



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

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

Introducció

1. ESTRUCTURA I FUNCIONS DE LA RETINA EXTERNA I INTERNA

La visió és un dels sentits més desenvolupats en l'espècie humana, que ens proporciona estímuls visuals de l'entorn de manera contínua, requisit fonamental que afecta a tots els aspectes del comportament i la comprensió de l'ambient [1]. Aquestes imatges són fruit d'una densa xarxa de connexions entre cèl·lules que processen col·lectivament els senyals abans d'enviar-los al mesencèfal i al tàlem. A nivell genètic, és un procés biològic molt complex i regulat, on hi ha molts gens implicats.

L'ull és l'òrgan sensorial que s'encarrega d'iniciar el procés de la captació de la imatge. Té una forma globular que presenta, a la part més anterior, la que està en contacte amb l'exterior, la còrnia. A continuació, està la càmera anterior i la pupil·la, rodejada per l'iris, i finalment, el cristal·lí i l'humor vitri. Per últim, a la part més posterior, es troba la retina i el nervi òptic. Així mateix, tot el globus ocular està embolcallat per l'escleròtica i la coroide [2].

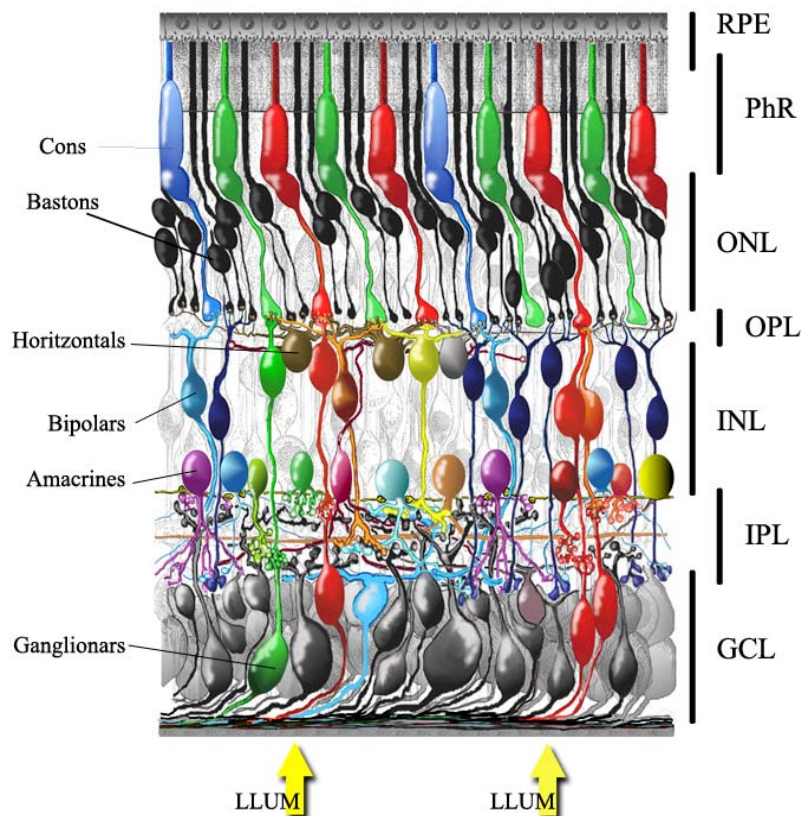


FIGURA 1 - Estructura de la retina. Esquema en el qual es representen les diferents capes i cèl·lules de la retina. PhR: fotorceptors, ONL: capa nuclear externa, OPL: capa plexiforme externa, INL: capa nuclear interna, IPL: capa plexiforme interna, GCL: capa de cèl·lules ganglionars. Imatge adaptada de Webvision (<http://webvision.med.utah.edu>).

La retina dels vertebrats consisteix en una fina capa d'uns 0,2-0,5 mm de teixit neuronal altament especialitzat situat a la part més interna de l'ull, la funció del qual és la percepció de la llum i el processament inicial del senyal produït. La part més externa d'aquest teixit està formada per una monocapa de cèl·lules que conformen l'epiteli pigmentari (RPE); la part interna, en canvi, és una xarxa trilaminar formada per diferents tipus de neurones i les seves connexions. Així doncs, hi hauria tres capes

nuclears: l'externa (ONL), on es troben els fotoreceptors, la interna (INL), formada pels somes de les cèl·lules bipolars, horitzontals, amacrines, interplexiformes i de Müller, i finalment, la capa constituïda per les cèl·lules ganglionars (GCL). D'altra banda, hi ha dues capes sinàptiques intercalades entre les nuclears: la primera, anomenada capa plexiforme externa (OPL), on s'estableixen les connexions entre els axons dels fotoreceptors i les dendrites de les cèl·lules de la INL, mentre que la segona és on es troben les sinapsis entre la INL i la GCL i s'anomena capa plexiforme interna (IPL). Per últim, els axons de les cèl·lules ganglionars formen el nervi òptic, que serà l'encarregat de connectar la retina amb el cervell [3].

Les cèl·lules fotosensibles (o fotoreceptors), encarregades d'iniciar la cadena de fototransducció quan són excitades per la llum, estan situades a la part més externa de la retina. Per tant, la llum ha de travessar tot l'ull, així com totes les capes neuronals, per poder arribar fins als fotoreceptors (FIGURA 1).

1.1. La retina externa: l'epiteli pigmentari

A la part més posterior de l'ull es troba una monocapa de cèl·lules epitelials anomenada epiteli pigmentari. Aquestes cèl·lules contenen melanina, un pigment que dona una coloració fosca i que s'encarrega d'absorbir gran part de la llum, per tal de protegir els fotoreceptors d'una exposició excessiva a aquesta. A més a més, aquestes cèl·lules estan en contacte amb els fotoreceptors i s'encarreguen de fagocitar i metabolitzar els discos produïts per aquests, mitjançant unes prolongacions que embolcallen el segment extern de cons i bastons.

1.2 La retina interna

1.2.1 Els fotoreceptors: Cons i bastons

Els vertebrats posseeixen, com a mínim, 2 tipus de cèl·lules fotoreceptores: els cons i els bastons (FIGURA 2). Aquestes cèl·lules són neurones especialitzades en captar la llum gràcies a uns pigments específics sensibles a diferents longituds d'ona que contenen en el seu interior. Tant els cons com els bastons tenen quatre compartiments morfològicament distingibles, tot i que estructuralment es solen dividir en tres parts:

1. El **segment extern** (OS) està especialitzat en la fotorecepció i presenta una elaborada ordenació laminar de discos membranosos rics en pigments fotosensibles. Les estructures membranoses estan separades de la membrana plasmàtica en els bastons i unides en els cons, i es van generant constantment a la part basal de l'OS i es reciclen a la part apical, al ser fagocitades per l'RPE.
2. El **segment intern** (IS) connecta amb l'extern a través d'un cili modificat, conté els mitocondris i la majoria d'òrgànuls cel·lulars, així com el nucli (que molts autors el classifiquen com un compartiment independent de l'IS). En aquest segment és on tenen lloc els processos metabòlics, la biosíntesi de molècules i l'endocitosi.

3. La **terminal sinàptica** és per on els fotoreceptors interactuen amb les cèl·lules bipolars i horitzontals de la INL.

Els bastons són els fotoreceptors majoritaris a la retina dels mamífers. Presenten una estructura allargada i cilíndrica i són els responsables de la visió nocturna, és a dir, aquella que es dona en condicions de poca llum. El pigment fotosensible que s'encarrega de la captació de fotons en aquestes condicions és la rodopsina, una proteïna extremadament abundant en aquestes estructures membranoses i que aporta 95% del total de proteïnes que es troben en els discos de l'OS [4]. A la retina humana hi ha al voltant de 130 milions de bastons repartits de manera més o menys homogènia, excepte en la fòvea, la qual està formada per cons. Els rosegadors, que són animals d'hàbits nocturns, no presenten una regió rica en cons, estant aquests repartits per tota la retina [5].

Els cons reben el seu nom degut a que el seu OS té forma conoidal. Són el tipus de cèl·lula fotoreceptora minoritària, havent-hi 1 con per cada 20 bastons, i s'encarreguen de la visió diürna i en color [6]. A diferència dels bastons, dels quals només hi ha un sol tipus, de cons en trobem més d'un i ve determinat per l'expressió de diferents gens d'opsines, el pigment fotosensible present en aquestes cèl·lules. Existeixen com a mínim dos tipus, els cons sensibles a la llum verda -cons M- i els sensibles a la blava -cons S-, no obstant, els primats tenen un tercer tipus, els que responen a la llum vermella -cons L- [7]. Altres animals com les aus, els peixos o els llangardaixos poden arribar a tenir fins a 5 tipus diferents de cons, que els hi permeten una excel·lent visió en color, endemés, cal recordar que els animals de sang freda fan vida durant les hores de més llum i caloroses del dia [5].

Els cons, a més a més, són responsables de l'agudesia visual en alguns vertebrats, com els primats o les aus rapinyaires, que han desenvolupat una regió a la retina extremadament rica en cons, anomenada fòvea. D'altra banda, aquesta zona està altament especialitzada i, per tal de tenir una màxima resolució, cada con està connectat amb una sola cèl·lula bipolar, que a la vegada interacciona amb una única cèl·lula ganglionar [4].

1.2.2 Cèl·lules amacrines, bipolars, interplexiformes, horitzontals i de Müller

En la INL trobem 4 tipus de cèl·lules neuronals: les amacrines, bipolars, horitzontals i interplexiformes (FIGURA 2). El paper de les tres primeres és transmetre la informació que reben per part dels fotoreceptors a les cèl·lules ganglionars. Així doncs, les cèl·lules horitzontals, de les quals es coneixen 3 tipus, connecten amb diferents cons i modulen el senyal produït per aquests sota diferents condicions de llum. Les bipolars, que es calcula que n'hi ha al voltant de 5 milions en la retina humana (classificades en 9 tipus diferents), connecten directament els fotoreceptors amb les ganglionars, i processen una imatge inicial més aviat borrosa que, juntament amb la informació addicional que els hi arriba de les cèl·lules horitzontals, la converteixen en una imatge més nítida. Això és possible, perquè les cèl·lules horitzontals reben senyals directament de més d'un con. Els més de 20 tipus de cèl·lules amacrines en

canvi, s'encarreguen de connectar les bipolars que reben senyals dels bastons amb les ganglionars, i a més a més, poden interaccionar amb les bipolars dels cons, generant un flux vertical de transmissió de la informació [4, 5, 8].

Tot i que gran part de la informació es genera en els fotoreceptors i migra verticalment fins a les cèl·lules ganglionars, existeixen altres estímuls que es mouen en sentit contrari, gràcies a un únic tipus de neurona, anomenada cèl·lula interplexiforme, que uneix les dues capes plexiformes enviant estímuls de retroalimentació des de la IPL a l'OPL [9, 10].

Endemés, en aquesta capa trobem cèl·lules de tipus no neuronal, les cèl·lules de Müller, que són un tipus de cèl·lula glial radial que s'encarrega bàsicament de mantenir l'homeòstasi i protegir les neurones. En els últims anys, diferents treballs han demostrat que aquestes cèl·lules poden ser capaces de diferenciar-se a qualsevol tipus de cèl·lula de la retina [11-13].

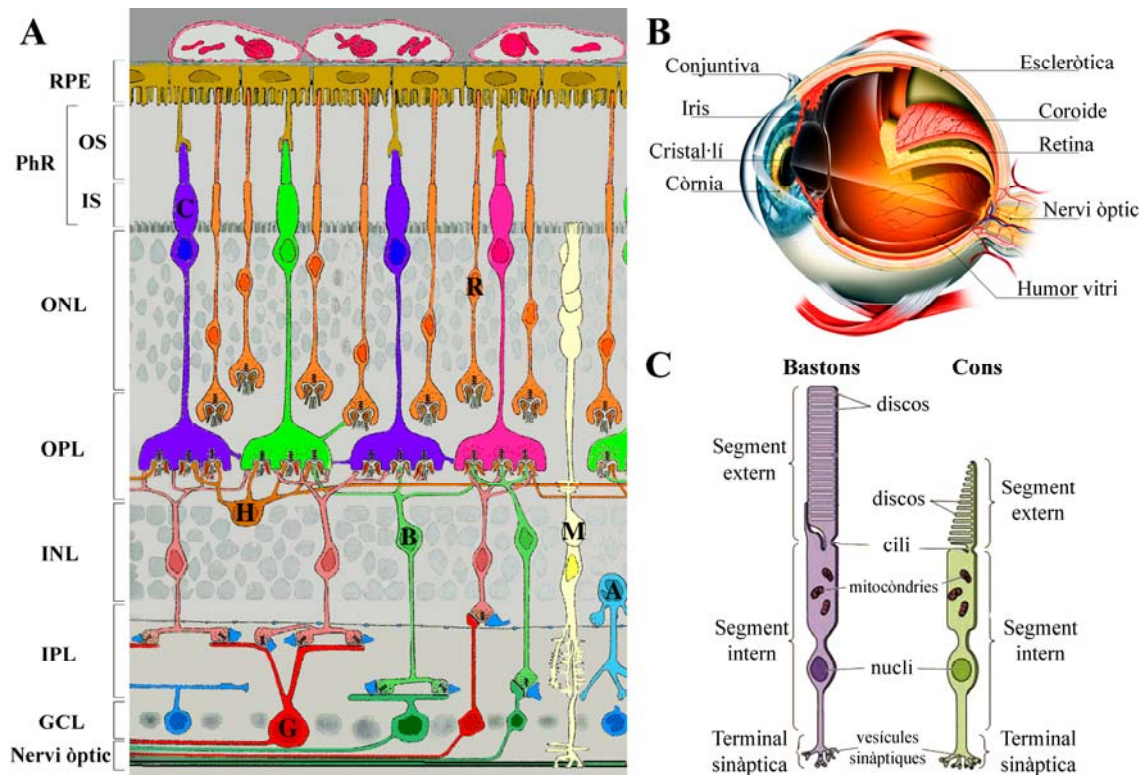


FIGURA 2 - Estructura de l'ull, la retina i els fotoreceptors. Esquema on es representen l'estructura, així com, els principals tipus cel·lulars de la retina (A), l'anatomia de l'ull (B) i la morfologia dels dos tipus de cèl·lules fotoreceptores, els cons i els bastons (C). C: cons, R: bastons, H: cèl·lules horitzontals, B: cèl·lules bipolars, A: cèl·lules amacrines, M: cèl·lules de Müller i G: cèl·lules ganglionars. Imatges adaptades de: A- Rodieck 1998 [14], B- <http://drsoler.com/las-partes-del-ojo> i C- Purves et al. 2001 [15].

1.2.3 Cèl·lules ganglionars

Les cèl·lules ganglionars estan a la part més anterior de la retina, formant una capa de neurones encarregades de processar el senyal enviat des dels fotoreceptors, via cèl·lules bipolars, abans d'enviar-lo cap al cervell a través del nervi òptic que formen els seus axons. S'estima que les retines humanes contenen al voltant d'un milió de cèl·lules ganglionars dividides en 20 tipus diferents [4].

Cap a l'any 1991, es va identificar un nou tipus de cèl·lula ganglionar en ratolins, estudiant un mutant natural de degeneració de fotoreceptors. En aquests ratolins *rd1/rd1* es van trobar respostes fotosensibles relacionades amb els ritmes circadians i reflexos pupil·lars [16]. No va ésser fins a finals del segle passat, que es va a començar a hipotetitzar sobre un nou tipus de fotoreceptor diferent a cons i bastons amb funcions no visuals implicades en la regulació fòtica i els ja esmentats ritmes circadians i reflexos pupil·lars [17]. Finalment, es van identificar un petit grup de cèl·lules ganglionars (1-3%), que contenen un fotopigment, la melanopsina, el pic d'absorció del qual és a 480 nm aproximadament [18]. Aquestes neurones s'anomenen cèl·lules ganglionars intrínsecament fotosensibles (ipRGC) i han estat observades en tots els mamífers, incloent-hi els humans [19].

