

Universitat Autònoma de Barcelona  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

**TESI DOCTORAL**

**Mutacions que modifiquen l'expressió gènica associades  
a Retinosi Pigmentària Autosòmica Dominant.  
Aproximació terapèutica mitjançant la interferència  
del mRNA**

**Imma Hernan Sendra**

Laboratori de Genètica i Biologia Molecular  
Servei d'Anàlisi Clíniques  
Hospital de Terrassa  
Juny de 2008

Imatge de la portada: Immunohistoquímica realitzada sobre un tall de retina parafinitzat. En blau es mostren els nuclis cel·lulars (marcats amb DAPI) i en vermell la proteïna Rodopsina (marcada amb anticòs primari anti-RHO + anticòs secundari conjugat a rodamina).

La present Tesi Doctoral, titulada “**Mutacions que modifiquen l’expressió gènica associades a Retinosi Pigmentària Autosòmica Dominant. Aproximació terapèutica mitjançant la interferència del mRNA**”, que presenta Imma Hernan Sendra per a obtenir el Grau de Doctora en Biologia, ha estat realitzada al Laboratori de Genètica i Biologia Molecular del Servei d’Anàlisis Clíniques de l’Hospital de Terrassa, sota la direcció del Dr. José Miguel Carballo Villarino i sota la tutoria de la Dra. María Carmen Martínez Gómez.

Dr. José Miguel Carballo Villarino  
Director de la Tesi Doctoral

Dra. María Carmen Martínez Gómez  
Tutora de la Tesi Doctoral

Imma Hernan Sendra  
Autora de la Tesi Doctoral

Terrassa, juny de 2008

## **AGRAÏMENTS**

He de donar les gràcies, en primer lloc, al Dr. Miguel Carballo, per haver-me donat l'oportunitat d'entrar en el món de la investigació científica i poder conèixer més a fons la genètica humana i, sobretot, per haver confiat en mi des del primer dia.

Com no, he de mencionar especialment a les meves companyes del Laboratori de Genètica i Biologia Molecular, amb qui he compartit tantes hores:

A la María, perquè des del primer dia es va convertir en una gran amiga, dins i fora del Laboratori (viva San Fermín!).

A la Marta, la Gemma i l'Ester, perquè cada una, a la seva manera, ha aportat aire fresc al Laboratori i ha deixat moments i anècdotes inolvidables.

A la Ma. José, perquè durant aquests anys hem compartit de tot al Laboratori: material, mètodes, discussions i sobretot bons resultats! I perquè més enllà de la feina hem compartit infinitat de moments carregats de complicitat i de bon rotllo. Sóm un bon tàndem!

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

A la Dra. Carmen Gimeno, Cap del Servei d'Anàlisis Clíniques de l'Hospital de Terrassa, per haver-me donat l'oportunitat de realitzar aquest treball al laboratori.

Al Dr. Miquel Maseras, com a Cap de Servei, i a la resta de membres del Servei d'Oftalmologia de l'Hospital de Terrassa, per la seva cooperació en l'examen i diagnòstic clínic 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.

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 Dra. María Carmen Martínez, com a tutora de la Tesi, per haver-me donat suport en tot moment durant la realització d'aquest treball.

A tots els joves investigadors que formen part de la xarxa EsRetNet i amb qui he compartit estones de laboratori, assistències a congressos i moltes rialles. Perquè a Barcelona, Madrid i València, encara que no hi hagi un contacte continuat, sé que hi ha més que simples companys de professió!

Als meus companys de Biologia, amb qui puc compartir xerrades de ciència o estones de diversió. Sobretot al Ferran, l'Olga i l'Oriol, perquè sempre hi són quan se'ls necessita. Les paraules sobren, sou genials!

A tots aquells amics que, encara que no entenguin massa bé tot això de la genètica, han mostrat interès per al desenvolupament de la Tesi i han sabut donar-me ànims en moments complicats.

A la meva família. Als meus pares, per haver-me recolzat sempre i fer un gran esforç perquè pogués arribar on estic avui. Perquè sense el seu ànim i la seva confiança potser avui no estaria escrivint aquestes línies.

A la Laura, pel seu suport incondicional a l'hora de realitzar aquesta Tesi i per estar sempre al meu costat, a les bones i no tan bones. Perquè només ella ha viscut el millor i el pitjor de tot plegat. T'estimo germaneta!

## ABREVIATURES

A	Adenina
aa	Aminoàcid
AV	Agudesa visual
C	Citosina
cDNA	DNA complementari
CV	Camp visual
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
DNasa	Desoxiribonucleasa
dNTP	Deoxinucleòsid trifosfat
DO	Densitat òptica
dsRNA	RNA de doble cadena
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
FBS	<i>Foetal Bovine Serum</i> (Sèrum boví fetal)
FCS	<i>Foetal Calf Serum</i> (Sèrum de vedella fetal)
FITC	Fluoresceïna
g	Acceleració gravitatòria
G	Guanina
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosina-5'-trifosfat
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
LB	<i>Lysogeny broth</i>
M	Molar (mols/litre)
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
mRNA	RNA missatger
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

nm	Nanòmetre (longitud d'ona)
OligodT	Oligonucleòtid de T
o/v	<i>Over night</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
PSA	Persulfat amònic
q.s.p	Quantitat suficient per
r.p.m.	Revolucions per minut
RNA	Àcid ribonucleic
RNAi	RNA d'interferència
RNasa	Ribonucleasa
RP	Retinosi Pigmentària
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-PCR</i> (Transcripció inversa-PCR)
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
snRNA	<i>Small nuclear ribonucleic acid</i>
snRNP	<i>Small nuclear ribonucleoprotein</i>
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
T	Timina
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametilendiamina
UTR	<i>Untranslated region</i>
U	Unitats ó uracil (depenent del context)
UV	Ultraviolat
WT	<i>Wild-type</i>

## ÍNDIX DE FIGURES

<b>Figura 1.</b> Esquema de l'ull i detall de les diferents capes neuronals que formen la retina.....	24
<b>Figura 2.</b> Visió d'un individu sa i visió d'un pacient afectat de RP .....	27
<b>Figura 3.</b> Fons d'ull d'un individu sa i d'un pacient afectat de RP.....	27
<b>Figura 4.</b> Expressió dels diferents gens associats a RPAD.....	33
<b>Figura 5.</b> Estructura de la proteïna rodopsina.....	35
<b>Figura 6.</b> Promotor de la rodopsina i factors que hi interactuen. ....	38
<b>Figura 7.</b> Seqüències consens implicades en el procés de <i>splicing</i> .....	42
<b>Figura 8.</b> Interacció entre les snRNPs U1 i U2 i les seqüències consens del pre-mRNA.....	43
<b>Figura 9.</b> Ensamblatge del <i>spliceosoma</i> i catàlisi. ....	44
<b>Figura 10.</b> Mecanisme de <i>splicing</i> no canònic.....	45
<b>Figura 11.</b> Paper dels factors de <i>splicing</i> associats a RPAD en l'ensamblatge del <i>spliceosoma</i> .....	49
<b>Figura 12.</b> Mecanismes de silenciament post-transcripcional en eucariotes.....	52
<b>Figura 13.</b> Mecanismes d'actuació dels oligonucleòtids antisentit.....	53
<b>Figura 14.</b> Tipus de ribozims.....	54
<b>Figura 15.</b> Estructura secundària d'un ribozim <i>hammerhead</i> unit al seu substrat.....	56
<b>Figura 16.</b> Passos que es donen per a la formació i funcionament del complex siRISC.....	58
<b>Figura 17.</b> Model per a la funció del miRISC humà. ....	61
<b>Figura 18.</b> Tècnica "overlap extension PCR".....	75
<b>Figura 19.</b> Vector pCI-neo.....	80
<b>Figura 20.</b> Vector pEGFP-C1.....	81



<b>Figura 21.</b> Vector pDONR201.....	83
<b>Figura 22.</b> Vectors pDEST-501 i pDEST-733. ....	84
<b>Figura 23.</b> Vector psiRNA-hH1GFPzeo. ....	90
<b>Figura 24.</b> Lectura simple de l'activitat luciferasa. ....	111
<b>Figura 25.</b> Estudi genètic de la família ADRP 645 amb mutació en el gen NRL. ....	123
<b>Figura 26.</b> Estudi genètic de la família ADRP 373 amb mutació en el gen PRPF3.....	124
<b>Figura 27.</b> Diagrama dels minigens de rodopsina construïts per a l'expressió en línies cel·lulars eucariotes.....	126
<b>Figura 28.</b> Interferència dels productes de <i>splicing</i> dels minigens RHOSPL2-4. ....	129
<b>Figura 29.</b> Productes de <i>splicing</i> dels minigens RHOSPL-2-4. ....	130
<b>Figura 30.</b> Interferència dels productes de <i>splicing</i> dels minigens RHOSPL3-5. ....	133
<b>Figura 31.</b> Productes de <i>splicing</i> dels minigens RHOSPL3-5.....	133
<b>Figura 32.</b> Diagrama dels genòmics de rodopsina construïts per a l'expressió en línies cel·lulars eucariotes.....	135
<b>Figura 33.</b> Productes de <i>splicing</i> dels genòmics de rodopsina.....	136
<b>Figura 34.</b> Interferència dels productes de <i>splicing</i> dels genòmics RHO-A3811G i RHO-WT.....	141
<b>Figura 35.</b> Productes de <i>splicing</i> dels genòmics RHO-WT i RHO-A3811G.....	142
<b>Figura 36.</b> Interferència dels productes de <i>splicing</i> dels genòmics RHO-G5167T i RHO-WT. ....	143
<b>Figura 37.</b> Productes de <i>splicing</i> dels genòmics RHO-WT i RHO-G5167T.....	144
<b>Figura 38.</b> <i>Western blot</i> de proteïna rodopsina.....	145
<b>Figura 39.</b> Immunocitoquímica sobre cèl·lules COS7 amb anticossos anti-RHO.....	148
<b>Figura 40.</b> Colocalització de les proteïnes rodopsina i giantina.....	151
<b>Figura 41.</b> Fragment de DNA de PRPF8. ....	154
<b>Figura 42.</b> Al·lels salvatge i mutat de PRPF8. ....	154

<b>Figura 43.</b> Percentatge d'interferència que realitza un shRNA i un ribozim sobre el mRNA salvatge de PRPF8. ....	155
<b>Figura 44.</b> Percentatge d'interferència que realitza un shRNA i un siRNA sobre el mRNA salvatge de PRPF8. ....	456
<b>Figura 45.</b> Expressió del mRNA PRPF8 mutat, en les línies limfocitàries CAR0001 i CAR0003.....	157
<b>Figura 46.</b> Electroforesi en gel d'acrilamida dels mRNAs salvatge i mutat de PRPF8.....	158
<b>Figura 47.</b> Detecció d'apoptosi cel·lular.....	159
<b>Figura 48.</b> Construccions pDEST-NRL i pDEST-CRX.....	161
<b>Figura 49.</b> Cèl·lules COS7 transfectades amb vectors pDEST control.....	161
<b>Figura 50.</b> Cèl·lules COS7 transfectades amb els vectors pDEST portadors dels cDNAs mutats de NRL.....	162
<b>Figura 51.</b> Activació del promotor de rodopsina amb els factors NRL mutats i CRX.....	164
<b>Figura 52.</b> Percentatge d'interferència que realitzen dos siRNAs sobre el mRNA salvatge de NRL.....	165
<b>Figura 53.</b> Percentatge d'interferència que realitza un siRNA i un shRNA sobre el mRNA de NRL salvatge.....	167
<b>Figura 54.</b> Seqüència diferencial entre els cDNAs de NRL salvatge i degenerat.....	168
<b>Figura 55.</b> Cèl·lules COS7 transfectades amb el vector pDEST portador del cDNA degenerat de NRL.....	170
<b>Figura 56.</b> Activació del promotor de rodopsina amb els factors NRL degenerat i CRX.....	171
<b>Figura 57.</b> Percentatge d'interferència que realitzen un siRNA i un shRNA sobre el mRNA de NRL degenerat.....	172

**Figura 58.** Esquema del producte de PCR obtingut amb els encebadors H1-  
shNRL.....173

## ÍNDIX DE TAULES

<b>Taula I.</b> Comparació dels dos tipus de fotoreceptors .....	24
<b>Taula II.</b> Gens associats a Retinosi Pigmentària Autosòmica Dominant. ....	31
<b>Taula III.</b> Criteris a tenir en compte per al disseny d'un siRNA funcional.....	63
<b>Taula IV.</b> Encebadors utilitzats per al clonatge del cDNA de NRL dins el vector pCI-neo.....	80
<b>Taula V.</b> Encebadors utilitzats per al clonatge del cDNA de rodopsina dins el vector pEGFP. ....	81
<b>Taula VI.</b> Encebadors utilitzats per a l'obtenció dels cDNAs de NRL i CRX flanquejats per cues attB .....	82
<b>Taula VII.</b> siRNAs, shRNAs i ribozims dissenyats al laboratori.....	88
<b>Taula VIII.</b> Programa de RT-PCR a temps real.....	105
<b>Taula IX.</b> Encebadors utilitzats per l'estudi de RNAi sobre els productes de <i>splicing</i> de RHO.....	106
<b>Taula X.</b> Encebadors utilitzats per l'estudi de RNAi sobre els trànscrips de NRL.....	107
<b>Taula XI.</b> Encebadors utilitzats per l'estudi de RNAi sobre els trànscrips de PRPF8.....	107
<b>Taula XII.</b> Gels d'acrilamida per a l'electroforesi de proteïnes.....	118
<b>Taula XIII.</b> siRNAs dissenyats per a interferir els productes de <i>splicing</i> del minigen RHOSPL-A3811G.....	128
<b>Taula XIV.</b> Percentatges d'interferència produïts pels siRNAs dissenyats contra els productes de <i>splicing</i> del minigen RHOSPL-A3811G.....	129
<b>Taula XV.</b> siRNA dissenyat per a interferir el producte de <i>splicing</i> del minigen RHOSPL-G5167T.....	132
<b>Taula XVI.</b> Percentatges d'interferència produïts pel siRNA dissenyat contra el producte de <i>splicing</i> del minigen RHOSPL-G5167T. ....	132

<b>Taula XVII.</b> Encebadors per a l'amplificació total de RHO. ....	136
<b>Taula XVIII.</b> siRNAs dissenyats per a interferir els productes de <i>splicing</i> dels genòmics de rodopsina.....	140
<b>Taula XIX.</b> Percentatges d'interferència produïts pels siRNAs dissenyats contra els productes de <i>splicing</i> del genòmic RHO-A3811G.....	141
<b>Taula XX.</b> Percentatges d'interferència produïts pel siRNA dissenyat contra el producte de <i>splicing</i> del genòmic RHO-G5167T. ....	143
<b>Taula XXI.</b> Immunocitoquímica per a la detecció de rodopsina. ....	147
<b>Taula XXII.</b> shRNA i ribozim dissenyats per a interferir el transcrit salvatge de PRPF8 humà. ....	153
<b>Taula XXIII.</b> siRNA dissenyat per a interferir el mRNA salvatge de PRPF8 humà.....	156
<b>Taula XXIV.</b> siRNAs dissenyats per a interferir el mRNA de NRL humà. ....	165
<b>Taula XXV.</b> shRNA dissenyat per a interferir el mRNA de NRL humà.....	166
<b>Taula XXVI.</b> Encebadors utilitzats per a l'obtenció d'un cDNA degenerat de NRL.....	168
<b>Taula XXVII.</b> Encebadors utilitzats per a l'amplificació del promotor H1 + shRNA NRL69. ....	173

## ÍNDEX

---



## ÍNDIX

<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	23
1.1. La retina i les cèl·lules fotoreceptores. ....	23
1.2. Distròfies hereditàries de la retina .....	25
1.3. La Retinosi Pigmentària.....	26
1.3.1. Retinosi Pigmentària sindròmica .....	28
1.3.2. Síntomes i evolució de la RP .....	28
1.3.3. Herència de la Retinosi Pigmentària.....	30
1.3.4. Genètica molecular de la RPAD .....	31
1.4. Pocessament ( <i>splicing</i> ) del pre-mRNA.....	42
1.4.1. El <i>splicing</i> alternatiu .....	46
1.4.2. Mutacions causants de RPAD relacionades amb el procés de <i>splicing</i> .....	47
1.5. Aproximació terapèutica: Interferència del mRNA.....	51
1.5.1. Oligonucleòtids antisentit .....	52
1.5.2. Ribozims .....	53
1.5.3. La via del RNAi .....	57
1.5.3.1. Mecanisme d'acció del RNAi .....	57
1.5.3.2. siRNA en cèl·lules mamíferes .....	61
1.5.3.3. Selecció d'un siRNA eficient .....	62
1.5.3.4. Silenciament genètic estable. shRNA <i>versus</i> siRNA .....	65
1.5.3.5. RNAi i Retinosi Pigmentària.....	66
<b>2. OBJECTIUS</b> .....	71
<b>3. MATERIAL I MÈTODES</b> .....	75
3.1. Mutagènesi del DNA mitjançant la tècnica d' <i>overlap extension PCR</i> .....	75
3.2. Clonatge d'un fragment de DNA dins un vector plasmídic .....	76



3.3. Sistema de vectors Gateway .....	81
3.3.1. Construcció de vectors Gateway .....	82
3.4. Disseny de Ribozims, siRNAs i shRNAs .....	85
3.4.1. Disseny i selecció de la seqüència del siRNA .....	86
3.4.2. Clonatge dels siRNAs dins vectors psiRNA.....	89
3.5. Cultiu de línies cel·lulars eucariotes .....	94
3.5.1. Caracterització de les línies cel·lulars utilitzades .....	94
3.5.2. Mètodes de transfecció utilitzats .....	97
3.6. Obtenció i anàlisi dels RNAs cel·lulars .....	102
3.6.1. Extracció del RNA cel·lular total.....	102
3.6.2. Tractament del RNA amb DNasa .....	103
3.6.3. Quantificació dels productes de RNA .....	104
3.7. Preparació d'extractes cel·lulars i mesura de l'activitat de luciferasa i $\beta$ -Galactosidasa.....	108
3.7.1. Obtenció d'extractes cel·lulars .....	108
3.7.2. Lectura de $\beta$ -Galactosidasa .....	109
3.7.3. Lectura de l'activitat luciferasa.....	111
3.8. Detecció d'apoptosi cel·lular .....	111
3.9. Immunocitoquímica.....	113
3.9.1. Tinció dels cultius cel·lulars amb DAPI .....	115
3.10. Extracció de proteïna total .....	116
3.11. <i>Western Blot</i> .....	117
<b>4. RESULTATS .....</b>	<b>123</b>
4.1. Anàlisi de mutacions en gens associats a RPAD .....	123
4.2. Productes de <i>splicing</i> obtinguts a partir dels minigens de rodopsina mutats. 124	
4.2.1. Productes de <i>splicing</i> obtinguts a partir dels minigens RHOSPL2-4 i interferència específica utilitzant siRNAs .....	126

4.2.2. Productes de <i>splicing</i> obtinguts a partir dels minigens RHOSPL3-5 i interferència específica utilitzant siRNAs .....	131
4.3. Productes de <i>splicing</i> obtinguts a partir dels genòmics de rodopsina mutats	134
4.3.1. Productes de <i>splicing</i> obtinguts a partir del genòmic RHO-A3811G i interferència específica utilitzant siRNAs .....	140
4.3.2. Productes de <i>splicing</i> obtinguts a partir del genòmic RHO-G-5167T i interferència específica utilitzant siRNAs .....	142
4.4. Caracterització de les proteïnes codificades pels productes de <i>splicing</i> obtinguts dels genòmics mutats de rodopsina.....	145
4.4.1. <i>Western Blot</i> de rodopsina.....	145
4.4.2. Localització cel·lular de les proteïnes mutants de Rhodopsina .....	146
4.5. Interferència del mRNA de PRPF8 .....	152
4.5.1. Efecte de la interferència del mRNA de PRPF8 .....	159
4.6. Localització cel·lular de les proteïnes NRL mutades .....	160
4.7. Estudi de l'activitat de les proteïnes NRL mutades .....	163
4.8. Disseny de siRNAs per a interferir el mRNA de NRL .....	164
4.9. Síntesi d'un cDNA degenerat de NRL .....	167
4.10. Localització cel·lular i funcionalitat de la proteïna NRL amb seqüència nucleotídica degenerada. ....	169
4.10.1. Localització cel·lular de la proteïna.....	169
4.10.2. Funcionalitat de la proteïna.....	170
4.11. Estudis d'interferència realitzats sobre el mRNA degenerat de NRL .....	171
4.11.1. Construcció d'un plàsmid portador del cDNA degenerat de NRL i del shNRL69, sota promotors independents.....	172
<b>5. DISCUSSIÓ</b> .....	177
<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	195
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	199

<b>8. PUBLICACIONS</b> .....	223
<b>9. ANNEX I</b> .....	229

## **1. INTRODUCCIÓ**

---



# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. La retina i les cèl·lules fotorreceptores.

En les malalties degeneratives de la retina, com és el cas de la Retinosi Pigmentària, de manera directa o indirecta, sol estar alterada l'estructura o funció de les cèl·lules fotorreceptores de la retina o bé hi ha anomalies en el procés de fototransducció que es dona en aquestes cèl·lules.

Així, per a l'estudi de les degeneracions retinianes, és de gran importància conèixer l'estructura de l'ull, la funció de la retina i el procés de la cascada visual. El coneixement global d'aquests conceptes ajuda a correlacionar la fisiologia de la malaltia amb l'origen molecular d'aquesta.

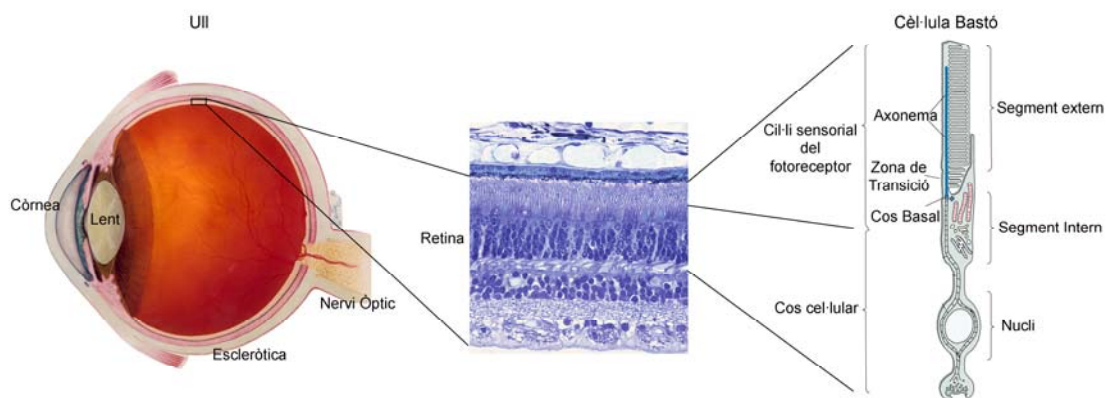
L'ull és una esfera plena de fluïd formada per diferents capes de teixit. La capa més interna, formada per la retina, és l'única que conté neurones sensibles a la llum i amb capacitat de transmetre senyals visuals a les dianes centrals. Abans d'arribar a la retina, la llum passa a través de la còrnia, les lents i dos espais fluids diferents (l'humor aquós i l'humor vitri).

La retina està formada per cinc tipus de neurones: fotorreceptors, cèl·lules bipolars, cèl·lules ganglionars, cèl·lules horitzontals i cèl·lules amacrines. La informació va dels fotorreceptors fins al nervi òptic, principalment a través de la via fotorreceptor - cèl·lula bipolar - cèl·lula ganglionar. Els axons de les cèl·lules ganglionars formen el nervi òptic i porten la informació procedent de l'estimulació retiniana cap al sistema nerviós central on els impulsos elèctrics són transformats en imatges.

Els fotorreceptors són les cèl·lules neuronals que hi ha a la retina i són els responsables de captar i convertir els senyals lluminosos en senyals nerviosos, que

seran transmesos cap al cervell a través del nervi òptic. En la retina humana existeixen dos tipus de fotoreceptors: els bastons i els cons.

Tots els fotoreceptors tenen una mateixa estructura bàsica (veure Figura 1). El segment extern del fotoreceptor conté discs plens d'opsina, la proteïna que absorbeix els fotons i està unida a un pigment anomenat retinal; junts formen la rodopsina.



**Figura 1. Esquema de l'ull i detall de les diferents capes neuronals que formen la retina** (part esquema i central de la figura). En una de les capes hi ha els fotoreceptors bastons i cons, ambdós amb una estructura molt definida (part dreta de la figura). [De :www.uphs.upenn.edu/].

**Taula I. Comparació dels dos tipus de fotoreceptors, bastons i cons, segons Kandel (Kandel et al., 2000).**

Bastons	Cons
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilitzats en la visió nocturna.</li> <li>- Molt sensibles a la llum.</li> <li>- La seva pèrdua provoca ceguesa nocturna.</li> <li>- Baixa agudesa visual.</li> <li>- Absents en la fòvea.</li> <li>- Baixa resposta a la llum.</li> <li>- Tenen més pigment que els cons, per tant poden detectar nivells de llum més baixos.</li> <li>- Els discs formen piles però no estan units a la membrana externa.</li> <li>- 120 milions de bastons a la retina</li> <li>- Un tipus de fotopigment</li> <li>- Permeten la visió en blanc i negre.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilitzats en la visió diürna.</li> <li>- Poc sensibles a la llum.</li> <li>- La seva pèrdua provoca ceguesa total.</li> <li>- Elevada agudesa visual, millor resolució espacial.</li> <li>- Concentrats en la fòvea.</li> <li>- Ràpida resposta a la llum, poden percebre canvis més ràpids en l'estímul.</li> <li>- Tenen menys pigment que els bastons, per tant necessiten més llum per detectar imatges.</li> <li>- Discs units a la membrana externa.</li> <li>- 6 milions de cons a la retina</li> <li>- En humans, tres tipus de fotopigment.</li> <li>- Confereixen la visió en color.</li> </ul>

Els fotoreceptors de l'ull són les úniques neurones humanes capaces de realitzar el procés de fototransducció, és a dir, capaces de convertir l'energia lluminosa d'un fotó en un canvi de potencial de membrana. Aquest canvi en la polarització de la membrana cel·lular dels fotoreceptors provoca la transmissió d'un senyal elèctric (a través de les unions sinàptiques) que travessa totes les capes de la retina i arriba al cervell a través del nervi òptic (Pugh et al., 1999; Kennan et al., 2005).

## **1.2. Distròfies hereditàries de la retina**

Les distròfies hereditàries de la retina són un conjunt de malalties degeneratives associades a una alteració funcional dels fotoreceptors. Aquestes malalties, a nivell mundial, tenen una incidència d'aproximadament 1/4000 individus i les característiques que les defineixen són el seu caràcter hereditari, la seva evolució progressiva i el no tenir, en l'actualitat, un tractament curatiu. L'evolució de la malaltia condueix a la pèrdua parcial o total de la visió (Rivolta et al., 2003).

L'origen molecular d'aquestes malalties és la presència de mutacions en el genoma del pacient que es presenten en gens relacionats amb l'estructura, desenvolupament i funció de la retina i que generalment s'expressen específicament en ella. Tanmateix, en els darrers anys s'ha descobert que mutacions en alguns gens amb expressió sistèmica (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.

Els mecanismes moleculars implicats en la patogènesi de les distrofies retinianes encara no estan ben definits.



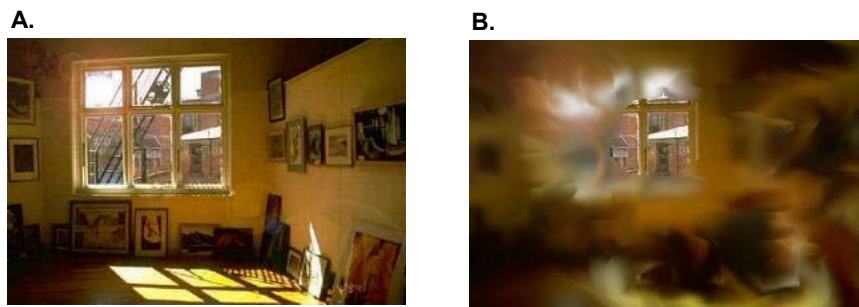
Tot i que les distròfies retinianes solen classificar-se segons els símptomes clínics, fenotip electroretinogràfic o patró hereditari (Phelan et al., 2000), de manera general es poden dividir en:

- Formes perifèriques, en les quals s'afecten inicialment i predominantment els bastons de la retina. La **Retinosi Pigmentària (RP)** n'és un exemple.
- Formes centrals, amb degeneració dels cons en el seu inici i , en alguns casos, afectació secundària dels bastons (distròfies de cons-bastons, CRD). Entre les distròfies de retina centrals es troben la malaltia de Stargardt (STGD), les distròfies maculars (MD) i les distròfies de cons (CD).

### 1.3. La Retinosi Pigmentària

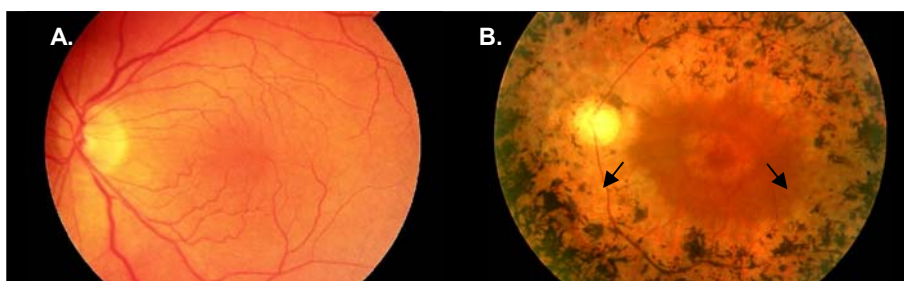
La Retinosi Pigmentària (RP) engloba un grup de malalties retinianes hereditàries que impliquen degeneració dels fotoreceptors cons i bastons i causen un defecte visual sever. A Espanya s'ha calculat que té una prevalença d'aproximadament 1/8000 individus (Nájera et al., 1995).

Un dels primers símptomes de la malaltia és la pèrdua de la visió nocturna. Els fotoreceptors bastons són els responsables de la visió en condicions de baixa intensitat lluminica per tant, una mutació genòmica que alteri la seva funcionalitat es tradueix clínicament en l'anomenada ceguesa nocturna. A més, donat que els bastons estan situats a la perifèria de la retina, és aquesta zona la que pateix primer la degeneració i provoca per tant una disminució de la visió perifèrica i la reducció del camp visual. Ambdós símptomes són característics de la Retinosi Pigmentària i desencadenen en el pacient l'anomenada "visió en túnel" (Hartong et al., 2006).



**Figura 2.** Visió d'un individu sa (A) i visió d'un pacient afectat de RP (B). En la figura B es pot apreciar la típica visió en túnel i la pèrdua de l'agudesia visual.

La mort dels bastons té un efecte secundari en els cons, els quals posteriorment comencen també a degenerar provocant la pèrdua de visió central. La mort d'ambdós tipus de fotorceptors provoca diferents símptomes patològics a la retina que inclouen l'atenuació dels vasos sanguinis de la retina i l'acumulació intra-retiniana de dipòsits de pigment, motiu pel qual la malaltia rep el seu nom (Hims et al., 2003; Kalloniatis et al., 2004).



**Figura 3.** Fons d'ull d'un individu sa (A) i d'un pacient afectat de RP (B). En la figura B s'observen els típics dipòsits de pigment en forma d'espícules (assenyalats amb fletxes) a la perifèria de l'ull.

Al 1983 es va arribar a un consens (Marmor et al., 1995-96) on es va suggerir que el diagnòstic de RP s'establiria quan fossin presents els següents signes:

- Disfunció dels bastons, mesurada mitjançant l'adaptació a la foscor o per l'electroretinograma (ERG).

- Pèrdua progressiva de la funció dels fotoreceptors.
- Pèrdua de visió perifèrica.
- Afectació bilateral.

### **1.3.1. Retinosi Pigmentària sindròmica**

La RP és una malaltia normalment lligada a un defecte en la visió, no obstant, alguns pacients tenen associada una o diverses alteracions patològiques no oculars. Les afectacions més comunes són la pèrdua d'oïda, afectacions neurològiques i defectes metabòlics. Parlem en aquests casos de RP sindròmica i n' existeixen més de 30 tipus diferents.

En aquestes síndromes, l'origen molecular és una mutació trobada en un gen que, a més d'expressar-se a retina, s'expressa també en altres òrgans.

Les síndromes més freqüents són la Síndrome d'Usher, on la Retinosi està associada a un defecte en l'oïda (Pennings et al., 2003) i la Síndrome de Bardet-Biedl, on la Retinosi, segons cada cas, pot estar associada a obesitat, defectes cognitius, polidactília, hipogenitalisme i malaltia renal (Beales et al., 1999).

### **1.3.2. Síntomes i evolució de la RP**

La Retinosi Pigmentària és una malaltia ben diagnosticada clínicament però fenotípicament molt variable. Alguns malalts comencen a perdre visió durant la infantesa mentre que d'altres són asimptomàtics fins que arriben a l'edat adulta. Molts pacients desenvolupen els trets característics: dificultat en adaptar-se a la foscor i ceguesa nocturna durant l'adolescència i posterior pèrdua del camp visual perifèric (visió en túnel) que augmenta amb l'edat fins que finalment, sobre els 60 anys habitualment, perden també la visió central.

Així, el curs de la malaltia es pot dividir en tres estadis:

- Estadi primari. El principal símptoma és la ceguesa nocturna. Pot aparèixer durant els primers anys de vida o durant la segona dècada o a vegades fins i tot més tard. En aquest estat els defectes en la visió perifèrica són mínims o inexistents en condicions normals de llum de manera que la malaltia pot no ser detectada. L'agudesia visual sol ser normal i també el fons d'ull (que no sol presentar dipòsits de pigment). Igualment són normals els exàmens del camp visual i la visió en color. L'ERG pot ser la prova clau per a detectar, en alguns casos, el problema visual ja que pot detectar una incipient deficiència funcional (alteració de la resposta elèctrica) dels fotoreceptors.
  
- Estadi mig. La ceguera nocturna és obvia. Els pacients presenten pèrdua del camp visual en condicions de llum, discromatòpsia als colors pàlids, fotofòbia i disminució de l'agudesia visual. El fons d'ull mostra dipòsits de pigment en la perifèria, un estretament evident dels vasos de la retina i un disc òptic moderadament pàlid. L'ERG gairebé en tots els casos està alterat.
  
- Estadi final. Pèrdua de la visió perifèrica i poca agudesia visual en la visió central. Fotofòbia intensa. El fons d'ull mostra dipòsits de pigment abundants que arriben a l'àrea macular, uns vasos sanguinis primis i un disc òptic molt pàlid. Hi ha una atròfia coreoretinal en la perifèria i en l'àrea foveomacular. L'ERG mostra alteracions clares o fins i tot abolicció de resposta per part dels cons i bastons.

L'edat d'aparició de la RP normalment fa referència a l'edat en què el pacient presenta símptomes visuals, que pot anar des de la infància fins a l'edat adulta. Degut però a la sorprenent variabilitat que hi ha entre els diferents individus a l'hora de percebre la pròpia pèrdua de visió, l'edat d'aparició dels símptomes és una mesura molt poc precisa en quan a la severitat de la malaltia i no sol ser per tant un bon indicador de quan realment ha començat la degeneració dels fotoreceptors. Els electroretinogrames i altres tests específics mostren que sovint la degeneració dels fotoreceptors ja existeix als 6 anys d'edat, inclús en pacients que són asimptomàtics fins passada l'adolescència. Exàmens clínics, especialment els que inclouen mesures quantitatives de la funció retiniana, són crucials per descriure acuradament el grau de visió de cada pacient i la velocitat de pèrdua d'aquesta. Aquesta informació és necessària per a poder fer un pronòstic sobre el futur visual de cada pacient. Així per exemple, no s'ha descrit cap cas de Retinosi Pigmentària típica en individus que a una edat superior a 6 anys presentaven ERG normals (Berson, 1993).

En general, la RP és una malaltia progressiva amb una pèrdua aparentment exponencial de l'àrea visual i de l'amplitud de l'ERG.

Entre tots els casos descrits, s'observen variacions en les velocitats de pèrdua de la visió que són atribuïdes a l'estadi de la malaltia, a factors ambientals i dietètics, a defectes en gens directament causants de la malaltia i a defectes en possibles gens modificadors (Hantong et al., 2006).

### **1.3.3. Herència de la Retinosi Pigmentària**

La malaltia presenta diferents tipus d'herència: autosòmica dominant (RPAD, sobre un 30-40% dels casos), autosòmica recessiva (RPAR, 50-60%) o lligada al cromosoma X (RPLX, 5-15%) (Hantong et al., 2006). Aquestes proporcions són comptant els casos aïllats

com a autosòmics recessius tot i que, probablement, n'hi ha algun que correspon a un nou cas de mutació dominant. S'han trobat també patrons d'herència no mendeliana com per exemple casos d'herència digènica i casos d'herència materna (o mitocondrial) però aquests són una proporció molt petita en el total de casos de RP. (Lestienne et al., 1988; Zeviani et al. 1988; Kajiwara et al., 1994; Mansergh et al., 1999; Katsanis et al., 2001).

#### **1.3.4. Genètica molecular de la RPAD**

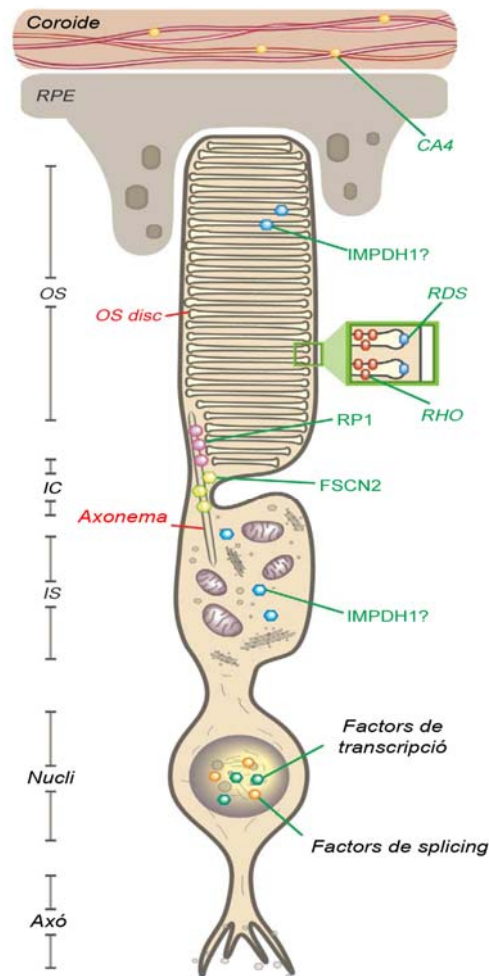
Molts gens s'han associat a Retinosi Pigmentària, tots ells amb una heterogeneïtat important tant pel que fa a la severitat de la malaltia com al model d'herència. Fins al moment s'han identificat setze gens lligats a RPAD ([www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/](http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/) - Retinal information network) però menys del 50% dels pacients analitzats presenten una mutació en algun d'ells, per tant, indubtablement, queden encara *loci* i gens per descobrir. A continuació (Taula II) es mostren els gens que s'han associat a RPAD i la funció putativa que s'ha assignat a les proteïnes que codifiquen.

Taula II. Gens associats a Retinosi Pigmentària Autosòmica Dominant.

Símbol (nom del locus)	Proteïna	Locus	Funció proteica	Expressió
<b>CA4 (RP17)</b>	<i>Carbonic anhydrase IV</i>	17q22	Hidratació CO <sub>2</sub> reversible	Coroide i sistèmica
<b>CRX</b>	<i>Cone-rod homeobox protein</i>	19q13.32	Factor de transcripció	Fotoreceptors
<b>FSCN2 (RP30)</b>	<i>Retinal fascin</i>	17q25	Empaquetament d'actina	Fotoreceptors
<b>GUCA1B</b>	<i>Guanilate cyclase activating protein</i>	6p21.1	Activació guanilat ciclases	Retina
<b>IMPDH (RP10)</b>	<i>Inosine Monophosphate dehydrogenase type1</i>	7q32.1	Síntesi de nucleòtids de guanina	Fotoreceptors i sistèmica

<b>NRL (RP27)</b>	<i>Neural retina leucine zipper protein</i>	14q11.2	Factor de transcripció	Fotoreceptors
<b>PAP-1 (RP9)</b>	<i>Pim-1 associated protein 1</i>	7p14.3	<i>Splicing</i> del pre-mRNA	Fotoreceptors i sistèmica
<b>PRPF3 (RP18)</b>	<i>PRP3 pre-mRNA processing factor 3 homologue</i>	1q21.2	<i>Splicing</i> del pre-mRNA	Fotoreceptors i sistèmica
<b>PRPF31 (RP11)</b>	<i>PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homologue</i>	19q13.42	<i>Splicing</i> del pre-mRNA	Fotoreceptors i sistèmica
<b>PRPF8 (RP13)</b>	<i>PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homologue</i>	17p13.3	<i>Splicing</i> del pre-mRNA	Fotoreceptors i sistèmica
<b>RDS (RP7)</b>	<i>Retinal degeneration slow protein</i>	6p21.2	Estructura dels discs	Fotoreceptors
<b>RHO (RP4)</b>	<i>Rhodopsin</i>	3q22.1	Pigment fotosensible	Fotoreceptors
<b>ROM1</b>	<i>Retinal outer segment membrane protein 1</i>	11q12.3	Estructura dels discs	Fotoreceptors
<b>RP1</b>	<i>Retinitis pigmentosa RP1 protein</i>	8q12.1	Estructura dels discs i axonema	Fotoreceptors
<b>SEMA4A</b>	<i>Semaphorin 4A</i>	1q22	Desenvolupament neuronal i/o resposta immune	EPR, cèls ganglionars
<b>TOPORS (RP31)</b>	<i>topoisomerase I binding, arginine/serine-rich</i>	9p21.1	Ubiquïtinització, <i>splicing</i> de pre-mRNA i altres	Fotoreceptors i sistèmica

Com es mostra en la Figura 4, les proteïnes codificades pels gens associats a RPAD que s'expressen en retina tenen una distribució molt concreta.



**Figura 4. Expressió dels diferents gens associats a RPAD.** La figura mostra la distribució de les diferents proteïnes al llarg del fotoreceptor, epiteli pigmentari de retina (RPE) i coroide. OS: Segment Extern, IC: cili interconnector, IS: segment Intern. [De: Kennan et al., 2005].

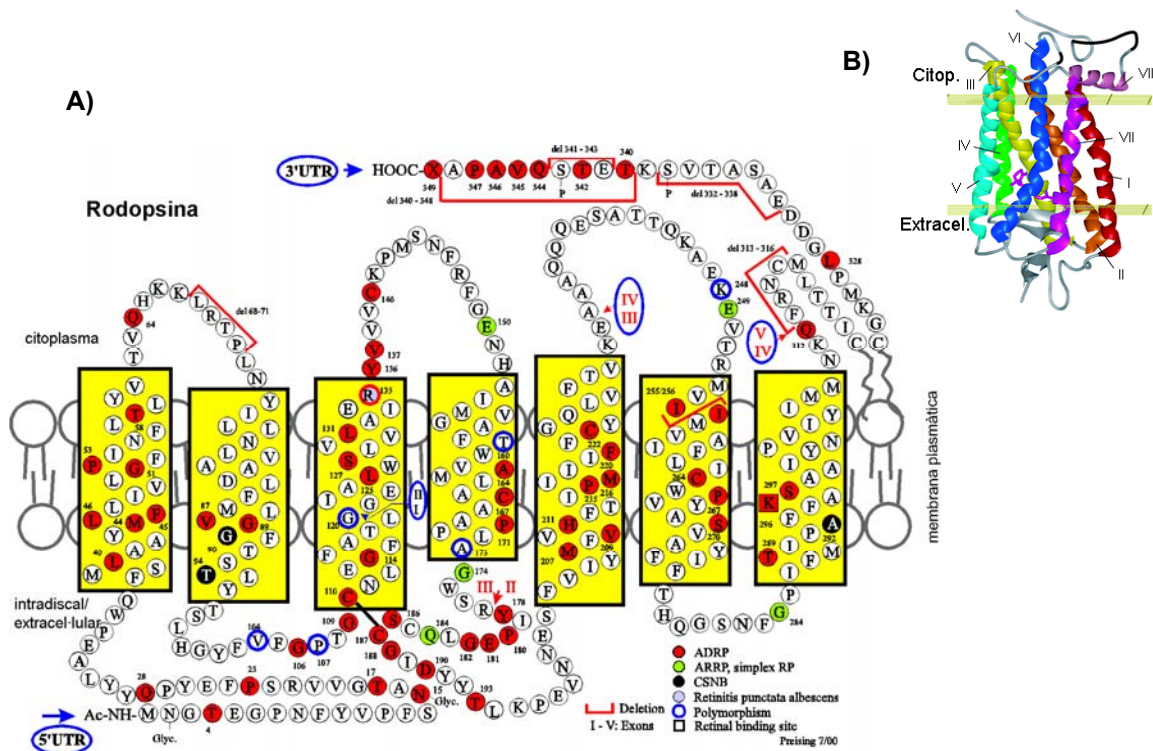
Fins a l'any 2001, tots els gens descrits relacionats amb RPAD codificaven proteïnes amb una funció clarament relacionada amb la funcionalitat de la retina. Entre aquestes es troben proteïnes implicades en la via de fototransducció, estructura cel·lular i control transcripcional dels gens dels fotoreceptors. En els darrers anys però s'han identificat varis gens lligats a RPAD que no presenten una relació tan òbvia entre la funció proteica i la malaltia (Kennan et al., 2005).



### **Rodopsina. El pigment visual**

Més del 70% del total de proteïna que forma el segment extern dels bastons és rodopsina. La proteïna es troba predominantment en els discs del segment extern on està covalentment unida al seu cromòfor, el 11-cis retinal. En RPAD les mutacions en aquest gen solen provocar un efecte de guany de funció en la proteïna resultant; un exemple està en un model de ratolí que amb només una còpia funcional del gen de la rodopsina presentava patologia retiniana (Humphries et al., 1997).

Més del 25% de casos de RPAD són deguts a mutacions en el gen de la rodopsina. S'han identificat més d'un centenar de mutacions diferents (Sohocki et al., 2001; Farrar et al., 2002) distribuïdes per tots els dominis estructurals de la proteïna. Generalment es pot parlar de dues classes de mutacions (tot i que hi ha alguns canvis nucleotídics que no encaixen del tot en aquests grups). Així, s'anomenen mutacions de classe I aquelles on la proteïna resultant s'assembla a la proteïna salvatge pel que fa als nivells d'expressió, a la capacitat de regenerar el 11-cis retinal i en la seva distribució al llarg de la membrana plasmàtica en cultius cel·lulars (Sung et al., 1993). Algunes de les mutacions de tipus I, particularment les que afecten la zona C terminal, sembla que intervenen en el tràfic de la rodopsina tot inhibint la seva translocació cap al segment extern dels bastons (Sung et al., 1994 i 2000). Per altra banda, les mutacions de classe II sembla que donen problemes en el plegament correcte de la rodopsina provocant la retenció de la proteïna mutada en el reticle endoplasmàtic quan són expressades en cultius cel·lulars (Sung et al., 1993; Kaushal et al., 1994).



**Figura 5. Estructura de la proteïna rodopsina.** A) Estructura secundària que mostra les 7 hèlix transmembrana, el domini citoplasmàtic i el domini extracel·lular de la proteïna. B) Imatge tridimensional de la proteïna rodopsina. [De [www.retina-international.org](http://www.retina-international.org) i de [www.cs.cmu.edu](http://www.cs.cmu.edu)., respectivament]

### **RDS, RP1 i FSCN2. Proteïnes estructurals dels fotoreceptors**

Alguns dels gens relacionats amb RPAD codifiquen proteïnes que juguen un paper important en la formació i manteniment de l'estructura cel·lular dels bastons. Així, mutacions en una glicoproteïna de membrana anomenada Periferina 2 (també coneguda com a RDS) causen diferents retinopaties, incloent RPAR, distròfia de cons i bastons i RPAD. La proteïna RDS forma complexos que intervien en la morfogènesi i estructura dels discs del segment extern, tant de bastons com de cons. Les proteïnes RDS acabades de sintetitzar formen homodímers que a la vegada formen tetràmers ja sigui amb homodímers de RDS o amb homodímers de la proteïna ROM 1.

Algunes mutacions en el gen RDS impedeixen la formació de tetràmers i queda inhibït així el transport des del segment intern fins a l'extern. En aquests casos, la proteïna salvatge és insuficient per atendre la demanda dels fotoreceptors i el resultat és la

degeneració retiniana. En altres casos, la proteïna mutada s'incorpora en els discs però fa que aquests siguin inestables i la Retinosi es desenvolupa a causa de la desorganització del segment extern (Loewen et al., 2003). Més evidències d'aquest efecte dominant negatiu les trobem en un model murí que porta el gen RDS amb la deleció del codó 307, que se sap que provoca RPAD (McNally et al., 2002). Aquest ratolí mostra un fenotip que és substancialment més sever que el que mostren ratolins portadors de mutacions nul·les.

