



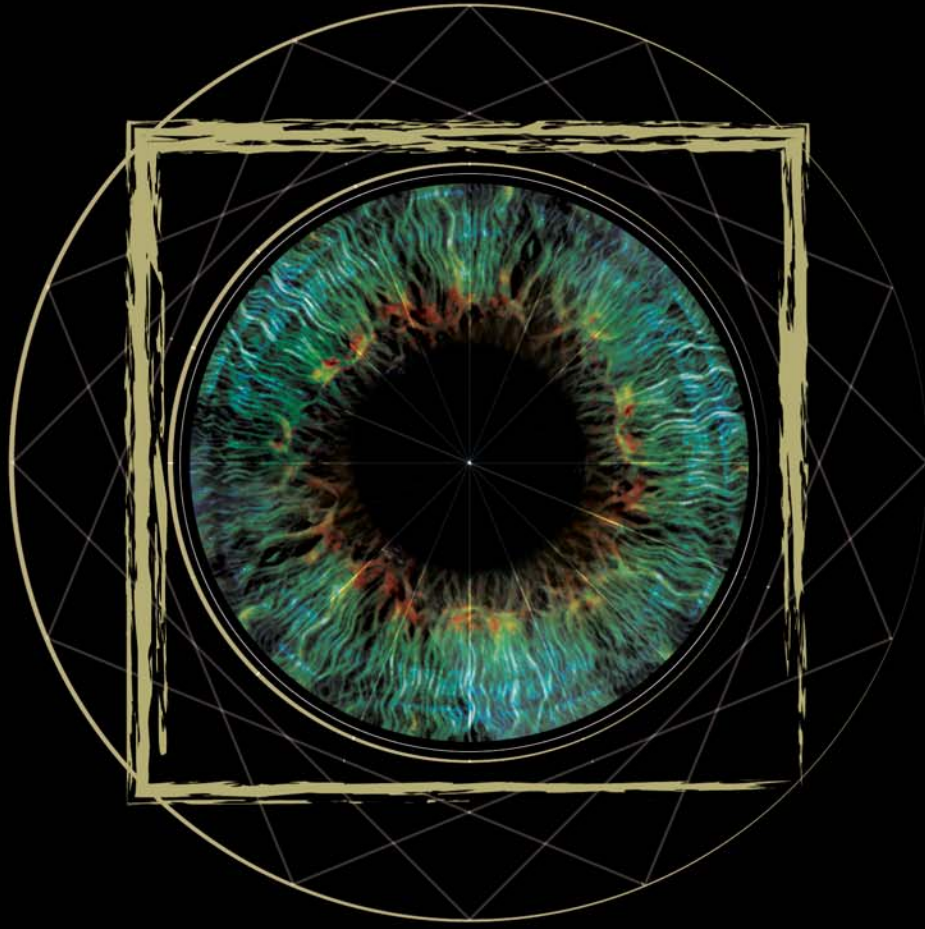
***CERKL*, generació d'un model *knockout* de retinosi pigmentària i estudis funcionals**

Alejandro Garanto Iglesias

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



CERKL,
GENERACIÓ D'UN MODEL *KNOCKOUT* DE
RETINOSI PIGMENTÀRIA I ESTUDIS FUNCIONALS
ALEJANDRO GARANTO IGLESIAS

JUNY 2011

CERKL, generació d'un model *knockout* de retinosi pigmentària i estudis funcionals

Memòria presentada per
Alejandro Garanto Iglesias

Per optar al grau de
Doctor

Tesi realitzada sota la direcció
de la Dra. Roser González Duarte i de la Dra. Gemma Marfany Nadal
al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona
Programa de Genètica (Bienni 2006-2008)

