'hPrp3 és necessària per a la interacció amb PAP-1, una altra proteïna associada a *splicing* (Maita et al., 2005), que també s'ha trobat que forma part del complex tri-snRNP U4/U6-U5. Això llavors suggereix que els factors de *splicing* implicats en RPAD contribueixen sols o mutuament a un processament de RNA adequat a la retina i que la pèrdua de les seves funcions degut a mutacions porta al desencadenament de la RPAD.

L'expressió clínica de la RP exhibeix un alt grau d'heterogeneïtat. Com ja s'ha comentat anteriorment, aquesta heterogeneïtat es mostra en l'aparició de molts fenotips associats a mutacions en diferents gens. Tot i així, moltes vegades es pot fer una classificació intentant correlacionar la clínica presentada amb un determinat tipus de mutació. Els pacients afectats portadors de mutació al *PRPF8* o al *PRPF31* presenten una aparició primerenca de la malaltia, canvis pigmentaris difosos i camps visuals amb depressió concèntrica. L'electroretinograma és abolit a la majoria de pacients a partir de la primera dècada de vida. Les mutacions al gen *PRPF8* provoquen una forma severa de RP, amb una penetrància completa en tots els pacients portadors de mutació. Pel que fa a les mutacions al gen *PRPF31*, es presenten casos d'individus asimptomàtics portadors de mutació, el que suposa una penetrància incompleta, fet que ja s'havia presentat en altres famílies portadores de mutacions al *PRPF31* (Vithana et al., 2003). Aquesta penetrància incompleta de mutacions causants de RPAD l'hem observat en altres gens com RP1 (Gamundi et al., 2006). Pel que fa referència a la família espanyola portadora de la mutació al gen *PRPF3*, només

es disposa d'informació clínica del pacient índex. Aquest pacient mostrava una aparició de la malaltia més tardana i un fenotip de RP més lleu que en els pacients amb mutacions als gens *PRPF8* i *PRPF31*. Tot i així, en altres grups de recerca (Chakarova et al., 2002; Wada et al., 2004) s'ha trobat que en pacients amb mutació al gen *PRPF3* l'inici de la malaltia és precoç amb una progressió ràpida després dels 40 anys i sense evidències de no-penetrància. Per tant, no es poden extreure moltes conclusions pel que fa a les mutacions al gen *PRPF3* degut a la poca informació de la qual disposem.

Les mutacions trobades al gen *PRPF8* es troben al darrer exó. Això fa més probable que els mRNA mutats transcrits siguin més estables i les proteïnes codificades també (Kondo et al., 2003)

El fet que es puguin sintetitzar proteïnes gairebé idèntiques a la proteïna salvatge (i que alteren la funció del producte gènic normal), fa suposar un efecte dominant negatiu (actuant la proteïna mutada com a producte deleteri) front a proteïnes més diferents de la salvatge, que poden ser inestables i ser eliminades, ocasionant un mecanisme d'haploinsuficiència, una situació en la qual la proteïna produïda per una sola còpia d'un gen normal no és suficient per a garantir una funció normal.

Una qüestió que encara queda per esbrinar és per què mutacions en gens que codifiquen factors de *splicing* que s'expressen de forma ubíqua només presenten patologia a la retina. S'ha proposat que aquests gens podrien estar implicats en passos limitants de la velocitat del procés de *splicing* en un teixit amb un alt metabolisme com és la retina. Alternativament, mutacions en els gens que codifiquen factors de *splicing* del mRNA causants de RP podrien interferir en interaccions específiques proteïna-proteïna que només tinguessin lloc a les cèl·lules retiniques o bé podrien jugar un paper important en una segona classe d'*spliceosomes*, l'U12, que elimina introns flanquejats pels senyals de *splicing* AU-AC en comptes dels senyals canònics AG-GU. Així, s'ha vist que mutacions en una família de gens que mantenen introns dependents d'U12 provoquen malalties neuromusculars i neurològiques (Wu et

al. 1999). Per tal d'investigar aquesta hipòtesi, es va procedir a l'obtenció de línies cel·lulars limfoblastoides mutants, provinents de pacients portadors de mutacions al gen *PRPF8*. En aquestes línies mutants es va investigar el comportament del processament del RNA en presència de minigens salvatges i minigens amb alteracions en senyals de *splicing*, i a més vam investigar diferències en l'expressió gènica, analitzant si es produïen diferències significatives en gens amb senyals de *splicing* no canònics del tipus U12, com es detalla més endavant.

En el nostre grup de treball es van identificar anteriorment, en dues famílies afectades de RPAD, mutacions en senyals de *splicing* en el gen de la rodopsina (*RHO*). La rodopsina, proteïna de 348 aminoàcids codificada pel gen *RHO*, és un pigment visual primari de les cèl·lules fotoreceptores bastons. És un receptor acoblat a proteïna G activat per la llum, que inicia la cascada de la fototransducció convertint senyals de llum en senyals electrofisiològics a les neurones retinianes. Aquest procés de transducció de senyal foto-activat és essencial per a la visió. La característica inicial de la clínica de la RP és la pèrdua de visió nocturna deguda a un mal funcionament dels fotoreceptors bastons. Una expressió correcta del gen salvatge de la rodopsina és essencial per al desenvolupament i funció sostinguda de les cèl·lules fotoreceptores. Les mutacions en el gen *RHO* són causa d'un 25% del total de casos de RPAD als EEUU, i d'un 15% de casos RPAD a Espanya, i s'han identificat més de 100 mutacions en el gen *RHO* (www.sph.uth.tmc.edu/RetNet). La majoria d'aquestes mutacions són mutacions *missense* que afecten un sol aminoàcid en la proteïna rodopsina. El fenotip d'aquestes mutacions és bastant heterogeni.

Les mutacions en senyals de *splicing* descrites en el gen de la rodopsina en el nostre grup de treball (IVS2-2A→G i IVS4-1G→T) presenten un fenotip lleu amb penetrància completa de la mutació. El mecanisme d'actuació de les mutacions no està gaire clar. Es va detectar, en un altre grup de recerca, una mutació en el senyal donador de l'intró 4 al gen de la rodopsina (Rosenfeld et al., 1995) en dues famílies. Aquesta mutació,

G4335T (IVS4+1G→T) es va observar en heterozigosi en 25 pacients, però només un d'ells presentava signes de RP. Davant d'aquest fet, calia esbrinar si realment les mutacions de *splicing* en el gen de la rodopsina detectades en el nostre grup produïen algun efecte en el processament del mRNA, per tal de poder relacionar-ho amb un defecte en la proteïna resultant.

