

PRPF31 因子对视网膜色素变性影响的研究进展

李 静¹, 毕宏生^{2,3}, 宋继科^{1,2,3}

引用:李静,毕宏生,宋继科. PRPF31 因子对视网膜色素变性影响的研究进展. 国际眼科杂志, 2024,24(12):1932-1938.

基金项目:山东省医药卫生科技项目(No.202307021729)

作者单位:¹(250014)中国山东省济南市,山东中医药大学;
²(250002)中国山东省济南市,山东中医药大学附属眼科医院
山东省眼视光与青少年视力低下防控临床医学研究中心;

³(250002)中国山东省济南市,山东省眼病防治研究院

作者简介:李静,女,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合眼病防治研究。

通讯作者:宋继科,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合眼病防治研究. edusjk@163.com

收稿日期:2024-04-16 修回日期:2024-10-23

摘要

剪接因子(SFs)是一种蛋白质,是剪接体的动态复合体的一部分。剪接体就像“剪刀”一样,能够精确地加工真核生物中前 mRNA(pre-mRNA),形成多种 mRNA 序列,该过程对于基因调控和蛋白质表达十分重要。前 mRNA 加工因子 31(PRPF31)是在生物组织中广泛表达的一种 SFs,PRPF31 突变会特异性地导致常染色体显性视网膜色素变性(adRP),称为 PRPF31-RP。目前 PRPF31-RP 的发病机制尚不清晰。文章从 PRPF31 突变或缺失导致组织和生物学过程受损的角度对 PRPF31 在 adRP 发生发展分子机制及该病治疗的研究进展做一综述,以期 PRPF31-RP 的发病机制与防治的研究提供新的思路。

关键词:剪接因子;前 mRNA 加工因子 31(PRPF31);视网膜色素变性;机制;治疗

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2024.12.13

Advances in the effect of PRPF31 on retinitis pigmentosa

Li Jing¹, Bi Hongsheng^{2,3}, Song Jike^{1,2,3}

Foundation item: Medical and Health Technology Project of Shandong Province (No.202307021729)

¹Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China; ²Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine; Shandong Provincial Clinical Medical Research Center of Optometry and Adolescent Low Vision Prevention and Control, Jinan 250002, Shandong Province, China; ³Shandong Academy of Eye Disease Prevention and Therapy, Jinan 250002, Shandong Province, China

Correspondence to: Song Jike. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China; Affiliated Eye Hospital of Shandong University of Traditional Chinese

Medicine; Shandong Provincial Clinical Medical Research Center of Optometry and Adolescent Low Vision Prevention and Control, Jinan 250002, Shandong Province, China; Shandong Academy of Eye Disease Prevention and Therapy, Jinan 250002, Shandong Province, China. edusjk@163.com

Received:2024-04-16 Accepted:2024-10-23

Abstract

• Splicing factors (SFs) are a type of protein that serves as an integral component of the dynamic spliceosome complex. The spliceosome, similar to “scissors”, has the ability to accurately process precursor RNA (pre-mRNA) in eukaryotes and generate a diverse range of mRNA sequences. This process is important for gene regulation and protein expression. Pre-mRNA processing factor 31 (PRPF31) is a widely expressed SFs in various biological tissues. However, mutations in PRPF31 are specifically linked to the development of autosomal dominant retinitis pigmentosa (adRP), known as PRPF31-RP. Currently, the pathogenesis of PRPF31-RP is still unclear. This article reviews the research progress on the molecular mechanism of PRPF31 in the development of adRP and the progress in PRPF31-RP treatment from the perspective of tissue damage and impairment of biological processes caused by PRPF31 mutation or deletion, in order to provide new ideas on the pathogenesis and treatment of PRPF31-RP.

• **KEYWORDS:** splicing factors; pre-mRNA processing factor 31 (PRPF31); retinitis pigmentosa; pathogenesis; treatment

Citation: Li J, Bi HS, Song JK. Advances in the effect of PRPF31 on retinitis pigmentosa. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2024, 24(12):1932-1938.

0 引言

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一种常见的以光感受器细胞和视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞进行性损伤和死亡为特征的遗传性致盲性疾病^[1]。RP 的早期症状是夜盲症和周边视力丧失,随着时间的流逝,视力丧失最终会发展到中央视野。患者眼底成像显示典型的视网膜周边斑点状色素沉着,被称为“骨针状色素沉着”,视盘蜡样苍白水肿^[2]。在全球范围内,RP 的患病率在 1/2 000 到 1/3 500 之间^[1],是年轻患者致盲的常见原因^[3-4]。RP 的遗传方式复杂多样,其中主要包括常染色体显性遗传(adRP),常染色体隐性遗传(arRP),X 连锁遗传(XLRP)以及少量的线粒体和双基因遗传。迄今为止,已确定了至少 86 个基因的突变与

RP 相关,并已报告了近 3 100 个突变^[1]。由于 RP 发病率高且后果严重,故一直是研究的热点和难点。

DNA 经过转录、RNA 剪接到翻译,转变成蛋白质分子。生物的基因序列中包含内含子与外显子,两者交互穿插组成基因,随后基因的 DNA 转录成前信使 RNA (pre-mRNA)。pre-mRNA 中的内含子需被移除以形成成熟的 mRNA, RNA 剪接在去除内含子保留外显子过程中发挥重要作用。RNA 剪接包括两类剪接事件:组成性剪接 (constitutive splicing) 和选择性剪接 (alternative splicing, AS)。组成型剪接是 RNA 剪接的一种基本方式,每个转录单位只产生一种 mRNA。AS 又称可变剪接,是指通过不同的剪接方式 (选择不同的剪接位点组合) 对 pre-mRNA 进行剪接后产生不同的 mRNA 异构体的过程,从而实现蛋白质组多样化,或者在相同的细胞中由于表达水平的不同而导致不同的表型^[5]。剪接因子 (splicing factors, SFs) 是一种蛋白质,是剪接体的动态复合体的一部分。剪接体是由核小 RNA (snRNA, U1、U2、U4、U5、U6 等) 和约 200 多种蛋白质因子动态组成,是识别 pre-mRNA 的剪接位点并催化剪接反应的核糖核蛋白复合体^[6]。它像“剪刀”一样,精确地加工 pre-mRNA,剪掉冗余部分,形成多种 mRNA 序列,再转译成具有不同生物学功能的蛋白质异构体,参与全身的生命活动。