Roser González

Gemma Marfany

Alejandro Garanto

Barcelona, Juny de 2011

Aquesta Tesi Doctoral no s'hagués pogut realitzar si no hi hagués hagut un suport econòmic, moral i personal al darrera, així com una sèrie d'instal·lacions i institucions que han estat essencials per poder desenvolupar aquest Treball. Tota la feina presentada en aquest treball ha estat realitzada gràcies al suport de les següents entitats en projectes i finançaments concedits a la Dra. Roser González-Duarte:

- **Ministerio de Ciencia y Tecnología** (BFU2006-04562-Construcción de un modelo genético para el estudio de una patología neurodegenerativa. Búsqueda y análisis funcional de nuevos genes causantes de Retinosis Pigmentaria).
- **Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN)** (SAF2009-08079-Genómica funcional para el estudio de la Retinosis Pigmentaria).
- **Fundaluce** (Construcción de un modelo murino *knockout* del gen RP26, causante de Retinitis Pigmentosa autosómica recesiva para ensayos terapéuticos. 2004-2006).
- **ONCE** (Caracterización de la neurodegeneración retiniana en el modelo murino *knockout Cerkl-/-*. 2010).
- **Bidons Egara** (Estudio funcional de genes RP. 2007-2010).
- **Ajuts a Grup de Recerca Consolidat de la Generalitat de Catalunya** (2009SGR1427-Genòmica funcional aplicada a l'estudi de patologies).
- **Centro de Investigación Biomédica En Red de Enfermedades Raras (CIBER-ER) Instituto de Salud Carlos III - MICINN (2006-actualidad):** Infraestructura para acciones de alto coste 2008; Ayudas intramurales 2008-2010.

Durant aquests temps he pogut gaudir de diverses beques i ajuts per anar a congressos o realitzar estades en altres laboratoris:

- **Beca Bidons Egara** (Maig 2006 - Agost 2007).
- **Beca FPI** (BES-2007-15414) del MICINN (Setembre 2007 - Agost 2011).
- Borsa de viatge **Dept. Genètica** per anar a congressos (Setembre 2007-Congrés SEG).
- Ayuda para estancias en el extranjero **CIBER-ER** (Agost - Novembre 2008).
- Ayudas para estancias en el extranjero de la **beca FPI** (MICINN)(Març - Agost 2009).

També cal destacar que aquesta feina s'ha pogut dur a terme gràcies a estades de curta durada o puntuals en diferents centres:

- **Institut de Química Avançada de Catalunya**, CSIC (Barcelona), en el grup de la Dra. Gemma Fabriàs i la Dra. Josefina Casas, les quals m'han proporcionat totes les facilitats per poder realitzar les anàlisis lipídiques, incloent l'ineestimable ajuda de la Dra. Meritxell Egido-Gabás i l'Eva Dalmau.
- **Dean A. McGee Eye Institute** (Oklahoma City), vaig poder realitzar dues estades (de 3 i 6 mesos) en el laboratori del Dr. Robert E. Anderson, sota la supervisió d'ell mateix i el Dr. Nawajes A. Mandal, on es van dur a terme bona part dels experiments de cerca dels substrats de CERKL, i es va posar a la meua disposició tot tipus de maquinària, material i reactius i ajuda per part dels diferents membres de l'equip: Dr. Martin-Paul Agbaga, Dr. Michael Elliott, Dr. Ash, Steve Brush, Sreemathi Logan and Julie Tran.
- **Departamento de Fisiología**, Facultad de Medicina (Alcalá de Henares, Madrid) en el grup del Dr. Pedro de la Villa i el Dr. Román Blanco. Vaig realitzar una estada de 2 setmanes per realitzar l'estudi de les retines d'animals sotmesos a dany amb llum i em van facilitar l'ús de les seves instal·lacions, material i ajuda per part del seu equip: Dra. Marta Rodríguez, Dr. Fran Germain, Dr. Javier Vicente, Dr. Miguel Marchena i Laura Ramírez.