La mutació G5167T (IVS4-1G→T) es va detectar en una família RPAD vasca. El canvi es troba en el senyal 3' acceptor de l'intró 4 del gen de la rodopsina. Aquest provoca una alteració en els senyals de *splicing*, de forma que es transforma d'AG a AT) (Reig et al., 1996). Després de realitzar l'estudi genètic en la família, es va comprovar que tots els pacients afectats de RPAD presentaven la mutació. Aquesta mutació no es va trobar en 50 controls no relacionats. En aquesta família, la mutació produeix RPAD amb un fenotip lleu i amb expressió variable. La malaltia sembla ser que segueix una progressió lenta, i té un inici bé a l'adolescència o a la segona o fins i tot a la tercera dècada de vida. Com a primers símptomes es presenten la ceguesa nocturna i una dificultat en l'adaptació a la foscor. En el cas índex, l'exploració oftalmològica presentava alteracions funduscòpiques, incloent dipòsits pigmentaris amb simetria entre els camps visuals més alts i més baixos. A més, els electroretinogrames estaven alterats amb una major participació del mecanisme escotòpic, i la resposta dels cons estava alterada, indicant una degeneració bastons-cons.

La seqüència AG està evolutivament conservada en el lloc 3' acceptor de tots els introns del gen *RHO*. La mutació IVS4-1G→T aboleix el lloc de *splicing* 3' acceptor de l'intró 4 situat a la posició 5167 de la seqüència del gen *RHO* (NCBI, nº d'accés U49742), amb la qual cosa poden generar-se patrons de *splicing* 3' alternatius. La predicció teòrica d'exons amb el programa informàtic *Genscan* ens proposava la generació d'un senyal de *splicing* alternatiu a la posició 5153, el que provocaria la síntesi d'una proteïna mutant amb 5 aminoàcids més que la proteïna salvatge. Degut a que el gen *RHO* només s'expressa en la retina, per tal de comprovar l'efecte de

mutacions en senyals de *splicing* sobre el processament del seu mRNA, hauria estat necessari analitzar el mRNA de retina dels pacients portadors de la mutació, però això actualment no es pot realitzar en un pacient viu. Per tant, l'alternativa va ser estudiar la mutació *in vitro*, per la qual cosa es va sintetitzar un plàsmid amb un minigen portador de la mutació IVS4-1G→T, que es va transfectar en la línia cel·lular COS-7.

La hipòtesi que es va formular va ser, llavors, que la pèrdua del senyal de *splicing* a l'intró 4 del gen de la rodopsina podria portar a un efecte patològic que semblava estar relacionat amb un possible extrem C-terminal anòmal de la proteïna. Per tal de comprovar-ho, es van construir els plàsmids portadors dels minigens salvatges i mutants i es van transfectar transitòriament en la línia COS-7. Després de l'anàlisi, per RT-PCR, dels mRNA extrets de les cèl·lules i comparant els resultats obtinguts en la transfecció del minigen mutant amb la transfecció del minigen salvatge, es va comprovar que la mutació provocava una alteració en el patró de *splicing* del mRNA del gen *RHO*, confirmant la hipòtesi que havíem formulat. La mutació provoca l'abolició del senyal de *splicing* AG normal situat a les posicions 5166-5167, creant un nou senyal de *splicing* AG a les posicions 5205-5206, de tal manera que es produïa la creació d'un exó 5 alternatiu comprès entre les posicions 5207 i 5278 en comptes de l'exó 5 salvatge localitzat entre les posicions 5168 i 5278. Això, a nivell de proteïna, si aquesta se sintetitzés *in vivo*, provocaria una deleció de 13 aminoàcids, concretament, des de la Phe-313 fins a la Lys-325, que estan situats cap al l'extrem C-terminal de la proteïna rodopsina (que consta de 348 aa). Per tant, una possible explicació de la patologia podria ser la síntesi d'una proteïna rodopsina no funcional, per manca de part de l'extrem C-terminal.

L'altra mutació de *splicing* identificada va ser en el senyal 3' acceptor de l'intró 2 del gen de la rodopsina en una família RPAD. Aquesta mutació (A3811G, IVS2-2A→G), canvia el senyal de *splicing* d'AG a GG (Martínez-Gimeno et al., 2000). Es va realitzar l'estudi genètic familiar i es va comprovar que la mutació era present a tots els

pacients afectats de RPAD, demostrant la perfecta co-segregació de la mutació amb la malaltia. Aquesta mutació no es va trobar en controls sans. Per tal de poder estudiar el possible efecte d'aquesta mutació de *splicing* sobre el processament del RNA del gen de la rodopsina, es va utilitzar també el programa de predicció teòrica d'exons *Genscan*. El programa va predir que, en presència de la mutació A3811G en el gen *RHO*, es creava un exó 3 alternatiu entre les posicions 3774-3978 en comptes de les posicions 3813-3978 presents en l'exó 3 del gen *RHO* salvatge. Es va realitzar llavors la construcció del plàsmid amb el minigen mutant portador de la mutació, per tal de comprovar si aquest efecte també tenia lloc *in vitro*. Es va transfectar el minigen salvatge i el minigen mutat en la línia cel·lular COS-7 i es va comprovar que la mutació provocava una alteració en el patró de *splicing* del mRNA del gen *RHO*. Tot i així, el canvi no eral mateix que el que havia predit el programa informàtic.

La mutació provoca l'abolició del senyal de *splicing* AG normal situat a les posicions 3811-3812, creant dos nous senyals de *splicing* AG, un d'ells a les posicions 3711-3712 i l'altre a les posicions 3956-3957, donant lloc, el primer, a un exó 3 alternatiu entre les posicions 3713-3978 i el segon a un exó 3 alternatiu entre les posicions 3958-3978, en comptes de l'exó 3 normal 3813-3978. Això significava la creació de dos exons alternatius que provocarien la síntesi, si aquesta tingués lloc, en tots dos casos, d'una proteïna rodopsina aberrant.

Per tant, en totes dues famílies, és possible que les mutacions en senyals de *splicing* al gen de la rodopsina estiguin provocant una alteració en el processament del mRNA. Tot i que els experiments no s'han realitzat en cultiu de cèl·lules de retina, que és el teixit en el qual es podrien observar els efectes (degut a l'expressió específica de la rodopsina a la retina), el fet de que observem diferències entre l'expressió dels minigens salvatges i els minigens mutats ens fa pensar que el mecanisme patològic d'aquestes mutacions pot estar relacionat amb un processament aberrant de les molècules de mRNA del gen de la rodopsina. Si aquest mRNA defectuós fós estable i

sintetitzés la proteïna, per a totes dues mutacions la rodopsina sintetitzada seria aberrant i no podria exercir la seva funció a la cascada de la fototransducció. Les mutacions de *splicing* en *cis* descrites en les famílies espanyoles contrasten amb la mutació trobada per altres grups en el senyal de *splicing* de l'intró 4 a la posició G4335T (IVS4+1G→T). Tal i com hem referit anteriorment, aquesta mutació no provoca afectació en heterozigosi, tot i que sí ho fa en un cas en homozigosi descrit (Rosenfeld et al. 1995). A falta dels resultats d'expressió d'aquest tipus de mutant, es pot especular que potser el transcrit originat per aquesta mutació (segons la predicció teòrica amb el programa *Genscan*) codifica una proteïna de major mida i amb major contingut de residus aberrants que les proteïnes mutants descrites en la població espanyola que provoquen RPAD. Aquest fet pot ocasionar un transcrit o proteïna altament inestable, i que, per tant, no arribi a provocar cap efecte deleteri als fotoreceptors bastons. Situacions semblants s'han descrit amb mutacions que produeixen codons de terminació en la regió C-terminal de la rodopsina, *RP1* i *FSCN2* (Gamundi et al., 2005, 2006)

La síntesi d'una proteïna aberrant que afectés la funció de la proteïna salvatge faria presuposar un mecanisme patològic per efecte dominant negatiu de les mutacions. Hipotèticament, si la proteïna no se sintetitzés, o si fós sintetitzada però inestable, una sola còpia de l'al·lel salvatge possiblement seria capaç de complir la funció de la rodopsina, sense produir RP. Això es dona en ratolins amb una sola còpia funcional de rodopsina (Humphries et al., 1997), en els quals s'observa una retenció de la majoria de fotoreceptors tot i que els segments interns i externs de les cèl·lules fotoreceptores mostren certa desorganització estructural, fent-se els segments externs més curts a mesura que augmenta l'edat del ratolí.