AS 由剪接体 (spliceosome) 催化完成。AS 也发生在视网膜中,其中 pre-mRNA 剪接因子 31 (pre-mRNA processing factor 31, PRPF31) 在视网膜组织中广泛表达并参与 AS 事件。PRPF31 突变常导致 adRP,称为 PRPF31-RP。PRPF31 基因位于染色体 19q13.42 上,编码高度保守并含有 499 个氨基酸的 PRPF31 蛋白^[7-8]。PRPF31 是 U4/U6·U5 tri-snRNPs 的组装和稳定性的关键蛋白,依赖剪接体在 mRNA 的剪接过程中发挥重要作用^[9]。PRPF31 除了能依赖剪接体参与 RNA 剪接外还能通过参

与其它细胞途径来维持视网膜的稳态^[10]。SFs 基因突变是继视紫红质 (RHO) 基因突变后导致 PRPF31-RP 的第二大常见原因^[11,11]。目前 PRPF31-RP 的发病机制尚不清晰。本文从 PRPF31 突变或缺失导致组织和生物学过程受损的角度对 PRPF31 在 adRP 发生发展分子机制及该病治疗的研究进展做一综述,以期为 PRPF31-RP 的发病机制与防治的研究提供新的思路。

1 PRPF31 对视网膜发育及其功能的影响

研究人员先后使用果蝇 (Prp31)^[12]、斑马鱼 (Prpf31)^[13]、小鼠 (Prpf31)^[14] 和视网膜类器官 (PRPF31)^[15] 等模型来研究 PRPF31-RP 发病机制。研究发现 PRPF31 可以通过依赖或者不依赖剪接体复合体的方式广泛调控视网膜祖细胞 (retinal progenitor cells, RPCs) 分化与存活^[13]、光感受器细胞外段发育及光传导^[16]、纤毛发生^[10]、RPE 吞噬与黏附^[17] 和蛋白异常聚集^[15] 等各种生物学过程 (图 1)。

1.1 PRPF31 调控 RPCs 的分化与存活

脊椎动物视网膜发育是一个相当复杂且连续的过程,在这个过程中 RPCs 先快速增殖以扩大克隆数目,随后部分 RPCs 开始退出细胞周期并按一个保守且重叠的顺序分化为 6 类主要神经元和 Müller 胶质细胞^[18]。由此可见基因组稳定与 RPCs 正常的细胞周期对于 RPCs 的分化与存活及视网膜发育至关重要。

在人类细胞中进行全基因组筛选表明,SFs 的缺失会导致各种有丝分裂缺陷^[19]。Li 等^[13] 首次确定 Prpf31 直接调控有丝分裂纺锤体微管组装和 DNA 损伤反应 (DNA damage response, DDR) 相关基因的可变剪接和表达,而该蛋白缺失会引起 RPCs 有丝分裂进程和 DDR 异常,前者导致细胞周期阻滞停留在 M 期,后者导致 DNA 损伤逐渐积累激活 p53 信号通路导致细胞凋亡,最终证实 Prpf31 对于维持 RPCs 的自我更新、分化以及存活必不可少。随后