Per últim gràcies pel suport i els ànims per part de les diverses fundacions d'afectats (Fundaluce, ONCE), així com per part del Sr. Joaquim López (Bidons Egara), Andrés Mayor (Presidente de la Asociación Retina Asturias, Tesorero de Fundaluce 2004-2010) i la família Casado Aguilera, amb el José M^a Casado al capdavant, per sempre estar disposats a col·laborar en els nostres estudis.

Índex

ABREVIATURES	7
INTRODUCCIÓ	13
1. ESTRUCTURA I FUNCIONS DE LA RETINA EXTERNA I INTERNA	15
1.1. LA RETINA EXTERNA: L'EPITELI PIGMENTARI	16
1.2 LA RETINA INTERNA	16
1.2.1 Els fotoreceptors: Cons i bastons	16
1.2.2 Cèl·lules amacrines, bipolars, interplexiformes, horitzontals i de Müller	17
1.2.3 Cèl·lules ganglionars	19
2. DISTRÒFIES RETINALS: LA RETINOSI PIGMENTÀRIA	20
2.1 PREVALENÇA I SIMPTOMATOLOGIA	20
2.2 HERÈNCIA	20
2.3 ELS GENS RP	21
3. EL GEN CERAMIDE KINASE-LIKE (CERKL)	24
3.1 EL LOCUS RP26	24
3.2 CERKL: ELS GENS HUMÀ I MURÍ	25
3.2.1 Estructura i expressió	25
3.3 CERKL: LA PROTEÏNA I ELS SEUS DOMINIS	26
3.4 CERKL: UN GEN CAUSANT DE DISTRÒFIES DE RETINA	27
3.4.1 Mutacions a CERKL	28
3.4.2 La distròfia de cons i bastons (CRD)	29
3.5 CERK: LA PROTEÏNA HOMÒLOGA MÉS PROPERA A CERKL	29
3.6 CERK I CERKL: EVOLUCIÓ I FUNCIÓ	30
4. ELS ESFINGOLÍPIDS	35
4.1 PAPER REGULADOR DELS ESFINGOLÍPIDS	35
4.2 PRINCIPALS ESFINGOLÍPIDS	37
4.2.1 La ceramida	37
4.2.2 L'esfingosina	38
4.2.3 L'esfingomielina	39
4.2.4 Glucosilceramida, galactosilceramida i lactosilceramida	39
4.2.5 Gangliòsids	40
4.3 ELS ESFINGOLÍPIDS DE LA RETINA	40
4.4 ESFINGOLÍPIDS I MORT CEL·LULAR	41

4.5	DISTRÒFIES DE RETINA CAUSADES PER DISFUNCIONS EN EL METABOLISME DELS LÍPIDS	42
4.5.1	Síndromes causades per defectes en el metabolisme dels esfingolípid	42
4.5.2	Distròfies de retina per deficiències en el metabolisme dels lípids	43
5.	MODELS ANIMALS EN L'ESTUDI DE L'RP	45
5.1	ESTUDIS DE RETINA	45
5.2	MODELS ANIMALS MURINS NATURALS	46
5.2.1	<i>Rd1</i> i <i>rd10</i>	47
5.2.2	<i>Rd11</i>	48
5.3	MODELS ANIMALS MANIPULATS GENÈTICAMENT: TRANSGÈNICS I MUTANTS INDUÏTS	49
5.3.1	<i>Knockout</i> de <i>Cerkl</i>	50
5.3.2	<i>Knockout</i> de <i>Gucal1b</i>	51
5.3.3	<i>Knockout</i> d' <i>Nrl</i>	51
	OBJECTIUS	53
	RESULTATS	57
	INFORME DE LES DIRECTORES	59
	CAPÍTOL 1: CARACTERITZACIÓ DEL GEN CERKL I APROXIMACIÓ FUNCIONAL	61
	PUBLICACIÓ 1: <i>OVEREXPRESSION OF CERKL, A GENE RESPONSIBLE FOR RETINITIS PIGMENTOSA IN HUMANS, PROTECTS CELLS FROM APOPTOSIS INDUCED BY OXIDATIVE STRESS</i>	63
	PUBLICACIÓ 2: <i>HIGH TRANSCRIPTIONAL COMPLEXITY OF THE RETINITIS PIGMENTOSA CERKL GENE IN HUMAN AND MOUSE</i>	81
	CERCA DEL SUBSTRAT DE CERKL	101
	CERCA D'INTERACCIONS PROTEIQUES	121
	CAPÍTOL 2: CONSTRUCCIÓ I CARACTERITZACIÓ D'UN MODEL ANIMAL KNOCKOUT PER CERKL	131
	PUBLICACIÓ 3: <i>THE USE OF ALTERNATIVE PROMOTERS TURNS A TARGETED KNOCKOUT OF THE RETINITIS PIGMENTOSA GENE CERKL INTO A KNOCKDOWN WITH MILD AFFECTATION OF THE RETINAL GANGLION CELL LAYER</i>	133
	CONSTRUCCIÓ D'UN MODEL MURÍ KNOCKOUT PER CERKL	151
	CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DEL RATOLÍ CERKL -/-	159