Utilitzant les mateixes construccions de minigens de *RHO* amb mutacions en senyals de *splicing*, i tenint en compte que havíem identificat mutacions en *trans* en factors de *splicing* associades a RPAD, es va voler caracteritzar funcionalment el paper d'un dels

factors de *splicing*, l'hPrp8, en el processament del mRNA. En un altre estudi (Yuan et al., 2005) ja es va demostrar que el gen de la rodopsina era substrat per a la proteïna codificada pel gen *PRPF31*. En aquell estudi es van construir minigens de *RHO* i de *ROM1* i es van co-transfectar en cèl·lules HEK junt amb plàsmids normals i mutants de *PRPF31*. Es va realitzar una extracció de RNA total de les cèl·lules i després de realitzar la RT-PCR específica per al minigen cotransfectat es va comprovar que, en presència d'hPrp31 mutat, s'inhibia el *splicing* del minigen de rodopsina, mentre que el *splicing* de *ROM1* restava inalterat. Basant-nos en això, vam voler estudiar l'efecte que podria provocar la mutació 6974-6994del 21 pb (V2325fsX2329) al gen *PRPF8* sobre el *splicing* dels minigens de *RHO*. Per a això, es van utilitzar línies limfoblastoides transformades amb EBV provinents de pacients afectats de RPAD i portadors d'aquesta mutació en el gen *PRPF8* i una línia provinent d'un individu normal sense mutació. Es van transfectar tant els minigens normals com els mutants (per tal de comprovar si entre aquests dos es podien veure diferències) en una línia normal i en una mutada, i es va extreure el RNA total de les cèl·lules. El resultat de la RT-PCR no va mostrar cap diferència entre la transfecció en la línia normal i la mutada, però sí es van veure diferències entre el *splicing* dels minigens normals i mutants, tal i com havíem vist en la línia cel·lular COS-7. Això ens va mostrar que, a primera vista, la mutació 6974-6994del 21 pb no afectava al *splicing* dels minigens de *RHO* construïts. Quan es va realitzar l'estudi genètic familiar de la mutació 6974-6994del 21pb en el gen *PRPF8*, es va comprovar que hi havia una penetrància del 100% de la mutació. Degut a que en el gen *PRPF31* s'havia observat penetrància incompleta de certes mutacions, un altre grup de recerca (Vithana et al., 2003) va voler estudiar la diferent expressió de l'al·lel mutat en pacients afectats i en individus asimptomàtics portadors de mutació a *PRPF31*. En aquest cas es va veure que la penetrància parcial podria ser deguda a la co-herència d'un defecte al *PRPF31* junt amb un al·lel salvatge que s'expressava menys en els pacients afectats, de tal manera que els individus asimptomàtics heretaven un al·lel salvatge diferent a l'heretat pels seus familiars

afectats. En el nostre cas, per tal de comprovar que la penetrància completa de la mutació 6974-6994del 21pb era deguda a l'expressió del 50% de l'al·lel normal i del 50% de l'al·lel mutat en els pacients afectats portadors de la mutació, es va realitzar una quantificació en temps real de l'expressió dels mRNA del *PRPF8* salvatge i mutant. Es va comprovar que l'expressió de l'al·lel salvatge en els pacients afectats era del 50%, el que volia dir, per tant, que l'expressió de l'al·lel mutant era d'un 50%. Així doncs, l'expressió de l'al·lel mutat és idèntica a l'expressió de l'al·lel salvatge en pacients portadors de la mutació 6974-6994del 21pb.

D'altra banda, es va voler comprovar si mutacions al gen *PRPF8* provocaven canvis en l'expressió d'altres gens. De totes les famílies portadores de mutacions al gen *PRPF8* es van seleccionar les famílies RPAD SJD1 i M618, portadores de les mutacions 6974-6994del21 pb i 6893-6896 del ins 7pb, respectivament. Anteriorment, ja s'havien immortalitzat les cèl·lules limfoblàstoides dels pacients seleccionats, creant les línies CAR0001, CAR0002, CAR0003, CAR0004 i CAR0005. Les tres primeres pertanyen a la família SJD1, éssent CAR0003 un control sa sense mutació i CAR0001 i CAR0002 dos pacients afectats portadors de la mutació. CAR0004 i CAR0005 pertanyen a la família M618 i són dos pacients afectats. Es va extreure el RNA total de les cinc línies cel·lulars, i se'ls va realitzar una anàlisi de l'expressió gènica de les mostres amb un *microarray* de DNA, el "Human Genome Survey Microarray V2.0" d'Applied Biosystems". L'anàlisi mitjançant *microarrays* d'una mostra determinada de RNA ens permet obtenir el perfil d'expressió en aquesta mostra. El mètode dels *microarrays* de DNA ens permet mesurar indirectament l'expressió de determinats gens, donant-nos un esborrany de la mesura de la concentració cel·lular de diferents mRNA. Es van comparar els resultats de les línies mutades enfront la línia control. Els resultats obtinguts en brut es van normalitzar i es va definir l'expressió gènica diferencial aplicant un valor arbitrari de tall de 2 (2-fold o un canvi d'expressió superior). Es van separar els gens expressats diferencialment en les línies mutades segons si estaven