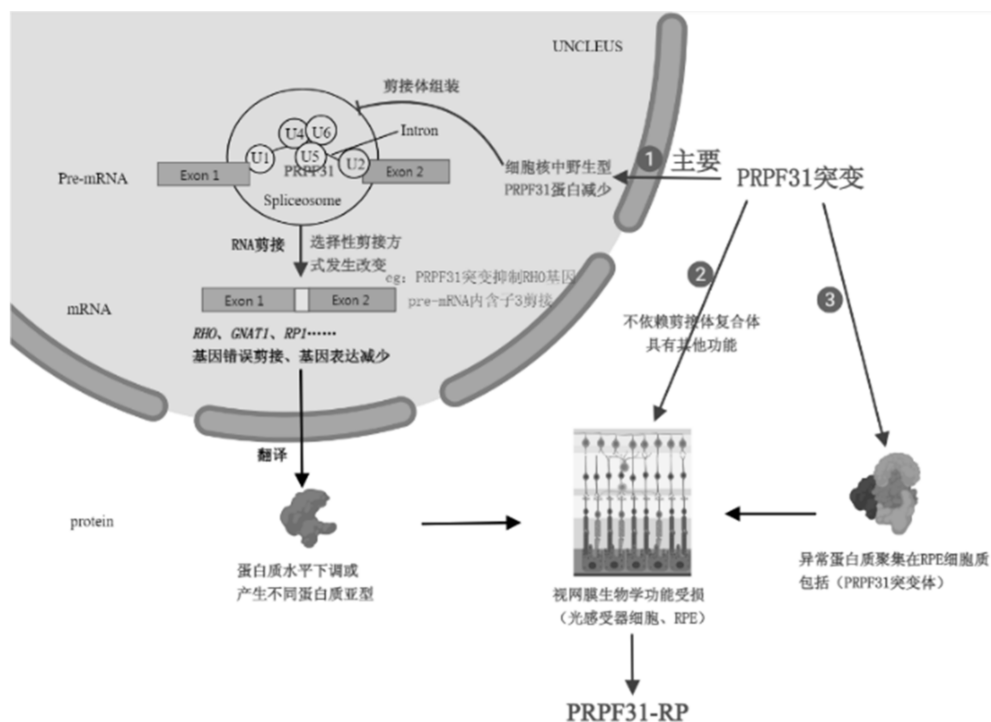


图 1 PRPF31-RP 发病机制示意图。

Nazlamova 等^[20]在 PRPF31 突变细胞系中也发现微管、中心体和 DDR 通路基因的差异剪接,提出 PRPF31 突变细胞的主要缺陷是微管和中心体缺陷,导致有丝分裂过程受损与 DNA 损伤,而 DDR 相关基因的差异剪接仅仅是这些细胞中 DDR 途径激活的标志,而不是 DDR 途径缺陷的症状。上述两个研究都支持 PRPF31 缺失或突变会导致有丝分裂相关基因的差异剪接进而影响该进程,但 Pellacani 等^[21]证实果蝇和人类细胞中 Prp31 直接调控着着丝点、纺锤体微管和 Ndc80 复合体之间的相互作用,Prp31 在有丝分裂过程中直接发挥作用,该研究结果强烈的反对 Prp31 抑制引起的有丝分裂缺陷是由于剪接因子编码 mRNA 失败的可能性。

以上结果都说明 PRPF31 直接或间接调控有丝分裂和 DDR 系统,在 RPCs 的分化与存活中必不可少。但是调节有丝分裂的两种生理功能是否共存甚至独立工作,PRPF31 突变导致的 RP 是否是由于两种生理功能同时受损导致还需要进一步研究。除此之外,PRPF31 突变直接导致 DDR 基因差异剪接还是由于突变导致 DNA 损伤进而触发 DDR 基因的差异剪接还存在争议,需要进一步深入验证。

1.2 PRPF31 调控光感受器细胞外段发育及光转导 光感受器在结构上分为外段(outer segment, OS)、连接纤毛(connecting cilium, CC)和内段(inner segment, IS)。OS 的膜盘结构是光信号级联传导的场所。光转导是光感受器细胞将外界光的信息(或光能)转化为神经冲动的过程。

Azizzadeh Pormehr 等^[22]利用人视网膜外植体(HORFC)构建 PRPF31-RP 模型后发现 PRPF31 下调会影响下游 mRNA 基因表达,其中光转导(RHO、GNAT1、RP1),光感受器结构(ROM1、FSCN2、CA4、SEMA4)和转录因子(CRX)的特异性基因表达减少。随后通过分析视网膜转录组的差异外显子使用(DEUs)和内含子保留检测发现 PRPF31 缺失会导致 RHO、ROM1、FSCN2、GNAT2 和 GNAT1 基因的剪接错误,视网膜特异性基因错误剪接与光感受器退化有关^[16]。而 Li 等^[13]在 Prpf31 突变斑马鱼中未发现光转导相关基因的错误剪接,认为可能是由于在发育过程中感光细胞分化较晚。2021 年,Hebbar 等^[12]在 Prp31 基因突变的果蝇模型中发现 Prp31 突变的感光细胞中出现视紫红质积累,发现视色素视紫红质的积累增加和孪生蛋白的 mRNA 水平增加与 RP 有关。

与先前研究结果不一致的原因可能在于动物模型不同,果蝇是复眼非哺乳动物,而人类是单眼哺乳动物,两者在视网膜结构和生理功能有明显不同;其次,在此积累的视紫红质可能是由于 PRPF31 突变影响 RHO 的正确剪接,导致其表达改变并累积。PRPF31 突变或缺失会影响光感受器发育和光转导相关基因剪接和表达,导致光感受器退化。但目前对于这些受影响的基因造成感光细胞受损的致病机制尚不清晰,还需要进一步验证。

1.3 PRPF31 调控光感受器连接纤毛的发生 OS 的膜盘结构每天更新约 10%,但其本身不具有蛋白和脂类的合成能力。光信号通路蛋白元件需要在 IS 合成再经狭小的 CC 纤毛桥运输至 OS 以维持其更新速度。外段蛋白运输失败会导致其在内段堆积,使光感受器出现应激性

细胞坏死。

基于全基因组 siRNA 的逆向遗传学筛选,PRPF31 被确定为参与初级纤毛生物发生和或维持的候选基因^[23]。大约 1/3 的视网膜营养不良病例可被认为是由感光器纤毛缺陷引起视网膜纤毛病^[24]。Buskin 等^[10]发现 PRPF31 定位于剪接复合体和纤毛,PRPF31 突变体中中心体和纤毛转录本存在差异剪接,并证实这些基因的错误剪接与严重的 RPE 缺陷和光感受器纤毛断裂有关。除此之外,在 hTERT-RPE1 细胞系进行 siRNA 敲除 PRPF31 后观察到与 PRPF31-RP 患者 RPE 类似的纤毛特异性蛋白的错误定位。Nazlamova 等^[20]进一步研究表明 PRPF31 突变导致的剪接体活性的微小缺陷主要影响富含较弱的 5' 与 3' 剪接位点的中心体及纤毛的转录本外显子的剪接效率,使其更容易发生错误剪接导致纤毛缺陷。除此之外还确定微管蛋白酪氨酸连接酶样家族成员 3(TTL3)对于纤毛微管(包括视网膜感光纤毛)的单糖基化至关重要,TTL3 的过度表达可以挽救 PRPF31 突变细胞中的纤毛数量。