Per tant, totes les cèl·lules esmentades anteriorment juguen un paper molt important en la captació, amplificació, modificació, integració i enviament dels estímuls més rellevants al cervell [4].

2. DISTRÒFIES RETINALS: LA RETINOSI PIGMENTÀRIA

La major causa de ceguesa en adults és la pèrdua de funció i mort, per apoptosi, de les cèl·lules de la retina, principalment els fotoreceptors, la mort dels quals explicaria al voltant del 50% dels casos de degeneracions retinals [20]. La degeneració d'aquestes neurones ve provocada normalment per causes genètiques, presentant una herència monogènica que globalment afecta a 1 de cada 3000 persones i es manifesta durant els primers 25 anys de vida. Tanmateix, existeixen altres degeneracions retinals d'herència multifactorial on el factor ambiental és molt més important que el genètic. Aquest és el cas de la degeneració macular associada a l'edat (AMD), que es manifesta en edats avançades i explica aproximadament el 50% dels casos de ceguesa i defectes visuals [21].

2.1 Prevalença i simptomatologia

Dins de les degeneracions retinals, la retinosi pigmentària (RP) és, sense cap dubte, la causa més comuna de ceguesa hereditària en l'adult, amb una prevalença d'1 en 4000. Aquesta malaltia engloba un conjunt de distròfies que comporten la pèrdua progressiva dels fotoreceptors, així com l'aparició de dipòsits de pigment, majoritàriament, a la part més perifèrica de la retina [22].

Els primers símptomes apareixen durant les dues primeres dècades de vida i es manifesten inicialment amb ceguera nocturna i amb dificultats d'adaptació a la foscor. Amb el pas del temps comença a aparèixer la pèrdua de la visió perifèrica, que es va accentuant, originant l'anomenada visió en túnel deguda a la mort per apoptosi dels bastons. A més a més, apareixen dipòsits pigmentaris a la retina perifèrica, així com un estretament dels vasos sanguinis. En alguns casos, generalment a partir de la quarta dècada, poden donar-se problemes relacionats amb l'agudesia visual a causa de la pèrdua de funció i mort dels cons, així com del constrenyiment progressiu del camp visual, fins produir-se ceguera total [23].

Tant a nivell clínic com genètic, l'RP és una patologia molt variable. Clínicament, els símptomes poden aparèixer a edats primerenques, o més cap a la segona dècada de vida. Tanmateix, alguns pacients no arriben mai a la pèrdua de visió completa. D'altra banda, hi ha una elevada variabilitat intra- i interfamiliar que, tot plegat, dificulta un bon diagnòstic. A més a més, a mida que progressa la patologia, els símptomes es poden solapar amb altres malalties similars degut al deteriorament dels teixits afectats, fet que complica encara més la diagnosi [24].

2.2 Herència

L'RP és una malaltia monogènica que segueix els tres patrons bàsics d'herència mendeliana: autosòmica dominant (adRP), autosòmica recessiva (arRP) i lligada al cromosoma X (X-RP). També s'han descrit casos d'RP amb una herència digènica, trobant-se mutacions en heterozigosi en dos gens diferents [25], o amb herència materna -mitocondrial- [26]. Endemés, presenta una elevada

heterogeneïtat genètica -diferents gens poden causar la mateixa patologia-, i al·lèlica -mutacions en el mateix gen poden causar diferents malalties i tipus d'RP-. Fins el moment, s'han descrit 53 gens causals i s'han mapat 9 loci diferents (TAULA 1) associats amb la patologia (RetNet: <http://www.sph.uth.tmc.edu/retnet>). No obstant, cal remarcar que al voltant del 35-40% dels casos romanen sense gen causal assignat, la qual cosa indica que encara resten nous gens per ser descrits o noves mutacions que podrien estar localitzades en introns, així com en exons específics d'isoformes de retina encara no identificats. Alguns autors estimen que el total de gens causants de retinosi s'aproparà al centenar [24]. L'RP es manifesta freqüentment de manera aïllada. Cal remarcar que en alguns casos (20-30%), forma part d'algunes síndromes on l'ull no és l'únic òrgan afectat. Les síndromes més comuns són la d'Usher -RP acompanyada de sordesa- [27] o la de Bardet-Biedl -RP amb obesitat, deteriorament cognitiu, problemes renals, polidactília i hipertensió, entre d'altres defectes congènits- [28].

2.3 Els gens RP

En els últims 30 anys s'han identificat més de 150 gens causants de distròfies de retina, dels quals aproximadament un 70% no es van descriure fins la primera dècada d'aquest segle [29]. Aquest increment va lligat a la millora del coneixement de marcadors genètics, molt útils pels estudis de lligament, com els SNPs, i a l'aparició de noves tecnologies que permeten fer estudis més precisos de seqüenciació múltiple, que resulten molt útils per fer crivellats a gran escala, fet que escurça considerablement el temps entre la preparació de la mostra, l'estudi de cadascun dels gens per separat i el resultat final. Com a exemples, trobem els diversos xips que existeixen actualment que analitzen directament els diferents gens i mutacions ja descrits, mitjançant els xips de seqüenciació de mutacions conegudes [30, 31] o els xips de reseqüenciació amb sondes de les regions que es volen genotipar [32]. A més a més, continua emprant-se el diagnòstic indirecte basat en l'anàlisi de lligament genètic i cosegregació amb marcadors genètics, els quals són altament útils per la cerca de noves mutacions i gens no descrits encara [33, 34].

Dels 53 candidats descrits fins el moment, 2 d'ells causen exclusivament X-RP, 17 s'han trobat en famílies amb adRP, mentre que 29 causen arRP. A més a més, hi ha 5 gens que han estat relacionats tant amb casos d'arRP com d'adRP, aquest és el cas dels gens *BEST1*, *NR2E3*, *NRL*, *RHO* i *RP1*, marcats en blau a la TAULA 1. Fins el moment, només s'ha descrit un cas d'RP digènica, causada per mutacions en heterozigosi en els gens *RDS* i *ROM1* [25].

Es calcula que l'arRP representa el 50-60% dels casos, on cap gen destaca com a majoritari, havent-hi encara un 30% de pacients amb arRP no sindròmica sense gen assignat. En el cas de l'adRP, 30-40% dels casos, existeix un gen majoritari, el de la rodopsina (*RHO*), que explica el 25% dels pacients, mentre que un 50% encara continua essent desconegut. Finalment, la X-RP suposa un 5-15% sobre el total dels casos RP, dels quals un 70-80% ve causat per mutacions en el gen *RPGR* i un 10% pel gen *RP2* [22].

Retinosi Pigmentària autosòmica dominant (adRP)			
Gen	Proteïna	Localització	Associació amb altres distròfies
BEST1	Bestrophin 1	11q12.3	adMD, adRCP, arBP
CA4	Carbonic anhydrase IV	17q23.2	
CRX	Cone-rod otx-like photoreceptor homeobox transcription factor	19q13.32	adCRD, arLCA, adLCA
FSCN2	Retinal fascin homolog 2	17q25.3	adMD
GUCA1B	Guanylate cyclase activating protein 1B	6p21.1	adMD
IMPDH1	Inosine monophosphate dehydrogenase 1	7q32.1	adLCA
KLHL7	Kelch-like 7 protein (<i>Drosophila</i>)	7p15.3	
NR2E3	Nuclear receptor subfamily 2 group E3	15q23	arESCS, GFS
NRL	Neural retina luciferase zipper	14q11.2	
PRPF3	Human homolog of yeast pre-mRNA splicing factor 3	1q21.2	
PRPF6	Human homolog of yeast pre-mRNA splicing factor 6	20q13.33	
PRPF8	Human homolog of yeast pre-mRNA splicing factor 8	17p13.3	
PRPF31	Human homolog of yeast pre-mRNA splicing factor 31	19q13.42	
PRPH2/RDS	Peripherin 2	6p21.1	adMD, digRP, adCRD, adAVMD
RDH12	Retinol dehydrogenase 12	14q24.1	arLCA
RHO	Rhodopsin	3q22.1	adCSNB
ROM1	Retinal outer segment membrane protein 1	11q12.3	digRP
RP1	RP1 protein	8q12.1	
RP9	RP9 protein o PIM1-kinase associated protein 1	7p14.3	
SEMA4A	Semaphorin 4A	1q22	adCRD
SNRNP200	Small nuclear ribonucleoprotein 200kDa	2q11.2	
TOPORS	Topoisomerase I binding arginine/serine rich protein	9p21.1	
Retinosi Pigmentària autosòmica recessiva (arRP)			
Gen	Proteïna	Localització	Associació amb altres distròfies
ABCA4	ATP-binding cassette transporter-retinal	1p22.1	arSD, arCRD, arMD, arFF
BEST1	Bestrophin 1	11q12.3	adMD, adRCP, arBP
C2ORF71	Chromosome 2 open reading frame 71	2p23.2	
CERKL	Ceramide Kinase-Like protein	2q31.3	arCRD
CLRN1	Clarin-1	3q25.1	arUS3
CNGA1	Rod cGMP-gated channel alpha subunit	4p12	
CNGB1	Rod cGMP-gated channel beta subunit	16q13	
CRB1	Crumbs homolog 1	1q31.3	arLCA, PPCA
DHDDS	Dehydrodolichyl diphosphate synthase	1p36.11	
EYS	Eyes shut/spacemaker homolog (<i>Drosophila</i>)	6q12	
FAM161A	Family with sequence similarity 161 member A	2p15	
IDH3B	NAD(+)-specific isocitrate dehydrogenase 3 beta	20p13	
IMPG2	Interphotoreceptor matrix proteoglycan 2	3q12.3	
LRAT	Lecithin retinol acyltransferase	4q32.1	arLCA
MERTK	c-mer protooncogene receptor tyrosine kinase	2q13	
NR2E3	Nuclear receptor subfamily 2 group E3	15q23	arESCS, GFS
NRL	Neural retina luciferase zipper	14q11.2	
PDE6A	cGMP phosphodiesterase alpha subunit	5q33.1	
PDE6B	Rod cGMP phosphodiesterase beta subunit	4p16.3	adCSNB
PDE6G	Phosphodiesterase 6G cGMP-specific rod gamma	17q25.3	
PRCD	Progressive rod-cone degeneration protein	17q25.1	
PROM1	Prominin 1	4p15.32	adMD, adS-LMD, adCRD, BEM
RBP3	Retinol binding protein 3	10q11.22	
RGR	RPE-retinal G protein-coupled receptor	10q23.1	adCS
RHO	Rhodopsin	3q22.1	adCSNB
RLBP1	Retinaldehyde-binding protein 1	15q26.1	arNRCD, arRPA
RP1	RP1 protein	8q12.1	
RPE65	Retinal pigment epithelium-specific 65 kD protein	1p31.2	arLCA
SAG	Arrestin	2q37.1	arCSNB
SPATA7	Spermatogenesis associated protein 7	14q31.3	arLCA
TTC8	Tetratricopeptide repeat domain 8	14q32.11	arBBS
TULP1	Tubby-like protein 1	6p21.31	arLCA

Retinosi Pigmentària autosòmica recessiva (arRP)			
Gen	Proteïna	Localització	Associació amb altres distròfies
USH2A	Usherin	1q41	arUS2
ZNF513	Zinc finger protein 513	2p23.3	
Retinosi Pigmentària lligada al cromosoma X (X-RP)			
Gen	Proteïna	Localització	Associació amb altres distròfies
RP2	Novel XRP2 protein similar to human cofactor C	Xp11.23	
RPGR	Retinitis pigmentosa GTPase regulator	Xp11.4	X-CD, X-AMD
Loci associats amb la Retinosi Pigmentària			
Locus	Tipus d'herència	Localització	Any identificació
RP22	arRP	16p12.3-p12.1	1998
RP29	arRP	4q32-q34	2001
RP32	arRP	1p21.2-p13.3	2005
RP6	X-RP	Xp21.3-p21.2	1990-2000
RP23	X-RP	Xp22	2000
RP24	X-RP	Xq26-q27	1998
RP34	X-RP	Xq28-qter	2006

TAULA 1 - Els gens RP. Classificació dels gens i loci descrits com a causants d'RP segons el tipus d'RP que causen, indicant la seva localització cromosòmica i altres distròfies de retina que poden causar. En blau, es maquen els gens causants d'RP tant autosòmica dominant com recessiva. ad: autosòmica dominant, ar: autosòmica recessiva i dig: digènica. MD: Distròfia macular, RCP: retinocoroidopatia, LCA: Amaurosi Congènita de Leber, ESCS: Síndrome de cons S, GFS: Síndrome de Goldmann-Favre, AVMD: Distròfia macular vitel·lifor de l'adult, CSNB: Ceguesa nocturna congènita estacionària, BP: Bestrofinopatia, SD: Malaltia d'Stargardt, FF: *Fundus flavimaculatus*, PPCA: Degeneració coriorretinal paravenosa pigmentada, BEM: Maculopatia en "ull de bou", CS: Esclerosi coroidal, NRDC: Distròfia de bastons i cons de Newfoundland, CRD: Distròfia de cons i bastons, RPA: Retinitis *punctata albescens*, BBS: Síndrome de Bardet-Biedl, US2: Síndrome d'Usher de tipus 2, US3: Síndrome d'Usher de tipus 3, X-CD: Distròfia de cons lligada al cromosoma X, X-AMD: Distròfia macular atròfica lligada al cromosoma X, RP: Retinosi Pigmentària, CD: Distròfia de cons, AMD Distròfia Macular associada a la Edat.

Els gens causants d'RP aïllada tenen funcions específiques de la retina, o amb una gran importància en aquest teixit, ja que, mutacions en aquests gens, només tenen afectació en l'ull i no en altres òrgans. En l'aspecte funcional, els diferents gens associats amb aquestes distròfies, juguen un paper important en diverses vies que tenen lloc en els fotoreceptors, així com en funcions més aviat estructurals i de connexions entre cèl·lules, de permeabilització i alliberació de neurotransmissors (TAULA 2).

Classificació funcional dels gens RP	
Funció	Gens
Fototransducció	CNGA1, CNGB2, GUCA1B, PDE6A, PDE6B, PDE6G, RHO, SAG
Metabolisme del retinol	ABCA4, LRAT, RBP3, RDH12, RGR, RLBPI, RPE65
Estructura dels fotoreceptors	EYS, PROM1, PRPH2, ROM1
Transcripció	CRX, NR2E3, NRL, ZNF513
Interaccions cel·lulars	CRB1, MERTK, SEMA4A, USH2A
Processament del mRNA	PRPF3, PRPF6, PRPF8, PRPF31, RP9, SNRNP200
Transport	C2ORF71, FSCN2, RP1, RP2, RPGR, TULP1, TTC8
Sistema Ubiquitina-Proteasoma	KLHL7, TOPORS
Activitats enzimàtiques diverses	BEST1, CA4, CLRN1, DHDDS, IDH3B, IMPDH1
Funció desconeguda	CERKL, FAM161A, PRCD, SPATA7

TAULA 2 - Classificació dels gens RP agrupats segons la funció que realitzen. Dins el grup d'activitats diverses, hi ha agrupats els gens que per si sols crearien un nou grup. Cal destacar que hi ha gens dels quals encara es desconeix la funció.

3. EL GEN CERAMIDE KINASE-LIKE (CERKL)

A partir d'una família espanyola es va descriure un nou gen causant d'RP, el *Ceramide Kinase-Like* (CERKL). Aquest gen, codifica per una proteïna quinasa de lípids semblant a la quinasa de ceramides (CERK- Ceramide Kinase). CERKL es va identificar l'any 2004 en el nostre grup i, la seva caracterització funcional ha estat l'eix principal d'aquest treball.

3.1 El locus RP26

A mitjans dels anys noranta, aquest grup de recerca va analitzar una família gran i consanguínia (P2). Aquesta família de 15 fills, presenta una forma d'arRP i té 5 afectes. El fenotip clínic consistia en una alteració de la visió tant perifèrica com central, a partir de la segona dècada de vida. Aquestes alteracions eren compartides per tots els afectes, encara que amb graus d'afectació diferents. En els pacients afectats més joves, mitjançant registres electroretinogràfics, es va poder establir que l'alteració primària en aquesta família era dels bastons, tret característic de l'RP [35].

