



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

Discussió

Cerca de nous gens RP i aproximació funcional *in silico*

Els avenços tecnològics i conceptuals en biologia molecular i genètica, i el desenvolupament d'eines bioinformàtiques potents, han permès que el nombre de gens causals de distròfies de retina identificats s'hagi incrementat considerablement en els últims anys, des de menys de 5 al 1986, fins els més de 200 coneguts actualment (FIGURA 44). Molts d'ells eren gens anotats en el genoma, que no s'havien associat encara a cap patologia. Altres, en canvi, han estat identificats *de novo* com és el cas del gen estudiat en aquesta Tesi, el gen CERKL [36].

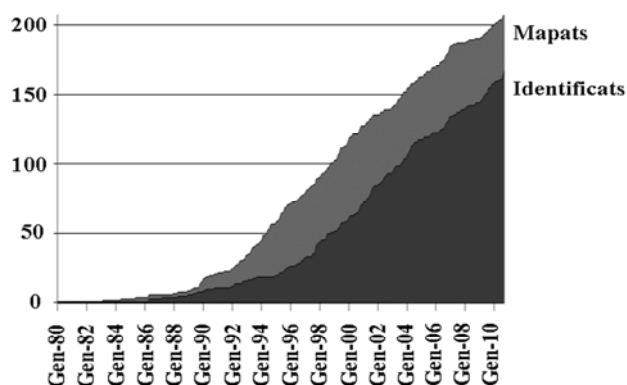


FIGURA 44 - Gens causants de degeneració retinal mapats i identificats 1980-2011. Imatge adaptada de RetNet (Gener 2011).

L'ús de diverses eines bioinformàtiques va permetre classificar la proteïna CERKL, identificada l'any 2004 [36], en el grup de les quinases de ceramides (CERKs), atès que presentava un domini DAGK conservat i una elevada homologia de seqüència amb la proteïna CERK [36, 39]. Aquest primer pas va situar a CERKL en l'escenari del metabolisme dels esfingolípids. Posteriorment, es va demostrar que CERKL conté dos dominis NLS (senyals de localització nuclear) [41] i dos NES (senyals d'exportació nuclear) [42], que permetrien l'entrada i sortida de la proteïna al/del nucli. Més recentment, s'ha confirmat l'existència d'un domini d'homologia a plextrina (PH), codificat pels dos primers exons [42]. Cerques informàtiques també ens han permès predir l'existència d'un domini d'unió a calci/calmodulina.

Utilitzant un programa de predicció de seqüències d'unió a calmodulina (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>), es van identificar 3 possibles dominis (FIGURA 45) en base als criteris següents: hidrofobicitat, capacitat de formar hèlixs alfa, massa molecular, càrrega i freqüència de residus concrets. Aquests possibles nous dominis haurien de ser estudiats amb deteniment, ja que, podria ser que l'activitat de CERKL estigués regulada pels nivells de Ca^{2+} i la unió a calmodulina, tal i com sembla ser que succeeix amb la seva homòloga més pròxima, la proteïna CERK [59]. Però de moment, degut a que encara es desconeix la funció de CERKL, no s'ha pogut estudiar el paper del Ca^{2+} en la modulació de la seva activitat.

```

..1 MPWRRRRNRV SALEGGREEE APPEAAAVPP ALLTSPQQTE AAAERILLRG
... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

.51 IFEIGRDSCD VVLSERALRW RPIQPERPAG DSKYDLLCKE EFIELKDIFS
... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0001111223

101 VKLKRCSVK QQRSGTLLGI TLFICLKKEQ NKLNSTLDDL INLSEHCDI
... 4455666677 778899987 765544443 3322110000 0000000000

151 WFRQFKKILA GFPNRPKSLK ILINPQSHKK EATQVYVEKV EPLLKLAGIK
... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

201 TDVTIMEYEG HALSLLKECE LQGFQVVCV GGDGSASEVA HALLLRAQKN
... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

251 AGMETDRILT PVRAQLPLGL IPAGSTNVLA HSLHGVPHVI TATLHIIMGH
... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

301 VQLVDVCTFS TAGKLLRFGF SAMFGFGRT LALAEKYRWM SPNQRRDFAV
... 0000000000 0000000000 0000111111 1111111122 3333222222

351 VKALAKLKAEE DCEISFLPFN SSDDVQERRA QGSPKSDCND QWQMIQQQFL
... 2222222211 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000

401 NVSIMAIPCL CSVAPRGLAP NTRLNNGSMA LIIARNTSRP EFIKHLKRYA
... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000011 1222222222

451 SVKNQFNFPF VETTYVVEVK VHERNNTGGY NPEEEDEETA SENCFPWNVD
... 2222222222 1100000000 0000000000 0000000000 0000000000

501 GDLMEVASEV HIRLHPRLIS LYGGSMEEMI PK
... 0000000000 0000000000 0000000000 00

```

FIGURA 45 - Dominis predits d'unió a calmodulina en CERKL. Sota la seqüència es mostra la puntuació obtinguda de cada regió candidata en una escala de 0 a 9 (emmarcada).

Multiplicitat d'isoformes dels productes d'expressió de CERKL

A l'inici d'aquest treball, s'havien descrit un total d'11 transcrits per humans, obtinguts a partir de diferents teixits (FIGURA 46). D'aquestes variants, només 7 (variants a-g) havien estat considerades vàlides per l'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>) com a seqüències de referència (RefSeq). El número d'accés típic d'aquesta base de dades està format per dues lletres en majúscula, separades per un guió baix d'un número de varies xifres. Endemés, en el cas que ens ocupa, si les lletres són NM vol dir que es tracta d'un transcrit d'mRNA codificant, mentre que NR significa que és no codificant. La resta de variants (h-k), apareixen en un *track* d'mRNAs humans del *GenBank*. Dins del grup d'mRNAs hi ha un transcrit incomplet identificat en cervell (variant j), la transcripció del qual comença des de l'UTR d'un gen adjacent a 5' de *CERKL*, el qual té alts nivells d'expressió en el sistema nerviós i està implicat en el desenvolupament del mateix, *NEUROD1* [211]. D'altra banda, a ronyó es va identificar un transcrit, que semblava incomplet, la transcripció del qual començava a l'exó 3 (variant k). En quant a ratolí, només hi havia una sola isoforma descrita, essent aquest treball el primer que descriu de forma acurada les diverses variants d'mRNA murines.

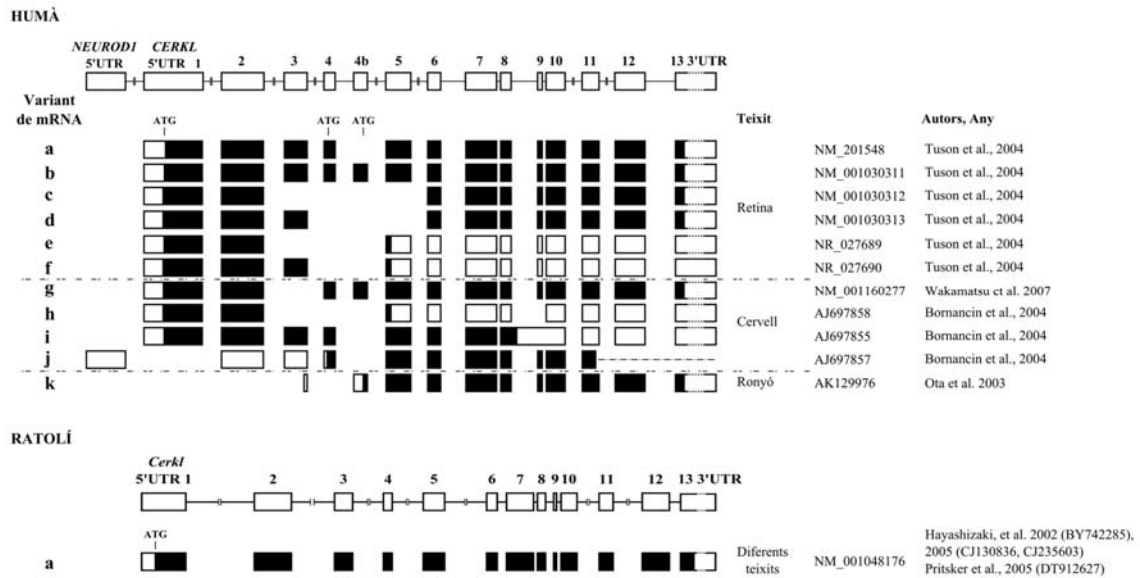


FIGURA 46 - Transcrits de CERKL a humans (any 2006-07). S'indiquen els diferents exons que formen cadascun dels transcrits, així com, el teixit on s'han aïllat, el seu número d'accés en els bancs de dades i els autors. En negre, es marca la regió codificant a partir del primer ATG en pauta. En el cas de ratolí, el transcrit es va obtenir pel solapament de diversos clons i comparació amb els RNAs humans.

