

# **CORRECCIÓN DEL EFECTO DE UNA MUTACIÓN EN FIBROBLASTOS DE UN PACIENTE DE NIEMANN-PICK TIPO C UTILIZANDO OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO**

Laura Rodríguez Pascau, *Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona.*

La enfermedad de Niemann-Pick tipo C es un trastorno lisosomal debido a mutaciones, en un 95% de los casos, en el gen NPC1 o bien, en un 5 % de los pacientes, en el gen NPC2. Ambos genes codifican proteínas presentes en los lisosomas, cuya función no es todavía bien conocida, pero que se relacionan con el tráfico intracelular de colesterol y otros lípidos. En los pacientes con Niemann-Pick tipo C una de estas proteínas (NPC1 o NPC2) es anómala de forma que no puede realizar correctamente su función y, en consecuencia, se acumulan colesterol y otros lípidos en el interior de los lisosomas.

La enfermedad de Niemann-Pick C se hereda siguiendo un patrón autosómico recesivo. Esto implica que para que un individuo presente la patología debe heredar las dos copias mutadas del gen, la copia (alelo) mutada de origen materno y la copia (alelo) mutada de origen paterno.

Actualmente no existe ningún tratamiento específico totalmente eficiente para la enfermedad. De todos modos, en los últimos años se ha ido avanzando tanto en el conocimiento de la patología, como en el estudio de posibles estrategias terapéuticas. En relación al desarrollo de posibles terapias, cabe destacar que se está realizando un ensayo clínico, basado en la utilización de un inhibidor de la glucosilceramida sintasa (Miglustat), como posible tratamiento para la enfermedad.

El trabajo que se presenta ha consistido en la identificación de mutaciones en cinco pacientes españoles de Niemann-Pick C. Se trata de pacientes en los que ya se había identificado una de las mutaciones (trabajo realizado en el Instituto de Bioquímica Clínica por la Dra. M<sup>a</sup> Josep Coll y por Judit Macías) pero faltaba encontrar la segunda mutación responsable de la enfermedad. Las nuevas mutaciones identificadas y su localización se muestran en la Tabla 1. Una de estas mutaciones, c.1554-1009G>A, es una mutación que afecta al proceso de maduración del RNA conocido como *splicing*. El *splicing* es un proceso celular que consiste en la eliminación de las secuencias no codificantes (intrones) del RNA correspondiente a un gen y el ensamblaje de las regiones codificantes (exones) para dar lugar al RNA mensajero maduro. El estudio de la mutación c.1554-1009G>A ha permitido conocer que se trata de un cambio intrónico que altera este proceso, de forma que toda una región intrónica es incluida en el RNA mensajero maduro como si se tratase de un exón. A este tipo de inserciones se les conoce como pseudoexones (figura 1). Al realizarse el *splicing* de forma aberrante, se altera la pauta de lectura de la proteína dando lugar a la introducción de un codón de parada prematuro que activa el proceso de *nonsense-mediated-decay*. Este proceso es un mecanismo de defensa que tiene la célula que consiste en la degradación de aquellos transcritos que presentan codones de parada prematuros para evitar así la síntesis de proteínas defectuosas que podrían ser perjudiciales.

Tabla 1. Mutaciones presentes en los cinco pacientes españoles con Niemann-Pick C analizados en este trabajo.

PACIENTE	CAMBIO NUCLEOTÍDICO	CAMBIO A NIVEL DE PROTEÍNA O RNA	EXON/INTRON
NPC2	c.3245+2insG	r.3245_3246insG	I21
	<b>c.3265G&gt;T</b>	<b>p. E1089X</b>	<b>E22</b>
NPC3	c.530G>A	p. C177Y	E5
	<b>c.2604+5G&gt;A</b>	<b>r. 2515_2604del</b>	<b>I17</b>
NPC8	c.895_896insT	p. V299fsX8	E7
	<b>c.2612A&gt;G</b>	<b>p. Y871C</b>	<b>E18</b>
NPC111	c.2882_2897del16insG	p.N961_F966delinsS	E19
	<b>c.1554-1009G&gt;A</b>	<b>r.1553_1554ins1553+1830_1554-1008</b>	<b>I9</b>
NPC115	c.1935T>A	p.C645X	E12
	<b>c.3236T&gt;C</b>	<b>p.F1079S</b>	<b>E21</b>

\*En negrita se muestran las mutaciones identificadas en este estudio.

