



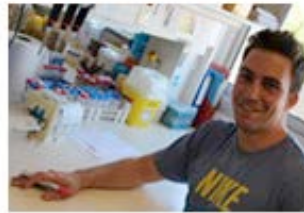
Fundació
La Marató de TV3
XVI SIMPOSIUM
Enfermedades minoritarias

Papel funcional de factores de empalme en la retinitis pigmentosa autosómica dominante (RP-ad): descifrado de los nuevos mecanismos moleculares en *Caenorhabditis elegans* para explorar nuevas terapias

Dr. Julián Cerón Madrigal

Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge





1. Resumen del proyecto

La retinosis pigmentaria es una ceguera progresiva relativamente frecuente dentro de las enfermedades raras, ya que afecta a 1/4.000 habitantes. Por tanto, en el mundo existen aproximadamente un millón y medio de personas con retinosis pigmentaria. Las personas afectadas nacen con mutaciones en ciertos genes que les predisponen para la enfermedad y que provocan una “visión en túnel” que, dependiendo de los individuos, puede terminar en ceguera completa. Por tanto, es una enfermedad hereditaria que puede transmitirse de diferentes modos. De los 50 genes que se han asociado a retinosis pigmentaria, nosotros hemos investigado seis que se transmiten de padres a hijos de forma dominante (la mutación de una de las dos copias de un gen es suficiente para provocar la enfermedad).

Los seis genes que hemos estudiado causantes de la enfermedad, al estar mutados en una de sus copias, son PRPF3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31 y SNRNP200. Estos seis genes tienen en común que codifican para proteínas que intervienen en un mecanismo celular denominado *splicing*. Mediante el mecanismo de *splicing*, el RNA mensajero derivado de un gen es procesado para su uso para producir la proteína correspondiente. El segundo aspecto en común de estos seis genes es que están muy bien conservados durante la evolución, de modo que son muy similares los de humanos y los de gusanos *Caenorhabditis elegans*, y además realizan las mismas funciones en las células de las dos especies.

A pesar de la publicación de más de nueve mil trabajos científicos sobre retinosis pigmentaria, aún no existe tratamiento eficiente contra la ceguera que provoca. Esta ausencia de terapias efectivas puede deberse a que los genes implicados en esta enfermedad son muy diversos. Por tanto, una medicina personalizada para cada paciente dependiendo de las mutaciones que presente, podría ser la estrategia a seguir. Nuestro grupo se ha centrado en investigar seis genes con la misma función en la célula, y que por ello podrían requerir una terapia similar. Para ello, hemos utilizado el organismo modelo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*),

un gusano de un milímetro de longitud, que es comúnmente utilizado para investigaciones biomédicas en todo el mundo. Descubrimientos realizados en este gusano han producido tres Premios Nobel en los últimos años, dos de ellos en medicina y fisiología.

Una paradoja del subtipo de retinosis pigmentaria que hemos investigado es que las mutaciones causantes de la enfermedad existen en genes que sabemos que se expresan en todas las células del organismo. Sin embargo, a pesar de esta actividad génica global, esas mutaciones solo causan enfermedad en la retina, no afectando a otros órganos del cuerpo.

Con estos antecedentes nos planteamos las siguientes preguntas:

- ¿Es posible crear un modelo de retinosis pigmentaria en *C. elegans*, un organismo muy eficiente y exitoso en investigación biomédica?
- ¿Cuál es el mecanismo por el que mutaciones en estos seis genes de *splicing* provocan una enfermedad exclusivamente en la retina?
- ¿Puede el conocimiento del mecanismo de la enfermedad, orientar y dinamizar el hallazgo de terapias eficientes para pacientes con este subtipo de retinosis pigmentaria?

2. Resultados

Un método clásico para conocer la función de los genes es inactivarlos y analizar las consecuencias. En este sentido, *C. elegans* posee la particularidad de permitir inactivar los genes de un modo flexible y eficiente mediante la técnica del RNA de interferencia por el alimento. En resumen: podemos inactivar la función del gen de nuestro interés en distintos grados regulando el alimento (clon bacteriano que produce RNA de doble cadena específico para cada gen) en una población de gusanos. Nuestro grupo ha creado y validado herramientas para la inactivación parcial de estos seis genes en *C. elegans*. De esta forma hemos modelado la falta

parcial de función que se produce en pacientes de retinosis pigmentaria como consecuencia de mutaciones.