El nostre treball sobre la caracterització de CERKL ha permès identificar fins a 21 transcrits humans, dels quals 13 eren descrits de nou, i el transcrit " j " completat del tot. Degut a l'elevat nombre de variants d'RNA identificades vam decidir proposar una nomenclatura més racional i vam assignar un número a cada isoforma. Aquesta proposta unificadora més coherent va ésser acceptada pel GenBank. Es descriuen un total de 24 transcrits (els 21 identificats en el nostre grup, i 3 més que no es van trobar en el nostre escrutini, procedents dels bancs de dades).

Hem identificat 4 promotors nous. L'inici de transcripció (TIS) originalment descrit a l'exó 1, és el més comú a totes les isoformes, tot i que es va trobar un altre TIS, situat enmig de l'exó 1. Endemés, hem descrit 2 TIS addicionals, un situat al 5'UTR del gen NEUROD1; i un altre situat enmig de l'exó 3. Excepte pel primer TIS, en els altres 3 casos es perd la metionina iniciadora de l'exó 1, que és a la vegada, la metionina amb la puntuació més alta obtinguda mitjançant les anàlisis bioinformàtiques de seqüències Kozak. En aquests casos, s'hauria de recórrer a altres metionines iniciadores en pauta per tal de poder generar una proteïna.

Així doncs, la predicció informàtica va identificar una sèrie de possibles metionines iniciadores. Per tal de validar si aquests transcrits podrien tenir una rellevància fisiològica i eren traduïts a proteïna, vam clonar dos d'aquests transcrits sense l'exó 1 complet en un vector d'expressió eucariota (pcDNA3.1), on havíem eliminat tota la seqüència que hi ha entre el promotor i el lloc de clonatge múltiple, per tal de que no pogués actuar com a 5'UTR (vegeu PUBLICACIÓ 2). A més, a 3' es va fusionar en pauta la seqüència de l'epítip HA, per tal de facilitar la detecció d'una proteïna si aquesta hagués estat generada a partir d'una altra metionina interna. D'aquesta manera es va comprovar que la predicció informàtica correlacionava amb el que passava *in vivo*, tot i que un dels transcrits no va produir proteïna en aquestes

condicions, la qual cosa suggereix que bé era un transcrit no codificant, un RNA regulador o, fins i tot, un producte aberrant de la maquinària d'*splicing* de la retina. Recentment, s'ha descrit que la retina conté el volum més elevat de transcrits de pre-mRNA processats de tot l'organisme degut, en part, a l'activitat dels gens de la família PRPF, que codifiquen per proteïnes associades a la formació de l'*spliceosoma* i que també causen distròfies de retina [212].

En quant a ratolí, es van aïllar un total de 32 transcrits (28 complets i 4 incomplets). A l'igual que en humans, es van identificar 4 promotors diferents, tot i que no totalment coincidents. Així, el de l'exó 1 de *Cerkl* i el de *NeuroD1*, coincidirien, però a més, vam identificar dos promotors suplementaris situats a 5' de l'exó 3 (3a i 3b). En aquest cas, donades les facilitats per obtenir RNA de diferents teixits murins, es va poder analitzar l'activitat dels diversos promotors. Es va observar que 3 d'ells són actius a la retina (els anomenats NeuroD1, exó 1 i exó 3a), essent el majoritari el que inicia la transcripció des de l'exó 1 (al voltant del 65-70% del total de transcrit de *Cerkl*). Mentre que en altres teixits, com fetge o testicle, els promotors 3a i 3b són els responsables principals de l'expressió de *Cerkl*.

La gran multiplicitat de transcrits, tant a humà com a ratolí, es deu principalment a la combinatòria dels diferents exons situats a 5', havent-hi transcrits que produirien, *a priori*, proteïnes en pauta, i altres que quedarien truncades. Justament és en aquesta regió on es troben la majoria dels dominis funcionals predits i posteriorment descrits en la proteïna, per tant, aquests transcrits podrien estar codificant proteïnes amb diferents funcions o localitzacions dins de la cèl·lula, ja que, l'NLS-2, els dominis PH i el DAGK, es veurien compromesos en algunes isoformes. Endemés, la presència de 4 promotors actius diferents, augmenta el nombre de combinacions possibles i, per exemple, casos com els dels transcrits que comencen des de l'exó 3, codificarien per proteïnes sense el domini PH. Tot plegat, fa pensar que aquestes proteïnes podrien jugar papers diferents, i ser específiques de tipus cel·lular. Cal recordar aquí que la retina té una gran variabilitat cel·lular, i que moltes d'aquestes isoformes no es troben en altres teixits estudiats. Fins i tot, es podria donar el cas de que les diferents proteïnes generades tinguessin funcions subtilment diferents dins d'una mateixa cèl·lula, podent inclús, regular-se unes a les altres.

D'altra banda, a ratolí, hem identificat un grup de transcrits que presenten retencions totals o parcials d'introns. En altres estudis transcripcionals de gens causants de distròfies de retina, s'ha vist també que, a ratolí es troba un cert percentatge de transcrits amb introns retinguts, fenomen que no s'ha trobat en estudis similars amb transcrits humans dels mateixos gens [213-215]. Això pot ser degut a una major permissivitat de transcrits aberrants en ratolí, una maquinària d'*splicing* menys efectiva que en humans, o el que és el mateix, que en la nostra espècie, hi hagi un control molt més acurat de tot el sistema de l'*spliceosoma* i de la degradació dels transcrits anòmals per NMD. Recentment, en el congrés d'ARVO d'aquest mateix any, Farkas i col·laboradors, van presentar un estudi transcriptòmic de la retina de ratolí mitjançant *next-generation sequencing*, en el qual van observar que a la retina hi ha una elevada taxa d'*splicing* alternatiu, així com de retenció d'introns (Abstract #2560 ARVO 2011).

L'expressió de *CERKL* és bastant ubiqua, tot i que amb diferències significatives en quant a la detecció de transcrit total entre els diferents teixits, com s'observa a les PUBLICACIÓ 1 i 2 i els treballs de Bornancin i col·laboradors [39]. L'anàlisi semiquantitativa dels nivells de transcripció de *CERKL* en teixits, va posar de manifest que el gen s'expressa principalment a la retina, tot i que en el cas de ratolí, es va detectar també una elevada expressió a fetge. No obstant, les anàlisis dels promotors van mostrar que la majoria de transcrits hepàtics es produeixen a partir del promotor 3b. Malgrat l'expressió moderada en altres teixits, els individus afectes per mutacions en el gen, únicament presenten afectació a la retina, per tant *CERKL* ha de jugar un paper clau en aquest teixit, o bé, en la resta de teixits pot realitzar un paper més aviat secundari o davant la manca de *CERKL* hi ha un altre gen que pugui realitzar la mateixa funció o una de semblant, assegurant la viabilitat de la cèl·lula.

