

Carla V. Jiménez Medina¹, Alberto Cañibano Hernández¹, Berta de la Cerda Haynes¹

¹ Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Sevilla. ✉ carla.jimenez@cabimer.es

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La retinitis pigmentosa (RP) es un grupo de distrofias retinianas hereditarias causadas por mutaciones en diversos genes y que presenta una prevalencia de 1 entre 4000. Es una enfermedad no tratable con una evolución clínica variable en la que los pacientes desarrollan discapacidad visual grave o incluso ceguera total. Las mutaciones en el gen de *splicing* de ARNm *PRPF31* se han descrito como la segunda causa más común de RP autosómica dominante, donde estudios anteriores relacionan mutaciones en este gen con disfunción y degeneración del epitelio pigmentario de la retina (RPE). Gracias a la capacidad de obtener y diferenciar células madre pluripotentes inducidas (iPSC), se pueden generar modelos retinianos para estudiar el mecanismo de la enfermedad y evaluar nuevas terapias. El objetivo de este trabajo es la caracterización de un modelo celular personalizado obtenido mediante la diferenciación de iPSCs de un paciente para obtener RPE. El paciente del presente estudio presenta la mutación heterocigota PRPF31 c.165G>A, que produce una proteína PRPF31 no funcional debido a un codón *stop* prematuro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular: Las células iPSC y RPE obtenidas en estudios anteriores se mantuvieron en cultivo sobre una matriz de matrigel. Las iPSCs habían sido obtenidas mediante la reprogramación de muestras sanguíneas de un paciente PRPF31 c.165G>A (iPSC/RPE Mutante) y un control sano (iPSC/RPE Control) mediante la infección con el virus Sendai (Fig.1).

Caracterización de las células RPE: Se estudió la morfología de ambos tipos celulares mediante microscopía óptica. Mediante RT-PCR, se determinó la expresión de *NANOG* como marcador de pluripotencia y *CRALBP* como marcador específico de RPE. A nivel fisiológico, el modelo se evaluó mediante medidas de resistencia eléctrica transepitelial (TER).

Estudio del modelo celular: Se emplearon las técnicas de RT-PCR, Western-blot e Inmunofluorescencia para determinar la expresión de genes y proteínas de interés específicos de RPE y relacionados con retinopatías.

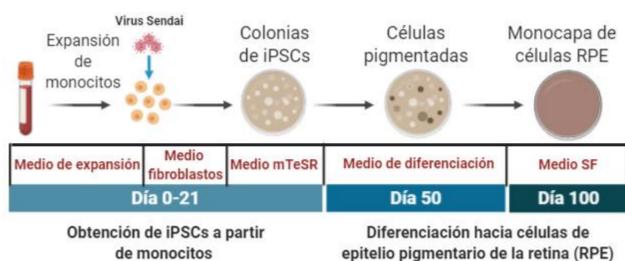


Fig. 1. Esquema de la diferenciación hacia RPE. Se muestra el aislamiento de monocitos, su reprogramación para obtener iPSCs y la diferenciación de iPSCs a RPE. SF: Serum Free.

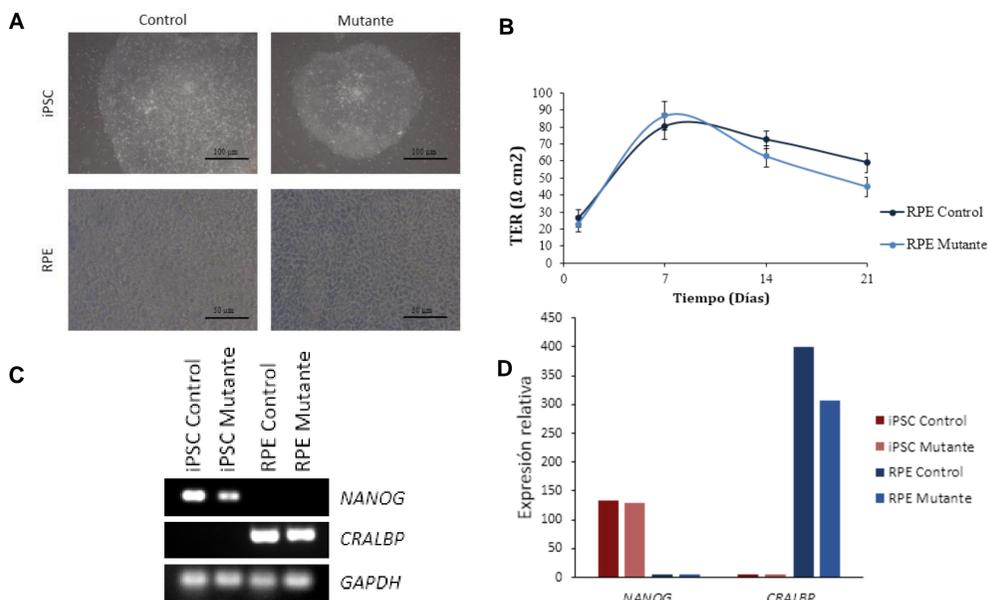


Fig. 2. Verificación de la diferenciación hacia RPE. Se observó un fenotipo característico de iPSC y RPE. (A) Imágenes de contraste de fase de los cultivos de iPSC y RPE. Barra de escala: 100 μ m y 50 μ m respectivamente. (B) Evolución del TER a lo largo del tiempo. (C) RT-PCR del gen de pluripotencia *NANOG* y el gen específico de RPE *CRALBP*. (D) Expresión relativa de los niveles de ARNm en iPSC y RPE control y mutante normalizados frente al control *GAPDH*.