induïts o reprimits respecte de la línia control i al seu torn, aquests es van classificar segons la via metabòlica o segons el procés biològic en el qual participava el producte del gen. Es va obtenir, doncs, una primera visió de la variació de l'expressió gènica en les línies mutades. Es va analitzar la variació de gens associats a RP i com a resultat rellevant es va observar que el gen *RPGR*, un dels gens associats a la malaltia RP, estava reprimit en tres de les quatre línies mutades analitzades. El gen *RPGR* (Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator) està associat a diverses retinopaties hereditàries: distròfia de cons o bastons lligada al X, ceguesa nocturna congènita estacionària autosòmica recessiva, amaurosi congènita de Leber autosòmica recessiva, degeneració macular lligada al X i retinosi pigmentària lligada al X. L'espectre de mutacions detectades en pacients RP comprèn mutacions *missense*, *nonsense*, però també delecions que eliminen un o diversos exons. S'ha demostrat una complexitat considerable en l'expressió del gen *RPGR*. L'estudi inicial del *RPGR* va identificar un transcrit consistent en 19 exons, expressat en una gran varietat de teixits, per la qual cosa se'l va anomenar transcrit constitutiu (Hong & Li, 2002). S'ha descrit un elevat grau de *splicing* alternatiu en el transcrit constitutiu. A més, també es va descobrir una nova variant humana de *RPGR*, que finalitza a l'intró 15 del gen *RPGR*. Aquest exó alternatiu terminal, anomenat ORF15, consisteix en l'exó 15 constitutiu i part de l'intró 15. En aquest nou exó s'ha trobat una seqüència repetitiva rica en purines, que codifica residus d'aminoàcid alternants de glicina i glutamina. S'han identificat un gran nombre de mutacions causants de patologia en l'exó ORF15 en pacients amb RP lligada al X. No s'han observat mutacions patològiques als exons 16-19 (únics al transcrit constitutiu), suggerint que el transcrit ORF15 podria ser la isoforma de *RPGR* funcionalment significativa. La majoria de mutacions es troben en la regió repetitiva rica en purines i donen lloc a un canvi en la pauta de lectura. El processament heterogeni dels transcrits de *RPGR* sembla ser un fenomen general en les retines de mamífer. La maquinària de *splicing* dels fotoreceptors, per tant, podria diferir de la d'altres teixits. Això ja es demostra amb les mutacions trobades als factors

de *splicing* del pre-mRNA. Degut a que aquests factors són utilitzats en totes les cèl·lules (per la seva expressió ubíqua), la patologia selectiva observada als fotoreceptors podria estar produïda per les diferències intrínseques entre els fotoreceptors i altres cèl·lules en termes d'abundància i activitats entre diferents factors de *splicing*. Llavors es podria determinar si *RPGR* podria ser una de les dianes afectades per mutacions en factors de *splicing* i si això podria formar part del procés patogènic. Actualment, aquest punt s'està investigant al laboratori.

CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

1. S'han detectat, per primera vegada en la població espanyola, mutacions en gens de codifiquen factors de processament del pre-mRNA (*PRPF3*, *PRPF8* i *PRPF31*) que provoquen retinosi pigmentària autosòmica dominant.
2. El percentatge de pacients RPAD portadors de mutacions en els gens *PRPF3*, *PRPF8* i *PRPF31* a la població espanyola és d'un 6%.
3. L'expressió clínica de la RP en els pacients portadors de mutació als gens *PRPF* és variable. Els portadors de mutacions al gen *PRPF3* i al gen *PRPF8* presenten, en general, una clínica més severa que els portadors de mutacions al gen *PRPF31*. S'ha observat que mutacions al gen *PRPF31* presenten, en algunes famílies, una penetrància incompleta.
4. Les mutacions en senyals de *splicing* en *cis* en el gen *RHO* detectades en la població espanyola provoquen la inactivació d'aquests senyals, creant altres senyals alternatius que donen lloc a la síntesi de productes aberrants de processament del mRNA de *RHO*. Aquestes mutacions provoquen una RPAD amb penetrància completa menys severa que la que, en general, presenten els pacients amb mutacions en zones codificants del gen *RHO*.
5. L'anàlisi del perfil d'expressió, mitjançant *microarrays* de DNA, en línies limfoblastoides de pacients amb mutació al gen *PRPF8* va mostrar una repressió del gen *RPGR* (gen associat a RP). No es va observar variació en cap altre gen associat a RP.
6. Mitjançant l'anàlisi de l'expressió gènica diferencial en línies limfoblastoides, no s'observen diferències en l'expressió de gens amb *splicing* no canònic entre línies cel·lulars portadores de mutació en el gen *PRPF8* i línies salvatges.

REFERÈNCIES

7. REFERÈNCIES

Articles de revista i monografies

- Aherne A, Kennan A, Kenna PF, McNally N, Lloyd DG, Alberts IL, Kiang AS, Humphries MM, Ayuso C, Engel PC, Gu JJ, Mitchell BS, Farrar GJ, Humphries P. "On the molecular pathology of neurodegeneration in IMPDH1-based retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet.* 2004 Mar 15;13(6):641-50.
- Ayadi L, Callebaut I, Saguez C, Villa T, Moron JP, Banroques J. Functional and structural characterization of the prp3 binding domain of the yeast prp4 splicing factor. *J Mol Biol.* 1998 Dec 4;284(3):673-87.
- Bell C, Converse CA, Hammer HM, Osborne A, Haites NE. Rhodopsin mutations in a Scottish retinitis pigmentosa population, including a novel splice site mutation in intron four. *Br J Ophthalmol.* 1994 Dec;78(12):933-8.
- Berson EL. Retinitis pigmentosa: unfolding its mystery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 May 14;93(10):4526-8. Review.
- Bessant DA, Payne AM, Mitton KP, Wang QL, Swain PK, Plant C, Bird AC, Zack DJ, Swaroop A, Bhattacharya SS. A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* 1999 Apr;21(4):355-6.
- Bishop DT, McDonald WH, Gould KL, Forsburg SL. Isolation of an essential *Schizosaccharomyces pombe* gene, prp31(+), that links splicing and meiosis. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 1;28(11):2214-20.
- Bowne SJ, Sullivan LS, Blanton SH, Cepko CL, Blackshaw S, Birch DG, Hughbanks-Wheaton D, Heckenlively JR, Daiger SP. Mutations in the inosine monophosphate dehydrogenase 1 gene (IMPDH1) cause the RP10 form of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet.* 2002 Mar 1;11(5):559-68.
- Brown JD, Beggs JD. Roles of PRP8 protein in the assembly of splicing complexes. *EMBO J.* 1992 Oct;11(10):3721-9.

- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet.* 2002 Apr;3(4):285-98.
- Cartegni L, Krainer AR. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet.* 2002 Apr;30(4):377-84.
- Chakarova CF, Hims MM, Bolz H, Abu-Safieh L, Patel RJ, Papaioannou MG, Inglehearn CF, Keen TJ, Willis C, Moore AT, Rosenberg T, Webster AR, Bird AC, Gal A, Hunt D, Vithana EN, Bhattacharya SS. Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet.* 2002 Jan 1;11(1):87-92.
- Chakarova CF, Hims MM, Bolz H, Abu-Safieh L, Patel RJ, Papaioannou MG, Inglehearn CF, Keen TJ, Willis C, Moore AT, Rosenberg T, Webster AR, Bird AC, Gal A, Hunt D, Vithana EN, Bhattacharya SS. Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet.* 2002 Jan 1;11(1):87-92.
- Chen S, Wang QL, Nie Z, Sun H, Lennon G, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Zack DJ. Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron.* 1997 Nov;19(5):1017-30.
- Collins CA, Guthrie C. The question remains: is the spliceosome a ribozyme? *Nat Struct Biol.* 2000 Oct;7(10):850-4.
- Cramer P, Srebrow A, Kadener S, Werbajh S, de la Mata M, Melen G, Noguees G, Kornblihtt AR. Coordination between transcription and pre-mRNA processing. *FEBS Lett.* 2001 Jun 8;498(2-3):179-82.
- Deery EC, Vithana EN, Newbold RJ, Gallon VA, Bhattacharya SS, Warren MJ, Hunt DM, Wilkie SE. Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by mutations in the splicing factor gene PRPF31. *Hum Mol Genet.* 2002 Dec 1;11(25):3209-19.
- Fairbrother WG, Chasin LA. Human genomic sequences that inhibit splicing. *Mol Cell Biol.* 2000 Sep;20(18):6816-25.

- Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA, Burge CB. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science*. 2002 Aug 9;297(5583):1007-13.
- Farrar GJ, Jordan SA, Kenna P, Humphries MM, Kumar-Singh R, McWilliam P, Allamand V, Sharp E, Humphries P. Autosomal dominant retinitis pigmentosa: localization of a disease gene (RP6) to the short arm of chromosome 6. *Genomics*. 1991 Dec;11(4):870-4. Erratum in: *Genomics* 1992 Aug;13(4):1384.
- Farrar GJ, Kenna PF, Humphries P. On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. *EMBO J*. 2002 Mar 1;21(5):857-64.
- Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev*. 2003 Feb 15;17(4):419-37.
- Freund CL, Gregory-Evans CY, Furukawa T, Papaioannou M, Looser J, Ploder L, Bellingham J, Ng D, Herbrick JA, Duncan A, Scherer SW, Tsui LC, Loutradis-Anagnostou A, Jacobson SG, Cepko CL, Bhattacharya SS, McInnes RR. Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. *Cell*. 1997 Nov 14;91(4):543-53.
- Furukawa T, Morrow EM, Cepko CL. Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell*. 1997 Nov 14;91(4):531-41.
- Gamundi MJ, Hernan I, Maseras M, Baiget M, Ayuso C, Borrego S, Antinolo G, Millan JM, Valverde D, Carballo M. Sequence variations in the retinal fascic FSCN2 gene in a Spanish population with autosomal dominant retinitis pigmentosa or macular degeneration. *Mol Vis*. 2005 Nov 2;11:922-8.
- Gamundi MJ, Hernan I, Martinez-Gimeno M, Maseras M, Garcia-Sandoval B, Ayuso C, Antinolo G, Baiget M, Carballo M. Three novel and the common Arg677Ter RP1 protein truncating mutations causing autosomal dominant retinitis pigmentosa in a Spanish population. *BMC Med Genet*. 2006 Apr 5;7(1):35

- Gao J, Cheon K, Nusinowitz S, Liu Q, Bei D, Atkins K, Azimi A, Daiger SP, Farber DB, Heckenlively JR, Pierce EA, Sullivan LS, Zuo J. Progressive photoreceptor degeneration, outer segment dysplasia, and rhodopsin mislocalization in mice with targeted disruption of the retinitis pigmentosa-1 (Rp1) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 16;99(8):5698-703.
- Gonzalez-Santos JM, Wang A, Jones J, Ushida C, Liu J, Hu J. Central region of the human splicing factor Hprp3p interacts with Hprp4p. *J Biol Chem*. 2002 Jun 28;277(26):23764-72.
- Gottschalk A, Neubauer G, Banroques J, Mann M, Luhrmann R, Fabrizio P. Identification by mass spectrometry and functional analysis of novel proteins of the yeast [U4/U6.U5] tri-snRNP. *EMBO J*. 1999 Aug 16;18(16):4535-48.
- Grainger RJ, Beggs JD. Prp8 protein: at the heart of the spliceosome. *RNA*. 2005 May;11(5):533-57.
- Greenberg J, Roberts L, Ramesar R. A rare homozygous rhodopsin splice-site mutation: the issue of when and whether to offer presymptomatic testing. *Ophthalmic Genet*. 2003 Dec;24(4):225-32.
- Guillonneau X, Piriev NI, Danciger M, Kozak CA, Cideciyan AV, Jacobson SG, Farber DB. A nonsense mutation in a novel gene is associated with retinitis pigmentosa in a family linked to the RP1 locus. *Hum Mol Genet*. 1999 Aug;8(8):1541-6.
- Heng HH, Wang A, Hu J. Mapping of the human HPRP3 and HPRP4 genes encoding U4/U6-associated splicing factors to chromosomes 1q21.1 and 9q31-q33. *Genomics*. 1998 Mar 1;48(2):273-5.
- Hentze MW, Kulozik AE. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell*. 1999 Feb 5;96(3):307-10.
- Hims MM, Daiger SP, Inglehearn CF. Retinitis pigmentosa: genes, proteins and prospects. *Dev Ophthalmol*. 2003;37:109-25.
- Hong DH, Li T. Complex expression pattern of RPGR reveals a role for purine-rich exonic splicing enhancers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Nov;43(11):3373-82.

- Humphries MM, Rancourt D, Farrar GJ, Kenna P, Hazel M, Bush RA, Sieving PA, Sheils DM, McNally N, Creighton P, Erven A, Boros A, Gulya K, Capecchi MR, Humphries P. Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nat Genet.* 1997 Feb;15(2):216-9.
- Jacobson SG, Kemp CM, Cideciyan AV, Macke JP, Sung CH, Nathans J. Phenotypes of stop codon and splice site rhodopsin mutations causing retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994 Apr;35(5):2521-34.
- Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science.* 1994 Jun 10;264(5165):1604-8.
- Kajiwara K, Hahn LB, Mukai S, Travis GH, Berson EL, Dryja TP. Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature.* 1991 Dec 12;354(6353):480-3.
- Kalloniatis M, Fletcher EL. Retinitis pigmentosa: understanding the clinical presentation, mechanisms and treatment options. *Clin Exp Optom.* 2004 Mar;87(2):65-80.
- Kennan A, Aherne A, Palfi A, Humphries M, McKee A, Stitt A, Simpson DA, Demtroder K, Orntoft T, Ayuso C, Kenna PF, Farrar GJ, Humphries P. Identification of an IMPDH1 mutation in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP10) revealed following comparative *microarray* analysis of transcripts derived from retinas of wild-type and Rho (-/-) mice. *Hum Mol Genet.* 2002 Mar 1;11(5):547-57.
- Kim RY, al-Magthteh M, Fitzke FW, Arden GB, Jay M, Bhattacharya SS, Bird AC. Dominant retinitis pigmentosa associated with two rhodopsin gene mutations. Leu-40-Arg and an insertion disrupting the 5'-splice junction of exon 5. *Arch Ophthalmol.* 1993 Nov;111(11):1518-24.
- Kojis TL, Heinzmann C, Flodman P, Ngo JT, Sparkes RS, Spence MA, Bateman JB, Heckenlively JR. Map refinement of locus RP13 to human chromosome 17p13.3 in a second family with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet.* 1996 Feb;58(2):347-55.