És important remarcar la gran variabilitat d'*splicing* alternatiu que afecta als 6 primers exons. Nogensmenys, en primats, hem identificat un exó extra, al que anomenem 4b. Aquest exó no es troba en cap altre grup, i els senyals acceptors i donadors d'*splicing* són d'un tipus poc freqüent, GC-AG. Considerem interessant destacar aquest punt atès que durant l'*splicing*, les diferents proteïnes de l'*spliceosoma* reconeixen els exons/introns mitjançant unes seqüències a la regió donadora i acceptora d'*splicing* en els introns. El cas més comú és el GT-AG. En canvi, un petit percentatge d'introns, són del tipus GC-AG. Aquest últim tipus, és freqüent en casos d'*splicing* alternatiu, degut a que es caracteritza per tenir una regió donadora d'*splicing* dèbil (GC-), mentre que la regió acceptora (-AG) acostuma a tenir un senyal fort de reconeixement per part de les proteïnes implicades en aquest mecanisme [216, 217]. En el cas de *CERKL*, tots els introns són del tipus més comú, GT-AG, a excepció dels introns 4b i 5, dos introns consecutius que són del tipus GC-AG. Aquest fet suggereix que ha d'haver-hi un bon sistema de regulació al darrera, ja que estadísticament és difícil trobar dos regions GC-AG en un mateix gen. Endemés, en el cas de l'intró 5, està conservat evolutivament, reforçant la hipòtesi de que l'*splicing* alternatiu en aquest gen segurament està finament regulat. Considerant altres gens, mutacions puntuals en aquestes regions donadores i acceptores d'*splicing* promouen transcrits aberrants i causen fins el 15% de les malalties genètiques humanes [218]. De fet, una de les mutacions descrites a *CERKL*, c.238+1G>A, que, a més a més, produeix un fenotip sever, està localitzada a la regió donadora d'*splicing* de l'exó 1, fet que provoca que no pugui haver-hi una correcta escissió de l'intró 1, el qual semblaria quedar retingut segons els estudis *in vitro* realitzats per Auslender i col·laboradors [40].

Finalment, el patró final de transcrits produïts pels mecanismes d'empalmament alternatiu, com per l'ús dels diferents promotors descrits, serien específics de teixit o tipus cel·lular. En ratolí, a part de la ja mencionada especificitat tissular d'alguns TIS, hem pogut observar també, que en alguns teixits, com ara pulmó, només s'expressen 2 isoformes de *Cerkl* a partir de l'exó 1, mentre que en retina en trobem 11. Aquests resultats també reforçarien la hipòtesi emergent de que a la retina, l'activitat de l'*spliceosoma*, i per tant l'obtenció de variants transcripcionals per *splicing* alternatiu, és major que en d'altres teixits i explicaria perquè mutacions en gens d'*splicing* ubics, com ara *PRPF31*, *PRPF3*, *PRPF8* o *PRPF6* causin retinosi amb herència autosòmica dominant, quan tenen un sol al·lel mutant, indicant que la retina

podria ser un teixit particularment sensible a una menor activitat dels mecanismes d'*splicing* i causaria alteracions en la major part de transcrits (al voltant del 60% dels produïts a retina).

Localització de CERKL

Quan es sobreexpressa qualsevol de les 4 isoformes (a-d) en cèl·lules en cultiu, CERKL presenta una localització subcel·lular dinàmica. Aquests resultats suggereixen una funció diferencial en els diferents compartiments cel·lulars, la qual cosa afavoreix que CERKL pugui anar-se movent entre un lloc i un altre. El fet que pugui transportar-se, o ser transportada, d'un compartiment a un altre podria donar-se per diferents motius. En primer lloc, CERKL com ja hem mencionat anteriorment, posseeix dos NLS i dos NES, que regularien, respectivament, l'entrada i sortida de la proteïna del nucli [42]. D'altra banda, CERKL localitza principalment en l'ER, l'aparell de Golgi, i sempre es troba associada a membrana, tot i que en algunes cèl·lules es detecta a nucli i endosomes primerencs. Aquesta localització és força semblant a la d'altres enzims implicats en el metabolisme dels esfingolípid, molts dels quals es troben associats a les membranes del Golgi, ER o membrana plasmàtica [219]. D'altra banda, la proteïna truncada R257X sembla quedar retinguda a nucli, la qual cosa suggeria la presència de senyals NES a C-terminal, confirmades posteriorment per Rovina i col·laboradors [42], que en aquesta proteïna mutant mancarien i causaria la seva acumulació preferent a nucli. Endemés, prediccions *in silico* han descartat que CERKL pugui ser una proteïna transmembrana. Per últim, els dos primers exons codifiquen pel domini PH, al qual se li han atribuït funcions diverses: en el cas d'algunes proteïnes és capaç d'unir-se als microtúbuls per migrar a través d'ells [37, 220], en altres casos permeten les unions proteïna-proteïna [221] i finalment, seria responsable de la unió a membrana per la interacció del domini PH amb els PIPs de la membrana dels diferents orgànuls [52, 222].

Per tant, CERKL *a priori* podria mitjançant els dominis descrits, anar canviant la seva localització subcel·lular, ja sigui de manera autònoma, ajudada per altres proteïnes amb les que pogués formar un complex, o de manera vesicular. Aquests canvis, podrien, almenys en alguns casos, estar associats a diverses funcions en cada compartiment, per exemple, la seva entrada a nucli podria estar relacionada amb la regulació transcripcional, o bé amb el transport d'algun component citoplasmàtic cap a l'interior del nucli. D'altra banda, la localització en altres compartiments podria relacionar-se amb el cicle cel·lular, i en funció de la fase en la qual es trobés la cèl·lula, CERKL podria localitzar-se en un compartiment diferent. Encara que aquesta última hipòtesi es podria intentar comprovar en cèl·lules en cultiu, cal mencionar que les cèl·lules de la retina són de naturalesa neuronal i, per tant, no es divideixen. Endemés, dades preliminars del grup amb la proteïna CERKL sobreexpressada en cultius cel·lulars no semblen donar suport a aquesta hipòtesi. Finalment, hi ha proteïnes, com per exemple PTEN, que poden canviar la seva localització depenent de les modificacions post-traduccionals [223]. Així doncs, seria possible que CERKL necessités tenir algun tipus de modificació, com ara alguna fosforilació, ubiquitilació, sumoïlació, etc., per entrar al nucli.

Per últim, cal recordar que estem davant un gen que pot generar nombroses isoformes, les quals variarien sobretot a l'extrem N-terminal de la proteïna, que és on es concentren la gran majoria dels dominis identificats de CERKL. Per tant, és probable, que hi hagi isoformes amb una localització subcel·lular única o, en el cas de mostrar també una localització dinàmica, que depengués de la formació d'un complex que tingués la capacitat de moure's d'un compartiment a un altre. És en aquest punt on entraria en joc una possible oligomerització de CERKL.

Els estudis de dimerització o interacció entre isoformes duts a terme en el nostre laboratori, tot i no ser exhaustius, semblen demostrar que CERKL no dimeritza. No obstant, tenint en compte les noves isoformes descrites recentment (vegeu PUBLICACIÓ 2), caldria comprovar si aquestes noves isoformes proteïques poden heterodimeritzar o formar complexes d'alt pes molecular amb altres *partners* no identificats. Els experiments esmentats anteriorment, es van realitzar amb les isoformes inicials, totes elles contenen un domini PH, dos NLS i dos NES, i l'únic que les faria diferents seria que dues d'elles no presenten el domini DAGK. Així doncs, en el nou escenari en el que ens trobem, podria donar-se el cas que les proteïnes codificades a partir de la metionina de l'exó 5, que només contindrien els dominis NES, poguessin interaccionar amb les isoformes de major massa (codificades des de l'exó 1) per la part C-terminal.

La cerca d'interactors proteïcs permet explorar si una proteïna interacciona amb altres i/o forma part d'algun complex, i a la vegada pot donar pistes sobre la funció que realitza. En aquest punt, es va decidir sobreexpressar CERKL en cèl·lules en cultiu per realitzar una immunoprecipitació en condicions no desnaturalitzants. Finalment, es van separar electroforèticament els eluïts per retallar les bandes diferencials i analitzar-les per MALDI-TOF. Cal tenir present que aquesta metodologia no permet distingir entre interaccions directes o indirectes amb la proteïna assajada.

Inicialment, els resultats obtinguts semblaven no tenir gaire sentit. Moltes de les proteïnes identificades formaven part de complexos nuclears implicats en la condensació i descondensació de la cromatina, o eren factors involucrats en la transcripció i l'*splicing*. Endemés, hi havia tot un seguit de proteïnes citoplasmàtiques relacionades amb la traducció, el plegament de les proteïnes, el citoesquelet, reaccions enzimàtiques diverses i transport vesicular.