Además de describir las consecuencias de la inactivación de estos genes en *C. elegans*, hemos estudiado los transcriptomas (*RNA-sequencing*) de poblaciones de animales con una falta de función parcial para cada uno de estos seis genes. Como resultado más relevante, hemos observado que al inactivar estos genes de *splicing* la célula responde expresando altos niveles de dos genes muy conservados entre gusanos y humanos. Estos genes son *atl-1*, homólogo del humano ATL que interviene en la respuesta al daño y al estrés replicativo en el DNA, y *egl-1*, homólogo de genes humanos activadores de la apoptosis.

Paralelamente hemos descubierto que uno de las seis proteínas de *splicing* implicadas en la enfermedad, PRP-8, interacciona funcionalmente con otra proteína, RSR-2, que interviene en el acoplamiento del *splicing* y la transcripción (FONTRODONA *et al.*, *Plos Genetics* 2013).

Así, en resumen, establecemos tres vías, dos novedosas, por las que se puede afectar la viabilidad de las células de la retina cuando se inactivan estos seis genes de *splicing*: (1) el propio *splicing* o procesamiento del RNA mensajero, (2) la eficiencia de la actividad transcripcional, y (3) la activación de ATL por estrés replicativo y la consecuente inducción de apoptosis (figura 1).

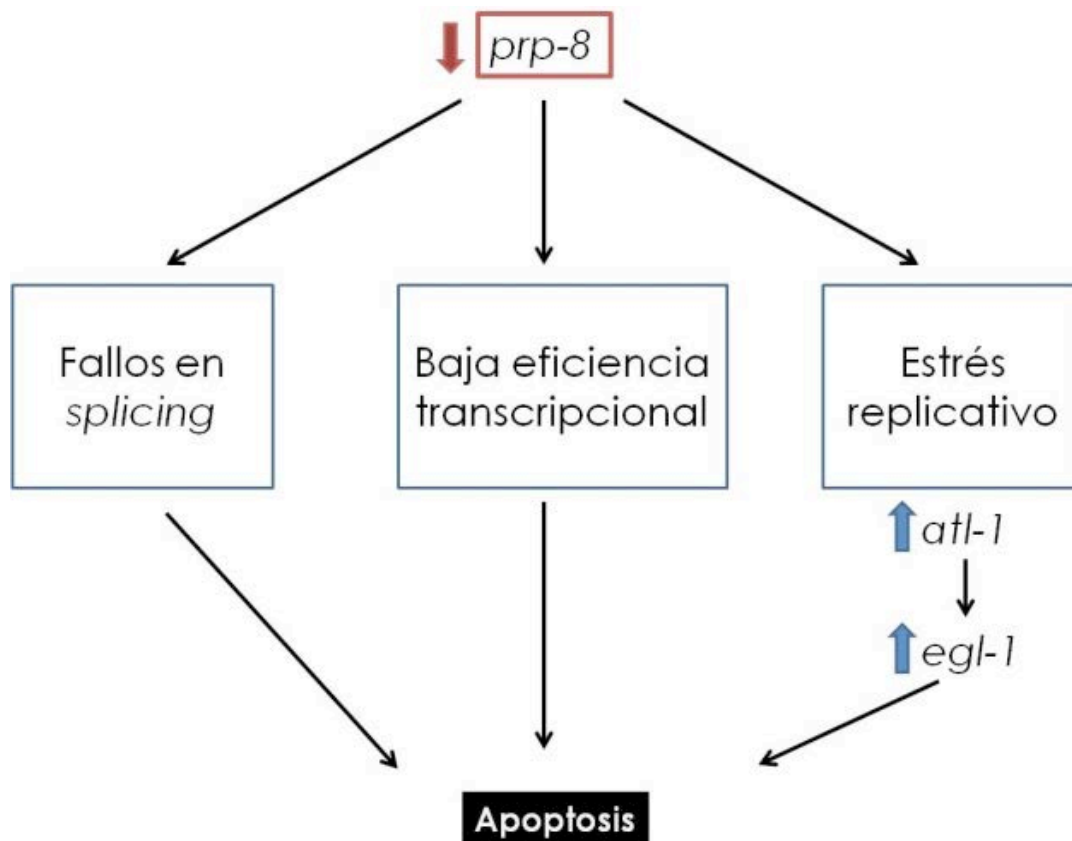


Figura 1

Los detalles moleculares de cómo una pérdida parcial de la función de estos seis genes puede provocar apoptosis serían muy extensos para este resumen, pero podemos indicar que en nuestro modelo la apoptosis estaría provocada por el *splicing* cotranscripcional y por la formación de *R-loops* en las horquillas de replicación del DNA solo en células con una altísima actividad transcripcional.

3. Relevancia y posibles implicaciones

El descubrimiento de la inducción del activador de apoptosis *egl-1* tras la inactivación parcial de estos seis genes en *C. elegans* fue algo relevante, ya que las células de la retina de pacientes con retinosis pigmentaria también mueren por el mecanismo de apoptosis. Además, observamos que esa apoptosis ocurría principalmente en células de la hipodermis del gusano; de igual modo que en humanos solo las células de la retina están afectadas, en el gusano se degrada un tipo celular concreto.

