

Cerca i identificació del gen de retinitis pigmentària autosòmica recessiva del locus RP26

**Miquel Tuson Segarra
2004**

**Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona**



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

**Cerca i identificació del gen
de retinitis pigmentària autosòmica recessiva
del locus RP26**

Memòria presentada per
Miquel Tuson Segarra

Per optar al grau de
Doctor en Ciències Biològiques

Tesi realitzada sota la direcció de
la Dra. Roser Gonzàlez Duarte i de la Dra. Gemma Marfany Nadal
al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona
Programa de Genètica (Bienni 1999-2001)

Roser Gonzàlez

Gemma Marfany

Miquel Tuson

Barcelona, Setembre de 2004

A la Dina i la Chon, *in memoriam*,
que van despertar en mi, de ben petit, la curiositat pel món que ens envolta.
A la Mila, el Jesús, i l'Amparo, per tota la resta.

*I no som mai un plor
sinó un somriure fi
que es dispersa com grills de taronja*
Joan Salvat-Papasseit

*Les hores dansen
sobre la meva pell
i ve la solitud
de peus menuts,
sense sabates...*
Maria-Mercè Marçal

*She sends me blue valentines
All the way from Philadelphia
To mark the anniversary
Of someone that I used to be
And it feels just like there's
A warrant out for my arrest
Got me checkin' in my rearview mirror
And I'm always on the run
That's why I changed my name
And I didn't think you'd ever find me here*
Tom Waits

AGRAÏMENT, DEDICATÒRIA I RECORD

A les **famílies** amb retinitis pigmentària que han participat generosament en aquest estudi, i, molt especialment, a la família Casado-Aguilera. A **FUNDALUCE**, Fundación Lucha contra la Ceguera, pel finançament d'aquest treball.

A la **Roser** i a la **Gemma**. A la Roser, perquè, ara fa ben bé cinc anys, va fer que es materialitzés un dels meus somnis: estudiar una malaltia humana hereditària, i perquè ha estat una font constant d'ànims, energies, i aprenentatges diversos. A la Gemma, per tot en general i per infinitud de coses en particular. Per haver-me adoptat científicament i haver estat en tot moment al meu costat: suggerint, proposant, tramant, creant, discutint (sobretot això) i disfrutant de fer ciència. A les dues –les meves mestres–, ha estat un plaer treballar plegats.

A totes les persones que, al llarg de més d'una dècada, han estat implicades en la recerca en retinitis pigmentària al Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona, i que són partícips d'aquest treball: a la **Susana**, al **Dani** i a la **Lluïsa**, per totes les converses, idees i suport. A la **Mònica**, per una herència –la del locus RP26– plena d'oportunitats; a l'**Amàlia**, pels consells, els ànims, i unes meravelloses pràctiques de genètica humana; a l'**Eva**, la meva mestra en les primeres passes maldestres al laboratori, mil gràcies per l'ajut i els coneixements, i perquè era un plaer treballar amb tu. A les tres: va deixar el llistó ben alt i heu estat models a seguir en tot moment. Al **Lars**, per l'herència dels gens “form” i el relleu en l'RP26. A l'**Enric Herrero** i a la **Maite Rodríguez** de la Universitat de Lleida, per haver-me introduït en l'apassionant món dels *knockout* en llevat i de la dissecció de tètrades. A la **Isabel Varela**, per haver-me acollit tan i tan bé al seu laboratori, i a la **Yolanda León**, per haver-me ensenyat a donar les primeres passes experimentals entre esfingolípid.

A l'**Eva** i a na **Marta**. És difícil posar paraules a tot el que hem viscut plegats durant aquests anys. La nostra amistat fa ben petita la distància física que ara ens separa.

A les “companyes” actuals del, recentment inaugurat, laboratori 4, i amigues, un cop n'atruvessem la porta. A l'**Anna**, des d'aquell *mojito* primogènit fins a aquest darrer viatge: per tot en particular i per moltes coses en concret. A l'**Esther** *sisplau, sisplau!* pel *feeling* i la complicitat que hi ha des del primer dia: per moltes coses en particular i per tot en concret. A les dues, ha estat i és un luxe tenir-vos com a companyes de feina i amigues alhora, no en triaria d'altres, i sapigieu que us trobaré molt a faltar.

A la resta de companys amb els quals hem compartit laboratori fins fa ben poc i moltes, i bones, converses: **Diana**, molta sort en el futur immediat i com a iniciadora de la colònia catalana a NYC; **Laura G**, molts ànims en la recta final; **Jon**, un cop més, els nostres camins es creuen; **Jordi**, sempre recordaré quan vam entrar a genètica; **Neus**, gràcies per haver-me escoltat i orientat sempre que m'ha fet falta; **Ricard**; **Laura T** i **Ayelén**.