Estudiant en detall i després de tota la informació que recentment hem obtingut, segurament podríem descartar com a artefactuals totes les proteïnes ribosomals, les quals formen part de les subunitats del ribosoma 40S i 60S, i molt probablement han immunoprecipitat degut a que estaven unides als transcrits a mig traduir. De la mateixa manera, les *Heat Shock Proteins* (HSP), també podrien haver estat eluïdes artefactualment, generat per la sobreexpressió de la proteïna, la qual al tenir una localització principalment a ER i Golgi, i trobar-se en quantitats superiors a les normals, pugui estar provocant un estrès a la cèl·lula. D'altra banda, hem identificat un seguit d'histones, implicades principalment en l'empaquetament del DNA, i una sèrie de proteïnes que juguen papers en la transcripció o que formen

part de l'*spliceosoma*. En aquest cas, sabem que CERKL posseeix una localització dinàmica, que fa pugui ser translocada al nucli, possiblement per desenvolupar alguna funció, encara desconeguda, en aquest compartiment. De donar-se aquesta possibilitat, potser ho podria fer directament, activant o reprimint la transcripció d'alguns gens, la qual cosa explicaria que pogués interaccionar amb histones i factors de transcripció. També, si realment forma part del metabolisme dels esfingolípid, podria jugar un paper en el transport o modificació d'aquests, ja que des de fa uns anys, s'està demostrant que aquesta família de lípids poden regular l'expressió d'altres gens, activant o inhibint la seva transcripció [219]. Dins del grup de les proteïnes amb activitats enzimàtiques diverses, trobem tot un conjunt de proteïnes implicades en la glucòlisi i l'obtenció d'energia. I després, tot un grup relacionat amb el citoesquelet amb la beta-tubulina d'una banda, i l'actina i un conjunt de proteïnes que s'encarreguen de regular la longitud d'aquests filaments. En aquest cas, el primer grup de proteïnes podrien tenir relació amb una demanda energètica per part de la cèl·lula davant la sobreexpressió de CERKL, ja que la glucòlisi, consisteix en una successió de reaccions que acaben en l'obtenció d'ATP i piruvat a partir de la glucosa. En quant a l'actina i la tubulina, ambdós formen part del citoesquelet, i com ja hem mencionat anteriorment, hi ha proteïnes que mitjançant el domini PH poden migrar a través dels microtúbuls, fet que, si finalment no fos un altre artefacte, podria estar indicant que CERKL pot unir-se d'alguna manera a aquests dos components estructurals. Finalment, trobem la clatrina, una proteïna que està recobrint les vesícules que es formen en el Golgi, i que està formada per 3 cadenes pesades que interactuen a C-terminal amb 3 cadenes lleugeres. Sens dubte aquesta es la opció més atractiva, ja que CERKL localitza a diferents compartiments membranosos, i per arribar a tots ells, ha de ser transportada en vesícules, o bé, per si mateixa de manera autònoma. A més a més, diferents esfingolípid i proteïnes es transporten en vesícules des de l'ER al *cis*-Golgi, del *cis*-Golgi al *trans*-Golgi i del *trans*-Golgi a la membrana. D'igual manera, les vesícules generades per endocitosi també transporten proteïnes i lípids des de la membrana plasmàtica als endosomes i lisosomes. Malauradament, la banda retallada tenia una massa aparent d'uns 150 kDa, mentre que la cadena pesada de la clatrina en fa gairebé 200 kDa, per tant, aquests resultats haurien de ser comprovats/confirmats mitjançant altres tècniques.

Recentment, en el darrer congrés d'ARVO, Ben-Yosef i col·laboradors van presentar resultats obtinguts en un experiment de doble híbrid entre, una genoteca de retina humana i CERKLa (isoforma 1, segons la nova nomenclatura). Els resultats que han obtingut revelen que CERKL pot interaccionar amb GCAP2 (també anomenada GUCA1B), una proteïna activadora de ciclases de guanilat implicada en la fototransducció que s'expressa, principalment, a bastons. Endemés, mitjançant una co-immunoprecipitació a partir de lisats de cèl·lules co-transfectades amb CERKLa fusionada amb un epítot i la GCAP1 d'una banda, i la GCAP2 d'altra, fusionades amb un altre, es va poder confirmar la interacció observada en el doble híbrid, així com també, la interacció amb GCAP1 (també coneguda com GUCA1A), la proteïna activadora de ciclases de guanilat dels cons. Més endavant, discutirem com pot afectar aquesta interacció a la funció de CERKL.

CERKL a la retina

Els primers estudis realitzats en el grup per hibridació *in situ* sobre retines de ratolí van mostrar que en ratolí, *Cerkl* s'expressa principalment a les cèl·lules ganglionars i en menor quantitat en fotoreceptors [36]. Els resultats coincideixen amb els obtinguts durant la realització d'aquesta Tesi amb l'objectiu d'abordar el patró d'expressió dels transcrits procedents del promotor de *Cerkl* o de *NeuroD1*. No es varen observar patrons diferents amb les diverses ribosondes utilitzades. Endemés, els estudis realitzats sobre retines d'animals *Cerkl* *-/-* van mostrar que hi ha una expressió residual del gen, especialment visible a la capa de cèl·lules ganglionars en comparació amb el *wild-type* (vegeu PUBLICACIÓ 3).

La generació d'anticossos eficients en el reconeixement de CERKL ha estat molt difícil i ha limitat molt el desenvolupament d'aquest treball. S'han intentat obtenir anticossos contra CERKL tant específics d'humà com de ratolí, així com alguns que poguessin reconèixer tots dos. En tots els casos, hem obtingut anticossos policlonals inespecífics, alguns dels quals, ni tan sols reconeixien la proteïna sobreexpressada. Per ratolí, es van intentar obtenir dos anticossos, que tot i que en *Western blot* no funcionaven gaire bé, es va observar que en assaigs d'immunocitoquímica realitzada sobre cèl·lules transfectades, reconeixien la proteïna, però amb un soroll de fons considerable. Un dels anticossos produïts estava dissenyat contra l'exó 2. Per disminuir el soroll de fons, vam utilitzar testicles de ratolí per preabsorbir l'anticòs, atès que en els estudis de promotors havíem observat que, en aquest teixit, només eren actius el promotor 3a i 3b. D'aquesta manera, vam aconseguir reduir considerablement el *background*, essent de gran utilitat en els posteriors estudis d'immunohistoquímica (IHC) sobre retines. Al reduir el soroll de fons, es va observar una localització clara de CERKL en els cons, on co-localitzava clarament amb la lecitina PNA (*Peanut Agglutinin*), i en menor mesura en els bastons, tal i com es mostra en la FIGURA 47.

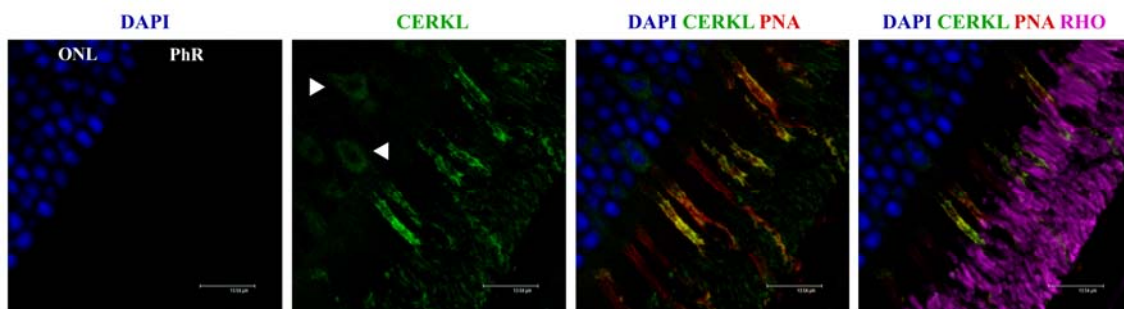


FIGURA 47 - Localització de CERKL en cons i bastons. IHC realitzada sobre retines de ratolí WT de 12 mesos d'edat. En blau es mostra el marcatge dels nuclis amb DAPI; en verd, CERKL immunodetectat amb l'anticòs preabsorbit; en vermell, el marcatge dels cons amb la PNA i en rosa, la rodopsina, fotorpigment exclusiu de bastons. Es pot observar una clara co-localització en el segment extern dels cons, on endemés mostra una distribució perinuclear (triangles blancs), a més d'una més dèbil co-localització amb la rodopsina, als segments externs dels bastons.