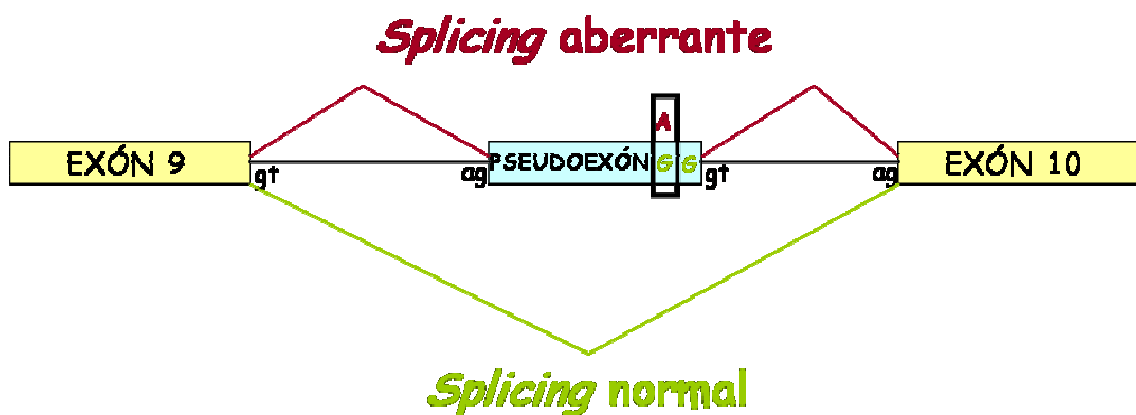


Figura 1. Efecto sobre el proceso de splicing de la mutación c.1554-1009G>A.

Las mutaciones que generan la introducción de un pseudoexón son susceptibles a una corrección terapéutica basada en la utilización de oligonucleótidos antisentido que, uniéndose a la región de la mutación por complementariedad de bases, evitan la generación del *splicing* aberrante, restaurándose de esta forma el *splicing* normal. Esta estrategia se ha utilizado para intentar corregir el efecto producido por la mutación c.1554-1009G>A. Para ello se trataron las células del paciente con un oligonucleótido antisentido específico a diferentes concentraciones y se analizó el efecto corrector a diferentes tiempos. Tras el tratamiento con el oligonucleótido antisentido a distintas concentraciones, se observó una desaparición de la banda correspondiente al *splicing* aberrante tanto a las 48 como a las 72 horas, indicando una corrección a favor del *splicing* normal (figura 2).

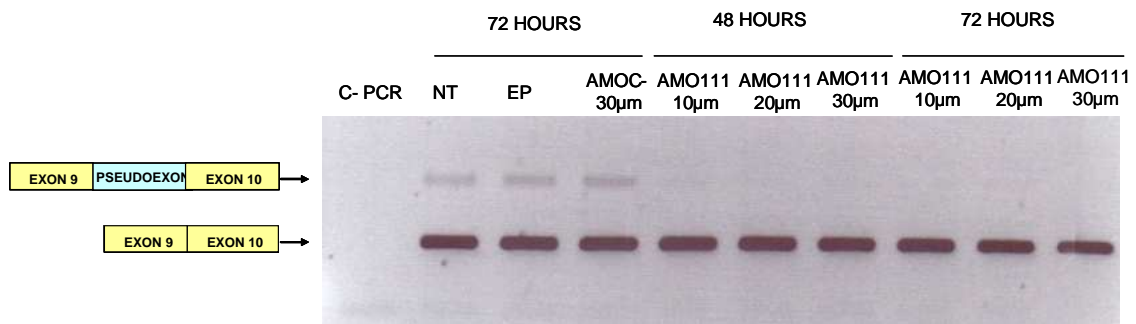


Figura 2. Ensayo del efecto corrector a las 48 y 72h tras el tratamiento de los fibroblastos del paciente con el oligonucleótido antisentido (AMO111) a concentraciones 10, 20 y 30  $\mu\text{M}$ . C- PCR, control negativo de PCR; NT, fibroblastos no tratados; EP, fibroblastos en presencia sólo del agente de transfección; AMO C-, fibroblastos tratados con un oligonucleótido antisentido no específico; AMO111, fibroblastos tratados con un oligonucleótido antisentido específico para la mutación.

Este mismo resultado se ha comprobado realizando el experimento en presencia de cicloheximida, un inhibidor de la traducción que evita el proceso de *nonsense-mediated-decay*. También se ha ensayado el efecto del oligonucleótido antisentido sobre células HeLa transfectadas con un minigen en presencia de la mutación. El minigen consiste en una construcción en la que se introduce el fragmento del gen que queremos estudiar, en este caso la región del pseudoexón en presencia y ausencia del cambio, para poder comprobar *in vitro* el efecto de la mutación sobre el proceso de *splicing*. Una vez comprobado el efecto corrector, se ha estimado la duración del mismo, siendo ésta aproximadamente de 72 horas. Además, los estudios de *western-blot* parecen indicar también una corrección a nivel de proteína.

Este trabajo representa un primer paso para el desarrollo de una futura terapia para la enfermedad dirigida a aquellos pacientes que presenten mutaciones de *splicing* susceptibles al tratamiento con oligonucleótidos antisentido. De todos modos, aunque los resultados son alentadores, debemos ser cautos, ya que se trata de un estudio a nivel celular y para que este tratamiento se pueda aplicar en humanos todavía queda un largo camino por recorrer y deberán realizarse muchos estudios para asegurar la eficacia, duración y seguridad del mismo.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, bajo la dirección de los doctores Daniel Grinberg y Lluïsa Vilageliu.

Se agradece la ayuda económica por parte del Ministerio de Educación y Ciencia así como de la Fundación Niemann-Pick de España.