DISCUSSIÓ	169
CERCA DE NOUS GENS RP I APROXIMACIÓ FUNCIONAL <i>IN SILICO</i>	171
MULTIPlicitat d'ISOFORMES DELS PRODUCTES D'EXPRESSIÓ DE CERKL	172
LOCALITZACIÓ DE CERKL	176
CERKL A LA RETINA	179
EL MODEL MURÍ DEFICIENT PER CERKL, CERKL -/-	180
LES RETINES CERKL -/- PATEIXEN ESTRÈS DE TEIXIT	185
CERKL, UN PROTECTOR EN CONDICIONS D'ESTRÈS OXIDATIU	185
JUGA CERKL UN PAPER EN LA FOTOTRANSDUCCIÓ?	186
CERKL, UNA QUINASA ÒRFENA DE SUBSTRAT	188
CERKL, ÉS UNA QUINASA DE LÍPIDS?	190
CONCLUSIONS	197
BIBLIOGRAFIA	201
ANNEX	213

Abreviatures

aCERase	Ceramidasa àcida
adRP	RP autosòmica dominant
alkCERase	Ceramidasa alcalina
alkSMase	Esfingomielinasa alcalina
AMD	Degeneració macular associada a l'edat
arRP	RP autosòmica recessiva
aSMase	Esfingomielina àcida
ATP	Adenosina 5'-trifosfat
AVMD	Distròfia macular vitel·liforme de l'adult
BBS	Síndrome de Bardet-Biedl
BEM	Maculopatia en "ull de bou"
BP	Bestrofinopatia
BSA	Albúmina sèrica bovina
C1P	Ceramida 1 fosfat
CD	Distròfia de cons
Cer	Ceramida
CERK	Quinasa de ceramides
CERKL	Proteïna semblant a quinases de ceramides
CerS1-6	Ceramida sintasa
CERT	Proteïna transportadora de ceramida
CGT	Ceramida galactosiltransferasa
CRD	Distròfia de cons i bastons
CS	Esclerosi coroïdal
CSNB	Ceguesa nocturna congènita estacionària
DAG o DG	Diacilglicerol
DAGK	Domini diacilglicerol quinasa
DEGS1-2	Dihidroceramida desaturasa 1-2
DHA	Àcid docohexaenoic
DHCer	Dihidroceramida
DHSM	Dihidroesfingomielina
DMSO	Sulfòxid de dimetil
DTPA	Àcid dietilentriamina pentaacètic
DTT	Ditiotreitòl
EDTA	Àcid etilendiamina tetraacètic
EGTA	Àcid etilenglicol tetraacètic
ENU	N-etil-nitrosurea
ER	Reticle endoplasmàtic
ERG	Electroretinograma
ESCS	Síndrome de cons S
FADS3	Desaturasa d'àcids grassos 3
FAPP2	PI(4)P <i>adaptor protein</i>
FBS	Sèrum fetal boví
FF	Fundus flavimaculatus
FFA	Àcids grassos lliures
GALC	Galactosilceramidasa
GalCer	Galactosilceramida
GBA1-3	Beta-glucosidasa 1-3
GCAP	Proteïna activadora de ciclases de guanilat
GCL	Capa de cèl·lules ganglionars
GCS	Glucosilceramida sintasa
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GFS	Síndrome de Goldmann-Favre
GlcCer	Glucosilceramida
GTP	Guanosina 5'-trifosfat
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IHC	Inmunohistoquímica
INL	Capa nuclear interna
IPL	Capa plexiforme interna
IS	Segment intern

