



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

Conclusions

- i. La caracterització detallada de l'expressió del gen *CERKL* ha revelat un total de 21 transcrits en humans i 32 en ratolí, dels quals 31 han estat descrits *de novo*. A la retina de ratolí s'expressen com a mínim 25 isoformes de *Cerkl*. Aquesta multiplicitat d'isoformes es deguda, entre altres causes, a una elevada activitat d'*splicing* alternatiu a la retina.
- ii. L'ús de promotors alternatius afegeix més complexitat a l'expressió de *CERKL*. Mitjançant l'aproximació combinada *in silico* i experimental s'han identificat 4 inicis de transcripció (TIS) diferents, tant a humans com a ratolí. A humans: els promotors de *NEUROD1* i el prèviament descrit de *CERKL*, a més de dos TIS nous a les regions 3' de l'exó 1 i de l'exó 3 (1b i 3b). El ratolí comparteix els TIS dels promotors de *NeuroD1* i *Cerkl*, i presenta 2 TIS nous, ambdós localitzats a l'intró 2, que generen els exons 3a i 3b. Estudis bioinformàtics també reforcen l'ús de metionines iniciadores (TSS) de noves isoformes proteiques a partir d'aquests nous TIS.
- iii. Els teixits murins on hem trobat una expressió més elevada de *Cerkl* són retina i fetge. El promotor més actiu en retina de ratolí és el de *Cerkl*, que dirigeix la síntesi del 65-70% de l'mRNA del gen, mentre que a fetge el TIS més actiu és el que s'inicia a l'exó 3b (no actiu a la retina). Aquests resultats suggereixen especificitat tissular dels diferents TIS.
- iv. L'estudi de la localització subcel·lular de *CERKL*, mitjançant la sobreexpressió de les isoformes 1, 2, 3 i 4 (nova nomenclatura) demostra una localització dinàmica, principalment associada a les membranes de l'ER i de l'aparell de Golgi, i un petit percentatge dins del nucli. La proteïna mutant, R257X, queda preferentment retinguda a nucli.
- v. A retina murina, la proteïna *CERKL* es troba principalment a cons, majoritàriament al segment extern i també mostra una localització perinuclear, tot i que les hibridacions *in situ* mostren una elevada expressió de *Cerkl* a la capa de cèl·lules ganglionars.
- vi. Els nombrosos assaigs enzimàtics realitzats no han permès demostrar que *CERKL*, tot i tenir un domini DAGK conservat, tingui activitat quinasa envers una gran diversitat de substrats lipídics i algunes proteïnes.
- vii. La sobreexpressió de *CERKL* en cèl·lules en cultiu protegeix les cèl·lules en situacions d'estrès oxidatiu. La isoforma R257X, en canvi, no es capaç de mantenir el nivell de protecció de les cèl·lules davant d'aquest tipus de dany.
- viii. S'ha construït un model murí *knockout* (*Cerkl* *-/-*) mitjançant la deleció del promotor proximal i l'exó 1 sencer del gen. A nivell de transcripció es manté un 30-35% de transcrit en aquests animals, degut a l'activitat dels promotors alternatius (*NeuroD1* i 3a). L'expressió a partir d'aquests promotors no es veu incrementada en els KO.

CONCLUSIONS

- ix. L'estudi dels nivells de GFAP han mostrat un augment en l'expressió d'aquest marcador d'estrès, fet que indica l'existència d'algun tipus d'alteració estructural o funcional a la retina. Els estudis morfològics de les retines dels ratolins *Cerkl* *-/-* a 2, 4, 6 i 12 mesos no evidencien alteracions morfològiques observables, respecte als animals control.
- x. Les anàlisis de varis marcadors específics de cèl·lules de retina van mostrar una disminució significativa, i no progressiva amb l'edat, dels nivells de Brn3a, un marcador de cèl·lules ganglionars. Aquesta davallada és específica atès que no s'observen diferències en els nivells d'expressió dels marcadors emprats de fotoreceptors i cèl·lules bipolars.
- xi. L'estudi electroretinogràfic dels ratolins *Cerkl* *-/-* a 2, 3, 4, 5, 6 i 12 mesos mostren alteracions consistents i estadísticament significatives en els potencials oscil·latoris (OP), fet que suggereix una afectació funcional de les cèl·lules ganglionars i/o amacrines. Aquests canvis no són progressius, es mantenen en el temps i concorden amb les diferències observades en els nivells del marcador Brn3a. No s'han observat alteracions en els ERGs de la funció dels cons i els bastons, la qual cosa indica que aquest model *Cerkl* *-/-* no mimetitzava el fenotip de retinosi pigmentària esperat.
- xii. Estudis de lipidòmica de les retines dels ratolins KO *versus* WT, mostren una davallada important dels nivells de glucosil- i galactosilceramida, i moderada de ceramida i d'esfingomielina. Aquests resultats concorden amb els obtinguts en els assaigs de *lipid-protein overlay*, on es demostra la unió de CERKL a glucosilceramida i esfingomielina i reforcen la contribució de CERKL en el metabolisme dels esfingolípid, malgrat queden molts interrogants per respondre.