Tot i així, cal destacar que la majoria de les mutacions trobades en el gen RDS són causants de distròfies maculars i no pas de RPAD (Gamundi et al., 2007).

S'han associat també a RPAD mutacions en el gen ROM1 però no s'ha pogut confirmar de forma inequívoca que siguin les causants de la malaltia ja que en ratolins mutants per ROM1 no s'ha pogut reproduir la malaltia. Si que sembla però confirmada la intervenció de ROM1 en mecanismes digènics de RP, juntament amb RDS (Kajiwara et al., 1994).

L'expressió del gen RP1 és exclusiva dels fotoreceptors i la proteïna codificada es localitza en l'axonema (Liu et al., 2002). Estudis de ratolins amb mutacions en aquest gen han mostrat que la funció de la proteïna podria estar relacionada amb la morfogènesi del segment extern dels fotoreceptors. A més, estudis més recents han demostrat que RP1 és una proteïna associada a microtúbuls (MAP) que es troba a l'axonema madur del segment extern, ajudant al control de la seva llargada i estabilitat (Liu et al., 2004). Sembla que podria formar part de les connexions entre l'axonema i els discs del segment extern tot ajudant a l'organització i orientació d'aquests. En pacients amb mutacions en RP1, sembla que una desorganització dels discs del segment extern porta cap a la mort dels fotoreceptors.

En la població espanyola, totes les mutacions detectades en RP1 sembla que donen lloc a una proteïna truncada. S'han trobat però mutacions que presenten una

penetrància incompleta i que fan pensar en l'existència d'algun element genètic modificador del fenotip de RP (Gamundi et al., 2007).

Una altra proteïna estructural implicada en RPAD és la fascina (FSCN2). Les fascines són proteïnes d'unió a l'actina i sembla que estan implicades en la formació d'estructures amb base d'actina que es troben en la membrana plasmàtica del cili connector dels fotoreceptors (Wada et al., 2001). S'ha suggerit que aquestes proteïnes poden tenir un rol en la morfogènesi dels discs i per tant, conduir a RP quan no funcionen correctament.

Fins al moment, només s'ha descrit una mutació (208delG) en FSCN2 causant de RPAD en la població japonesa (Wada et al., 2001). Tanmateix, aquesta mateixa mutació ha estat trobada també en individus japonesos amb degeneració macular (Wada et al., 2003). Contràriament, estudis realitzats recentment en la població xinesa conclouen que la mutació 208delG no està associada a cap degeneració retiniana (Zhang et al., 2007).

En la població espanyola, s'han trobat 16 variants genètiques en FSCN2 però cap d'elles s'ha pogut associar a RPAD (Gamundi et al., 2005).

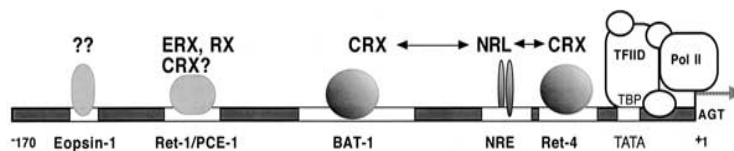
### **CRX i NRL. Factors de transcripció de retina**

Els passos que es donen durant el desenvolupament, diferenciació i manteniment dels fotoreceptors es produeixen sota un control estricte coordinat per diferents factors de transcripció. Dos d'aquests factors són el CRX (*cone-rod homeobox*) i el NRL (*neural retina leucine zipper*), ambdós associats a RPAD.

El CRX es va relacionar inicialment amb un cas familiar de distròfia de cons i bastons (Freund et al., 1997). Es va veure després que és un factor essencial per al

desenvolupament dels fotoreceptors (Furukawa et al., 1997) i mutacions en aquest factor s'han relacionat amb Amaurosi Congènita de Leber (LCA) i RPAD (Sohocki et al., 1998). El CRX és un membre de la família dels factors de transcripció d'homodomini i és important per a la regulació de l'expressió de varis gens específics de fotoreceptor (Furukawa et al., 1997). Tot i que hi ha alguns punts encara desconeguts sobre el paper que juga aquest gen en les degeneracions retinianes, en general, les mutacions en aquest factor de transcripció provoquen una alteració en la regulació transcripcional que realitza CRX en els fotoreceptors (Chen et al., 2002).

El NRL, un segon factor de transcripció associat a RPAD, actua sinèrgicament amb CRX regulant l'expressió de rodopsina (Chen et al., 1997). Ambdós factors s'uneixen a zones conegudes del promotor de RHO i ajuden a la seva activació.



**Figura 6. Promotor de la rodopsina i factors que hi interactuen.** En l'esquema es pot veure NRL i CRX, dos factors de transcripció que actuen de manera sinèrgica activant el promotor de rodopsina.

Les anàlisis fetes a un model de ratolí sense cap còpia funcional de NRL indiquen que aquest factor està implicat en la determinació i desenvolupament dels fotoreceptors així com en la seva funció i manteniment en l'estat adult (Mears et al., 2001).

**PRPF3, PRPF8, PRPF31 i PAP-1. Factors de *splicing***

Mutacions trobades en quatre gens que codifiquen proteïnes implicades en el *splicing* dels introns del pre-mRNA han estat identificades com a causants de RPAD . Aquests

gens són PRPF3, PRPF8, PRPF31 i PAP-1 (McKie et al., 2001; Vithana et al., 2001; Chakarova et al., 2002; Keen et al., 2002). No hi ha dubte que mutacions en aquests factors causen RPAD però és un misteri encara per resoldre el perquè gens que s'expressen de manera ubiqua i que tenen una funció bàsica tan important només provoquen malaltia en la retina.

Els fotoreceptors renoven sovint els seus discs del segment extern, on es troba situada la rodopsina. Aquest fet implica un requeriment continu de trànscripats de rodopsina que òbviament han de passar pel procés de *splicing* abans de ser traduïts. Alguns estudis (Deery et al., 2002; Maita et al., 2004) postulen que el fenotip de la malaltia retiniana pot estar relacionat amb el llindar dels nivells de *splicing*. Així, es creu que els fotoreceptors dels pacients poden sobreviure fins que els nivells de *splicing* de rodopsina, o altres mRNAs, disminueixin per sota d'un nivell mínim, punt en el qual la cèl·lula seria danyada irreversiblement, arribant en alguns casos a l'apoptosi.

### **IMPDH1. Un gen que intervé en la síntesi de GTP**

Mutacions en el gen IMPDH1 (*Inosine monophosphatase dehydrogenase type 1*) van ser identificades com a causants de RPAD tipus RP10 (Bowne et al., 2002).

La proteïna codificada pel gen és un enzim clau en la via de síntesi de les purines i, específicament, és responsable de la conversió de la inosina monofosfat (IMP) cap a xantosina monofosfat (XMP). XMP és un precursor dels nucleòtids de guanina els quals, a més de ser un component clau dels àcids nucleics, són importants per diverses funcions biològiques com la senyalització cel·lular i la glicosilació. Malgrat que les cèl·lules poden obtenir nucleòtids de guanina mitjançant diferents mecanismes, estudis d'expressió demostren que els fotoreceptors són altament dependents d'IMPDH1 per a l'obtenció d'aquests nucleòtids (Aherne et al., 2004). Pels fotoreceptors, els nucleòtids de guanina són crucials per diferents motius; un d'ells és perquè la maquinària cel·lular de transcripció requereix grans quantitats de precursors de RNA, incloent GTP, per tal de

suplir les quantitats requerides de transcrit de rodopsina. A més, el GTP també s'utilitza en varis dels passos de la cascada de fototransducció.

La demanda de GTP per part dels fotoreceptors podria donar força a la conclusió de que la Retinosi es produeix com a resultat d'una haploinsuficiència de l'IMPDH1 (de manera que una única còpia funcional del gen no seria suficient per suplir els elevats nivells de GTP requerits). No obstant, s'ha vist que un ratolí al que li falta *Impdh1* té una retinopatia significativament més lenta i moderada que la que apareix en pacients humans. Aquest model indica que no és la falta d'IMPDH1 la que provoca la degeneració retiniana sinó que és el guany de funció provocat per la proteïna mutada (Aherne et al., 2004).

La majoria de les mutacions trobades en IMPDH1 estan en el domini proteic anomenat CBS (que és diferent al domini d'activació de l'enzim). La funció exacte d'aquest domini però encara no s'ha trobat.

Es pot dir que, al igual que en rodopsina, diferents mutacions en IMPDH1 poden provocar Retinosi Pigmentària a través de diferents mecanismes.

### **CAIV. Un gen que no s'expressa a retina associat a Retinosi Pigmentària**

Un dels últims gens identificat com a causant de RPAD difereix de tota la resta perquè no s'expressa en retina. El gen codifica la proteïna Anhidrasa Carbònica IV (CAIV) que sembla és responsable de RP17, ja que el canvi R14W en la seqüència proteica segrega amb el fenotip de la malaltia en una família sud africana (Rebello et al., 2004).

Sembla que la proteïna CAIV mutada té un efecte final en les cèl·lules fotoreceptores degut al dany causat a les cèl·lules endotelials dels capil·lars coroïdals de l'ull, on s'expressa la proteïna. Probablement aquesta és la conseqüència de la quantitat creixent de proteïna mal plegada en el reticle endoplasmàtic la qual activa la resposta a proteïna malplegada (UPR) que, quan està activada durant molt temps, porta a apoptosi. La mort de les cèl·lules dels capil·lars coroïdals, que nodreixen la retina,

produiria un efecte sobre els fotoreceptors apareixent finalment una Retinosi Pigmentària.

### **TOPORS. Un gen relacionat amb la regulació de la topologia del DNA associat a Retinosi Pigmentària**

El gen TOPORS (*topoisomerase I binding, arginine/serine-rich*) codifica una E3 ubiquitin lligasa que sembla pot ubiquitinar a p53 (Rajendra et al., 2004). A més, la proteïna TOPORS té dominis RS que es coneix estan implicats en el *splicing* del pre-mRNA. Es creu que TOPORS no només pot estar implicada en el processament de *splicing* sino també en un ventall més ampli de funcions en les cèl·lules mamíferes (Cazalla et al., 2005).

Per RT-PCR s'ha confirmat que la proteïna s'expressa en diferents teixits humans incloent-hi la retina.

Estudis realitzats en el gen TOPORS han identificat dues mutacions de canvi de pauta de lectura en dues famílies independents afectades de RPAD. Aquests canvis, trobats en heterozigosi, suggereixen que mutacions en aquest gen són responsables de RP31. El fet de que TOPORS sigui un gen d'expressió ubiqua i que en els pacients d'ambdues famílies afectades no s'hagi trobat proteïna truncada, suggereix que la causa de la malaltia és un mecanisme molecular d'haploinsuficiència i no un efecte dominant negatiu (Chakarova et al., 2007).

En alguns gens, com *ROM-1*, *GUCA1B* i *SEMA4A*, no s'ha pogut establir una clara correlació entre mutació i RP.

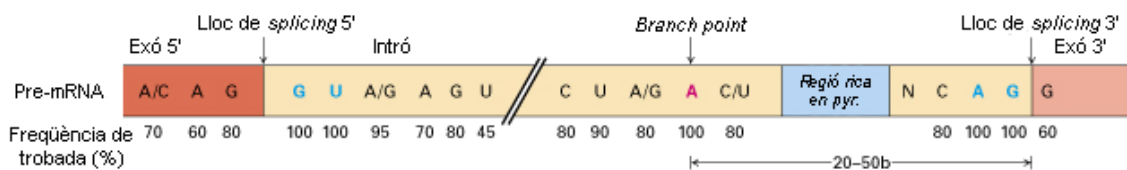


## 1.4. Processament (*splicing*) del pre-mRNA

Després del procés de transcripció, en la molècula de RNA missatger formada s'eliminen els introns i s'uneixen els exons tot donant lloc a un RNA missatger madur que podrà ser traduït. Aquest processament de tall i unió es coneix amb el nom de "*splicing*" del pre-mRNA.

Els límits entre exó i intró estan definits per curtes seqüències degenerades. Així, la majoria dels introns comencen a 5' amb la seqüència "GU", anomenada lloc donador de *splicing* i acaben a 3' amb la seqüència "AG" coneguda com a lloc acceptor de *splicing*. No obstant, aquestes dues seqüències no són suficients per assenyalar la presència d'un intró. Cal també la seqüència anomenada *branch site*, que es localitza a 20-50 parells de bases en direcció 5' del lloc acceptor de *splicing*. La seva seqüència consens és "CU(A/G)A(C/U)", on el nucleòtid A de la quarta posició (anomenat *branch point*) està conservat en tots els gens.

En el 60% dels casos, la seqüència exònica anterior al lloc donador és (A/C)AG i la posterior al lloc acceptor és G (Faustino et al., 2003).

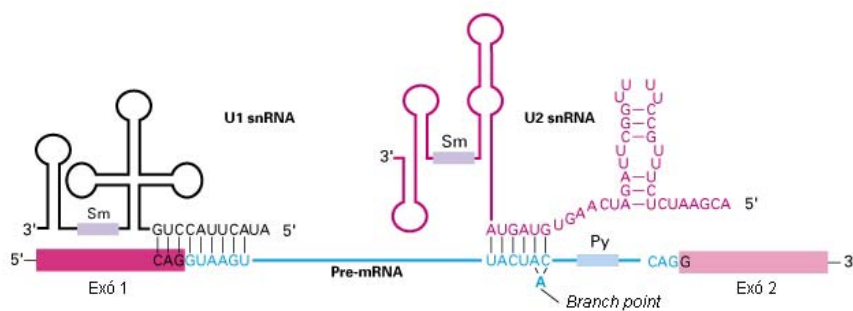


**Figura 7. Seqüències consens implicades en el procés de *splicing*.** Es poden veure les diferents seqüències situades al voltant dels llocs 5' i 3' de *splicing* en els pre-mRNAs de vertebrats. [De www. departments.oxy.edu]

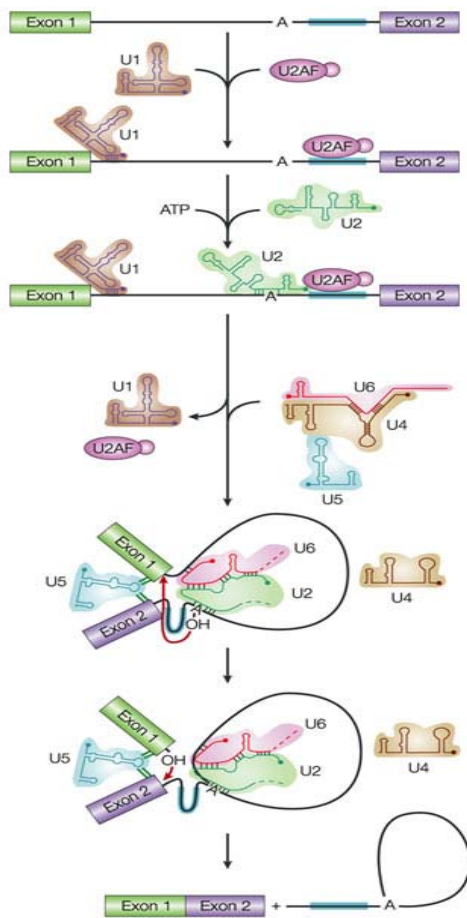
Els components de la maquinària basal de *splicing* s'uneixen a aquestes seqüències i promouen el muntatge del complex multiproteic conegut com a *spliceosoma*. El *spliceosoma* és l'encarregat de dur a terme les dues principals funcions de *splicing*: reconèixer els límits entre exó i intró i catalitzar les reaccions de tall i unió que eliminen els introns i uneixen els diferents exons. El *spliceosoma* està format per 5 petites ribonucleoproteïnes nuclears (snRNP) i més d'un centenar de proteïnes. Cada snRNP està formada per un RNA nuclear petit ric en uridines (snRNA) i múltiples proteïnes.

El muntatge del *spliceosoma* és un procés dinàmic que implica diferents interaccions entre RNA i proteïnes, canvis en la conformació del RNA i remodelacions dels snRNPs (Mordes et al., 2006).

Immediatament després de la transcripció, el pre-mRNA naixent entra en la ruta de *splicing*. Inicialment, el lloc de *splicing* 5' és reconegut per la snRNP U1 mentre que la seqüència *branch site* interacciona amb el snRNP U2 mitjançant la hidròlisi d'ATP i factors proteics addicionals.



**Figura 8.** Interacció entre les snRNPs U1 i U2 i les seqüències consens del pre-mRNA. [De [www.departments.ox.y.edu](http://www.departments.ox.y.edu)]



**Figura 9. Ensamblatge del spliceosoma i catalisi.** Les fletxes vermelles mostren les dues reaccions de transesterificació. [De: Patel et al., 2003].

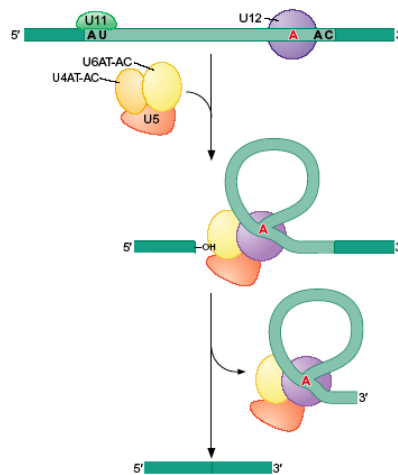
El següent pas ATP dependent és la incorporació del complex tri-snRNP U4/U6.U5 dins el *spliceosoma*, que implica la dissociació del snRNP U1 del lloc 5' de *splicing*.

En aquest moment, la seqüència 5' donadora interacciona amb el snRNP U6 per la zona intrònica i amb el U5 per la regió exònica. Un cop col·locada la ribonucleoproteïna U6 dins el complex de *splicing*, el snRNP U4 és alliberat. Ja format el *spliceosoma* catalíticament actiu, U2, U5 i U6 catalitzen dues reaccions de transesterificació que promouen l'eliminació de l'intró en forma de lariat i la unió dels exons mitjançant hidròlisi d'ATP. En la primera reacció de transesterificació, el residu 2'OH de l'adenosina de la seqüència *branch site* ataca el lloc 5' de *splicing*

produint un lariat intermediari i un exó 5', també intermediari, amb un grup 3' OH. En la segona reacció, aquest grup 3' OH ataca el lloc 3' de *splicing* per produir un producte de RNA madur que serà alliberat i un intró en forma de lariat que es desfarà (Hastings et al., 2001; Zhou et al., 2002; Jurica et al., 2003; Turner et al., 2006).

L'explicat fins ara és l'anomenat *splicing* canònic que es dona en el 99% dels casos i el realitza l'anomenat *spliceosoma* major, descrit també anteriorment.

Hi ha vegades però on les seqüències flanquejants de l'intró no són GU-AG sino que els llocs de *splicing* 5' i 3' són AU i AC respectivament, i els introns s'anomenen del tipus U12. En aquests casos es dona l'anomenat *splicing* no canònic, que el realitza l'*spliceosoma* menor. Aquest conté també la snRNP U5 però la resta de snRNPs, tot i que funcionalment anàlogues, són diferents. En aquest tipus de *spliceosoma* trobem U11, U12, U4atac i U6atac substituïnt a U1, U2, U4 i U6 respectivament (Patel et al. 2003; Ng et al., 2004).



**Figura 10. Mecanisme de *splicing* no canònic.** En aquests casos el *spliceosoma* menor actua eliminant els introns de tipus U12. [De: [www.library.csi.cuny.edu](http://www.library.csi.cuny.edu)].

En el reconeixement dels exons hi actuen també elements auxiliars en *cis* coneguts com *enhancers* de *splicing* exònics i intrònics (ESEs i ISEs) i silenciadors de *splicing* exònics i intrònics (ESSs i ISSs). Aquests solen trobar-se en ambdós tipus de *splicing*, canònic i no canònic.

S'ha vist que diferents exons constitutius són reconeguts mitjançant diferents mecanismes i requereixen diferents elements auxiliars a més de les seqüències de

*splicing* clàssiques. La importància d'aquestes observacions queda reflectida en tres punts:

1. Hi ha un nombre considerable de mutacions intròniques i exòniques causants de malalties que modifiquen elements auxiliars desconeguts que actuen en *cis* o bé modifiquen els llocs de *splicing* clàssics.
2. Degut a que cada exó té uns requeriments diferents per al seu reconeixement, les mutacions que alteren la funció de la maquinària de *splicing* tindran diferents efectes en cada exó.
3. La variabilitat que presenten els diferents tipus de cèl·lules en la maquinària de *splicing* basal podria provocar sensibilitats específiques de cèl·lula segons cada mutació de *splicing* concreta.

#### **1.4.1. El *splicing* alternatiu**

El *splicing* alternatiu es produeix quan els components del *spliceosoma* s'uneixen a llocs de *splicing* 5' i 3' diferents als normals o majoritaris. Aquest fet permet a un gen expressar múltiples mRNAs que codifiquen proteïnes amb funcions diverses i fins i tot antagòniques. Fins al 59% dels gens humans generen mRNAs múltiples mitjançant *splicing* alternatiu (Lander et al., 2001) i aproximadament el 80% dels *splicings* alternatius impliquen canvis en la proteïna codificada (Modrek et al., 2002). El *splicing* alternatiu genera fragments de mRNA molt variables que poden donar lloc a la inserció o eliminació d'aminoàcids, canvi en la pauta de lectura, o introducció d'un codó *stop*. El *splicing* alternatiu també afecta l'expressió gènica tot introduint o eliminant elements reguladors que controlen la traducció, estabilitat del mRNA o localització proteica.

Una gran part del *splicing* alternatiu experimenta una regulació específica de cèl·lula que implica una regulació de les vies de *splicing* segons el tipus cel·lular, estadi de

desenvolupament, gènere o en resposta a estímuls externs. Aquesta especificitat cel·lular sorgeix bàsicament des de dues característiques: la primera, la repressió del *splicing* en un tipus de cèl·lula inapropiada es combina amb l'activació del *splicing* en el tipus de cèl·lula adequada i segon, aquest control combinat implica l'actuació de múltiples complexes tant d'activació com de repressió que actuen sobre els elements en *cis* que envolten els llocs de *splicing* (Grabowski, 1998; Smith et al. 2000). De fet, aquests complexes són els que regulen la maquinària basal de *splicing* tot activant-la o inhibint-la davant el reconeixement dels llocs de *splicing* clàssics (Ladd et al., 2001).

#### **1.4.2. Mutacions causants de RPAD relacionades amb el procés de *splicing***

S'ha estimat que el 15% de les mutacions puntuals que provoquen malalties genètiques humanes afecten el procés de *splicing* del pre-mRNA (Nakai et al., 1994). Però, degut a que la majoria dels estudis genètics se centren en les regions exòniques, sembla que aquest tant per cent està subestimat.

Les mutacions de *splicing* poden classificar-se en dos grans grups:

- Mutacions en *cis*. Localitzades en les seqüències reguladores de *splicing* d'un gen. Afecten directament el *splicing* del mRNA del gen corresponent.
- Mutacions en *trans*. Localitzades en gens que intervenen en la funció reguladora del *splicing* com, per exemple, gens que codifiquen les proteïnes *spliceosomals*. Provoquen un defecte en la maquinària o en els reguladors de *splicing* i, conseqüentment, un *splicing* aberrant del pre-mRNA dels gens diana implicats.

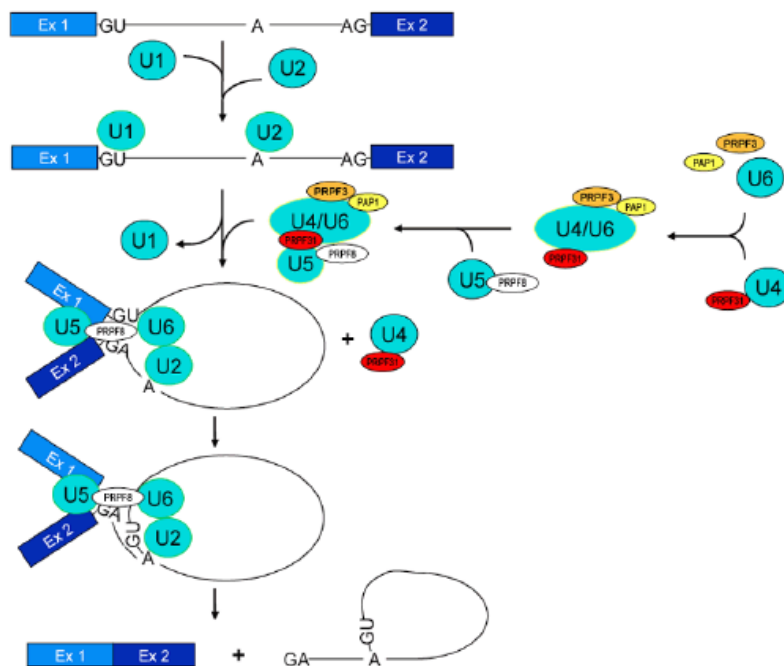
Diferents mutacions de *splicing* han estat descrites en diferents tipus de RP.

En RPAD, s'han trobat varies mutacions d'aquest tipus en el gen de la rodopsina (Kim et al., 1993; Greenberg et al., 1994; Jacobson et al., 1994; Reig et al., 1996; Martinez-Gimeno et al., 2000). També s'han detectat mutacions de *splicing* en el gen RPGR que provoquen RPLX (Dry et al., 1999) així com en el gen que codifica per la fosfodiesterasa cGMP, en aquest cas produint RPAR (Piriev et al., 1998). Totes aquestes serien mutacions que actuen en *cis*.

Els efectes patogènics de mutacions que actuen en *trans* també es poden veure a través dels estudis de RP. En aquests casos, malgrat que els gens mutats s'expressen ubiquament, les seves mutacions provoquen manifestacions específiques de tipus cel·lular.

La formació del complex U4/U6.U5 i la seva associació amb el *spliceosoma* requereix varis factors proteics entre els que es troben PRPF3, PRPF8 i PRPF31. Aquestes proteïnes s'ha vist que estan altament conservades evolutivament, des del llevat fins a l'humà (Will et al., 1997, Jurica et al., 2003).

Quan s'estudia la Retinosi Pigmentària, cal dir que és remarcable el fet que 4 dels 12 gens clonats causants de RPAD són gens expressats ubiquament i associats al *splicing* del pre-mRNA. Tres d'aquests gens (PRPF3, PRPF8 i PRPF31) codifiquen proteïnes *spliceosomals* que són crítiques per a la formació del complex madur de *splicing* i el quart gen, PAP1, està també implicat en el *splicing* del pre-mRNA i s'ha demostrat que interacciona amb PRPF3. Estudis genètics i bioquímics mostren que el PRPF3, PRPF8 i PRPF31 són necessaris per a la formació estable dels snRNPs U4/U6 i per a la unió del tri-snRNP U4/U6.U5. Ha estat proposat que el PRPF3 i PRPF31 estan implicats en l'activació del *spliceosoma* desfent el dúplex U4/U6 (Nottrott et al., 2002) mentre que el PRPF8 és crucial per a la formació del centre catalític del *spliceosoma*.



**Figura 11. Paper dels factors de *splicing* associats a RPAD en l'ensamblatge del *spliceosoma*.** La formació del complex U4/U6.U5 tri-snRNP requereix PRPF3, PRPF8 i PRPF31, a més d'altres factors de *splicing*. [De: Mordes et al., 2006].

El descobriment de mutacions causants de RPAD en aquests factors de *splicing* demostra clarament la importància i especificitat del *splicing* del pre-mRNA en la funció i supervivència dels fotoreceptors. És probable que el *splicing* del pre-mRNA de certs gens dels fotoreceptors depengui de la dosi gènica, és a dir, de l'expressió d'ambdues còpies salvatges del gen. Tant els mecanismes de pèrdua com de guany de funció poden portar a un processament defectuós del RNA en els fotoreceptors.

S'han proposat varis models per a explicar el fenotip específic de fotoreceptor (Mordes et al., 2006):

1. Model d'haploinsuficiència. La pèrdua d'una còpia funcional d'un d'aquests gens essencials per al *splicing* portaria cap a una funció insuficient en els bastons a causa de la gran demanda que tenen aquests d'expressió de mRNA



i síntesi proteica. És possible que mutacions en PRPF3, PRPF8, PRPF31 i PAP1 impliquin una reducció en els nivells de determinades proteïnes salvatges funcionals fent que siguin insuficients per mantenir el nivell de processament de RNA requerit per a la supervivència i funció dels fotoreceptors.

2. Relacionat amb l'anterior, aquest model diu que mutacions associades a RPAD poden disminuir la relació d'activació del *spliceosoma* (Kuhn et al., 2002) fent que el *splicing* del pre-mRNA sigui un pas limitant en els fotoreceptors però no en altres cèl·lules.
3. Un tercer model postula que la presència de cofactors específics de fotoreceptors, que actuarien conjuntament amb els factors de *splicing* associats a RPAD, serien els responsables de les manifestacions específiques de fotoreceptor. Fins ara però, només es coneix un nombre molt limitat de proteïnes d'unió al RNA que siguin específiques de cèl·lules neuronals i, de moment, no s'han descrit factors de *splicing* ni proteïnes d'unió al RNA que siguin específiques de fotoreceptor.
4. El quart model diu que la producció de factors de *splicing* mutats provoca (degut al guany de funció dominant negatiu) toxicitat en els fotoreceptors però no en altres tipus cel·lulars. Vàries línies d'investigació donen suport a aquesta teoria. Tots els pacients amb RP13 presentaven mutacions sense sentit i un fenotip sever de la malaltia; aquest fet suggereix un possible mecanisme dominant negatiu en les RPADs associades a PRPF8 (McKie et al., 2001). Diferents tipus de mutacions en el gen PRPF31 s'ha predit que donen lloc a proteïnes truncades i, experiments *in vivo* recolzen també el mecanisme de

guany de funció (Vithana et al., 2001). La sobreexpressió de les proteïnes PRPF31 mutants AD5 o SP117 en cèl·lules primàries de retina provoca un augment significatiu en la mort de cèl·lules de retina positives per rodopsina. La coexpressió en cultius cel·lulars d'aquestes proteïnes PRPF31 mutades juntament amb un minigen de rodopsina porta cap a la inhibició del *splicing* del intró 3 del pre-mRNA de rodopsina (Yuan et al., 2005).

Aquests quatre possibles mecanismes no s'exclouen uns als altres de manera que és possible que diferents mutacions en diferents gens provoquin RPAD a través de vies diferents. El punt final comú a totes elles és la mort dels fotoreceptors.

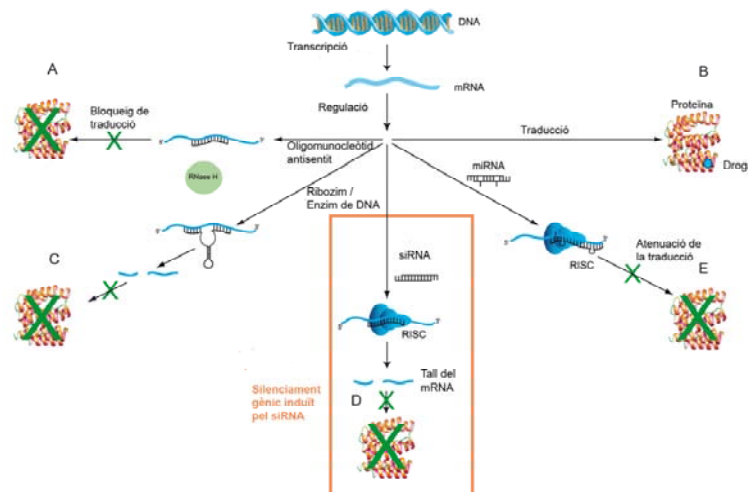
El descobriment de que mutacions en gens codificants per factors de *splicing* provoquin la mort dels fotoreceptors indica que aquestes cèl·lules poden tenir propietats úniques que les facin especialment sensibles a mutacions en gens implicats en el *splicing* del pre-mRNA. Això també suggereix l'existència d'una via comú a través de la qual defectes en el *splicing* del pre-mRNA portin fins a la mort de les cèl·lules fotoreceptores.

## **1.5. Aproximació terapèutica: Interferència del mRNA**

El potencial dels oligodeoxinucleòtids per actuar com a agents antisentit tot inhibint la replicació viral en un cultiu cel·lular va ser descobert per Zamecnik i Stephenson al 1987 (Zamecnik et al., 1978). Des d'aleshores la tecnologia antisentit s'ha desenvolupat enormement fins a convertir-se actualment en una eina quasi imprescindible a l'hora d'inhibir l'expressió de gens diana d'interès.

Quan es parla de les molècules amb capacitat d'induir el silenciament genètic a nivell post-transcripcional, es descriuen principalment 3 categories:

- **Oligonucleòtids antisentit (AS-ONs)**. Segons el tipus, són capaços de reclutar la RNasa H per tallar el mRNA diana o inhibir la seva traducció.
- **Ribozims**. Oligonucleòtids catalíticament actius capaços de tallar el mRNA.
- **Molècules siRNA / miRNA**. Molècules petites de RNA de doble cadena que indueixen la degradació del mRNA a través d'una via de silenciament genètic coneguda com a RNA d'interferència (RNAi).

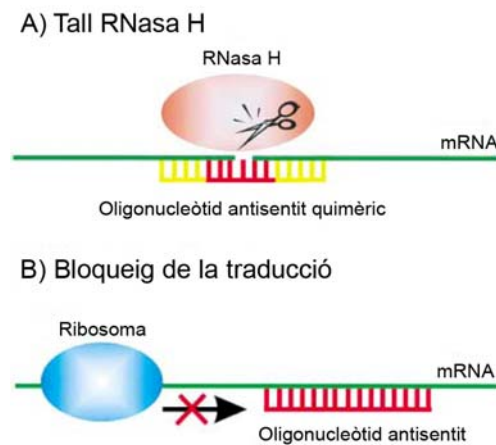


**Figura 12. Mecanismes de silenciament post-transcripcional en eucariotes.** A) Els oligonucleòtids antisentit (AS-ONs) bloquegen la transcripció del mRNA o indueixen la seva degradació a través de la RNasa H. B) L'activitat proteica pot ser abolida utilitzant un inhibidor que s'uneix directament a la proteïna. C) Un oligonucleòtid catalíticament actiu pot promoure la degradació del mRNA diana. D) Molècules de dsRNA poden incorporar-se al RISC i catalitzar el tall del mRNA diana. E) mRNAs endògens poden incorporar-se al RISC i reprimir la traducció del mRNA. [De *RNA interference –Technical Reference & Application Guide. Dharmacon*].

### 1.5.1. Oligonucleòtids antisentit

Els AS-ONs són molècules de DNA de cadena senzilla de 15-20 nucleòtids de llargada i complementaris al mRNA diana que es vol interferir. Hi ha 2 mecanismes principals

que contribueixen en la seva activitat antisentit. El primer, i més utilitzat, és la capacitat del AS-ON d'activar la RNasa H. Aquesta és capaç de tallar el RNA que forma part de l'heterodúplex DNA-RNA i desencadenar així la degradació del mRNA diana. A més, els AS-ONs que no són capaços d'induir el tall de la RNasa H poden ser utilitzats per inhibir la traducció mitjançant un bloqueig del ribosoma ja que quan els AS-ONs tenen la seva diana a l'extrem 5' del mRNA, impedeixen la unió de la maquinària de traducció (Kurreck, 2003).



**Figura 13. Mecanismes d'actuació dels oligonucleòtids antisentit.** A) Els AN-ONs poden induir el tall del mRNA via RNasaH. B) Alguns AN-ONs inhibeixen la traducció tot bloquejant el ribosoma. [De Kurreck, 2003].

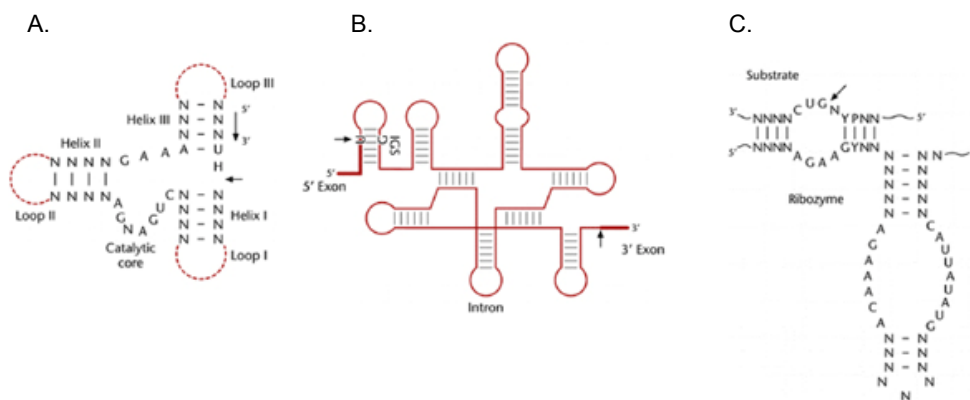
Un dels inconvenients d'aquestes molècules és la inestabilitat dels oligonucleòtids que poden ser fàcilment degradats per les nucleases dels fluids biològics. Des de fa uns anys, per intentar millorar l'estabilitat dels AS-ONs, s'està treballant amb nucleòtids modificats químicament.

### **1.5.2. Ribozims**

A principis dels 80, Cech i els seus col·laboradors van descobrir l'activitat autocatalítica en els introns del grup I de *Tetrahymena thermophila* (Cech et al., 1981; Kruger et

al., 1982) i van utilitzar el nom “ribozims” per descriure aquests enzims de RNA. Poc després, es va descobrir el paper del RNA del complex RNasa P en el procés de maduració del tRNA (Guerrier-Takada et al.,1983). Aquesta va ser la primera caracterització d’un enzim de RNA verdader capaç de catalitzar una reacció en *trans* sobre un substrat lliure.

Des d’aleshores i fins al moment s’han identificat 7 classes de ribozims naturals. Tots ells catalitzen el tall o lligació d’una molècula de RNA per transesterificació o hidròlisi de grups fosfat. Aquests ribozims poden ser dividits en tres grans grups segons la seva funció i mecanisme: els ribozims *hammerhead*, *hairpin*, hepatitis delta virus (HDV) i *Varkud Satellite* (VS); els introns del grup I i II; i la ribonucleasa P (Petit-Zeman, 2003; Khan, 2006).



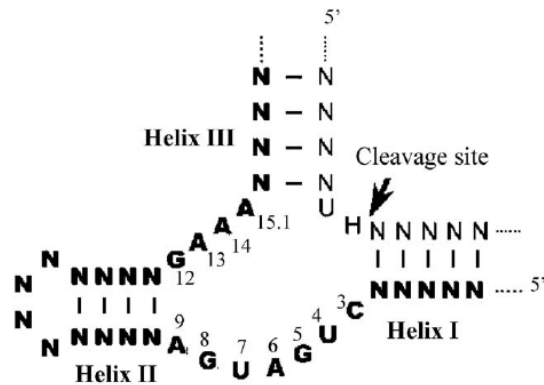
**Figura 14. Tipus de ribozims.** Estructura d’un ribozim *hammerhead* (A), intró del grup I (B) i ribozim *hairpin* (C). Les fletxes indiquen el lloc de tall. [De Petit-Zeman, 2003].

**Ribozims *hammerhead*.** Aquests petits RNAs catalítics tenen des de 40 fins a 155 nucleòtids de llargada i catalitzen, a diferència dels altres, un tall de lloc específic. L’aparellament de bases i les interaccions terciàries els són d’ajuda a l’hora d’alinejar el lloc de tall amb el centre catalític del ribozim.

Els ribozims *hammerhead*, que són els més estudiats i utilitzats fins al moment, van ser descoberts per primera vegada en virus de RNA de plantes (Forster et al., 1987). La replicació d'aquests patògens es dona pel mecanisme de "rolling circle" (Branch et al., 1984) en el qual el genoma circular de RNA es copia dins de llargs i multimèrics trànscrips. Aquests trànscrips han de ser després tallats en fragments de genomes únics. En diversos casos però, aquest pas no implica enzims proteics sino que es dona per una autoreacció catalítica catalitzada per un motiu específic de RNA anomenat *hammerhead* (Sheldon et al., 1989). Des d'aleshores s'ha demostrat que el motiu *hammerhead* pot ser incorporat dins d'oligonucleòtids sintètics i transformat en un veritable catalitzador adequat per tallar en *trans* una gran varietat de RNAs diana (Uhlenbeck, 1987; Haseloff et al., 1988).

Tots els motius *hammerhead* comparteixen una estructura secundària formada per tres hèlix (I, II i III) que envolten una regió central formada per varis nucleòtids invariables (el nucli catalític). En la majoria dels ribozims *hammerhead* que actuen en *trans*, l'hèlix II està formada únicament per nucleòtids propis del catalitzador mentre que les hèlix I i III es formen per hibridació del ribozim amb seqüències complementàries del substrat (Hammann et al., 2002, Persson et al., 2002).

Al 1994, Pley i els seus col·laboradors van publicar l'estructura d'un ribozim *hammerhead*. El nucli estava format per dos dominis estructurals: residus 3-6 (CUGA) que formaven una corba idèntica a la corba formada per les uridines en el tRNA, mentre que els residus 8, 9, 12 i 13 formaven un dúplex no estàndard situat després de l'hèlix II.



**Figura 15. Estructura secundària d'un ribozim *hammerhead* unit al seu substrat.** El ribozim, a diferència del mRNA substrat, està marcat en negreta. Els ribozims més utilitzats per a les aplicacions exògenes tenen 35-40 nucleòtids i l'hèlix intramolecular està formada per 4 parells de bases. Tot i així, s'han descrit altres variants amb una elevada activitat catalítica. N: qualsevol nucleòtid H: qualsevol nucleòtid excepte G. [De Khan et al., 2006].

Al 1995, Scott et al. van confirmar aquesta estructura general amb estudis cristal·logràfics i van afegir que en el lloc de tall hi ha sempre un grup 2-O-metil (Scott et al., 1995 i 1996). Tot i que les estructures obtingudes en aquests estudis cristal·logràfics reflecteixen la conformació predominant del ribozim en solució a temperatura ambient, per aconseguir la catàlisi es requereix algun petit canvi en aquesta estructura (McKay, 1996; Scott et al., 1996; Lilley, 2005).

Se sap que els ribozims *hammerhead* tallen en els triplets NUH (on H és qualsevol nucleòsid excepte guanosina). El processament més eficaç es dona davant els triplets AUC i GUC. L'eficiència de tall d'un ribozim d'aquest tipus és altament dependent de l'estructura secundària i terciària del mRNA diana.

**Introns del grup I i II.** Poden tenir des de pocs centenars fins a 2500 nucleòtids de llargada. Es caracteritzen per catalitzar el seu propi *splicing* mitjançant reaccions de transesterificació (Cech, 1990; Michel et al., 1995; Jacquier, 1996).

**Ribonucleasa P.** En tenen totes les cèl·lules i està implicada en la formació de diversos RNAs precursors, com per exemple els tRNAs, tot catalitzant el tall de seqüències específiques en els precursors. És un complex format per un RNA i una proteïna (Frank et al., 1998).

### **1.5.3. La via del RNAi**

El RNA d'interferència o RNAi és un mecanisme conservat evolutivament que permet una regulació post-transcripcional específica de seqüència en les cèl·lules dels metazous eucariotes, incloent els humans (Tomari et al., 2005).

El RNAi va ser observat per primera vegada en plantes a finals dels 80 però el seu mecanisme molecular no es va conèixer fins a finals dels 90, quan un treball sobre el nemàtode *Caenorhabditis elegans* va mostrar que el RNAi és un mecanisme de silenciament genètic evolutivament conservat (Fire et al., 1998; Reinhart et al., 2000).

#### **1.5.3.1. Mecanisme d'acció del RNAi**

La via del RNAi la inicien RNAs llargs de doble cadena (dsRNAs) que són processats fins a molècules de RNA de 21-23 nucleòtids capaces d'induir el silenciament genètic.

Existeixen dos tipus naturals d'aquests RNAs petits capaços d'actuar com a silenciadors genètics: siRNA (short interfering RNA) i miRNA (microRNA). Com s'explica a continuació, cada un d'aquests es forma a partir d'una via diferent del sistema RNAi.

**siRNA.** En la primera fase, els dsRNAs lineals o els *hairpins* de RNA (shRNA) són reconeguts i processats en el citoplasma pel Dicer, una RNasa de tipus III, fins a



dúplex de siRNA de 19-23 nucleòtids de llargada amb 2 nucleòtids desaparellats en els extrems 3' i grups fosfat en els extrems 5' (Hannon et al., 2004; Meister et al., 2004). Alternativament als dsRNA, també poden ser introduïts directament a la cèl·lula els siRNAs que, només entrar, seran fosforilats en els extrems 5' per quinases cel·lulars.

Les molècules de siRNA s'incorporen aleshores dins d'un complex multiproteic anomenat RISC (RNA-induced silencing complex) (Tuschl et al., 1999; Elbashir et al., 2001) i una helicasa dependent d'ATP present en aquest complex desplega els dúplex de siRNA permetent que una de les dues cadenes, concretament la cadena antisentit anomenada cadena guia, s'incorpori dins el RISC i

es formi així un complex RNA-proteïna conegut com a siRISC (Hammond et al., 2000; Martinez et al., 2002). La cadena sentit del siRNA, també anomenada cadena passatgera, és alliberada i degradada.

Les proteïnes del RISC col·loquen la cadena guia en una posició favorable perquè s'uneixi al mRNA diana i juxtaposen la unitat catalítica de l'endonucleasa del RISC amb l'enllaç fosfat situat entre els nucleòtids 10 i 11 de la cadena guia del siRNA. És per tant la cadena antisentit del dúplex la que fixa la posició de tall del mRNA.

La fosforilació a 5' de la cadena guia és essencial per a la funció del siRNA ja que és el nucleòtid 5' inicial qui determina la posició de tall de l'endonucleasa sobre el fosfat

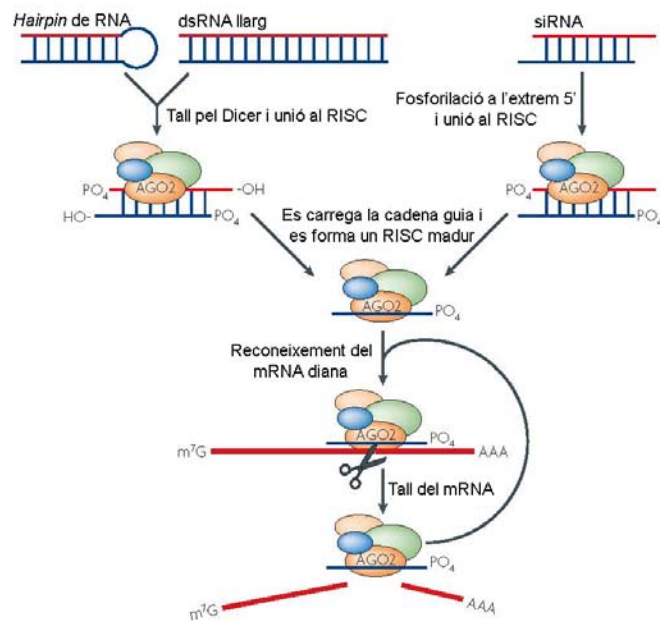


Figura 16. Passos que es donen per a la formació i funcionament del complex siRISC. [De: Rana., 2007].

situat entre els nucleòtids 10 i 11 (Elbashir et al., 2001). L'endonucleasa sempre talla en la mateixa posició, independentment de l'extrem 3' en la cadena guia (que serà el que determinarà que la llargada del siRNA sigui de 17, 19 o 21 nucleòtids). S'ha observat que diferents modificacions de l'extrem 5' (2'-O-metil) bloquegen la via RNAi, però les modificacions a l'extrem 3' són tolerades (Rychahou et al., 2006).

En mamífers, l'endonucleasa del RISC que talla el mRNA selectivament entre els nucleòtids 10 i 11 del siRNA és Ago2, un membre de la família de les proteïnes Argonaut que són capaces d'unir-se a siRNAs. Aquesta proteïna té dos dominis estructurals principals: PAZ (*Piwi/Argonaute/Zwille*) i Piwi. Aquest últim comparteix característiques estructurals amb la Rnasa H (Liu et al., 2004; Meister et al., 2004).

Sembla que també és Ago2 qui destrueix la cadena del siRNA que no s'incorpora en el RISC (Matranga et al., 2005; Rand et al., 2005). A diferència, la cadena guia queda associada al complex permetent que diferents mRNAs puguin entrar-hi i ser degradats.

**miRNA.** Són RNAs endògens no codificants de 19-25 nucleòtids que estan implicats tant en processos de regulació post-transcripcional com en altres mecanismes de regulació genètica encara no definits (Bartel, 2004). Actualment se sap que en humans i ratolins n'existeixen uns 200 (Lagos-Quintana et al., 2003; Tomari et al., 2005).

La biogènesi del miRNA comença en el nucli. Inicialment, els miRNAs són transcrits per la RNA polimerasa II i s'obtenen trànscrip primaris de miRNA (pri-miRNAs) que poden tenir centenars de nucleòtids de llargada i es pleguen formant estructures amb loops (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004). El complex format per la RNasa III nuclear Drosha i el seu cofactor DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene-8*) talla aquests pri-miRNAs per formar pre-miRNAs, estructures de RNA d'uns 70 nucleòtids amb grups 5' fosfat i 2 nt desaparellats en els extrems 3' (Denli et al., 2004; Kim, 2005).