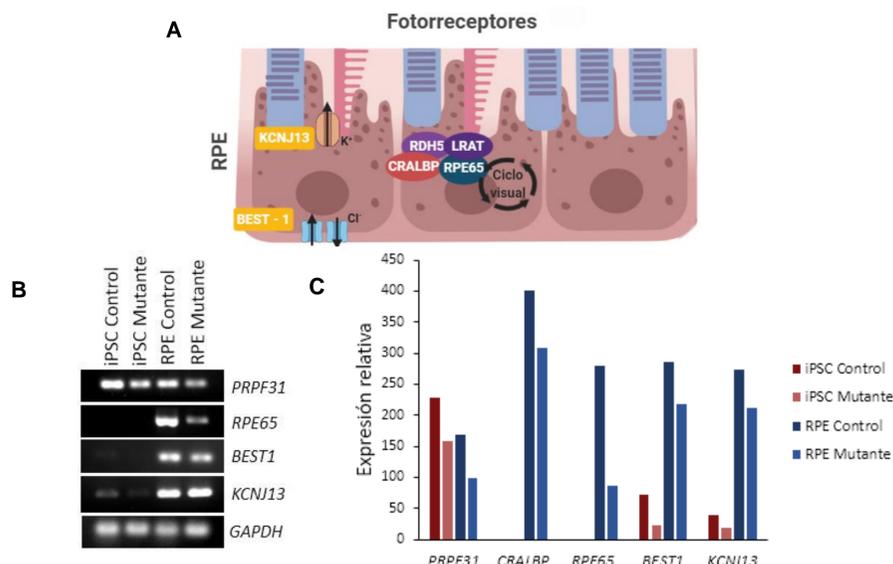


Fig. 3. Estudio del modelo celular a nivel de expresión génica. El modelo celular presentó una disminución en la expresión de genes esenciales para el RPE. (A) Esquema de la localización y función de las proteínas derivadas de los genes estudiados. (B) RT-PCR de *PRPF31* y genes específicos del RPE. (C) Expresión relativa de los niveles de ARNm en iPSC y RPE control y mutante normalizados frente al control *GAPDH*.

RESULTADOS

Las imágenes de microscopía mostraron una morfología característica y distintiva de las células iPSC y RPE, sin diferencias apreciables entre el modelo celular mutante y el control. En las células diferenciadas, se determinó el silenciamiento de genes de pluripotencia como *NANOG* y la activación de genes específicos del RPE, como *CRALBP*. La medida de TER mostró un perfil similar entre las células control y mutante, indicando una maduración en paralelo y la capacidad de establecer una barrera epitelial *in vitro* en ambos casos.

En cuanto al estudio del efecto de la mutación PRPF31 c.165G>A sobre el modelo celular, se apreció una reducción de un 58% en la expresión del gen *PRPF31* en el modelo de RPE mutante con respecto al control, indicando la existencia de haploinsuficiencia. Para el resto de genes analizados, la expresión génica disminuyó en torno a un 25% salvo en el caso del gen *RPE65* que disminuye en un 70%, siendo el gen más afectado.

El estudio de las proteínas mostró una disminución en todos los marcadores analizados en el RPE mutante comparando con el RPE control. Dicha reducción oscila entre el 70-80% en el caso de PRPF31, CRALBP o LRAT y el 100% en el caso de RPE65. En cuanto a PRPF31, se detectó un patrón de bandas distinto en RPE mutante y control, el cual debe ser estudiado con posterioridad. La proteína de choque térmico HSP70 no mostró un aumento en la expresión, a pesar de haberse descrito dicha variación en otras mutaciones de PRPF31. Los datos de *immunoblotting* se confirmaron con ensayos de inmunofluorescencia para las proteínas PRPF31, MITF y RDH5. Así se comprobó la localización nuclear de PRPF31, una reducción en la expresión de RDH5 en RPE mutante y un aumento en la expresión del factor de transcripción MITF, el cual ha sido estudiado por su papel en la regulación de la expresión de CRALBP y RDH5.

Por último, en un estudio preliminar sobre los posibles defectos de *splicing* en *RPE65*, se emplearon diferentes parejas de *primers* complementarios a dos regiones distintas del gen. No se han identificado errores de *splicing* específicos, a falta de más estudios.

