

Resumen tesis

El síndrome de Usher (USH) es un trastorno autosómico recesivo definido por sordera neurosensorial (SNHL), y una distrofia retiniana conocida como retinosis pigmentaria (RP) que produce una pérdida visual progresiva. Algunos casos también presentan disfunción vestibular, que se traduce en problemas de equilibrio. A pesar de que USH es la forma más común de sordoceguera de origen genético, la baja prevalencia de la enfermedad en la población le confiere el carácter de rara. No existe cura hasta la fecha, a excepción de los audífonos o implantes cocleares que mitigan la discapacidad auditiva.

Según la gravedad y la aparición de los síntomas, se diferencian tres tipos de USH (USH1, USH2 y USH 3). La patología también muestra heterogeneidad genética, puesto que se conocen al menos 10 genes responsables, cada uno típicamente asociado a uno de los tres tipos sindrómicos. No obstante, las mutaciones en *USH2A* son la causa más frecuente de la enfermedad, debido a su vez en gran medida a la recurrencia de la variante patogénica c.2299delG. Por lo tanto, una aproximación terapéutica enfocada a esta mutación concreta beneficiaría a una parte considerable de los pacientes.

Con este propósito, en esta tesis se ha desarrollado un ensayo de edición génica para revertir dicha anomalía genética por medio del revolucionario sistema CRISPR/Cas9. Sucintamente, la tecnología está basada en una enzima de escisión de ADN, la cual es conducida a una región genómica precisa por medio de un fragmento de ARN acoplado gracias al fenómeno de emparejamiento de bases complementarias. La lesión se repara posteriormente de forma endógena, normalmente por medio de un mecanismo propenso a errores que tiende a producir pequeñas inserciones o deleciones alrededor del sitio de corte. Sin embargo, tras esta ruptura bicatenaria también puede inducirse el mecanismo de recombinación homóloga como alternativa de reparación si una secuencia molde se encuentra oportunamente accesible. Este proceso se puede aprovechar para introducir de forma dirigida algunos cambios en la secuencia nucleotídica, como la reversión de ciertas variantes patológicas, al proporcionar exógenamente un fragmento casi idéntico y cuidadosamente diseñado para la recombinación.

Se diseñaron varios complejos CRISPR específicos de locus que fueron probados primero en células HEK293 a modo de estudio piloto y con el fin de seleccionar el ARN guía (sgRNA) definitivo. El sgRNA-1 fue el más apropiado para la región diana, y se usó para proceder con la corrección de la mutación en células derivadas de pacientes. Se aislaron fibroblastos homocigotos para el alelo patogénico con la deleción de la guanina mediante

una biopsia de piel, los cuales se sometieron al proceso de edición por CRISPR previamente trazado. La tasa de corrección de la mutación obtenida fue del 2.5%, cuantificada tanto por estudio de RFLP como por secuenciación masiva a gran profundidad de la región de las células tratadas.

El éxito de esta prueba de concepto demuestra la viabilidad de la tecnología para su uso en la corrección de mutaciones patológicas de los genes USH. Ello representa una terapia potencial una vez se refine el sistema, si bien, según los principios de la medicina de precisión, es dependiente del genotipo. Por este motivo, el diagnóstico molecular de los pacientes con USH no sólo es relevante para comprender o ampliar los conocimientos sobre los mecanismos y bases funcionales de la enfermedad, sino también como paso previo a los tratamientos personalizados venideros que estarán condicionados al perfil mutacional de los pacientes.