El primer escrutini realitzat en la família P2 va consistir en l'anàlisi de cosegregació amb marcadors de loci descrits de diferents distròfies retinals. A més a més, es va estudiar, també per cosegregació, un seguit de gens relacionats amb diverses funcions que es donen a la retina, alguns dels quals ja havien estat descrits com a gens causants d'RP (*RHO*, *PDE6B*, *RDS*, *ROM1*, *RCV1*, *NRL* i *PDE6C*). Cap dels gens i loci analitzats cosegregava amb la malaltia [35].

Després de descartar els possibles candidats, es van realitzar estudis d'anàlisi de lligament mitjançant l'ús de més de 105 marcadors de tipus microsatèl·lit distribuïts arreu del genoma. Un dels marcadors emprats, D2S118, el qual localitza en el cromosoma 2, va donar un valor de *lod score* de 4.12 a $=0.00$. Estudis més exhaustius amb altres marcadors van permetre la caracterització d'un nou locus d'arRP, anomenat RP26, que comprenia al voltant de 17 Mb [35], que posteriorment, emprant marcadors SNP, va ser delimitat fins a 2,5 Mb [36].

La nova regió acotada del locus RP26 contenia un total de 8 gens ja descrits, els quals van ser descartats per seqüenciació manual [36]. Una cerca d'ESTs *in silico* va permetre trobar un cDNA incomplet, aïllat d'una llibreria d'ull/retinoblastoma, que semblava contenir 6 exons i una EST amb 7 possibles exons. Ambdues seqüències tenien una pauta oberta, i es localitzaven entre els gens *ITGA4* i *NEUROD1*. L'estudi en detall, va permetre observar que les dues seqüències compartien 18 nucleòtids, i que un cop encavalcades *in silico*, produïen un cDNA format per 13 exons amb una pauta de lectura oberta de 1596 nucleòtids, que generava una proteïna de 532 aminoàcids amb homologia amb proteïnes quinases de ceramida, esfingosina i diacilglicerol. La semblança més elevada la presentava, en concret, amb la CERK humana [37] -29% identitat, 50% similitud- [36]. Així doncs, CERKL es troba en la regió cromosòmica 2q31.3 i comprèn un total de 140,35 kb.

L'anàlisi mutacional d'aquest nou gen en la família P2 va revelar una mutació sense sentit en homozigosi en l'exó 5 (R257X), que truncava la proteïna al bell mig del domini catalític predit i que, a més a més, cosegregava amb la patologia. Així doncs, estàvem davant un nou gen causant d'RP, el gen RP26, anomenat des d'aquell moment *CERKL*, en base a la seva homologia a nivell proteic amb la proteïna humana CERK [36].

3.2 *CERKL*: Els gens humà i murí

3.2.1 Estructura i expressió

Estudis d'expressió realitzats en diversos teixits humans del gen *CERKL*, han demostrat que aquest gen produeix 9 transcrits diferents, mitjançant la combinació de 15 exons diferents (FIGURA 3) [38-40].

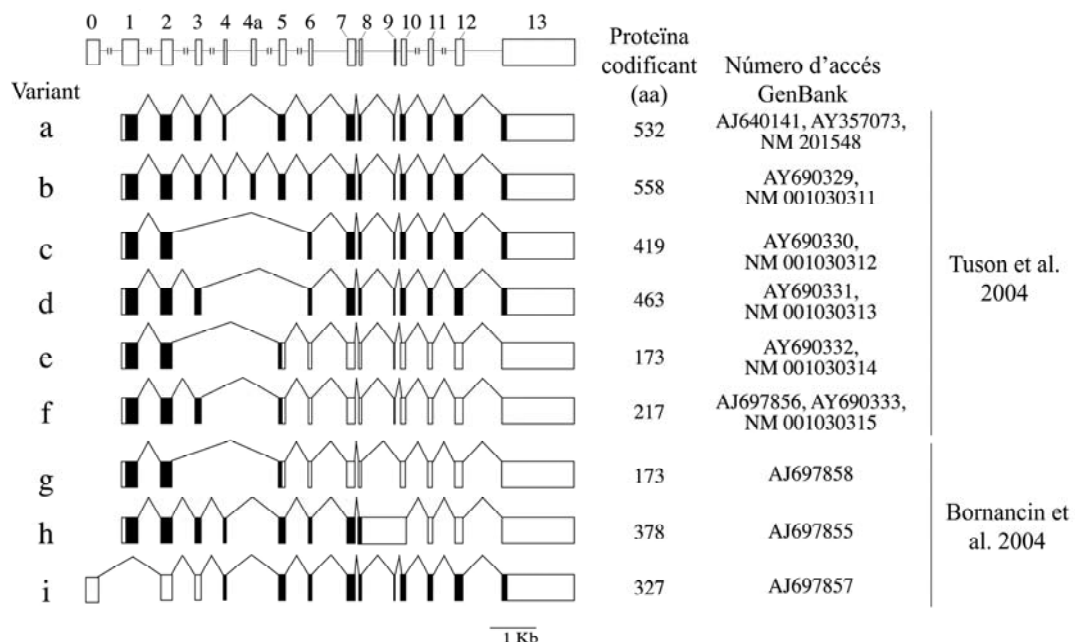


FIGURA 3 - Transcrits de *CERKL* a humà. Esquema de les variants d'RNA de *CERKL* descrites abans d'iniciar aquest treball, amb els diferents exons que conformen cadascuna, així com el seu número d'accés en els bancs de dades i els autors. En negre es marca la regió codificant entre el primer ATG en pauta i el codó d'aturada. Imatge adaptada d'Auslender et al. 2007 [40].

La diversitat de transcrits observada és produïda per fenòmens d'empalament alternatiu entre la regió compresa entre els exons 2 i 6. Aquestes combinacions d'exons donen lloc a 4 transcrits capaços de codificar una proteïna en pauta des del primer exó fins l'últim (variants: a, b, c i d). En canvi, hi ha combinacions que generen codons d'aturada prematurs, i en cas de no estar sotmesos a NMD (*Non-Sense Mediated Decay*) produïrien proteïnes truncades (variants: e, f i g). Per últim, com es mostra a la FIGURA 3, es va descriure un transcrit que comença a l'exó 0, el qual es correspon amb el 5' UTR del gen *NEUROD1*; gen amb elevat nivell d'expressió en el sistema nerviós i que, a la vegada, és el gen més proper a la regió 5' de *CERKL*. En aquest cas, aquest transcrit es salta l'exó 1 i s'empalma directament amb el 2, i per tant, podria codificar una proteïna, l'inici de la qual estaria a l'exó 4, lloc on es troba el primer ATG en pauta [36, 38-40].

En quant a ratolí, l'únic transcrit descrit seria l'equivalent a la variant "a" humana i consta de 1578 pb que codifiquen una proteïna de 525 aa (FIGURA 4). La seqüència d'aquesta variant es va obtenir mitjançant el solapament de diversos clons.

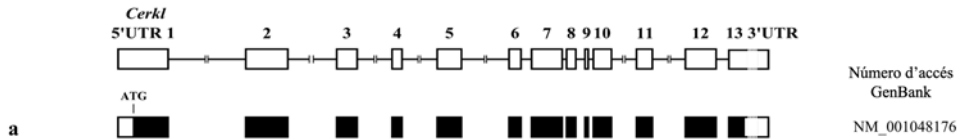


FIGURA 4 - Transcrits de *Cerkl* a ratolí. Esquema en el qual es mostra l'estructura de la única isoforma descrita fins 2011 de *Cerkl* de ratolí i el possible transcrit generat. En negre està representada la regió codificant.

Tot i que mutacions descrites de *CERKL* causen un fenotip que afecta, única i exclusivament, a la retina, aquest gen s'expressa en nombrosos teixits. Diversos estudis, tant quantitius com semi-quantitius, realitzats sobre panells de cDNA comercials de mostres de diferents teixits provinents d'individus adults i de fetus, han demostrat que, en adults, *CERKL* s'expressa de manera elevada o moderada a retina, ronyó, pàncrees, pulmó, cervell, fetge i testicles, mentre que en teixits fetals, ho fa a ronyó, pulmó i fetge [38, 39]. L'anàlisi d'expressió en diferents línies cel·lulars mostra una elevada expressió en les A549 -cèl·lules epitelials d'adenocarcinoma de pulmó- i més baixa en HEK293 -cèl·lules embrionàries de ronyó humà- [39]. L'expressió en ratolí, en canvi, no ha estat estudiada.

Malgrat que l'expressió de *CERKL* humana sembla bastant generalitzada, la retina és un dels teixits on el nivell de transcripció és més alt. Una anàlisi d'isoformes sobre diferents teixits, realitzada al nostre grup, va posar de manifest que l'expressió de *CERKL* en cada teixit, era fruit de la combinació de les 4 isoformes que en aquell moment estaven descrites (a, b, c, d). El resultat més sorprenent i rellevant d'aquest estudi va ser que només un teixit, la retina, presentava els 4 transcrits [38].

3.3 CERKL: La proteïna i els seus dominis

Estudis comparatius en bases de dades a nivell de dominis proteics en *CERKL* va permetre descriure el domini conservat diacilglicerol quinasa (DAGK), format pels exons 3, 4, 5, 6 i part del 7 (FIGURA 5). Així doncs, si tinguéssim en compte els transcrits amb una pauta de lectura oberta llarga, només dues isoformes tindrien activitat catalítica (isoformes a i b). En el cas de la isoforma "b", l'exó 4b està considerat també part del domini, ja que no trenca la pauta de lectura [38, 39].

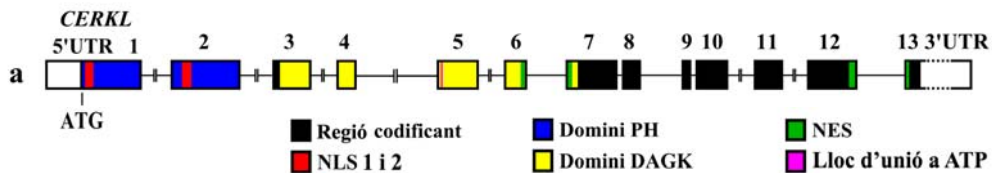


FIGURA 5 - Representació dels dominis proteics descrits per la isoforma "a" de *CERKL*.

El domini DAGK està present des dels bacteris fins els vertebrats superiors. Un estudi filogenètic comparant CERKL amb diverses proteïnes amb activitat quinasa de lípids va mostrar que CERK era la proteïna més semblant a CERKL, seguida del grup de les quinases d'esfingosina (SPHK) i per últim, el grup més allunyat, filogenèticament parlant, era el de les diacilglicerol quinases convencionals [38]. CERKL i CERK comparteixen un 50% de similituds i un 26% d'identitats [38]. També, en les quinases d'esfingolípid han estat definits cinc subdominis catalítics, així com també un domini específic de grup (FIGURA 6). En el cas que ens ocupa, CERKL té bastant conservada la regió específica de les quinases de ceramida (CERKs), i tres dels cinc subdominis descrits, en un dels quals s'ha identificat un domini d'unió a ATP completament conservat en CERKL. No obstant dos dels subdominis, no presenten gaire conservació. Malgrat que totes aquestes evidències, respecte al paper que juga CERKL, apunten cap a una funció quinàsica de lípids, encara no s'ha pogut demostrar aquesta activitat així com tampoc, identificar el seu substrat [39].

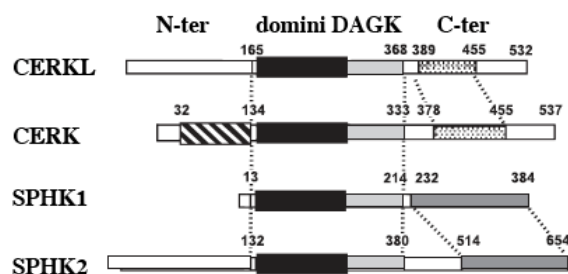


FIGURA 6 - Comparació dels dominis de CERKL, CERK i SPHKs. La regió N-terminal de CERK codifica pel domini PH, també identificat recentment en CERKL (requadre amb ratlles), la regió C-terminal conté subdominis característics per cada subfamília (requadre puntejat per CERK i CERKL, i gris per les SPHKs). Enmig trobem el domini DAGK (requadre negre i gris clar) Adaptada de Bornancin et al. 2005 [39].

CERKL conté dos senyals de localització nuclear (NLS), un a l'exó 1 (NLS-1) i un altre, que sembla ser el més important, a l'exó 2 (NLS-2); tots dos de 12 aminoàcids encara que la regió principal serien els 5 aminoàcids centrals de cadascun d'ells [41]. D'altra banda, recentment s'ha demostrat que hi ha dos senyals d'exportació nuclear (NES) situats, el primer entre l'exó 6 i 7 i el segon entre el 12 i el 13 (FIGURA 5) [42]. Tot plegat, la identificació d'aquests dos tipus de senyals suggereix que CERKL podria estar implicada en algun tipus de transport nucli-citoplasma, apuntant cap a funcions diferencials en ambdós compartiments.

Per últim, els exons 1 i 2 codifiquen per un domini d'homologia a plectrina (PH), del qual es desconeix quin seria el seu paper funcional (FIGURA 5). Entre d'altres, s'hipotetitzava que podria actuar com un punt d'unió al substrat, d'interacció amb altres proteïnes o també d'ancoratge a la membrana [42].

3.4 CERKL: un gen causant de distròfies de retina

Diverses mutacions han estat identificades en aquest gen durant els darrers anys. A la vegada, l'aparició d'aquestes noves alteracions patològiques, ha derivat en un debat sobre si les mutacions a CERKL causen RP o distròfia de cons i bastons (CRD).

3.4.1 Mutacions a *CERKL*

La primera mutació descrita a *CERKL* va ser la p.R257X, una mutació en homozigosi que generava un codó d'aturada prematur enmig del domini DAGK, identificada en una família espanyola on hi havia diversos malalts d'RP [38]. Posteriorment, aquesta mutació s'ha trobat en un total de 9 famílies espanyoles diagnosticades amb RP [33, 43]. En canvi, altres autors associen la mutació p.R257X a la CRD, en concret en una família d'origen alemany/anglès i una canadenc [44, 45].

L'any 2007, es va descriure una nova mutació en una família de jueus iemenites, c.238+1G>A, situada en la regió donadora d'*splicing* de l'exó 1, que provoca que quedi retingut l'intró 1. Aquesta mutació és molt més severa i està associada a una afectació macular, que va portar a confusions a l'hora de la diagnosi. Alguns pacients van mostrar un fenotip d'RP mentre que d'altres, de CRD [40]. Una altra mutació, la p.R106S, és un canvi d'aminoàcid en l'NLS-2, que es va identificar en una família paquistanesa amb arRP [46]. Una última mutació en homozigosi, p.C125W, es va trobar en una família canadenc diagnosticada amb CRD. Aquesta consisteix en un canvi d'aminoàcid en un residu conservat de l'exó 2 [45].

A més a més de les mutacions en homozigosi esmentades en els paràgrafs anteriors, s'han descrit heterozigots compostos de *CERKL* associats a CRD. Un d'aquests casos és el de la mutació p.R257X que s'ha trobat en pacients d'origen alemany/anglès amb CRD, en heterozigosi amb una altra mutació a l'exó 8, p.C362X, que genera un codó d'aturada prematur. A la vegada, en un pacient d'una família d'origen anglès, també diagnosticat amb CRD, s'ha trobat en heterozigosi la mutació p.R257X, tot i que no s'ha trobat encara l'altra alteració [44]. Finalment, les mutacions en heterozigosi, c.156_157insT i c.758delT, cosegregaven amb la malaltia en els pacients d'una família xinesa diagnosticada amb arRP [47].

La localització de totes les mutacions de *CERKL* descrites fins el moment es representa esquemàticament en la FIGURA 7.