这些结果都表明 PRPF31 突变导致的基因错误剪接与纤毛发生障碍密切相关。但也有研究认为 PRPF31 除依赖剪接体发挥作用外可能还具有不依赖剪接复合体的其他功能参与纤毛的发生^[25-26]。综上所述,PRPF31 调控光感受器连接纤毛的发生,但 PRPF31 对纤毛发生有哪些功能以及突变体中纤毛特异性蛋白错误定位是由什么介导的仍需要深入研究。

1.4 PRPF31 参与视网膜的昼夜节律调控 RPE 吞噬黏附功能 视网膜中存在昼夜节律系统,它控制着视网膜生物过程的许多方面,包括基因表达、信号传导、新陈代谢、光感受器外节脱落和吞噬等^[27-28]。为对抗光子产生的氧化攻击以及对抗其他攻击,在纤毛的作用下 OS 膜盘永久更新,大多数氧化的 POS 尖端每天通过 RPE 细胞的吞噬作用被清除,这种周期性吞噬作用受昼夜节律调控^[29]。此外,RPE 积极参与视网膜黏附以确保 RPE 顶端微绒毛和 POS 全长之间的紧密性,视网膜的黏连也与昼夜节律相关^[30]。

Farkas 等^[17]研究发现 Prpf31^{+/-}突变小鼠的原代 RPE 培养物存在吞噬能力下降、吞噬的昼夜节律几乎丧失和吞噬受体定位错误,RPE 顶端微绒毛与感受器外节的黏附强度在黏附峰期间也有所下降。Hamieh 等^[31]和 Vanoni 等^[14]也验证了这一结果。Buskin 等^[10]在 PRPF31-RP 的 RPE 中发现细胞黏附相关基因 pre-mRNA 剪接受损,受损基因与该病 RPE 表型及生物学过程异常相关。Shakhmantsir 等^[32]在人类细胞培养模型中发现 Prp31 的下调会导致昼夜节律周期延长,PRPF31 是人类昼夜节律的重要调节器。

综上所述,PRPF31 蛋白参与视网膜昼夜节律系统,而 PRPF31 的缺失或突变会导致该系统受损进而影响一系列生物学功能。但是 PRPF31 突变影响昼夜节律系统是由于视网膜组织受损后导致还是突变直接影响该系统导致尚不清楚还需深入研究。

1.5 PRPF31 与 RPE 沉积物 错误折叠蛋白的聚集和积累是许多视网膜病变的共同特征,包括年龄相关性黄斑变性和 RP^[33]。Graziotto 等^[34]发现 1 岁 Prpf31^{+/-}小鼠的 RPE 出现退行性变化,在 RPE 和 Bruch 膜之间出现基底折叠缺失、空泡化和有无定形沉积物的积累,提出了 SFs 相关

RP的光感受器功能障碍可能是继发于不健康的RPE。随后Valdés-Sánchez等^[35]发现突变的Prpf31蛋白会以不溶性聚集体的形式聚集在RPE细胞的细胞质中,并降低细胞核中Prpf31蛋白水平。由此可见Prpf31突变可能同时具有显性负性和单倍性不足效应。研究还发现为了响应PRPF31蛋白聚集,HSPA4L伴侣被激活并招募到聚集物中,折叠聚集的蛋白并促进其转位到细胞核。HSP70过表达可能是治疗PRPF31突变所致视网膜变性的新治疗靶点。Georgiou等^[15]对患者来源的RPE和视网膜器官进行定量蛋白质组学表明,除了mRNA剪接外,自噬和溶酶体、废物处理、未折叠蛋白反应和视觉周期等关键的细胞过程都受到了显著影响,导致RPE细胞中包含每个通路关键成分的不溶性聚集物的逐渐积累,从而影响细胞活力,并提出渐进式聚集体积累使废物处理机制负担过重,而不是由于该基因突变直接引发的错误剪接导致的。

由此可见,PRPF31突变会导致蛋白地异常聚集,进而加重废物处理机制从而导致RPE退化性病变,但目前RPE发生改变是否为PRPF31-RP原发改变,光感受器受损是否继发于RPE病变仍然存在争议。总之,PRPF31蛋白参与视网膜发育及感光细胞和RPE的各种生理功能,对维持视网膜地稳态至关重要。PRPF31突变会影响这些生理功能进而影响视网膜稳态导致视网膜退化。

2 PRPF31与RP

2001年,PRPF31首次被确定为介导adRP的基因^[8]。但PRPF31-RP发病年龄和疾病的严重程度会因PRPF31突变的不同而不同^[36]。PRPF31突变位点遍布整个基因,但多发生于基因的6-10号外显子区域,尤其是7和8号外显子^[11]。突变类型包括错义、缺失、移位、插入,多数突变会使其mRNA的截短进而导致PRPF31蛋白功能不全,单倍体剂量不足被认为是PRPF31突变引起RP的主要原因^[37]。除了导致单倍体剂量不足外还可能会由于各种原因产生异常功能的蛋白质影响视网膜的发生发展,也可能促进蛋白质在细胞质形成不溶性和细胞毒性聚集物^[38]进而通过功能丧失和显性负作用影响组织。体内外研究表明PRPF31 Ala216Pro的突变体与U4/U6 snRNP结合的能力受损,但是可以直接与U5 snRNPs中的PRPF6相互作用,这样会干扰U4/U6·U5 tri-snRNPs的正常形成^[39-40]。过表达PRPF6可以使PRPF31 Ala216Pro产生负显性效应得到逆转^[40]。故各种突变引起RP的原因究竟是单倍剂量不足效应或突变后的蛋白产生的负性效应还是两种共同存在还需要进一步研究。