En consecuencia, otro objetivo de esta tesis ha sido la caracterización genética de una colección de pacientes USH aún sin diagnóstico molecular. Dada la variabilidad genética de la enfermedad, dicho propósito requirió el uso de técnicas de secuenciación masiva que permiten la secuenciación simultánea de una selección de loci del genoma (o su totalidad indiscriminada). Una primera fase implicó la secuenciación dirigida de las regiones codificantes de todos los genes responsables o asociados a la enfermedad conocidos hasta ese momento (*MYO7A*, *USH1C*, *CDH23*, *PCDH15*, *USH1G*, *CIB2*, *USH2A*, *ADGRV1*, *WHRN*, *CLRN1*, *HARS*, *PDZD7*, *CEP250* y *C2orf71*), usando un método de captura por amplificación y una plataforma basada en la detección de protones. Este estudio, cuya cohorte incluyó 58 pacientes no escrutados previamente, permitió la identificación de 42 nuevas mutaciones presuntamente patológicas, y una tasa general de detección de alelos responsables de la enfermedad de prácticamente el 83%.

Sorprendentemente, se observó que uno de los sujetos debía su sordoceguera a mutaciones en *CEP250*, uno de los últimos genes correlacionados con la enfermedad. Sin embargo, una exhaustiva revisión clínica reveló que la degeneración retiniana se trataba en realidad de una distrofia de conos y bastones en lugar de RP clásica. Estos hallazgos, en consonancia con resultados de otros trabajos, han permitido la consolidación del gen *CEP250* como responsable de un fenotipo similar al USH (Usher-like).

El resto de casos sin resolver, tanto en este como otros trabajos análogos, induce a sospechar de la existencia de otros genes vinculados con USH. Así pues, se analizó el exoma íntegro de dichos casos negativos del panel por medio de secuenciación de exoma

completo, lo cual proporcionó resultados relevantes en seis de las muestras estudiadas. Uno de tales sujetos resultó ser un claro caso de fenocopia de USH, al albergar mutaciones patogénicas de procesamiento de intrones en dos genes independientes, *TECTA* y *REEP6*, siendo el primero responsable de la SNHL y el segundo de la RP. De forma parecida, en otro paciente se detectaron variantes patológicas para RP en el gen *EYS*, pero no se identificó paralelamente ningún cambio genético que explicara la SNHL.

Tres individuos adicionales resultaron haber sido erróneamente diagnosticados como USH, dada la conclusiva inexistencia o ambigüedad de la sordera. Uno de ellos fue definido como homocigoto de una mutación en *CNGB1*, ya reconocido como responsable de RP. Los otros dos pacientes del grupo fueron desvelados como casos más peculiares al presentar variantes supuestamente patológicas en genes asociados por lo general a otros trastornos. Concretamente, en uno de dichos sujetos se identificó una mutación en homocigosis en el gen *GRN*, cuyos defectos en estado heterocigoto están asociados a demencia frontotemporal y más raramente combinada con RP si ambos alelos se encuentran alterados. Ciertamente, en este paciente se había referido un deterioro cognitivo, inicialmente ignorado dada la alta frecuencia de este rasgo en la población general, concordante con este inusitado cuadro clínico. Por otro lado, el tercer paciente fue resuelto como heterocigoto compuesto de variantes en *WDR19*, un gen asociado en mayor medida a una distrofia retiniana acompañada de trastornos renales y, más raramente, a la forma aislada del síntoma.

En el último de los seis casos resaltados de este objetivo se detectó una mutación homocigota sin sentido en el gen *ASIC5*, cuyo papel en el organismo todavía se desconoce. Sin embargo, se han correlacionado funciones visuales y auditivas para miembros de la misma familia proteica, por lo que la difusión pública de este resultado es oportuna por si se dieran otros casos similares.

En conjunto, los hallazgos obtenidos en este trabajo avalan la importancia del uso de las más novedosas tecnologías en la búsqueda de soluciones para enfermedades raras, las cuales, siendo realistas, presentan por ahora un pronóstico terapéutico bastante desamparado. Asimismo, otras consecuencias positivas en cuanto a la caracterización genética de los pacientes son la corroboración (o rectificación) del diagnóstico inicial, así como la contribución a la estimación demográfica y correlaciones de genotipo-fenotipo, que en definitiva ayudan en la comprensión de USH y otras enfermedades relacionadas.