El pre-miRNA és molt semblant en estructura al shRNA (*short hairpin RNA*), ja que ambdós són curts *hairpins* de RNA amb 2 nt sobresortint a l'extrem 3'.

Ambdós, pre-miRNAs i shRNAs s'uneixen al complex nuclear format per un factor nuclear anomenat Exportina 5 (Exp5) i el seu cofactor Ran-GTP (Yi et al., 2003; Lund et al., 2004). Aquest complex transporta els pre-miRNAs i shRNAs cap al citoplasma on es produeix la hidròlisi del Ran-GTP i s'alliberen així els RNAs transportats pel complex. A partir d'aquí, els pre-miRNAs i shRNAs, al igual que els siRNAs, són processats per la RNasa III citoplasmàtica anomenada Dicer (Bernstein et al., 2001; Zhang et al., 2002).

Aquesta RNasa processa els pre-miRNAs cap a miRNAs madurs d'uns 22 nt que s'uniran al RISC per tal de portar a terme el silenciament gènic. Els complexos RISC carregats amb el miRNA (miRISCs) reconeixen la seqüència del mRNA diana (normalment amb una homologia inferior al 100%) i s'uneixen a la regió 3' UTR d'aquest. Sense una unió perfecta entre les dues molècules de RNA, el mRNA diana no es talla sinó que es reprimeix la seva traducció.

Alguns estudis (Liu et al., 2005; Chu et al., 2006) han demostrat que varis complexos miRISC poden unir-se a un únic mRNA diana i transportar-lo fins a unes estructures citoplasmàtiques anomenades cossos P que reprimirien la seva traducció. Els mRNAs reprimits poden ser emmagatzemats en els cossos P o entrar en la via de degradació. Segons les condicions cel·lulars i els estímuls, els mRNAs emmagatzemats poden tornar a la via de traducció o passar a la ruta de degradació (Rana, 2007).

No se sap encara quins són els factors que decideixen que un mRNA sigui tallat o que simplement es reprimeixi la seva traducció quan aquest s'uneix al complex miRISC o siRISC. Fins ara, les evidències indiquen que una complementarietat perfecta en la part central del dúplex siRNA-mRNA porta cap a la via de tall del mRNA. La presència de protuberàncies o altres irregularitats en aquesta regió evitaran el tall.

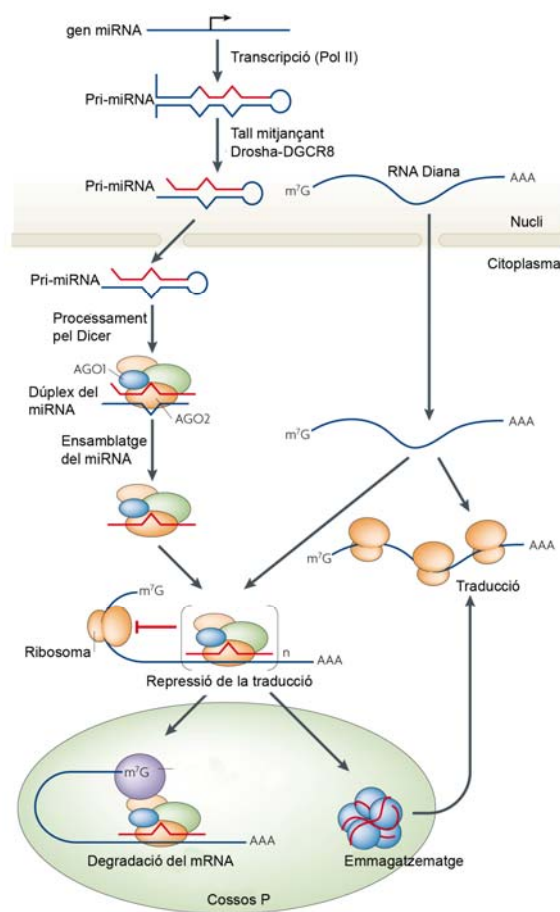


Figura 17. Model per a la funció del miRISC humà. [De: Rana, 2007]

### 1.5.3.2. siRNA en cèl·lules mamíferes

El silenciament específic i efectiu de gens via RNAi en *C.elegans* i *D.melanogaster* pot aconseguir-se utilitzant llargs dsRNAs ( $\geq 500$  pb) (Mello et al., 2004). A més, els dsRNAs poden ser introduïts en els nemàtodes per injecció directa o remullant els cucs en una solució de dsRNAs (Wang et al., 2005). No obstant, aquest no és el cas dels sistemes mamífers.

Primerament, els dsRNAs de més de 30 pb activen el sistema immune innat tot desencadenant la via de l'interferó  $\gamma$ . Diferents estudis van demostrar que per evitar aquesta activació, calia utilitzar siRNAs de doble cadena de 21-23 pb generats per

síntesi química (Elbashir et al., 2001), tall enzimàtic (Kittler et al., 2004) o sistemes d'expressió (Zheng et al., 2004).

En segon lloc, es va demostrar també que els dúplex de siRNA han de ser transfectats dins les cèl·lules de mamífer utilitzant fórmules basades en lípids (Brazas et al, 2005), electroporació (Gresch et al., 2004) o unint-los a pèptids (Muratovska et al., 2004).

Gràcies a la gran utilització que s'ha fet en els últims anys dels siRNAs, s'ha pogut definir l'estructura bàsica perquè un siRNA sigui més efectiu. Aquesta comporta la presència d'un dúplex de RNA de 19 pb amb 2 nucleòtids sobresortint en els extrems 3'. Se sap també que l'efectivitat de silenciament d'un siRNA és específic de seqüència i, per tant, s'han desenvolupat normes per al disseny correcte de siRNAs.

#### **1.5.3.3. Selecció d'un siRNA eficient**

Des de fa uns anys, s'han identificat varis factors que contribueixen al disseny d'un siRNA eficaç.

Tuschl i els seus col·laboradors van ser dels primers científics en establir alguns dels criteris a tenir en compte a l'hora de seleccionar la seqüència diana del siRNA (Elbashir et al., 2002). Aquests són:

- La regió seleccionada preferiblement ha d'estar localitzada en la zona codificant del gen, com a mínim 50 nucleòtids després de la metionina inicial.
- El contingut en GC hauria de ser d'aproximadament el 50%
- Una seqüència de tipus AA N19 TT sembla ser avantatjosa.
- Cal realitzar un BLAST (alineació de seqüències) per assegurar-se que el siRNA no presenta homologies significants amb altres gens diferents al d'interès.

Tot i que aquests criteris de selecció han estat utilitzats amb èxit en varis experiments de RNAi, una descoberta important per a poder realitzar una selecció encara més

acurada d'un siRNA actiu va ser el fet de descobrir que cada una de les dues cadenes d'un siRNA o miRNA s'incorpora al RISC de manera asimètrica (Khvorova et al., 2003; Schwars et al., 2003). Així, es va veure que els dúplex funcionals tenen una estabilitat termodinàmica relativa més baixa a l'extrem 5' de la cadena antisentit que els dúplex no funcionals. Sembla que és l'estabilitat relativa de les bases situades en els extrems de cada una de les cadenes d'un siRNA la que determina quina de les dues cadenes entrarà a la via del RNAi.

Aquests criteris van ser refinats més tard quan el grup de Reynolds va realitzar un anàlisi de 180 siRNAs que tenien com a diana els mRNAs de dos gens diferents (Reynolds et al., 2004). Amb l'estudi van definir 8 criteris a tenir en compte per tal de millorar la selecció de siRNAs potents (veure Taula III). Segons aquest sistema de puntuació, un siRNA amb un total de 6 o més punts sembla que té unes probabilitats més elevades d'eficiència de silenciament gènic.

**Taula III. Criteris a tenir en compte per al disseny d'un siRNA funcional, segons Reynolds et al.**

<b>Criteri</b>	<b>Puntuació</b>
Contingut de GC entre 30-52 % (en un siRNA de 19pb)	1
A o U en les posicions 15-19	1 per cada una
A en la posició 19	1
A en la posició 3	1
U en la posició 10	1
G o C en la posició 19	-1
G en la posició 13	-1

Tot i que la majoria dels mètodes existents per al disseny d'un siRNA efectiu es basen en una combinació dels criteris proposats per Tuschl (per tal de trobar les zones diana adequades dins la regió codificant d'un gen) i amb el sistema de puntuació de

Reynolds (per tal de validar l'eficiència d'un potencial siRNA), diferents estudis mostren que aquests dos paràmetres no són suficients per explicar totalment o predir la potència dels siRNAs (Kurreck, 2006).

Així per exemple, estudis posteriors als de Reynolds (Heale et al., 2005; Schubert et al., 2005) van demostrar que l'estructura secundària del mRNA diana és de gran importància per a l'eficiència del siRNA. S'ha vist que la presència d'estructures *hairpin* dins de la regió diana del mRNA redueixen considerablement la potència del siRNA. A més, sembla que existeix una correlació lineal entre el silenciament que produeix el siRNA i l'energia lliure de la regió diana del mRNA.

Diferents algorismes disponibles gratuïtament, com el servidor web Sfold (Ding et al., 2004), permeten dissenyar siRNAs basant-se en les propietats termodinàmiques dels dúplex però considerant també la predicció de les estructures secundàries en la zona d'unió del mRNA.

Un altre factor que també sembla influenciar en la funcionalitat d'un siRNA és l'estructura de la seva cadena guia (Patzel et al., 2005). Així, després de testar varis siRNAs, es va veure que l'eficiència d'aquests augmentava quan les seves cadenes guies en l'extrem 3' no formaven estructures definides o tenien nucleòtids terminals lliures. Contràriament, estructures amb aparellament de bases en els extrems eren virtualment inactives.

Més tard, altres estudis (Kim et al., 2005; Siolas et al., 2005) van demostrar que el silenciament genètic òptim s'aconseguia amb siRNAs de 27 o 29 nucleòtids de llargada. Sembla que aquests eren 100 vegades més potents que els siRNAs convencionals de 21 pb.

Totes aquestes característiques són importants però no porten encara a un mètode concret per a determinar la potència d'un siRNA. Per tant, la prova experimental del siRNA dissenyat és de moment imprescindible. Probablement hi ha implicats altres factors que encara es desconeixen i que fan necessària la recerca continua en aquest camp.

#### **1.5.3.4. Silenciament genètic estable. shRNA *versus* siRNA**

El silenciament genètic és dependent del número de molècules de siRNA transfectades dins la cèl·lula i els dúplex es dilueixen progressivament a mesura que la cèl·lula es divideix. La persistència de l'activitat siRNA en cèl·lules de mamífer varia segons l'estat proliferatiu de les cèl·lules. Així per exemple, l'activitat siRNA és present durant 3-7 dies en cèl·lules proliferatives però pot persistir fins a tres setmanes o més en cèl·lules terminalment diferenciades com és el cas de les neurones (Omi et al., 2004). Per intentar solucionar aquest problema, s'han desenvolupat sistemes basats en vectors plasmídics que permeten introduir el siRNA dins la cèl·lula i obtenir una expressió estable d'aquest. Aquests vectors contenen promotors de RNA polimerases III que permeten l'expressió del shRNA que serà després tallat pel Dicer per produir els siRNAs. Selecció amb l'antibiòtic adequat, es poden obtenir línies cèl·lulars estables. Aquests sistemes plasmídics han estat utilitzats amb èxit per obtenir knock-downs estables de diferents gens en cèl·lules de mamífer (Mittal, 2004). Alguns treballs recents també indiquen que els shRNAs són inductors més potents de la via RNAi que els siRNA (Siovas et al., 2005).



### 1.5.3.5. RNAi i Retinosi Pigmentària.

En els últims anys s'han desenvolupat diferents tècniques de teràpia gènica que s'han testat sobre cultius cel·lulars, explants de retina i sobre diferents models animals transgènics de Retinosi Pigmentària.

Es van començar primer a utilitzar els ribozims com a molècules per al silenciament genètic. Així, s'han dissenyat diferents tipus de ribozims capaços de silenciar mRNAs portadors de diferents mutacions associades a RPAD (Hauswirth et al., 2000; O'Neill et al., 2000). Més tard, es van donar a conèixer les molècules de siRNA i shRNA i es van començar a utilitzar per al disseny d'estudis de silenciament contra mutacions concretes en gens relacionats amb RPAD. Una de les més estudiades ha estat la mutació P23H trobada en el gen de la rodopsina (Tessitore et al., 2006).

Degut però a que la Retinosi Pigmentària és una malaltia provocada per una varietat molt àmplia de mutacions diferents, es va començar a pensar en el desenvolupament de teràpies independents de mutació ja que haver de fer una teràpia específica per cada mutació era econòmicament inviable. Així, es van començar, i s'estan multiplicant en els últims anys, diferents estudis *in vitro* i *in vivo* sobre mutants de rodopsina en els que s'utilitzen tècniques de RNAi per silenciar els mRNAs de rodopsina, tant salvatges com mutats, i s'introdueix després un gen de rodopsina degenerat capaç de reestablir la funció eliminada i sobre el que no actua la molècula de RNAi (Cashman et al., 2005; Kiang et al., 2005; O'Reilly et al., 2007 i 2008). Aquesta tècnica, coneguda amb el nom de supressió i substitució gènica, s'ha aplicat sobretot en models animals transgènics portadors de mutacions en rodopsina ja que la causa més important de RPAD són mutacions en aquest gen. Hi ha però també alguns estudis que han trobat en la tècnica de supressió i substitució una bona eina de teràpia gènica per aplicar *in vitro* o sobre models animals amb mutacions en RDS (Palfi et al., 2006) o IMPDH1 (Tam et al., 2008). Tots aquests estudis d'interferència gènica obren una via important en el camp

de la teràpia i aporten aproximacions terapèutiques que poden ser útils no només per a la cura de la RPAD sino també per a l'estudi d'altres malalties genètiques amb herència dominant.



## **2. OBJECTIUS**

---



## 2. OBJECTIUS

Els objectius d'aquesta Tesi han estat:

1. Detecció de mutacions relacionades amb l'expressió gènica en famílies amb RPAD.
2. Expressió *in vitro* de gens portadors de mutacions que afecten la regulació gènica i s'associen a RPAD.
3. Localització cel·lular i mecanismes patogènics de mutants que afecten la regulació gènica i s'associen a RPAD.
4. Desenvolupament de tècniques RNAi com a aproximació terapèutica a la RPAD.



### **3. MATERIAL I MÈTODES**

---

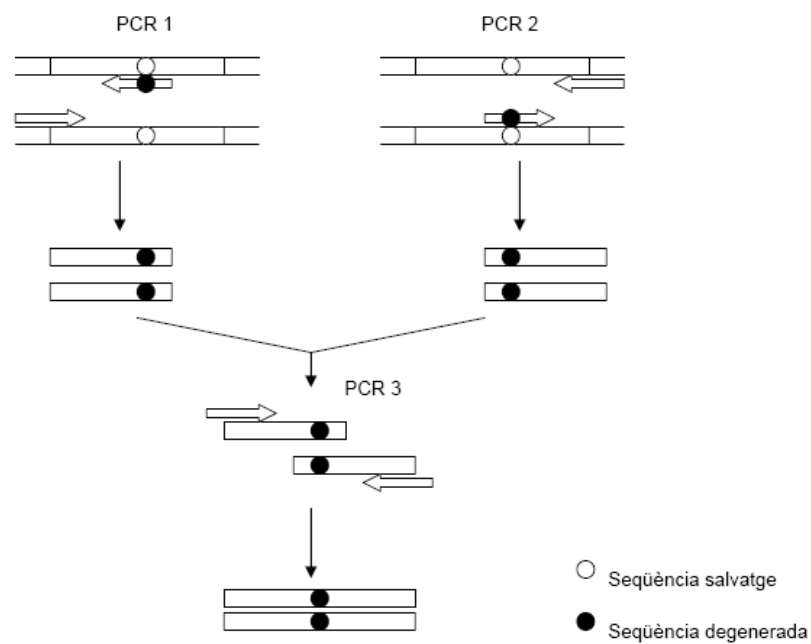




### 3. MATERIAL I MÈTODES

#### 3.1. Mutagènesi del DNA mitjançant la tècnica d'*overlap extension PCR*

Una de les tècniques utilitzades per a fer mutagènesi sobre fragments de DNA és l'anomenada "overlap extension PCR". A continuació es mostra l'esquema i protocol que cal seguir per a obtenir el fragment desitjat, portador dels canvis nucleotídics corresponents.



**Figura 18.** Tècnica "overlap extension PCR". L'esquema mostra els passos a seguir per a realitzar la mutagènesi d'un fragment de DNA mitjançant la tècnica esmentada.

1. En la primera ronda, es fan dues PCRs utilitzant en cada una d'elles un encebador extern i un encebador intern complementari al DNA i portador del canvi o canvis nucleotídics que es volen introduir en el fragment a estudiar.  
Els encebadors interns utilitzats en cada una de les dues PCRs han de tenir una regió idèntica.
2. Es realitza després una tercera PCR amb els encebadors externs i utilitzant com a motlle de DNA una barreja dels dos productes de PCR obtinguts anteriorment. Al tenir aquests productes una petita zona complementària, s'uneixen durant la fase d'anellament i, a partir dels encebadors externs, s'obté el fragment de DNA complet portador de la mutació o mutacions desitjades.

### **3.2. Clonatge d'un fragment de DNA dins un vector plasmídic**

El clonatge d'un fragment de DNA dins un vector es realitza de diferents maneres segons quin sigui el vector utilitzat.

Un dels mètodes es basa en la recombinació entre diferents vectors de DNA (utilitzat, per exemple, en el sistema Gateway (veure punt 3.3.)).

El mètode més utilitzat però es basa en la lligació entre un fragment de DNA (o insert) i un vector plasmídic tractats ambdós amb un enzim de restricció comú. A continuació es mostra el protocol a seguir en aquest tipus de clonatge.

#### **1. Digestió del fragment de DNA i del vector**

Barrejar en un tub de microcentrífuga:

Fragment de DNA / Vector	15 µl
Enzim de restricció	1 µl

Tampó de l'enzim		x $\mu$ l (segons la concentració final requerida per l'enzim)
Aigua	q.s.p	50 $\mu$ l

Incubar la mescla 1h 30 minuts a 37 °C. Seguidament inactivar l'enzim de restricció tot incubant durant 20 minuts a 65 o 80 °C (segons els requeriments de l'enzim utilitzat).

## 2. Defosforilació del vector (utilitzant l'enzim *Antarctic Phosphatase*, de Biolabs)

Barrejar en un tub de microcentrífuga:

Vector digerit		44 $\mu$ l
Enzim <i>Antarctic Phosphatase</i>		1 $\mu$ l (5 unitats)
Tampó de reacció de l'enzim, 10x		5 $\mu$ l

Incubar 15 minuts (per vectors amb extrems 5' protuberants o extrems roms) o 60 minuts (per vectors amb extrems 3' protuberants) a 37 °C. Seguidament inactivar durant 20 minuts a 65 °C.

## 3. Lligació del fragment de DNA i vector digerits (utilitzant el "Rapid DNA Ligation kit", de Roche)

Mesclar en un microtub:

Vector digerit		x $\mu$ l *
Insert de DNA		y $\mu$ l *
Tampó de dilució, 5x		2 $\mu$ l
Aigua	q.s.p	10 $\mu$ l

Barrejar bé tots els components i afegir després:

Tampó de lligació, 2x	10 µl
Lligasa T4	1 µl

Incubar 5 minuts a temperatura ambient.

\* Es fan dues relacions diferents de vector:insert. Normalment, 1:3 i 2:4. Els valors x i y es calculen segons les concentracions de cada molècula de DNA.

#### **4. Preparació i transformació de cèl·lules *E.coli* Z-competents**

Per a l'obtenció d'*E.coli* Z-competents i posterior transformació s'utilitza el kit "Z-competent *E.coli* transformation kit and Buffer Set", de Zymo Research. L'eficiència de transformació és de  $2 \times 10^8$  –  $1 \times 10^9$  cèl·lules transformades per µg de plàsmid pUC19.

##### Preparació de les cèl·lules Z-competents

1. Inocular 0.5 ml d'un cultiu fresc d'*E.coli* (que hagi estat creixent o/n en LB) en 50 ml de medi S.O.B. Mantenir el cultiu en agitació a 20-25 °C fins aconseguir una  $DO_{600}$  de 0.4 – 0.6.
2. Deixar el cultiu en gel durant 10 minuts. Després, centrifugar les cèl·lules a 3000 r.p.m. durant 6 minuts a 0-4 °C.
3. Eliminar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 5 ml de *Wash Buffer* 1x fred. Centrifugar a 3000 r.p.m. durant 6 minuts a 0-4 °C.
4. Eliminar completament el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 5 ml de *Competent Buffer* 1x fred.
5. Aliquotar 100-200 µl de cèl·lules en microtubs i posar en gel. Les cèl·lules es poden transformar directament o emmagatzemar-se a -70 °C.

### Transformació de les cèl·lules Z-competents

1. Agafar 100 µl de cèl·lules Z-competents i afegir 1-5 µl de DNA.
2. Barrejar i incubar en gel durant 5-10 minuts.
3. Afegir 4 volums de SOC per cada 100 µl de barreja de transformació i incubar a 37 °C durant 1 hora. Aquest pas no és necessari quan s'utilitza ampicilina com a antibiòtic de selecció però és altament recomanat si es fa servir kanamicina o tetraciclina per a la selecció dels clons.
4. Sembrar 50-100 µl del cultiu en una placa d'agar selectiva pre-escalfada a 37 °C.

### **5. Anàlisi dels clons positius**

1. Agafar vàries de les colònies que han crescut a la placa i posar-les a créixer en medi TB amb l'antibiòtic corresponent.
2. Analitzar per PCR els clons per tal de saber quins d'ells contenen el vector amb l'insert desitjat.
3. Posar a créixer o/n en 50-200 ml de TB el clon d'interès i aïllar després el DNA plasmídic. Al laboratori s'utilitzen els kits "HiSpeed midi/maxi Plasmid DNA purification Kit", de Qiagen.
4. Analitzar el plàsmid purificat per seqüenciació directa.

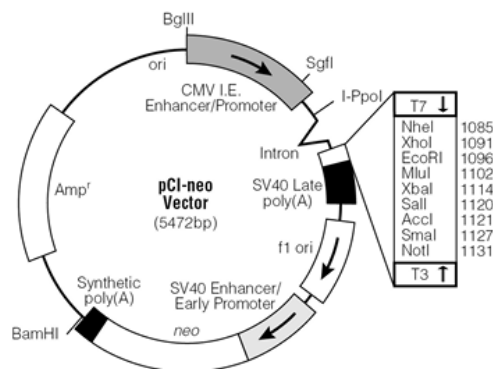
Utilitzant aquesta tècnica de clonatge, s'han dissenyat al laboratori diferents construccions plasmídiques. A continuació es mostren els vectors i encebadors utilitzats.

### Clonació dins el vector pCI-neo

Dins el vector d'expressió pCI-neo, de Promega, es van clonar diferents cDNAs de gens associats a RPAD.

**Taula IV. Encebadors utilitzats per al clonatge del cDNA de NRL dins el vector pCI-neo.** Les dianes de restricció utilitzades (*EcoRI* i *Sall*) estan subratllades.

Nom	Seqüència (5' - 3')	Tm (°C)
<b>MM-NRL-F</b>	CATAAGAAATCCGAATTCCAGCCCAGCTCCAGAATG	73.4
<b>MM-NRL-R</b>	CAAGTCTCTATGGAGCTCGTCCGACCAGCCCCACTACACCACAAG	> 75



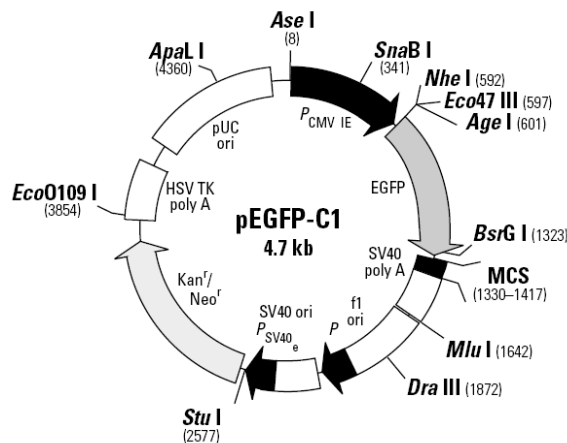
**Figura 19. Vector pCI-neo.** Utilitzat per al clonatge de diferents fragments de cDNA.

### **Clonació dins el vector pEGFP**

Dins el vector d'expressió pEGFP, de Clontech, es va clonar el cDNA, provinent del mRNA salvatge o mutat, del gen RHO. Utilitzant aquest vector es volia obtenir una proteïna de fusió entre GFP i els diferents cDNAs de RHO; per aconseguir-ho, es van utilitzar els encebadors descrits a la Taula V. Aquests encebadors a més de contenir una diana de restricció adient per al clonatge del fragment de DNA dins el vector, es van dissenyar de manera que permetessin mantenir la pauta de lectura desitjada en RHO.

**Taula V. Encebadors utilitzats per al clonatge del cDNA de rodopsina dins el vector pEGFP.** Les dianes de restricció utilitzades (*EcoRI* i *Sall*) estan subratllades. En vermell es marca el codó inicial i final de la seqüència codificant i en gris/blanc es mostra la pauta de lectura de la proteïna resultant.

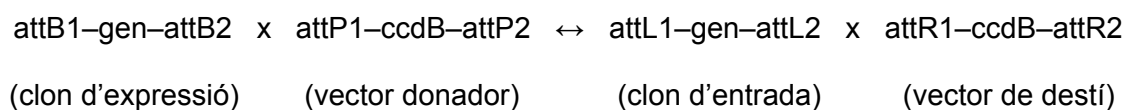
Nom	Seqüència (5' - 3')	Tm (°C)
RHOpEGFP-F	AAGCTTCGAATTCTATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACT	73.1
RHOpEGFP-R	GGTACCGTCGACTTAGGCCGGGGCCACCTGGCTCGT	83.7



**Figura 20. Vector pEGFP-C1.** Utilitzat per al clonatge dels diferents cDNAs de RHO que donarà com a resultat proteïnes de fusió amb GFP.

### 3.3. Sistema de vectors Gateway

El sistema Gateway (d'Invitrogen) és un sistema de clonatge universal basat en les propietats de recombinació específica de lloc del bacteriòfag lambda. Aquest sistema permet moure de manera ràpida i eficient seqüències de DNA entre diferents tipus de vectors per a realitzar tant anàlisis funcionals com d'expressió de proteïnes.





La reacció de recombinació entre extrems attB x attP és mediada per l'enzim "Gateway BP Clonase" mentre que la reacció attL x attR és portada a terme per l'enzim "Gateway LR Clonase".

### **3.3.1. Construcció de vectors Gateway**

#### **1. Obtenció d'un fragment de DNA flanquejat per cues attB**

Per poder introduir una seqüència de DNA determinada dins un vector donador del Sistema Gateway (pDONR), cal que aquest DNA estigui flanquejat per les anomenades seqüències attB, necessàries perquè es doni la recombinació de dita seqüència amb el vector.

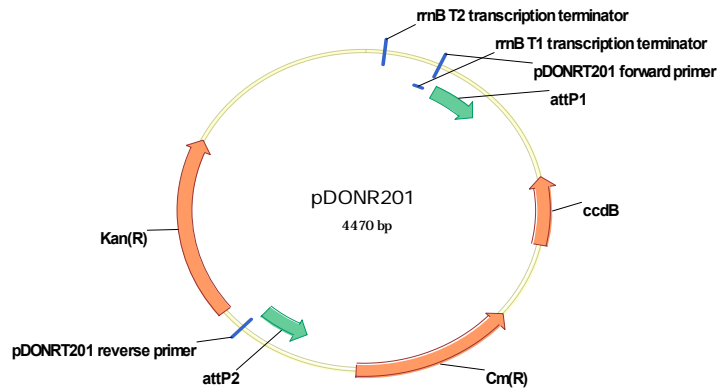
Així, cal amplificar la seqüència nucleotídica que es vol introduir en el vector utilitzant encebadors que portin en els extrems 5' les cues attB.

Taula VI. Encebadors utilitzats per a l'obtenció dels cDNAs de NRL i CRX flanquejats per cues attB (marcades en negreta i cursiva).

Nom	Seqüència (5' - 3')	Producte amplificat
<b>NRLgway-F</b>	<i>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</i> TCCCAGCTCCAGAATG	cDNA de NRL
<b>NRLgway-R</b>	<i>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</i> GGCCCCCACTACACCACAAG	
<b>CRXgway-F</b>	<i>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</i> CAAGATCATGATGGCGTATAT	cDNA de CRX
<b>CRXgway-R</b>	<i>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</i> CGATGGAGAGAGATGGAGA	

#### **2. Reacció de recombinació BP**

Un cop obtinguts els productes de PCR amb cues attB, cal clonar-los dins un vector donador (amb seqüències attP). En aquest cas, el vector escollit va ser el pDONR-201.



**Figura 21. Vector pDONR201.** Es poden veure les seqüències de recombinació attP1 i attP2.

Els passos a seguir per a la realització de la reacció BP són:

1. Barrejar en un tub de microcentrifuga:

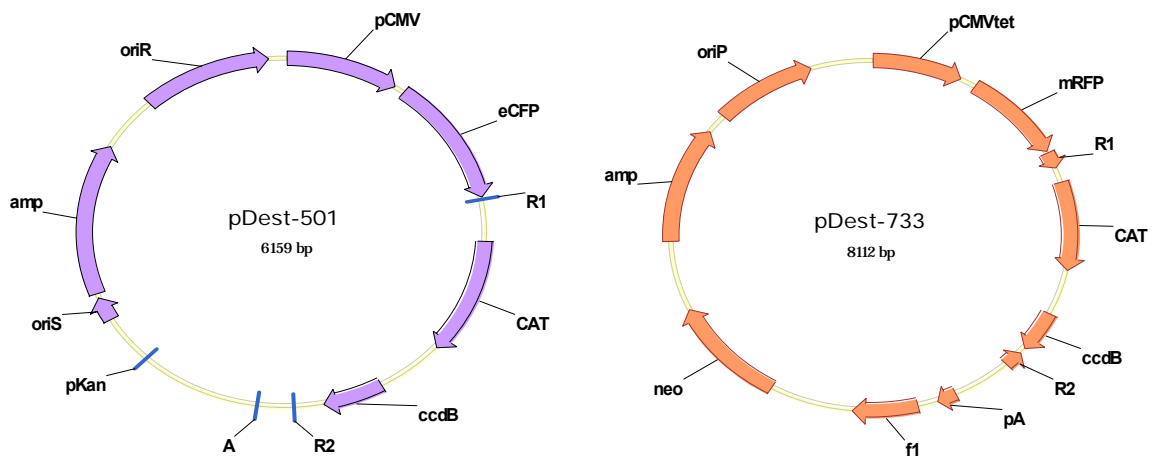
Producte de PCR amb extrems attB	1-5 $\mu$ l
Vector donador (pDONR™) (150 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
<i>BP Clonase™ Reaction Buffer</i> , 5x	2 $\mu$ l
Tampó TE, pH 8	q.s.p 8 $\mu$ l

2. Treure el “BP Clonase™ enzyme mix” de -80 °C i posar-lo en gel durant 2 minuts. Agitar breument amb vòrtex.  
Afegeix a cada reacció 2  $\mu$ l de l'enzim. Agitar i centrifugar breument.
3. Incubar la reacció a 25 °C durant 60 minuts.
4. Afegeix 1  $\mu$ l de Proteïnasa K per tal d'aturar la reacció. Vòrtex.
5. Incubar a 37 °C durant 10 minuts.
6. Transformació de cèl·lules DH5 $\alpha$ 
  - 1- Transformar 1  $\mu$ l de cada reacció BP en 50  $\mu$ l de cèl·lules competents DH5 $\alpha$ .
  - 2- Incubar en gel 30 minuts.

- 3- Fer un xoc tèrmic a les cèl·lules incubant-les durant 45 segons a 42 °C. Seguidament, posar en gel 2 minuts.
- 4- Afegir 450 µl de medi SOC i incubar una hora a 37 °C en agitació.
7. Sembrar 20-100 µl de cada transformació en plaques d'agar amb kanamicina (50 µg/ml).
8. Seleccionar un dels clons crescuts en agar. Es fa créixer tota la nit en medi líquid TB amb antibiòtic i es fa després una midiprep o maxiprep (utilitzant el kit "HiSpeed Plasmid Midi Kit" o "HiSpeed Plasmid Maxi Kit", ambdós de Qiagen).

### 3. Reacció de recombinació LR

Una vegada obtingut el vector pDONR amb l'insert corresponent, es procedeix a fer la segona recombinació de lloc específic. En aquest cas, és una recombinació del tipus LR on el clon d'entrada (amb seqüències attL) és un dels obtinguts anteriorment i, el clon de destí (amb seqüències attR) és un vector pDEST.



**Figura 22. Vectors pDEST-501 i pDEST-733.** Ambdós utilitzats al laboratori com a vectors de destí en el Sistema Gateway de clonatge. Les seqüències de recombinació attR estan senyalades com a R1 i R2.

Els passos a seguir per a realitzar la reacció LR són els següents:

1. Posar, per cada mostra, en un tub de microcentrífuga:

Clon d'entrada (100-300 ng)		1-5 µl
Vector de destí (pDEST) (150 ng/ µl)		1 µl
<i>LR Clonase™ Reaction Buffer, 5x</i>		2 µl
Tampó TE, pH 8	q.s.p	8 µl

2. Treure el “LR Clonase™ enzyme mix” de -80 °C i posar en gel durant 2 minuts.  
Agitar breument amb vòrtex.  
Afegir a cada reacció 2 µl de l'enzim. Agitar i centrifugar breument.
3. Incubar les reaccions a 25 °C durant 60 minuts.
4. Afegir 1 µl de Proteïnasa K a cada mostra per tal d'aturar la reacció. Vòrtex.
5. Incubar a 37 °C durant 10 minuts.
6. Transformació de cèl·lules DH5α (explicat anteriorment).
7. Plaquejar 20-100 µl de cada transformació en plaques d'agar amb ampicil·lina (50 µg/ml) .
8. Seleccionar un dels clons crescuts en agar i aïllar el DNA plasmídic fent una midi o maxiprep.

### 3.4. Disseny de ribozims, siRNAs i shRNAs

S'han dissenyat varies molècules (ribozims, siRNAs i shRNAs) per tal d'interferir diferents gens i productes de *splicing* relacionats amb RPAD.

### **3.4.1. Disseny i selecció de la seqüència del siRNA**

Per al disseny i selecció de cada un dels siRNA d'interès es va utilitzar principalment el programa Sfold.

El *software* de Sfold està basat en varis algorismes desenvolupats per Ding i Lawrence (Ding et al., 2004). Un dels principals objectius d'aquest *software* és oferir eines computacionals per al disseny de siRNAs, oligonucleòtids antisentit i ribozims efectius per al silenciament genètic.

El programa ofereix tres mòduls diferents anomenats SiRNA, Soligo i Sribo que proporcionen les eines adequades per al disseny de siRNAs, oligonucleòtids antisentit i ribozims, respectivament. A més, existeix un quart mòdul, Srna, que ofereix una representació de les estructures secundàries del RNA analitzat. El servidor Sfold està disponible al web <http://sfold.wadsworth.org>.

La metodologia de Sfold per al disseny dels siRNAs es basa en criteris dissenyats empíricament per Reynolds et al (Reynolds et al., 2004), en la predicció de l'accessibilitat al mRNA diana i en les propietats termodinàmiques del siRNA dúplex. A continuació es detallen cada un d'aquests apartats.

- Criteris empírics per als dúplex de siRNA.
  - Els siRNAs haurien d'estar formats per una cadena sentit i una antisentit aparellades, ambdues de 21 nt. En els extrems 3' haurien de tenir 2 nt dTdT penjant.
  - La seqüència del siRNA hauria de tenir un contingut en GC baix o moderat (30-60%).
  - S'haurien d'evitar les seqüències amb 3 Gs o Cs contigües.
  - Caldria evitar també seqüències de 4 As o Ts seguides.

- Accessibilitat i estructura secundària del mRNA diana. Les regions de cadena simple que es troben en l'estructura secundària del RNA són accessibles a la unió d'àcids nucleics a través de la interacció de les bases. L'accessibilitat a la diana que tenen tant els siRNAs com els ribozims i els oligonucleòtids antisentit és un factor important per a la potència del silenciament que realitzen.
- Propietats termodinàmiques del siRNA. Les anàlisis estadístiques publicades revelen que els siRNAs funcionals tenen a l'extrem 5' antisentit una estabilitat interna inferior que en l'extrem 5' de la cadena sentit. Sembla que tant l'estabilitat absoluta com la relativa dels extrems del siRNA dúplex determinen el grau amb el que cada una de les dues cadenes del dúplex participarà en la via RNAi. A més, els siRNAs funcionals tendeixen a tenir una inestabilitat relativa en el lloc de tall, que sembla facilita l'alliberament del mRNA i la repetició del cicle (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003).

El Sfold dóna una puntuació total a cada siRNA predit. Aquesta puntuació s'obté segons quina sigui l'accessibilitat a la diana, les característiques de la seqüència del dúplex i la termodinàmica d'aquest.

A més, Sfold recomana fer un BLAST nucleòtid-nucleòtid contra la base de dades de l'organisme seleccionat per tal d'evitar efectes no específics degut a l'homologia entre el siRNA i gens diferents al d'interès. Un bon criteri és que hi hagi com a mínim 2 desaparellaments entre el siRNA seleccionat i els gens que no són diana.

A més del *software* Sfold, tant per al disseny com per a la síntesi dels siRNAs es va consultar també el programa "siRNA Wizard", un *software* gratuït de la casa comercial Invivogen (<http://www.siRNAwizard.com>) i les fonts informàtiques i bases de dades de la casa comercial Ambion (<http://www.ambion.com/techlib/resources/siRNA>).

Un cop seleccionada i dissenyada la seqüència del siRNA a estudiar (21 nt), hi ha dues opcions:

- Sintetitzar el siRNA com a molècula de RNA dúplex i transfectar-la d'aquesta manera dins la cèl·lula. Es parlarà en aquest cas d'una molècula de siRNA.
- Sintetitzar el siRNA en forma de doble cadena de DNA. Aquesta doble cadena ha de ser anellada i clonada dins un plàsmid adequat per ser després transfectada en els cultius cel·lulars. Es parlarà en aquest cas de shRNAs.

Si s'escull la primera opció, només cal demanar a una casa comercial la síntesi del siRNA i procedir després amb la transfecció. En el cas d'utilitzar la segona opció, el procés és més complex (veure punt 3.4.2.).

**Taula VII. siRNAs, shRNAs i ribozims dissenyats al laboratori.** En groc es marquen les zones dels shRNAs i ribozims que interaccionaran amb el mRNA corresponent.

Nom	Seqüència (5' – 3')
siRNA R3811B1	ACCUUGGCUGUCCCAAGUtt ttUGGAACCGACAAGGGUUCA
siRNA R3811B5	UCCAGCUCGUCUUCACCGUtt ttAGGUCGAGCAGAAGUGGCA
siRNA Rho5167	CAAGCAGAACCCACUGGGUtt ttGUUCGUCUUGGGUGACCCA
shRNA PRPF8- lab	GTACCTC <b>GGAGGTTTACTCTGCGGAT</b> TCAAGAG <b>ATCCGCAGAGTAAACCTCC</b> TTTTTGGAAA GAG <b>CCTCCAAATGAGACGCCTA</b> AGTTCTC <b>TAGGCGTCTCATTGGAGG</b> AAAAAACCTTTTCGA
Ribozim PRPF8- lab	GTACCTC <b>ATCCGCA</b> CTGATGAGGCCGAAAGGCCGAA <b>AGTAAAC</b> TTTTTGGAAA GAG <b>TAGGCGT</b> GACTACTCCGGCTTTCCGGCTT <b>TCATTTG</b> AAAAAACCTTTTCGA
siRNA PRPF8- lab	GGAGGUUUACUCUGCGGAUtt ttCCUCCAAAUGAGACGCCUA

siRNA NRL40	UGACUUUGACUUGAUGAAGtt ttACUGAAACUGAACUACUUC
siRNA NRL69	AGCGGGAACCCUCUGAGGGtt ttUCGCCCCUUGGGAGACUCCC
shRNA NRL69	ACCTCAGCGGGAACCCCTCTGAGGGTCAAGAGCCCTCAGAGGGTTCCCGCTTT GTCGCCCTTGGGAGACTCCCAGTTCTCGGGAGTCTCCCAAGGGCGAAAAAAC

### **3.4.2. Clonatge dels siRNAs dins vectors psiRNA**

Els vectors psiRNA (de Invivogen) han estat específicament dissenyats per al clonatge de petits oligonucleòtids sintètics de 21 nt, homòlegs al segment del gen que es vol interferir, separats per una petita regió espaiadora formada per 5-9 nt. L'insert queda clonat sota un promotor humà (7SK o H1) d'una RNA polimerassa III. Després de la transcripció s'obté un petit dsRNA amb estructura de *hairpin* (shRNA) que consisteix en una doble cadena de 21pb corresponent a la seqüència diana i un petit *loop* format per la regió espaiadora.

Per al clonatge dels shRNAs dissenyats al laboratori, es va utilitzar el plàsmid psiRNA-hH1GFPzeo que té com a característiques principals:

1. Promotors H1 i hCMV-HTLV. Asseguren elevats nivells d'expressió.
2. EC2K. És un promotor bacterià que permet l'expressió constitutiva del gen de resistència a zeocina en *E.coli*.
3. GFP::zeo. La fusió entre el gen GFP i el gen de resistència a zeocina ens proporciona en les cèl·lules de mamífer un control de transfecció i una resistència a antibiòtic respectivament. Aquest gen de fusió permet:

- 3.1 Monitoritzar l'eficiència de transfecció.



- 3.2 Estandaritzar l'eficiència de silenciament gènic.
- 3.3 Seleccionar els clons que expressen de manera estable el siRNA.
4. EM7-alpha-pèptid: el cassette EM7-lacZ  $\alpha$ -pèptid és un cassette d'expressió bacterina que permet la selecció de clons blancs/blaus. El  $\alpha$ -pèptid permet que el bacteri produeixi una  $\beta$ -galactosidasa activa (LacZ). Així, en els bacteris transformats amb aquest vector, la  $\beta$ -galactosidasa catalitza la hidròlisi de X-Gal i es produeix un precipitat blau.
5.  $\beta$ Glo pAn: Seqüències de poliadenilació i 3' UTR de la  $\beta$ -globina humana.
6. pMB1 Ori. Origen de replicació per *E.coli*.

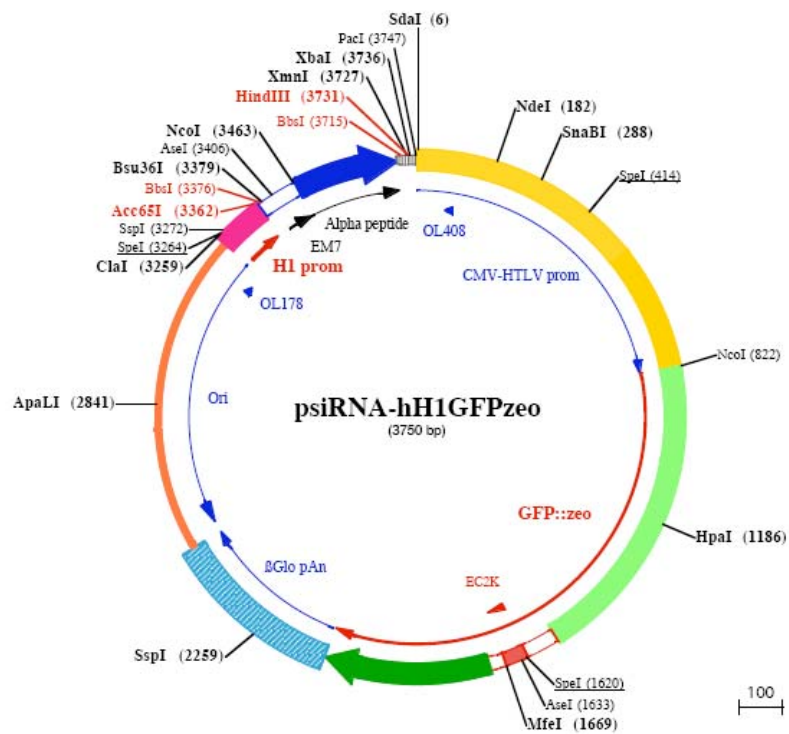


Figura 23. Vector psiRNA-hH1GFPzeo. Utilitzat per al clonatge de shRNAs.

Els passos a seguir per a clonar un shRNA dins el vector psiRNA-hH1GFPzeo són:

**1. Preparació del plàsmid.** Cal digerir el plàsmid amb els enzims de restricció adequats per tal de poder clonar-hi després el siRNA. El plàsmid psiRNA-hH1GFPzeo ofereix dues opcions de clonatge:

a) Bbs I / Bbs I (tot i que ambdós són reconeguts pel mateix enzim, els dos llocs de tall són diferents per tal d'evitar la re-ligació del plàsmid).

Per aquesta opció, cal digerir utilitzant 1 unitat d'enzim per cada  $\mu\text{g}$  de DNA i el tampó NEBuffer 2.

b) Acc 65I / Hind III.

En aquest cas, utilitzar per a la digestió el tampó NEBuffer 2 i BSA.

Després de la digestió, és aconsellable purificar el plàsmid digerit en un gel d'agarosa del 0,7 %. El DNA plasmídic serà de 3411 pb si s'utilitza Bbs I i de 3381 pb si la digestió es fa amb Acc 65I / Hind III .

**2. Síntesi del siRNA.** El siRNA es dissenya amb l'ajuda dels programes informàtics citats anteriorment. Una vegada dissenyat, es demana a un centre extern que sintetitzi cada una de les dues cadenes que formen el siRNA.

**3. Anellament de l'insert de siRNA.** Cal seguir els passos següents.

1. Dissoldre els dos oligonucleòtids sintetitzats a una concentració de  $25 \mu\text{M}$ .

2. Preparar la solució d'anellament:

Oligonucleòtid sentit (25µM)		2µl
Oligonucleòtid antisentit (25µM)		2µl
NaCl 0,5M		6µl
Aigua	q.s.p.	30µl

1- Incubar durant 2 minuts en un bany d'aigua a 80 °C. Parar el bany i deixar reposar la solució fins que la temperatura del bany arribi a 35 °C.

2- Utilitzar immediatament l'insert de siRNA anellat o emmagatzemar-lo a -20 °C.

**4. Clonatge de l'insert de siRNA dins del vector psiRNA** (veure punt 3.4.2.).

**5. Transformació en *E.coli* Z-competents** (veure punt 3.2.).

Les cèl·lules es sembren sobre plaques amb agar Fast-Media® Zeo X-Gal, de la casa comercial Invivogen.

**6. Selecció dels clons positius.** Fast-Media® Zeo X-Gal és un medi de cultiu cel·lular dissenyat per a fer una selecció dels clons per color. Els clons recombinants tallen el  $\alpha$ -pèptid i no produeixen X-Gal de manera que apareixen de color blanc a la placa d'agar. A diferència, els clons que contenen el vector psiRNA sense el siRNA insertat donen una coloració blava.

A més però, es comprova mitjançant PCR la presència de l'insert de siRNA dins el vector psiRNA.

S'utilitzen dos encebadors situats en els extrems de la zona de clonació del vector:

OL178 (sentit): 5' TCTTTTCTACGGGGTCTGAC 3'

OL408 (antisentit): 5' GCGTTACTATGGGAACATAC 3'

I les condicions de PCR són:

Pre-incubació "Hot start" a 94 °C, 5 minuts

Desnaturalització a 94 °C, 1 minut

Anellament a 56 °C, 1 minut

Extensió a 68 °C, 2 minuts

Extensió final a 68 °C, 8 minuts

Final a 15 °C

durant 30 cicles

Les mides esperades del producte de PCR, varien en funció del sistema de clonatge utilitzat. Així, si es vol clonar un siRNA de 21 pb, els fragments que es poden obtenir, segons si hi ha hagut recombinació o no, són:

	Plàsmid no recombinat	Plàsmid recombinat
Bbs I / BbsI	664 pb	355 pb
Acc 65I / Hind III	664 pb	357 pb

### 3.5. Cultiu de línies cel·lulars eucariotes

#### 3.5.1. Caracterització de les línies cel·lulars utilitzades

##### Línia cel·lular COS7

<b>Nom de la línia :</b>	COS7
<b>ECACC No.</b>	87021302
<b>Descripció:</b>	Cèl·lules de ronyó de mico verd africà, transformades amb SV40.
<b>Medi de cultiu:</b>	DMEM + 2 mM Glutamina + 10 % FBS + Penicil·lina G-sodi 100 U/ml i Estreptomicina-sulfat 100 µg/ml.
<b>Rutina de subcultiu:</b>	Dividir els cultius sub-confluents (70-80 %) sembrant $1-3 \times 10^4$ cèl·lules/cm <sup>2</sup> utilitzant 0.25 % tripsina/EDTA. Incubar a 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> .
<b>Morfologia:</b>	Fibroblast.
<b>Forma de creixement:</b>	Adherent en monocapa.
<b>Riscos d'aquesta línia:</b>	COS7 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.