- Kondo H, Tahira T, Mizota A, Adachi-Usami E, Oshima K, Hayashi K. Diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa by linkage-based exclusion screening with multiple locus-specific microsatellite markers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Mar;44(3):1275-81.
- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet.* 1992 Sep-Oct;90(1-2):41-54.
- Knudsen S. *Guide to analysis of DNA microarray data.* 2nd edition. Wiley-Liss, 2004.
- Liu HX, Cartegni L, Zhang MQ, Krainer AR. A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):55-8.
- Liu Q, Zhou J, Daiger SP, Farber DB, Heckenlively JR, Smith JE, Sullivan LS, Zuo J, Milam AH, Pierce EA. Identification and subcellular localization of the RP1 protein in human and mouse photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Jan;43(1):22-32.
- Liu Q, Zuo J, Pierce EA. The retinitis pigmentosa 1 protein is a photoreceptor microtubule-associated protein. *J Neurosci.* 2004 Jul 21;24(29):6427-36.
- Levine A, Durbin R. A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence. *Nucleic Acids Res.* 2001 Oct 1;29(19):4006-13.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. *Molecular Cell Biology.* 4th ed. New York: W. H. Freeman & Co.; c2000.
- Lossky M, Anderson GJ, Jackson SP, Beggs J. Identification of a yeast snRNP protein and detection of snRNP-snRNP interactions. *Cell.* 1987 Dec 24;51(6):1019-26.
- Lu SS, Zhao C, Cui Y, Li ND, Zhang XM, Zhao KX. [Novel splice-site mutation in the pre-mRNA splicing gene PRPF31 in a Chinese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa] *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2005 Apr;41(4):305-11.

- Lucke S, Klockner T, Palfi Z, Boshart M, Bindereif A. Trans mRNA splicing in trypanosomes: cloning and analysis of a PRP8-homologous gene from *Trypanosoma brucei* provides evidence for a U5-analogous RNP. *EMBO J*. 1997 Jul 16;16(14):4433-40.
- Luo HR, Moreau GA, Levin N, Moore MJ. The human Prp8 protein is a component of both U2- and U12-dependent spliceosomes. *RNA*. 1999 Jul;5(7):893-908.
- Mair G, Ullu E, Tschudi C. Cotranscriptional cap 4 formation on the *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA. *J Biol Chem*. 2000 Sep 15;275(37):28994-9.
- Maita H, Kitaura H, Ariga H, Iguchi-Arigo SM. Association of PAP-1 and Prp3p, the products of causative genes of dominant retinitis pigmentosa, in the tri-snRNP complex. *Exp Cell Res*. 2005 Jan 1;302(1):61-8.
- Makarova OV, Makarov EM, Liu S, Vornlocher HP, Luhrmann R. Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6*U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing. *EMBO J*. 2002 Mar 1;21(5):1148-57.
- Maniatis T, Reed R. The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature*. 1987 Feb 19-25;325(6106):673-8.
- Marmor MF, Holder GE, Porciatti V, Trick GL, Zrenner E. Guidelines for basic pattern electroretinography. Recommendations by the International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. *Doc Ophthalmol*. 1995-96;91(4):291-8.
- Maroney PA, Romfo CM, Nilsen TW. Functional recognition of 5' splice site by U4/U6.U5 tri-snRNP defines a novel ATP-dependent step in early spliceosome assembly. *Mol Cell*. 2000 Aug;6(2):317-28.
- Maroney PA, Yu YT, Jankowska M, Nilsen TW. Direct analysis of nematode cis- and trans-spliceosomes: a functional role for U5 snRNA in spliced leader addition trans-splicing and the identification of novel Sm snRNPs. *RNA*. 1996 Aug;2(8):735-45.
- Martinez-Gimeno M, Gamundi MJ, Hernan I, Maseras M, Milla E, Ayuso C, Garcia-Sandoval B, Beneyto M, Vilela C, Baiget M, Antinolo G, Carballo M.

- Mutations in the pre-mRNA splicing-factor genes PRPF3, PRPF8, and PRPF31 in Spanish families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 May;44(5):2171-7.
- Martinez-Gimeno M, Trujillo MJ, Lorda I, Gimenez A, Calvo MT, Ayuso C, Carballo M. Three novel mutations (P215L, T289P, and 3811-2 A-->G) in the rhodopsin gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa in Spanish families. *Hum Mutat.* 2000 Jul;16(1):95-6.
 - McGee TL, Devoto M, Ott J, Berson EL, Dryja TP. Evidence that the penetrance of mutations at the RP11 locus causing dominant retinitis pigmentosa is influenced by a gene linked to the homologous RP11 allele. *Am J Hum Genet.* 1997 Nov;61(5):1059-66.
 - McKie AB, McHale JC, Keen TJ, Tarttelin EE, Goliath R, van Lith-Verhoeven JJ, Greenberg J, Ramesar RS, Hoyng CB, Cremers FP, Mackey DA, Bhattacharya SS, Bird AC, Markham AF, Inglehearn CF. Mutations in the pre-mRNA splicing factor gene PRPC8 in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP13). *Hum Mol Genet.* 2001 Jul 15;10(15):1555-62.
 - McKie AB, McHale JC, Keen TJ, Tarttelin EE, Goliath R, van Lith-Verhoeven JJ, Greenberg J, Ramesar RS, Hoyng CB, Cremers FP, Mackey DA, Bhattacharya SS, Bird AC, Markham AF, Inglehearn CF. Mutations in the pre-mRNA splicing factor gene PRPC8 in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP13). *Hum Mol Genet.* 2001 Jul 15;10(15):1555-62.
 - Mears AJ, Kondo M, Swain PK, Takada Y, Bush RA, Saunders TL, Sieving PA, Swaroop A. Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet.* 2001 Dec;29(4):447-52.
 - Millan JM, Najera C, Beneyto M. [Molecular genetics of pigmentary retinopathy] *Med Clin (Barc).* 1994 Jan 15;102(1):30-2.
 - Nicoletti A, Wong DJ, Kawase K, Gibson LH, Yang-Feng TL, Richards JE, Thompson DA. Molecular characterization of the human gene encoding an abundant 61 kDa protein specific to the retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet.* 1995 Apr;4(4):641-9.

- Pagani F, Baralle FE. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet.* 2004 May;5(5):389-96.
- Pagani F, Buratti E, Stuani C, Bendix R, Dork T, Baralle FE. A new type of mutation causes a splicing defect in ATM. *Nat Genet.* 2002 Apr;30(4):426-9.
- Patel AA, McCarthy M, Steitz JA. The splicing of U12-type introns can be a rate-limiting step in gene expression. *EMBO J.* 2002 Jul 15;21(14):3804-15.
- Phelan JK, Bok D. A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Mol Vis.* 2000 Jul 8;6:116-24.
- Pierce EA, Quinn T, Meehan T, McGee TL, Berson EL, Dryja TP. Mutations in a gene encoding a new oxygen-regulated photoreceptor protein cause dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* 1999 Jul;22(3):248-54.
- Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell.* 2002 Feb 22;108(4):501-12.
- Pugh EN Jr, Nikonov S, Lamb TD. Molecular mechanisms of vertebrate photoreceptor light adaptation. *Curr Opin Neurobiol.* 1999 Aug;9(4):410-8.
- Rebello G, Ramesar R, Vorster A, Roberts L, Ehrenreich L, Oppon E, Gama D, Bardien S, Greenberg J, Bonapace G, Waheed A, Shah GN, Sly WS. Apoptosis-inducing signal sequence mutation in carbonic anhydrase IV identified in patients with the RP17 form of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 27;101(17):6617-22.
- Reig C, Alvarez AI, Tejada I, Molina M, Arostegui E, Martin R, Antich J, Carballo M. New mutation in the 3'-acceptor splice site of intron 4 in the rhodopsin gene associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa in a Basque family. *Hum Mutat.* 1996;8(1):93-4.
- Rivolta C, Sharon D, DeAngelis MM, Dryja TP. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum Mol Genet.* 2002 May 15;11(10):1219-27. Review. Erratum in: *Hum Mol Genet.* 2003 Mar 1;12(5):583-4.