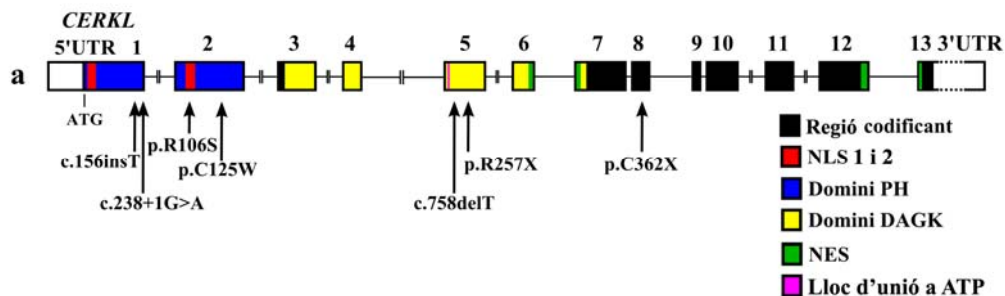


FIGURA 7 - Mutacions patogèniques descrites en *CERKL*. Posició de les mutacions causants d'RP i CRD en la isoforma "a" del gen *CERKL* i dels dominis proteics identificats en la proteïna, i com es veurien afectats per les mutacions.

3.4.2 La distròfia de cons i bastons (CRD)

La CRD té una incidència d'1 en 40000 i es caracteritza per la mort dels fotoreceptors i la formació de dipòsits de pigment visibles, majoritàriament, en la regió macular. Les CRDs presenten inicialment, durant la primera dècada de vida, un deteriorament de la màcula, regió rica en cons, que provoca una disminució en l'agudesia visual, acompanyada de diferents graus de fotofòbia (intolerància a la llum) i discromatopsia (visió en color anormal). Amb el pas dels anys, apareix la ceguesa nocturna i la pèrdua de visió perifèrica deguda a la mort dels bastons, que desembocarà en una ceguesa gairebé total [48]. El diagnòstic clínic de les CRDs acostuma a ser difícil en les primeres etapes de la patologia degut, principalment, a què és complicat diferenciar entre una CRD, una distròfia de cons, una distròfia macular, com podria ser la malaltia d'Stargardt, o alguna altra patologia que provoqués degeneració de la màcula [49]. La CRD, com també passa amb l'RP, és una malaltia amb una elevada heterogeneïtat genètica que segueix els tres patrons d'herència mendeliana: autosòmic dominant (adCRD), autosòmic recessiu (arCRD) i lligat al cromosoma X (X-CRD), i que també, es pot presentar com a malaltia aïllada o formant part d'una síndrome, com la de Bardet-Biedl -CRD acompanyada d'obesitat, problemes congènits i cognitius- o l'atàxia espinocerebel·lar de tipus 7 -atàxia cerebel·lar amb CRD-. Fins el moment, són 17 els gens identificats com responsables de causar CRD (RetNet).

3.5 CERK: La proteïna homòloga més propera a CERKL

La quinasa de ceramides, CERK, va ser clonada l'any 2002 a partir d'una llibreria de cDNA de cèl·lules leucèmiques i també de cervell murí [37]. *CERK* es troba al cromosoma 22 i produeix un sol transcrit (NM_022766) format per 13 exons que codifiquen per una proteïna de 537 aminoàcids. Estudis a nivell d'homologia de seqüència proteica, a partir del domini DAGK, van permetre establir una nova subclasse dins de la superfamília de les quinases de diacilglicerol, que actualment, està formada per CERK i CERKL [50].

CERK conté un domini DAGK en el centre de la proteïna, especialment conservat entre les quinases implicades en el metabolisme dels esfingolípids (FIGURA 6) [39, 51]. També mitjançant estudis de modelatge, es va predir un domini PH a l'extrem N-terminal, l'existència del qual ha estat demostrada en diversos treballs experimentals, atribuint-li un paper essencial en l'activitat enzimàtica i en la unió a la membrana per tal de dur a terme la seva funció, fet que explicaria la seva localització subcel·lular en compartiments membranosos [50, 52].

En els darrers anys, com també ha passat amb CERKL, s'han descrit diversos dominis en CERK [51]. Un dels més rellevants, és el motiu de cisteïnes (CXXXCXXC) conservat evolutivament entre les diferents espècies, i que sembla tenir un paper important en l'exportació des del nucli, la localització en l'aparell de Golgi i en l'activitat de l'enzim. També s'han descrit un NLS a N-terminal, així com dos NES, un situat a C-terminal i l'altre que coincideix en la seva totalitat amb el domini de cisteïnes

conservat [42, 53]. Per últim, CERK presenta un domini d'unió Calci/Calmodulina [37], de tal forma que la calmodulina s'uneix a aquest lloc de manera depenent de calci, i regulada per, possiblement, una serina (S427) fosforilada [54].

CERK s'expressa de manera ubíqua, tot i que, els nivells més elevats d'mRNA s'han trobat a cervell, cor, múscul esquelètic i intestí prim [39]. D'altra banda, la proteïna, es localitza principalment en els *rafts* lipídics [55] i les fraccions de membranes pesades [56]. Estudis realitzats sobreexpressant CERK com a proteïna de fusió en diferents tipus de cèl·lules en cultiu, va demostrar un enriquiment en la seva localització a l'aparell de Golgi, la membrana plasmàtica i vesícules citoplasmàtiques, tot i que en el cas dels dos últims compartiments, sembla ser que es deu a una translocació en resposta a la turgència osmòtica [50, 52]. Més endavant, analitzant l'expressió de CERK endògena, es va poder demostrar que localitzava més aviat en el *trans*-Golgi i en altres compartiments, com els endosomes/exosomes i mitocondris [56]. Finalment, la seva localització a Golgi i la translocació a la membrana plasmàtica semblen ser depenent del domini PH [57].

3.6 CERK i CERKL: Evolució i funció

Anteriorment, ja hem mencionat que el nom de CERKL es degut a què comparteix un 50% de similitud amb CERK. Posseeixen una estructura força semblant, en quant a dominis es refereix, tenint ambdues dominis DAGK, PH, NLS i NES, tot i que el motiu conservat de cisteïnes, essencial per l'activitat enzimàtica que duu a terme CERK, no està present en CERKL.

A nivell evolutiu, segons les dades que hi ha en diferents recursos informàtics (com és el cas del banc de dades accessible lliurement al NCBI), les DAGKs apareixen ja als procariotes, trobant-se en diferents tipus de bacteris, i la subclasse de les SPHKs, en eucariotes, des dels llevats fins a organismes superiors. En quant a CERK, fins el moment, només s'ha identificat en plantes, invertebrats i vertebrats; en canvi, CERKL només s'ha pogut descriure en vertebrats. Comparacions realitzades sobre el genoma d'amfiox, l'ancestre cordat més proper a aquest últim grup, no han demostrat que el gen CERKL s'hi trobi present, encara que CERK sí que hi és. Així doncs, estem davant un gen que semblaria ser específic dels vertebrats [38].

D'altra banda, comparacions a nivell de proteïna entre diferents espècies de vertebrats, han mostrat diferències clares en quant a la proteïna CERK de peix zebra, la qual estaria formada per 649 aminoàcids, 112 més que la CERK humana, mentre que en el cas de CERKL no succeix això. Cal remarcar, però, la gran conservació entre ximpanzé i humà, en quant a CERKL, tot i que, la proteïna del primer està incompleta -d'aquí la diferència d'aminoàcids entre ambdues espècies-, endemés, la isoforma descrita fins el moment en ximpanzé inclou l'exó 4b, fins ara només descrit en alguns primats (FIGURA 8, FIGURA 9, FIGURA 10 i TAULA 3).

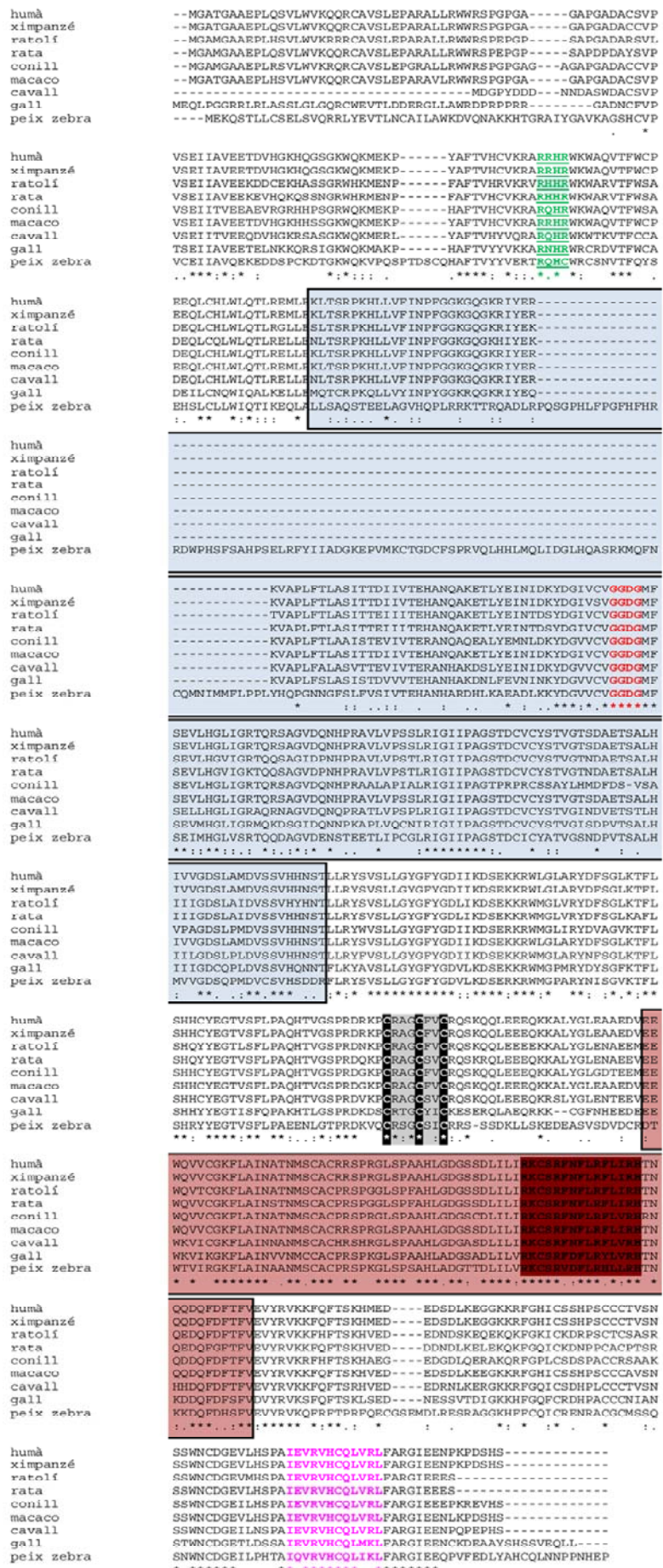


FIGURA 10 - Alineament de la proteïna CERK de diferents espècies de vertebrats. Els diferents dominis representats són: emmarcat en blau, el domini DAGK i en vermell, el domini específic de les CERKs. En lletres vermelles, el domini d'unió a ATP; en verd, els diferents NLS, amb la regió, essencial, subratllada, mentre que en rosa, els NES. També s'indica en grana el domini Calci/Calmodulina, i en gris i negre, el motiu de cisteïnes conservat que coincideix a la vegada amb un NES.

Localització dels gens CERK i CERKL en diferents espècies				
Espècie	CERK		CERKL	
	Cromosoma	Proteïna	Cromosoma	Proteïna
Humà: (<i>Homo sapiens</i>)	22	537 aa	2	532 aa
Ximpanzé (<i>Pan troglodytes</i>)	22	537 aa	2B	494 aa
Ratolí (<i>Mus musculus</i>)	15	531 aa	2	525 aa
Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	7	531 aa	3	618 aa
Conill (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Desconegut	538 aa*	7	542 aa
Macaco (<i>Macaca mulatta</i>)	10	537 aa	12	502 aa
Cavall (<i>Equus caballus</i>)	28	504 aa	18	686 aa
Gall/Gallina/Pollastre (<i>Gallus gallus</i>)	1	543 aa	7	523 aa
Peix zebra (<i>Danio rerio</i>)	4	649 aa	9	577 aa*

TAULA 3 - Localització genòmica i mida de la proteïna en diferents espècies animals. En la taula es mostra la localització cromosòmica de CERK i CERKL, així com la mida de les proteïnes per les que codifiquen en cada espècie. L'asterisc indica predicció.

CERK és una fosfotransferasa que utilitza l'ATP com a donador de fosfat primari. S'encarrega de fosforilar la ceramida (Cer), produint la ceramida-1-fosfat (C1P), fet que manté l'equilibri entre Cer/C1P, que com veurem més endavant, està finament regulat i, variacions en aquest balanç, desencadenen tot un seguit de respostes que decideixen el futur de la cèl·lula. El pH òptim de treball de CERK és a pH neutre, i concentracions submicromolars de calci estimulen la seva activitat [37, 58-60]. La funció de CERKL, en canvi, encara no ha estat descrita. Inicialment, basant-se en l'homologia entre ambdues proteïnes, tot semblava indicar que CERKL havia de fer un paper similar al de CERK [38]. Malauradament, CERKL encara continua essent una quinasa òrfena de funció i substrat.

Els estudis obtinguts sobre un model animal murí *Cerk* *-/-*, van mostrar que no és un gen letal embrionari i no provoca cap tipus de malformació durant el desenvolupament. Tot i disrupcionar el gen, en aquest animals s'observaven nivells residuals d'un 20% de C1P, el producte esperat de la reacció que duu a terme CERK. Per tant, suggereixen altres vies de generació d'aquest metabòlit. Malgrat que els nivells de C1P havien disminuït i en canvi, els de ceramida havien augmentat, no es va trobar cap fenotip aparent en aquests ratolins. Finalment, l'estudi més exhaustiu va determinar que l'únic fenotip clar que presentava aquest model era neutropènia i nivells elevats de ceramida en sèrum. Com es comentarà en l'apartat 4, la ceramida és un inductor de l'apoptosi, i els autors hipotetitzen que els nivells alts de ceramida en sèrum indueixen l'apoptosi dels neutròfils, i per això, es redueix el seu nombre [61].

4. ELS ESFINGOLÍPIDS

Els esfingolípids són una família de lípids amfipàtics que juguen una funció estructural bàsica i tenen propietats multifuncionals fonamentals per la cèl·lula. Són components de membrana ubics que es troben en les membranes de totes les cèl·lules eucariotes, especialment en les dels teixits animals [62]. J.L.W Thudichum va descobrir els esfingolípids l'any 1884 en teixit nerviós, i posteriorment, va establir que eren components essencials per les cèl·lules eucariotes [63]. Durant molts anys, els esfingolípids han estat considerats merament components estructurals de membrana sense cap funció específica, però en els darrers 20 anys, el coneixement sobre aquestes molècules ha crescut considerablement, vivificant el seu interès científic, demostrant que són imprescindibles i que juguen un paper fonamental en el control funcional de la cèl·lula i les seves vies de senyalització [64]. Tots els membres d'aquesta família de lípids estan formats per una cadena hidrofòbica que actuaria d'esquelet (base esfingoide), un grup polar i la presència/absència d'un àcid gras esterificat (FIGURA 11).

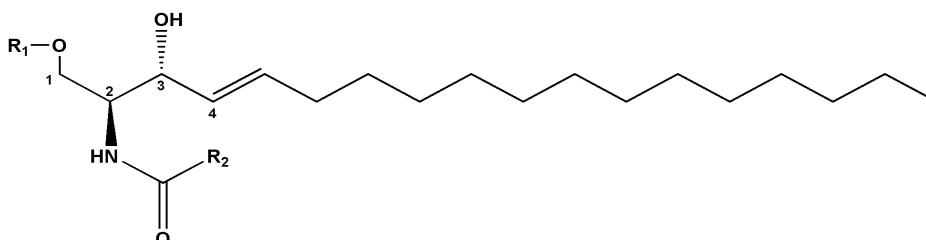


FIGURA 11 - Estructura bàsica d'un esfingolípido. L'esquelet està format per una base esfingoide de 18 C, un grup polar variable entre els diferents membres de la família (R1) i un àcid gras o un hidrogen en el R2.