##### Línia cel·lular HEK293

<b>Nom de la línia :</b>	HEK293
<b>Descripció:</b>	Cèl·lules embriòniques de ronyó humà.

<b>Medi de cultiu:</b>	DMEM + 2 mM Glutamina + 10 % FBS + Penicil·lina G-sodi 100 U/ml i Estreptomina-sulfat 100 µg/ml.
<b>Rutina de subcultiu:</b>	Dividir els cultius sub-confluents (70-80 %) sembrant $3 \cdot 6 \times 10^4$ cèl·lules/cm <sup>2</sup> utilitzant 0.25 % tripsina/EDTA. Incubar a 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> .
<b>Morfologia:</b>	Epitelial.
<b>Forma de creixement:</b>	Adherent en monocapa.
<b>Riscos d'aquesta línia:</b>	HEK293 és una línia cel·lular transformada amb l'adenovirus 5 DNA. 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.

Per treballar amb les dues línies cel·lulars descrites anteriorment, s'utilitzen flascons de poliestirè (de 25 cm<sup>2</sup> i de 75 cm<sup>2</sup>) com a recipients 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™.

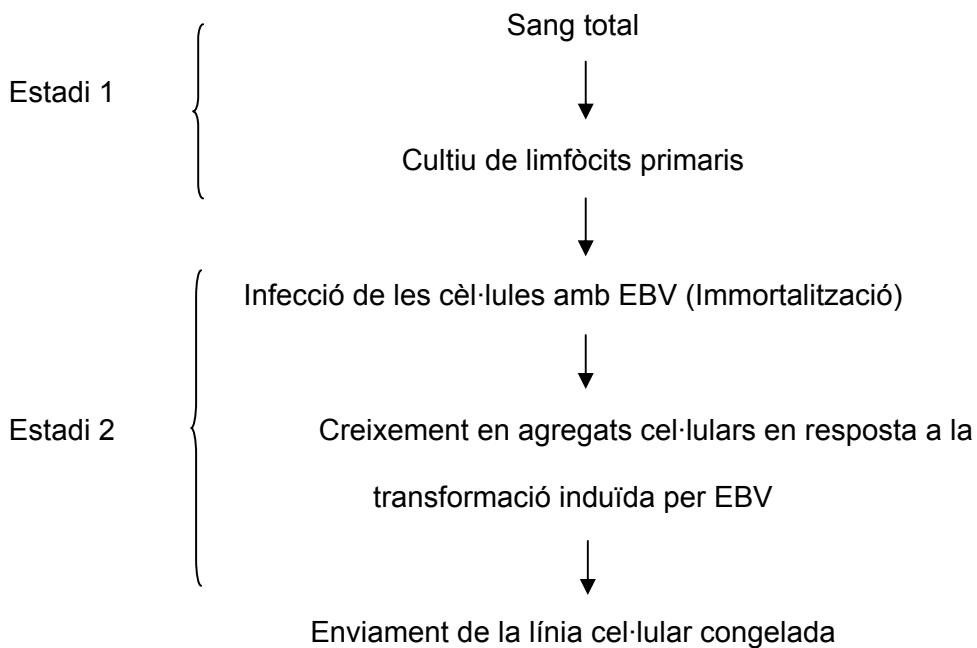
### **Línies cel·lulars limfoblastoides transformades amb EBV**

<b>Nom de les línies:</b>	CAR0001,0002,0003 pertanyents a pacients portadors d'una mutació al gen <i>PRPF8</i> (CAR0001 i 2) i un individu control sense mutació (CAR0003)
<b>Descripció:</b>	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 d'una mateixa família afectats de RP (CAR0001 i CAR0002 , pare i filla respectivament) amb la mutació c.6974\_6994del en el gen *PRPF8* i d'un individu sa (CAR0003, filla i germana respectivament dels pacients anteriors), 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 manera:



Quan aquestes cèl·lules arriben al laboratori en criotubs, es processen segons el següent protocol:

1. Posar les cèl·lules de cada un dels criotubs en un flascó de 25 cm<sup>2</sup> que contingui 10 ml de medi de cultiu. Deixar créixer en un incubador a 37 °C i 5 % de CO<sub>2</sub>
2. Després de 18-24 hores, afegir 5-10 ml de medi a cada flascó.
3. Continuar afegint medi cada 2-3 dies fins que s'assoleixi un volum de 30 ml, moment en el qual han de ser transferides a un flascó de 75 cm<sup>2</sup> en 50 ml de medi.
4. Les cèl·lules limfoblastoides creixen en suspensió i apareixeran en forma d'agregats visibles a l'ull. Un medi sa ha de ser taronja o groc.

### **3.5.2. Mètodes de transfecció utilitzats**

Per a realitzar els experiments explicats en aquesta Tesi, s'han utilitzat dos mètodes de transfecció diferents. L'elecció d'un o altre depèn del tipus de cèl·lula a transfectar i del material genètic que s'hi vol introduir:

Lípids catiónics. És un dels mètodes més eficients i més utilitzats per a la transfecció cel·lular. La part catiónica de la molècula lipídica s'uneix als àcids nucleics carregats negativament tot formant complexos compactes liposoma/àcid nucleic. En cultius cel·lulars, la càrrega positiva d'aquests complexos permet la seva associació a les membranes cel·lulars carregades negativament i, per endocitosi, els complexos entren dins la cèl·lula. Els àcids nucleics s'alliberen després dels endosomes i travessen la membrana nuclear.



Electroporació. Aquesta tècnica s'utilitza normalment sobre cèl·lules difícils de transfectar. Consisteix en aplicar un camp elèctric que crea petits porus a la membrana externa de les cèl·lules per on podrà entrar el material genètic d'interès.

### **Transfecció de les línies cel·lulars COS7 i HEK293**

#### Electroporació amb nucleofector. "Cell line Nucleofector Kit"

L'electroporació amb l'aparell Nucleofector és un dels mètodes més ràpid i eficient per a transfectar cèl·lules tipus COS7. En alguns dels experiments s'ha utilitzat aquest kit.

El protocol a seguir és el següent:

1. Un dia abans de transfectar, cultivar el nombre de cèl·lules requerit per tal d'aconseguir a les 24 hores un 80-90 % de confluència.
2. El dia de la transfecció, pre escalfar la "Nucleofector Solution V" a temperatura ambient i el medi de cultiu a 37 °C.
3. Rentar els cultius cel·lulars amb PBS i centrifugar el número requerit de cèl·lules ( $1 \times 10^6$  cèl·lules per cada punt d'electroporació) durant 10 minuts a 200 g. Eliminar completament el sobrenedant de manera que no quedin restes de PBS ni medi de cultiu.
4. Resuspendre el pellet en la solució "Nucleofector Solution V" a una concentració final de  $1-5 \times 10^6$  cèl·lules/100 µl solució. Evitar que la suspensió cel·lular estigui més de 20 minuts en aquesta solució ja que això redueix la viabilitat cel·lular i l'eficiència de transfecció.

Important: els passos 5-7 haurien de fer-se separatament per cada mostra.

5. Barrejar els 100 µl de la suspensió cel·lular amb 1-5 µg de DNA.
6. Transferir la mostra en una cubeta certificada d'Amaya evitant la formació de bombolles amb el pipeteig. Tapar la cubeta amb el corresponent tap.

7. Introduir la cubeta dins l'aparell Nucleofector i seleccionar el programa d'electroporació desitjat.
8. Per evitar el dany cel·lular, cal treure les mostres de la cubeta immediatament després de que el programa hagi finalitzat. Per fer-ho, afegir 500 µl de medi de cultiu pre escalfat a la cubeta i transferir la mostra dins de les plaques P6 plenes ja amb medi de cultiu complet.
9. Repetir els passos 4-7 per cada una de les mostres a electroporar.
10. Incubar els cultius cel·lulars en un incubador humit a 37 °C i amb un 5 % de CO<sup>2</sup> durant 24-48 hores.

#### Tranfecció utilitzant Lipofectamine™ 2000

Aquest reactiu s'ha utilitzat per a la co-tranfecció de DNA plasmídic i molècules de RNAi en cèl·lules COS7 i HEK293. El protocol a seguir es detalla a continuació.

1. Un dia abans de transfectar, sembrar en medi sense antibiòtics el nombre necessari de cèl·lules per tal d'obtenir un 80-90% de confluència en el moment de la tranfecció ( ≈ 2x10<sup>5</sup> cèl·lules en cada pou d'una placa de 6 pous).
2. Per cada mostra a transfectar, preparar els complexos DNA-RNAi-Lipofectamine™ 2000 seguint el següent protocol (quantitats calculades per a la tranfecció de cultius en placa de 6 pous):
  1. Diluir el DNA (500-1000 ng) i el dsRNA (5-50 pmol) en 250 µl de medi Opti-MEM® I sense sèrum. Barrejar.
  2. Diluir el reactiu Lipofectamine™ 2000 (2,5-6 µl) en 250 µl de medi Opti-MEM® I sense sèrum. Barrejar i incubar 5 minuts a temperatura ambient.

3. Passats els 5 minuts, barrejar les dues mescles anteriors i incubar durant 20 minuts a temperatura ambient per permetre la formació dels complexos DNA-RNAi-Lipofectamine™ 2000 .
3. Afegir els complexos sobre cada un dels cultius cel·lulars i sacsejar bé.
4. Incubar les cèl·lules a 37 °C (24-48 h) en un incubador amb un 5 % de CO<sub>2</sub> fins al moment de la seva tripsinització i assaig del gen diana d'interès.

En tots els experiments detallats en aquesta tesi, les quantitats utilitzades per a aquest tipus de transfecció van ser (per cada pou d'una placa P6):

- Opció A (transfecció de plàsmid i siRNA): 1000 ng de DNA plasmídic, 50 pmol de siRNA i 2,5 µl de reactiu Lipofectamine™ 2000.
- Opció B (transfecció de plàsmid i shRNA): 2000 ng de DNA plasmídic, 2000 ng de shRNA i 10 µl de reactiu Lipofectamine™ 2000.

### **Transfecció de les línies limfoblàstoides**

#### Electroporació amb nucleofector. "Human B Cell Nucleofector Kit"

Aquest *kit* s'ha utilitzat per transfectar en les línies limfocitàries siRNAs, vectors plasmídics de DNA o ambdues molècules a la vegada.

El protocol a seguir és el següent:

1. Pre escalfar la solució "Human B Cell Nucleofector Solution" a temperatura ambient i el medi de cultiu a 37 °C.

2. Rentar les cèl·lules amb PBS, fer el recompte i centrifugar el número requerit de cèl·lules ( $1-5 \times 10^6$  cèl·lules per cada punt d'electroporació) durant 10 minuts a 200 g. Eliminar completament el sobrenedant de manera que no quedin restes de PBS ni medi de cultiu.
3. Resuspendre el pellet en la solució "Human B cell Nucleofector Solution" a una concentració final de  $1-5 \times 10^6$  cèl·lules/100µl solució. Evitar que la suspensió cel·lular estigui més de 20 minuts en aquesta solució ja que això redueix la viabilitat cel·lular i l'eficiència de transfecció.

Important: els passos 4-6 haurien de fer-se separatament per cada mostra.

4. Barrejar els 100 µl de la suspensió cel·lular amb 1-5 µg de DNA plasmídic purificat o 0.5-3 µg de siRNA.
5. Transferir la mostra en una cubeta certificada d'Amaya evitant la formació de bombolles amb el pipetejat. Tapar la cubeta amb el corresponent tap.
6. Introduir la cubeta dins l'aparell Nucleofector i seleccionar el programa d'electroporació desitjat.
7. Per evitar el dany cel·lular, cal treure les mostres de la cubeta immediatament després de que el programa hagi finalitzat. Per fer-ho, afegir 500 µl de medi de cultiu pre escalfat a la cubeta i transferir la mostra dins de les plaques P6 plenes ja amb medi de cultiu complet.
8. Repetir els passos 4-7 per cada una de les mostres a electroporar.
9. Incubar els cultius cel·lulars en un incubador humit a 37 °C i amb un 5 % de CO<sup>2</sup>.

### 3.6. Obtenció i anàlisi dels RNAs cel·lulars

A continuació es mostren els procediments seguits per a l'extracció, purificació i quantificació del RNA cel·lular.

#### 3.6.1. Extracció del RNA cel·lular total

24 hores (si es transfecta per electroporació) o 48 hores (si es transfecta utilitzant lípids catiónics) després de la transfecció es va extreure el RNA de les cèl·lules seguint el protocol del *kit* "RNeasy® Plus Mini kit", de Qiagen.

1. Per cèl·lules adherents, treure el medi de cultiu i seguir amb el pas 2.  
Si es treballa amb cèl·lules que creixen en suspensió, no utilitzar més de  $1 \times 10^7$  cèl·lules. Centrifugar a 300 g durant 5 minuts. Recollir el sobrenedant.
2. Llisar les cèl·lules afegint la solució tampó *RLT Plus* (per  $<5 \times 10^6$  cèl·lules utilitzar 350  $\mu$ l; per un número major afegir 600  $\mu$ l). Agitar amb vòrtex o pipetejar per assegurar una lisi correcta.
3. Homogeneïtzar el llisat amb l'ajuda del vòrtex durant 2 minuts.
4. Transferir el llisat a una columna *gDNA Eliminator* col·locada sobre un microtub de 2 ml. Centrifugar 30 segons a  $\geq 8000$  g. Eliminar la columna i guardar l'eluït.
5. Afegir a l'eluït un volum (350  $\mu$ l o 600  $\mu$ l) d'etanol al 70 %. Barrejar bé fent pipeteig. No centrifugar.
6. Transferir la mostra a una columna *RNeasy* situada sobre un microtub. Centrifugar 15 segons a  $\geq 8000$  g. Eliminar l'eluït.
7. Afegir 700  $\mu$ l de tampó RW1 a la columna. Centrifugar 15 segons a  $\geq 8000$  g per tal de rentar la membrana de la columna. Eliminar l'eluït.

8. Afegir 500 µl de tampó RPE a la columna. Centrifugar 15 segons a  $\geq 8000$  g per tal de rentar la membrana de la columna. Eliminar l'eluit.
9. Afegir de nou 500 µl de tampó RPE. Centrifugar durant 2 minuts a  $\geq 8000$  g per tal de rentar la membrana de la columna. Eliminar el microtub col·lector.
10. Col·locar la columna *RNeasy* en un microtub net i centrifugar durant 1 minut a màxima velocitat.
11. Col·locar la columna en un nou tub col·lector d'1,5 ml. Afegir 30-50 µl d'aigua lliure de RNases directament sobre la membrana de la columna. Centrifugar durant 1 minut a  $\geq 8000$  g per tal d'eluir el RNA.

### **3.6.2. Tractament del RNA amb DNasa**

El protocol seguit per tal d'eliminar qualsevol possible traça de DNA d'una mostra de RNA purificat és:

1. Posar en un tub:

RNA extret	24 µl
Tampó de reacció RQ1, 10x	3 µl
DNasa RQ1 (de Promega)	3 µl

2. Deixar a 37 °C durant 30 minuts.
3. Afegir 3 µl de solució Stop i incubar a 65 °C durant 10 minuts.

### **3.6.3. Quantificació dels productes de RNA**

El *kit* “QuantiTect SYBR Green RT-PCR”, de Qiagen, permet fer una quantificació a temps real específica de producte a partir del RNA cel·lular extret. El procediment a seguir és:

1. Descongelar el reactiu “2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix”, els encebadors, l'aigua lliure de RNases i els RNA mostra. Barrejar bé cada una de les solucions i mantenir-les en gel.
2. Preparar la barreja de reacció:

Component	Volum	Concentració final
2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix	10 µl	1x
Encebadors (a 10 µM)	2 µl	1 µM
QuantiTect RT mix	0,2 µl	0,2 µl/reacció
Aigua lliure de RNases	variable	
RNA mostra (afegit en el pas 4)	variable	< 500 ng/reacció
Volum total	20 µl	

3. Mesclar bé la barreja de reacció i dispensar el volum apropiat dins els capil·lars de PCR.
4. Afegir el RNA mostra corresponent en cada un dels capil·lars i col·locar-los en el LightCycler.
5. Programar l'aparell d'acord amb el programa descrit en la Taula VIII.

**Taula VIII. Programa de RT-PCR a temps real.** Programa bàsic per a la realització d'una RT-PCR al LightCycler utilitzant el kit "QuantiTect SYBR Green RT-PCR", de Roche.

TRANSCRIPCIÓ REVERSA				
Segment	Temps	Temp.	Rampa	
1	20 min	50 °C	20 °C/s	
PCR				
Segment	Temps	Temp.	Rampa	
1: Activació	15 min	95 °C	20 °C/s	Aquí s'activa la DNA polimerasa HotStarTaq. La Transcriptasa Reversa queda inactivada i el cDNA motlle es desnaturalitza.
Amplificació 35-55 cicles				Depèn de la quantitat de RNA inicial i de l'abundància del producte diana.
1: Desnaturalització	15 s	94 °C	20 °C/s	
2: Anellament	20-30 s	50-60 °C	20 °C/s	Aprox. 5 – 8 °C per sota de la $T_m$ dels primers.
3: Extensió	10-30 s	72 °C	2 °C/s	Fa la lectura de fluorescència (a no sé que s'hagi afegit un pas especial de captura de dades). El temps d'extensió depèn de la mida del producte. Afegir 5 s per cada 100 pb posant un mínim de 10 s.
4 (opcional): Captura de dades	5 s	x °C	20 °C/s	$T_m$ dímer < x < $T_m$ producte. Aquest pas s'afegeix si cal suprimir la fluorescència generada per la formació de dímers d'encebador. Si no es posa aquest pas, la captura de dades es fa al finalitzar el segment d'extensió.
MELTING				
Segment	Temps	Temp.	Rampa	
1	0 s	95 °C	20 °C/s	
2	15 s	50-70 °C	20 °C/s	La temperatura varia segons quina sigui la $T_m$ del producte estudiat.
3	0 s	95 °C	0,1 °C/s	
REFREDAMENT				
Segment	Temps	Temp.	Rampa	
1	30 s	45 °C	20 °C/s	



Cada producte quantificat té el seu propi programa de RT-PCR (veure Annexe I).

6. Opcional: per comprovar l'especificitat de la RT-PCR, carregar els productes resultants en una electroforesi en gel d'agarosa.

A continuació es mostren els encebadors utilitzats per a la quantificació dels productes de RNA obtinguts en els diferents estudis realitzats.

Els valors de quantificació obtinguts per cada un dels trànscrips estudiats s'han normalitzat utilitzant la quantificació del gen de la  $\beta$ 2-microglobulina. D'aquesta manera, es corregeixen les diferències d'expressió que podrien ser degudes a una diferència en el nombre de cèl·lules entre els diferents punts de transfecció estudiats.

Taula IX. Encebadors utilitzats per l'estudi de RNAi sobre els productes de *splicing* de RHO.

Producte amplificat	Encebadors (5' - 3')	T <sub>m</sub> prod. PCR (°C)	Mida amplicó (pb)
<b>Prod.1+Prod.2</b> <b>RHOSPL2-4WT</b>	Rhospl-F: CAAGACTTATGAATTCAGCGGTACGTGGTGGTGTGT	87-88	216
	Rspl-EX3-R: GTTGTTGACCTCCGGCTTGA		
<b>Prod.1+Prod.2</b> <b>RHOSPL-A3811G</b>	Rho24-F: AGCGGTACGTGGTGGTGTGT	86-87	141
	RsplE2B1-R: ACATTCCCTCCCTGGACCA		
<b>Prod.3+Prod.4</b> <b>RHOSPL-A3811G</b>	Rho24-F: AGCGGTACGTGGTGGTGTGT	86-87	144
	Rspl-E23-R: ACGGTGAAGACGAGCTGGAC		
<b>Prod.1</b> <b>RHOSPL3-5</b>	Rhospl3-5-F: GTCAGGTACGAATTCGGAGGTCAACAACGAGTCT	80-81	139
	RhoEX24-R: TTCTGGGCAGCGGCCTCCT		
<b><math>\beta</math>2-microglobulina</b>	B2M-F: TTCTGGCCTGGAGGCTATC	78-79	86
	B2M-R: TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC		

Taula X. Encebadors utilitzats per l'estudi de RNAi sobre els trànscrips de NRL.

Producte amplificat	Encebadors (5' - 3')	T <sub>m</sub> prod. PCR (°C)	Mida amplicó (pb)
NRL	NRL50-F: TGCCTCCTACACCCACCTTCAG	87-88	154
	NRL96-R: AGCTCCGTGGCCTCTTCAG		
$\beta$ 2-microglobulina	B2M-F: TTCTGGCCTGGAGGCTATC	78-79	86
	B2M-R: TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC		

Taula XI. Encebadors utilitzats per l'estudi de RNAi sobre els trànscrips de PRPF8.

Producte amplificat	Encebadors (5' - 3')	T <sub>m</sub> prod. PCR (°C)	Mida amplicó (pb)
Al-lel salvatge i mutat	FRP1comú-F: GCCCTCTCACTTCTCAAC	82	99 i 78
	FRP1comú-R: AGCAGGAGGCAGGGAAAC		
Al-lel salvatge	FRP1WT-F: CAGGAGGGGGAGGTTTAC	80-81	68
	FRP1comú-R: AGCAGGAGGCAGGGAAAC		
Al-lel mutat	FRP1mut-F: GCAGGAGGGGGAGGAC	80	48
	FRP1comú-R: AGCAGGAGGCAGGGAAAC		
$\beta$ 2-microglobulina	B2M-F: TTCTGGCCTGGAGGCTATC	77-78	86
	B2M-R: TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC		

### Disseny de corbes estàndard

Per a la quantificació dels productes de RNA s'han utilitzat diferents corbes estàndard, una per a cada producte a estudiar.

Per generar una corba estàndard, es mesuren com a mínim 5 concentracions diferents d'un RNA determinat (anomenat estàndard) i es fan totes les reaccions per duplicat. Com a RNA estàndard s'ha utilitzat sempre un RNA provinent de la mateixa línia cel·lular que els RNAs diana a quantificar.

La quantitat de RNA de les mostres que es volen analitzar a d'estar dins el rang que ocupa la corba patró.

### **3.7. Preparació d'extractes cel·lulars i mesura de l'activitat de luciferasa i $\beta$ -Galactosidasa.**

#### **3.7.1. Obtenció d'extractes cel·lulars**

Per a obtenir els llisats cel·lulars dels cultius de COS7 s'ha utilitzat la solució tampó "Reporter Lysis Buffer" (RLB). El protocol a seguir és el següent.

1. Eliminar el medi dels cultius cel·lulars que han de ser estudiats. Rentar les cèl·lules dues vegades amb PBS 1x. Eliminar totalment la solució de rentat.
2. Afegir un volum suficient de RLB 1x per cobrir les cèl·lules (300-400  $\mu$ l per cada pou d'una placa P6). Sacsejar la placa suaument per assegurar que tot el cultiu queda cobert amb la solució.
3. Incubar a temperatura ambient i en agitació durant 15 minuts.
4. Fer un pas de congelació - descongelació dels cultius per assegurar una lisi cel·lular completa.
5. Amb una pipeta, transferir cada llisat a un tub de microcentrifuga i posar-los en gel.
6. Fer vórtex durant 10-15 segons. Centrifugar a 12000 g durant 15 segons (a temperatura ambient) o fins a 2 minuts (a 4 °C). Transferir el sobrenedant a un nou tub.
7. Emmagatzemar el sobrenedant / llisat cel·lular a -70 °C o procedir a la lectura.

### **3.7.2. Lectura de $\beta$ -Galactosidasa**

En alguns experiments de transfecció s'ha utilitzat el vector pCH110 com a marcador per a normalitzar els nivells d'expressió cel·lular. Aquest vector conté un gen lacZ funcional que sintetitza la proteïna  $\beta$ -Galactosidasa. A l'afegir el substrat de  $\beta$ -Galactosidasa sobre els llisats cel·lulars obtinguts després d'una transfecció amb pCH110, s'obté una relació de la quantitat de transfecció en cada punt. Els valors obtinguts serviran per a normalitzar les quantificacions de lectura de luciferasa.

Al laboratori, per a la lectura de l'activitat  $\beta$ -Galactosidasa s'ha utilitzat el kit " $\beta$ -Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer", de Promega. El protocol es detalla a continuació.

1. Descongelar els components del kit i barrejar-los bé abans d'utilitzar. Mantenir la solució tampó *Assay 2x Buffer* en gel.
2. Pot ser necessari diluir els llisats cel·lulars en la solució RLB 1x. Una dilució 2:1 de llisat en RLB 1x és suficient (100  $\mu$ l de llisat més 50  $\mu$ l de RLB 1x). Com a control negatiu, preparar la mateixa dilució a partir d'un llisat cel·lular que no hagi estat transfectat amb el gen Lac-Z.
3. Pipetejar 150  $\mu$ l de cada un dels llisats diluïts dins d'un nou tub de microcentrífuga.
4. Afegir 150  $\mu$ l d'*Assay 2x Buffer* a cada tub. Barrejar cada mostra amb vòrtex.
5. Incubar les reaccions a 37 °C durant 30 minuts o fins que les mostres agafin un color grogós. L'augment de color continua durant aproximadament 3 hores. Si l'activitat enzimàtica és baixa, les mostres poden ser incubades o/n.
6. Parar la reacció afegint 500  $\mu$ l de carbonat sòdic 1 M. Fer vòrtex.
7. Llegir l'absorbància a 420 nm.

Preparació de corbes estàndard

1. Barrejar 10 µl d'una solució d' 1 u/µl de β-Galactosidasa amb 990 µl de *Reporter Lysis Buffer* 1x. Afegir 10 µl d'aquesta dilució (1:100) a 990 µl de *Reporter Lysis Buffer* 1x i barrejar. S'obté així una solució stock de 1:10.000.
2. Utilitzant aquesta dilució stock preparar la següent sèrie de dilucions.

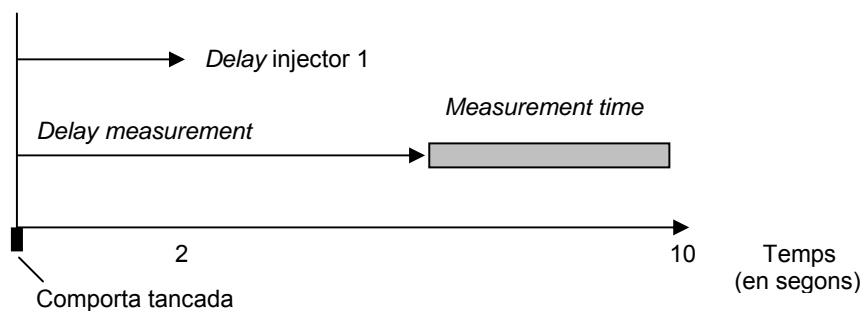
<b>β-Galactosidasa (miliunitats)</b>	<b>Volum de solució stock (1:10.000)</b>	<b>Volum de <i>Reporter Lysis</i> <i>Buffer</i> 1x</b>
0	0 µl	150 µl
1.0	10 µl	140 µl
2.0	20 µl	130 µl
3.0	30 µl	120 µl
4.0	40 µl	110 µl
5.0	50 µl	100 µl
6.0	60 µl	90 µl

3. Afegir 150 µl d'*Assay 2x Buffer* a cada tub. Barrejar cada mostra amb vòrtex.
4. Incubar les reaccions a 37 °C durant 30 minuts o fins que les mostres agafin un color grogós. L'augment de color continua durant aproximadament 3 hores. Si l'activitat enzimàtica és baixa, les mostres poden ser incubades tota la nit.
5. Parar la reacció afegint 500 µl de carbonat sòdic 1M. Agitar amb vòrtex.
6. Llegir l'absorbància a 420 nm. Relacionant els valors d'absorbància obtinguts amb les concentracions de β-Galactosidasa de cada dilució s'obté la recta patró.
7. Un cop obtinguda la recta patró, es procedeix a l'anàlisi de les mostres experimentals (seguint els passos 3-6).

### **3.7.3. Lectura de l'activitat luciferasa**

La lectura s'ha fet utilitzant el sistema de lectura simple i un luminòmetre amb injectors.

1. Preparar 100 µl per cada mostra a analitzar del reactiu *Luciferase Assay Reagent* (obtingut de la reconstitució del *Luciferase Assay Substrate* amb el tampó *Luciferase Assay Buffer*).
2. Dispensar 20 µl de cada llistat cel·lular dins un tub adient per fer la lectura al luminòmetre.
3. Programar el luminòmetre per a realitzar la lectura de l'activitat luciferasa.



**Figura 24. Lectura simple de l'activitat luciferasa.** Representació dels temps programats al luminòmetre per fer una lectura simple de l'activitat luciferasa.

4. Introduir el primer tub amb llistat dins el luminòmetre i iniciar la lectura simple injectant 100 µl de *Luciferase Assay Reagent* dins el tub. Realitzar la lectura de la resta de punts a estudiar.

## **3.8. Detecció d'apoptosi cel·lular**

Per a detectar les cèl·lules en procés d'apoptosi d'un cultiu cel·lular, s'ha utilitzat el kit "In situ Cell Death detection Kit, TMR red", de Roche. Aquest kit conté l'enzim TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) que catalitza la polimerització de molècules

tetrametil-rodamina-dUTP en els extrems 3'OH de les molècules de DNA que presenten trencaments o "nicks". Observant la mostra tractada al microscopi de fluorescència (a una longitud d'ona de 520-560 nm) es pot fer una detecció directa de la fragmentació de DNA.

A continuació es detalla el protocol a seguir.

### **1. Fixació cel·lular**

- Per cèl·lules en suspensió:

1. Rentar les cèl·lules 3 vegades amb PBS i ajustar a  $2 \times 10^7$  cèl·lules/ml.
2. Transferir 100 µl de la suspensió cel·lular a un tub de microcentrifuga.
3. Afegir 100 µl de solució de fixació (4 % de paraformaldehid en PBS, pH 7.4)
4. Resuspendre i incubar durant 60 minuts en agitació a 15 – 25 °C.
5. Centrifugar a 300 g durant 10 minuts i eliminar el sobrenedant.
6. Rentar les cèl·lules una vegada amb 200 µl de PBS.
7. Centrifugar a 300 g durant 10 minuts i eliminar el PBS.

- Per cèl·lules adherents:

1. Fixar les cèl·lules amb solució de fixació (4 % de paraformaldehid en PBS, pH 7.4) durant 60 minuts a 15 – 25 °C
2. Rentar amb PBS

### **2. Permeabilització**

Resuspendre les cèl·lules en 100 µl de solució de permeabilització (0,1 % de Triton X-100 en PBS al 0,1 % de citrat sòdic) durant 2 minuts en gel (2 – 8 °C).

Amb els cultius adherents, utilitzar el volum necessari per cobrir el cultiu.

### 3. Reacció de marcatge amb els reactius TUNEL

La barreja de reacció TUNEL s'ha de preparar immediatament abans de ser utilitzada i cal guardar-la en gel fins al seu ús. Per a cada mostra a analitzar s'utilitzen: 45 µl de *Label Solution* i 5 µl d'*Enzyme Solution*. S'obtenen així els 50 µl de barreja de reacció TUNEL necessaris per a la detecció de les cèl·lules apoptòtiques en cada punt a estudiar.

Una vegada preparat el reactiu, es procedeix a la preparació de les mostres tal i com s'explica a continuació.

1. Rentar les cèl·lules amb PBS
2. Afegir 50 µl de la barreja de reacció TUNEL. Per al control negatiu, afegir a la mostra 50 µl de *Label solution*.
3. Incubar durant 60 minuts a 37 °C en una atmosfera humida i a la foscor.
4. Rentar amb PBS.

### 4. Anàlisi amb microscopi de fluorescència

La longitud d'ona d'excitació del reactiu TUNEL està en el rang de 520-560 nm (màxim, 540 nm; verd). El rang de detecció està en 570-620 nm (màxim 580 nm; vermell). Les cèl·lules apoptòtiques són aquelles que emeten fluorescència en el rang d'ona del vermell.

## 3.9. Immunocitoquímica

La immunocitoquímica ens permet localitzar en una cèl·lula diferents molècules, majoritàriament proteïnes, mitjançant la reacció específica entre antigen i anticòs.

Per tal d'utilitzar aquest mètode, les cèl·lules s'han de sembrar sobre cubreobjectes de vidre estèrils.

El protocol a seguir es detalla a continuació.



1. **Rentar:** Treure el medi de cultiu i rentar les cèl·lules 5 minuts amb PBS 1x.
2. **Fixació:** amb 4 % paraformaldehid en PBS 1x durant 20 minuts a temperatura ambient.
3. **Rentar:** 5 minuts amb PBS 1x.
4. **Permeabilització:** amb 0.1 % Triton X-100 en PBS durant 15 minuts a temperatura ambient. Rentar després amb PBS 1x.
5. **Bloqueig:** amb 10% de sèrum en PBS 1x (preferiblement sèrum de l'hoste de l'anticòs secundari). Incubar 1 hora a temperatura ambient.
6. **Anticòs primari:** diluir l'anticòs primari en la solució de bloqueig. Incubar 1-2 hores a 37 °C.

Els diferents anticossos primaris utilitzats en les immunocitoquímiques detallades en aquesta Tesi han estat:

- Anticòs monoclonal de ratolí (1D4) contra la proteïna RHO (referència ab5417, de la casa comercial Abcam). A una dilució 1/1000.
- Anticòs monoclonal de ratolí (RET-P1) contra la proteïna RHO (referència ab3267, de la casa comercial Abcam). A una dilució 1/50.
- Anticòs policlonal de conill contra la proteïna NRL (referència AB5693, de la casa comercial Chemicon). A una dilució 1/1000.
- Anticòs policlonal de conill contra la proteïna CRX (referència sc-30150, de la casa comercial Santa Cruz biotechnology, inc.). A una dilució 1/50.
- Anticòs policlonal de conill contra la proteïna giantina (referència ab24586, de la casa comercial Abcam). A una dilució 1/1000. Utilitzat com a control de localització de l'aparell de Golgi.

7. **Rentar:** fer 3 rentats de 5 minuts amb 1 % de sèrum en PBS 1x.

**8. Anticòs secundari:** diluir l'anticòs secundari en la solució de bloqueig. Incubar durant 45 minuts a 37 °C. Si l'anticòs està conjugat a un fluorocrom, la incubació ha de fer-se a les fosques.

Els anticòs secundaris utilitzats per al desenvolupament dels estudis descrits en aquesta tesi han estat:

- Anticòs policlonal de cabra contra les IgGs H&L de ratolí, conjugat a fluoresceïna (referència ab6785, de la casa comercial Abcam). A una dilució 1/200.
- Anticòs policlonal d'ase contra les IgGs de ratolí, conjugat a rodamina (referència AP192R, de la casa comercial Chemicon). A una dilució 1/200.
- Anticòs policlonal d'ase contra les IgGs de conill, conjugat a fluoresceïna (referència AP182F, de la casa comercial Chemicon). A una dilució 1/200.
- Anticòs policlonal de cabra contra les IgGs de conill, conjugat a rodamina (referència ab6718, de la casa comercial Abcam). A una dilució 1/200.

**9. Rentar:** fer 3 rentats de 5 minuts amb 1 % de sèrum en PBS 1x

**10. Tinció amb DAPI** (opcional): segons punt 3.9.1.

**11. Montatge:** Montar els cubreobjectes amb el medi adequat.

### **3.9.1. Tinció dels cultius cel·lulars amb DAPI**

En els cultius cel·lulars que creixen en monocapa, la tinció dels nuclis cel·lulars amb DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) s'ha fet segons el següent protocol.

1. Treure el medi de cultiu de les cèl·lules.
2. Rentar una vegada amb DAPI-metanol (solució 1 µg/ml).

3. Cobrir les cèl·lules amb DAPI-metanol i incubar 15 minuts a 37 °C.
4. Treure la solució i rentar el cultiu una vegada amb metanol.
5. Muntar la preparació microscòpica utilitzant el reactiu “ProLong® Gold Antifade”, d’Invitrogen, com a medi de muntatge.

En el cas dels cultius cel·lulars que creixen en suspensió el protocol seguit ha estat:

1. Centrifugar les cèl·lules i eliminar el medi de cultiu.
2. Resuspendre les cèl·lules en DAPI - PBS 1x (solució 1µg/ml) i deixar incubar uns minuts a temperatura ambient.
3. Rentar el cultiu dues vegades amb PBS 1x.
4. Muntar la preparació microscòpica utilitzant PBS 1x com a medi de muntatge.

### **3.10. Extracció de proteïna total**

Per a l’extracció de proteïnes dels cultius cel·lulars, s’ha utilitzat el *kit* “Qproteome Mammalian Protein Prep kit”, de la casa comercial Qiagen. El procediment a seguir (per a una quantitat de 5-10 milions de cèl·lules) es detalla a continuació.

1. Eliminar el medi de cultiu i rentar les cèl·lules amb 5 ml de PBS 1x fred.
2. Afegir 10 ml de PBS 1x fred.
3. Desenganxar les cèl·lules del flascó (en el cas de que siguin cultius adherents) amb l’ajuda d’una rasqueta de plàstic i transferir-les a un tub de 15 ml fred.
4. Centrifugar la suspensió cel·lular durant 5 minuts a 450 g en una centrífuga a 4 °C. Eliminar el sobrenedant i guardar el *pellet* en gel.

5. Per a la lisis cel·lular, afegir 1 unitat de la nucleasa Benzonasa<sup>®</sup> i 10 µl d'inhibidor de proteases (100x) per cada ml de *Mammalian Lysis Buffer*.
6. Resuspendre les cèl·lules en 1 ml de *Mammalian Lysis Buffer* preparat en el pas 6 i incubar en un agitador durant 5 minuts a 4 °C.
7. Centrifugar la suspensió durant 10 minuts a 14.000 g en una microcentrífuga a 4 °C.
8. Transferir el sobrenedant a un nou tub de microcentrífuga. Aquest sobrenedant conté la fracció de proteïna total que pot ser utilitzada directament o guardar-se a – 80 °C.

### **3.11. Western Blot**

#### **1. Preparació de les mostres**

Per tal de quantificar la proteïna, es fa un assaig colorimètric utilitzant el *kit* "RC DC Protein Assay", de BIO-RAD.

El volum de proteïna que es vol carregar es barreja amb tampó "Laemmli sample Buffer" fent una dilució aproximada de 1:3 (proteïna:Laemmli). Aquesta mescla es carrega directament en el gel d'acrilamida.

#### **2. Electroforesi amb gels 1D-SDS-PAGE**

Els reactius necessaris (tots de la casa comercial BIO-RAD) són:

- Acrilamida/Bis al 30 % (37,5:1)
- Solució SDS al 10% (pes/volum)
- Tampó apilador: Tampó Tris-HCl 0,5M
- Tampó separador: Tampó Tris-HCl 1,5M
- Persulfat amònic al 10% (PSA)

- TEMED
- Tampó d'electroforesi: TGS (Tris/Glicina/SDS) 1x
- a) Muntatge de l'electroforesi i preparació dels gels, segons protocol "Mini-PROTEAN® 3 Cell Instruction Manual", de BIO-RAD.
- b) Els gels es fan utilitzant el % d'acrilamida desitjat segons la mida de la proteïna a analitzar. Per a realitzar els *Western blot* descrits en aquesta tesi, s'han utilitzat les quantitats que es detallen a continuació (per a un volum final de 10ml).

**Taula XII. Gels d'acrilamida per a l'electroforesi de proteïnes.** Reactius i quantitats necessàries per a la realització d'un gel d'acrilamida per fer una electroforesi de proteïnes.

%	Aigua (ml)	Acrilamida/Bis al 30%	Solució tampó (ml)	Solució SDS al 10% (pes/volum)
5 (gel apilador)	5,8	1,6	2,5 (tampó apilador)	0,1
12 (gel separador)	3,4	4,0	2,5 (tampó separador)	0,1

S'afegeixen 100 µl de PSA i 14µl de TEMED

- c) Carregar les mostres i posar el gel a córrer a 150 V durnat 1h en tampó d'electroforesi.

### 3. Transferència de les mostres a la membrana

- a) Muntar el cassette per a la transferència, segons el protocol "Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell Instruction Manual", de BIO-RAD.
- Per la transferència s'han utilitzat membranes de PVDF i el tampó Towbin - format per tampó TG (Tris/Glicina) 1x més el 20% de metanol.

- b) Es deixa transferint 1h a 100 V.

#### **4. Bloqueig de la membrana.**

- a) Utilitzem “Blotting Grade Blocker non-fat dry milk”, de BIO-RAD. Es mesclen 5 g de llet en 100 ml de tampó TBST 1x (*Tris Buffered Saline 1x (TBS) + 0,1 % Tween 20 Buffer*).
- b) S'incuba la membrana en la solució de bloqueig durant mínim 1 hora en agitació.

#### **5. Incubació amb anticossos**

- a) Incubar la membrana amb la dilució adequada d'anticòs primari en solució de bloqueig durant 2 hores en agitació.

L'anticòs primari utilitzat ha estat:

- Anticòs monoclonal de ratolí (1D4) contra RHO (referència ab5417, de la casa comercial Abcam). A una dilució 1/1000.

- b) Fer 3 rentats de 10 minuts en TBST 1x.

- c) Incubar la membrana amb la solució d'anticòs secundari adient, també en solució de bloqueig.

L'anticòs secundari utilitzat ha estat:

- Anticòs policlonal de cabra contra les IgGs H&L de ratolí, conjugat a Fosfatasa Alcalina (referència ab6790, de la casa comercial Abcam). A una dilució 1/500.

- d) Fer 3 rentats de 10 minuts en TBST 1x.

#### **6. Revelat de la membrana**

Donat que tots els anticossos secundaris emprats en als estudis estan conjugats a Fosfatasa Alcalina, el revelat de la membrana s'ha fet utilitzant les “NBT/BCIP Ready-

to-Use Tablets”, de Roche. Aquest reactiu porta un substrat (BCIP) per a la Fosfatasa Alcalina que després de ser defosforilat és oxidat (mitjançant la reducció del substrat NBT) formant-se així un precipitat de color blau que permet detectar la proteïna unida a l'anticòs.

## **4. RESULTATS**

---



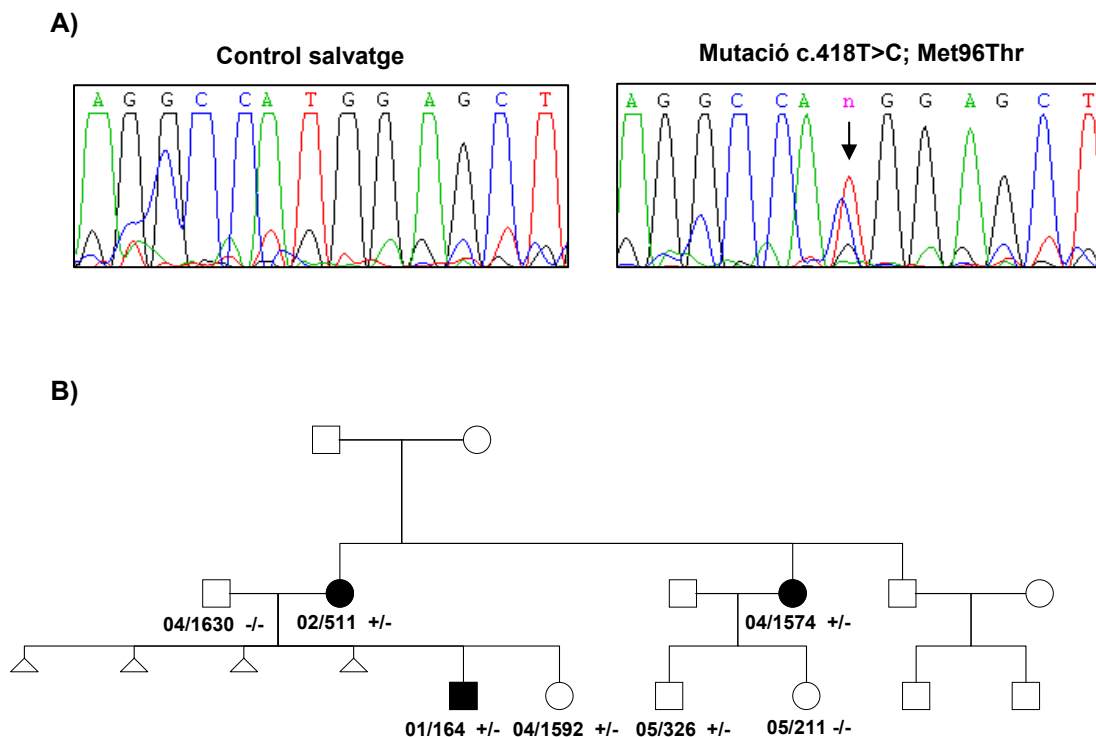


## 4. RESULTATS

### 4.1. Anàlisi de mutacions en gens associats a RPAD

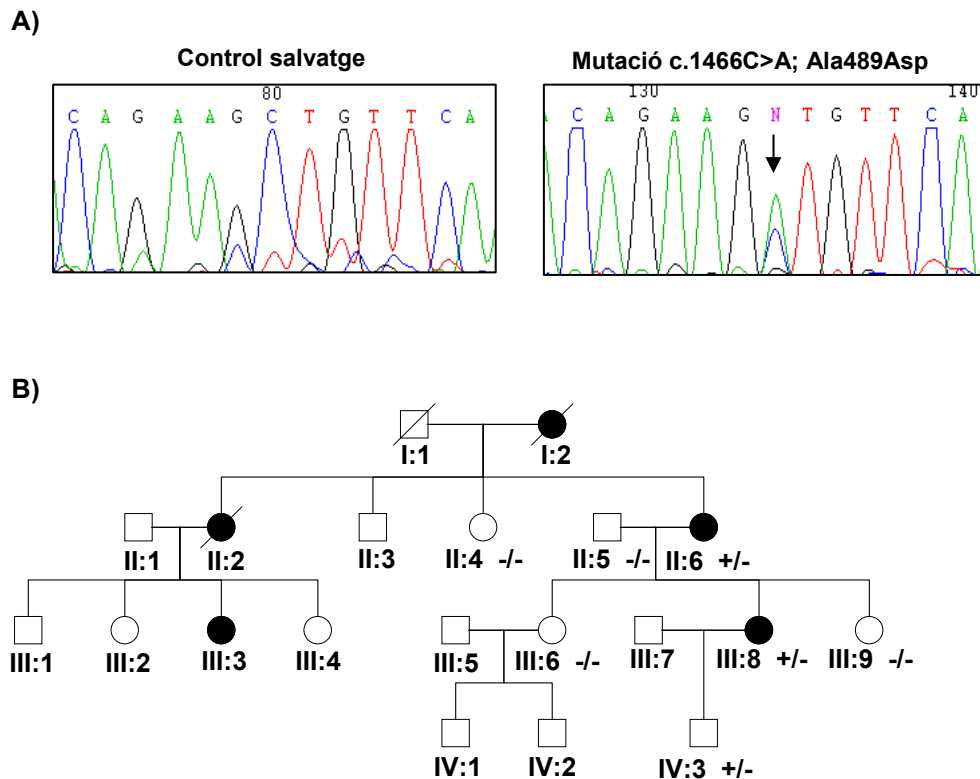
Al laboratori es realitzen rutinàriament anàlisis de mutacions utilitzant les tècniques de PCR, DGGE i seqüenciació. En les últimes anàlisis, realitzades sobre un grup de 30 pacients afectats de RPAD, s'han trobat dues noves mutacions d'especial interès.

- **Mutació Met96Thr en el gen NRL** (nº d'accés NCBI: NM\_006177). En la família RPAD 645, s'ha detectat la mutació puntual c.418T>C que provoca el canvi aminoacídic Met96Thr.



**Figura 25. Estudi genètic de la família ADRP 645 amb mutació en el gen NRL.** A) Seqüència de DNA de l'al·lel normal i mutat. B) Arbre genealògic. Presenten la mutació Met96Thr en heterozigosi els tres individus malalts i dos individus fins al moment asimptomàtics.

- **Mutació Ala489Asp en el gen PRPF3** (nº accés NCBI: NM\_004698). En la família RPAD 373, s'ha trobat la mutació puntual c.1466C>A que provoca el canvi aminoacídic Ala489Asp.



**Figura 26. Estudi genètic de la família ADRP 373 amb mutació en el gen PRPF3.** A) Seqüència de DNA de l'al·lel normal i mutat. B) Arbre genealògic. Presenten la mutació Ala489Asp en heterozigosi els dos individus malalts analitzats de la família i un tercer, de moment asimptomàtic.

## 4.2. Productes de *splicing* obtinguts a partir dels minigens de rodopsina mutats

Les mutacions de *splicing* g.3811A>G i g.5167G>T, trobades en el gen de la rodopsina (NCBI, nº d'accés: U49742) en pacients espanyols amb RPAD, han estat estudiades

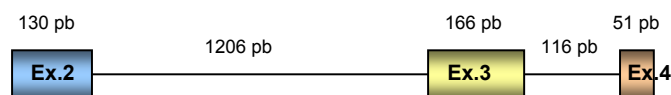
anteriorment al laboratori (Gamundi et al., 2008). A més, s'ha estudiat també la mutació de *splicing* g.4335G>T, trobada en el gen de la rodopsina en pacients amb RPAR.