- Rosenfeld PJ, Cowley GS, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP. A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* 1992 Jun;1(3):209-13.
- Rosenfeld PJ, Hahn LB, Sandberg MA, Dryja TP, Berson EL. Low incidence of retinitis pigmentosa among heterozygous carriers of a specific rhodopsin splice site mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995 Oct;36(11):2186-92.
- Ruby SW, Abelson J. Pre-mRNA splicing in yeast. *Trends Genet.* 1991 Mar;7(3):79-85.
- Ruiz A, Borrego S, Marcos I, Antiñolo G. Anatomía y fisiología de la retina. En: La retinosis pigmentaria en España: estudio clínico y genético. Editat per ONCE, coordinat per Diana Valverde. 2001.
- Sato H, Wada Y, Itabashi T, Nakamura M, Kawamura M, Tamai M. Mutations in the pre-mRNA splicing gene, PRPF31, in Japanese families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol.* 2005 Sep;140(3):537-40.
- Schaffert N, Hossbach M, Heintzmann R, Achsel T, Luhrmann R. RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies. *EMBO J.* 2004 Aug 4;23(15):3000-9.
- Schena M. *Microarray analysis.* Wiley-Liss, 2003.
- Slaugenhaupt SA, Blumenfeld A, Gill SP, Leyne M, Mull J, Cuajungco MP, Liebert CB, Chadwick B, Idelson M, Reznik L, Robbins C, Makalowska I, Brownstein M, Krappmann D, Scheidereit C, Maayan C, Axelrod FB, Gusella JF. Tissue-specific expression of a splicing mutation in the IKBKAP gene causes familial dysautonomia. *Am J Hum Genet.* 2001 Mar;68(3):598-605.
- Sohocki MM, Daiger SP, Bowne SJ, Rodriguez JA, Northrup H, Heckenlively JR, Birch DG, Mintz-Hittner H, Ruiz RS, Lewis RA, Saperstein DA, Sullivan LS. Prevalence of mutations causing retinitis pigmentosa and other inherited retinopathies. *Hum Mutat.* 2001;17(1):42-51.
- Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NS, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat.* 2003 Jun;21(6):577-81.

- Stevens SW, Abelson J. Purification of the yeast U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein particle and identification of its proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 22;96(13):7226-31.
- Stevens SW, Barta I, Ge HY, Moore RE, Young MK, Lee TD, Abelson J. Biochemical and genetic analyses of the U5, U6, and U4/U6 x U5 small nuclear ribonucleoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. 2001 Nov;7(11):1543-53.
- Sullivan LS, Heckenlively JR, Bowne SJ, Zuo J, Hide WA, Gal A, Denton M, Inglehearn CF, Blanton SH, Daiger SP. Mutations in a novel retina-specific gene cause autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet*. 1999 Jul;22(3):255-9.
- Tarn WY, Steitz JA. Pre-mRNA splicing: the discovery of a new spliceosome doubles the challenge. *Trends Biochem Sci*. 1997 Apr;22(4):132-7.
- Tarttelin EE, Plant C, Weissenbach J, Bird AC, Bhattacharya SS, Inglehearn CF. A new family linked to the RP13 locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on distal 17p. *J Med Genet*. 1996 Jun;33(6):518-20.
- Teigelkamp S, Mundt C, Achsel T, Will CL, Luhrmann R. The human U5 snRNP-specific 100-kD protein is an RS domain-containing, putative RNA helicase with significant homology to the yeast splicing factor Prp28p. *RNA*. 1997 Nov;3(11):1313-26.
- Teigelkamp S, Newman AJ, Beggs JD. Extensive interactions of PRP8 protein with the 5' and 3' splice sites during splicing suggest a role in stabilization of exon alignment by U5 snRNA. *EMBO J*. 1995 Jun 1;14(11):2602-12.
- Teigelkamp S, Whittaker E, Beggs JD. Interaction of the yeast splicing factor PRP8 with substrate RNA during both steps of splicing. *Nucleic Acids Res*. 1995 Feb 11;23(3):320-6.
- van Lith-Verhoeven JJ, van der Velde-Visser SD, Sohocki MM, Deutman AF, Brink HM, Cremers FP, Hoyng CB. Clinical characterization, linkage analysis, and PRPC8 mutation analysis of a family with autosomal dominant retinitis pigmentosa type 13 (RP13). *Ophthalmic Genet*. 2002 Mar;23(1):1-12.

- Vidal VP, Verdone L, Mayes AE, Beggs JD. Characterization of U6 snRNA-protein interactions. *RNA*. 1999 Nov;5(11):1470-81.
- Vithana EN, Abu-Safieh L, Allen MJ, Carey A, Papaioannou M, Chakarova C, Al-Maghteh, Ebenezer ND, Willis C, Moore AT, Bird AC, Hunt DM, Bhattacharya SS. A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Mol Cell*. 2001 Aug;8(2):375-81.
- Vithana EN, Abu-Safieh L, Allen MJ, Carey A, Papaioannou M, Chakarova C, Al-Maghteh M, Ebenezer ND, Willis C, Moore AT, Bird AC, Hunt DM, Bhattacharya SS. A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Mol Cell*. 2001 Aug;8(2):375-81.
- Vithana EN, Abu-Safieh L, Pelosini L, Winchester E, Hornan D, Bird AC, Hunt DM, Bustin SA, Bhattacharya SS. Expression of PRPF31 mRNA in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a molecular clue for incomplete penetrance? *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Oct;44(10):4204-9.
- Wada Y, Abe T, Takeshita T, Sato H, Yanashima K, Tamai M. Mutation of human retinal fascin gene (FSCN2) causes autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Sep;42(10):2395-400.
- Wada Y, Itabashi T, Sato H, Tamai M. Clinical features of a Japanese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa associated with a Thr494Met mutation in the HPRP3 gene. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2004 Nov;42(11):956-61. Epub 2004 Apr 15.
- Wang A, Forman-Kay J, Luo Y, Luo M, Chow YH, Plumb J, Friesen JD, Tsui LC, Heng HH, Woolford JL Jr, Hu J. Identification and characterization of human genes encoding Hprp3p and Hprp4p, interacting components of the spliceosome. *Hum Mol Genet*. 1997 Nov;6(12):2117-26.
- Wang L, Ribaldo M, Zhao K, Yu N, Chen Q, Sun Q, Wang L, Wang Q. Novel deletion in the pre-mRNA splicing gene PRPF31 causes autosomal dominant retinitis pigmentosa in a large Chinese family. *Am J Med Genet A*. 2003 Sep 1;121(3):235-9.