有趣的是,PRPF31杂合突变携带者具有不同外显性,一些表现为视力正常,而另一些则会逐渐失明。研究发现野生型等位基因的表达水平与RP的外显率有关^[41-42]。PRPF31不足可以通过来自野生型等位基因的更高表达来补偿^[43]。PRPF31的表达水平与一些调控因子相关,如:(1)在基因组14q21-23区域内存在对PRPF31基因起反式作用的表达数量性状基因位点(eQTLs)^[44];(2)PRPF31的负性调节因子CNOT3基因,该基因是通过转录抑制机制决定PRPF31突变外显率的主要修饰基因^[45-46],但近期研究发现CNOT3表达水平与非外显率无关^[47-49];(3)PRPF31核心启动子相邻区域小

卫星重复元件(MSR1)的拷贝数目会影响非突变型PRPF31的表达水平,4个MSR1拷贝是防止症状性RP发展的保护因子^[47,49-51]。但也有一项研究表明MSR1的拷贝数与RP外显率不相关^[48]。

上述研究表明,PRPF31表达水平与某些调控因子相关,但对于PRPF31表达的调控并不是某个调控因子单独作用的结果,PRPF31具体由哪些因子调控及其这些因子又是如何对PRPF31表达发挥调控作用尚不清楚,还需要进一步验证与研究。故PRPF31调控因子的进一步深入研究将为减轻PRPF31-RP的发病率及发病症状提供新研究思路。

3 PRPF31-RP潜在的治疗途径

目前临床上尚无针对PRPF31-RP有效的治疗方法,治疗仅限于低视力辅助、日光防护、康复计划和疾病进展的监测,这些措施的目的只是为了减缓疾病的发展,目前还没有有效的治疗方法。早期认为补充维生素A对RP的进展有积极作用,但近期研究^[52]表明维生素A并非对所有类型的RP具有普遍的神保护作用。目前,针对治疗的研究主要集中在基因治疗,基因治疗可能通过解决疾病的潜在遗传原因来治疗PRPF31-RP。在疾病发展的后期,一旦细胞死亡,基因治疗便不再是治疗首选,但是细胞治疗和视网膜植入有望使患者恢复视力^[53]。除以上的主要治疗外,还可以联合其他的神经保护剂等来辅助治疗增加疗效。

3.1 基因扩增 PRPF31-RP的主要发病机制是单倍体剂量不全,而野生型等位基因的表达水平与RP外显率有关,因此基因扩增是治疗该病的潜在治疗方式。2019年,Brydon等^[54]使用腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)介导的PRPF31基因治疗方法对源自PRPF31突变的诱导多功能干细胞(iPSCs)分化的RPE细胞进行治疗后发现,PRPF31^{+/-}-iPSC来源的RPE细胞的形态、吞噬、纤毛发生、屏障功能等有所改善,这是首次证明基于AAV的基因治疗方法对prpf31-RP治疗是有潜力的。Rodrigues等^[55]证实AAV介导的基因治疗可以有效地挽救PRPF31突变引起的光感受器细胞死亡。Xi等^[56]利用AAV介导的CRISPR/Cas9敲除建立了与患者类似的早期形态和功能障碍的Prpf31突变小鼠模型,并首次在体内证明AAV介导的PRPF31基因扩增在快速退化的小鼠模型中恢复了视网膜结构和功能。AAV作为一种单链DNA细小病毒,由于其高安全性和极低免疫原性,是目前最常用的基因治疗载体。除此之外,纳米颗粒也是一种很有前途的基因治疗载体^[57-58]。

虽然针对PRPF31-RP基因扩增的研究相对其他治疗的研究较多,但作为新兴的治疗手段仍然具有潜在的局限性:(1)基因扩增不适用于有显性负作用的PRPF31的突变体;(2)PRPF31-RP主要累及感光细胞和RPE,基因扩增如何靶向这两个部位是该技术的关键问题;(3)基因扩增治疗后基因可能不会长期表达,或者会随着时间的推移而沉默,故可能只能为RP提供暂时修复;(4)基因扩增存在潜在副作用风险,如脱靶表达、炎症和毒性,其临床疗效、安全性及稳定性还需要进一步临床实验验证。

3.2 基因编辑 基因组编辑是指在特定位置对生物体基因组进行精确修改,可用于修复或纠正导致遗传疾病的突

变基因,成簇规律间隔短回文重复(CRISPR/Cas9)系统是应用广泛的基因编辑工具^[59]。Buskin等^[10]使用CRISPR/Cas9来纠正RP11-iPSC中的PRPF31 c.1115_1125del11突变,观察到修正后的iPSC来源的光受体和RPE的形态和功能恢复,这为潜在的治疗策略提供了概念证明。

基因编辑技术不仅可以精确地识别、修复或纠正导致遗传疾病的突变基因,而且由于其对于细胞和生物体都具有广泛适用性,通过对基因进行精细编辑能够加速我们对于生物基础研究地理解。基因编辑治疗方法对于纠正PRPF31突变具有广阔前景,但基因编辑技术也具有明显的局限性。基因编辑技术对人类基因进行修改面临严重的社会问题和伦理问题,除此之外,在基因编辑治疗时有编辑不准确的风险,可能会激活潜在致癌基因或人体健康重要基因被删除的风险。同基因扩增,也具有潜在副作用风险。