Per a l'estudi de dites mutacions, van ser dissenyats i clonats dins el vector d'expressió pCI-neo diferents minigens de rodopsina. Aquests minigens (veure Figura 27) es van transfectar en cèl·lules COS7 i es van analitzar després, mitjançant RT-PCR, els diferents productes de *splicing* obtinguts per tal de poder sintetitzar posteriorment diferents siRNAs amb capacitat d'interferir cada un dels productes obtinguts a partir dels minigens mutats.

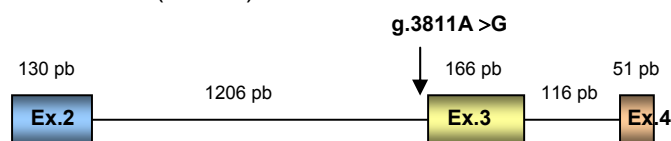
### **Minigens RHOSPL2-4**

**EcoRI** / Ex.2 parcial (2478-2607) + Intró 2 + Ex.3 + Intró 3 + Ex.4 parcial (4095-4145) / **Sal I**

**Minigen RHOSPL2-4 WT (salvatge):**



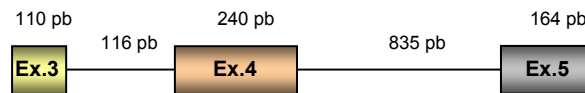
**Minigen RHOSPL-A3811G (mutant):**



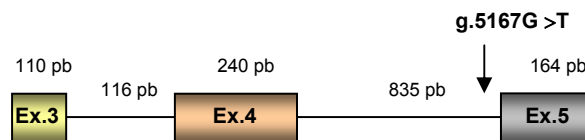
### **Minigens RHOSPL3-5**

**EcoRI** / Ex.3 parcial (3869-3978) + Intró 3 + Ex.4 + Intró 4 + Ex.5 / **SalI**

**Minigen RHOSPL3-5 WT (salvatge):**



**Minigen RHOSPL-G5167T (mutant):**



**Figura 27. Diagrama dels minigens de rodopsina construïts per a l'expressió en línies cel·lulars eucariotes.** Els minigens RHOSPL2-4 comprenen des de l'exó 2 (parcial) fins a l'exó 4 (parcial). 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).

#### **4.2.1. Productes de *splicing* obtinguts a partir dels minigens RHOSPL2-4 i interferència específica utilitzant siRNAs**

A continuació es mostra la seqüència de cada un dels productes de *splicing* obtinguts després del processament dels minigens RHOSPL2-4 (Gamundi et al., 2008).

En majúscules es marquen els exons i en minúscules els introns. En negreta i emmarcats en vermell es marquen els siRNAs dissenyats per a eliminar específicament cada un dels productes de *splicing*. Els encebadors utilitzats per a la quantificació dels RNAs estan subratllats (veure Taula IX).

**Productes obtinguts a partir del minigen RHOSPL2-4 WT**

Producte 1: Ex.2 parcial + Ex.3 + Intró 3-4 + Ex.4 parcial (Fragment de 463 pb)

AGCGGTACGTGGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGGCGTTGCCTTCACCTGGGTGCAT  
GGCGCTGGCTGCGCCGCACCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTGTCTCGTGTGGAATCGACTACTAC  
ACGCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTATCTACATGTTTCGTGGTCCACTTCACCATCCCCATGATTATCATCTTTTTCT  
GCTATGGGCAGCTCGTCTTACCCGTCAAGGAGgtacgggcccggggggtgggcccctcaaggctctgagggccagccccagcatgc  
atctgcccgtcctgctccctggaggagccatggtctggaccgggtcccgtgtcctgcagGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGTCAGCCA  
CCACACAGAAGGCAGAGAAGGAG

Producte 2: Ex.2 parcial + Ex.3 + Ex.4 parcial (Fragment de 347 pb)

AGCGGTACGTGGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGGCGTTGCCTTCACCTGGGTGCAT  
GGCGCTGGCTGCGCCGCACCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTGTCTCGTGTGGAATCGACTACTAC  
ACGCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTATCTACATGTTTCGTGGTCCACTTCACCATCCCCATGATTATCATCTTTTTCT  
GCTATGGGCAGCTCGTCTTACCCGTCAAGGAGGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGTCAGCCACCACACAGAAGGCAGAGAAGGAG

**Productes obtinguts a partir del minigen RHOSPL-A3811G**

Producte 1: Ex.2 parcial + Intró 2-3 parcial + Ex.3 + Intró 3-4 + Ex.4 parcial (Fragment de 563 pb)

AGCGGTACGTGGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGGCGTTGCCTTCACCTGGGTGCAT  
GGCGCTGGCTGCGCCGCACCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGggagggaaatgtgaagcccagaaagggccagcgtcggcagccacc  
ttggctgttcccaagtccctcacagggcaggtctcctacctgctgctcctcagGTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTGTCTCGTGTGGA  
ATCGACTACTACAGCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTATCTACATGTTTCGTGGTCCACTTCACCATCCCCATGATT  
TCATCTTTTTCTGTATGGGCAGCTCGTCTTACCCGTCAAGGAGgtacgggcccggggggtgggcccctcaaggctctgagggccag  
ccccagcatgcacatctgcccgtcctgctccctggaggagccatggtctggaccgggtcccgtgtcctgcagGCCGCTGCCAGCAGC  
AAGAGTCAGCCACCACACAGAAGGCAGAGAAGGAG

Producte 2: Ex.2 parcial + Intró 2-3 parcial + Ex.3 + Ex.4 parcial (Fragment de 447 pb)

AGCGGTACGTGGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGGCGTTGCCTTCACCTGGGTGCAT  
GGCGCTGGCTGCGCCGCACCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGggagggaaatgtgaagcccagaaagggccagcgtcggcagccacc  
ttggctgttcccaagtccctcacagggcaggtctcctacctgctgctcctcagGTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTGTCTCGTGTGGA  
ATCGACTACTACAGCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTATCTACATGTTTCGTGGTCCACTTCACCATCCCCATGATT  
TCATCTTTTTCTGTATGGGCAGCTCGTCTTACCCGTCAAGGAGGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGTCAGCCACCACACAGAAGGCAG  
GAAGGAG

Producte 3: Ex.2 parcial + Ex.3 parcial + Intró 3-4 + Ex.4 parcial (Fragment de 318 pb)

AGCGGTACGTGGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGGCGTTGCCTTCACCTGGGTGCAT  
GGCGCTGGCTGCGCCGCACCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGgtacgggcccggggggtgggcccctcaaggctctgagggccagccccagcatgcacatctgcccgtcctgctccctggaggagccatggtctggaccgggtcccgtgtcctgcagGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGTCAGCCACCACACAGAAGGCAGAGAAGGAG

Producte 4: Ex.2 parcial + Ex.3 parcial + Ex.4 parcial (Fragment de 202 pb)

AGCGGTACGTGGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGGCGTTGCCTTCACCTGGGTGCAT  
GGCGCTGGCTGCGCCGCACCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGgtacgggcccggggggtgggcccctcaaggctctgagggccagccccagcatgcacatctgcccgtcctgctccctggaggagccatggtctggaccgggtcccgtgtcctgcagGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGTCAGCCACCACACAGAAGGCAGAGAAGGAG

Després d'estudiar les seqüències de cada un dels productes obtinguts, amb l'ajuda dels programes informàtics Sfold i *InvivoGen's siRNA Wizard* (veure punt 3.4.1.) van ser dissenyats dos siRNAs diferents. El primer, anomenat siRNA R3811B1, putativament silenciaria els productes 1 i 2 obtinguts després del processament del minigen RHOSPL-A3811G. El segon siRNA, anomenat R3811B5, eliminaria potencialment els productes 3 i 4 obtinguts també en aquest processament.

Les seqüències diana d'aquests siRNAs no es trobaven en els productes de *splicing* resultants del processament del minigen RHOSPL2-4 WT motiu pel qual, a priori, els siRNAs no actuarien sobre els productes salvatges.

Taula XIII. siRNAs dissenyats per a interferir els productes de *splicing* del minigen RHOSPL-A3811G.

Nom del siRNA	Seqüència	Productes de <i>splicing</i> als que potencialment interfereix
<b>R3811B1</b>	ACCUUGGCUGUCCCAAGUtt ttUGGAACCGACAAGGGUUCA	Producte 1 i 2 del minigen RHOSPL-A3811G
<b>R3811B5</b>	UCCAGCUCGUCUUCACCGUtt ttAGGUCGAGCAGAAGUGGCA	Producte 3 i 4 del minigen RHOSPL-A3811G

Per a l'estudi de l'eficiència i especificitat dels siRNAs dissenyats, cada un d'aquests juntament amb un minigen RHOSPL2-4 (mutat o salvatge) van ser transfectats sobre cèl·lules COS7 utilitzant el reactiu Lipofectamina 2000 (veure punt 3.5.2.).

Els diferents punts de transfecció van ser:

1. Minigen RHOSPL-A3811G + siRNA R3811B1
2. Minigen RHOSPL-A3811G + siRNA R3811B5
3. Minigen RHOSPL-A3811G + siRNA *scramble*
4. Minigen RHOSPL2-4 WT + siRNA R3811B1

5. Minigen RHOSPL2-4 WT + siRNA R3811B5

6. Minigen RHOSPL2-4 WT + siRNA *scramble*

48 hores després de la transfecció es va realitzar una extracció de RNA total i es van quantificar cada un dels productes de *splicing* de rodopsina resultants mitjançant un sistema de RT-PCR acoblat a SYBR Green (veure punt 3.6.3). Per a normalitzar els valors de quantificació dels productes de rodopsina, es va utilitzar el gen de la  $\beta$ 2-microglobulina. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula XIV i Figura 28.

Taula XIV. Percentatges d'interferència produïts pels siRNAs dissenyats contra els productes de *splicing* del minigen RHOSPL-A3811G.

	Minigen RHOSPL-A3811G		Minigen RHOSPL2-4 WT
	Interferència de Producte 1 + Producte 2	Interferència de Producte 3 + Producte 4	Interferència de Producte 1 + Producte 2
siRNA R3811B1	56,83 %	15,00 %	- 10,70 %
siRNA R3811B5	59,19 %	49,63 %	72,12 %
siRNA <i>scramble</i>	0 %	0 %	0 %

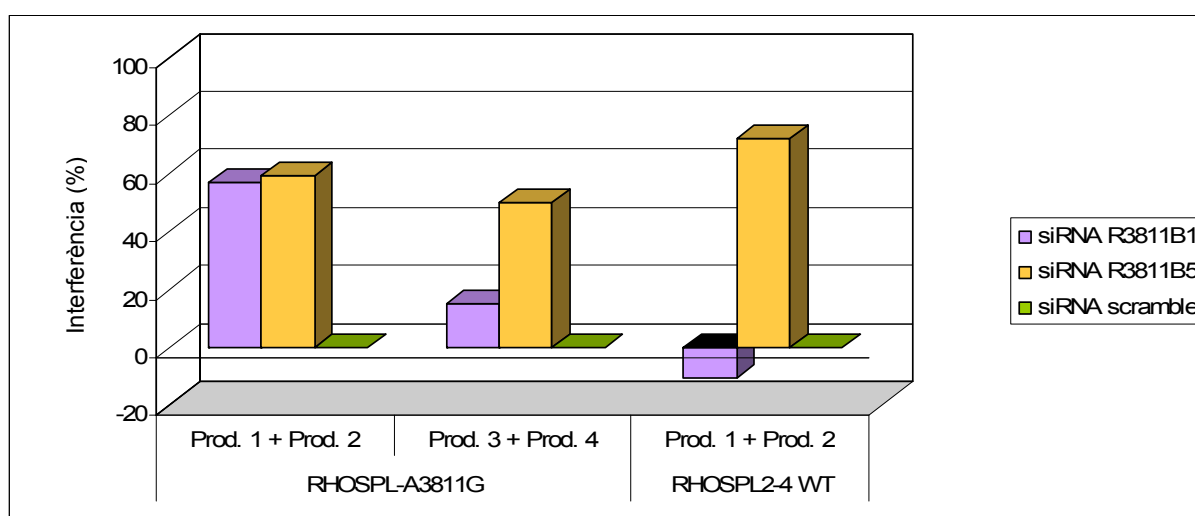


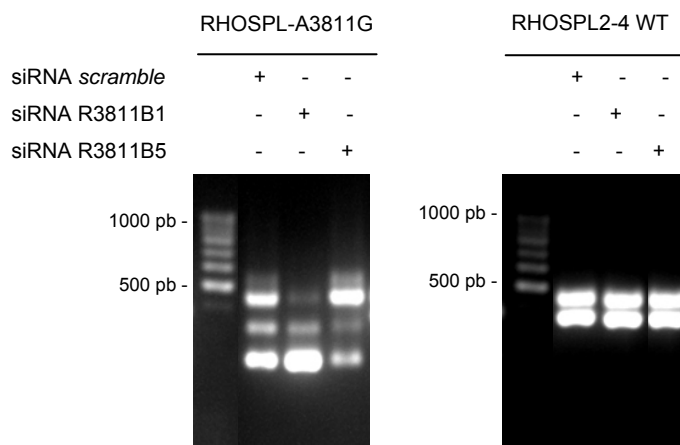
Figura 28. Interferència dels productes de *splicing* dels minigenes RHOSPL2-4.



El siRNA R3811B1 silencia específicament i amb una eficiència de gairebé el 60 % els productes de *splicing* 1 i 2 obtinguts a partir del minigen mutat. Sembla que hi ha una petita inhibició també dels productes 3 i 4 però no actua sobre els productes obtinguts en la transcripció del minigen salvatge.

A diferència, el siRNA R3811B5, tot i que és molt eficient en el silenciament, no és específic. Es pot veure com silencia tots els productes de *splicing* obtinguts, tant mutats com salvatges.

Els RNAs van ser utilitzats per realitzar una RT-PCR en dos passos per tal d'observar, en una electroforesi en gel d'agarosa, les diferents quantitats obtingudes de cada un dels productes de *splicing*.



**Figura 29. Productes de splicing dels minigens RHOSPL-2-4.** Electroforesi en gel d'agarosa de les RT-PCRs fetes amb els encebadors externs de RHO sobre els RNAs extrets de cèl·lules COS7 previament transfectades amb un minigen de RHO i el siRNA corresponent. A la part esquerra de les figures es mostra el marcador de pes molecular.

Les electroforesis corroboren els resultats obtinguts amb les quantificacions dels RNAs.

#### **4.2.2. Productes de *splicing* obtinguts a partir dels minigens RHOSPL3-5 i interferència específica utilitzant siRNAs**

Es mostren a continuació les seqüències dels productes de *splicing* obtinguts després del processament dels minigens RHOSPL3-5.

En majúscules es marquen els exons i en minúscules els introns. En negreta i emmarcats en vermell es marquen els siRNAs dissenyats per a eliminar específicament cada un d'aquests productes. Els encebadors utilitzats per a la quantificació del mRNA estan subratllats (veure Taula IX).

##### **Productes obtinguts a partir del minigen RHOSPL3-5 WT**

Producte 1: Ex.3 parcial + Ex.4 + Ex.5 + seq. 3' no codificant (fragment de 514 pb)

CGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTTCATCTACATGTTTCGTGGTCCACTTCACCATCCCCATGATTATCATCTTTTTCTGCTATGGGCA  
GCTCGTCTTCACCGTCAAGGAGGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGTCAGCCACCACACAGAAGGCAGAGAAGGAGGTCAACCCGCATGGTC  
ATCATCATGGTCATCGCTTTCCTGATCTGCTGGGTGCCCTACGCCAGCGTGGCATTCTACATCTTCACCCACCAGGGTCCAACCTCG  
GTCCCATCTTCATGACCATCCAGCGTTCCTTTGCCAAGAGCGCCGCCATCTACAACCCTGTCTATATCATGATGAACAAGCAGTT  
CCGGAACATGCATGCTCACCACCATCTGCTGCGGCAAGAACCCTGGGTGACGATGAGGCCTCTGCTACCGTGTCCAAGACGGAGACG  
AGCCAGGTGGCCCCGGCCTAAgacctgctaggactctgtggcgactataggcgtctcccatcccctacacct

##### **Productes obtinguts a partir del minigen RHOSPL-G5167T**

Producte 1: Ex.3 parcial + Ex.4 + Ex.5 parcial + seq. 3' no codificant (fragment de 475 pb)

CGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTTCATCTACATGTTTCGTGGTCCACTTCACCATCCCCATGATTATCATCTTTTTCTGCTATGGGCA  
GCTCGTCTTCACCGTCAAGGAGGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGTCAGCCACCACACAGAAGGCAGAGAAGGAGGTCAACCCGCATGGTC  
ATCATCATGGTCATCGCTTTCCTGATCTGCTGGGTGCCCTACGCCAGCGTGGCATTCTACATCTTCACCCACCAGGGTCCAACCTCG  
GTCCCATCTTCATGACCATCCAGCGTTCCTTTGCCAAGAGCGCCGCCATCTACAACCCTGTCTATATCATGATGAA**CAAGCAGAA**  
**CCCACTGGGT**GACGATGAGGCCTCTGCTACCGTGTCCAAGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGCCTAAgacctgctaggactctg  
tggccgactataggcgtctcccatcccctacacct

Per a l'estudi d'aquests productes, es va dissenyar un siRNA, anomenat Rho5167, que putativament silenciaria el producte de *splicing* obtingut a partir del minigen RHOSPL-G5167T però no actuaria sobre el producte de rodopsina salvatge.

Taula XV. siRNA dissenyat per a interferir el producte de *splicing* del minigen RHOSPL-G5167T.

Nom del siRNA	Seqüència	Producte de <i>splicing</i> al que potencialment interfereix
<b>Rho5167</b>	CAAGCAGAACCCACUGGGUtt ttGUUCGUCUUGGGUGACCCA	Producte únic del minigen RHOSPL-G5167T

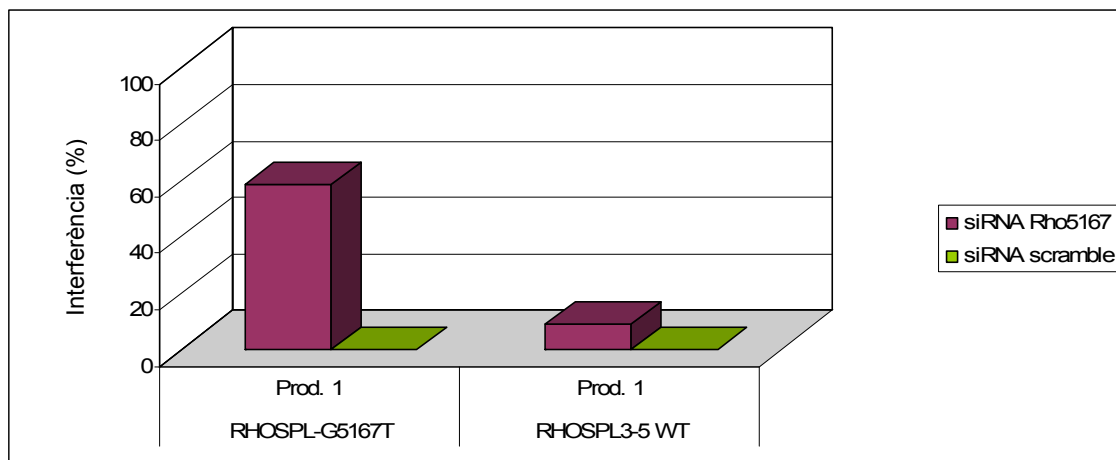
Per a estudiar l'eficiència i especificitat del siRNA Rho5167, les transfeccions realitzades sobre les cèl·lules COS7 van ser:

- Minigen RHOSPL-G5167 + siRNA Rho5167
- Minigen RHOSPL-G5167 + siRNA *scramble*
- Minigen RHOSPL3-5 WT + siRNA Rho5167
- Minigen RHOSPL3-5 WT + siRNA *scramble*

De la mateixa manera que per a l'estudi dels minigens RHOSPL2-4, es va realitzar una extracció de RNA total 48 hores després de la transfecció i es van quantificar, mitjançant el sistema de RT-PCR acoblat a SYBR Green, tant els productes resultants del *splicing* dels minigens de rodopsina com el mRNA de la  $\beta$ 2-microglobulina (veure punt 3.6.3). La Taula XVI i Figura 30 ens mostren els resultats obtinguts.

Taula XVI. Percentatges d'interferència produïts pel siRNA dissenyat contra el producte de *splicing* del minigen RHOSPL-G5167T.

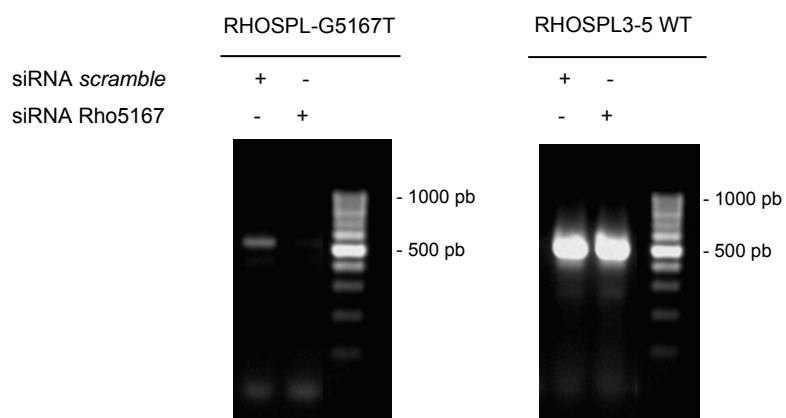
	Minigen RHOSPL-G5167T	Minigen RHOSPL3-5 WT
	Interferència del Producte 1	Interferència del Producte 1
<b>siRNA Rho5167</b>	58,47 %	8,76 %
<b>siRNA scramble</b>	0 %	0 %



**Figura 30.** Interferència dels productes de *splicing* dels minigens RHOSPL3-5.

Els resultats evidencien que el siRNA Rho5167 actua específicament silenciant el producte mutat i que ho fa amb una eficiència de gairebé un 60 %

Els mateixos RNAs van ser utilitzats per a realitzar una RT-PCR en dos passos que permetria veure, en una electroforesi en gel d'agarosa, les diferents quantitats obtingudes de cada un dels productes de *splicing*.



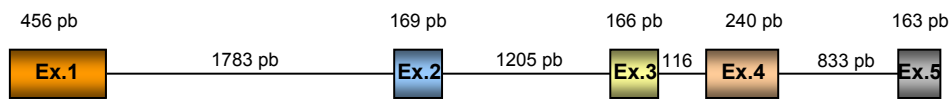
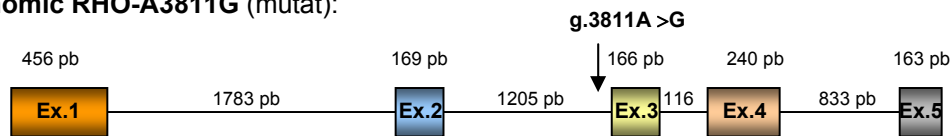
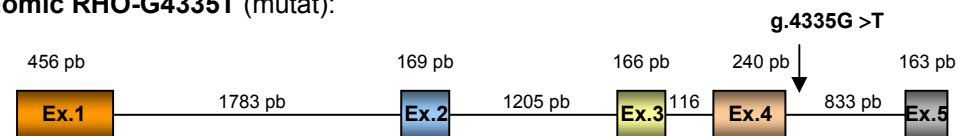
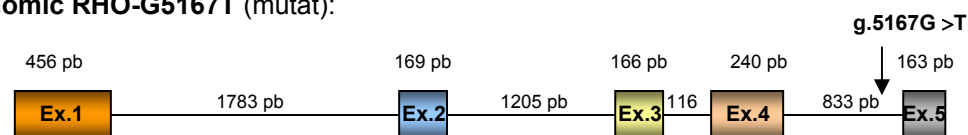
**Figura 31.** Productes de *splicing* dels minigens RHOSPL3-5. Electroforesi en gel d'agarosa de les RT-PCRs fetes amb els encebadors externs de RHO sobre els RNAs extrets de cèl·lules COS7 prèviament transfectades amb un minigen de RHO i el siRNA corresponent. A la part dreta de les figures es mostra el marcador de pes molecular.

Les electroforesis corroboren els resultats obtinguts amb les quantificacions dels RNAs.

### **4.3. Productes de *splicing* obtinguts a partir dels genòmics de rodopsina mutats**

Els estudis realitzats anteriorment al laboratori utilitzant minigens de rodopsina (Gamundi et al., 2008) van demostrar que el *splicing* d'aquests podia ser depenent de la seqüència escollida per a la seva construcció. Es va decidir per tant, utilitzar el DNA genòmic complet de la rodopsina (d'unes 6 Kb) per a estudiar els siRNAs dissenyats al laboratori.

Es va demanar a la casa comercial ExonBio que clonés, dins el vector pCI-neo, el DNA genòmic de rodopsina salvatge, el DNA genòmic de rodopsina amb la mutació g.3811A>G i el DNA genòmic amb la mutació g.5167G>T (ambdues causants de RPAD). A més, es va clonar també un DNA amb la mutació g.4335G>T causant de RPAR. Sobre aquesta mutació no s'han dissenyat molècules d'interferència gènica però sí que s'ha utilitzat per a estudis d'expressió i localització proteica (explicats posteriorment).

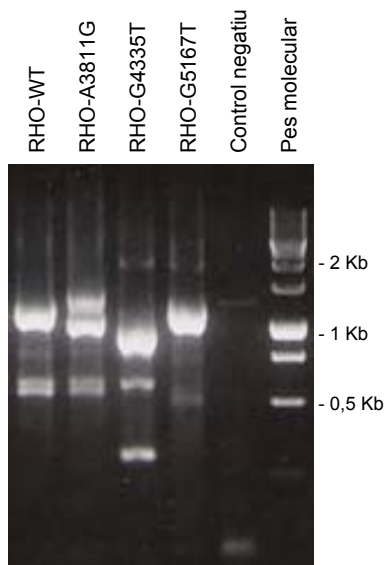
**Genòmic RHO-WT (salvatge):****Genòmic RHO-A3811G (mutat):****Genòmic RHO-G4335T (mutat):****Genòmic RHO-G5167T (mutat):**

**Figura 32.** Diagrama dels genòmics de rodopsina construïts per a l'expressió en línies cel·lulars eucariotes. En els quatre casos, es va clonar el fragment de DNA comprès entre el nucleòtid 200 i el 5330 del genòmic de rodopsina (NCBI, n° d'accés: U49742).

Primer de tot calia veure quins eren els productes de *splicing* obtinguts després de la transfecció i processament d'aquests genòmics de rodopsina i si es correlacionaven amb els productes obtinguts a partir dels minigens corresponents. Amb aquesta finalitat, es van transfectar cèl·lules COS7 amb cada un dels vectors dissenyats (formats per pCIneo + genòmic de RHO) i 48 hores després es va fer una extracció de RNA total. Utilitzant encebadors externs (veure Taula XVII) es va fer una RT-PCR que va mostrar els diferents productes de *splicing* obtinguts en cada cas (veure Figura 33).

**Taula XVII. Encebadors per a l'amplificació total de RHO.** Encebadors utilitzats per a realitzar la RT-PCR dels RNAs extrets dels cultius de COS7 transfectats amb un plàsmid amb DNA genòmic de rodopsina, salvatge o mutat.

Nom	Seqüència ( 5' - 3' )	Tm
<b>Rho267-F</b>	AACTAGCACTCGAGCCACGGGTCAGCCACAAG	75,6 °C
<b>Rhospl3-5-R</b>	GCATATTATGTTCGACAGGTGTAGGGGATGGGAGAC	69,7 °C



**Figura 33. Productes de splicing dels genòmics de rodopsina.** Productes de RT-PCR (realitzada amb encebadors externs) feta sobre els RNAs obtinguts dels genòmics de rodopsina. Com a control negatiu s'ha utilitzat RNA de cèl·lules no transfectades.

A continuació es mostra la seqüència nucleotídica de cada un dels productes obtinguts.

En majúscules es marquen els exons i en minúscules els introns. En negreta i emmarcats en vermell es troben els siRNAs utilitzats per interferir cada un dels productes de *splicing*. Els encebadors utilitzats per a la quantificació de cada un dels productes són els mateixos que els utilitzats per quantificar els productes de *splicing* respectius trobats en el processament dels minigens (veure Taula IX).

**Productes obtinguts a partir del genòmic RHO-WT**

Producte 1: Ex.1 + Ex.2 + Ex.3 + Ex.4 + Ex.5 (Fragment de 1130pb)

AGCCACGGGTCAGCCACAAGGGCCACAGCC**ATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTGG**  
**TACGCAGCCCCTTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCCGCCTACATGTTTCTGCTGATCGT**  
**GCTGGGCTTCCCCATCAACTTCCTCACGCTCTACGTCACCGTCCAGCACAGAAGCTGCGCACGCCCTCTCAACTACATCCTGCTCAAC**  
**CTAGCCGTGGCTGACCTCTTCATGGTCCTAGGTGGCTTACCAGCACCCCTTACACCTCTCTGCATGGATACTTCGTTCTCGGGCCCA**  
**CAGGATGCAATTTGGAGGGCTTCTTTGCCACCCTGGGCGGTGAAATTGCCCTGTGGTCTTGGTGGTCTGGCCATCGAGCGGTACGT**  
**GGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGGCGTTGCCTTACCTGGGTCATGGCCTGGCC**  
**TGCGCCGACCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCCGAGGGCCTGCAGTCTCGTGTGGAATCGACTACTACACGCTCAAGC**  
**CGGAGGTCAACAACGAGTCTTTGTTCATCTACATGTTCTGGTCCACTTACCATCCCCATGATTATCATCTTTTTCTGCTATGGGCA**  
**GCTCCTTACCCGTC AAGGAGGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGT CAGCCACCACACAGAAGGCAGAGAAGGAGGT CACCCGCATGGTC**  
**ATCATCATGGTCATCGCTTTCCTGATCTGCTGGTGGCTTACCAGCAGCGTGGCATTCTACATCTTACCACCAGGGCTCCAACCTCG**  
**GTCCCATCTTCATGACCATCCAGCGTCTTTGCCAAGAGCGCCGATCTACAACCCTGTCTATATCATGATGAACAAGCAGTT**  
**CCGAACTGCATGCTACCAACCATCTGCTCGGCAAGAACCCTGGGTGACGATGAGGCCCTCTGTACCGTGTCCAAGACGGAGACG**  
**AGCCAGGTGGCCCGGCC**TAA**GACCTGCCTAGGACTCTGTGGCCACTATAGGCGTCTCCCATCCCCTACACCT**

**Productes obtinguts a partir del genòmic RHO-A3811G**

Producte 1: Ex.1 + Ex.2 + Intró 2-3 parcial + Ex.3 + Ex.4 + Ex.5 (Fragment de 1230pb)

AGCCACGGGTCAGCCACAAGGGCCACAGCC**ATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTGG**  
**TACGCAGCCCCTTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCCGCCTACATGTTTCTGCTGATCGT**  
**GCTGGGCTTCCCCATCAACTTCCTCACGCTCTACGTCACCGTCCAGCACAGAAGCTGCGCACGCCCTCTCAACTACATCCTGCTCAAC**  
**CTAGCCGTGGCTGACCTCTTCATGGTCCTAGGTGGCTTACCAGCACCCCTTACACCTCTCTGCATGGATACTTCGTTCTCGGGCCCA**  
**CAGGATGCAATTTGGAGGGCTTCTTTGCCACCCTGGGCGGTGAAATTGCCCTGTGGTCTTGGTGGTCTGGCCATCGAGCGGTACGT**  
**GGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGGCGTTGCCTTACCTGGGTCATGGCCTGGCC**  
**TGCGCCGACCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGggagggaatgtgaagccagaaagggccagcgctcggcagcc**accttggctgttc****  
****ccaagt**ccctcacagggcaggtctccctacctgctgtctcAGGTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTCTCGTGTGGAATCGACTACT**  
**ACACGCTCAAGCCGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTTCATCTACATGTTCTGGTCCACTTACCATCCCCATGATTATCATCTTTTT**  
**CTGCTATGGGAGCTCGTCTTACCCTCAAGGAGGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGT CAGCCACCACACAGAAGGCAGAGAAGGAGGT**  
**ACCCGCATGGTCATCATCATGGTCATCGCTTTCCTGATCTGCTGGTGGCTTACCAGCAGCGTGGCATTCTACATCTTACCACCAGG**  
**GCTCCAACCTCGGTCCCATCTTCATGACCATCCAGCGTCTTTGCCAAGAGCGCCGATCTACAACCCTGTCTATATCATGAT**  
**GAACAAGCAGTTCCGAACTGCATGCTCACCACCATCTGCTGCGGCAAGAACCCTGGGTGACGATGAGGCCCTCTGCTACCGTGTCC**  
**AAGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCGGCC**TAA**GACCTGCCTAGGACTCTGTGGCCACTATAGGCGTCTCCCATCCCCTACACCT**

Producte 2: Ex.1 + Ex.2 + Ex.3 parcial + Ex.4 + Ex.5 (Fragment de 985pb)

AGCCACGGGTCAGCCACAAGGGCCACAGCC**ATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTGG**  
**TACGCAGCCCCTTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCCGCCTACATGTTTCTGCTGATCGT**  
**GCTGGGCTTCCCCATCAACTTCCTCACGCTCTACGTCACCGTCCAGCACAGAAGCTGCGCACGCCCTCTCAACTACATCCTGCTCAAC**  
**CTAGCCGTGGCTGACCTCTTCATGGTCCTAGGTGGCTTACCAGCACCCCTTACACCTCTCTGCATGGATACTTCGTTCTCGGGCCCA**  
**CAGGATGCAATTTGGAGGGCTTCTTTGCCACCCTGGGCGGTGAAATTGCCCTGTGGTCTTGGTGGTCTGGCCATCGAGCGGTACGT**  
**GGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGGCGTTGCCTTACCTGGGTCATGGCCTGGCC**  
**TGCGCCGACCCCCACTCGCCGGCTGG**TCCAGCTCGTCTTACCCTT**AAGGAGGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGT CAGCCACCACACA**  
**GAAGGCAGAGAAGGAGGT CACCCGCATGGTCATCATGGTCATCGCTTTCCTGATCTGCTGGGTGGCTTACGCCAGCGTGGCATT**  
**TACATCTTACCACAGGAGGCTCCAACCTCGGTCCATCTTCATGACCATCCAGCGTCTTTGCCAAGAGCGCCGATCTACAACC**  
**CTGTCATCTATATCATGATGAACAAGCAGTTCCGAACTGCATGCTCACCACCATCTGCTGCGGCAAGAACCCTGGGTGACGATGA**  
**GGCCTCTGTACCGTGTCCAAGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCGGCC**TAA**GACCTGCCTAGGACTCTGTGGCCACTATAGGCGT**  
**TCCCATCCCCTACACCT**

**Productes obtinguts a partir del genòmic RHO-G4335T**

Producte 1: Ex.1 + Ex.2 + Ex.3 + Ex.5 (Fragment de 890 pb)

AGCCACGGGTCAGCCACAAGGGCCACAGCC**ATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTGG**  
**TACGCAGCCCCTTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCCGCCTACATGTTTCTGCTGATCGT**  
**GCTGGGCTTCCCCATCAACTTCCTCACGCTCTACGTCACCGTCCAGCACAGAAGCTGCGCACGCCCTCTCAACTACATCCTGCTCAAC**  
**CTAGCCGTGGCTGACCTCTTCATGGTCCTAGGTGGCTTACCAGCACCCCTTACACCTCTCTGCATGGATACTTCGTTCTCGGGCCCA**  
**CAGGATGCAATTTGGAGGGCTTCTTTGCCACCCTGGGCGGTGAAATTGCCCTGTGGTCTTGGTGGTCTGGCCATCGAGCGGTACGT**  
**GGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGGCGTTGCCTTACCTGGGTCATGGCCTGGCC**  
**TGCGCCGACCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCCGAGGGCCTGCAGTCTCGTGTGGAATCGACTACTACACGCTCAAGC**



CGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTTCATCTACATGTTTCGTGGTCCACTTCACCATCCCCATGATTATCATCTTTTTCTGCTATGGGCA  
 GCTCGTCTTCACCGTCAAGGAGTTCCGGAAGTGCATGCTCACCACCATCTGCTGCGGCAAGAACCCTGGGTGACGATGAGGCCTCT  
 GCTACCGTGTCCAAGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGCC**TAA**GACCTGCCTAGGACTCTGTGGCCGACTATAGGCGTCTCCCAT  
 CCTACACCT

## **Productes obtinguts a partir del genòmic RHO-G5167T**

Producte 1: Ex.1 + Ex.2 + Ex.3 + Ex.4 + Ex.5 parcial (Fragment de 1091 pb)

AGCCACGGGTGACCCACAAGGGCCACAGCC**ATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTGG**  
**TACGCAGCCCCTTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCCGCTACATGTTTCTGCTGATCGT**  
**GCTGGGCTTCCCCATCAACTTCCTCAGCTCTACGTCACCGTCCAGCACAGAAGCTGCGCACGCCCTCTCAACTACATCCTGCTCAAC**  
**CTAGCCGTGGCTGACCTCTTCATGGTCTAGGTGGCTTACCAGCACCCCTCTACACCTCTCTGCATGGATACTTCGCTTTCGGGCCCA**  
**CAGGATGCAATTTGGAGGGCTTCTTTGCCACCCTGGGCG**GTGAAATTGCCTGTGGTCTTGGTGGTCTGGCCATCGAGCGGTACGT  
 GGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTTCCGCTTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGCGTTGCCTTACCTGGGTGATGGCGTGGCC  
 TGGCCGACCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCCGAGGGCCTGCAGTGTCTGTTGGAATCGACTACTACAGCTCAAGC  
 CGGAGGTCAACAACGAGTCTTTTGTTCATCTACATGTTTCGTGGTCCACTTCACCATCCCCATGATTATCATCTTTTTCTGCTATGGGCA  
 ATCATGATGGTTCATCGCTTTCCTGATCTGCTGGGTGCCCTACGCCAGCGTGGCATTCTACATCTTACCCACCAGGGTCCAACCTCG  
 GTCCATCTTCATGACCATCCAGCGTCTTTTGGCAAGAGCGCCGCATCTACAACCTGTCTATATCATGATGAA**CAAGCAGAA**  
**CCCACTGGGT**GACGATGAGGCCTCTGCTACCGTGTCCAAGACGGAGACGACCAGGTGGCCCCGGCC**TAA**GACCTGCCTAGGACTCTG  
 TGGCCGACTATAGGCGTCTCCATCCCCTACACCT

Analitzant les seqüències s'observa que:

1 - Després del procés de *splicing*, el genòmic RHO-WT mostra un únic producte, format pels 5 exons complets. La proteïna sintetitzada és de 348 aa.

2 - En el cas de la mutació g.3811A>G, el senyal de *splicing* AG normal situat a les posicions 3811-3812 queda abolit i es creen dos nous senyals de *splicing* AG (que són els mateixos que els utilitzats en el *splicing* del minigen RHOSPL-A3811G). Un d'ells queda situat a la posició intrònica 3711-3712 i l'altre a la posició exònica 3956-3957, donant lloc, el primer, a un producte de 1230 pb amb un exó 3 alternatiu entre les posicions 3713-3978 i el segon a un producte de 985 pb amb un exó 3 alternatiu entre les posicions 3958-3978, en comptes del producte salvatge de 1130 pb i amb un exó 3 comprès entre els nucleòtids 3813-3978.

Cal destacar però que en el processament del genòmic no apareixen 4 productes com passa amb el minigen sino únicament 2 (corresponents als productes 2 i 4 del minigen RHOSPL-A3811G). Així, els dos productes de *splicing* que retenen l'intró 3-4 obtinguts en el processament del minigen no es troben en el processament del genòmic corresponent.

Segons el *software* de predicció de proteïnes, les dues proteïnes rodopsina aberrants formades a partir del genòmic RHO-A3811G serien de 213 aa (amb la mutació proteica Arg177Ser, fsX214) i de 180 aa (amb la mutació proteica Arg177\_Tyr178 ins AspGluMet, fsX181).

3 - La mutació g.4335G>T (d'herència recessiva) aboleix el senyal 5' de *splicing* GU situat a les posicions 4335-4336. Com a conseqüència, es produeix un nou producte de *splicing* de 890 pb que ha perdut l'exó 4. Degut al canvi proteic Del Ala233\_Gln312, a la putativa proteïna sintetitzada, de 268 aa, li faltarien la sisena i la setena hèlix transmembrana.

4 - Pel que fa a la mutació g.5167G>T, el senyal de *splicing* AG normal situat a les posicions 5166-5167 queda abolit i es crea nou senyal de *splicing* AG a les posicions 5205-5206, produint-se així un producte de 1091 pb amb un exó 5 alternatiu comprès entre les posicions 5207 i 5278, en comptes d'un exó 5 salvatge localitzat entre les posicions 5168 i 5278. La proteïna resultant seria de 335 aa i portaria el canvi proteic Del Phe313\_Lys325.

En aquest cas, minigen i genòmic utilitzen el mateix lloc de *splicing* alternatiu, donant ambdós un únic producte de *splicing*.

Les prediccions proteiques realitzades a partir de les seqüències obtingudes dels productes de *splicing* es van fer utilitzant el *software* "Nucleic Acid to Amino Acid Translation" que trobem al web [www.biochem.ucl.ac.uk/cgi-bin/mcdonald/cgina2aa.pl](http://www.biochem.ucl.ac.uk/cgi-bin/mcdonald/cgina2aa.pl).

Després d'observar que els productes de *splicing* dels genòmics de rodopsina (tant mutats com salvatges) estaven formats pels fragments obtinguts amb els minigens corresponents més la part de cDNA que faltava en aquests per a completar la

seqüència codificant total de rodopsina, es va decidir estudiar l'efecte dels siRNAs sobre aquests genòmics.

Calia veure si cada un dels siRNAs dissenyats silenciava de manera específica el producte genòmic desitjat i, contràriament, no actuava sobre el producte salvatge de rodopsina.

**Taula XVIII. siRNAs dissenyats per a interferir els productes de *splicing* dels genòmics de rodopsina.** siRNAs dissenyats contra els productes de *splicing* dels minigens de rodopsina i possible interferència sobre els productes obtinguts a partir de les seqüències genòmiques.

Nom del siRNA	Seqüència	Producte genòmic de <i>splicing</i> al que potencialment interfereix
<b>R3811B1</b>	ACCUUGGCUGUCCCAAGUtt ttUGGAACCGACAAGGGUUCA	Producte 1 del genòmic RHO-A3811G
<b>R3811B5</b>	UCCAGCUCGUCUUCACCGUtt ttAGGUCGAGCAGAAGUGGCA	Producte 2 del genòmic RHO-A3811G
<b>Rho5167</b>	CAAGCAGAACCCACUGGGUtt ttGUUCGUCUJGGGUGACCCA	Producte únic del genòmic RHO-G5167T

#### **4.3.1. Productes de *splicing* obtinguts a partir del genòmic RHO-A3811G i interferència específica utilitzant siRNAs**

Per a estudiar la mutació g.3811A>G, les transfeccions fetes en cèl·lules COS7, utilitzant Lipofectamina 2000 (veure punt 3.5.2.), van ser:

- Genòmic RHO-A3811G + siRNA R3811B1
- Genòmic RHO-A3811G + siRNA R3811B5
- Genòmic RHO-A3811G + siRNA *scramble*
- Genòmic RHO-WT + siRNA R3811B1
- Genòmic RHO-WT + siRNA R3811B5
- Genòmic RHO-WT + siRNA *scramble*

Igual que en l'estudi sobre els minigens, es va fer l'extracció del RNA 48 hores després de la transfecció i es va procedir a la seva anàlisi mitjançant quantificació per RT-PCR acoblada a SYBR Green (veure punt 3.6.3.). Els resultats obtinguts es presenten en la Taula XIX i Figura 34.

Taula XIX. Percentatges d'interferència produïts pels siRNAs dissenyats contra els productes de *splicing* del genòmic RHO-A3811G.

	Genòmic RHO-A3811G		Genòmic RHO-WT
	Interferència del Prod. 1	Interferència del Prod. 2	Interferència del Prod. 1
siRNA R3811B1	72,49 %	20,77 %	20,14 %
siRNA R3811B5	77,43 %	88,38 %	64,3 %
siRNA scramble	0 %	0 %	0 %

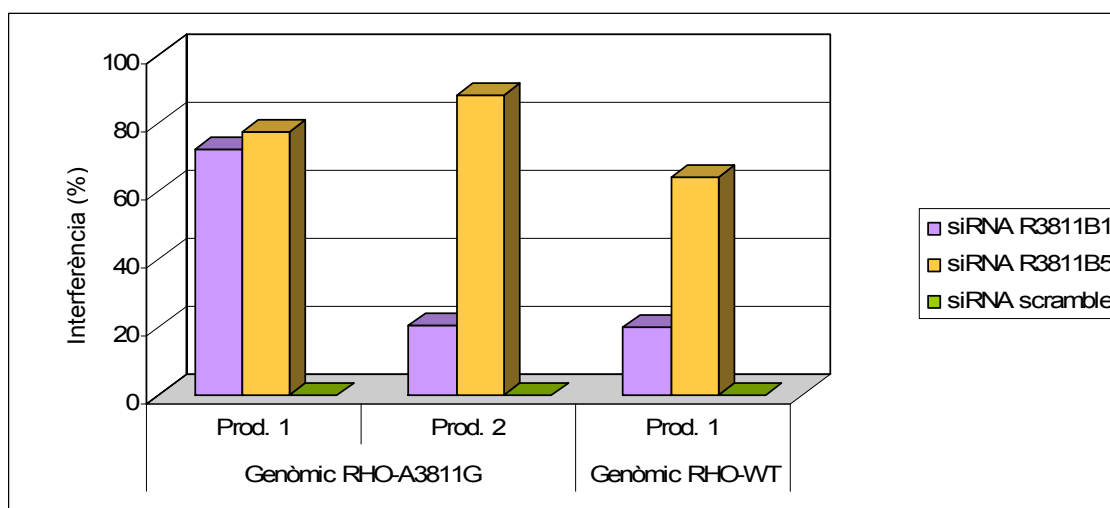
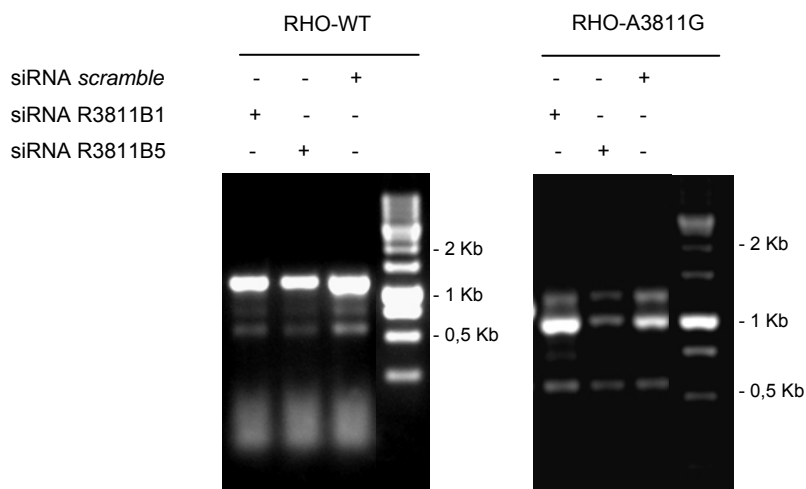


Figura 34. Interferència dels productes de *splicing* dels genòmics RHO-A3811G i RHO-WT.

Els resultats demostren que, en la majoria de punts, els siRNAs R3811B1 i R3811B5 actuen amb més força sobre els productes de *splicing* obtinguts dels genòmics que sobre els productes obtinguts a partir dels minigens corresponents. S'observa novament

que el siRNA R3811B1 és eficient i molt específic mentre que el siRNA R3811B5 té una gran eficiència però no mostra especificitat de producte.

La RT-PCR (feta amb els encebadors externs de rodopsina) i posterior electroforesi realitzades sobre els RNAs extrets dels cultius transfectats va confirmar l'efecte dels siRNAs dissenyats per a l'estudi de la mutació g.3811A>G en RHO.



**Figura 35. Productes de splicing dels genòmics RHO-WT i RHO-A3811G.** Electroforesi en gel d'agarosa de les RT-PCRs fetes amb els encebadors externs de RHO sobre els RNAs extrets de cèl·lules COS7 previament transfectades amb un genòmic de RHO i el siRNA corresponent. A la part dreta de les figures es mostra el marcador de pes molecular.

#### **4.3.2. Productes de *splicing* obtinguts a partir del genòmic RHO-G-5167T i interferència específica utilitzant siRNAs**

Per estudiar la mutació g.5167G>T en el genòmic de rodopsina, es van dur a terme les següents transfeccions:

- 1- Genòmic RHO-G5167T + siRNA Rho5167

- 2- Genòmic RHO-G5167T + siRNA *scramble*
- 3- Genòmic RHO-WT + siRNA Rho5167
- 4- Genòmic RHO-WT + siRNA *scramble*

Les quantificacions dels RNAs extrets a les 48 hores després de la tranfecció van donar els resultats que es mostren a la Taula XX i Figura 36.