A tots els companys amb els quals hem compartit feina i il·lusions els darrers cinc anys. A tota la gent que formava part d'aquell laboratori anomenat “les humanes”: **Kika**, **Olga**, **Eva**, **Nats**, **Anna**, **Magda**, **Adriana** i **Raül**. Mai la densitat i la qualitat humanes han estat tan grans. A la **Sara**, pels bons consells, el sentit de l'humor, l'ajuda i els coneixements. A la **Rebe**, i al **Cristian**, per fer de la veterania un grau, i a la Rebe, en concret, per tants i tan bons moments. Al **Bru**, perquè sempre s'ha interessat per com anaven les coses.

Als companys d'Epi: **Senda, Josep, Anna R, Marfa, Mette, Juani, Kike, Roger, Cris G, Jordi S, Roberto, Jordi P, Mercè, Víctor, Miquel V, Albert, Sergi, Manel, Marta S, Mireia, Cris P, Adrià, i Isabel.** És un plaer conviure amb vosaltres dins i fora del laboratori; a base de cerveses, *panxitos*, dinars, sopars...heu omplert aquests anys de molt bons moments. En concret, a l'**Anna R**, per tots els bocins de cultura i els fragments d'amistat compartits. Un record especial per a l'**Iñaki**, i per al **Jordi T**, que fan de pares tot fent les amèriques.

Als companys d'Evo: **Eva T, Àlex, Michael, i Orestis.**

A la **Mari**, pels consells, les converses i tota la seva feina, que sempre forma part de la nostra. A l'**Anna**, pel bon humor i les tones i tones de plaques i centenars de litres de medi.

A tots els companys de **D-Recerca**, Associació de doctorands i becaris de recerca de Catalunya, amb els quals hem compartit la il·lusió que algun dia dedicar-se a fer ciència al nostre país no sigui tan difícil.

Als amics, tots. En concret, a la **Neus**, pels *somriures* i les sorpreses *sempre*. A n'**Antònia**, tota una descoberta. A la resta del "club de la bona vida": **Olga i Enric.**

Als **Zahories**, músics, però per sobre de tot amics: **Jordi George Artigas, Oriol Blanc, Oriol Espinal, Jaume James Puigagut**, Heu estat la millor banda sonora d'aquests darrers vuit anys, Des de Pere IV fins a L'H passant per Poble Nou, han estat moltes les tardes, i més les nits, i al llarg dels anys n'hem après de la música i l'amistat.

A la **Lo**, per totes les *estones de cel* que vam passar junts (les millors de la meua vida).

A la família, al complet.

A tots aquells que avui no poden compartir aquest moment amb nosaltres perquè ja no hi són, un record ben especial per ells.

Índex

INTRODUCCIÓ 7

Breu apunt històric:
Franz Cornelius Donders i la història d'un malnom 10

1. Els teixits afectats: la retina i l'epiteli pigmentari 11

1.1. La retina 11

1.2. L'epiteli pigmentari 13

Breu apunt històric:
La neuroanatomia de la retina, en la base de la teoria neuronal de Ramón y Cajal 13

2. Les cèl·lules fotorreceptores: els bastons i els cons 15

Breu apunt històric:
Topografia de la capa de bastons i cons de la retina humana 17