4.1 Paper regulador dels esfingolípids

La síntesi *de novo* (FIGURA 12) dels esfingolípids comença en la cara citosòlica del reticle endoplasmàtic (ER) a partir de la condensació del palmitoil-CoA i la serina per formar la 3-ceto-dihidroesfingosina, la qual mitjançant l'activitat d'una reductasa es converteix en dihidroesfingosina (o esfinganina). Posteriorment, la dihidroceramida sintasa sintetitza la dihidroceramida afegint-li un àcid gras. Finalment, mitjançant una reacció de desaturació en el carboni 4, es forma la ceramida, el compost central del metabolisme dels esfingolípids, a partir de la qual, mitjançant diferents modificacions es van generant la resta de membres de la família [65]. A més a més, el metabolisme dels esfingolípids és complex, perquè funciona com una sèrie de xarxes interconnectades que divergeixen d'una sola entrada i convergeixen en una sola sortida [57].

Els esfingolípids es poden dividir en dos grups. Els esfingolípids simples, que estarien formats per la ceramida, l'esfingosina, les formes fosforilades de cadascuna d'elles i altres lípids semblants; i els esfingolípids complexos, on trobem tots aquells formats per una ceramida amb grups polars més grans, com ara l'esfingomièlina i els glucoesfingolípids (FIGURA 13) [57].

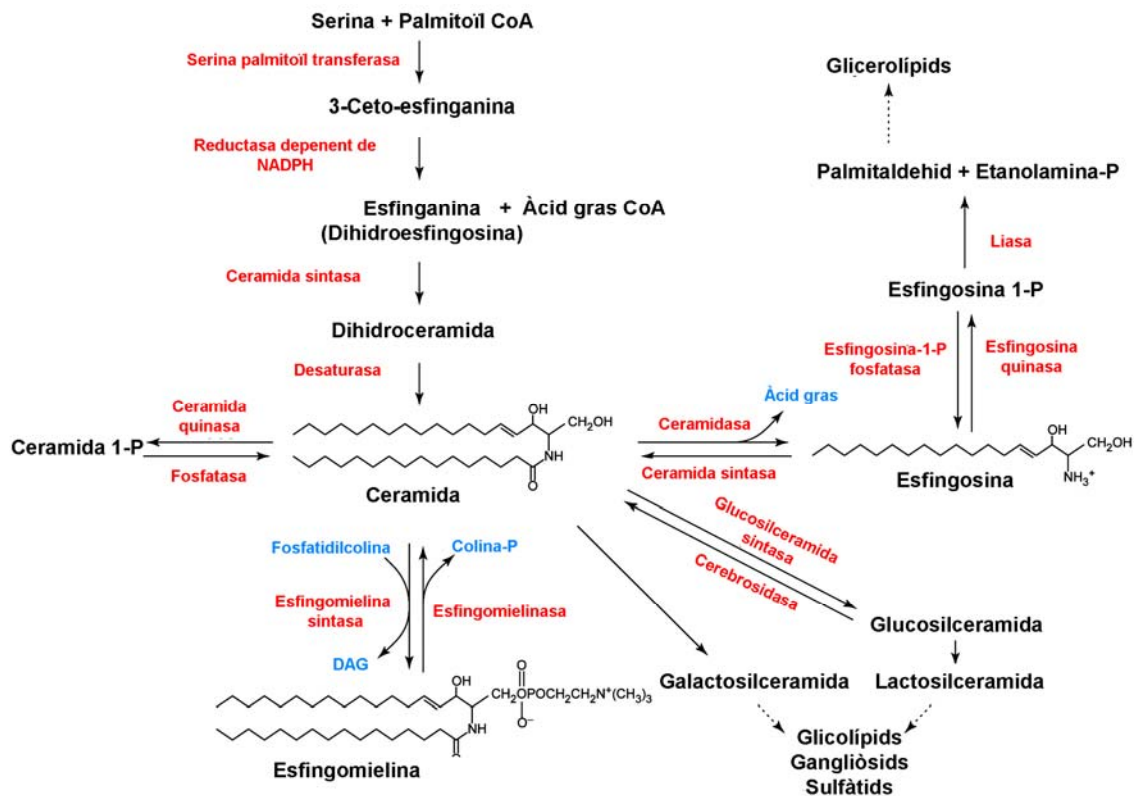


FIGURA 12 - Metabolisme dels esfingolípids. Ruta de síntesi dels diferents esfingolípids, així com les activitats enzimàtiques que catalitzen cada pas. Adaptada de Hannun i Luberto 2000 [65].

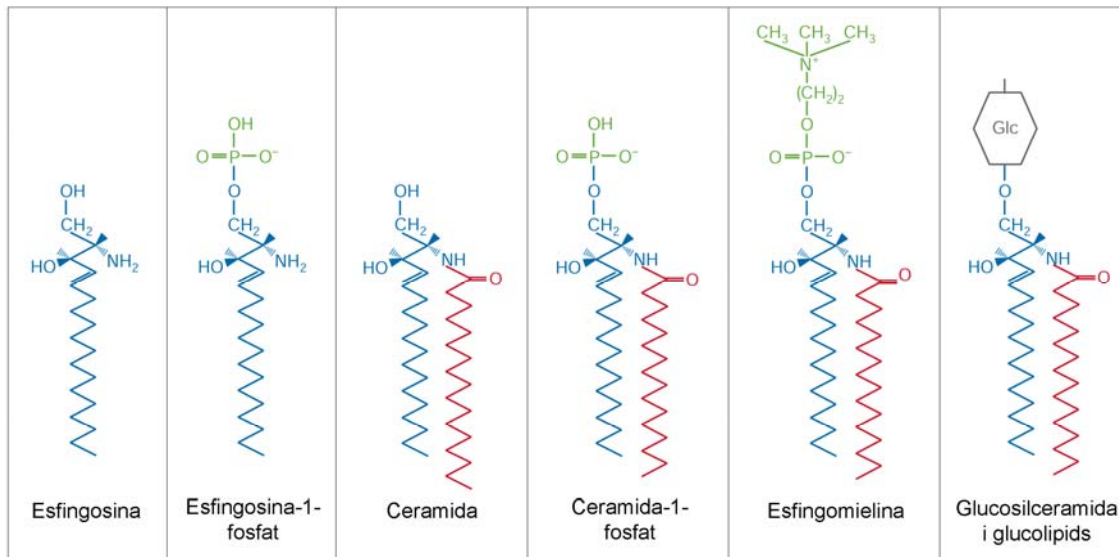


FIGURA 13 - Estructura dels principals esfingolípids. En blau, es mostra la base esfingoide; en vermell, l'àcid gras i en verd/negre, diferents residus units al primer carboni. Adaptada de Futerman i Hannun 2004 [66].

En els últims anys aquest metabolisme ha adquirit una importància molt gran, ja que estem davant d'un conjunt de reaccions que tenen lloc en diversos orgànuls cel·lulars i que estan finament regulades per múltiples processos interconnectats a diferents nivells, que inclouen la regulació de l'expressió dels enzims, modificacions postraduccionals i mecanismes alostèrics [66]. Endemés, moltes de les reaccions que es duen a terme són reversibles, fet que afavoreix que pugui haver-hi una ràpida interconversió dels

diferents intermediaris de les rutes metabòliques, molt important en el cas dels metabòlits amb funció biosenyalitzadora com, per exemple, la ceramida [67].

4.2 Principals esfingolípids

4.2.1 La ceramida

El metabolisme dels esfingolípids gira al voltant de la ceramida, un tipus de molècula formada per una base esfingoide i un àcid gras variable, en quant a longitud i número d'insaturacions, que ha acaparat nombrosos estudis en l'última dècada.

La ceramida (FIGURA 13) es sintetitza per diverses vies (FIGURA 14), la principal de les quals és la síntesi *de novo* a partir de la desaturació de la dihidroceramida a l'ER, i està induïda per respostes a l'estrès i apoptosi [68]. Una altra via és la hidròlisi de l'esfingomielina, gràcies a l'acció de les esfingomielinases en varis compartiments subcel·lulars, un cop han estat estimulades per respostes d'estrès oxidatiu [64, 68]. Recentment, s'han descrit noves vies de síntesi de ceramida. La primera és a partir del reciclatge de cadenes curtes de ceramida exògena que la ceramidasa convertirà en esfingosina, en canvi la segona és l'anomenada via de rescat i consisteix en la recuperació de la ceramida en els endosomes tardans i lisosomes mitjançant l'acció de les ceramidases, glucosidases i esfingomielinases. Aquesta última ruta de rescat situa a les ceramides com a reguladores de la senyalització cel·lular, de l'apoptosi i del tràfic cel·lular [68].

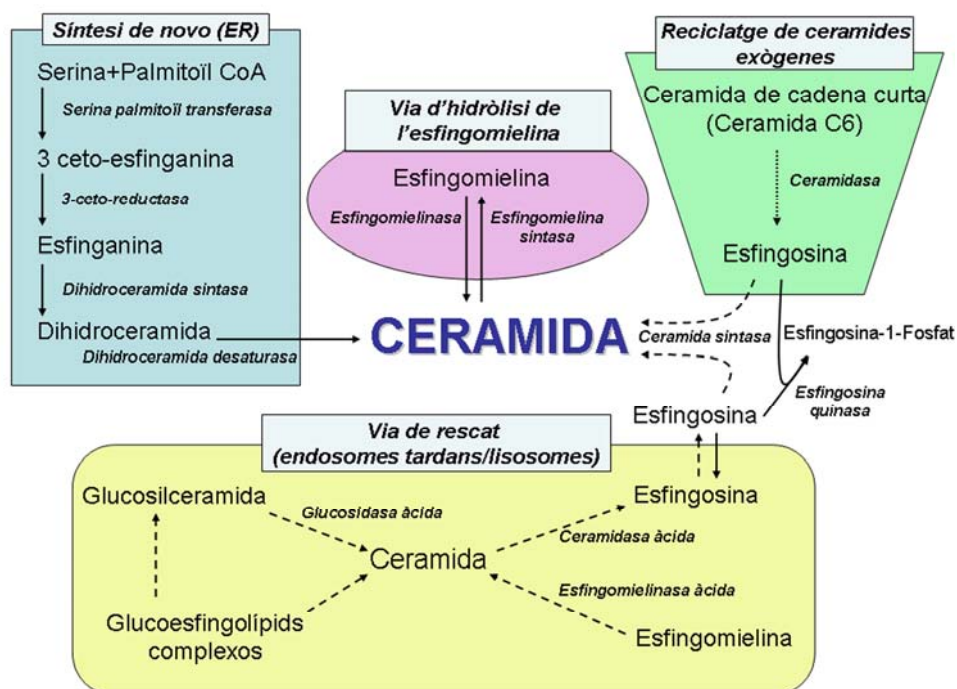


FIGURA 14 - Rutes de síntesi de ceramida. L'esquema mostra les vies metabòliques de síntesi a partir de la generació *de novo*, la ruta d'hidròlisi de l'esfingomielina, la via de reciclatge de ceramida exògena i la via de rescat. Les fletxes puntejades indiquen la ceramida resultant del reciclatge/rescat de l'esfingosina. Adaptada de Kitatani et al. 2008 [68].

La síntesi de la ceramida està molt ben regulada, i els augments de ceramida estan relacionats amb la inducció de l'apoptosi [69]. Per tant, hi ha una sèrie de mecanismes que coordinen la producció d'esfingolípid per mantenir, així, l'homeòstasi entre ells dins la cèl·lula [67]. Alguns d'aquests mecanismes consisteixen en transformar la ceramida en altres metabòlits, com l'esfingomielina, glucosilceramida o C1P.

L'enzim CERK és l'encarregat de convertir la ceramida en C1P, mitjançant l'addició d'un grup fosfat en el primer carboni [58, 70]. Per dur a terme aquest procés, la ceramida es transportada des de l'ER fins el Golgi en vesícules o per l'actuació de la proteïna transportadora de ceramida (CERT) [62]. El nou lípid que es forma amb aquesta modificació adquireix funcions contraposades a les que realitzava el seu precursor. Així doncs, la C1P és un mediador de la fagocitosi [55], està relacionada amb la inflamació mitjançant l'activació de la fosfolipasa A2 [71], estimula la síntesi de DNA [72] i bloqueja l'apoptosi afavorint la supervivència cel·lular entre d'altres [73]. En l'altre costat de la balança, trobaríem que la ceramida actua com un lípid bioactiu induint l'apoptosi, l'autofàgia, la detenció del cicle cel·lular i la diferenciació [64, 74], així com la regulació de les propietats i permeabilitat de les membranes [75]. També s'han suggerit una sèrie de rols relacionats amb càncer, diabetis, neurodegeneració, inflamació i susceptibilitat microbiana [76-78]. Endemés, en els últims anys, hi hagut diversos treballs que situen a la ceramida com a mediador en l'apoptosi dels fotoreceptors [79, 80].

4.2.2 L'esfingosina

L'esfingosina és el producte resultant de la pèrdua de l'àcid gras de la ceramida per l'activitat de les ceramidases. Tal i com passa en el cas de la ceramida, l'esfingosina també és un esfingolípid que es manté en un constant balanç amb la seva forma fosforilada, l'esfingosina-1-fosfat (S1P), i a la vegada amb les ceramides. Alteracions en la relació entre tots ells poden comportar un desequilibri en aquest "reòstat" que desencadenarà canvis en l'homeòstasi cel·lular i tissular [72]. L'esfingosina i la ceramida, i les seves formes fosforilades, actuen com a molècules biosenyralitzadores, activant o formant part de diverses vies de transducció de senyal. A més a més, en ambdós casos les funcions de les formes fosforilades i no fosforilades es contraposen [64, 81].

Diferents agents apoptòtics augmenten els nivells cel·lulars de l'esfingosina, provocant l'activació de diverses vies de transducció de senyal d'inducció d'apoptosi, que a vegades, difereixen d'aquelles rutes activades per la ceramida [82, 83]. L'S1P en canvi, regula múltiples processos indispensables per l'homeòstasi, incloent el creixement, proliferació, diferenciació, migració i supervivència cel·lular, així com la resposta immune [84-86].

L'S1P es forma per la fosforilació de l'esfingosina gràcies a dues quinases d'esfingosina (SPHK) que difereixen en les seves propietats catalítiques i cinètiques, la localització subcel·lular i l'expressió tissular. SPHK1 és més aviat citosòlica i els factors de creixement promouen la seva translocació a la membrana [87],

mentre que l'SPHK2 es transloca del citosol a l'ER o al nucli en condicions d'estrès [88, 89]. Ambdues quinases tenen funcions contraposades, de manera que l'S1P produïda per l'SPHK1 és anti-apoptòtica, mentre que la que prové de l'acció de l'SPHK2 és pro-apoptòtica, a més a més, si l'SPHK1 es transloca a reticle, també passa a tenir un efecte pro-apoptòtic [90]. Els models murins *knockout* han demostrat que aquestes dues quinases tenen una funció parcialment redundants, ja que els *knockouts* simples per l'*Sphk1* i l'*Sphk2* van mostrar unes molt lleugeres alteracions en els nivells d'S1P; en canvi, es va poder demostrar que les SPHKs són essencials i juguen un paper molt important en el desenvolupament, ja que el doble *knockout* és letal embrionari degut a la incompleta maduració del sistema vascular i del cervell [91].