A més a més, es va detectar la presència de CERKL perinuclear, tal i com s'assenyala a la FIGURA 47. Aquesta localització reforçaria que CERKL podria estar associada a l'ER que es troba envoltant al nucli i no només això, si no que també hauria de moure's cap al segment extern, en el qual, molt probablement, continuaria associada a membrana en els discos dels cons. Endemés, com ja hem esmentat, també es va immunodetectar CERKL en els segments externs dels bastons, tot i que amb menys intensitat. Com s'observa en la PUBLICACIÓ 2, CERKL també sembla localitzar al voltant dels nuclis, de cèl·lules de l'INL, com per exemple, les bipolars. D'altra banda, es va detectar proteïna, tot i que amb menys intensitat, en la capa de cèl·lules ganglionars, on, per *in situ*, havíem observat el màxim d'expressió del gen. Aquest fet podria deure's a una permeabilització diferencial de les neurones de les diferents capes retinals, i per tant a una exposició antigènica no homogènia.

En la retina de ratolí, hi ha 3 promotors actius, el de l'exó 1, que produiria aproximadament el 65-70% de *Cerkl*, el de *NeuroD1*, que s'encarregaria del 35-25% i finalment, el de l'exó 3a que aportaria al voltant d'un 5%. D'altra banda, entre els exons 1 i 6 hi ha molta variabilitat en quant a la combinació d'exons, donant-se fenòmens d'*splicing* alternatiu, que acabarien codificant proteïnes amb una gran variabilitat de la presència/absència de dominis de CERKL. Desconeixem com pot afectar a la conformació de la proteïna i fins a quin punt la manca o presència de residus concrets pot canviar molt o poc l'estructura terciària de la proteïna. Per últim, alguns dels transcrits descrits a retina sense l'exó 2, que podrien expressar-se majoritàriament en aquesta capa de cèl·lules i, aquest fos el motiu pel qual el nostre anticòs no dona un marcatge majoritari en les cèl·lules ganglionars.

Contràriament al que haguéssim esperat, a la retina de ratolí CERKL localitza principalment en els cons. L'RP és una patologia que es caracteritza per una mort primerenca per apoptosi dels bastons seguida de la mort dels cons, probablement, induïda per les substàncies i l'augment de radicals lliures que produeixen estrès oxidatiu i la consegüent pèrdua dels bastons [224]. La CRD, en canvi, consisteix en el procés invers. En els últims anys, s'han descrit noves mutacions en CERKL, en les que el fenotip semblaria encaixar molt més en una CRD que no pas en una RP [44]. No obstant, ambdues malalties tenen una gran heterogeneïtat clínica que, sovint, presenta problemes pel diagnòstic, ja que molts cops el fenotip es solapa amb el d'altres patologies, especialment en estats avançats on la retina està ja tan degenerada que no es pot realitzar una correcta diagnosi [24]. Endemés, la mateixa mutació, dins de la mateixa família, pot tenir severitat i progressions diferents, indicant que el fons genètic juga també un paper important en la severitat del fenotip.

El model murí deficient per *Cerkl*, *Cerkl* -/-

Juntament amb la caracterització funcional, la generació d'un model animal deficient per *Cerkl*, ha estat l'altre gran bloc de feina d'aquesta Tesi. Són diverses les mutacions descrites en aquest gen que causen RP o CRD. L'objectiu principal de la generació del *knockout* va ser poder discernir la funció de CERKL i, així, poder establir els mecanismes pel quals les alteracions en aquest gen desencadenen la

degeneració dels fotoreceptors, i un cop identificats, cercar alguna teràpia per aturar o frenar la progressió de la patologia.

Durant la realització d'aquesta Tesi Doctoral, un model animal deficient per *Cerkl* va ser generat per Graf i col·laboradors [162]. Aquest model consisteix en l'escissió de l'exó 5, el qual codifica part del domini central DAGK. Aquest és l'exó on rau la mutació R257X a humans. En quant als coneixements que es tenien de *Cerkl* abans d'aquest treball, s'havia descrit una única isoforma. No obstant, estudis *in silico* en el nostre grup, havien predit la més que probable existència de les isoformes "c" i "d" (3 i 4 segons la nova nomenclatura) també en ratolí i l'absència de la isoforma b (actualment, isoforma 2). Així doncs, en aquest model només es veia afectada la isoforma "a", donat que, és l'única que conté l'exó 5, un dels exons sotmesos a *splicing* alternatiu. Segons els autors, el ratolí *Cerkl* *-/-* no va mostrar cap fenotip aparent. Les retines eren completament normals i en quant a lípids, no es van detectar diferències en la fosforilació de les ceramides. En aquests moments, sabem que molts dels transcrits no es veuen afectats per aquesta deleció.

La construcció del nostre model deficient per *Cerkl* va prosseguir endavant, ja que estàvem en una fase avançada del projecte. Endemés, aquest ratolí *knockout* podia aportar noves pistes, ja que, a diferència de l'anterior, consistia en l'escissió del promotor i l'exó 1, afectant, *a priori*, a totes les isoformes, i per tant esperàvem generar un KO total. Els nostres animals *Cerkl* *-/-* han resultat viables i fèrtils, i sense cap fenotip aparent. La caracterització més en detall del gen va revelar l'existència de 3 promotors alternatius nous, dels quals 2 estarien actius a la retina i, no es veurien afectats per l'absència de l'exó 1. Amb l'aparició d'aquests nous promotors vam voler analitzar l'expressió de *Cerkl* en els animals KO. El resultat va mostrar que els ratolins *Cerkl* *-/-* produeixen al voltant d'un 65-70% menys de transcrit, i per tant, la resta, hauria de ser produït a partir dels 2 promotors actius a la retina (NeuroD1 i 3a), tot i que no descartem que puguin haver-hi més inicis per identificar. A la vegada, els TIS NeuroD1 i 3a no augmenten la seva activitat, i per tant, no hi ha una compensació d'activitat transcripcional entre ells. Així doncs, estàvem davant d'un *knockdown*, en comptes d'un *knockout*.

Els estudis morfològics i els registres electroretinogràfics dels animals KO van revelar una estructura de la retina completament normal, sense cap diferència respecte als WT. En quant als ERGs no es va observar que hi hagués degeneració dels fotoreceptors. Per tant, els animals eren aparentment normals i no vam trobar cap diferència observable ni a 2, 4, 6 ni 12 mesos d'edat. Tot i això, cal remarcar que els potencials oscil·latoris (OP), que registren els senyals enviats per les cèl·lules ganglionars i amacrines, presentaven unes amplituds un 25-30% menors respecte al WT, essent aquesta diferència significativa i consistent. Aquestes diferències, apareixen ja en els 2-4 mesos i es mantenen fins els 12, sense haver-hi progressió. Vam pensar que potser només es podria observar el fenotip en situacions d'estrès lumínic, trobant-se una lleugera disminució en la resposta de bastons i mixta (cons i bastons) en els ERGs dels ratolins KO. Aquesta és una feina a desenvolupar en un futur, en la qual traslladarem l'al·lel KO en homozigosi a individus albins per poder observar l'efecte de l'estrès lumínic.

Resumint tot l'esmentat anteriorment, el ratolí va resultar ser un *knockdown* en el qual, els nivells de *Cerkl* havien disminuït al voltant del 65-70%. Aquesta davallada sembla no ser suficient per causar la degeneració dels fotoreceptors, ja que aquests es mantenen intactes fins els 12 mesos d'edat. D'altra banda, els experiments d'estrès lumínic, van generar una petita davallada en la resposta dels fotoreceptors, respecte els WT, indicant, que CERKL juga algun paper en la protecció dels fotoreceptors. Per últim, de manera natural, trobem diferències en els OPs, aquestes diferències són constants al llarg del temps, fet que podria indicar algun defecte congènit lligat a les cèl·lules ganglionars, en les quals per *in situ*, hem detectat la màxima expressió de *Cerkl*. Caldria aprofundir en aquesta qüestió, per tal de veure si es produeix una pèrdua o degeneració selectiva de les cèl·lules ganglionars al llarg del temps. Endemés, seria interessant estudiar el fenotip del KO en un fons albi, molt més sensible a la llum.

En quant a la morfologia de la retina, de moment no s'ha detectat cap diferència a nivell estructural entre WT i KO, ni tampoc després del dany amb llum. Endemés, IHCs amb diversos marcadors de diferents tipus cel·lulars -rodopsina (bastons), opsines (cons), PNA (cons), PKC (bipolars), Brn3a (ganglionars)- no han mostrat patrons de distribució o densitat diferents entre WT i KO, així com amb ratolins exposats a la llum.