3.3 剪接开关反寡核苷酸 剪接开关反寡核苷酸(antisense oligonucleotides, AOs)是一种合成的核酸短序列,通常长度为15-30个残基,对反义核酸进行适当修饰后,能够通过碱基互补配对原则与目标mRNA结合,从而改变剪接位点的选择^[60]。AOs技术能够诱导降解、剪接调节或在错误的剪接事件中通过纠正错误剪接的RNA,使得下游蛋白正常产生从而恢复其在健康个体中所发挥的作用^[61]。近期Grainok等^[62]探索了一种反义寡核苷酸外显子跳跃策略来治疗由PRPF31不编码关键功能域外显子12截断突变引起的PRPF31-RP, AOs诱导的第12外显子跳跃挽救了开放阅读框,PRPF31mRNA在患者成纤维细胞中上调并且上调水平达到了预测的治疗阈值,并保留了诱导PRPF31亚型的核易位能力。这种方法对其他一些不编码关键功能域的带有突变的外显子具有靶向作用的情况还需要进一步研究及验证。ASOs具有精准靶向的特性,但其应用仍可能引发一些副作用。其中,免疫反应、细胞毒性和其在体内的稳定性和持久性是日前需重点关注和解决的问题。

除上述治疗外,还包括光遗传学技术、细胞疗法、视网膜植入等也是RP的治疗手段^[63]。光遗传学疗法是通过病毒载体将视蛋白基因递送至功能性视网膜细胞,这些视蛋白被光激活后,视网膜细胞被赋予感光功能,可恢复终末期RP的部分视功能^[64]。细胞疗法可利用干细胞或祖细胞分化成各种类型的视网膜细胞,有可能恢复失去光感受器的视网膜视力^[65]。视网膜植入不要求患者有剩余视网膜功能,是通过绕过受损的光感受器直接刺激剩余的神经节细胞,传视觉信息进入大脑^[66]。但目前尚无这些治疗方法针对PRPF31-RP的具体研究。由于PRPF31-RP后期视网膜可见RPE细胞质中蛋白的异常聚集,故除上述治疗外,可结合雷帕霉素激活自噬使这些细胞质聚集物的减少和细胞存活的改善^[55]。除此以外还可以结合神经保护剂等进行治疗,延缓视力的丧失。

4 总结与展望

RP是全球致盲的常见原因之一,其发展进程和程度与基因突变类型高度相关。其中, SFs 基因突变中PRPF31突变最常见。基于蛋白组学、转录组学等方法对PRPF31-RP动物实验模型的研究发现,PRPF31蛋白可通过依赖或者不依赖剪接复合体的形式调控RPCs分化与

存活、光感受器细胞外段发育及光转导、纤毛发生、RPE吞噬与黏附和废物处理等各种生理功能。现阶段认为PRPF31-RP的主要发病机制是PRPF31单倍体剂量不足,进而影响上述生理过程导致并逐渐加重RP,但目前的研究尚未对PRPF31-RP发病机制形成一条完整的思路。未来可通过多组学联合分析对RP的发病机制进行深入研究。

目前基因治疗是主要的潜在的治疗方法,也是现阶段研究的重点,适用于RP早期。在该病的晚期,光遗传学技术、细胞疗法、视网膜植入会是主要的潜在治疗手段,然而这些治疗手段在RP晚期的研究尚无且疗效未得到验证。除此之外,PRPF31蛋白表达水平与RP外显率呈负相关,故对野生型PRPF31蛋白数量调控因子的研究对于该病的防治也至关重要,但目前对该方面的研究却极少,未来这将是研究方向之一。相信随着基因治疗及其他治疗手段的进一步深入研究与发展,攻克PRPF31-RP这一难题指日可待。

参考文献

- [1] Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJF, et al. Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res*, 2018,66:157-186.
- [2] Kiser K, Webb-Jones KD, Bowne SJ, et al. Time course of disease progression of PRPF₃1-mediated retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol*, 2019,200:76-84.
- [3] Al-Merjan JI, Pandova MG, Al-Ghanim M, et al. Registered blindness and low vision in Kuwait. *Ophthalmic Epidemiol*, 2005,12(4):251-257.
- [4] Pontikos N, Arno G, Jurkute N, et al. Genetic basis of inherited retinal disease in a molecularly characterized cohort of more than 3000 families from the United Kingdom. *Ophthalmology*, 2020,127(10):1384-1394.
- [5] Liu YS, González-Porta M, Santos S, et al. Impact of alternative splicing on the human proteome. *Cell Rep*, 2017,20(5):1229-1241.
- [6] Lee Y, Rio DC. Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem*, 2015,84:291-323.
- [7] Makarova OV, Makarov EM, Liu SB, et al. Protein 61K, encoded by a gene (PRPF₃1) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6 * U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing. *EMBO J*, 2002,21(5):1148-1157.
- [8] Vithana EN, Abu-Safieh L, Allen MJ, et al. A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31 underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Mol Cell*, 2001,8(2):375-381.
- [9] Liu SB, Li P, Dybkov O, et al. Binding of the human Prp31 Nop domain to a composite RNA-protein platform in U4 snRNP. *Science*, 2007,316(5821):115-120.
- [10] Buskin A, Zhu LL, Chichagova V, et al. Disrupted alternative splicing for genes implicated in splicing and ciliogenesis causes PRPF₃1 retinitis pigmentosa. *Nat Commun*, 2018,9(1):4234.
- [11] Wheway G, Douglas A, Baralle D, et al. Mutation spectrum of PRPF₃1, genotype-phenotype correlation in retinitis pigmentosa, and opportunities for therapy. *Exp Eye Res*, 2020,192:107950.
- [12] Hebbbar S, Lehmann M, Behrens S, et al. Mutations in the splicing regulator Prp31 lead to retinal degeneration in *Drosophila*. *Biol Open*, 2021,10(1):bio052332.
- [13] Li JZ, Liu F, Lv YX, et al. Prpf31 is essential for the survival and differentiation of retinal progenitor cells by modulating alternative splicing. *Nucleic Acids Res*, 2021,49(4):2027-2043.