4.2.3 L'esfingomielina

Les esfingomielines són el tipus d'esfingolípid més abundant en les membranes plasmàtiques de les cèl·lules animals, sobretot en el recobriment de mielina de les cèl·lules del teixit nerviós [57]. L'esfingomielina es sintetitza en el Golgi, a partir de la ceramida transportada per la CERT des de l'ER, per l'actuació de l'esfingomielina sintasa, que afegeix una fosfatidilcolina (PC). El paper d'aquesta sintasa és molt important, ja que ella sola regula els nivells de PC, diacilglicerol (DAG) i ceramida, tots ells relacionats amb efectes oposats sobre la proliferació i supervivència cel·lular. Endemés, també regula els nivells d'esfingomielina, molt importants de cara a l'estructura de la membrana [57]. Recentment, s'han suggerit papers en la transducció de senyal i interacció cel·lular [92, 93], així com en la inflamació [94].

4.2.4 Glucosilceramida, galactosilceramida i lactosilceramida

L'altre gran grup d'esfingolípid complexos és el format pels glucoesfingolípid. Aquests tenen una estructura bàsica que consta d'una ceramida ancorada a la membrana amb un o varis monosacàrids en la cara exterior d'aquesta. El grup polar permet subdividir-los en dos tipus, segons el número de sucres que porten units. D'una banda, estarien els més simples, els grups polars, els quals estarien formats per una glucosa, una galactosa i una lactosa, i d'altra, tindriem els gangliòsids, un ampli grup de glucolípid on el grup polar està format per diverses unitats carbohidratades [66]. També es classifiquen en àcids (gangliòsids) i neutres (cerebròsids), depenent de si porten un o mes monosacàrids sense càrrega -glucosa, galactosa, cerebròsids o globòsid- (neutres) i amb un polisacàrid complex en el que un o més residus són d'àcid siàlic (àcids).

La glucosilceramida (GlcCer) és la precursora de la majoria de glucolípid, entre ells la lactosilceramida (LacCer) i els més complexos. Es sintetitza en el *cis*-Golgi a partir de la ceramida transportada per la CERT o vesícules, gràcies a l'actuació de la glucosilceramida sintasa (GCS). Diferents estudis suggereixen que la GlcCer es reconeguda per la proteïna de transport FAPP2, mitjançant la qual seria transportada cap al *trans*-Golgi [95], i també, mitjançant una flipasa -que alguns autors hipotetitzen que podria ser també FAPP2 [72]-, entraria al lumen del *trans*-Golgi a sintetitzar altres glucolípid com la LacCer [96]. La GlcCer és essencial pel desenvolupament dels mamífers, ja que models animals deficients

per la GCS moren durant la primera setmana embrionària [97]. Estudis en *knockouts* condicionals específics de teixits han mostrat diferents fenotips, essent el més greu els defectes en el teixit nerviós, que causen la mort prematura dels ratolins entre el dia 11 i 24 postnatal, la qual cosa suggereix que els glucoesfingolípids són imprescindibles en la maduració del cervell així com per la funció neuronal [97]. Alguns dels papers que se li atribueixen és el manteniment de la membrana, així com ser un constituent dels *rafts* lipídics degut a la seva afinitat pel colesterol [96].

La galactosilceramida (GalCer) és el glucolípid més abundant al teixit nerviós i es troba principalment en la mielina, especialment durant la formació de la matèria blanca del cervell [98], a més a més, és la precursora dels sulfàtids. Està formada per una ceramida amb una galactosa que afegeix la galactosiltransferasa en el primer carboni en una reacció que té lloc en el lumen de l'ER. El *knockout* per l'enzim mostrava problemes motors causats per la pèrdua de conducció dels nervis, també infertilitat masculina i mort prematura [99]. Les cerebrosidases són les encarregades de revertir tant la GalCer com la GlcCer, cap a ceramida un altre cop. Ambdós glucoesfingolípids estan considerats com a protectors de l'apoptosi [100].

4.2.5 Gangliòsids

Els gangliòsids són ceramides unides a oligosacàrids i es sintetitzen majoritàriament a partir de la GlcCer. Presenten una variabilitat tant en la part hidrofòbica (la longitud de les ceramides) com en la part hidrofílica (combinació i número de monosacàrids units al primer carboni). Els gangliòsids es troben en la cara externa de la membrana plasmàtica, especialment de les neurones, i sobretot, en les terminacions pre- i postsinàptiques [101]. Gràcies a la presència de les cadenes d'oligosacàrids, altament hidrofíliques, estan en contacte amb l'espai extracel·lular, permetent la interacció amb altres molècules, incloent-hi toxines, components de la matriu, molècules d'adhesió, receptors i enzims específics de la superfície de les cèl·lules adjacents. A la vegada, poden modular les funcions biològiques interaccionant amb proteïnes de la mateixa membrana [102, 103]. Tot sembla indicar que els gangliòsids formen part dels dominis de membrana i de les caveoles, on regulen el receptor de la insulina, que està directament unit de manera específica a un dels tipus de gangliòsids –GM3- [104]. Durant la dècada passada diferents estudis van determinar que els gangliòsids són neuroprotectors en condicions d'estrès oxidatiu i podrien, en un futur, utilitzar-se com a teràpia protectora a la retina [105-107].

4.3 Els esfingolípids de la retina

Tot i que durant les últimes dècades, el coneixement sobre els esfingolípids ha crescut extraordinàriament i ha permès entendre la relació entre ells, i com d'importants són per la cèl·lula, encara queda molt per estudiar. Aquest és el cas de la retina, que malgrat el gran interès que estan suscitant els esfingolípids en el món científic, poc es coneix sobre la seva composició a la retina.

La primera evidència del paper dels esfingolípidis a la retina ve donada pels augments de ceramida durant la degeneració dels fotoreceptors. Diferents estudis han demostrat que durant la mort d'aquestes neurones, tant *in vivo* com *in vitro*, hi ha un augment en els nivells de ceramida que activen l'apoptosi [77-79]. D'altra banda, també s'ha demostrat que davant condicions d'estrès, es genera ceramida per la ruta de síntesi *de novo* i s'activa també l'apoptosi [80, 108]. La inhibició de la biosíntesi de la ceramida manté l'estructura i la funció en models animals d'RP [109]. Sobre la funció de l'esfingosina a la retina es sap més aviat poc, no obstant, publicacions recents suggereixen un paper similar al de la ceramida [110]. En quant a l'S1P, s'ha observat que té efectes beneficiosos per l'ull ja que, provoca proliferació, transformació de mioblasts, producció de col·lagen i expressió de proteïnes fibroses [111], també protegeix les cèl·lules de l'RPE de l'apoptosi induïda per la ceramida [112] i actua com a mitogen en cèl·lules precursoras de fotoreceptors en cultiu [113]. A part de mediar en l'apoptosi, els esfingolípidis són essencials per mantenir l'estructura dels fotoreceptors [114]. Altres lípids, com l'àcid docosahexaenoic (DHA), protegeixen els fotoreceptors de l'apoptosi en cultiu i sota condicions d'estrès oxidatiu. El DHA consisteix en un àcid gras de 22 carbonis poli-insaturat (22:4), molt abundant a la retina, especialment en els fotoreceptors [79].

La composició esfingolipídica de la retina encara és bastant desconeguda. Els estudis més recents realitzats en retines de vaca i rata apunten a que els gangliòsids i l'esfingomielina són els dos esfingolípidis majoritaris, seguits de les ceramides. També han observat que l'àcid gras que tenen aquests esfingolípidis acostuma a ser un àcid gras saturat de 18 carbonis, seguit del de 16. Entre els àcids grassos insaturats units a la base esfingoide, el DHA és el més abundant [93].

4.4 Esfingolípidis i mort cel·lular

Sovint els teixits es veuen sotmesos a certs factors d'estrès. El cas més conegut és l'estrès oxidatiu, procés pel qual s'incrementa dins la cèl·lula el potencial reductor, i es produeixen espècies reactives d'oxigen (ROS), radicals lliures i peròxids. Si no es troba un mecanisme per eliminar aquests productes, la cèl·lula entra en apoptosi, o si l'estrès és intens, la cèl·lula mor directament per necrosi. En aquest context, un dels teixits que més pateix l'estrès oxidatiu és la retina. Això es deu a que la llum incideix sobre la retina i activa una sèrie de mecanismes que duen a terme la fototransducció, però la incidència constant de llum, a vegades molt intensa, manté aquest teixit en un estrès continu que genera radicals lliures. Aquest efecte juntament amb la pol·lució, i l'elevada taxa metabòlica dels fotoreceptors perjudiquen a aquestes cèl·lules, que tot i ser molt estables, són a la vegada summament fràgils [115].

Els esfingolípidis, directa o indirectament, juguen un paper en la mort cel·lular com ja hem vist anteriorment. Es consideren tres tipus de mort cel·lular: l'apoptosi (també anomenada mort cel·lular programada (*Programmed Cell Death* (PCD), de tipus I), l'autofàgia (PCD II) i la necrosi (PCD III) [116]. L'apoptosi és un procés dependent d'energia que s'indueix per estímuls fisiològics o patològics que inclouen l'activació d'efectors, com ara les caspases o les calpaines, que indueixen a la fragmentació del

DNA nucleosomal i posterior mort cel·lular. És una estratègia fisiològica que opera, bé per la via extrínseca mitjançant l'activació de receptors de membrana, o bé intrínseca, per l'alliberació intracel·lular de diferents factors [117], i té com a finalitat, eliminar les cèl·lules danyades, prevenint la resposta immune a causa de l'alliberació dels components intracel·lulars a l'exterior [118, 119]. La necrosi és el procés pel qual les cèl·lules s'inflen i es lisen, alliberant tots els seus components intracel·lulars als teixits adjacents, provocant una resposta inflamatòria [119, 120]. L'autofàgia és la via principal de degradació de proteïnes de vida llarga i dels orgànuls citoplasmàtics en les cèl·lules animals, implica la reorganització de les membranes subcel·lulars per tal d'embolcallar els components a degradar, formant l'anomenat autofagosoma, que es fusiona amb lisosomes per tal de degradar-se i, posteriorment, reciclar el seu contingut. Aquest procés s'estimula davant de canvis en les condicions ambientals o en absència de nutrients, entre d'altres. Sembla ser que l'autofàgia serviria com a resposta primària contra l'estrès i, que en cas de perdurar, desembocaria en apoptosi [116]. A més a més, és un mecanisme que juga un paper important en la regulació de l'envelliment i en la renovació de les membranes dels fotoreceptors, fet que afavoreix l'adaptació a l'increment d'il·luminació [121, 122].

4.5 Distròfies de retina causades per disfuncions en el metabolisme dels lípids

Fins el moment, cap esfingolípid ni enzim de qualsevol de les rutes de síntesi/degradació ha estat directament relacionat com a causant d'alguna distròfia de retina, a excepció de CERKL, de la que encara no es sap la seva funció ni quin paper juga dins d'aquest metabolisme. En canvi, si s'han pogut identificar altres gens causals relacionats d'alguna manera amb altres famílies de lípids.

4.5.1 Síndromes causades per defectes en el metabolisme dels esfingolípid

S'han descrit diferents malalties neurodegeneratives, les causes de les quals són deficiències en alguns enzims del metabolisme dels esfingolípid. Com hem mencionat anteriorment, cap d'elles causa únicament i com a símptoma principal degeneració retinal, més aviat és una associació que es pot donar en alguns pacients degut a la mort neuronal de les cèl·lules de la retina [63, 93]. La majoria d'aquestes síndromes estan classificades com a malalties lisosomals i a continuació, hi ha una breu descripció d'algunes esfingolipidosis, aquelles malalties causades per deficiències en enzims que intervenen en el metabolisme dels esfingolípid.

1. **Malaltia de Gaucher:** És una malaltia autosòmica recessiva causada per la deficiència en l'enzim glucocerebrosidasa, fet que provoca un cúmul de GlcCer (OMIM 230800). Existeixen 3 tipus diferents (I, II i III) i alguns dels símptomes principals son hepatomegàlia i esplenomegàlia, lesions òssies, destrucció prematura de les cèl·lules sanguínies generant anèmia, neutropènia, etc. Alguns subtipus provoquen retardament mental, convulsions, demència, problemes oculars, osteoporosi i una coloració marronenca de la pell, entre d'altres trets fenotípics.

2. **Malaltia de Niemann-Pick:** És una malaltia hereditària autosòmica recessiva causada per mutacions en l'esfingomielinasa àcida, fet que provoca l'acúmul d'esfingomielina i colesterol en les cèl·lules del fetge i la melsa (OMIM 257200). S'han descrit 3 tipus diferents (A, B, C) i un subtipus de la última variant (D), en base a la seva severitat. La malaltia cursa per un progressiu deteriorament de les funcions vitals, com ara la pèrdua de la capacitat comunicativa, per caminar, dificultat per empassar el menjar, insuficiència respiratòria, etc.
3. **Malaltia de Farber:** Un dèficit en l'activitat ceramidasa àcida és el responsable de causar aquesta malaltia autosòmica recessiva (OMIM 228000). És una patologia molt rara que acostuma a aparèixer en les primeres setmanes de vida. Els diferents símptomes són: retard mental, nòduls subcutanis, artritis, problemes respiratoris i afectació a fetge, cor i ronyó.
4. **Malaltia de Krabbe:** Mutacions en la galactocerebrosidasa, provoquen cúmuls de GalCer que dificulten la formació del recobriment de mielina dels nervis, afectant principalment al sistema nerviós. Els primers símptomes són irritabilitat, febres i un retard del desenvolupament mental i motor. És una malaltia autosòmica recessiva molt rara (OMIM 245200).
5. **Síndrome de Fabry:** Deficiències en l'alfa-galactosidasa, gen que codifica per una proteïna que hidrolitza els sucres dels glucolípid, causen aquesta síndrome d'herència recessiva lligada al cromosoma X (OMIM 301500). Els símptomes són: episodis de dolor, insuficiència renal, angioceratomes (punts vermells en la pell), problemes cardíacs, neuropaties, etc.
6. **Altres:** Malaltia de Sandhoff (cúmul de gangliòsid GM1, OMIM 230600), malaltia de Tay-Sachs (Cúmul de gangliòsid GM2, OMIM 272800).

4.5.2 Distròfies de retina per deficiències en el metabolisme dels lípids

Actualment, hi ha varies distròfies retinals causades per gens relacionats amb els lípids.

1. **Malaltia d'Stargardt de tipus 3 (STGD3):** L'STGD3 és un tipus de malaltia rara de degeneració macular d'Stargardt. Segueix un patró d'herència autosòmic dominant i la causa és una deleció de 5 pb en el gen *ELOVL4* [123]. Aquest gen codifica per una proteïna implicada en l'elongació dels àcids grassos de cadena llarga (> 26 carbonis) [124]. Aquesta distròfia cursa amb degeneració macular durant la primera-segona dècada de vida, tot i que la visió perifèrica es manté al llarg de la vida, i eventualment, pot desembocar en ceguera total [124].
2. **Malaltia d'Stargardt de tipus 1 (STGD1):** És una distròfia macular molt semblant a l'STGD3 amb la diferència que és una malaltia autosòmica recessiva. Està causada majoritàriament per mutacions en el gen *ABCA4*. S'ha descrit que *ABCA4* és una proteïna transmembrana que actua com a transportador de lípids [125]. S'encarrega de translocar,

mitjançant l'ús d'ATP, l'N-retinilidè-fosfatidiletanolamina (tot-*trans*-retinal), un dels intermediaris del cicle visual, de la cara interna de la membrana dels discos a la cara citosòlica, on serà hidrolitzat per una deshidrogenasa a tot-*trans*-retinol.

- 3. Amaurosi Congènita de Leber (LCA):** Aquesta malaltia és molt semblant a l'RP però molt més primerenca i severa. Està causada per diversos gens amb patrons d'herència autosòmica dominant i recessiva. L'*RDH12* és un dels gens causals d'LCA i d'RP [126]. En condicions d'estrès oxidatiu es forma el 4-hidroxinonenal (4-HNE), un producte citotòxic resultant de la peroxidació dels lípids poli-insaturats de membrana i que es pot unir a les proteïnes. Els *knockout* per *Rdh12*, així com estudis *in vitro* utilitzant cDNAs humans sans i amb mutacions, suggereixen que la funció de la retinol deshidrogenasa (*RDH12*) consistiria en detoxificar el 4-HNE en els fotoreceptors afavorint la supervivència cel·lular, ja que la falta de la proteïna genera adductes 4-HNE-proteïna causant mort cel·lular [127]. Un altre gen implicat en la via del retinol es la lecitina retinol transferasa (*LRAT*), que s'encarrega d'esterificar el producte tot-*trans*-retinol a tot-*trans*-retinil durant la fototransducció, essent una reacció essencial del cicle visual [128]. S'han descrit mutacions causants d'arRP i arLCA en aquest gen.