D'altra banda, l'anàlisi per *Western-blot* de proteïnes de retina va mostrar una davallada significativa i no progressiva amb l'edat d'un 30% en la proteïna Brn3a, un factor de transcripció que s'expressa en les cèl·lules ganglionars i està implicat en la formació de sinapsis i d'axons [225, 226]. En canvi, en l'estudi d'altres marcadors retinals com les opsines, la rodopsina o la PKC α , no es van observar diferències entre retines *Cerkl* *+/+* i *Cerkl* *-/-*. Això reforça la hipòtesi d'una afectació en les cèl·lules ganglionars, atès que: i) el màxim d'expressió en retines WT es troba en aquesta capa; ii) en els ratolins KO la davallada més considerable en quant a l'expressió del gen es dona en ganglionars; iii) els nivells de Brn3a es troben significativament disminuïts i iv) els OPs, que registren principalment els senyals enviats per les cèl·lules ganglionars i amacrines, presenten alteracions clares.

Per tant, aquests resultats suggeririen, que les alteracions detectades no són suficients com per causar la degeneració dels fotoreceptors en els marges de temps que hem utilitzat. També, podria ser que els diferents ERGs dels animals sotmesos a estrès lumínic reflectissin el dany inicial inflingit per la llum encara que no s'hauria induït la mort cel·lular ni causaria canvis substancials a nivell estructural. A més a més, l'estrès lumínic no és molt efectiu en ratolins pigmentats, per tant hauriem d'estudiar l'efecte del dany en ratolins albins. Algunes de les IHCs dels ratolins exposats a estrès lumínic es mostren en el desplegable de la FIGURA 48. D'altra banda, altres models KO de diversos gens RP tampoc manifesten el fenotip humà molt més sever (cas dels models *knockout* d'*Rdh12* o *Gucal1b*). Per últim, hem de tenir en compte, i) que aquests ratolins no són completament KO i que hi ha una transcripció basal de *Cerkl* i ii) les isoformes més freqüents en humà, no tenen per què ser les més abundants en ratolí, ni causar el mateix tipus d'alteració en els mateixos tipus cel·lulars. De nou un aspecte inesperat per estudiar en un futur.

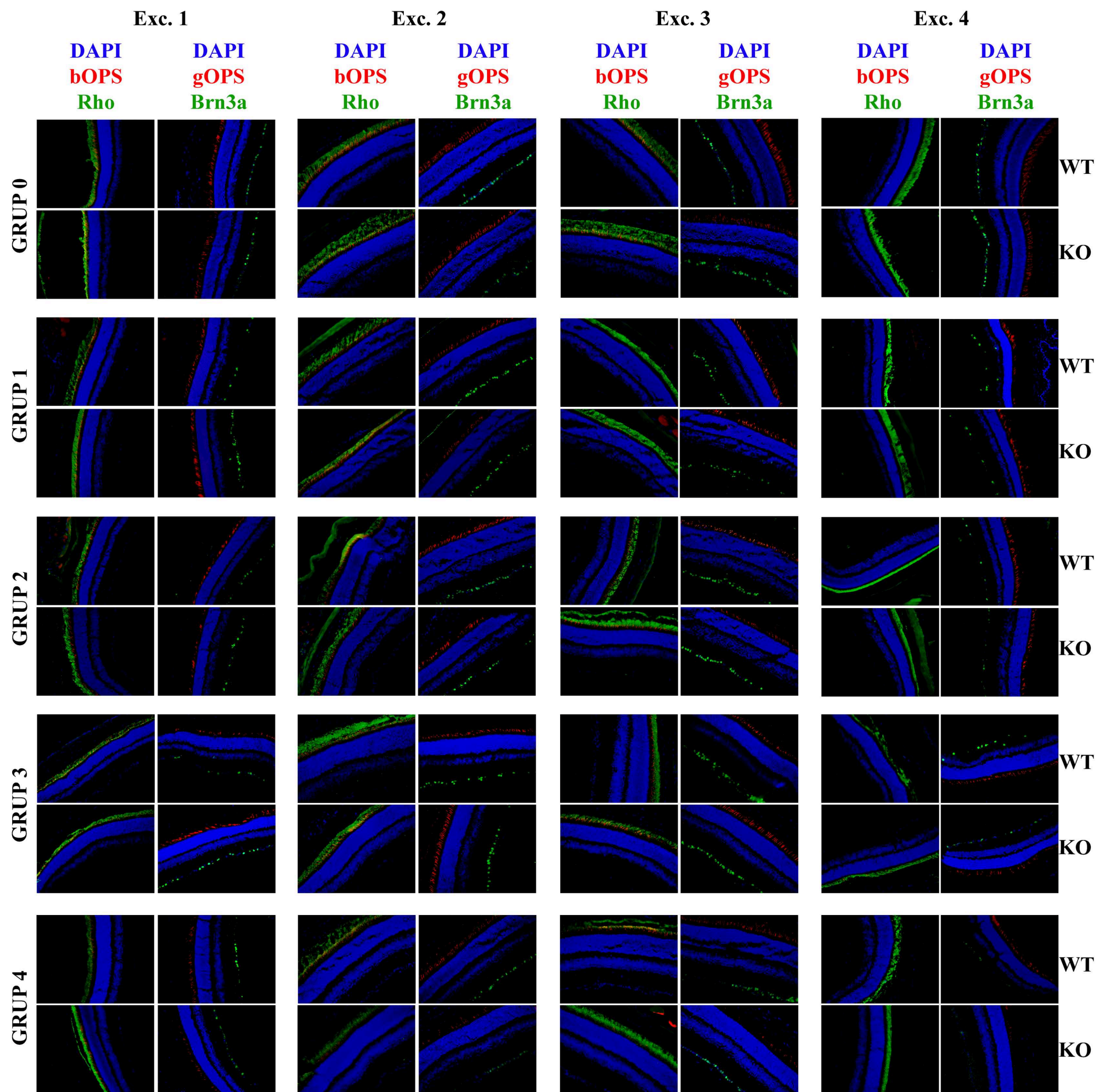


FIGURA 48 - Immunohistoquímica en ratolins WT i KO amb diferents marcadors després de l'estrès lumínic. Diferents imatges corresponents a 4 excentricitats (1 i 4 laterals, 2 i 3 centrals) de 5 grups d'animals WT i KO. Els marcadors utilitzats foren DAPI (tinció de nuclis), *blue Op sin* (cons), *green Op sin* (cons), Rodopsina (Rho, bastons), Brn3a (ganglionars). GRUP 0: ratolins no exposats a la llum, GRUP 1: ratolins exposats durant 60 hores a 5000-6000 lx amb atropina i sacrificats 2 mesos després, GRUP 2: ratolins exposats durant 60 hores a 5000-6000 lx sense atropina i sacrificats 2 mesos després, GRUP 3: ratolins exposats durant 60 hores a 5000-6000 lx amb atropina i sacrificats immediatament després de l'exposició, GRUP 4: ratolins exposats durant 60 hores a 5000-6000 lx amb atropina i sacrificats 7 dies post-dany amb llum. No es va detectar cap diferència significativa.

Les retines *Cerkl* *-/-* pateixen estrès de teixit

La proteïna GFAP, marcador d'astròcits del sistema nerviós central (SNC), ha estat descrita en nombrosos treballs com un marcador d'estrès, implicat en la gliosi. A la retina, aquesta proteïna es detecta normalment en les cèl·lules de Müller (les cèl·lules glials d'aquest teixit) [227, 228], però presenta un increment quan aquest teixit està sotmès a estrès o també quan envulleix. Per tal d'observar si les retines dels animals *Cerkl* *-/-* patien diferències en l'expressió del marcador GFAP, vam realitzar estudis qualitius a nivell de talls histològics de ratolins P60 i P280, els resultats dels quals van mostrar diferències significatives amb l'edat, tot i que les diferències entre WT i KO eren poc evidents en els grups P60 i P280. La semiquantificació per *Western-blot* a partir de lisats proteics de retines d'animals d'edats P60 i P365 va mostrar un augment significatiu en els nivells de GFAP entre animals *Cerkl* *+/+* i *Cerkl* *-/-*. Aquesta diferència, es manté constant al llarg del temps. A més a més, també es va observar un increment d'expressió significatiu amb l'edat. Tot plegat indica que les retines dels animals deficientes pel nostre gen i, presenten algun tipus d'alteració estructural o funcional, encara no identificat, que està generant l'expansió de les cèl·lules de Müller com a resposta a l'estrès que pateix el teixit.