Resulta muy interesante que exista una clara semejanza entre las células de la retina humana y las células de la hipodermis del gusano: ambos tipos celulares son células con una mayor actividad transcripcional en los respectivos organismos. Por ello proponemos un modelo muy atractivo para el estudio de retinosis pigmentaria, que seguramente será explotado por otros grupos de investigación y por nosotros mismos en un futuro próximo.

Por otro lado, la activación de la expresión de *atl-1* implica que hemos identificado una nueva vía responsable de la apoptosis y, por tanto, si somos capaces de inhibirla farmacológicamente podríamos aumentar la supervivencia de las células de la retina y así retrasar o evitar la ceguera progresiva.

CRISPR y medicina personalizada

La reciente técnica de CRISPR/Cas9 permite editar los genomas de células y organismos modelo con una flexibilidad y eficiencia sin precedentes. En la actualidad nuestro grupo ya ha usado esta técnica en otros proyectos para introducir mutaciones puntuales o pequeñas deleciones/inserciones “a la carta”. En este escenario, la fusión del CRISPR/Cas9 con nuestro modelo de retinosis pigmentaria en *C. elegans* nos permitirá introducir en el genoma del gusano mutaciones de los pacientes, de forma que cada persona detectada con una mutación en estos genes de *splicing* podría tener un “tubo de ensayo multicelular personalizado” en el laboratorio sobre el cual testar posibles terapias.

4. Bibliografía científica generada

Artículos

Laura Fontrodona, David Aristizábal-Corrales, Karinna Rubio, Montserrat Porta-de-la-Riva, Silvia Torres, Francisco Javier García, Eric Cornes, Julián Cerón

Modeling of autosomal dominant Retinitis Pigmentosa in Caenorhabditis elegans uncovers a nexus between impaired function of splicing factors and apoptosis.

RNA journal (artículo en segunda revisión)

Laura Fontrodona; Montserrat Porta de-la-Riva; Tomás Morán; Wei Niu; Mònica Díaz; David Aristizábal Corrales; Alberto Villanueva; Simó Schwartz; Valerie Reinke; Julián Cerón.

RSR-2, the Caenorhabditis elegans Ortholog of Human Spliceosomal Component SRm300/SRRM2, Regulates Development by Influencing the Transcriptional Machinery.

PLoS Genetics. 9 - 6, p. e1003543. 06/2013. ISSN 1553-7404

Trabajos experimentales de máster

Karinna Rubio Peña.

Modelando la retinopatía humana Retinosis pigmentaria autosómica dominante en C. elegans.

Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Màster de Genètica Avançada. Fecha de lectura: 19/07/2013

Silvia Torres Manjón.

Desenvolupament del model de Retinosis pigmentaria en C. elegans.

Universitat: Universitat de Barcelona (UB). Màster en Biomedicina. Fecha de lectura: 18/07/2014