- [14] Vanoni EM, Nandrot EF. The retinal pigment epithelium: cells that know the beat!. *Adv Exp Med Biol*, 2023,1415:539–545.
- [15] Georgiou M, Yang CB, Atkinson R, et al. Activation of autophagy reverses progressive and deleterious protein aggregation in PRPF₃1 patient-induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cells. *Clin Transl Med*, 2022,12(3):e759.
- [16] Azizzadeh Pormehr L, Ahmadian S, Daftarian N, et al. PRPF₃1 reduction causes mis-splicing of the phototransduction genes in human organotypic retinal culture. *Eur J Hum Genet*, 2020,28(4):491–498.
- [17] Farkas MH, Lew DS, Sousa ME, et al. Mutations in pre-mRNA processing factors 3, 8, and 31 cause dysfunction of the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol*, 2014,184(10):2641–2652.
- [18] Stenkamp DL. Development of the vertebrate eye and retina. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2015,134:397–414.
- [19] Neumann B, Walter T, Hériché JK, et al. Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes. *Nature*, 2010,464(7289):721–727.
- [20] Nazlamova L, Villa Vasquez SS, Lord J, et al. Microtubule modification defects underlie Cilium degeneration in cell models of retinitis pigmentosa associated with pre-mRNA splicing factor mutations. *Front Genet*, 2022,13:1009430.
- [21] Pellacani C, Bucciarelli E, Renda F, et al. Splicing factors SF3A2 and Prp31 have direct roles in mitotic chromosome segregation. *eLife*, 2018,7:e40325.
- [22] Azizzadeh Pormehr L, Daftarian N, Ahmadian S, et al. Human organotypic retinal flat-mount culture (HORFC) as a model for retinitis pigmentosa11. *J Cell Biochem*, 2018,119(8):6775–6783.
- [23] Wheway G, Schmidts M, Mans D, et al. An siRNA-based functional genomics screen for the identification of regulators of ciliogenesis and ciliopathy genes. *Nat Cell Biol*, 2015,17(8):1074–1087.
- [24] Nazlamova L, Thomas NS, Cheung MK, et al. A CRISPR and high-content imaging assay compliant with ACMG/AMP guidelines for clinical variant interpretation in ciliopathies. *Hum Genet*, 2021,140(4):593–607.
- [25] Boldt K, van Reeuwijk J, Lu QH, et al. An organelle-specific protein landscape identifies novel diseases and molecular mechanisms. *Nat Commun*, 2016,7:11491.
- [26] Johnson CA, Malicki JJ. The nuclear arsenal of Cilia. *Dev Cell*, 2019,49(2):161–170.
- [27] McMahon DG, Iuvone PM, Tosini G. Circadian organization of the mammalian retina: from gene regulation to physiology and diseases. *Prog Retin Eye Res*, 2014,39:58–76.
- [28] Rao F, Xue T. Circadian-independent light regulation of mammalian metabolism. *Nat Metab*, 2024,6(6):1000–1007.
- [29] DeVera C, Dixon J, Chrenek MA, et al. The circadian clock in the retinal pigment epithelium controls the diurnal rhythm of phagocytic activity. *Int J Mol Sci*, 2022,23(10):5302.
- [30] Nandrot EF, Anand M, Sircar M, et al. Novel role for alpha5beta5-integrin in retinal adhesion and its diurnal peak. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006,290(4):C1256–C1262.
- [31] Hamieh A, Nandrot EF. Retinal pigment epithelial cells: the unveiled component in the Etiology of prpf splicing factor-associated retinitis pigmentosa. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham: Springer International Publishing, 2019,1185:227–231.
- [32] Shakhmantsir I, Dooley SJ, Kishore S, et al. RNA splicing factor mutations that cause retinitis pigmentosa result in circadian dysregulation. *J Biol Rhythms*, 2020,35(1):72–83.
- [33] Surgucheva I, Ninkina N, Buchman VL, et al. Protein aggregation in retinal cells and approaches to cell protection. *Cell Mol Neurobiol*, 2005,25(6):1051–1066.
- [34] Graziotto JJ, Farkas MH, Bujakowska K, et al. Three gene-targeted mouse models of RNA splicing factor RP show late-onset RPE and retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011,52(1):190–198.
- [35] Valdés-Sánchez L, Calado SM, de la Cerda B, et al. Retinal pigment epithelium degeneration caused by aggregation of PRPF₃1 and the role of HSP70 family of proteins. *Mol Med*, 2019,26(1):1.
- [36] Waseem NH, Vaclavik V, Webster A, et al. Mutations in the gene coding for the pre-mRNA splicing factor, PRPF₃1, in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007,48(3):1330–1334.
- [37] Rio Frio T, Wade NM, Ransijn A, et al. Premature termination codons in PRPF₃1 cause retinitis pigmentosa via haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay. *J Clin Invest*, 2008,118(4):1519–1531.
- [38] Yin J, Brocher J, Fischer U, et al. Mutant Prpf31 causes pre-mRNA splicing defects and rod photoreceptor cell degeneration in a zebrafish model for Retinitis pigmentosa. *Mol Neurodegener*, 2011,6:56.
- [39] Huranová M, Hnilicová J, Fleischer B, et al. A mutation linked to retinitis pigmentosa in HPRP31 causes protein instability and impairs its interactions with spliceosomal snRNPs. *Hum Mol Genet*, 2009,18(11):2014–2023.
- [40] Wilkie SE, Vaclavik V, Wu HM, et al. Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by missense mutations in the splicing factor gene PRPF₃1. *Mol Vis*, 2008,14:683–690.
- [41] Rose AM, Bhattacharya SS. Variant haploinsufficiency and phenotypic non-penetrance in PRPF₃1-associated retinitis pigmentosa. *Clin Genet*, 2016,90(2):118–126.
- [42] Rose AM, Luo R, Radia UK, et al. Gene of the month: PRPF₃1. *J Clin Pathol*, 2017,70(9):729–732.
- [43] Růžičková Š, Staněk D. Mutations in spliceosomal proteins and retina degeneration. *RNA Biol*, 2017,14(5):544–552.
- [44] RioFrio T, Civic N, Ransijn A, et al. Two trans-acting eQTLs modulate the penetrance of PRPF₃1 mutations. *Hum Mol Genet*, 2008,17(20):3154–3165.
- [45] Venturini G, Rose AM, Shah AZ, et al. CNOT3 is a modifier of PRPF₃1 mutations in retinitis pigmentosa with incomplete penetrance. *PLoS Genet*, 2012,8(11):e1003040.
- [46] Rose AM, Shah AZ, Venturini G, et al. Dominant PRPF₃1 mutations are hypostatic to a recessive CNOT3 polymorphism in retinitis pigmentosa: a novel phenomenon of “linked trans-acting epistasis”. *Ann Hum Genet*, 2014,78(1):62–71.
- [47] McLenachan S, Zhang D, Grainok J, et al. Determinants of disease penetrance in PRPF₃1-associated retinopathy. *Genes*, 2021,12(10):1542.
- [48] Ali-Nasser T, Zayit-Soudry S, Banin E, et al. Autosomal dominant retinitis pigmentosa with incomplete penetrance due to an intronic mutation of the PRPF₃1 gene. *Mol Vis*, 2022,28:359–368.
- [49] Lisbjerg K, Grønsvov K, Bertelsen M, et al. Genetic modifiers of non-penetrance and RNA expression levels in PRPF₃1-associated retinitis pigmentosa in a Danish cohort. *Genes*, 2023,14(2):435.
- [50] Rose AM, Shah AZ, Venturini G, et al. Transcriptional regulation of PRPF₃1 gene expression by MSR1 repeat elements causes incomplete penetrance in retinitis pigmentosa. *Sci Rep*, 2016,6:19450.