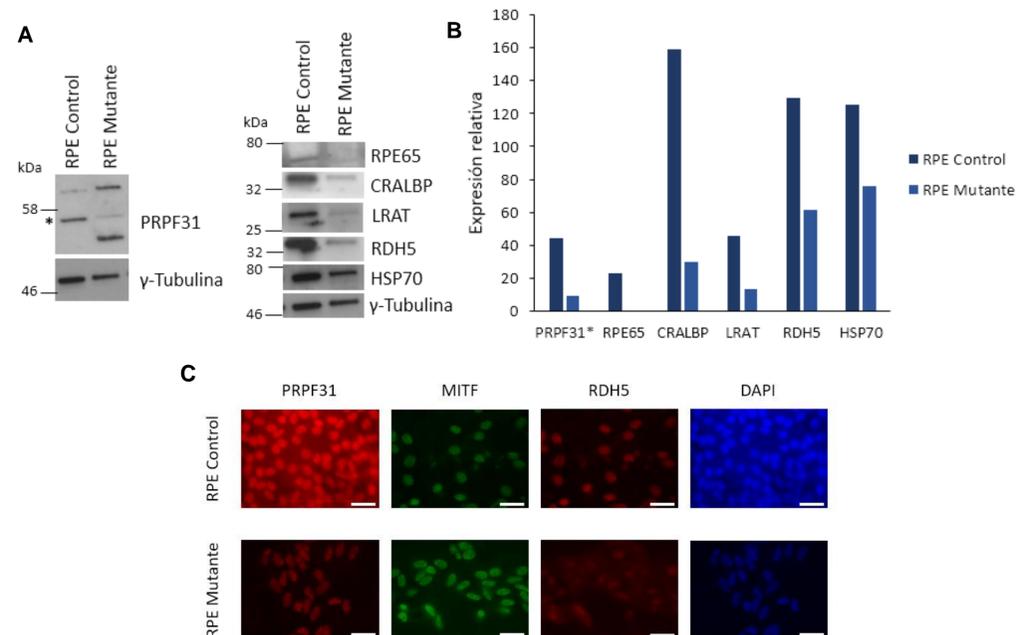


Fig. 4. Estudio del modelo celular a nivel de expresión de proteínas. Se observó una reducción generalizada en la expresión de proteínas específicas en células RPE mutantes. (A) Expresión de distintos marcadores característicos de RPE mediante Western blotting. El asterisco indica el tamaño de la proteína PRPF31 funcional (55 kDa) (B) Expresión relativa de proteínas específicas de RPE normalizadas con respecto a γ -tubulina. Para PRPF31, sólo se analizó la expresión de la proteína funcional. (C) Estudio de la localización subcelular de las proteínas PRPF31, MITF y RDH5 mediante inmunofluorescencia y tinción nuclear con DAPI. Barra de escala: 25 μ m.

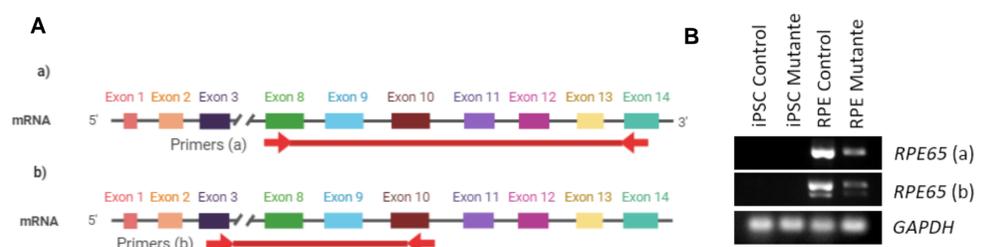


Fig. 5. Estudio preliminar de posibles defectos de *splicing* en *RPE65*. (A) Esquema general de los exones de *RPE65* y parejas de *primers* dirigidos (a) a la región 3' o (b) a la región 5'. (B) Niveles de expresión obtenidos mediante RT-PCR de la región 3' de *RPE65* (*RPE65a*) o 5' (*RPE65b*), empleando *GAPDH* como control.

CONCLUSIONES

Se ha obtenido un modelo celular correctamente diferenciado de RPE con la mutación PRPF31 c.165G>A. El modelo celular presentó niveles disminuidos de proteínas participantes en el ciclo visual, a nivel de expresión génica y, de forma más acentuada, a nivel de expresión de proteínas. Concretamente, la disminución en la cantidad de enzima *RPE65* en el modelo celular sugiere que este podría ser el mecanismo por el cual la mutación PRPF31 c.165G>A causa RP. Estudios anteriores han relacionado la insuficiencia de *RPE65* con RP y otras formas de ceguera. Un estudio detallado de los efectos de esta mutación sobre el ARNm de *RPE65* y su proteína está actualmente en marcha.

REFERENCIAS

Brydon et al., 2019; Molecular Therapy - Methods and Clinical Development.
Valdés-Sánchez et al., 2019; Molecular Medicine.
Verbakel et al., 2018; Progress in Retinal and Eye Research.