5. MODELS ANIMALS EN L'ESTUDI DE L'RP

Les distròfies de retina, entre elles l'RP, han estat descrites també en altres animals, on la patologia ha aparegut de manera natural. D'altra banda, els avenços científics, ens han permès manipular genèticament alguns animals per reproduir les patologies humanes, el que fa que siguin especialment interessants per poder estudiar el desenvolupament i progressió de les malalties i establir algunes estratègies terapèutiques [129].

Existeixen diversos animals model, entre d'altres micos, gossos, rates i el més emprat de tots, el ratolí, tot i que en els darrers anys el peix zebra ha esdevingut un model molt útil per la facilitat de generar *knockdowns* mitjançant l'ús de morfollinos. No obstant, els ratolins ofereixen una sèrie d'avantatges sobre la resta. Són fàcils de manipular, poden ser estudiats en grups nombrosos i la seva curta longevitat, en el camp de les distròfies retinals, permet fer el seguiment de la neurodegeneració, fins i tot observar patologies que, en humans, cursen en les últimes dècades de vida. A més a més, les interaccions entre cons-bastons i l'RPE estan conservades amb la nostra espècie. Hi ha una àmplia varietat de soques amb degeneració retinal hereditària i la manipulació genètica és fàcilment reproducible i ben establerta en la literatura. Per últim i no menys important, molts dels gens murins tenen el seu equivalent en humans [130]. No obstant, no cal oblidar que aquest són models que presenten diferències substancials a nivell genètic i fisiològic amb els humans. Tots els experiments cal que estiguin aprovats per un comitè ètic, que han de mirar d'afavorir sempre el benestar animal, fent ús de les tres Rs (Reemplaçament, Reducció i Refinament) [131].

5.1 Estudis de retina

Per dur a terme els estudis de les degeneracions retinals en ratolins, es fan servir una sèrie de tècniques que ens permeten analitzar amb detall la retina. A continuació, hi ha una explicació breu de les tècniques que són més útils per aquests estudis: la histologia bàsica, la immunohistoquímica i els electroretinogrames.

La histologia és la manera més fàcil per poder comparar l'estructura entre un animal sa i un amb degeneració retinal. Aquesta tècnica consisteix en fer fins talls del teixit per després aplicar sobre aquests diverses tècniques. La més senzilla és una tinció hematoxilina-eosina, en la que els nuclis queden marcats en blau gràcies a l'hematoxilina, i la resta de teixit es tenyit de rosa per l'eosina [132]. D'altra banda, es poden realitzar immunohistoquímiques fluorescents, on mitjançant l'ús d'un anticòs, es reconeix l'antigen, normalment proteïnes, per determinar la seva localització en la retina [133].

Els electroretinogrames (ERGs) ens permeten estudiar la funció de la retina, i és una de les tècniques que s'utilitza sovint pel diagnòstic de malalties de retina en humans. Els ERGs consisteixen en la mesura de corrents elèctriques que són generades en resposta a un estímul lumínic. De manera molt resumida, amb aquesta tècnica es pot examinar el comportament de diversos tipus cel·lulars de la retina (FIGURA 15). En primer lloc, ha d'haver-hi una adaptació a la foscor, necessària per poder examinar la resposta dels bastons (resposta escotòpica), que permet avaluar la funcionalitat d'aquests fotoreceptors. Els ERGs també permeten veure la resposta màxima (resposta mixta), que és la utilitzada per estudiar el comportament de bastons i cons, per separat, i ambdós alhora. Els potencials oscil·latoris (PO), en canvi, ens permeten observar la funcionalitat de les cèl·lules amacrines i ganglionars. Finalment, s'adapta a la claror a l'individu per tal d'obtenir la resposta dels cons i la capacitat integradora d'estímuls freqüents (*Flicker*) [134].

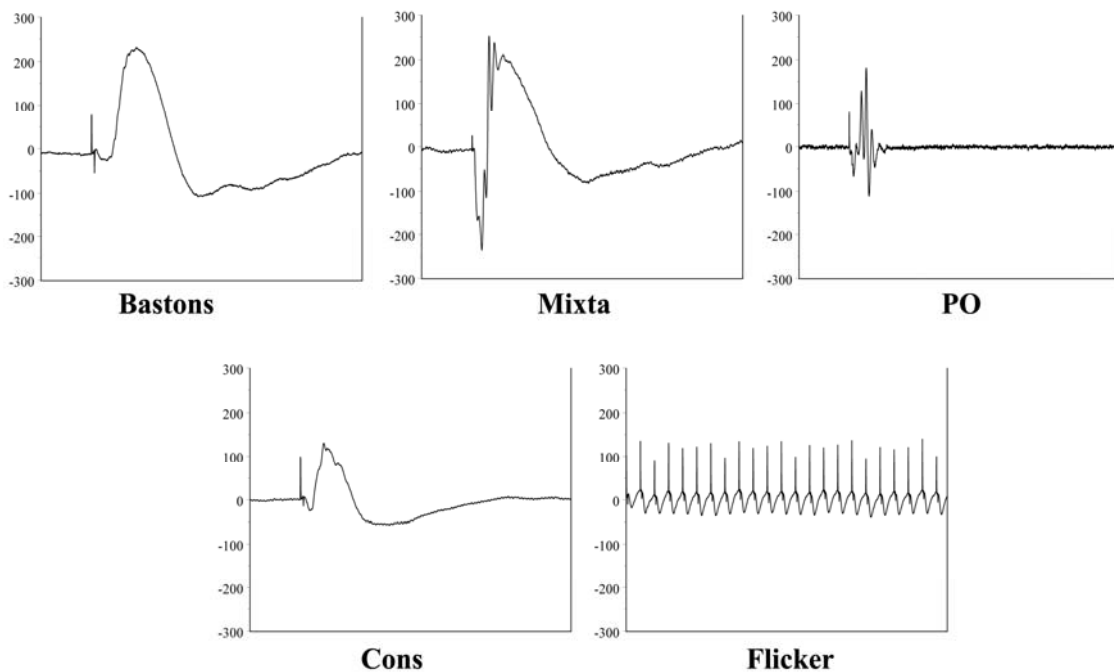


FIGURA 15 - Representació dels diferents tipus de registres obtinguts en un ERG.

5.2 Models animals murins naturals

S'han identificat diferents soques mutants de vertebrats que presenten degeneració de la retina. D'aquesta manera, l'RP ha pogut ser estudiada en ratolins, gossos, pollastres, gats, rates, porcs, etc. A la Taula 4 es presenta un llistat d'alguns dels models murins més emprats per l'estudi de l'RP i altres distròfies de retina [135-138].

Models murins de degeneració retinal (<i>rd</i>)			
Soca	Gen	Mutació, herència	Fenotip
<i>rd1</i>	<i>Pde6b</i>	Y347X, AR	Degeneració severa de bastons i cons que comença a partir de P10 [139].
<i>rd2</i>	<i>Rds</i>	Inserció de 9,2 kb, AD	Degeneració lenta de bastons i cons a partir de les 3 setmanes. L'ONL desapareix gairebé del tot als 12 mesos [140].
<i>rd3</i>	<i>Rd3</i>	R107X, AR	Degeneració retinal a partir de la tercera setmana. S'assembla a l'amaurosi congènita de Leber (LCA) [141].
<i>rd4</i>	<i>Gnb1</i>	Inversió del cr. 4, AD	Letal en homozigosi, ONL disminuïda als 10 dies, pèrdua completa a les 6 setmanes [142].
<i>rd6</i>	<i>Mfrp</i>	Deleció exó 4, AR	Degeneració progressiva de la retina amb formació de petits dipòsits blancs [143].
<i>rd7</i>	<i>Nr2e3</i>	Deleció de 380 pb (exó 4 i 5), AR	Degeneració lenta i progressiva de retina. Producció anormal de cons [144].
<i>rd8</i>	<i>Crb1</i>	Deleció d'1 base, AR	Degeneració lenta i progressiva de la retina amb ERGs estables durant un any [145].
<i>rd10</i>	<i>Pde6b</i>	R560C, AR	A les 3 setmanes es detecta degeneració de retina per histologia, els bastons a P35 ja han mort, els cons ho fan a continuació. Als 2 mesos, els ERGs no són mesurables [137].
<i>rd11</i>	<i>Lpcat1</i>	Inserció d'1 nucleòtid, AR	No hi ha gairebé resposta dels bastons en ERGs a les 4 setmanes. La resposta als cons comença a disminuir entre les 4-6 setmanes. A partir de P21, s'accelera la degeneració [146].
<i>rd12</i>	<i>Rpe65</i>	R44X, AR	Canvis estructurals a les 3 setmanes. Amb l'edat, augmenta la degeneració de la retina. ERGs atenuats [147].
<i>rd16</i>	<i>Cep290</i>	Deleció exons 35-39, AR	ERGs mostren una gran deterioració a P18. A P28 ja no hi ha resposta. S'ha observat degeneració de l'OS i aprimament de l'ONL [148].

TAULA 4 - Mutants naturals de degeneració retinal. Alguns dels gens també s'han identificat com a causants de degeneracions de retina a humans (marcats en blau). AD: autosòmica dominant; AR: autosòmica recessiva.

5.2.1 *Rd1* i *rd10*

Dos dels models murins més estudiats són l'*rd1* i l'*rd10*. Les subunitats alfa i beta (PDE6A i PDE6B) de la fosfodiesterasa dels bastons (PDE6) tenen una estructura molt similar [149]. La funció PDE és crítica per la transducció del senyal lumínic. En humans, mutacions en aquest gens causen arRP. S'han descrit dos models naturals de degeneració de fotoreceptors per mutacions en el gen *Pde6b*. Tots dos presenten una progressió de la neurodegeneració molt semblant a l'RP, primer moren els bastons i, seguidament, els cons. No obstant, és important recordar que, a diferència dels humans, els ratolins són animals nocturns, que no disposen de fòvea i, per tant, els cons estan repartits homogèniament per tota la retina, els quals representen un total del 3-5% dels fotoreceptors de la retina. Endemés, els rosegadors només posseeixen cons S i M (que responen a llum blava i verda, respectivament) [138].

Els ratolins *rd1* es van descriure l'any 1924 per Clyde Keeler. Aquesta soca presentava individus sense bastons i aquest fenotip s'heretava de manera recessiva [150]. Durant la Segona Guerra Mundial, es va donar per perdut aquest model, però en els anys 50, un ratolí amb un fenotip semblant va aparèixer a Suïssa [151]. Estudis genètics posteriors van demostrar que ambdós ratolins eren portadors de la mateixa mutació (p.Y347X) en el gen *Pde6b* [152]. Fenotípicament, els ratolins *rd1* tenen dificultats a l'hora d'elaborar els segments externs dels fotoreceptors i presenten una ràpida degeneració d'aquests a P12, quan obren els ulls. A P17, el 98% dels bastons han desaparegut encara que els cons encara estan presents, i als 18 mesos encara resten un 1,5% de cons vius [153].

El mutant *rd10* [137] està causat per una mutació (R560C) en el gen *Pde6b* [154]. A diferència de l'*rd1*, aquest ratolí degenera més lentament, tot i que a P30-35 han desaparegut gairebé tots els bastons.

Els cons també moren més tard. Endemés, hi ha estudis que han mostrat que la mort dels fotoreceptors va acompanyada d'una retracció de les dendrites de les cèl·lules bipolars i amacrines [155], que quadraria amb la remodelació de la retina observada en els models de degeneració [156].

5.2.2 Rd11

En aquesta memòria, cal fer menció especial del mutant *rd11*, atès que el gen mutat, identificat recentment, forma part de la via de síntesi dels fosfolípids. Aquest model es va descriure l'any 2005 durant un escrutini de diferents models murins amb problemes de retina d'origen natural realitzat al *The Jackson Laboratory* [157]. En aquest escrutini es va trobar un model, que un cop examinat el fons de l'ull va mostrar un aprimament de les venes a partir de P36, degeneració retinal totalment òbvia a P113. En quant als ERGs, no presenten gairebé resposta als bastons a partir de la setmana 4 i a partir d'aquesta setmana, la resposta dels cons comença a disminuir significativament. A nivell histològic, els fotoreceptors es desenvolupen correctament, i fins P21, no es detecten diferències. En canvi, a partir d'aquest dia comença una degeneració ràpida que a P31 acaba disminuint les rengleres de nuclis de l'ONL a 4 o 5, i a una sola a P47 (FIGURA 16). Un estudi de lligament va portar a trobar el gen i la mutació causal. Es tracta d'una deleció de 7 nucleòtids en l'exó 1 (c14-20delGCCGCGG) en el gen *Lpcat1*. La proteïna codificada per aquest gen és un enzim implicat en la biosíntesi i remodelació dels fosfolípids que facilita la conversió de la palmitoïl-lisofosfatidilcolina a dipalmitoïl-fosfatidilcolina [146].

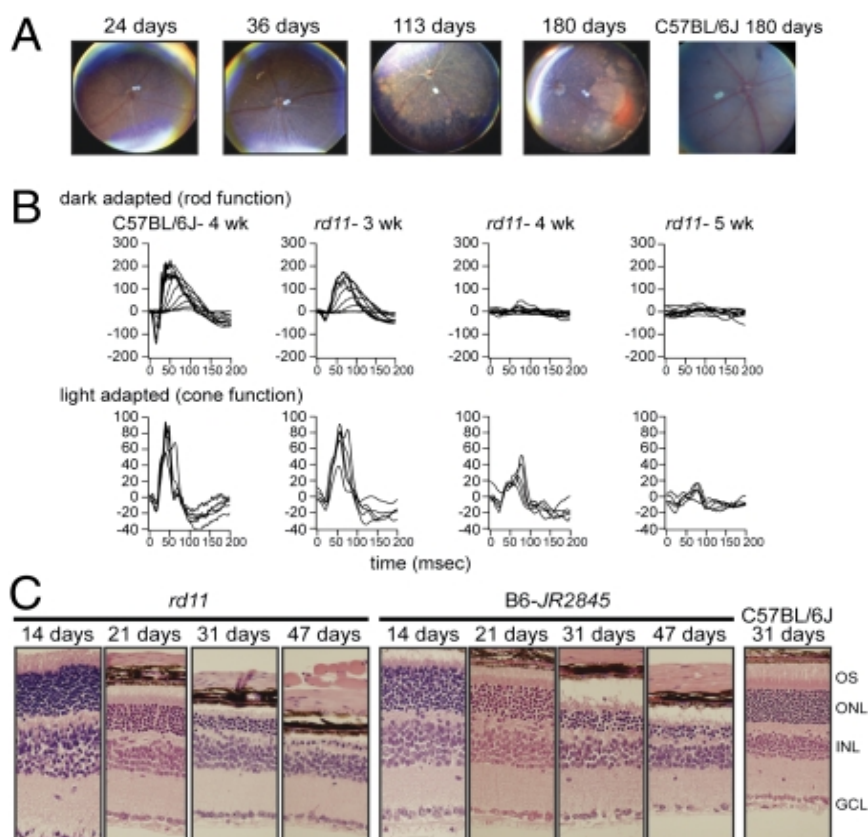


FIGURA 16 - Degeneració de la retina en ratolins *rd11*. Imatge del fons de l'ull a P24, P36, P113 i P180 (A), Resposta electroretinogràfica dels bastons i cons a les 3, 4 i 5 setmanes d'edat (B). Tinció Hematoxilina-Eosina on es mostra la pèrdua de rengleres en les capes nuclears (C). Adaptada de Friedman et al. 2010 [146].