Taula XX. Percentatges d'interferència produïts pel siRNA dissenyat contra el producte de *splicing* del genòmic RHO-G5167T.

	Genòmic RHO-G5167T	Genòmic RHO-WT
	Interferència del Producte 1	Interferència del Producte 1
siRNA Rho5167	58,11 %	- 1,33 %
siRNA <i>scramble</i>	0 %	0 %

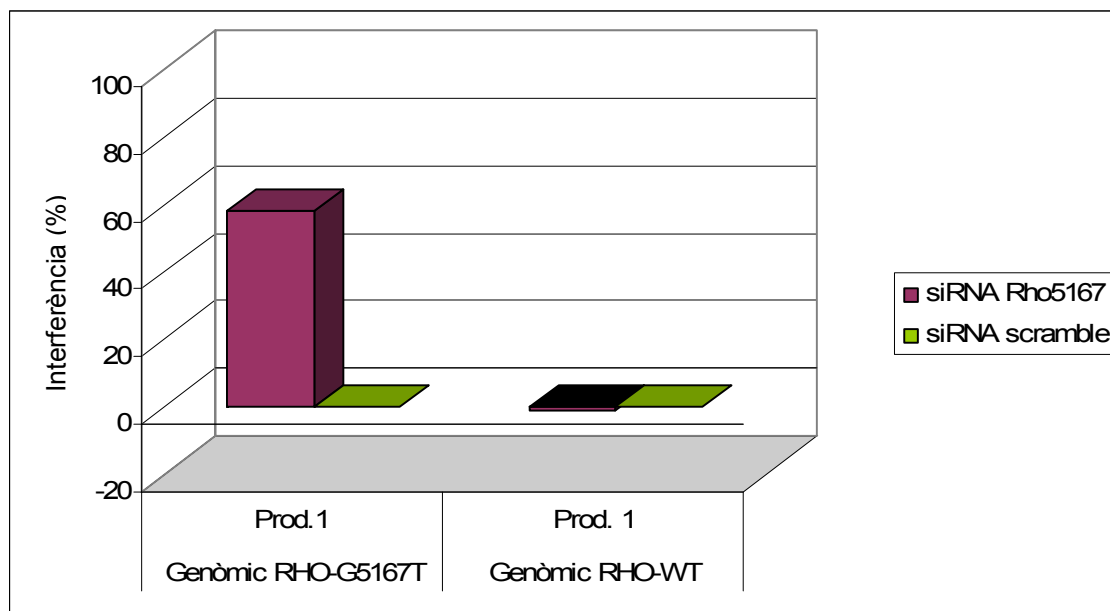
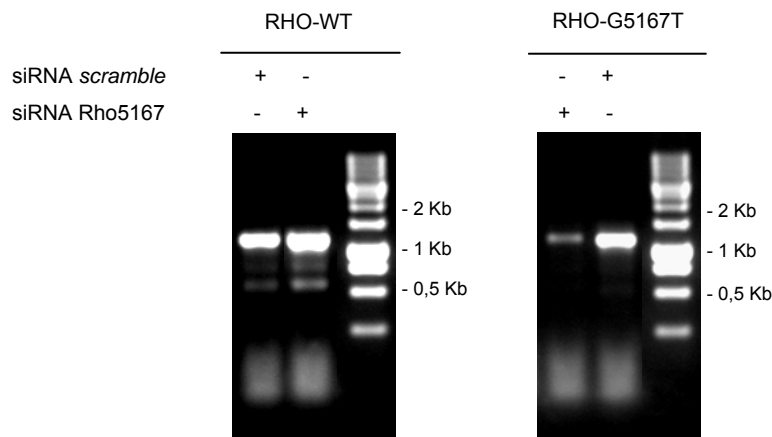


Figura 36. Interferència dels productes de *splicing* dels genòmics RHO-G5167T i RHO-WT.

En aquest cas, es reproduïxen els resultats obtinguts amb els minigens corresponents. Així, el siRNA Rho5167 degrada el producte genòmic mutat de la rodopsina fins a gairebé un 60 % mentre que deixa intacte el producte salvatge.

Es va fer també sobre els RNAs extrets d'aquestes transfeccions una RT-PCR i posterior electroforesi en gel d'agarosa per tal de veure el silenciament produït per cada un dels siRNAs.

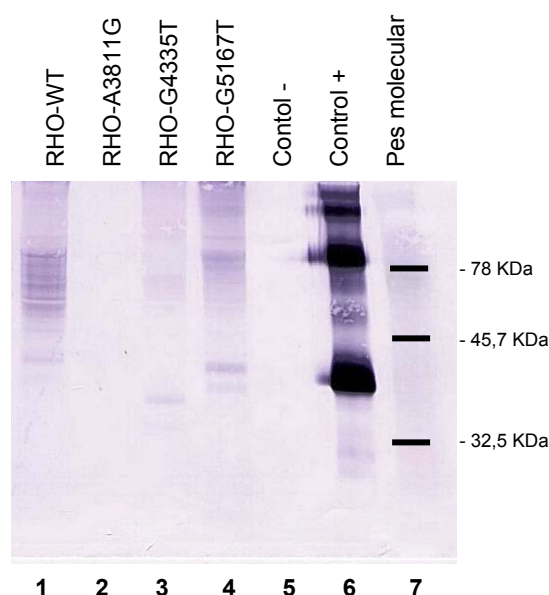


**Figura 37. Productes de splicing dels genòmics RHO-WT i RHO-G5167T.** Electroforesi en gel d'agarosa de les RT-PCRs fetes amb els encebadors externs de RHO sobre els RNAs extrets de cèl·lules COS7 previament transfectades amb un genòmic de RHO i el siRNA corresponent. A la part dreta de les figures es mostra el marcador de pes molecular.

## 4.4. Caracterització de les proteïnes codificades pels productes de *splicing* obtinguts dels genòmics mutats de rodopsina

### 4.4.1. Western Blot de rodopsina

Per tal de veure si els productes mutats de rodopsina es traduïen i donaven lloc a la proteïna predita pel programa informàtic utilitzat, es van transfectar cèl·lules COS7 amb cada un dels plàsmids portadors dels genòmics de rodopsina. A les 24 hores es va fer una extracció total de proteïna (veure punt 3.10.) i amb els extractes obtinguts es va fer un *Western Blot* (veure punt 3.11.). Com a anticòs primari es va utilitzar el 1D4, que s'uneix a la zona citoplasmàtica de la proteïna rodopsina, i com a anticòs secundari es va fer servir un policlonal conjugat a fosfatasa alcalina.



**Figura 38. Western blot de proteïna rodopsina.** S'han carregat els extractes proteics obtinguts dels cultius cel·lulars transfectats amb el vector pCIneo portador dels diferents genòmics de rodopsina (carrils 1-4). Com a control neagtiu s'ha carregat extracte proteic de cèl·lules no transfectades (carril 5) i com a control positiu proteïna rodopsina bovina purificada (carril 6). En el carril 7 es mostra el marcador de pes molecular.



Els resultats confirmen el tamany de les proteïnes esperades segons el *software* informàtic de predicció: proteïna WT de 348 aa (d'uns 40 KDa), proteïna mutada G4335T de 268 aa (d'uns 30 KDa) i proteïna mutada G5167T de 335 aa (d'uns 37 KDa).

Amb l'anticòs 1D4 utilitzat no es detecten les proteïnes formades a partir del genòmic mutant RHO-A3811G perquè són proteïnes truncades que no contenen el domini on s'uneix aquest anticòs. S'han fet altres *Western Blot* utilitzant altres anticossos primaris contra RHO però no se n'ha trobat cap capaç de detectar en els extractes proteics els dos productes resultants de la mutació g.3811A>G.

Tot i així, estudis posteriors utilitzant immunocitoquímica han demostrat que els dos productes de *splicing* formats a partir del genòmic RHO-A3811G són capaços també de sintetitzar proteïna.

#### **4.4.2. Localització cel·lular de les proteïnes mutants de Rodopsina**

Per tal de veure si les diferents variants de *splicing* trobades en els mutants de RHO tenien una localització diferent a la proteïna salvatge, que es localitza a membrana, es van fer dos estudis diferents.

En el primer estudi, es va transfectar sobre cèl·lules COS7 cada un dels vectors pCI-neo portadors dels DNAs genòmics de rodopsina. 24 hores després de la transfecció es va realitzar una immunocitoquímica (veure punt 3.9.) sobre cada un dels punts transfectats.

Com a anticossos primaris es van utilitzar el 1D4, que reconeix l'extrem C terminal de RHO (citoplasmàtic) i el RET-P1, que reconeix l'extrem N terminal de RHO

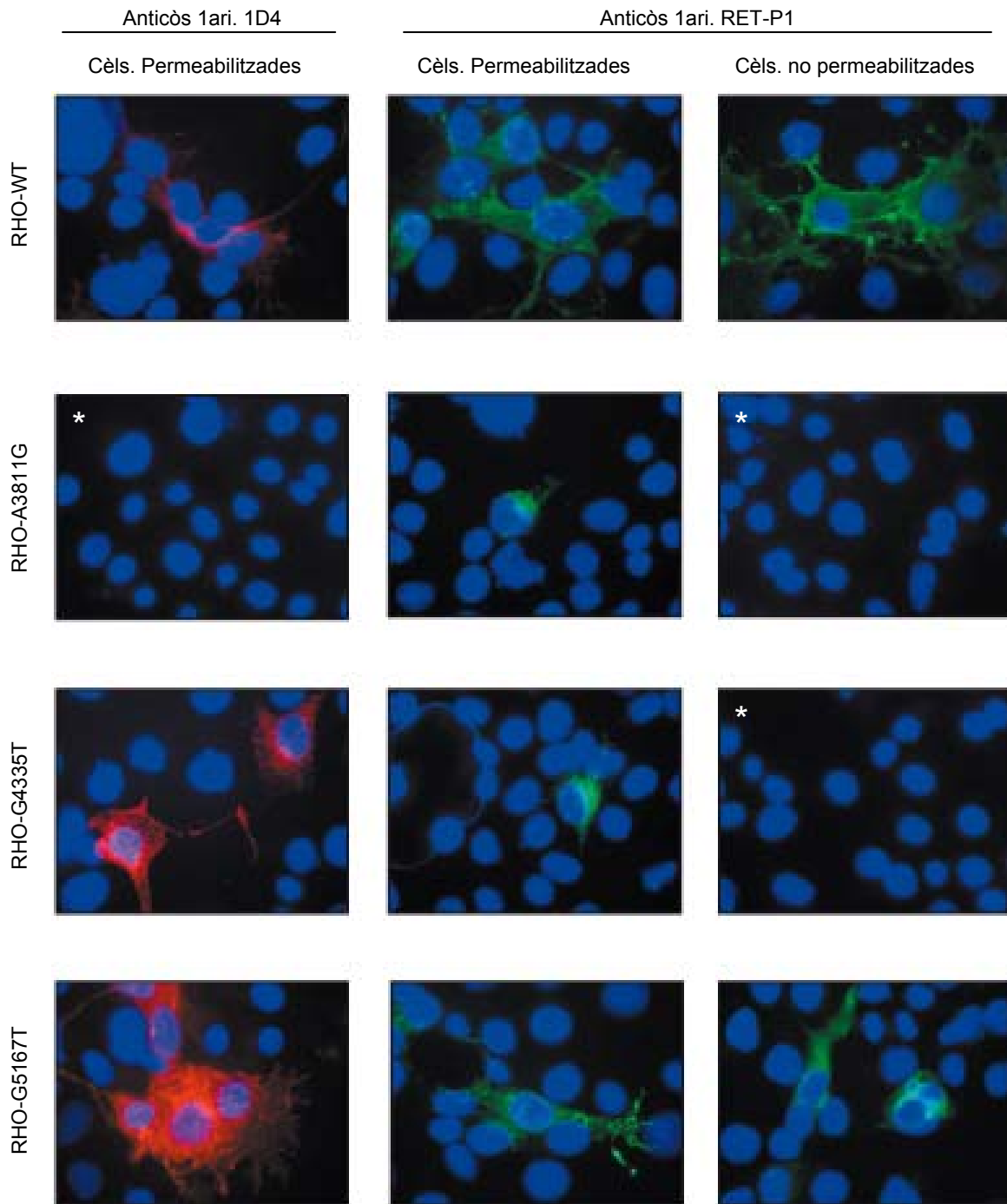
(extracel·lular). Com a anticossos secundaris es va utilitzar contra 1D4 un anticòs conjugat a Rodamina i contra RET-P1 un anticòs conjugat a FITC.

Al realitzar la immunocitoquímica, cada un dels punts de transfecció va ser analitzat per duplicat. En un punt, es va seguir el protocol normal d'immunocitoquímica mentre que en l'altre, no es van permeabilitzar les cèl·lules. Al no fer la permeabilització, al microscopi de fluorescència només es podrien veure aquelles proteïnes RHO que estiguessin unides a la membrana plasmàtica de les cèl·lules.

Els resultats, obtinguts al microscopi de fluorescència s'observen en la Taula XXI i Figura 39.

**Taula XXI. Immunocitoquímica per a la detecció de rodopsina.** Fluorescència detectada en cada una de les immunocitoquímiques realitzades sobre els cultius cel·lulars de COS7 prèviament transfectats amb els mutants de rodopsina. Els signes + ens indiquen la intensitat aproximada de la fluorescència detectada en cada punt.

Vector transfectat	Anticòs primari 1D4		Anticòs primari RET-P1	
	Cèl·lules permeabilitzades	Cèl·lules no permeabilitzades	Cèl·lules permeabilitzades	Cèl·lules no permeabilitzades
pCI-gRHO-WT	++ (membr./citopl.)	-	+++ (membr./citopl.)	+++ (membr.)
pCI-gRHO-A3811G	-	-	+ (membr./citopl.)	-
pCI-gRHO-G4335T	+ (membr./citopl.)	-	+ (membr./citopl.)	-
pCI-gRHO-G5167T	++ (membr./citopl.)	-	++ (membr./citopl.)	+ (membr.)



**Figura 39. Immunocitoquímica sobre cèl·lules COS7 amb anticossos anti-RHO.** Cèl·lules COS7 transfectades amb els vectors pCIneo portadors dels DNAs genòmics mutants i salvatge de rodopsina i posterior immunocitoquímica utilitzant anticossos primaris anti-RHO. Els anticossos secundaris utilitzats estan conjugats a Rodamina i FITC. Les fotografies fetes al microscopi de fluorescència a 100x mostren el perfil més comú observat en cada una de les preparacions. Les imatges amb un \* a la part superior esquerra no mostraven pràcticament marcatge.

Quan s'utilitza l'anticòs 1D4 en cèl·lules sense permeabilitzar, no veiem rodopsina en cap dels punts perquè l'anticòs no pot entrar dins la cèl·lula i unir-se a la part

citoplasmàtica de la proteïna. Després de permeabilitzar en canvi, veiem rodopsina salvatge i també rodopsina procedent dels genòmics mutats g.4335G>T i g.5167G>T. Tot i així, la quantitat de fluorescència és menor en els mutants, sobretot en G4335T, que en el salvatge. La detecció de fluorescència en aquestes condicions concretes ens indica que hi ha proteïna rodopsina a membrana i/o citoplasma.

Com ja s'ha explicat, degut a que les proteïnes obtingudes amb el genòmic g.3811A>G perden la part C terminal, no poden ser detectades amb l'anticòs 1D4, independentment de que les cèl·lules estiguin o no permeabilitzades.

Quan s'utilitza l'anticòs anti-rodopsina RET-P1 sobre cultius sense permeabilitzar, es veu marcatge en la proteïna salvatge i en la mutada g.5167G>T mentre que les proteïnes resultants de les mutacions g.3811A>G i g.4335G>T no donen senyal en la immunocitoquímica indicant així, probablement, que no es dirigeixen cap a la membrana cel·lular. Amb els estudis realitzats amb aquest anticòs sobre cèl·lules permeabilitzades veiem senyal en tots els punts. Això indica que totes les mutacions de *splicing* estudiades són capaces de generar proteïna rodopsina. Tot i així, s'observa una disminució de fluorescència en les rodopsines amb mutació g.3811A>G i g.4335G>T.

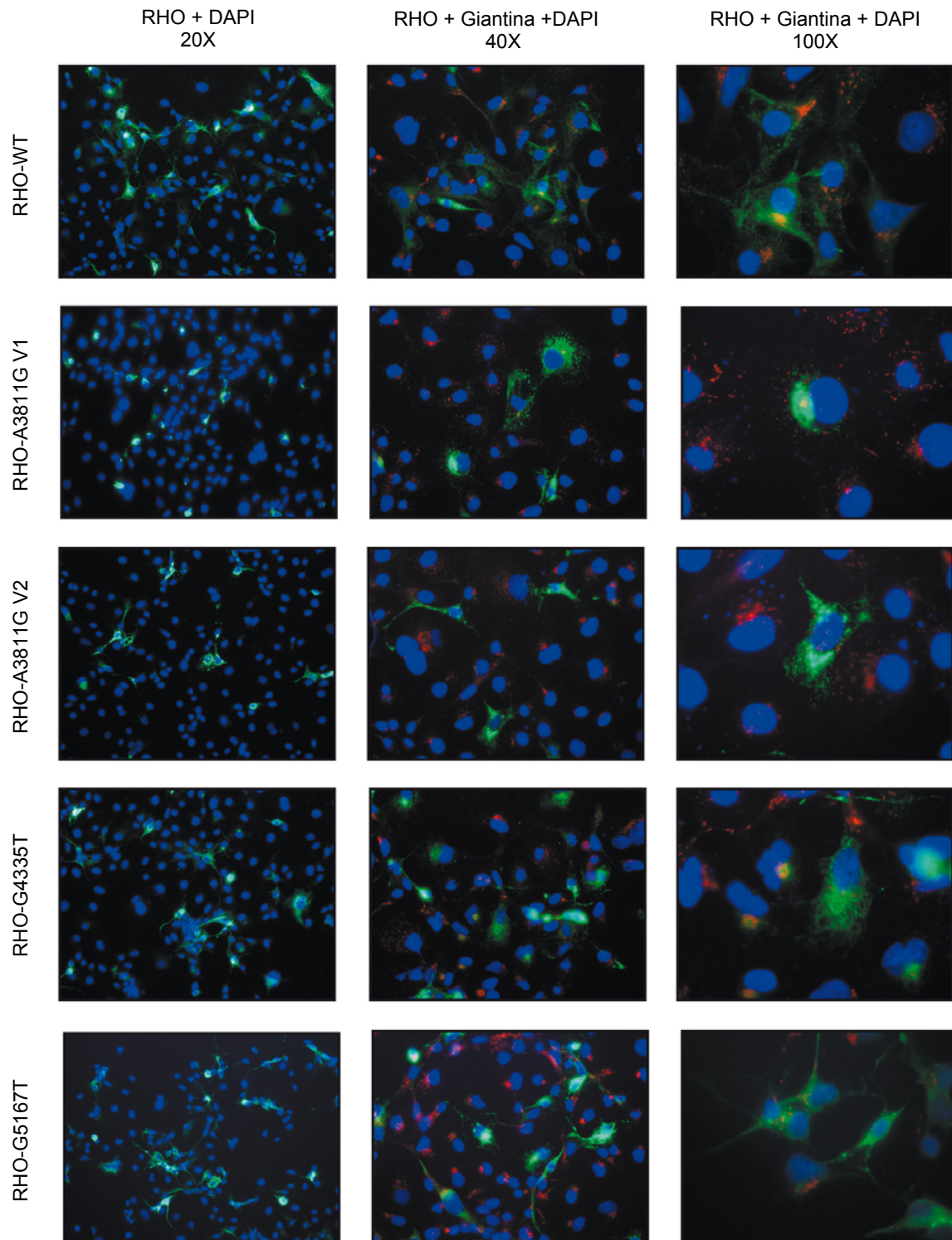
El segon experiment dissenyat per veure la localització de les proteïnes rodopsina mutades va consistir en clonar cada genòmic de rodopsina dins un vector d'expressió que permetria l'obtenció d'una proteïna de fusió entre RHO i GFP.

Amb aquesta finalitat, es va transfectar sobre cèl·lules COS7 cada un dels vectors pCI-neo portadors dels DNAs genòmics de rodopsina. Sobre el mRNA extret d'aquestes cèl·lules es va fer una RT-PCR i cada un dels productes obtinguts va ser clonat dins el vector d'expressió pEGFP (veure punt 3.2.).

Es van obtenir així 5 construccions plasmídiques diferents:

- 1- pEGFP – RHO-WT (portador del producte salvatge de rodopsina)
- 2- pEGFP – RHO-A3811G V1 (portador del producte 1 de *splicing* generat per la mutació g.3811A>G)
- 3- pEGFP – RHO-A3811G V2 (portador del producte 2 de *splicing* generat per la mutació g.3811A>G)
- 4- pEGFP – RHO-G4335T (portador del producte de *splicing* generat per la mutació g.4335G>T)
- 5- pEGFP – RHO-G5167T (portador del producte de *splicing* generat per la mutació g.5167 G>T)

Cèl·lules COS7 van ser transfectades amb cada un d'aquests plàsmids i 24 hores després es va fer una immunocitoquímica per marcar l'aparell de Golgi en les cèl·lules. Es va utilitzar un anticòs primari anti-giantina (proteïna que es localitza a l'aparell de Golgi) i un anticòs secundari conjugat a rodamina (veure punt 3.9.). L'anàlisi dels diferents punts es va fer al microscopi de fluorescència i els resultats es mostren a la Figura 40.



**Figura 40. Colocalització de les proteïnes rodopsina i giantina.** Cèl·lules COS7 expressant RHO-GFP, i proteïna Giantina com a marcador d'aparell de Golgi. Alguns mutants de RHO sembla que s'acumulen a la zona juxtannuclear.

Els resultats evidencien que, mentre que la proteïna rodopsina salvatge sembla tenir una distribució a membrana o citoplasma, les proteïnes resultants de l'expressió dels

dos productes de *splicing* generats per la mutació g.3811A>G tenen una localització juxtannuclear que en alguns casos, tot i que no sempre està clar, sembla que podria colocalitzar amb l'aparell de Golgi. Una localització molt semblant es veu també en els productes mutats G4335T. A diferència, les proteïnes sintetitzades a partir del producte de *splicing* G5167T sembla que tenen una localització pràcticament igual a la rodopsina salvatge.

Cal remarcar que les intensitats de fluorescència són gairebé sempre inferiors en les proteïnes mutades que en la salvatge i que en cap de les preparacions observades hi ha una homogeneïtat de fluorescència cel·lular, és a dir, es veu una tendència majoritària de localització proteica en les cèl·lules però mai es veu en totes les cèl·lules d'un mateix punt el mateix patró de distribució de rodopsina.

#### **4.5. Interferència del mRNA de PRPF8**

Al laboratori es disposa de dues línies cel·lulars limfoblastoides humanes transformades amb EBV provinents de la família RPAD SJD1, portadora de la mutació c.6974\_6994del en el gen PRPF8 (NCBI, nº d'accés: NM\_006445). Una de les línies utilitzades (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.

La mutació c.6974\_6994del trobada en el gen PRPF8 proporciona a l'al·lel salvatge una seqüència diferencial respecte a l'al·lel mutat. Treballant amb aquesta seqüència, al laboratori es va dissenyar un shRNA i un ribozim anomenats PRPF8-lab (veure Taula XXII) que potencialment havien d'interferir específicament el mRNA salvatge del gen PRPF8 i no havien d'actuar sobre l'al·lel mutat.

**Taula XXII. shRNA i ribozim dissenyats per a interferir el transcrit salvatge de PRPF8 humà.** En groc es marquen les regions complementàries al mRNA.

Nom	Seqüència	Clonatge dins psiRNA
<b>shRNA PRPF8-lab</b>	<u>GTACCTC</u> <b>GGAGGTTTACTCTGCGGAT</b> TCAAGAG <b>ATCCGCAGAGTAAACCTCC</b> TTTTTGGAAA GAG <b>CCTCCAAATGAGACGCCTA</b> AGTTCTC <b>TAGGCGTCTCATTGGAGG</b> AAAAACCTT <b>ITCGA</b>	Acc 651 / Hind III
<b>Rbz PRPF8-lab</b>	<u>GTACCTC</u> <b>ATCCGCA</b> CTGATGAGGCCGAAAGGCCGAA <b>AGTAAAC</b> TTTTTGGAAA GAG <b>TAGGCGT</b> GACTACTCCGGCTTCCGGCTT <b>TCATTG</b> AAAAACCTT <b>ITCGA</b>	Acc 651 / Hind III

Per tal de comprovar la seva eficiència i especificitat, es van transfectar per electroporació (veure punt 3.5.2.) les línies limfoblàstiques CAR0001 i CAR0003 amb ambdues molècules, per separat.

Els punts de transfecció van ser:

1. siRNA PRPF8\_2 (Control positiu d'interferència sobre PRPF8, de Qiagen)
2. shRNA *scramble*
3. shRNA PRPF8-lab
4. Ribozim PRPF8-lab

24 hores després de la transfecció es va extreure el RNA de les cèl·lules (veure punt 3.6.1.) per tal de procedir a la seva quantificació.

Abans però, calia testar l'especificitat dels encebadors dissenyats per a l'amplificació i quantificació de cada un dels al·lels de PRPF8 (veure Taula XI i Figura 41).



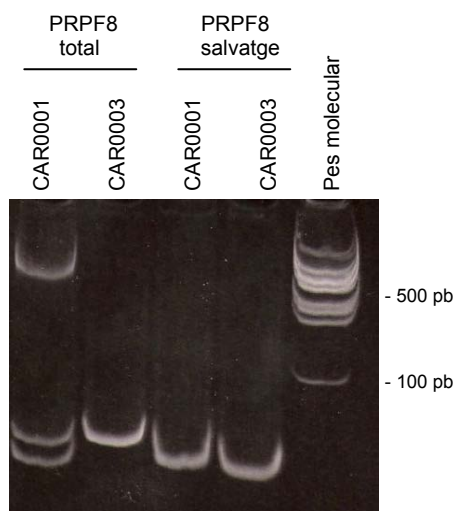
```

. . . ATGGGTGTTTCGGCATGACCCCAACATGAAATATGAGCTACAGCTGGCGAACCCCAAAGAGTTCTACCACGAGGTGCACAGGCCCT
CTCACTTCCTCAACTTTGCTCTCCTGAGGAGGGGGAGGTTTACTCTGCGGATCGGGAGGACCTGTATGCCCTGACCGTTTCCTGCCT
FRP1comú-F          FRP1mut-F          FRP1wt-F          FRP1comú-R
CCTGCTTCAGCCTCCCGAGGCCGAAGCCTCAGCCCTCCAGACAGGCCGCTGACATTCAGCAGTTTGGCCTCTTCCCTCTGTCTGTG
CTTGTGTTGTTGACCTCCTGATGGCTTGCATCCTGAATAAA . . .
    
```

**Figura 41. Fragment de DNA de PRPF8.** En color es marquen els diferents encebadors utilitzats per a l'estudi d'aquest gen i en negreta i cursiva es marca la deleció c.6974\_6994del (present en la línia limfocitària CAR0001). L'encebador FRP1mut-F (marcat en groc) es solapa amb l'encebador FRP1wt-F (marcat en verd); la zona compartida per ambdós encebadors es marca en blau.

Al fer l'amplificació del producte total de PRPF8 amb els encebadors corresponents (FRP1comú-F – FRP1comú-R), en els RNAs de CAR0001 obtenim dos productes, un de més gran (99 pb) corresponent a l'al·lel salvatge i un de menor (78 pb) corresponent a l'al·lel portador de la mutació c.6974\_6994del. A diferència, sobre els RNAs de CAR0003 només obtenim el producte salvatge, de 99 pb.

Amb els encebadors utilitzats per a l'amplificació específica de l'al·lel salvatge (veure Taula XI) s'amplifica un únic producte (68 pb) en cada una de les dues línies cel·lulars.



**Figura 42. Al·lels salvatge i mutat de PRPF8.** Productes de RT-PCR fetes sobre els RNAs de les línies cel·lulars CAR0001 i CAR0003. Amb l'amplificació de PRPF8 total, on s'utilitzen encebadors comuns per ambdós al·lels, podem veure dos productes de RT-PCR en CAR0001 (corresponents a l'al·lel salvatge, de 99 pb, i al mutat, de 78 pb) mentre que en CAR0003 només apareix el producte de l'al·lel salvatge. Per amplificar selectivament PRPF8 salvatge, s'utilitzen encebadors que no permeten l'amplificació del producte mutat.

Un cop comprovada l'especificitat dels encebadors, es va procedir a la quantificació del PRPF8 sobre els RNAs extrets de les transfeccions cel·lulars. Es va realitzar una RT-PCR acoblada a SYBR Green (veure punt 3.6.3.) i es va quantificar específicament l'al·lel salvatge de PRPF8 i el gen de la  $\beta$ -2-microglobulina (utilitzat per a normalitzar els valors).

Els resultats obtinguts mostren l'eficiència de cada una de les molècules utilitzades per al silenciament gènic de PRPF8 salvatge.

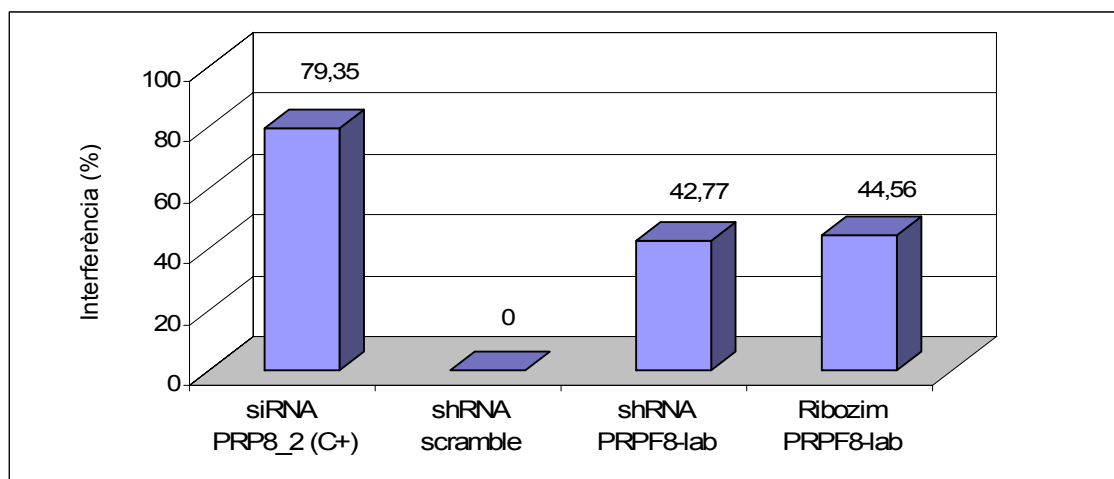


Figura 43. Percentatge d'interferència que realitza un shRNA i un ribozim sobre el mRNA salvatge de PRPF8.

Els resultats mostren que tant el shRNA com el ribozim dissenyats al laboratori tenen capacitat d'interferir el mRNA de PRPF8 salvatge en més d'un 40%

Un cop estudiada l'eficiència del shRNA i ribozim PRPF8-lab, es va voler estudiar l'eficiència d'un siRNA. Amb aquesta finalitat, es va dissenyar un siRNA amb la mateixa seqüència que el shRNA PRPF8-lab.

Taula XXIII. siRNA dissenyat per a interferir el mRNA salvatge de PRPF8 humà.

Nom	Seqüència
siRNA PRPF8-lab	GGAGGUUUACUCUGCGGAUtt ttCCUCCAAAUGAGACGCCUA

La línia limfocitària CAR0003 es va transfectar amb el shRNA i el siRNA PRPF8-lab, per separat. Els resultats obtinguts de la quantificació de PRPF8 sobre els RNAs extrets a les 24 hores després de la transfecció es mostren a la Figura 44.

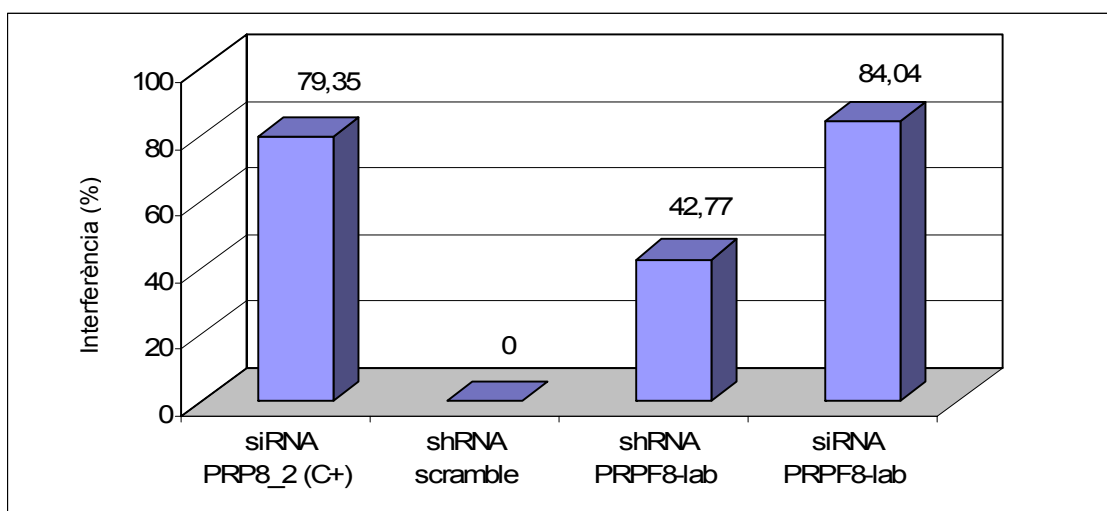


Figura 44. Percentatge d'interferència que realitza un shRNA i un siRNA sobre el mRNA salvatge de PRPF8.

Amb les quantificacions del mRNA salvatge, s'observa que en les mateixes condicions (electroporació com a mètode de transfecció i anàlisi del RNA a les 24 hores després de transfectar) el siRNA PRPF8-lab dissenyat contra el mRNA de PRPF8 salvatge és força més eficient que el shRNA corresponent.

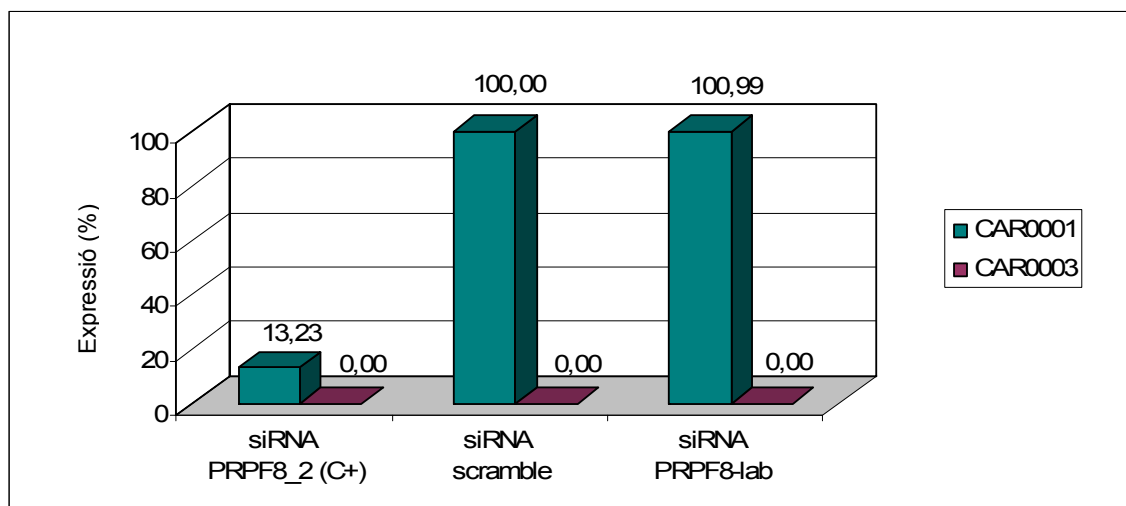
Una vegada demostrat que de les tres molècules dissenyades al laboratori per al silenciament de PRPF8 salvatge el siRNA era el que presentava un silenciament més eficient, s'havia de confirmar la seva especificitat per a l'al·lel salvatge de PRPF8.

La primera prova que va permetre veure l'especificitat del siRNA dissenyat va consistir en transfectar el siRNA PRPF8-lab sobre les línies cel·lulars CAR0003 i CAR0001.

Els punts transfectats en cada línia van ser:

1. siRNA PRPF8\_2 (C+)
2. shRNA *scramble*
3. siRNA PRPF8-lab

En els mRNAs extrets a les 24 hores es va quantificar, mitjançant RT-PCR, el transcrit PRPF8 mutat (utilitzant els encebadors FRP1mut-F i FRP1mut-R).



**Figura 45. Expressió del mRNA PRPF8 mutat, en les línies limfocitàries CAR0001 i CAR0003.** Mentre el siRNA utilitzat com a control (siRNA PRPF8\_2) és capaç d'interferir el mRNA mutat de PRPF8, el siRNA dissenyat al laboratori actua com si fos un siRNA *scramble*. La línia CAR0003 prové d'un individu sa, sense al·lel PRPF8 mutat.

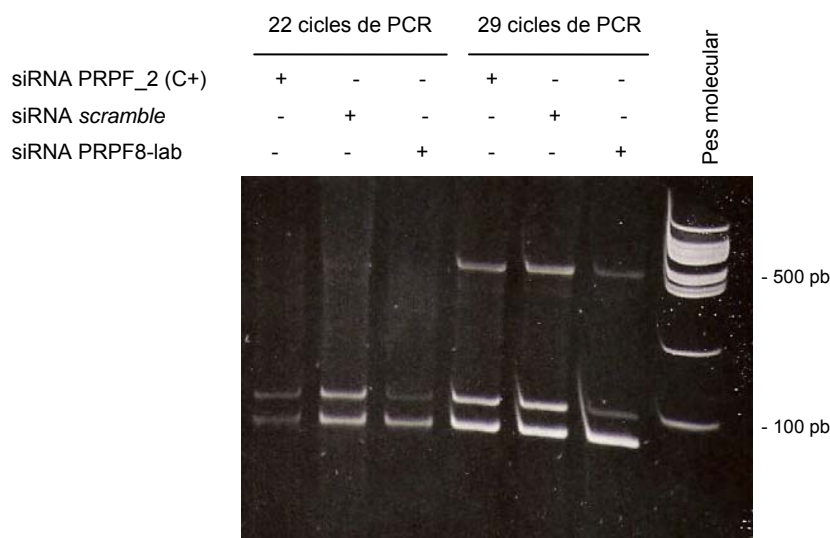
Els valors ens demostren l'especificitat del siRNA dissenyat al laboratori.

S'observa que el siRNA PRPF8\_2 (utilitzat com a control positiu de silenciament) elimina tant el mRNA salvatge de PRPF8 com el mRNA mutat (veure Figura 44 i Figura 45) mentre que el siRNA PRPF8-lab interfereix específicament el mRNA salvatge i deixa intacte el producte mutat.

Els valors de zero obtinguts en la quantificació del mRNA mutat sobre el RNA extret de les transfeccions fetes en CAR0003 ens demostren que els encebadors utilitzats són específics pel mRNA mutat.

Utilitzant els RNAs extrets de les transfeccions fetes sobre CAR0001 es van fer tres RT-PCRs diferents. En totes elles es van utilitzant els encebadors que amplifiquen el producte PRPF8 total però, cada una de les RT-PCR tenia un nombre diferent de cicles d'amplificació (17, 22 i 29 respectivament). Això permetria veure quina era en cada mostra la quantitat d'al·lel salvatge i mutat existent durant la fase exponencial de la reacció de PCR.

Els productes obtinguts es van fer córrer en una electroforesi d'acrilamida al 15% (veure Figura 46).



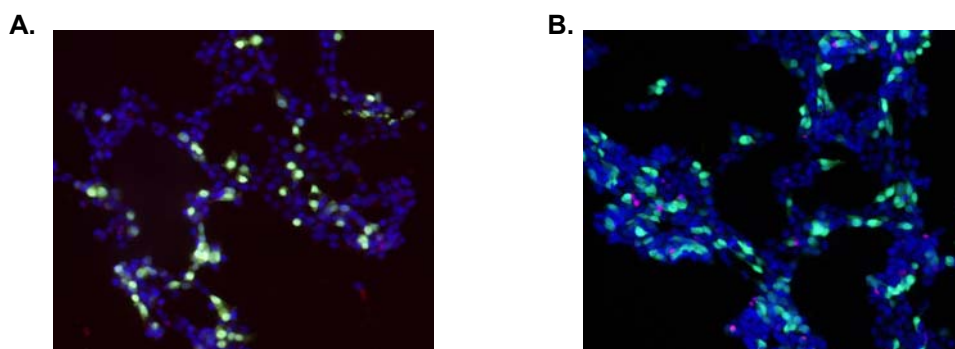
**Figura 46. Electroforesi en gel d'acrilamida dels mRNAs salvatge i mutat de PRPF8.** RT-PCR que amplifica ambdós al·lells de PRPF8, salvatge (de 99 pb) i mutat (de 78 pb), realitzada sobre els RNAs obtinguts després de transfectar en la línia CAR0001 diferents molècules de RNAi. Per tal de veure els productes durant la fase exponencial de la PCR es van fer dues amplificacions diferents, de 22 i 29 cicles respectivament.

Els primers 17 cicles de PCR no són suficients per poder observar en acilamida producte amplificat. En el producte obtingut en les PCRs de 22 i 29 cicles, es pot veure l'especificitat d'al·lel del siRNA PRPF8-lab. S'observa com en el punt on s'ha transfectat el siRNA control hi ha una disminució d'ambdós productes de PCR (salvatge i mutat) mentre que, en el punt on s'ha transfectat el siRNA dissenyat al laboratori, la banda corresponent al mRNA mutat resta intacte a la vegada que el producte salvatge disminueix. El siRNA *scramble* no interfereix cap dels dos productes de PCR.

#### **4.5.1. Efecte de la interferència del mRNA de PRPF8**

Després de veure que el siRNA contra el mRNA de PRPF8 salvatge dissenyat al laboratori era eficient, es va decidir estudiar quin era l'efecte que podia tenir el silenciament de PRPF8 en una cèl·lula que expressés aquest gen.

Amb aquesta finalitat, es van transfectar cèl·lules humanes HEK293 (que expressen el gen PRPF8 humà) amb el shRNA PRPF8-lab i amb un shRNA *scramble*. 24 hores després de la transfecció es va analitzar l'apoptosi en els cultius cel·lulars utilitzant el *kit* "In situ Cell Death detection Kit, TMR red", de Roche (veure punt 3.8.).



**Figura 47. Detecció d'apoptosi cel·lular.** Cèl·lules HEK293 transfectades amb el shRNA PRPF8-lab (A) i amb un shRNA *scramble* (B). Ambdós vectors contenen la proteïna GFP que ens serveix com a control de transfecció del shRNA. Les cèl·lules apoptòtiques queden marcades en vermell. En la figura A es veuen cèl·lules de color groc, resultants de la unió de la fluorescència verda i vermella.

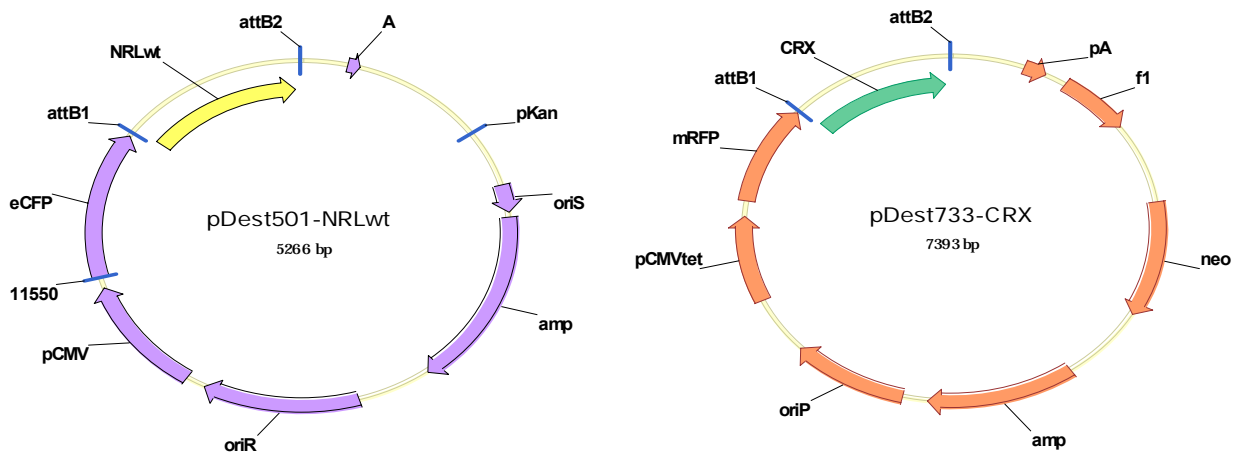
Els resultats mostren que quan s'interfereix el PRPF8 en les cèl·lules, mitjançant el shRNA PRPF8-lab, aquestes entren en la via d'apoptosi mentre que no s'observa cap canvi d'aquest tipus en les cèl·lules que han estat transfectades amb el shRNA *scramble*.

#### **4.6. Localització cel·lular de les proteïnes NRL mutades**

Per tal d'observar si determinades mutacions en la seqüència nucleotídica de NRL provoquen un canvi en la localització de la proteïna sintetitzada, es van clonar els cDNAs dels NRL salvatge i mutats dins el vector pDEST-501 seguint el mètode de recombinació del Sistema Gateway (veure punt 3.3.). Les mutacions analitzades van ser: S50T, P51L, M96T i G122E.

Al transfectar en cèl·lules de mamífer aquests vectors, s'obté una proteïna de fusió entre NRL i GFP (proteïna fluorescent que emet a la longitud d'ona del verd).

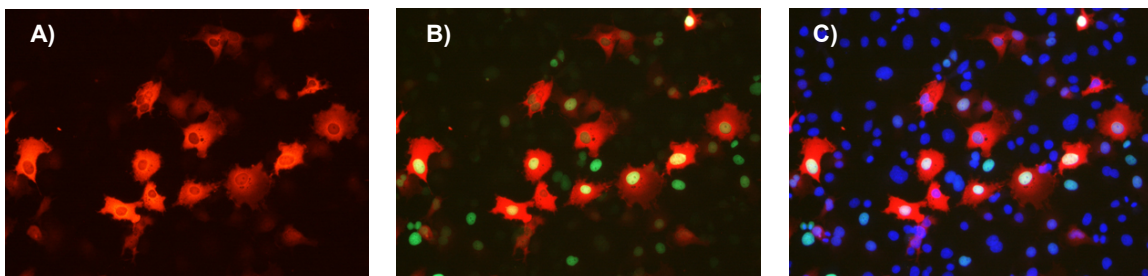
Igualment, es va clonar el cDNA de CRX dins el vector pDEST-733 per obtenir una proteïna de fusió entre CRX i RFP (proteïna fluorescent que emet a la longitud d'ona del vermell).



**Figura 48. Construccions pDEST-NRL i pDEST-CRX.** Plàsmids obtinguts després de clonar pel mètode de recombinació Gateway els cDNAs de NRL i CRX. Els cDNAs mutats de NRL es van clonar, igual que el cDNA NRLwt, en el vector pDEST501.