- Weidenhammer EM, Singh M, Ruiz-Noriega M, Woolford JL Jr. The PRP31 gene encodes a novel protein required for pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 1996 Mar 15;24(6):1164-70.
- Welch EM, Jacobson A. An internal open reading frame triggers nonsense-mediated decay of the yeast SPT10 mRNA. *EMBO J.* 1999 Nov 1;18(21):6134-45.
- Whitehead JL, Bell C, Converse CA, Hammer HM, Haites NE. Rhodopsin splice site sequence changes in retinitis pigmentosa and their effect at the mRNA level. *Hum Mutat.* 1998;Suppl 1:S295-7.
- Wu Q, Krainer AR. AT-AC pre-mRNA splicing mechanisms and conservation of minor introns in voltage-gated ion channel genes. *Mol Cell Biol.* 1999 May;19(5):3225-36.
- Wyatt JR, Sontheimer EJ, Steitz JA. Site-specific cross-linking of mammalian U5 snRNP to the 5' splice site before the first step of pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* 1992 Dec;6(12B):2542-53.
- Xia K, Zheng D, Pan Q, Liu Z, Xi X, Hu Z, Deng H, Liu X, Jiang D, Deng H, Xia J. A novel PRPF31 splice-site mutation in a Chinese family with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Vis.* 2004 May 20;10:361-5.
- Xu SY, Schwartz M, Rosenberg T, Gal A. A ninth locus (RP18) for autosomal dominant retinitis pigmentosa maps in the pericentromeric region of chromosome 1. *Hum Mol Genet.* 1996 Aug;5(8):1193-7.
- Yuan L, Kawada M, Havlioglu N, Tang H, Wu JY. Mutations in PRPF31 inhibit pre-mRNA splicing of rhodopsin gene and cause apoptosis of retinal cells. *J Neurosci.* 2005 Jan 19;25(3):748-57.
- Zhou Z, Sim J, Griffith J, Reed R. Purification and electron microscopic visualization of functional human spliceosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 17;99(19):12203-7.

Bases de Dades i Recursos Web utilitzats

- Blast 2 Sequences: <http://genopole.toulouse.inra.fr/blast/wblast2.html>
- Cell and Molecular Biology Online: <http://www.cellbio.com/protocols.html>
- DN MAD (Diagnosis and Normalization of *Microarray* Data): <http://dnmad.bioinfo.cnio.es/>
- Ensembl Genome Browser: <http://www.ensembl.org/index.html>
- ESE Finder: <http://exon.cshl.org/ESE>,
- ESEfinder Release 2.0: <http://exon.cshl.org/ESE>
- European Collection of Cell Cultures: <http://www.ecacc.org.uk/>
- ExPASy Proteomics Server: <http://www.expasy.org/>
- Free Online Full-text Articles: <http://highwire.stanford.edu/lists/freeart.dtl>
- Galeria d'imatges, University of Miami: <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene>
- GeneCards: <http://www.genecards.org/index.shtml>
- Geneid 1.2 Web Server 2005: <http://www1.imim.es/geneid.html>
- Genetics Home Reference: <http://ghr.nlm.nih.gov/ghr/glossary>
- GENSCAN Web Server: <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>
- Glosario de Términos Genéticos: <http://www.genome.gov/sglossary.cfm>
- Human Gene Mutation Database: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>
- LabOnline: <http://www.labonline.com.au/science/admin/glossary.asp?fn=display&keyword=T>
- Manual DGGE: http://humgen.wustl.edu/hdk_lab_manual/dgge/dgge1.html
- NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

-
- NetGene2 Server: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2>
 - Online Mendelian Inheritance in Man: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
 - PANTHER Classification System: <http://www.pantherdb.org/>
 - Protocol Online: <http://www.protocol-online.org/>
 - Retina International: <http://www.retina-international.org/>
 - Retinosis.org: http://retinosis.org/vision_27/index.htm
 - RetNet: <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>
 - Splice Site Prediction by Neural Network: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
 - The GDB Human Genome Database: <http://www.gdb.org/>
 - The SNP Consortium Ltd: <http://snp.cshl.org/>
 - W.U.S.M. Neuroscience Tutorial: <http://thalamus.wustl.edu/course/eyeret.html>
 - Web de la xarxa EsRetNet: <http://esretnet.org/#>
 - Webvision: <http://webvision.med.utah.edu/>

PUBLICACIONES

8. PUBLICACIONS

Durant el període d'elaboració d'aquesta Tesi Doctoral, part del treball realitzat ha estat objecte de publicacions en revistes especialitzades en el camp de les retinopaties. A continuació es mostra un recull, per ordre cronològic, d'aquestes publicacions, junt amb altres publicacions realitzades en col·laboració amb altres grups de recerca independents del grup d'investigació de les retinopaties hereditàries.

Articles de revista

- Millá E, Maseras M, Martínez-Gimeno M, Gamundi MJ, Assaf H, Esmerado C, Carballo M; Grupo Multicéntrico Español de Retinosis Pigmentaria. [Genetic and molecular characterization of 148 patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP)] *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2002 Sep;77(9):481-4.
- Martínez-Gimeno M, Gamundi MJ, Hernan I, Maseras M, Millá E, Ayuso C, García-Sandoval B, Beneyto M, Vilela C, Baiget M, Antiñolo G, Carballo M. Mutations in the pre-mRNA splicing-factor genes PRPF3, PRPF8, and PRPF31 in Spanish families with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 May; 44(5):2171-7.
- Hernan I, Roig I, Martín B, Gamundi MJ, Martínez-Gimeno M, Carballo M. De novo germline mutation in the serine-threonine kinase STK11/LKB1 gene associated with Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Genet*. 2004 Jul; 66(1):58-62.
- Carballo M, Roig I, Aguilar F, Pol MA, Gamundi MJ, Hernan I, Martinez-Gimeno M. Novel c-KIT germline mutation in a family with gastrointestinal stromal tumors and cutaneous hyperpigmentation. *Am J Med Genet A*. 2005 Feb 1;132(4):361-4.
- Gamundi MJ, Hernan I, Maseras M, Baiget M, Ayuso C, Borrego S, Antinolo G, Millan JM, Valverde D, Carballo M. Sequence variations in the retinal fascic FSCN2 gene in a Spanish population with autosomal dominant retinitis pigmentosa or macular degeneration. *Mol Vis*. 2005 Nov 2;11:922-8.

- Gamundi MJ, Hernan I, Martínez-Gimeno M, Maseras M, García-Sandoval B, Ayuso C, Antiñolo G, Baiget M, Carballo M. Three novel and the common Arg677Ter RP1 protein truncating mutations causing autosomal dominant retinitis pigmentosa in a Spanish population. *BMC Med Genet.* 2006 Apr 5;7(1):35

Contribucions a monografies

- Hernan I, Gamundi MJ, Carballo M. Aspectos genéticos y aplicación de *microarrays* al estudio de las reacciones alérgicas a fármacos, en M. Blanca, E. Buendía, G. Canto (eds.) *Reacciones Alérgicas a fármacos. Avances y nuevas perspectivas. II Reunión Internacional.* Madrid: Ramírez de Arellano, S.L., 2005, p.197-231.