3. La retinitis pigmentària i altres distròfies retinals, a través dels gens que les causen 18

Estratègies de cerca de gens responsables de malalties humanes 18

El clonatge posicional 19

L'estratègia de gens candidats 20

El candidat posicional 21

Biologia retinal i patologia molecular en la retinitis pigmentària 21

3.1. La fototransducció 23

3.1.1. Gens RP que codifiquen proteïnes de la cascada de fototransducció 26

3.1.2. Gens que codifiquen proteïnes de la cascada de fototransducció, responsables d'altres distròfies retinals 32

3.2. El metabolisme del retinol (vitamina A): el cicle visual 41

3.2.1. Gens RP que codifiquen proteïnes del metabolisme del retinol 44

3.2.2. Gens que codifiquen proteïnes del metabolisme del retinol, responsables d'altres distròfies retinals 50

3.3. L'estructura de les cèl·lules fotorreceptores 54

3.3.1. Gens RP que codifiquen proteïnes estructurals del fotorreceptor 55

3.3.2. Gens que codifiquen proteïnes estructurals del fotorreceptor, responsables d'altres distròfies retinals 57

3.4. La transcripció 58

3.4.1. Gens RP que codifiquen factors de transcripció 58

3.5.	Les interaccions cel·lulars	62
3.5.1.	Gens RP que codifiquen proteïnes que intervenen en interaccions cel·lulars	62
3.6.	El processat de l'RNA missatger	65
3.6.1.	Gens RP que codifiquen factors de processat de premRNA	65
3.7.	El transport intracel·lular i el citoesquelet	68
3.7.1.	Gens RP que codifiquen proteïnes que intervenen en el transport intracel·lular o bé en funcions del citoesquelet	68
3.8.	Els altres gens RP	74
4.	Els loci orfes de la retinitis pigmentària	77
4.1.	Loci orfes de retinitis pigmentària autosòmica recessiva	77
4.2.	Loci orfes de retinitis pigmentària lligada al cromosoma X	78
5.	El locus RP26 de retinitis pigmentària autosòmica recessiva	80
5.1.	La família P2	80
5.2.	Exclusió de gens i loci candidats	81
5.3.	Anàlisi de lligament i definició del locus RP26	81

OBJECTIUS 83

RESULTATS 87

CAPÍTOL 1:

Caracterització funcional d'un nou gen del locus RP26: el gen *ORMDL1* i la família gènica *ORMDL*

89

Publicació a la qual ha donat lloc aquest treball:

ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins. *Genome Biology* **3** (6):research0027.1–0027.16 (2002).

CAPÍTOL 2:		
Cerca i identificació del gen responsable de retinitis pigmentària autosòmica recessiva del locus RP26: el gen <i>CERKL</i>		109
2.1.	Anàlisi de gens candidats en la regió crítica del locus RP26	112
2.2.	Refinament de l'interval de cosegregació del locus RP26	116
2.3.	Anàlisi de gens candidats en el locus RP26	119
2.3.1.	<i>FRZB</i>	119
2.3.2.	<i>NEUROD1</i>	120
2.3.3.	<i>ITGAV</i>	122
2.3.4.	<i>GLS</i>	123
2.4.	Mapatge d'homozigositat en el locus RP26	123
2.4.1.	Anàlisi de marcadors microsatèl·lit	124
2.4.2.	Anàlisi de polimorfismes d'un únic nucleòtid (SNP)	126
2.5.	Anàlisi en profunditat de la regió candidata	128
2.5.1.	Anàlisi mutacional dels gens que havien quedat descartats pel criteri d'expressió	130
2.5.2.	Seqüenciació d'exons addicionals de gens analitzats prèviament	130
2.6.	Cerca de nous gens en la regió crítica	131
2.6.1.	Anàlisi mutacional de la ceramida quinasa en la família P2	133
2.6.2.	Anàlisi de la ceramida quinasa en el panell de famílies arRP	133

Publicació a la qual ha donat lloc aquest treball:

Mutation of *CERKL*, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26). *American Journal of Human Genetics* **74**: 128–138 (2004).

CAPÍTOL 3:		
Caracterització de les variants produïdes pel processat alternatiu de transcrits del gen <i>CERKL</i>		147

Manuscrit al qual ha donat lloc aquest treball:

Characterization of the alternatively spliced isoforms of *CERKL*, a gene responsible for autosomal recessive retinitis pigmentosa.

DISCUSSIÓ **159**

<i>Cerca “pregenòmica” del gen causal d’RP en el locus RP26</i>	161
<i>Els projectes de seqüenciació d’EST: una eina per a la cerca dels gens de malalties?</i>	162
<i>Identificació d’un nou gen humà en el locus RP26: el gen ORMDL1</i>	163
<i>Cerca “genòmica” del gen causal d’RP en el locus RP26</i>	164
<i>Definició d’una regió crítica a partir de la informació d’una segona família RP</i>	166
<i>Mapatge d’homozigositat: els polimorfismes d’un únic nucleòtid</i>	168
<i>Identificació del gen RP26</i>	172
<i>El gen CERKL codifica una proteïna similar a la ceramida quinasa</i>	172
<i>Origen únic o punt calent mutacional?</i>	173
<i>Resten encara gens per descobrir al genoma humà?</i>	174
<i>Esfingolípid i apoptosi</i>	176
<i>Esfingolípid i (dis)funció retinal</i>	181
<i>És CERKL una ceramida quinasa?</i>	184
<i>Processat alternatiu de transcrits i malaltia</i>	187
<i>La retinitis pigmentària a l’era genòmica</i>	191

CONCLUSIONS **195**

ADDENDA **199**

BIBLIOGRAFIA **209**