CERKL, un protector en condicions d'estrès oxidatiu

Els esfingolípid han deixat de ser considerats mers components estructurals de la membrana, i avui en dia se sap que són unes molècules biosenyalitzadores implicades en nombrosos processos cel·lulars. Una de les seves tasques més rellevants seria actuar com a sensors de l'estat cel·lular i activar vies cap a l'apoptosi o la supervivència (vegeu l'apartat *CERCA DEL SUBSTRAT DE CERKL*). CERK, la proteïna homòloga més propera a CERKL, s'encarrega de fosforilar la ceramida per obtenir C1P. A la literatura està ben establert que les formes fosforilades de ceramida i esfingosina envien senyals anti-apoptòtics a la cèl·lula, envers els pro-apoptòtics de les no fosforilades. Dins aquest marc, es va voler estudiar com reaccionaven les cèl·lules davant d'un estímul d'estrès quan sobreexpressaven CERKL.

Vam tractar les cèl·lules humanes en cultiu (HeLa) transfectades amb CERKL amb: 1) diferents concentracions d'H₂O₂, que genera espècies reactives d'oxigen (ROS) que provoquen la peroxidació dels lípids, oxidació de proteïnes i dany a nivell del DNA [229, 230]; 2) nitroprussiat de sodi (SNP), un donador d'òxid nítric que activa l'activitat de l'esfingomielinasa àcida, provocant un augment de ceramida, que alhora incrementa la formació de ROS, induint l'apoptosi [80, 231]; i 3) en medi sense sèrum fetal boví (FBS), que provoca una davallada en els factors de creixement, i és un mètode àmpliament utilitzat per induir l'autofagia [232, 233]. L'estudi final va revelar que CERKL era capaç de protegir temporalment les cèl·lules davant l'estrès oxidatiu generat per la presència d' H₂O₂ en el medi. La construcció de la proteïna truncada mutant R257X en canvi, mantenia només una petita part de la capacitat protectora.

En aquest context, la retina és un teixit que es troba en estrès continu, degut a la gran taxa metabòlica dels fotoreceptors així com, a la incidència constant de llum, a vegades molt intensa, que genera molts radicals lliures, font d'estrès oxidatiu. Aquests efectes ambientals perjudiquen als fotoreceptors que, tot i ser cèl·lules molt estables, són a la vegada summament fràgils [115]. Aquesta hiperòxia pot conduir a la degeneració d'aquestes neurones quan estan sotmeses a una exposició prolongada a la llum i/o quan algun dels processos de supervivència o de fototransducció està alterat [116, 234, 235]. També cal recordar que la pol·lució també és un factor a tenir en compte.

Els nostres estudis *in vitro* en cèl·lules, suggeririen un paper de CERKL en la protecció de la cèl·lula, la qual cosa afavoreix la seva supervivència. Són molts els investigadors que per induir la degeneració de la retina, sobretot en ratolins albins, utilitzen la sobreexposició d'aquests a la llum. En aquest cas, es va voler estudiar l'efecte que aquest dany en llum podia causar sobre els ratolins deficients. Com hem esmentat anteriorment, es va observar una lleugera disminució inicial dels registres electroretinogràfics de la resposta dels bastons i mixta, fet que suggereix novament, el paper protector de CERKL. És aquí on la manca en el coneixement del substrat d'aquesta proteïna, limita el poder determinar com és capaç de protegir la cèl·lula. Arribats a aquest punt, i després de tot el que s'ha descrit anteriorment, podríem proposar vies on intervindria CERKL. D'una banda, alguns lípids incrementen la seva concentració en condicions d'estrès oxidatiu, un clar exemple és la ceramida. En aquest context, CERKL podria encarregar-se de derivar aquests lípids pro-apoptòtics, cap a altres tipus de lípids anti-apoptòtics que, degut a la presència d'un domini DAGK conservat, probablement seria mitjançant fosforilació. També podria actuar com a sensor d'estrès, de manera que pogués activar la transcripció d'alguns gens per tal d'augmentar la supervivència cel·lular, fet que explicaria el possible paper de CERKL al nucli. Per últim, en condicions d'estrès, els lípids pateixen peroxidacions, que a la vegada s'uneixen a les proteïnes, afavorint la formació d'adductes proteics i posterior mort dels fotoreceptors per apoptosi, tal i com passa en els ratolins deficients pel gen *Rdh12* [127]. Per tant, podria donar-se el cas que CERKL pogués actuar sobre aquests lípids peroxidats, tenint un paper detoxificador en els fotoreceptors. No obstant, encara queda molta feina per poder establir el mecanisme pel qual, mutacions en CERKL, generen la mort dels fotoreceptors per apoptosi.

Juga CERKL un paper en la fototransducció?

Com ja s'ha esmentat, la interacció de CERKL amb la GCAP2 s'ha identificat, mitjançant un assaig de doble híbrid i, també, en experiments de co-immunoprecipitació direccionats amb la GCAP1. El cGMP és un missatger secundari que s'encarrega de transduir el senyal lumínic en una resposta elèctrica, mitjançant la seva hidròlisi i disminuint la concentració de Ca^{2+} lliure, el qual juga un paper en el procés d'adaptació lumínica mitjançant un *feedback* negatiu en la cascada de fototransducció [236]. Les proteïnes GCAP es troben en el segment extern dels fotoreceptors de tots els vertebrats i contenen un domini EF (EF1) no dependent d'unió a metall i tres dominis EF d'unió a metall (EF2-4) capaços d'unir Ca^{2+} i Mg^{2+} . Endemés, aquestes proteïnes pertanyen al grup de proteïnes semblants a la recoverina i poden

ser acilades a N-terminal per un àcid gras, normalment, per l'àcid mirístic [237]. Mutacions en les GCAP han estat repetidament relacionades amb diverses degeneracions retinals.

D'altra banda, CERKL interaccionaria amb el domini EF2 de, mitjançant un fragment de la regió N-terminal de CERKL, concretament, el domini PH i part del DAGK.

El Ca^{2+} juga un paper molt important en la regulació de les GCAP, membres de la súper família de calmodulina [238], però a diferència de la calmodulina, activa quan s'uneix al Ca^{2+} , les GCAP són actives en absència de Ca^{2+} i inhibeixen les guanilat ciclastes (proteïnes de membrana) un cop aquest ió s'uneix a la proteïna.

Dins d'aquest context, prediccions bioinformàtiques sobre la isoforma de 532 aa (isoforma a) van predir tres possibles dominis d'unió a calmodulina. Un d'ells a l'extrem N-terminal, i podria ser el lloc responsable de la interacció amb les proteïnes GCAP, o si més no, jugar un paper en la regulació de Ca^{2+} lliure, permetent l'activació o inhibició de les proteïnes GCAP i per tant de les guanilat ciclastes. Endemés, CERKL podria ser també la responsable de la regulació d'aquestes proteïnes afegint els grups acils a N-terminal, afavorint l'estabilitat termodinàmica en presència de Ca^{2+} [239].

Els ratolins *Cerkl* *-/-*, no expressen les isoformes amb el domini PH, la qual cosa voldria dir que, en aquest model la interacció amb les GCAP no es podria realitzar, i per tant hauríem d'observar canvis en l'adaptació a la llum, però els animals KO no experimenten problemes d'adaptació lumínica sota les nostres condicions electroretinogràfiques, caldria, però, realitzar altres tipus de registres per poder observar aquests canvis. En cas que no s'observés aquest retard, podria significar que o bé, en ratolins aquesta interacció no es dona, o bé la regulació que pugui exercir CERKL sobre les GCAP no és essencial per la viabilitat dels fotoreceptors en aquesta espècie. No obstant, aquests resultats preliminars presentats per aquest grup, obren una nova perspectiva que cal ser estudiada més a fons, i que ens podria obrir les portes d'un camí molt interessant d'abordar en el qual CERKL podria estar implicada en la fototransducció.