5.3 Models animals manipulats genèticament: Transgènics i mutants induïts

Les tècniques d'enginyeria genètica, han revolucionat el camp de la recerca, atès que es poden generar models que no existeixen de manera natural, mitjançant la modificació genètica dels organismes, i per tant, facilitant l'obtenció de transgènics, *knockouts*, *knockouts* condicionals, *knockins*, etc. La tècnica més utilitzada per generar un *knockout* (KO) consisteix en la disrupció del gen, amb la qual cosa s'elimina tot el producte gènic i es pot observar el fenotip resultant. Tot i així, cal tenir en compte que si el gen disrupcionat juga un paper important en el desenvolupament, el KO no arribarà a néixer mai. Aquest és el motiu que ha portat a molts investigadors a generar KO-condicionals o específics de teixit, de manera que només s'elimina el gen en un teixit o òrgan concret, en comptes de fer-ho en tot l'organisme.

D'altra banda, sovint es volen mirar els efectes de mutacions concretes que s'han trobat en humans i es vol estudiar què passa en el ratolí. La introducció d'aquests canvis generen el que coneixem com a *knockin* (KI). També existeixen mètodes de mutagènesi no dirigida que són aleatoris, un exemple és la inducció de mutacions mitjançant l'ús d'*N*-etil-nitrosurea (ENU) o *N*-metil-nitrosurea (MNU) [158], però aquest tipus de model modificat genèticament per mutació a l'atzar, no es pot considerar un animal transgènic. A la TAULA 5 es presenten transgènics pels gens RP i algun mutant induït, però només ens centrarem a explicar-ne alguns, donada la seva rellevància per aquesta Tesi, mencionant models molt severs i sense afectació.

Transgènics i mutants induïts murins pels gens RP		
Gen	Transgènic	Fenotip
<i>Abca4</i>	KO	Disrupció del gen <i>Abcr</i> , que provoca retard en l'adaptació a la foscor i nivells augmentats de tot- <i>trans</i> -retinaldehid. Després de l'exposició a la llum, es troben nivells alts de PE en l'OS. Acumulació d'A2E i lipofuscina [159].
<i>Best1</i>	KI	Es va introduir el transgen amb el promotor de <i>BEST1</i> per dirigir l'expressió de Cre. Cap fenotip aparent. L'expressió de Cre es limita a l'RPE [160].
<i>Ca4</i>	KO	Ratolí viable, disminució del número de femelles. La supervivència de les femelles és menor a 10 mesos en el doble KO per <i>Ca4/Ca14</i> [161].
<i>Cerkl</i>	KO	Cap fenotip aparent [162].
<i>Cngb1</i>	KO	Mort progressiva per apoptosi dels bastons, els cons queden intactes i comencen a degenerar a partir dels 6 mesos. ERGs sense resposta per bastons [163].
<i>Crx</i>	KO	Els homozigots presenten fotoreceptors sense OS. No hi ha resposta de cons i bastons en ERG [164].
<i>Fscn2</i>	KI	Introducció de la mutació puntual 208delG en una soca, i en una altra reemplaçament de l'exó 1 per la GFP. En ambdós casos, provoca que els heterozigots presentin degeneració de retina deguts a problemes en el manteniment/elongació dels OS [165].
<i>Gucal1b</i>	KO	A nivell estructural, als 7 mesos les retines continuen essent normals. Es van trobar que els bastons eren més sensibles als flashs de llum i a la vegada, trigaven en recuperar-se respecte al WT [166].
<i>Impdh</i>	KO	Degeneració lenta i progressiva. En els ERGs, problemes de manera gradual, tot i que als 12 mesos, molts fotoreceptors continuaven intactes [167].
<i>Lrat</i>	KO	Davallada en el número de cons. Doble KO <i>Gnat1/Lrat</i> no té resposta pels cons en ERG [168].
<i>Mertk</i>	KO	Degeneració de fotoreceptors ràpida, resposta escotòpica baixa en ERGs [169].
<i>Nrl</i>	KO	<i>NRL</i> ^{-/-} té una pèrdua completa de la funció dels bastons, en canvi una funció de cons normal. Estudis moleculars van demostrar que els bastons s'havien convertit en cons [170].
<i>Pde6a</i>	induit amb ENU	Diferències significatives a nivell bioquímic i de degeneració, tot i que amb molta variabilitat que podria dependre del fons genètic [171].
<i>Pde6g</i>	KO	Disrupció del gen introduint el cassette de resistència a neomicina en l'exó 3. Els homozigots presentaven una degeneració ràpida i el dímer PDE-alfa/beta es formava, però no tenia activitat catalítica [172].
	KI	Introduint el canvi W70A, apareix un fenotip de nictalopia estacionària [173].

Transgènics i mutants induïts murins pels gens RP		
Gen	Transgènic	Fenotip
<i>Prpf3</i>	KI	T494M va ser la mutació introduïda. A l'edat de 2 anys, l'heterozigot mostrava un RPE alterat i cúmuls de depòsits amorfs entre l'RPE i la membrana de Bruch. En els homozigots els canvis eren més severos i començaven abans. Disminució en la funció dels bastons [174].
	KO	<i>Prpf3</i> ^{-/-} no sobreviu més enllà del dia 14 postfecundació. Heterozigot no mostra degeneració dels fotoreceptors [175].
<i>Prpf8</i>	KI	Es va introduir la mutació H2309P. A l'edat de 2 anys l'heterozigot mostrava un RPE alterat i cúmuls de depòsits amorfs entre l'RPE i la membrana de Bruch. En els homozigots els canvis eren més severos i començaven abans [174].
<i>Prpf31</i>	KI	Introducció de la mutació A216P no va mostrar degeneracions en l'examinació del fons de l'ull. L'homozigot és letal embrionari [176].
	KO	Degeneracions en l'RPE, semblants a les de <i>Prpf3</i> , a l'edat d'un any en els heterozigots [174]. Homozigots són letals embrionaris [176].
<i>Rds</i>	KI	Delecció d'una base del gen <i>Rds</i> . Fenotip més sever que el <i>Rds</i> ^{-/-} natural (<i>rd2</i>) [177].
	KI	Es va reproduir la mutació R172W. Estructura de cons i bastons anormal, però no en l'heterozigot [178].
<i>Rdh12</i>	KO	Cap fenotip aparent [179]. Augment en la formació d'adductes 4-HNE amb proteïnes [127].
<i>Rho</i>	KO	<i>Rho</i> ^{-/-} no tenen bastons funcionals i la morfologia d'aquests també és anormal [180].
	KI	Mutació P23H causa desenvolupament normal dels bastons però els OSs mai arriben a tenir la longitud normal. Mort progressiva de bastons i cons [181].
	KI	La mutació P347S provoca una pèrdua de nuclis a l'ONL progressiva, als 4 mesos només queden un parell de files. Les amplituds dels ERGs també disminueixen a partir dels 20-30 dies [182].
	KI	La resposta en els ERGs mostra petites baixades en paral·lel a la degeneració de la retina. La transducció en els mutants Q344X és lenta [183].
<i>Rlbp1</i>	KO	No hi ha degeneració de retina, però l'adaptació a la foscor després de la il·luminació, així com la regeneració de la rodopsina, tardava 10 vegades més comparat amb el WT [184].
<i>Rom1</i>	KO	Els discos dels fotoreceptors estan altament desorganitzats i els bastons moren poc a poc per apoptosi [185].
<i>Rp1</i>	KO	Retina alterada a partir del dia P7 i via de senyalització de JNK compromesa [186].
<i>Rpe65</i>	KO	Fins els 6 mesos no sembla que hi hagi pèrdua de fotoreceptors; el cons, en canvi, degeneren molt ràpid. A les 4 setmanes, ERGs anormals [187].
<i>Rpgr</i>	KO	Degeneració de cons i bastons, nivells de rodopsina reduïts, localització ectòpica de l'opsina en el soma i les sinapsis [188].
<i>Sag</i>	KO	En condicions de llum poc intensa, manifesta una mica de desorganització dels OS dels bastons. Els ERGs són normals pels cons i anormals pels bastons. En llum intensa es desencadena degeneració de fotoreceptors [189].
<i>Sema4a</i>	KO	Es desenvolupa de manera normal [190].
<i>Topors</i>	KO	No s'han fet estudis de retina. En altres teixits, s'ha vist que es donen transformacions malignes en molts teixits i que l'heterocromatina pericèntrica està alterada [191].
<i>Tulp1</i>	KO	Degeneració retinal primerenca amb mort ràpida i progressiva dels fotoreceptors [192].
<i>Ush2a</i>	KO	Degeneració dels fotoreceptors progressiva, acompanyada d'una sordesa moderada però no progressiva [193].

TAULA 5 - Transgènics i mutants induïts descrits pels gens causants d'RP. KO: knockout, KI: knockin, ENU: N-etil-Nitrosurea.

5.3.1 Knockout de *Cerkl*

Es va construir un model murí deficient pel gen *Cerkl*, que mimetitzava la mutació patològica p.R257X, eliminant l'exó 5. El mutant homozigot era completament viable i estudis histològics van mostrar que les retines *Cerkl*^{-/-} eren completament normals. Endemés, es van analitzar diferents lípids i es van trobar nivells normals de ceramida i C1P. A les condicions i temps estudiats, aquest model no té cap fenotip aparent que pugui deixar entreveure quina és la funció de CERKL, ni per què mutacions en el gen causen RP o CRD [162].

5.3.2 Knockout de *Guca1b*

Durant la transducció visual, un fotó excita el fopigment (rodopsina/opsina) i s'activen tot un seguit de reaccions. Una d'elles és la hidròlisi del cGMP, que provoca que els canals iònics es tanquin i la membrana s'hiperpolaritzi, fet que causa el decrement de Ca^{2+} intracel·lular. Dues ciclasses de guanilat (retGC) són les encarregades de restaurar els nivells de cGMP, per tal de poder recuperar-se de l'excitació que ha patit el fotoreceptor. Les proteïnes activadores de ciclasses de guanilat (GCAP) són sensibles als nivells de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ i s'encarreguen de regular l'activitat de les retGCs.

Les GCAPs estan codificades pels gens *Guca1a* (GCAP1) i *Guca1b* (GCAP2) i s'expressen en cons i bastons, respectivament. El procés d'activació de les GCAP és dependent de Ca^{2+} . Breument, durant el període de fosc, els nivells de Ca^{2+} i cGMP són elevats, degut a que els canals iònics estan oberts, per tant les GCAPs i retGCs estan inhibides. En condicions de llum, l'excitació dels fopigments disminueix els nivells de cGMP, la qual cosa provoca el tancament dels canals de manera que es redueix la concentració de Ca^{2+} intracel·lular lliure, fet que afavoreix l'intercanvi iònic $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ a les GCAPs, les quals deixen d'estar inhibides i activen les retGCs per regenerar els nivells de cGMP i així tornar a l'estat inicial on els fotoreceptors recuperen la sensibilitat a la llum i a canvis en la intensitat d'aquesta [166].

El gen *GUCA1B* és un dels gens causants d'arRP en humans. Tanmateix, estudis en un model *knockout* per aquest gen han mostrat que mantenen una morfologia de la retina, mida dels segments externs dels fotoreceptors i ultraestructura normals, sense apreciar-se degeneració de bastons. Endemés, per immunodetecció de proteïnes, no s'han apreciat canvis d'expressió en les proteïnes retGCs i GCAP1, així com tampoc, en altres proteïnes implicades en la via de fototransducció, a excepció de la recoverina -proteïna encarregada de perllongar l'activitat de la rodopsina fotoactivada-, la qual pateix una disminució del 20% i per tant, és esperable, un decrement de l'amplitud de la resposta. Estudis més en detall mostren que la recuperació als flashs lumínics és més lenta en els ratolins KO respecte als WT. Endemés, els bastons dels ratolins *Guca1b* *-/-* són més sensibles a aquests flashs però tendeixen a saturar-se abans i a menors intensitats [166]. Aquest és un model KO, el fenotip del qual és lleu i allunyat dels fenotips causats per les mutacions en humans.

5.3.3 Knockout d'*Nrl*

Nrl és un factor de transcripció neuroretinal amb cremallera de leucines que s'expressa sobretot a bastons [194, 195]. Actua sinèrgicament amb *Crx*, un factor de transcripció de cons i bastons amb caixa homeòtica de tipus *Otx* [196] per tal de regular l'expressió de la rodopsina [197]. En humans, mutacions en *NRL* estan associades a adRP [198].

El KO per *Nrl* es va generar mitjançant l'escissió dels exons 2 i 3 [170]. A nivell histològic, l'homozigot mutant va mostrar degeneració clara de retina, així com un enriquiment de cons S. Per electromicroscopia es va observar que, a més a més, els segments externs eren curts i amb els discos desorganitzats. En quant a la funció dels fotoreceptors mesurada per ERGs, es va veure que no hi havia resposta alguna per part dels bastons. L'expressió de gens típics de bastons com ara *Nr2e3*, *Rho* i *Pde6b* estava clarament disminuïda, mentre que altres gens específics de cons, com l'*OpsSw*, *Gnat2* i l'arrestina de cons van mostrar un notable augment en els animals *Nrl* *-/-*. Així, doncs, *Nrl* és un gen important pel desenvolupament dels bastons, que modula directament els gens implicats en aquest i, simultàniament, inhibeix la via dels cons S, activant *Nr2e3* [170].

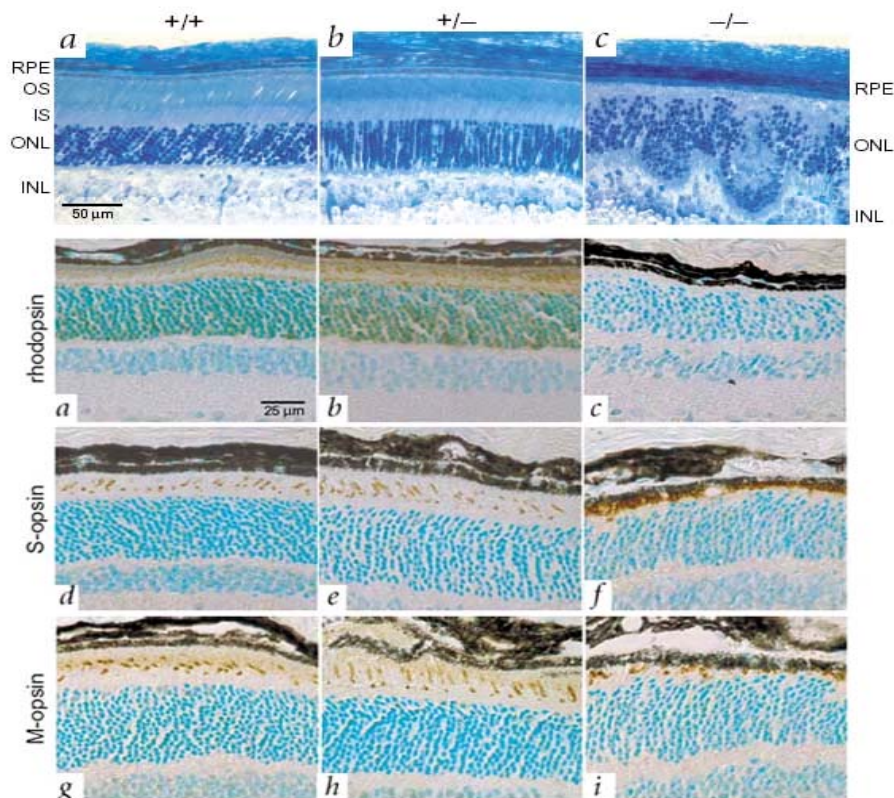


FIGURA 17 - Estructura de la retina d'animals *Nrl*+/+, +/- i -/-. Representació de la retina dels 3 ratolins amb una tinció Hematoxilina-Eosina (a, b, c). Marcatge de diferents cèl·lules amb marcadors específics: rodopsina: bastons (d, e, f); opsina S:-cons S (g, h, i) i opsina M: cons M (j, k, l). Adaptat de Mears et al. 2001 [170].