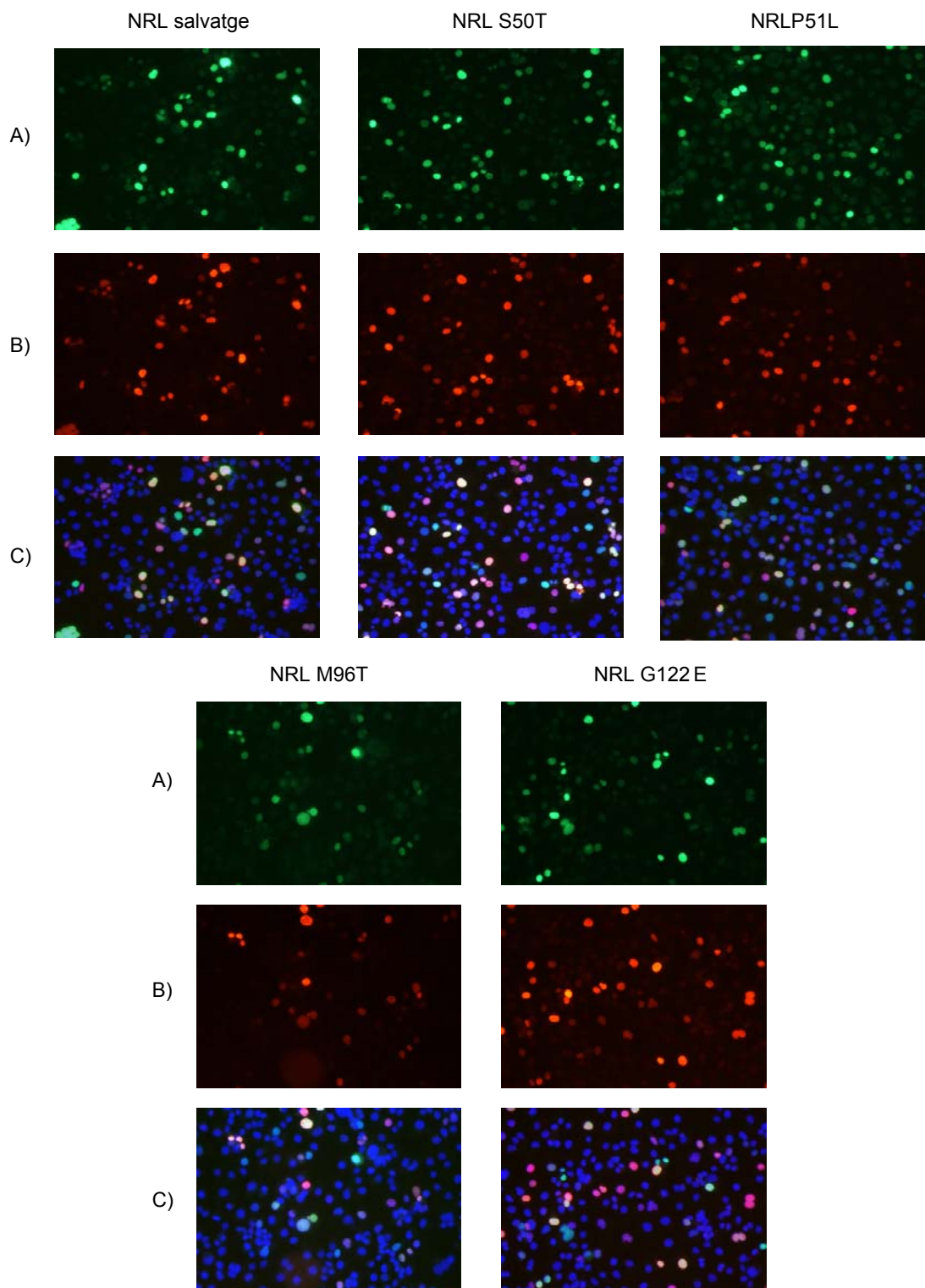
Amb el mètode d'electroporació, es van cotransfectar cèl·lules COS7 amb cada un dels plàsmids pDEST-501-NRL, per separat, juntament amb el vector pDEST-733-CRX. 24 hores més tard, es van observar les cèl·lules al microscopi de fluorescència i es va analitzar la localització d'ambdues proteïnes.

Es va utilitzar la tinció amb DAPI com a control de marcatge nuclear mentre que la transfecció del vector recombinant pDEST-733-PDZ ens va servir com a control de marcatge citoplasmàtic.



**Figura 49. Cèl·lules COS7 transfectades amb vectors pDEST control.** A) En vermell s'observa l'expressió de la proteïna PDZ-RFP (control citoplasmàtic) B) Es sobreposa a l'anterior l'expressió de NRLwt-GFP (verd) C) S'afegeix a les fluorescències anteriors, el marcatge amb DAPI (control nuclear).





**Figura 50.** Cèl·lules COS7 transfectades amb els vectors pDEST portadors dels cDNAs mutats de NRL. En verd es veu l'expressió de les proteïnes NRL-GFP (A) i en vermell l'expressió de CRX-RFP (B). A la part inferior de la figura (C) es sobreposa el marcatge amb DAPI juntament amb l'expressió de NRL-GFP i CRX-RFP.

Les imatges mostren que les diferents mutacions de NRL estudiades no impliquen cap canvi en la localització cel·lular de la proteïna de manera que, al igual que la proteïna salvatge, totes les proteïnes mutades es localitzen al nucli.

El factor de transcripció CRX també té localització nuclear.

#### **4.7. Estudi de l'activitat de les proteïnes NRL mutades**

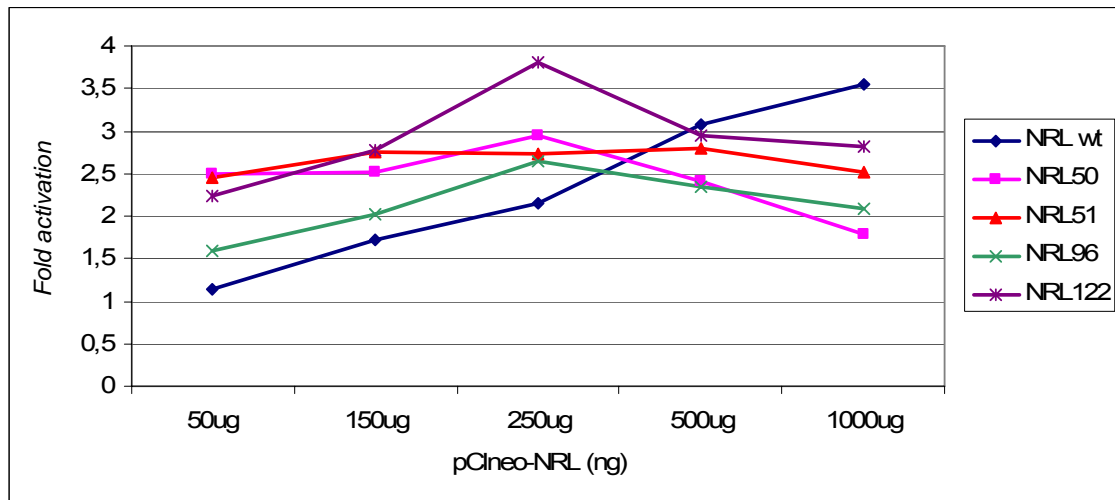
Per tal de veure si les proteïnes NRL mutades tenien la mateixa capacitat d'activar el promotor de rodopsina, es van fer estudis sobre cèl·lules COS7 utilitzant el gen *reporter* de la luciferasa.

A cada punt de cèl·lules COS7 (transfectades per electroporació, segons punt 3.5.2.) es va transfectar:

- pGL3-130. Vector pGL3 portador de part del promotor de la rodopsina seguit del gen de la luciferasa (Tesi doctoral: Martínez-Gimeno, 2004): 2000 ng.
- pCIneo-CRX. Vector pCIneo amb el cDNA de CRX: 1500 ng en cada punt.
- pCIneo-NRL. Vector pCIneo amb el cDNA de NRL (salvatge o mutat): 50, 150, 250, 500 i 1000 ng en cada punt.
- pCH110. Vector utilitzat per a normalitzar els nivells de transfecció: 50 ng.
- pGL2-basic. Vector utilitzat per a normalitzar les quantitats de DNA transfectat: quantitat variable en cada punt.

Les transfeccions van ser repetides per triplicat.

24 hores després de la transfecció es van obtenir els llisats cel·lulars de cada punt i es va fer la lectura de l'activitat luciferasa i  $\beta$ -Galactosidasa (veure punt 3.7.).



**Figura 51. Activació del promotor de rodopsina amb els factors NRL mutats i CRX.** Diferents quantitats de NRL, salvatge o mutat van ser transfectades sobre cèl·lules COS7 juntament amb pCneo-CRX i pGL3-130. L'activació està referida a un punt de transfecció control en el que no s'afegeix NRL ni CRX.

Els resultats mostren una sobreactivació del promotor de rodopsina quan s'utilitzen els NRL mutats en comptes del NRL salvatge.

S'observa també que a partir d'una certa quantitat de NRL transfectat, tots els mutants provoquen una disminució en l'activitat del promotor de rodopsina mentre que aquesta continua augmentant quan es transfecta NRL salvatge.

#### 4.8. Disseny de siRNAs per a interferir el mRNA de NRL

Amb l'ajuda del *software* informàtic Sfold (veure punt 3.4.1) es van dissenyar dos siRNAs que putativament actuarien eliminant tant el mRNA de NRL salvatge com el mRNA dels mutants S50T, P51L, M96T i G122E .

Taula XXIV. siRNAs dissenyats per a interferir el mRNA de NRL humà.

Nom del siRNA	Seqüència	mRNA al que potencialment interfereix
<b>siNRL40</b>	UGACUUUGACUUGAUGAAGtt ttACUGAAACUGAACUACUUC	mRNA de NRL salvatge i mutat
<b>siNRL69</b>	AGCGGGAACCCUCUGAGGGtt ttUCGCCCUUGGGAGACUCCC	mRNA de NRL salvatge i mutat

Per testar la seva eficiència es va transfectar, en cèl·lules COS7 i utilitzant el reactiu Lipofectamina 2000, cada un dels siRNAs per separat juntament amb el plàsmid pCIneo-NRLwt (portador del cDNA del gen NRL salvatge).

Els RNAs, extrets a les 48 hores després de la transfecció, van ser tractats amb DNasa i quantificats amb el sistema de RT-PCR acoblat a SYBR Green (veure punt 3.6.3.). Utilitzant els encebadors específics (veure Taula X), es va quantificar el mRNA de NRL i el de  $\beta$ 2-microglobulina.

Els resultats obtinguts es mostren en la Figura 52.

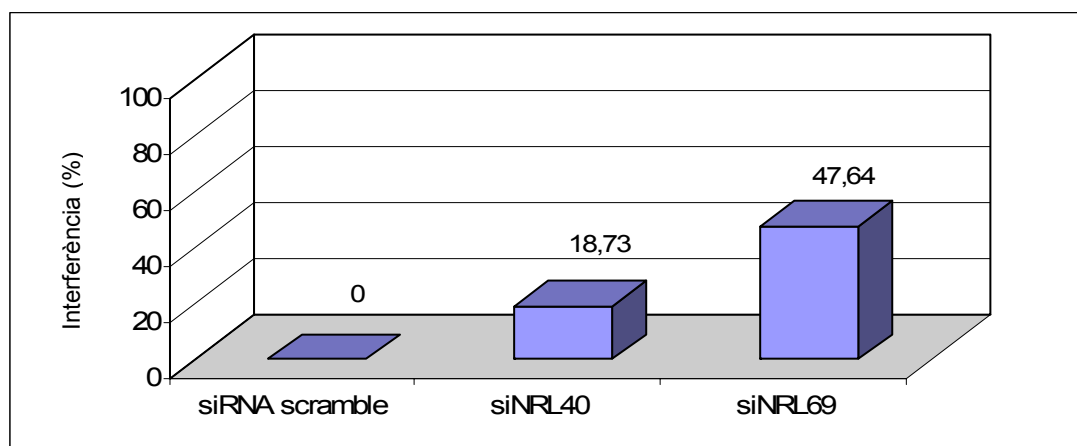


Figura 52. Percentatge d'interferència que realitzen dos siRNAs sobre el mRNA salvatge de NRL.

Es pot observar com ambdós siRNAs interfereixen el mRNA de NRL salvatge però el siNRL69 actua amb una eficiència força superior que el siNRL40.

En aquest experiment, tot i que es va transfectar sempre el vector pCIneo-NRL juntament amb el siRNA desitjat, no s'ha pogut utilitzar cap factor de correcció respecte a la transfecció simultània d'ambdues molècules dins les cèl·lules. Tot i així, en experiments controls realitzats al laboratori s'ha observat que quan en un mateix cultiu cel·lular es transfecta més d'un plàsmid, hi ha un 30-50 % de les cèl·lules transfectades que només presenta un dels plàsmids.

Després de comprovar que entre els dos siRNAs sintetitzats el siNRL69 era el més eficient, es va decidir clonar-lo dins del vector psiRNA-hH1GFPzeo utilitzant el lloc de clonatge del vector Bbs I / Bbs I (veure punt 3.4.2). Es va obtenir així el vector anomenat psiRNA-shNRL69.

**Taula XXV.** shRNA dissenyat per a interferir el mRNA de NRL humà. En groc es marquen les regions complementàries al mRNA.

Nom	Seqüència siRNA	Clonatge dins psiRNA
shNRL69	ACCTCAGCGGGAACCTCTGAGGGTCAAGAGCCCTCAGAGGGTTCCCGCTTT GTCGCCCTTGGGAGACTCCCAGTTCTCGGAGTCTCCCAAGGGCGAAAAAAC	Bbs I / Bbs I

Posteriorment, es van transfectar en cèl·lules COS7 ambdues molècules per separat, siNRL69 i shNRL69. A les 48 hores el mRNA cel·lular es va extreure i quantificar.

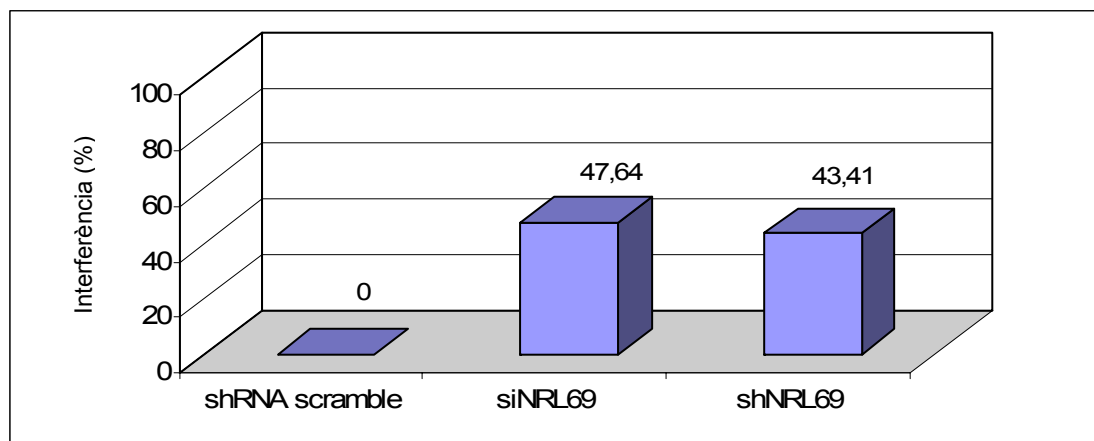


Figura 53. Percentatge d'interferència que realitza un siRNA i un shRNA sobre el mRNA de NRL salvatge.

Els resultats obtinguts indiquen que tant el siRNA com el shRNA NRL69 interfereixen específicament el mRNA de NRL i ambdós ho fan amb una eficiència semblant, pròxima al 50%

#### 4.9. Síntesi d'un cDNA degenerat de NRL

Mitjançant mutagènesi i utilitzant el mètode de l'*overlap extension PCR* (veure punt 3.1.), es va sintetitzar, a partir del cDNA salvatge de NRL, un cDNA degenerat de NRL, és a dir, un cDNA amb determinats nucleòtids canviats respecte a la seqüència de NRL salvatge però que no implica cap canvi a nivell de proteïna.

En cada una de les PCRs realitzades en la primera ronda es va utilitzar un encebador extern (anomenats MM-NRL-F/R) i un encebador intern complementari al cDNA de NRL i portador d'una part de la seqüència de NRL degenerada (anomenats NRLdegenerat-F/R), (veure Taula XXVI).

Com a motlle per a les PCRs es va utilitzar un vector plasmídic que conté el cDNA de NRL humà salvatge.

**Taula XXVI. Encebadors utilitzats per a l'obtenció d'un cDNA degenerat de NRL.** En groc es marquen els nucleòtids que s'han modificat respecte a la seqüència de cDNA salvatge de NRL per tal d'obtenir el NRL degenerat.

Nom	Encebadors ( 5' - 3' )	Tm
MM-NRL-F	CATAAGAAATCCGAATTCAGCCCAGCTCCAGAATG	73,4 °C
MM-NRL-R	CAAGTCTCTATGGAGCTCGTCGACCAGCCCCACTACACCACAAG	> 75 °C
NRLdegenerat-F	GAGGTAAA <b>AA</b> GGGAACCT <b>AGC</b> GAA <b>AG</b> CCGACCTG	74,7 °C
NRLdegenerat-R	GCCAGGTCGGCC <b>TTC</b> <b>GCTA</b> GGTTCCCT <b>TT</b> TTTACCTCAAACCTTCA	80,4 °C

Els productes de PCR obtinguts en la primera tanda van ser:

PCR 1: Encebadors: MM-NRL-F + NRLdegenerat-R

Producte de 123 pb

PCR 2: Encebadors: NRLdegenerat-F + MM-NRL-R

Producte de 710 pb

Per a la tercera PCR es van utilitzar els dos encebadors externs i, com a motlle de DNA, els dos productes obtinguts en les PCRs anteriors. Es va obtenir finalment un cDNA degenerat de NRL.

GAG GTA AAG CGG GAA CCC TCT GAG GGC CGA	→ cDNA salvatge de NRL
GAG GTA AA <b>A</b> <b>AGG</b> GAA CCT <b>AGC</b> GAA <b>A</b> GGC CGA	→ cDNA degenerat de NRL
E V K R E P S E G R	→ Seqüència proteica (a.a. 22-31)

**Figura 54. Seqüència diferencial entre els cDNAs de NRL salvatge i degenerat.** En groc es marquen els nucleòtids que s'han modificat (respecte a la seqüència salvatge) per a la síntesi del cDNA degenerat de NRL.

Els canvis en la seqüència nucleotídica del NRL es van fer de manera que els codons resultants fossin idèntics (sempre que fos possible) als utilitzats per la proteïna en altres posicions aminoacídiques. A més, els canvis es van realitzar en una posició

determinada per tal de que el siRNA i shRNA NRL69 no tinguessin la capacitat, *a priori*, d'interferir el mRNA degenerat de NRL.

#### **4.10. Localització cel·lular i funcionalitat de la proteïna NRL amb seqüència nucleotídica degenerada.**

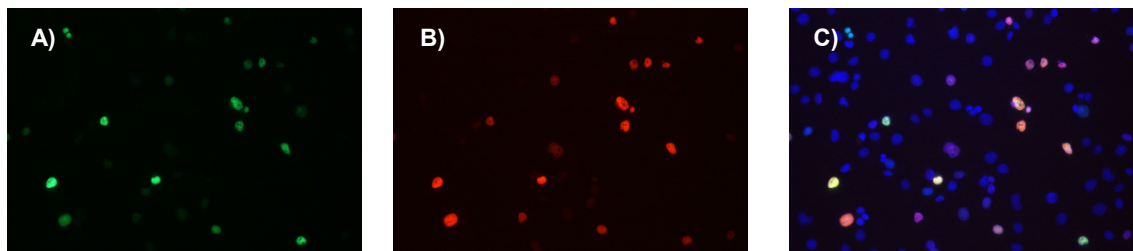
Calia comprovar primer de tot si la proteïna codificada pel cDNA degenerat de NRL s'expressava i tenia una localització i funció homòlogues a les de la proteïna salvatge.

##### **4.10.1. Localització cel·lular de la proteïna**

Per estudiar la localització de la proteïna, el cDNA degenerat de NRL va clonar-se dins els vectors del Sistema *Gateway* (veure punt 3.3.1.) per obtenir finalment un plàsmid pDEST-501 recombinat amb el cDNA de NRL degenerat.

Es van cotransfectar cèl·lules COS7 (utilitzant el mètode d'electroporació) amb els vectors pDEST-501-NRLdegenerat i pDEST-733-CRX. A les 24 hores després de la transfecció, es va fer la tinció nuclear amb DAPI i es va mirar al microscopi de fluorescència la localització d'ambues proteïnes.





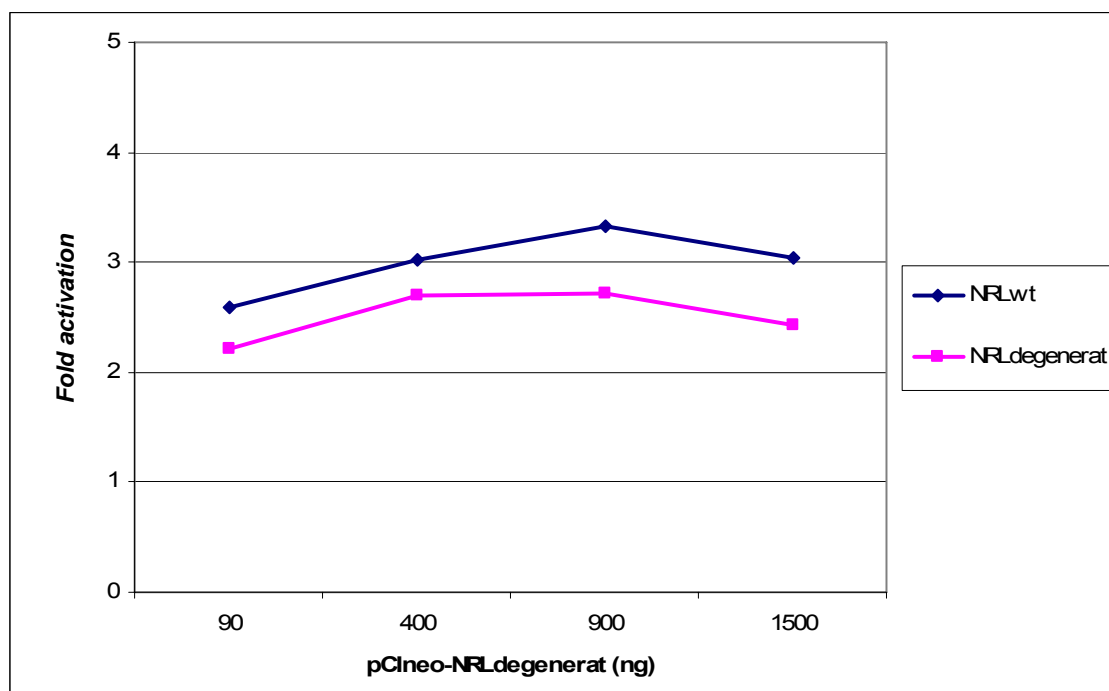
**Figura 55.** Cèl·lules COS7 transfectades amb el vector pDEST portador del cDNA degenerat de NRL. En verd es veu l'expressió de la proteïna de fusió NRLdegenerat-GFP (A) i en vermell l'expressió de CRX-RFP (B). En la imatge C) es sobreposa el marcatge amb DAPI juntament amb l'expressió de NRL-GFP i CRX-RFP.

Igual que la proteïna NRL salvatge i les proteïnes mutades estudiades anteriorment, la proteïna formada a partir del cDNA degenerat de NRL es localitza a nucli.

#### **4.10.2. Funcionalitat de la proteïna**

Per tal de testar la funcionalitat de la proteïna, el cDNA de NRL degenerat va ser clonat dins el vector pCIneo entre els llocs de restricció *EcoRI* i *Sall* (veure punt 3.2.).

Igual que es va fer per estudiar l'activitat de les proteïnes NRL mutades, es van cotransfectar cèl·lules COS7 amb el vector pCIneo-NRL (degenerat o salvatge) juntament amb els diferents vectors anteriorment citats (veure punt 4.7.) per tal de veure quina era l'activació del promotor de rodopsina. Amb aquesta finalitat, es va quantificar l'activitat luciferasa i  $\beta$ -Galactosidasa dels llistats obtinguts.



**Figura 56. Activació del promotor de rodopsina amb els factors NRL degenerat i CRX.** Diferents quantitats de NRL, salvatge o degenerat van ser transfectades sobre cèl·lules COS7 juntament amb pCIneo-CRX i pGL3-130. L'activació està referida a un punt de transfecció control en el que no s'afegeix NRL ni CRX.

#### 4.11. Estudis d'interferència realitzats sobre el mRNA degenerat de NRL

La seqüència nucleotídica degenerada de NRL es va dissenyar de manera que, a *priori*, no hi poguessin actuar ni el siNRL69 ni el shNRL69 ja que s'havien modificat 7 dels 19 nucleòtids amb els que aquestes dues molècules presentaven complementarietat de bases amb el cDNA de NRL salvatge.

Per comprovar-ho, es va cotransfectar en cèl·lules COS7 cada una de les molècules juntament amb el plàsmid pCIneo-NRLdegenerat. Amb el RNA extret a les 48 hores es va procedir a la quantificació de NRL i  $\beta$ 2-microglobulina (veure punt 3.6.3).

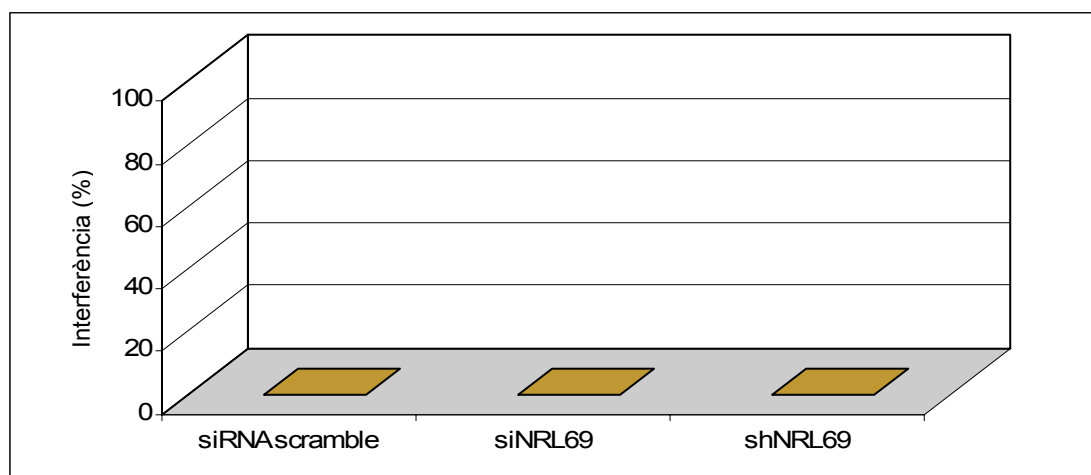


Figura 57. Percentatge d'interferència que realitzen un siRNA i un shRNA sobre el mRNA de NRL degenerat.

Els resultats mostren que ni el siNRL69 ni el shNRL69 són capaços d'interferir el mRNA de NRL degenerat, actuen igual que un shRNA *scramble*.

#### **4.11.1. Construcció d'un plàsmid portador del cDNA degenerat de NRL i del shNRL69, sota promotors independents**

Un cop observat que el shNRL69 interferia específicament el mRNA salvatge de NRL i deixava intacte el mRNA degenerat, es va decidir clonar dins el vector pDEST501-NRLdegenerat el promotor H1 seguit del shNRL69.

##### **1. Amplificació del promotor H1 + shNRL69 a partir del vector psiRNA-shNRL69.**

Es van dissenyar uns encebadors per tal de poder amplificar, a partir del plàsmid psiRNA-shNRL69 construït anteriorment (veure punt 4.8.), el promotor H1 i el shRNA clonat a continuació. Els encebadors introduïrien en els extrems del fragment de PCR dianes de restricció *NgoMIV* (veure Taula XXVII).

**Taula XXVII. Encebadors utilitzats per a l'amplificació del promotor H1 + shRNA NRL69.** En cursiva i subratllat es marca la diana de restricció *NgoMIV*.

Encebador	Seqüència ( 5' – 3' )	Tm
H1-shNRL-F	GTTGTCGCAG <u>C</u> CCGGCAGGGATTTGGTCATGTTCTTAA	78,2 °C
H1-shNRL-R	TGCCTGTCTATAG <u>C</u> CCGGCGGGTCGTTGGGCGGTCA	83,7 °C

Les condicions de PCR van ser:

Pre-incubació "Hot start" a 95°C, 6 minuts

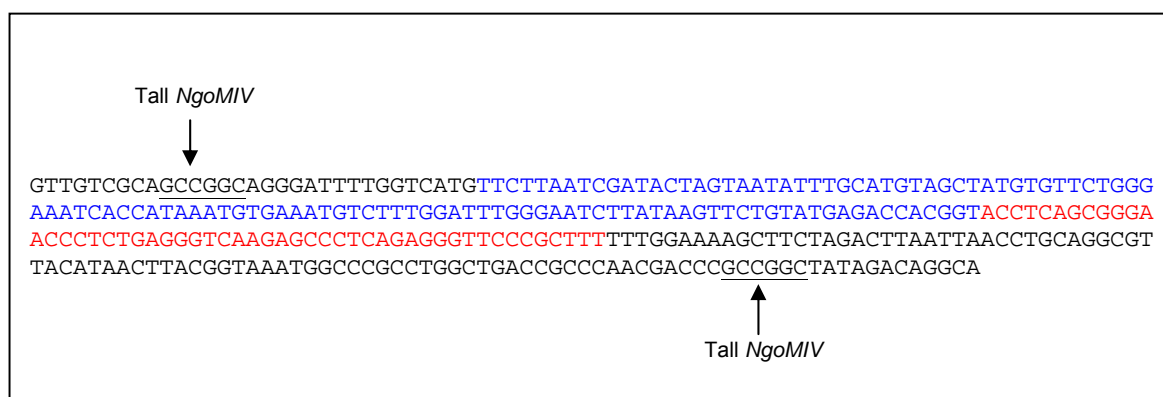
Desnaturalització a 95°C, 30 segons

Anellament a 61,5°C, 30 segons

Extensió a 72°C, 1 minut

Final a 15°C

durant 20 cicles

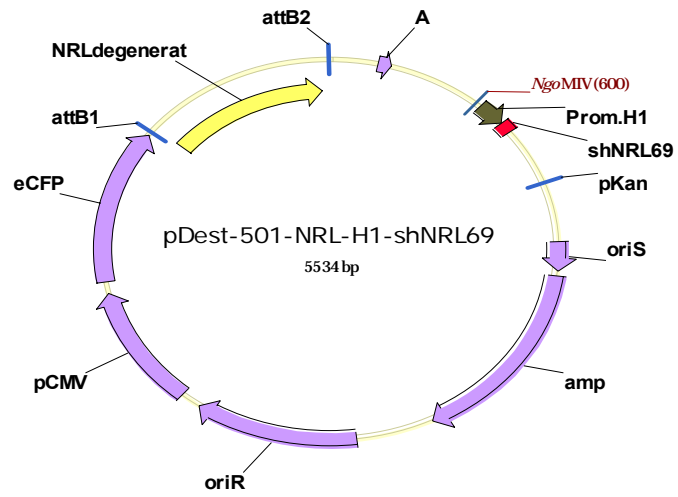


**Figura 58. Esquema del producte de PCR obtingut amb els encebadors H1-shNRL.** El producte conté el promotor H1 (marcat en blau) seguit del shRNA NRL69 (marcat en vermell). En els extrems té la seqüència diana per a l'enzim de restricció *NgoMIV* (subratllades).

## 2. Construcció del plàsmid

Utilitzant l'enzim de restricció *NgoMIV* es van digerir tant el fragment de PCR obtingut anteriorment com el plàsmid pDEST501-NRLdegenerat i es va seguir el protocol

establert per al clonatge d'un fragment de DNA dins un vector plasmídic (veure punt 3.2.).



**Figura 59. Construcció vector pDEST- cDNA degenerat de NRL- shNRL69.** Vector pDEST-501 portador del cDNA degenerat de NRL (sota el control del promotor de CMV) i del shRNA NRL69 (sota el control del promotor H1).

## **5. DISCUSSIÓ**

---



## 5. DISCUSSIÓ

En el laboratori es realitza sistemàticament l'anàlisi de mutacions en gens relacionats amb RPAD per tal de trobar en cada pacient, i per extensió a tota la família, la causa genètica de la seva malaltia (Martínez-Gimeno, 2004; Gamundi, 2006).

El treball d'aquesta Tesi se centra concretament en l'estudi de mutacions relacionades amb una alteració de l'expressió gènica i associades a Retinosi Pigmentària Autosòmica Dominant. Així, el treball s'ha centrat en mutacions trobades en el factor de transcripció NRL, en els factors de *splicing* PRPF i en mutacions que afecten el procés de *splicing* en el gen de la rodopsina (Reig et al., 1996; Martínez-Gimeno et al., 2000).

En les últimes anàlisis, on s'han estudiat un total de 30 pacients índex afectats de RPAD, s'han trobat dues noves mutacions d'especial interès.

Una d'elles (A489D) es troba en el gen PRPF3 i suposa la tercera mutació descrita en aquest gen (Gamundi et al., 2008). En la família on s'ha detectat, els dos individus amb RPAD analitzats presenten la mutació. Hi ha però un tercer individu (IV:3), de només 5 anys, que presenta la mutació però de moment és asimptomàtic. Es pot gairebé afirmar que la mutació trobada segrega amb la malaltia i que el pacient IV:3 no presenta de moment el fenotip RP probablement degut a la seva curta edat. Tot i així, cal remarcar que l'estudi familiar no s'ha pogut completar ja que hi ha una part de la família que no ha volgut col·laborar en l'estudi.

Aquest nou canvi aminoacídic descrit en PRPF3 suposa el canvi d'un aminoàcid no polar a un aminoàcid àcid i està situat a només 4 aa *upstream* de les dues mutacions trobades fins al moment en aquest gen, P493S i T494M (Martínez-Gimeno et al., 2003). Se sap que la regió C terminal on es troben les tres mutacions de PRPF3 està ben conservada evolutivament (Gamundi et al., 2008) i a més, aquesta regió sembla estar implicada en les interaccions que es donen entre aquest factor de *splicing* i altres



elements implicats en el *spliceosoma* com per exemple PAP-1, un gen sobre el que s'han trobat mutacions causants de RP9, un tipus concret de RPAD (Maita et al., 2005).

Per tal de confirmar que la mutació Ala489Asp és la causant de RPAD en aquesta família, al laboratori s'estan dissenyant estudis funcionals per a analitzar la proteïna mutada. Aquestes anàlisis però no són objecte d'estudi en aquesta tesi.

La segona mutació trobada amb el *screening* de mutacions fet en pacients amb RPAD ha estat el canvi Met96Thr en el factor de transcripció NRL. En aquest cas, tots els malalts analitzats en la família són portadors de la mutació però a més, hi ha dos individus asimptomàtics portadors també del canvi nucleotídic. Aquest fet fa suposar que estem davant un cas d'aparició tardana de la malaltia o penetrància incompleta. Donat que en el gen NRL s'han trobat mutacions causants de RP tant d'herència recessiva com d'herència dominant, al laboratori s'han fet estudis funcionals de proteïnes NRL mutades per tal de poder definir un possible mecanisme patològic d'aquestes i poder fer una possible classificació d'aquelles que són candidates a ser causants de RPAD.

Amb aquesta finalitat, es va començar estudiant la localització cel·lular de les proteïnes NRL mutades portadores de les mutacions S50T, P51L, M96T i G122E (Bessant et al., 1999; Martínez-Gimeno et al., 2001). L'anàlisi de les proteïnes de fusió obtingudes entre NRL i GFP va mostrar una localització nuclear de totes les proteïnes NRL mutades que coincidia exactament amb la localització cel·lular de la proteïna NRL salvatge. Aquest resultat demostra que l'efecte patològic de les mutacions estudiades no és degut a una situació aberrant de la proteïna NRL en la cèl·lula sinó a algun mecanisme diferent. Cal tenir en compte però que els estudis s'han fet sobre cèl·lules COS7 ja que, fins al moment, ha estat impossible treballar amb cèl·lules fotoreceptores de retina al laboratori. Per tant, tot i que aquesta pot ser una bona aproximació, degut a que el

factor de transcripció NRL s'expressa únicament en cèl·lules de retina, caldria confirmar aquestes localitzacions en cultius de fotorceptors o en models animals

Es va decidir estudiar després el paper que té el factor NRL en la regulació de l'expressió gènica. Per això, es va clonar el gen de la luciferasa sota el control del promotor de la rodopsina i el cDNA de NRL i el de CRX, dos factors de transcripció que se sap que actuen de manera sinèrgica activant el promotor de rodopsina, (Mitton et al., 2000; Pittler et al., 2004) sota el control del promotor CMV. Es volia veure si l'activació del promotor de rodopsina variava segons si el NRL introduït en les cèl·lules (juntament amb el factor CRX) era el salvatge o algun dels mutats.

Comparant els valors obtinguts amb NRL salvatge, els resultats mostren que hi ha un augment d'expressió de luciferasa (que indica un augment en l'activació del promotor de rodopsina) cada vegada que s'introdueix a la cèl·lula un cDNA de NRL mutat. A diferència però dels últims resultats publicats (Kanda et al., 2007) els nostres estudis mostren que a l'introduir en les cèl·lules elevades quantitats de NRL mutat, hi ha una disminució de l'expressió de luciferasa mentre que, quan s'utilitza NRL salvatge hi ha sempre una correlació positiva entre la quantitat de NRL introduït i el perfil d'expressió de luciferasa. El perquè elevades quantitats de NRL mutat porten a una disminució de l'activació del promotor està sent objecte d'estudi en aquests moments al laboratori. Sabent però que en qualsevol procés de transfecció hi ha un nombre màxim de cèl·lules que es transfecten, podem pensar que, a l'augmentar la quantitat de DNA transfectat fins a nivells molt elevats, el que s'aconsegueix no és un augment del nombre de cèl·lules transfectades sinó un augment de la quantitat de DNA introduït dins de cada una de les cèl·lules que és susceptible a ser transfectada. Tenint en compte aquest fet, podem pensar que en els nostres experiments, la disminució en els nivells d'expressió de luciferasa sigui deguda a un efecte d'agregació entre molècules NRL mutades o entre molècules de NRL mutades i algun o varis factors que hi puguin

interaccionar. Aquestes interaccions deixarien menys quantitat de proteïna NRL lliure i disminuiria així la possibilitat d'activació del promotor de rodopsina.

Una altra possibilitat seria que les mutacions en NRL fessin variar les propietats cinètiques de la proteïna resultant de manera que la velocitat d'unió / desunió entre el factor de transcripció i el promotor de rodopsina es podria veure alterada i, com a conseqüència, quedaria afectada l'expressió del gen que està regulat per aquest promotor. Aquesta variació en la cinètica de reacció podria estar associada a modificacions post-transcripcionals com seria per exemple la fosforilació. De fet, existeixen ja estudis que relacionen certes mutacions en NRL causants de RPAD amb un diferent grau de fosforilació de la proteïna (Kanda et al., 2007).

Sabent que les mutacions en el gen NRL tenen un efecte dominant negatiu, la sobreactivació del promotor de rodopsina, observada en els mutants de NRL, podria no ser la causa única d'aquest efecte ja que, arribat a una concentració determinada, aquesta sobreactivació causada per la mutació en NRL desapareix. Per tant, seria d'esperar que la causa de RP en els pacients amb mutació NRL fos l'agregació de proteïna mutada o bé la variació de les propietats cinètiques d'aquesta. Actualment s'està investigant activament aquesta hipòtesi en el laboratori.

Donat que la nova mutació trobada, M96T, segueix el mateix patró que les mutacions S50T i P51L (que se sap són mutacions dominants causants de RPAD), podem pensar que aquest nou canvi nucleotídic és candidat a ser el causant de RPAD en la família on s'ha descrit.

En els darrers mesos però s'ha fet una nova revisió oftalmològica de la família portadora de la mutació Met96Thr i s'ha detectat la presència d'un individu (no portador de la mutació) que amb 37 anys d'edat manifesta símptomes inicials de RP. Aquest fet ens fa replantejar la naturalesa de la mutació i podem pensar en tres possibles situacions diferents:

- a) Que la causa de RPAD en la família sigui una altra i no la mutació detectada. Fet no predictable inicialment donat l'arbre genealògic de la família i el fet que els 3 individus malalts presenten la mutació.
- b) Que les proves de funcionalitat de la proteïna NRL realitzades al laboratori no es correlacionin amb el diagnòstic. Cal recordar però que hi ha estudis publicats on s'utilitza aquesta metodologia (Kanda et al., 2007).
- c) Que la mutació participi en un mecanisme digènic o poligènic causant de RPAD.

L'estudi presentat manifesta l'heterogeneïtat i complexitat de la Retinosi Pigmentària. Aquest fet, sumat a la dificultat del diagnòstic i pronòstic de la malaltia, ens demostra la importància que té el realitzar estudis clínics i de laboratori de manera coordinada així com la importància de la correlació fenotip - genotip.

D'aquesta manera, un altre objectiu d'aquesta tesi era investigar els mecanismes patològics produïts per les mutacions en senyals de *splicing* g.3811A>G i g.5167G>T trobades en el lloc de *splicing* 3' dels introns 2 i 4 del gen de rodopsina en dues famílies amb RPAD (Reig et al., 1996; Martínez-Gimeno et al., 2000) i comparar-los amb els possibles mecanismes produïts per la mutació, també de *splicing*, g.4335G>T detectada en el lloc de *splicing* 5' de l'intró 4 del mateix gen i causant de RPAR en dues famílies independents (Rosenfeld et al., 1995; Greenberg et al., 2003).

Estudis anteriors realitzats al laboratori sobre minigens de rodopsina (Gamundi et al., 2008) van demostrar que les mutacions en senyals de *splicing* en el gen RHO detectades en la població espanyola provoquen la inactivació d'aquests senyals i creen altres senyals alternatius que donen lloc a la síntesi de productes aberrants de processament del mRNA de RHO. Es va veure però que segons quina era la

seqüència utilitzada per a generar el minigen, els productes de *splicing* obtinguts podien variar, és a dir, que les seqüències flanquejants podien ser importants per al processament del mRNA. Per a eliminar aquest possible factor modulador dels resultats de *splicing*, es van realitzar nous estudis sobre els DNAs genòmics totals de RHO. Aquests estudis, fets en cèl·lules COS7, van confirmar també l'existència d'un patró de *splicing* alterat.

En el cas de la mutació g.3811A>G, el senyal de *splicing* AG normal situat a les posicions 3811-3812 queda abolit i es creen dos nous senyals de *splicing* AG que donen com a resultat dos productes diferents amb un exó 3 alternatiu. Un fet molt semblant passa amb la mutació g.5167 G>T ja que el senyal de *splicing* AG normal situat a les posicions 5166-5167 queda abolit i es crea un nou senyal de *splicing* que genera un nou producte amb un exó 5 alternatiu.

No segueix però el mateix mecanisme la mutació g.4335G>T (d'herència recessiva). Aquesta mutació aboleix el senyal 5' de *splicing* GU normal situat a les posicions 4335-4336 però, contràriament a les dues mutacions descrites anteriorment, no es crea un lloc de *splicing* alternatiu, sinó que el producte de mRNA resultant elimina per complet l'exó 4.

Per tant, igual que s'observava en els minigens, a l'analitzar els productes de *splicing* resultants de les transfeccions dels genòmics mutats de RHO, es pot concloure que les mutacions de *splicing* en aquest gen produeixen mRNAs aberrants. Cal destacar però que, mentre les mutacions g.3811A>G i g.5167 G>T, causants de RPAD, busquen un lloc de *splicing* alternatiu dins la seqüència gènica, la mutació recessiva g.4335G>T aboleix la senyal de *splicing* mutada i la cèl·lula passa a utilitzar la senyal de *splicing* present en el següent intró.

Aquest fet fa pensar en que probablement hi ha una cinètica de *splicing* diferent entre els llocs normals de *splicing* utilitzats normalment per la cèl·lula i els llocs alternatius

generats per les mutacions estudiades. Així, donat que la maquinària de *splicing* té com a llocs preferents d'actuació les zones on hi ha els senyals de *splicing* constitutius, es pot pensar que actua d'una manera més lenta (o infinitament més lenta) processant les zones de *splicing* amb senyals alternatius. Aquest fet es posa de manifest a l'observar que tot i que els senyals de *splicing* alternatius es troben també en els pre-mRNAs salvatges, la maquinària de *splicing* no els utilitza si troba els senyals de *splicing* normals inalterats. D'aquesta manera, en les RPAD (on els pacients tenen un al·lel salvatge i un al·lel mutat) es podria hipotetitzar un model de competència entre el processament de l'al·lel salvatge i el de l'al·lel mutat de manera que, per exemple, una part de la maquinària de *splicing* quedaria durant més temps retinguda en els senyals de *splicing* alternatius mentre que una altra part, a l'unir-se als llocs preferents de *splicing* presents en els genòmics salvatges, continuaria processant (a una velocitat més elevada) proteïna normal. Aquesta diferent cinètica de processament provocada segons el lloc de *splicing* utilitzat implicaria (en individus heterozigots) la síntesi de més quantitat de proteïna salvatge que mutada i, si aquesta proteïna mutada fos tòxica, explicaria el perquè, tot i tenir aquestes mutacions un efecte dominant negatiu, pacients amb RPAD amb mutacions en els llocs de *splicing* del gen de rodopsina presenten un fenotip més lleu que els individus amb mutacions en la regió codificant d'aquest mateix gen (Berson et al., 2002).

A més, aquesta hipòtesi sobre la diferent cinètica de *splicing* també explicaria les RPAR degudes a mutacions en llocs de *splicing*. Així, estudiant la mutació g.4335G>T s'observa que no es creen llocs de *splicing* alternatius sinó que la maquinària cel·lular de processament simplement salta el lloc mutat. Per tant, en aquest cas, la maquinària de *splicing* continua utilitzant els llocs normals de *splicing* i ho farà sempre a una velocitat determinada, probablement igual a la que actuaria sobre un genòmic salvatge donat que els llocs de *splicing* no han variat, simplement se n'ha eliminat un. Al no haver-hi una retenció de la maquinària de processament del pre-mRNA en els llocs

alternatius de *splicing*, la cèl·lula fotoreceptora conserva la capacitat de *splicing* que trobaríem davant un mRNA de rodopsina salvatge. Per tant, aquest mutant, contràriament als mutants de *splicing* causants de RPAD, no provocaria un efecte negatiu degut a la limitació del procés de *splicing* en el fotoreceptor. Això, juntament amb la possible no toxicitat de la proteïna sintetitzada explicaria el perquè la mutació no desencadena la malaltia en individus heterozigots.

La proteïna formada a partir del genòmic mutat g.4335G>T sembla que hauria perdut les hèlix VI i VII transmembrana. Aquesta proteïna, si s'expressés, probablement no seria funcional i sembla que no provoca un efecte deleteri en cèl·lules bastó; un fet semblant al que s'ha vist en estudis realitzats sobre el mutant de rodopsina E150K causant de RPAR (Zhu et al., 2006).

La següent aproximació del mecanisme patològic de les mutacions de rodopsina descrites es va fer estudiant la localització de les proteïnes mutades sintetitzades.

Tindríem així una aproximació sobre el tipus de mutant, I o II, de rodopsina (Sung et al., 1993, 1994 i 2000; Kaushal et al., 1994).

En un primer estudi es volia detectar si les proteïnes codificades pels productes de *splicing* dels genòmics mutats de RHO anaven a membrana, on es dirigeix la proteïna salvatge, o si la mutació impedia la seva correcta localització. Els experiments d'immunocitoquímica fets sobre cèl·lules permeabilitzades (on es veuria la proteïna rodopsina expressada en qualsevol zona de la cèl·lula) i sobre cèl·lules sense permeabilitzar (que només permetrien veure la proteïna rodopsina que arriba a membrana) ens van mostrar diferències entre les proteïnes mutades i la salvatge. Així, mentre veiem gran quantitat de proteïna RHO salvatge a membrana, n'hi havia menys quantitat de RHO g.5167G>T i, pràcticament no es detectava proteïna a membrana quan s'estudiaven les mutacions g.4335G>T i, sobretot, g.3811A>G. Per tant, sembla que les proteïnes mutants tenen dificultats per arribar a la membrana cel·lular i, si hi

arriben, ho fan d'una manera molt més lenta. La hipòtesi és que pot haver-hi un problema d'agregació de proteïna a l'interior de la cèl·lula o un defecte en el transport d'aquesta cap a membrana. Estaríem en aquest cas parlant de mutacions de rodopsina de tipus II (Sung et al., 1993; Kaushal et al., 1994).

Per tal d'investigar aquest mecanisme, es van realitzar estudis utilitzant proteïnes de fusió entre RHO i GFP. L'observació d'aquestes proteïnes al microscopi de fluorescència ens donaria informació addicional sobre la localització cel·lular de cada una d'elles. Els resultats evidencien que, mentre que la proteïna rodopsina salvatge se situa a membrana, les proteïnes resultants de l'expressió dels dos productes de *splicing* generats per la mutació g.3811A>G i del producte generat per g.4335G>T tenen una localització majoritària diferent i, tot i que hi ha diferències entre cada una de les cèl·lules i no es veu un patró homogeni en totes, sí que s'observa en la majoria de les cèl·lules una localització juxtenuclear de la proteïna rodopsina. Tot i que en alguns casos sembla que la proteïna tingui una localització en aparell de Golgi, s'han de fer més estudis per confirmar-ho ja que hi ha, per exemple, bibliografia (Saliba et al., 2002) que mostra que determinats mutants de RHO quan són transfectats en cèl·lules COS7 formen agrosomes, uns agregats intracel·lulars que es formen com a resposta fisiològica a un excés de polipèptids mal plegats. Independentment de la localització exacta a nivell cel·lular, el fet de que en aquests mutants la proteïna RHO es trobi predominantment a la zona juxtenuclear de les cèl·lules fa pensar que podria ser un problema d'acúmul de proteïna i toxicitat el causant del fenotip RP.

A diferència, les proteïnes generades a partir dels productes mutats g.5167G>T sembla que tenen una localització pràcticament igual a la rodopsina salvatge.

Al laboratori es continuen fent estudis sobre la localització d'aquests mutants, utilitzant ara la tècnica de microscòpia confocal, per tal de poder confirmar la hipòtesi



d'acumulació i toxicitat de les proteïnes mutants i trobar una explicació més acurada sobre el mecanisme patològic en que estan implicades cada una d'elles.