ABREVIATURES

KDSR	3-ceto-dihidroesfingosina reductasa
KI	<i>Knockin</i>
KO	<i>Knockout</i>
LacCer	Lactosilceramida
LASS1-6	LAG1 <i>longevity assurance homolog 1</i> (CerS1-6)
LCA	Amaurosi Congenita de Leber
LPA	Àcid lisofosfatídic
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPE	Lisofosfatidiletanolamina
LPI	Lisofosfatidilinositol
MAG o MG	Monoacilglicerol
MD	Distròfia macular
MetOH	Metanol
nCERase	Ceramidasa neutra
NES	Senyal d'exportació nuclear
NLS	Senyal de localització nuclear
NMD	<i>Non-Sense Mediated Decay</i>
NRDC	Distròfia de bastons i cons de Newfoundland
nSMase	Esfingomielinasa neutra
ONL	Capa nuclear externa
OP	Potencials oscil·latoris
OPL	Capa plexiforme externa
OS	Segment extern
PA	Àcid fosfatídic
PBS	Tampó Fosfat-Salí
PC	Fosfatidilcolina
PCD	Mort cel·lular programada
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDE	Fosfodiesterasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PH	Domini d'homologia a plextrina
PI	Fosfatidilinositol
PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil
PNA	<i>Peanut Agglutinin</i>
PPAP2A-C	Fosfatasa d'àcid fosfatídic 2A-C
PPCA	Degeneració corioretinal paravenosa pigmentada
PS	Fosfatidilserina
RA	Àcid retinoic
RCP	Retinocoroidopatia
retGC	Guanilat ciclasa de retina
RL	Lípids de retina
RP	Retinosi Pigmentària
RPA	Retinitis <i>punctata albescens</i>
RPE	Epiteli pigmentari
RT-PCR	Transcripció reversa seguida de PCR
S1P	Esfingosina 1 fosfat
SD	Malaltia d'Stargardt
SGPP1-2	S1P fosfatasa 1-2
SM	Esfingomielina
SNC	Sistema nerviós central
SNP	Nitroprussiat de sodi
SNPs	Polimorfismes de nucleòtids simples
Sph	Esfingosina
SPHK	Quinasa d'esfingosina
SPT	Serina-Palmitoïl transferasa
SPTLC1-3	Cadena llarga de la SPT1-3
STGD3	Malaltia de Stargardt 3
TAG o TG	Triacilglicerol
TBS	Tampó Tris-Salí

TIS	Lloc d'inici de transcripció
TLC	Cromatografia en capa fina
TSS	Lloc de començament de la traducció
UGGT1-2	Glicoproteïna glucosiltransferasa d'UDP-Glucosa 1-2 (també anomenada GCS)
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
US2	Síndrome d'Usher de tipus 2
UTR	Regió no traduïda
VLCFA	Àcids grassos de cadena llarga
VLCPUFA	Àcids grassos poli-insaturats de cadena llarga
WT	<i>Wild-type</i>
X-AMD	Distròfia macular atròfica lligada al cromosoma X
X-CD	Distròfia de cons lligada al cromosoma X
X-RP	RP lligada al cromosoma X