- [51] Martín-Merida I, Sanchez-Alcudia R, Fernandez-San Jose P, et al. Analysis of the PRPF₃1 gene in Spanish autosomal dominant retinitis pigmentosa patients; a novel genomic rearrangement. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017,58(2):1045-1053.
- [52] Comander J, Weigel DiFranco C, Sanderson K, et al. Natural history of retinitis pigmentosa based on genotype, vitamin A/E supplementation, and an electroretinogram biomarker. *JCI Insight*, 2023, 8(15):e167546.
- [53] Aweidah H, Xi ZH, Sahel JA, et al. PRPF₃1 - retinitis pigmentosa: Challenges and opportunities for clinical translation. *Vision Res*, 2023,213:108315.
- [54] Brydon EM, Bronstein R, Buskin A, et al. AAV-mediated gene augmentation therapy restores critical functions in mutant PRPF₃1^{+/-} iPSC-Derived rpe cells. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2019, 15: 392-402.
- [55] Rodrigues A, Slembrouck-Brec A, Nanteau C, et al. Modeling PRPF₃1 retinitis pigmentosa using retinal pigment epithelium and organoids combined with gene augmentation rescue. *NPJ Regen Med*, 2022,7(1):39.
- [56] Xi ZH, Vats A, Sahel JA, et al. Gene augmentation prevents retinal degeneration in a CRISPR/Cas9-based mouse model of PRPF₃1 retinitis pigmentosa. *Nat Commun*, 2022,13(1):7695.
- [57] Pensado A, Diaz-Corrales FJ, De la Cerda B, et al. Span poly-L-arginine nanoparticles are efficient non-viral vectors for PRPF₃1 gene delivery; an approach of gene therapy to treat retinitis pigmentosa. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2016,12(8):2251-2260.
- [58] Valdés-Sánchez L, Borrego-González S, Montero-Sánchez A, et al. Mesoporous silica-based nanoparticles as non-viral gene delivery platform for treating retinitis pigmentosa. *J Clin Med*, 2022,11(8):2170.
- [59] Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, et al. Various aspects of a gene editing system-CRISPR-Cas9. *Int J Mol Sci*, 2020,21(24):9604.
- [60] Dias N, Stein CA. Antisense oligonucleotides; basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther*, 2002,1(5):347-355.
- [61] Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics; beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(2):125-140.
- [62] Grainok J, Pitout IL, Chen FK, et al. A precision therapy approach for retinitis pigmentosa 11 using splice-switching antisense oligonucleotides to restore the open reading frame of PRPF₃1. *Int J Mol Sci*, 2024,25(6):3391.
- [63] Liu W, Liu S, Li P, et al. Retinitis pigmentosa: progress in molecular pathology and biotherapeutic strategies. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9):4883.
- [64] Sahel JA, Boulanger-Scemama E, Pagot C, et al. Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. *Nat Med*, 2021,27(7):1223-1229.
- [65] Liu H, Lu SY, Chen M, et al. Towards stem/progenitor cell-based therapies for retinal degeneration. *Stem Cell Rev Rep*, 2024, 20(6):1459-1479.
- [66] Lu GX, Gong C, Sun YZ, et al. Noninvasive imaging-guided ultrasonic neurostimulation with arbitrary 2D patterns and its application for high-quality vision restoration. *Nat Commun*, 2024,15(1):4481.