En aquelles malalties dominants, com la RPAD, on la causa de la patologia pot ser una proteïna mutada amb un efecte dominant negatiu, una bona aproximació terapèutica consisteix en eliminar aquesta proteïna anòmala per suprimir així l'efecte negatiu i permetre l'actuació del producte salvatge. Amb aquesta finalitat, el nostre grup va entrar en el camp de la interferència del RNA (RNAi). Per utilitzar qualsevol de les molècules capaces d'interferir un mRNA (ribozim, siRNA o shRNA) primer cal testar la seva especificitat. Així, el primer experiment realitzat al laboratori tenia com a finalitat eliminar específicament un gen endogen en un cultiu cel·lular. Es va escollir el gen PRPF8 ja que és un dels gens estudiats en una de les línies d'investigació que es realitzen en el laboratori (Martínez-Gimeno et al., 2003; Gamundi et al., 2008). L'estudi detallat de les seqüències del gen PRPF8 salvatge i portador de la mutació 6974\_6994del mostren clarament que no hi ha cap seqüència diferencial en l'al·lel mutat respecte al salvatge. No obstant, sí que hi ha una diferència de seqüència en l'al·lel salvatge respecte al mutat ja que la zona que es delecta amb la mutació crea en l'al·lel salvatge una regió diferencial inexistent en el DNA mutat.

Quan es va analitzar, amb l'ajuda del programa Sfold, l'estructura secundària del mRNA salvatge de PRPF8 es va veure que aquesta seqüència diferencial era una bona regió per a que hi pogués interaccionar un siRNA putativament funcional.

Per tant, es va decidir sintetitzar un shRNA i un siRNA (ambdós amb la mateixa seqüència) que, *a priori*, haurien d'interferir l'al·lel salvatge de PRPF8.

A més però, es va estudiar també la possibilitat de dissenyar un ribozim contra la mateixa seqüència ja que a l'hora de sintetitzar un ribozim *hammerhead* funcional, els requeriments de seqüència són menys que els que es requereixen per al disseny d'un siRNA funcional. Així, un ribozim necessita una regió diferencial molt més petita que

presenti, gairebé com a condició única, una zona NUH (on H és qualsevol nucleòtid excepte G) sobre la que es realitzarà el tall catalític. Donat que la seqüència diferencial entre l'al·lel salvatge i el mutat presentava una d'aquestes zones, es va dissenyar també un ribozim contra PRPF8 salvatge. Amb els experiments realitzats sobre cultius cel·lulars es va demostrar que les tres molècules interferien el producte PRPF8 salvatge amb una eficiència superior al 40 % i que, en el cas del siRNA arribava a un 80 %.

Al silenciar aquestes molècules el mRNA salvatge i no el mutat, no era possible utilitzar-les com a aproximació terapèutica de la malaltia però sí que ens podien servir per a estudis funcionals de la proteïna PRPF8. Al ser aquesta proteïna important per al procés de *splicing* en la cèl·lula, es va pensar que la seva abolició podia afectar d'una manera important la viabilitat cel·lular, com s'ha vist que passa a l'estudiar algunes mutacions en el factor PRPF31 (Yuan et al., 2005). Per tal de comprovar-ho, es van fer estudis d'apoptosi sobre cèl·lules humanes HEK293, que expressen PRPF8. En aquestes cèl·lules es va transfectar el shRNA dissenyat i els resultats demostren que quan s'interfereix el mRNA de PRPF8 en una cèl·lula, aquesta entra en la via apoptòtica confirmant-se per tant la importància de PRPF8 en la viabilitat cel·lular.

Donat que al laboratori es disposa de línies limfoblastoides humanes portadores de la mutació c.6974\_6994del transformades amb EBV, s'està estudiant la possibilitat de transfectar-les amb el shRNA mencionat per tal d'eliminar el mRNA de PRPF8 salvatge i veure quin és el comportament de la cèl·lula quan només sintetitza la proteïna PRPF8 mutada. D'aquesta manera es podria arribar a traçar el mecanisme patològic que segueix l'al·lel mutat. Fins al moment però, el principal inconvenient d'aquest estudi és que les línies limfoblastoides són difícils de transfectar i per a poder fer un estudi acurat del mecanisme patològic dels mutants és necessari disposar d'un nombre elevat de cèl·lules interferides. S'està discutint també la possibilitat de transfectar les cèl·lules i separar-les després amb un *cell sorter* però el problema està

en la viabilitat d'aquestes cèl·lules després de passar per un procés de transfecció i un de separació. Caldria assegurar-se de que els resultats obtinguts són deguts a la presència única de PRPF8 mutat a les cèl·lules i no pas a la manipulació que requeriria tot l'estudi.

Continuant en el camp dels siRNAs i després de veure que amb els *softwares* informàtics dels que disposàvem es podien dissenyar molècules funcionals per a la interferència del mRNA, es va intentar fer una aproximació terapèutica per a les mutacions trobades en posicions de *splicing* del gen RHO i que són causants de RPAD. Com a model per a l'estudi es van utilitzar cèl·lules COS7 a les que se'ls va transfectar un vector portador del cDNA mutat de RHO més un siRNA concret. Els estudis es van fer sobre la seqüència salvatge i sobre les seqüències portadores de les mutacions causants de RPAD utilitzant sempre tant els minigens com els genòmics sencers de RHO. Després d'estudiar amb el programa Sfold cada un dels trànscripats resultants de les mutacions g.3811A>G i g.5167 G>T es van dissenyar tres siRNAs diferents. Un d'ells, anomenat R3811B1, hauria d'inhibir específicament el producte 1 obtingut amb la transcripció del cDNA genòmic de RHO portador de la mutació g.3811A>G. El segon producte obtingut amb aquest genòmic hauria de ser silenciats putativament amb un segon siRNA dissenyat, anomenat R3811B5. El tercer siRNA, anomenat RHO5167, hauria d'interferir el producte obtingut amb el cDNA genòmic portador de la mutació g.5167 G>T. Els resultats demostren en primer lloc, que l'efecte de cada un dels siRNAs sobre els productes dels minigens és comparable a l'efecte que produeixen sobre els genòmics corresponents. Això era d'esperar tenint en compte que les seqüències dels minigens estan contingudes en les seqüències genòmiques respectives.

A l'analitzar-los de manera individual, s'observa que el siRNA R3811B1 elimina amb una elevada eficiència i especificitat el mRNA desitjat mentre que deixa intacte tant el

segon producte de *splicing* mutat com el mRNA salvatge de rodopsina. Quan s'analitza però el segon siRNA (R3811B5) dissenyat per a l'estudi de la mutació g.3811A>G no es veu especificitat de mRNA. R3811B5 és molt eficient però interfereix tots els productes de *splicing*, mutats i salvatges. Quan s'analitza detalladament la seqüència diana d'aquest siRNA, es pot veure com la seqüència del mRNA salvatge i la dels productes mutats (diferents al producte diana d'aquest siRNA), només difereixen en 2 nucleòtids a la regió 5' respecte la seqüència diana del siRNA R3811B5. Per tant, en aquest cas, una diferència de dos nucleòtids no és suficient perquè el producte salvatge pugui escapar del silenciament genètic produït per R3811B5. Així, aquest siRNA no serveix com a aproximació terapèutica tot i que sí que pot ser útil per a futurs experiments on es vulgui silenciar el gen RHO, independentment de que sigui salvatge o mutat.

El tercer siRNA, Rho5167, mostra una elevada especificitat i és capaç d'interferir el mRNA mutat g.5167G>T amb una eficiència aproximada del 50 %.

És important destacar que tots els resultats extrets d'aquests estudis d'interferència gènica probablement estan subestimats ja que els valors d'interferència s'han obtingut després de quantificar els RNAs extrets dels cultius cel·lulars transfectats amb dues molècules diferents: un vector amb el cDNA corresponent i un siRNA. Se sap però (i s'ha comprovat també al laboratori) que quan es transfecta un cultiu cel·lular amb més d'una molècula, no en totes les cèl·lules transfectades trobem totes les molècules, és a dir, en aquest cas en concret, probablement hi ha cèl·lules on només haurà entrat el siRNA, d'altres que només continguin el DNA plasmídic i unes altres (que serien les que ens interessaria analitzar) on hi hauria ambdues molècules. Com que és inviable fer *cell sorter* de cada un d'aquests experiments per tal d'analitzar només les cèl·lules on s'han transfectat ambdues molècules, se suposa que els resultats obtinguts ens mostren la interferència mínima que realitza cada un dels siRNAs estudiats però es creu, que l'efecte real és superior en tots els casos.

Els resultats que hem obtingut en els experiments d'interferència de mRNA específics pels al·lells mutats de rodopsina demostren que determinats productes de *splicing* no es poden interferir de manera específica. El mateix passa en el cas analitzat de PRPF8 on l'al·lel mutat no mostra cap seqüència diferencial que pugui ser interferida. A aquesta limitació s'hi ha d'afegir la de la gran quantitat de siRNAs que s'haurien de dissenyar per tal de poder estudiar l'ampli espectre de mutacions causants de RPAD que, només en el gen de la rodopsina són més de cent. Per tant, aquest mètode d'interferència específic de mutació només seria econòmicament viable en canvis nucleotídics que fossin majoritaris en la població afectada per la patologia que, en el cas de RPAD, podria ser la mutació P23H sobre la que s'han realitzat ja diferents estudis d'interferència gènica amb èxit (O'Reilly et al., 2007).

Per a evitar aquesta limitació cost-efectiva en els mètodes de teràpia gènica, darrerament s'ha començat a utilitzar la tècnica d'interferència anomenada de supressió i substitució en la que es pretén suprimir tant el mRNA mutat com el salvatge endògens de la cèl·lula o model animal estudiat i substituir-los per un mRNA degenerat capaç d'evitar el silenciament genètic produït per la molècula de RNAi introduïda.

En aquesta Tesi es mostra l'aplicació d'aquesta tècnica que s'ha realitzat per primera vegada sobre el gen NRL.

Calia primer trobar un siRNA capaç d'eliminar eficaçment el mRNA de NRL. Es van dissenyar dues molècules que interferien el gen NRL en dues zones diferents, ambdues conservades en qualsevol dels mRNAs mutats de NRL que teníem al laboratori. Així, si alguna d'elles funcionava bé, seria capaç d'eliminar tant el mRNA salvatge de NRL com els mRNAs portadors de les mutacions S50T, P51L, M96T i G122E. Després d'analitzar-los es va observar que el siRNA més eficient era el siNRL69 que pot interferir el producte NRL en gairebé un 50 %. Al igual que s'ha comentat anteriorment, aquí també cal tenir en compte que els experiments, realitzats

sobre COS7, impliquen la transfecció de dues molècules diferents (plàsmid amb el cDNA de NRL i un siRNA) que no sempre entraran juntes dins la cèl·lula.

Es va dissenyar després un cDNA de NRL degenerat substituint alguns dels nucleòtids situats a la zona diana del siNRL69 per uns altres. Els canvis nucleotídics no impliquen un canvi d'aminoàcid i es va intentar a més, sempre que va ser possible, que els nous codons creats tinguessin una freqüència elevada dins la seqüència proteica de NRL salvatge. Un cop dissenyat el cDNA de NRL degenerat, es va estudiar la seva interferència amb el siNRL69 i es va observar que aquest siRNA era incapaç de silenciar el producte degenerat. Com a possible molècula per a la teràpia gènica, es va dissenyar un plàsmid que conté el cDNA degenerat de NRL seguit d'un shRNA NRL69, ambdós sota diferents promotors. Aquesta molècula podria ser introduïda en animals portadors d'una mutació en el gen NRL i aplicar així el mecanisme de supressió i substitució d'un gen. El mecanisme esperat seria que el shNRL interferís el mRNA del NRL mutat endògen i que la funció de NRL quedés reconstituïda amb l'expressió del NRL degenerat.

Caldria comprovar també si la proteïna degenerada té una funcionalitat comparable a la proteïna salvatge. Amb aquesta finalitat, al laboratori s'han fet experiments amb el promotor de rodopsina i el factor de transcripció CRX per intentar veure amb quin grau el factor NRL degenerat és capaç d'activar el promotor. Sembla que ho fa d'una manera força semblant a la proteïna salvatge, inclús una mica més, igual que passa amb les proteïnes NRL mutades. Tot i que, a diferència d'aquestes i coincidint amb el perfil de la proteïna salvatge, a concentracions elevades de NRL degenerat no disminueix l'activació del promotor.

Creiem però que per validar correctament la tècnica de supressió i substitució s'hauria de testar el plàsmid *in vivo* i analitzar en el model animal tant la funcionalitat de la proteïna NRL degenerada com l'eficiència i especificitat del shNRL69 validat al laboratori utilitzant cultius cel·lulars.

Les dues tècniques d'interferència de RNA descrites en aquesta tesi constitueixen una aproximació terapèutica per a la Retinosi Pigmentària.

En primer lloc, la interferència específica d'al·lel pot considerar-se una aproximació farmacològica ja que molècules de doble cadena de RNA actuarien sobre una diana concreta, que en aquest cas serien els transcrits mutats, tot inhibint-la. Aquesta tecnologia s'està provant en altres malalties d'herència dominant i actualment, s'estan realitzant molts estudis per tal d'obtenir molècules de siRNA més estables capaces de poder resistir intactes a l'entrar en contacte amb el sèrum de l'organisme viu.

En segon lloc, la tècnica de supressió i substitució és més semblant al que es coneix conceptualment com a teràpia gènica ja que aquí, a més de l'efecte terapèutic de la supressió, es requereix la substitució d'un gen.

Ambdues tecnologies d'interferència podrien considerar-se una realitat terapèutica però en el cas de la Retinosi Pigmentària hi ha un altre problema que, pot ser mínim en altres malalties però que és rellevant en les retinopaties. Així, el gran inconvenient és la introducció del material extern a l'interior de la retina de l'ull. Cal que el fàrmac o vector de supressió-substitució superi la barrera homeostàtica protectora de la retina i arribi a les cèl·lules fotoreceptores. En models animals s'utilitza la injecció directa però aquesta tècnica no pot aplicar-se en els pacients humans de manera repetida.

Les solucions a aquest problema d'entrada de material extern s'enfoquen actualment des del camp de la nanotecnologia. Així, la investigació en el camp dels biopolímers i nous materials marcarà el futur de les línies de treball per a la consolidació de les tècniques terapèutiques de RNAi en les retinopaties hereditàries.

## **6. CONCLUSIONS**

---





## 6. CONCLUSIONS

1. Mutacions de *splicing* en *cis* en el gen de la rodopsina s'associen a RPAD i RPAR. Les associades a RPAD generen senyals de *splicing* alternatius mentre que les associades a RPAR salten el senyal de *splicing* mutat i provoquen la deleció de l'exó.
2. L'expressió dels mutants de *splicing* en *cis* de rodopsina en sistemes cel·lulars produeix proteïnes truncades o amb deleció d'alguns aminoàcids que en alguns casos presenten una localització aberrant. L'acumulació de proteïna aberrant podria produir un efecte tòxic en les cèl·lules i ser per tant la causa d'aparició de la malaltia.
3. Tot i que la mutació M96T trobada en el gen NRL es comporta funcionalment igual que les mutacions de NRL associades a RPAD, en la família on s'ha detectat aquesta mutació s'han trobat dos individus sans portadors del canvi nucleotídic i un individu amb inicis de RP que no presenta la mutació. Aquests resultats qüestionen que la mutació M96T sigui la causa única de RP en la família o que tingui alguna relació amb la malaltia.
4. En els assajos realitzats, la tècnica d'interferència gènica utilitzant molècules de shRNA, siRNA i ribozims ha resultat eficaç en l'eliminació selectiva de mRNAs. No obstant, algunes mutacions no provoquen l'aparició d'una seqüència diferencial en el DNA que pugui ser utilitzada com a seqüència diana per l'actuació de siRNAs. Aquestes mutacions no permeten utilitzar la interferència del mRNA com a eina de teràpia gènica.

5. Un mètode efectiu per a solucionar els problemes d'especificitat de seqüència i del gran nombre i heterogeneïtat de mutacions que estan associades a RPAD és la tècnica de supressió i substitució gènica. Al laboratori s'ha dissenyat un vector per tal de poder aplicar aquesta tècnica sobre el gen NRL.
  
6. La interferència del mRNA de PRPF8 mitjançant un shRNA en cultius cel·lulars produeix l'aparició d'apoptosi. Aquest mecanisme, degut a la falta de funcionalitat d'un factor de pre-mRNA, podria ser comú al produït per mutacions en trans de *splicing* associades a RPAD.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

---



## 7. BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281-97. Review.
- Beales PL, Elcioglu N, Woolf AS, Parker D, Flinter FA. New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J Med Genet.* 1999 Jun;36(6):437-46.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001 Jan 18;409(6818):363-6.
- Berson EL. Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993 Apr;34(5):1659-76.
- Berson EL, Rosner B, Weigel-DiFranco C, Dryja TP, Sandberg MA. Disease progression in patients with dominant retinitis pigmentosa and rhodopsin mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Sep;43(9):3027-36.
- 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.
- 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.

- Branch AD, Robertson HD. A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science*. 1984 Feb 3;223(4635):450-5. Review.
- Brazas RM, Hagstrom JE. Delivery of small interfering RNA to mammalian cells in culture by using cationic lipid/polymer-based transfection reagents. *Methods Enzymol*. 2005;392:112-24.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004 Dec;10(12):1957-66.
- Cashman SM, Binkley EA, Kumar-Singh R. Towards mutation-independent silencing of genes involved in retinal degeneration by RNA interference. *Gene Ther*. 2005 Aug;12(15):1223-8.
- Cazalla D, Newton K, Cáceres JF. A novel SR-related protein is required for the second step of Pre-mRNA *splicing*. *Mol Cell Biol*. 2005 Apr;25(8):2969-80.
- Cech TR, Zaug AJ, Grabowski PJ. In vitro *splicing* of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell*. 1981 Dec;27(3 Pt 2):487-96.
- Cech TR. Self-*splicing* of group I introns. *Annu Rev Biochem*. 1990;59:543-68. Review.
- 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, Papaioannou MG, Khanna H, Lopez I, Waseem N, Shah A, Theis T, Friedman J, Maubaret C, Bujakowska K, Veraitch B, Abd El-Aziz MM, Prescott de Q, Parapuram SK, Bickmore WA, Munro PM, Gal A, Hamel CP, Marigo V, Ponting CP, Wissinger B, Zrenner E, Matter K, Swaroop A,

- Koenekoop RK, Bhattacharya SS. Mutations in TOPORS cause autosomal dominant retinitis pigmentosa with perivascular retinal pigment epithelium atrophy. *Am J Hum Genet.* 2007 Nov;81(5):1098-103.
- 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.
  - Chen S, Wang QL, Xu S, Liu I, Li LY, Wang Y, Zack DJ. Functional analysis of cone-rod homeobox (CRX) mutations associated with retinal dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2002 Apr 15;11(8):873-84.
  - Chu CY, Rana TM. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol.* 2006 Jul;4(7):e210.
  - 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.
  - Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004 Nov 11;432(7014):231-5.
  - Ding Y, Chan CY, Lawrence CE. Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 1;32.
  - Dry KL, Manson FD, Lennon A, Bergen AA, Van Dorp DB, Wright AF. Identification of a 5' splice site mutation in the RPGR gene in a family with X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Hum Mutat.* 1999;13(2):141-5.
  - Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 2001 Dec 3;20(23):6877-88.



- Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*. 2002 Feb;26(2):199-213.
- 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. Review.
- Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA *splicing* and human disease. *Genes Dev*. 2003 Feb 15;17(4):419-37. Review.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
- Forster AC, Symons RH. Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell*. 1987 Jul 3;50(1):9-16.
- Frank DN, Pace NR. Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:153-80. Review.
- 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, Antiñolo G, Millán JM, Valverde D, Carballo M. Sequence variations in the retinal fasciculation FSCN2 gene in a Spanish population with autosomal dominant retinitis pigmentosa or macular degeneration. *Mol Vis*. 2005 Nov 2;11:922-8.

- Gamundi MJ. Tesi doctoral: Anàlisi de l'expressió de mutacions de *splicing* en *cis* i *trans* en gens associats a Retinosi Pigmentària Autosòmica Dominant. Abril 2006.
- Gamundi MJ, Hernan I, Muntanyola M, Trujillo MJ, García-Sandoval B, Ayuso C, Baiget M, Carballo M. High prevalence of mutations in peripherin/RDS in autosomal dominant macular dystrophies in a Spanish population. *Mol Vis*. 2007 Jun 28;13:1031-7.
- Gamundi MJ, Hernan I, Muntanyola M, Maseras M, López-Romero P, Alvarez R, Dopazo A, Borrego S, Carballo M. Transcriptional expression of cis-acting and trans-acting *splicing* mutations cause autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mutat*. 2008 Apr 15;29(6):869-878.
- Grabowski PJ. *Splicing* regulation in neurons: tinkering with cell-specific control. *Cell*. 1998 Mar 20;92(6):709-12. Review.
- Greenberg J, Goliath R, Beighton P, Ramesar R. A new locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on the short arm of chromosome 17. *Hum Mol Genet*. 1994 Jun;3(6):915-8.
- 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.
- Gresch O, Engel FB, Nesic D, Tran TT, England HM, Hickman ES, Körner I, Gan L, Chen S, Castro-Obregon S, Hammermann R, Wolf J, Müller-Hartmann H, Nix M, Siebenkotten G, Kraus G, Lun K. New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods*. 2004 Jun;33(2):151-63.
- Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*. 1983 Dec;35(3 Pt 2):849-57.
- Hamman C, Lilley DM. Folding and activity of the *hammerhead* ribozyme. *ChemBiochem*. 2002 Aug 2;3(8):690-700. Review.

- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000 Mar 16;404(6775):293-6.
- Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):371-8.
- Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet*. 2006 Nov 18;368(9549):1795-809. Review.
- Haseloff J, Gerlach WL. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*. 1988 Aug 18;334(6183):585-91.
- Hastings ML, Krainer AR. Pre-mRNA *splicing* in the new millennium. *Curr Opin Cell Biol*. 2001 Jun;13(3):302-9. Review.
- Hauswirth WW, LaVail MM, Flannery JG, Lewin AS. Ribozyme gene therapy for autosomal dominant retinal disease. *Clin Chem Lab Med*. 2000 Feb;38(2):147-53.
- Hauswirth WW, Lewin AS. Ribozyme uses in retinal gene therapy. *Prog Retin Eye Res*. 2000 Nov;19(6):689-710. Review.
- Heale BS, Soifer HS, Bowers C, Rossi JJ. siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures. *Nucleic Acids Res*. 2005 Feb 18;33(3):e30. Erratum in: *Nucleic Acids Res*. 2006;34(16):4653.
- Hims MM, Diager SP, Inglehearn CF. Retinitis pigmentosa: genes, proteins and prospects. *Dev Ophthalmol*. 2003;37:109-25. Review.
- 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.
- Jacquier A. Group II introns: elaborate ribozymes. *Biochimie.* 1996;78(6):474-87. Review.
- Jurica MS, Moore MJ. Pre-mRNA *splicing*: awash in a sea of proteins. *Mol Cell.* 2003 Jul;12(1):5-14. Review.
- 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.
- Kalloniatis M, Fletcher EL. Retinitis pigmentosa: understanding the clinical presentation, mechanisms and treatment options. *Clin Exp Optom.* 2004 Mar;87(2):65-80. Review.
- Kanda A, Friedman JS, Nishiguchi KM, Swaroop A. Retinopathy mutations in the bZIP protein NRL alter phosphorylation and transcriptional activity. *Hum Mutat.* 2007 Jun;28(6):589-98.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science.* 4th ed., pp.507-513. McGraw-Hill, New York. 2002.
- Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, Scambler PJ, Davidson WS, Beales PL, Lupski JR. Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science.* 2001 Sep 21;293(5538):2256-9.
- Kaushal S, Khorana HG. Structure and function in rhodopsin. 7. Point mutations associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Biochemistry.* 1994 May 24;33(20):6121-8.
- Keen TJ, Hims MM, McKie AB, Moore AT, Doran RM, Mackey DA, Mansfield DC, Mueller RF, Bhattacharya SS, Bird AC, Markham AF, Inglehearn CF.

- Mutations in a protein target of the Pim-1 kinase associated with the RP9 form of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Eur J Hum Genet.* 2002 Apr;10(4):245-9.
- Kennan A, Aherne A, Humphries P. Light in retinitis pigmentosa. *Trends Genet.* 2005 Feb;21(2):103-10.
  - Khan AU. Ribozyme: a clinical tool. *Clin Chim Acta.* 2006 May;367(1-2):20-7. Review.
  - Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 2003 Oct 17;115(2):209-16. Erratum in: *Cell.* 2003 Nov 14;115(4):505.
  - Kiang AS, Palfi A, Ader M, Kenna PF, Millington-Ward S, Clark G, Kennan A, O'reilly M, Tam LC, Aherne A, McNally N, Humphries P, Farrar GJ. Toward a gene therapy for dominant disease: validation of an RNA interference-based mutation-independent approach. *Mol Ther.* 2005 Sep;12(3):555-61.
  - Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S, Rossi JJ. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol.* 2005 Feb;23(2):222-6.
  - 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.
  - Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 May;6(5):376-85. Review.
  - Kittler R, Putz G, Pelletier L, Poser I, Heninger AK, Drechsel D, Fischer S, Konstantinova I, Habermann B, Grabner H, Yaspo ML, Himmelbauer H, Korn B, Neugebauer K, Pisabarro MT, Buchholz F. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature.* 2004 Dec 23;432(7020):1036-40.

- Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR. Self-*splicing* RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell*. 1982 Nov;31(1):147-57.
- Kuhn AN, Reichl EM, Brow DA. Distinct domains of *splicing* factor Prp8 mediate different aspects of spliceosome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 9;99(14):9145-9.
- Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem*. 2003 Apr;270(8):1628-44.
- Kurreck J. siRNA Efficiency: Structure or Sequence-That Is the Question. *J Biomed Biotechnol*. 2006;2006(4):83757.
- Ladd AN, Charlet N, Cooper TA. The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative *splicing*. *Mol Cell Biol*. 2001 Feb;21(4):1285-96.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *RNA*. 2003 Feb;9(2):175-9.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001. 409:860-921.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4051-60.
- Lestienne P, Ponsot G. Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletion. *Lancet*. 1988 Apr 16;1(8590):885.
- Lilley DM. Structure, folding and mechanisms of ribozymes. *Curr Opin Struct Biol*. 2005 Jun;15(3):313-23. Review.

- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 2004 Sep 3;305(5689):1437-41.
- Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*. 2005 Jul;7(7):719-23.
- 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.
- Loewen CJ, Moritz OL, Tam BM, Papermaster DS, Molday RS. The role of subunit assembly in peripherin-2 targeting to rod photoreceptor disk membranes and retinitis pigmentosa. *Mol Biol Cell*. 2003 Aug;14(8):3400-13.
- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004 Jan 2;303(5654):95-8.
- Maita H, Kitaura H, Keen TJ, Inglehearn CF, Ariga H, Iguchi-Ariga SM. PAP-1, the mutated gene underlying the RP9 form of dominant retinitis pigmentosa, is a *splicing* factor. *Exp Cell Res*. 2004 Nov 1;300(2):283-96.
- Maita H, Kitaura H, Ariga H, Iguchi-Ariga 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.
- Mansergh FC, Millington-Ward S, Kennan A, Kiang AS, Humphries M, Farrar GJ, Humphries P, Kenna PF. Retinitis pigmentosa and progressive sensorineural hearing loss caused by a C12258A mutation in the mitochondrial MTTTS2 gene. *Am J Hum Genet*. 1999 Apr;64(4):971-85.

- 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.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. 2002 Sep 6;110(5):563-74.
- Martínez-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.
- Martínez-Gimeno M, Maseras M, Baiget M, Beneito M, Antiñolo G, Ayuso C, Carballo M. Mutations P51U and G122E in retinal transcription factor NRL associated with autosomal dominant and sporadic retinitis pigmentosa. *Hum Mutat*. 2001 Jun;17(6):520.
- 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.
- Martínez-Gimeno M. Tesis doctoral : Caracterización y expresión de mutaciones en genes específicos de retina asociados a Retinosis Pigmentaria autosómica dominante (RPAD). Maig 2004.
- Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*. 2005 Nov 18;123(4):607-20.
- McKay DB. Structure and function of the *hammerhead* ribozyme: an unfinished story. *RNA*. 1996 May;2(5):395-403.



- 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.
- McNally N, Kenna PF, Rancourt D, Ahmed T, Stitt A, Colledge WH, Lloyd DG, Palfi A, O'Neill B, Humphries MM, Humphries P, Farrar GJ. Murine model of autosomal dominant retinitis pigmentosa generated by targeted deletion at codon 307 of the rds-peripherin gene. *Hum Mol Genet.* 2002 May 1;11(9):1005-16.
- 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.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell.* 2004 Jul 23;15(2):185-97.
- Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature.* 2004 Sep 16;431(7006):343-9.
- Mello CC, Conte D Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature.* 2004 Sep 16;431(7006):338-42. Review.
- Michel F, Ferat JL. Structure and activities of group II introns. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:435-61. Review.
- Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat Rev Genet.* 2004 May;5(5):355-65. Review.
- Mitton KP, Swain PK, Chen S, Xu S, Zack DJ, Swaroop A. The leucine zipper of NRL interacts with the CRX homeodomain. A possible mechanism of transcriptional synergy in rhodopsin regulation. *J Biol Chem.* 2000 Sep 22;275(38):29794-9.

- Modrek B, Lee C. A genomic view of alternative *splicing*. Nat Genet. 2002 Jan;30(1):13-9.
- Mordes D, Luo X, Kar A, Kuo D, Xu L, Fushimi K, Yu G, Sternberg P Jr, Wu JY. Pre-mRNA *splicing* and retinitis pigmentosa. Mol Vis. 2006 Oct 26;12:1259-71. Review.
- Muratovska A, Eccles MR. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. FEBS Lett. 2004 Jan 30;558(1-3):63-8. Erratum in: FEBS Lett. 2004 May 21;566(1-3):317.
- Nájera C, Millán JM, Beneyto M, Prieto F. Epidemiology of retinitis pigmentosa in the Valencian community (Spain). Genet Epidemiol. 1995;12(1):37-46.
- Nakai K, Sakamoto H. Construction of a novel database containing aberrant *splicing* mutations of mammalian genes. Gene. 1994 Apr 20;141(2):171-7.
- Ng B, Yang F, Huston DP, Yan Y, Yang Y, Xiong Z, Peterson LE, Wang H, Yang XF. Increased noncanonical *splicing* of autoantigen transcripts provides the structural basis for expression of untolerized epitopes. J Allergy Clin Immunol. 2004 Dec;114(6):1463-70.
- Nottrott S, Urlaub H, Lührmann R. Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. EMBO J. 2002 Oct 15;21(20):5527-38.
- Omi K, Tokunaga K, Hohjoh H. Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. FEBS Lett. 2004 Jan 30;558(1-3):89-95.
- O'Neill B, Millington-Ward S, O'Reilly M, Tuohy G, Kiang AS, Kenna PF, Humphries P, Farrar GJ. Ribozyme-based therapeutic approaches for autosomal dominant retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000 Sep;41(10):2863-9.

- O'Reilly M, Palfi A, Chadderton N, Millington-Ward S, Ader M, Cronin T, Tuohy T, Auricchio A, Hildinger M, Tivnan A, McNally N, Humphries MM, Kiang AS, Humphries P, Kenna PF, Farrar GJ. RNA interference-mediated suppression and replacement of human rhodopsin in vivo. *Am J Hum Genet.* 2007 Jul;81(1):127-35.
- O'Reilly M, Millington-Ward S, Palfi A, Chadderton N, Cronin T, McNally N, Humphries MM, Humphries P, Kenna PF, Farrar GJ. A transgenic mouse model for gene therapy of rhodopsin-linked Retinitis Pigmentosa. *Vision Res.* 2008 Feb;48(3):386-91.
- Palfi A, Ader M, Kiang AS, Millington-Ward S, Clark G, O'Reilly M, McMahon HP, Kenna PF, Humphries P, Farrar GJ. RNAi-based suppression and replacement of rds-peripherin in retinal organotypic culture. *Hum Mutat.* 2006 Mar;27(3):260-8.
- Patel AA, Steitz JA. *Splicing* double: insights from the second spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Dec;4(12):960-70. Review.
- Patzel V, Rutz S, Dietrich I, Köberle C, Scheffold A, Kaufmann SH. Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency. *Nat Biotechnol.* 2005 Nov;23(11):1440-4.
- Pennings RJ, Fields RR, Huygen PL, Deutman AF, Kimberling WJ, Cremers CW. Usher syndrome type III can mimic other types of Usher syndrome. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2003 Jun;112(6):525-30.
- Persson T, Hartmann RK, Eckstein F. Selection of *hammerhead* ribozyme variants with low Mg<sup>2+</sup> requirement: importance of stem-loop II. *Chembiochem.* 2002 Nov 4;3(11):1066-71.
- Petit-Zeman S. Ribozymes: scissors from an old world. *Horizon symposia. Understanding the RNAissance.* May 2003.
- Phelan JK, Bok D. A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Mol Vis.* 2000 Jul 8;6:116-24. Review.

- Piriev NI, Shih JM, Farber DB. Defective RNA *splicing* resulting from a mutation in the cyclic guanosine monophosphate-phosphodiesterase beta-subunit gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998 Mar;39(3):463-70.
- Pittler SJ, Zhang Y, Chen S, Mears AJ, Zack DJ, Ren Z, Swain PK, Yao S, Swaroop A, White JB. Functional analysis of the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase alpha-subunit gene promoter: Nrl and Crx are required for full transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2004 May 7;279(19):19800-7.
- Pugh EN Jr, Nikonov S, Lamb TD. Molecular mechanisms of vertebrate photoreceptor light adaptation. *Curr Opin Neurobiol.* 1999 Aug;9(4):410-8. Review.
- Rajendra R, Malegaonkar D, Pungaliya P, Marshall H, Rasheed Z, Brownell J, Liu LF, Lutzker S, Saleem A, Rubin EH. Topors functions as an E3 ubiquitin ligase with specific E2 enzymes and ubiquitinates p53. *J Biol Chem.* 2004 Aug 27;279(35):36440-4.
- Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jan;8(1):23-36. Review.
- Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell.* 2005 Nov 18;123(4):621-9.
- 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, Aróstegui E, Martín 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.

- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):901-6.
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol*. 2004 Mar;22(3):326-30.
- 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, 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.
- Rychahou PG, Jackson LN, Farrow BJ, Evers BM. RNA interference: mechanisms of action and therapeutic consideration. *Surgery*. 2006 Nov;140(5):719-25. Review.
- Saliba RS, Munro PM, Luthert PJ, Cheetham ME. The cellular fate of mutant rhodopsin: quality control, degradation and aggresome formation. *J Cell Sci*. 2002 Jul 15;115(Pt 14):2907-18.
- Schubert S, Grünweller A, Erdmann VA, Kurreck J. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *J Mol Biol*. 2005 May 13;348(4):883-93.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):199-208.
- Scott WG, Finch JT, Klug A. The crystal structure of an all-RNA *hammerhead* ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell*. 1995 Jun 30;81(7):991-1002.

- Scott WG, Murray JB, Arnold JR, Stoddard BL, Klug A. Capturing the structure of a catalytic RNA intermediate: the *hammerhead* ribozyme. *Science*. 1996 Dec 20;274(5295):2065-9.
- Sheldon CC, Symons RH. RNA stem stability in the formation of a self-cleaving *hammerhead* structure. *Nucleic Acids Res*. 1989 Jul 25;17(14):5665-77.
- Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, Hannon GJ, Cleary MA. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol*. 2005 Feb;23(2):227-31.
- Smith CW, Valcárcel J. Alternative pre-mRNA *splicing*: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci*. 2000 Aug;25(8):381-8. Review.
- 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.
- Sohocki MM, Sullivan LS, Mintz-Hittner HA, Birch D, Heckenlively JR, Freund CL, McInnes RR, Daiger SP. A range of clinical phenotypes associated with mutations in CRX, a photoreceptor transcription-factor gene. *Am J Hum Genet*. 1998 Nov;63(5):1307-15.
- Sung CH, Davenport CM, Nathans J. Rhodopsin mutations responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. Clustering of functional classes along the polypeptide chain. *J Biol Chem*. 1993 Dec 15;268(35):26645-9.
- Sung CH, Makino C, Baylor D, Nathans J. A rhodopsin gene mutation responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa results in a protein that is defective in localization to the photoreceptor outer segment. *J Neurosci*. 1994 Oct;14(10):5818-33.
- Sung CH, Tai AW. Rhodopsin trafficking and its role in retinal dystrophies. *Int Rev Cytol*. 2000;195:215-67. Review.

- Tam LC, Kiang AS, Kennan A, Kenna PF, Chadderton N, Ader M, Palfi A, Aherne A, Campbell M, Reynolds A, McKee A, Humphries MM, Farrar J, Humphries P. Therapeutic benefit derived from RNAi-mediated ablation of IMPDH1 transcripts in a murine model of autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP10). *Hum Mol Genet.* 2008 Apr 4.
- Tessitore A, Parisi F, Denti MA, Allocca M, Di Vicino U, Domenici L, Bozzoni I, Auricchio A. Preferential silencing of a common dominant rhodopsin mutation does not inhibit retinal degeneration in a transgenic model. *Mol Ther.* 2006 Nov;14(5):692-9.
- Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* 2005 Mar 1;19(5):517-29.
- Turner IA, Norman CM, Churcher MJ, Newman AJ. Dissection of Prp8 protein defines multiple interactions with crucial RNA sequences in the catalytic core of the spliceosome. *RNA.* 2006 Mar;12(3):375-86.
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 1999 Dec 15;13(24):3191-7.
- Uhlenbeck OC. A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature.* 1987 Aug 13-19;328(6131):596-600.
- 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.
- 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, Abe T, Itabashi T, Sato H, Kawamura M, Tamai M. Autosomal dominant macular degeneration associated with 208delG mutation in the FSCN2 gene. *Arch Ophthalmol*. 2003 Nov;121(11):1613-20.
- Wang J, Barr MM. RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Enzymol*. 2005;392:36-55.
- Will CL, Lührmann R. Protein functions in pre-mRNA *splicing*. *Curr Opin Cell Biol*. 1997 Jun;9(3):320-8. Review.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003 Dec 15;17(24):3011-6.
- 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.
- Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Jan;75(1):280-4.
- Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. 1988. *Neurology*. 1998 Dec;51(6):1525 and 8 pages following.
- Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J*. 2002 Nov 1;21(21):5875-85.
- Zhang Q, Li S, Xiao X, Jia X, Guo X. The 208delG mutation in FSCN2 does not associate with retinal degeneration in Chinese individuals. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Feb;48(2):530-3.



- Zheng L, Liu J, Batalov S, Zhou D, Orth A, Ding S, Schultz PG. An approach to genomewide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jan 6;101(1):135-40.
- Zhou Z, Licklider LJ, Gygi SP, Reed R. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. Nature. 2002 Sep 12;419(6903):182-5.
- Zhu L, Imanishi Y, Filipek S, Alekseev A, Jastrzebska B, Sun W, Saperstein DA, Palczewski K. Autosomal recessive retinitis pigmentosa and E150K mutation in the opsin gene. J Biol Chem. 2006 Aug 4;281(31):22289-98.

#### **Bases de dades i recursos Web utilitzats**

- Ambion (programa de suport per a la selecció de molècules de RNAi): <http://www.ambion.com/techlib/resources/siRNA>
- Blast 2 Sequences: <http://genopole.toulouse.inra.fr/blast/wblast2.html>
- Cell and Molecular Biology Online: <http://www.cellbio.com/protocols.html>
- Ensembl Genome Browser: <http://www.ensembl.org/index.html>
- European Collection of Cell Cultures: <http://www.ecacc.org.uk/>
- Genetics Home Reference: <http://ghr.nlm.nih.gov/ghr/glossary>
- Human Gene Mutation Database: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>
- NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nucleic Acid to Amino Acid Translation: [www.biochem.ucl.ac.uk/cgi-bin/mcdonald/cgina2aa.pl](http://www.biochem.ucl.ac.uk/cgi-bin/mcdonald/cgina2aa.pl)
- Protocol Online: <http://www.protocol-online.org/>

- Retinal information network: [www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/](http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/)
- Retina International: <http://www.retina-international.org/>
- Retinosis.org: [http://retinosis.org/vision\\_27/index.htm](http://retinosis.org/vision_27/index.htm)
- RetNet: <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>
- RNA Interference. Technical Reference & Application Guide – Dharmacon.
- Sfold: <http://sfold.wadsworth.org/>
- *siRNA Wizard* (programa de suport per a la selecció de molècules de RNAi): <http://www.siRNAwizard.com>
- The GDB Human Genome Database: <http://www.gdb.org/>
- Web de la xarxa EsRetNet: <http://esretnet.org/#>
- Webvision: <http://webvision.med.utah.edu/>



## **8. 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

- Gamundi MJ, Hernan I, Muntanyola M, Maseras M, López-Romero P, Alvarez R, Dopazo A, Borrego S, Carballo M. Transcriptional expression of cis-acting and trans-acting *splicing* mutations cause autosomal dominant retinitis pigmentosa. Hum Mutat. 2008 Apr 15;29(6):869-878.
- Bernal S, Solans T, Gamundi MJ, Hernan I, de Jorge L, Carballo M, Navarro R, Tizzano E, Ayuso C, Baiget M. Analysis of the involvement of the NR2E3 gene in autosomal recessive retinal dystrophies. Clin Genet. 2008 Apr;73(4):360-6.
- Cornejo-Garcia JA, Fernandez TD, Torres MJ, Carballo M, Hernan I, Antunez C, Blanca M, Mayorga C. Differential cytokine and transcription factor expression in patients with allergic reactions to drugs. Allergy. 2007 Dec;62(12):1429-38.
- Gamundi MJ, Hernan I, Muntanyola M, Trujillo MJ, García-Sandoval B, Ayuso C, Baiget M, Carballo M. High prevalence of mutations in peripherin/RDS in autosomal dominant macular dystrophies in a Spanish population. Mol Vis. 2007 Jun 28;13:1031-7.
- Millá E, Hernan I, Gamundi MJ, Martínez-Gimeno M, Carballo M. Novel LMX1B mutation in familial nail-patella syndrome with variable expression of open angle glaucoma. Mol Vis. 2007 Apr 27;13:639-48.

- 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;7:35.
- Gamundi MJ, Hernan I, Maseras M, Baiget M, Ayuso C, Borrego S, Antiñolo G, Millán 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.
- Espunya MC, López-Giráldez T, Hernan I, Carballo M, Martínez MC. Differential expression of genes encoding protein kinase CK2 subunits in the plant cell cycle. J Exp Bot. 2005 Dec;56(422):3183-92.
- Carballo M, Roig I, Aguilar F, Pol MA, Gamundi MJ, Hernan I, Martínez-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.
- Hernan I, Roig I, Martin 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.
- 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.

### **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.





## **9. ANNEX I**

---



## LightCycler Software Version 4.0



## Quantificació: Producte minigen RHOSPL 2-4 WT

### Programs

Program Name	RT					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
50	00:20:00	20	0	0	0	None
Program Name	PCR					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:15:00	20	0	0	0	None
Program Name	CYCLING					
Cycles	40	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
94	00:00:15	20	0	0	0	None
55	00:00:20	20	0	0	0	None
72	00:00:15	2	0	0	0	None
82	00:00:05	20	0	0	0	Single
Program Name	DATA ACQUISITION					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:00	20	0	0	0	None
60	00:00:15	20	0	0	0	None
95	00:00:00	0,1	0	0	0	Continuous
Program Name	COOLING					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode

spl24WT-RNA221107-261107

28/05/2008

Page 1 of 2

Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
45	00:00:30	20	0	0	0	None

## LightCycler Software Version 4.0



## Quantificació: Productes splicing G5167T

### Programs

Program Name	RT					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
50	00:20:00	20	0	0	0	None
Program Name	PCR					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:15:00	20	0	0	0	None
Program Name	CYCLING					
Cycles	30	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
94	00:00:15	20	0	0	0	None
55	00:00:20	20	0	0	0	None
72	00:00:15	2	0	0	0	Single
Program Name	DATA ACQUISITION					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:00	20	0	0	0	None
70	00:00:15	20	0	0	0	None
95	00:00:00	0,1	0	0	0	Continuous
Program Name	COOLING					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
45	00:00:30	20	0	0	0	None

## LightCycler Software Version 4.0



## Quantificació: Producte 1+2 minigen RHOSPL - A3811G

### Producte 1 genòmic - A3811G

**Programs**

Program Name	RT					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
50	00:20:00	20	0	0	0	None
Program Name	PCR					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:15:00	20	0	0	0	None
Program Name	CYCLING					
Cycles	30	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
94	00:00:15	20	0	0	0	None
55	00:00:20	20	0	0	0	None
72	00:00:15	2	0	0	0	None
80	00:00:05	20	0	0	0	Single
Program Name	DATA ADQUISITION					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:00	20	0	0	0	None
70	00:00:15	20	0	0	0	None
95	00:00:00	0,1	0	0	0	Continuous
Program Name	COOLING					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
45	00:00:30	20	0	0	0	None

## LightCycler Software Version 4.0



## Quantificació: Producte 3+4 minigen RHOSPL - A3811G

### Producte 2 genòmic - A3811G

#### Programs

Program Name	RT					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
50	00:20:00	20	0	0	0	None
Program Name	PCR					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:15:00	20	0	0	0	None
Program Name	CYCLING					
Cycles	30	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
94	00:00:15	20	0	0	0	None
55	00:00:20	20	0	0	0	None
72	00:00:15	2	0	0	0	None
80	00:00:05	20	0	0	0	Single
Program Name	DATA ACQUISITION					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:00	20	0	0	0	None
70	00:00:15	20	0	0	0	None
95	00:00:00	0,1	0	0	0	Continuous
Program Name	COOLING					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
45	00:00:30	20	0	0	0	None

## LightCycler Software Version 4.0



## Quantificació transcrit PRPF8 - total

### Programs

Program Name	RT					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
50	00:20:00	20	0	0	0	None
Program Name	PCR					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:15:00	20	0	0	0	None
Program Name	CYCLING					
Cycles	22	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
94	00:00:15	20	0	0	0	None
55	00:00:20	20	0	0	0	None
72	00:00:15	2	0	0	0	Single
Program Name	DATA ACQUISITION					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:00	20	0	0	0	None
60	00:00:15	20	0	0	0	None
95	00:00:00	0,1	0	0	0	Continuous
Program Name	COOLING					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
45	00:00:30	20	0	0	0	None





## Report

### Quantificació transcrit PRPF8 - mutat

#### Programs

Program Name	RT					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
50	00:20:00	20	0	0	0	None
Program Name	PCR					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:15:00	20	0	0	0	None
Program Name	CYCLING					
Cycles	40	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
94	00:00:15	20	0	0	0	None
55	00:00:20	20	0	0	0	None
72	00:00:15	2	0	0	0	Single
Program Name	DATA ACQUISITION					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:00	20	0	0	0	None
60	00:00:15	20	0	0	0	None
95	00:00:00	0,1	0	0	0	Continuous
Program Name	COOLING					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
45	00:00:30	20	0	0	0	None

## LightCycler Software Version 4.0



## Quantificació transcrit PRPF8 - WT

## Programs

Program Name	RT					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
50	00:20:00	20	0	0	0	None
Program Name	PCR					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:15:00	20	0	0	0	None
Program Name	CYCLING					
Cycles	40	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
94	00:00:15	20	0	0	0	None
55	00:00:20	20	0	0	0	None
72	00:00:15	2	0	0	0	Single
Program Name	DATA ACQUISITION					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:00	20	0	0	0	None
60	00:00:15	20	0	0	0	None
95	00:00:00	0,1	0	0	0	Continuous
Program Name	COOLING					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
45	00:00:30	20	0	0	0	None

## LightCycler Software Version 4.0



## Quantificació transcrit NRL

### Programs

Program Name	RT					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
50	00:20:00	20	0	0	0	None
Program Name	PCR					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:15:00	20	0	0	0	None
Program Name	CYCLING					
Cycles	35	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
94	00:00:15	20	0	0	0	None
55	00:00:20	20	0	0	0	None
72	00:00:15	2	0	0	0	None
82	00:00:05	20	0	0	0	Single
Program Name	DATA ACQUISITION					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:00	20	0	0	0	None
60	00:00:15	20	0	0	0	None
95	00:00:00	0,1	0	0	0	Continuous
Program Name	COOLING					
Cycles	1	Analysis Mode	None			
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
45	00:00:30	20	0	0	0	None



## Quantificació transcrit B2- microglobulina

### Programs

Program Name	RT					
Cycles	1	Analysis Mode None				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
50	00:20:00	20	0	0	0	None
Program Name	PCR					
Cycles	1	Analysis Mode None				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:15:00	20	0	0	0	None
Program Name	CYCLING					
Cycles	45	Analysis Mode None				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
94	00:00:15	20	0	0	0	None
55	00:00:20	20	0	0	0	None
72	00:00:15	2	0	0	0	Single
Program Name	DATA ADQUISITION					
Cycles	1	Analysis Mode None				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
95	00:00:00	20	0	0	0	None
60	00:00:15	20	0	0	0	None
95	00:00:00	0,1	0	0	0	Continuous
Program Name	COOLING					
Cycles	1	Analysis Mode None				
Target (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)	Acquisition Mode
45	00:00:30	20	0	0	0	None