Cal destacar que el model animal *Guca1b* *-/-* no presenta cap alteració morfològica detectable i que l'únic fenotip observat és un retard en la recuperació als flashs lumínics, així com una sensibilitat més elevada a aquests, però amb una saturació més ràpida. En conjunt, el fet que aquest model, morfològicament, tingui un fenotip semblant al que hem observat en *Cerkl* *-/-*, i que ambdues proteïnes poguessin interaccionar, indica que caldria estudiar més en detall la resposta del KO a flashs de diferents intensitats, per poder determinar si pateix algun tipus d'alteració en la resposta als estímuls lluminosos i per tant en la fototransducció.

CERKL, una quinasa òrfena de substrat

Estudis inicials sobre CERKL apuntaven a que el seu substrat hauria de ser la ceramida, ja que tenia una elevada homologia de seqüència amb CERK i, endemés, codificava per un domini DAGK conservat, així com una regió específica present en el grup de les CERKs. No obstant, a dia d'avui i sota les condicions utilitzades, CERKL no és capaç de fosforilar la ceramida, quedant en entredit la seva funció quinàsica.

En aquest treball hem volgut cercar el substrat de CERKL. Inicialment, assumint el seu paper com a quinasa de ceramides, es van posar tots els esforços en trobar aquesta funció. Es van dur a terme nombrosos assaigs, utilitzant substrats fluorescents per després detectar-los per HPLC, reaccions enzimàtiques *in vitro* amb radioactivitat, entre d'altres. Excepte en el cas de l'UPLC, on per limitacions tècniques la C1P no es detecta gaire bé, en tota la resta dels casos, no es va poder observar que CERKL es comportés com una quinasa de ceramida, mentre que el control positiu (CERK), mostrava nivells elevats de C1P.

Les reaccions *in vitro*, es realitzaven sota les mateixes condicions que CERK. Per aquest motiu, es va intentar realitzar l'assaig en cèl·lules en cultiu afegint ortofosfat marcat radioactivament, per tal d'aproximar-nos el màxim a les condicions endògenes. Tampoc en aquestes condicions vam detectar cap augment en els nivells de C1P, detectant únicament l'activitat de la CERK endògena de les cèl·lules.

Els següents passos van consistir en provar diferents esfingolípidis com a substrat, es van realitzar reaccions *in vitro* amb i sense radioactivitat, es va quantificar la quantitat de fòsfor incorporat, i l'activitat quinasa de CERKL no va poder ser demostrada. També es va provar a realitzar la reacció a pH àcid i bàsic, i tampoc es va observar un augment en la quantitat de fòsfor incorporat. Així doncs, la pregunta que ens va sorgir va ser: és CERKL realment una quinasa?

L'any 2008, un grup d'Oklahoma va trobar la funció del gen *ELOVL4*, gen causant de STGD3. Aquest enzim era una elongasa de lípids, que s'encarregava d'allargar la cadena dels àcids grassos de 26, a 28 i 30 carbonis [124]. Aquests àcids grassos de cadena llarga poden ser utilitzats per la formació d'esfingolípidis. A més a més, la disfunció en aquest gen causa degeneració retinal i indica que aquests lípids de cadena llarga són importants per la retina. Per tant, es va hipotetitzar que, les ceramides de cadena llarga que es podien produir gràcies a l'activitat de l'*ELOVL4*, podien ser el substrat de CERKL. De nou, cap dels assaigs que vam provar ens van permetre detectar cap activitat quinàsica de CERKL ni de baix ni d'alt nombre de carbonis. Aquest fet ens va fer replantejar-nos si realment aquest era un enzim implicat en el metabolisme dels esfingolípidis, i la raó per la qual CERKL tenia un domini DAGK conservat, si no fosforilava cap substrat conegut.

L'assaig del *protein-lipid overlay* va mostrar que la proteïna, directa o indirectament, podia unir-se a la GlcCer i l'SM. Diversos experiments anteriors amb cèl·lules transfectades amb *CERKL*, analitzats per UPLC, ja mostraven una certa tendència a augmentar els nivells de GlcCer quan hi havia sobreexpressió de *CERKL*.

Finalment, un cop obtingut el ratolí KO, l'anàlisi de la lipidòmica de les retines va ser crucial per tal de poder entendre les tendències que portàvem arrossegant en els experiments realitzats *in vitro*. La quantificació dels lípids de les retines va mostrar una davallada significativa en la quantitat de ceramida, SM i molt especialment en la de GlcCer/GalCer (FIGURA 49). No obstant, encara que la quantitat global d'esfingolípid disminueix, la distribució per espècies de carbonis es manté gairebé igual i sense mostrar un patró diferent al del WT (vegeu ANNEX). Aquí cal esmentar, que la GlcCer i la GalCer només es diferencien en el residu glucídic, i degut a que la glucosa i la galactosa posseeixen la mateixa massa, sota les condicions estàndard utilitzades, no es poden diferenciar per UPLC.

Ara però, teníem la difícil tasca de donar-li un sentit biològic a aquests resultats, per tal de poder trobar la funció de *CERKL*. Tanmateix, tot apunta a que definitivament *CERKL* juga un paper en el metabolisme dels esfingolípid, però queda per establir quina és exactament la seva funció.

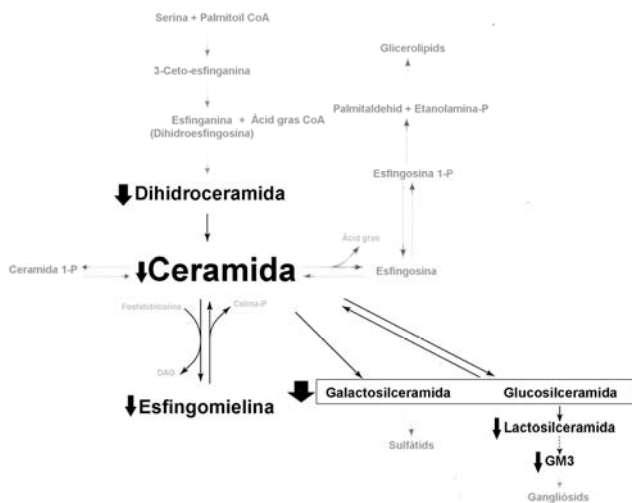


FIGURA 49 - Panell de lípids estudiats en retines WT i KO. Les fletxes indicades al costat del nom de cada esfingolípid analitzat mostren els canvis observats en quant al total de cadascuna de les espècies dels KO, respecte als ratolins WT.

A dia d'avui, ningú ha descrit que la GlcCer, la GalCer i l'SM puguin ser fosforilades. Tampoc, hi ha cap via descrita que uneixi directament els dos tipus d'esfingolípid complexos. Podrien estar relacionats en el cas de que es produís una transacilació entre l'SM i la GlcCer, és a dir, el canvi de l'àcid gras. Però aquests no són els únics esfingolípid amb diferències significatives entre retines WT i KO. Tant l'SM com els glucoesfingolípid, deriven de la ceramida, per vies separades. Per una banda, la GalCer es sintetitza en l'ER [57], mentre que l'SM i la GlcCer ho fan en l'aparell de Golgi. CERT transporta, principalment, ceramides de cadenes de 16, 18 i 20 carbonis que serviran per sintetitzar l'SM. En canvi, en el cas de la GlcCer, està descrit que, normalment, la ceramida utilitzada és la que és transportada de manera vesicular [202]. Per tant, la síntesi i el transport del precursor, la ceramida, no

acaba de ser igual entre tots dos. Malgrat trobar repetidament pistes que apunten a un rol relacionat amb l'SM i la GlcCer, les dades que tenim fins el dia d'avui no són concloents i caldria fer anàlisis més en detall, i en altres condicions, com per exemple, en condicions d'estrès produït pel dany amb llum per tal de treure'n l'entrellat.

CERKL, és una quinasa de lípids?

Arribats a aquest punt, i després de totes les proves realitzades, queda prou clar que CERKL, tot i tenir un domini DAGK conservat, no es comporta com una quinasa. Almenys, ni en reaccions *in vitro*, ni en cèl·lules en cultiu o lisats de retina, hem estat capaços de detectar aquesta activitat. Recentment, Rovina i col·laboradors van descriure a CERK un domini de cisteïnes que regula l'activitat enzimàtica de la proteïna. Aquest conjunt de residus, però, no es troba a CERKL [53]. Caldria provar si, generant una construcció on amb tècniques recombinants s'afegís aquesta regió rica en cisteïnes, CERKL seria capaç de fosforilar la ceramida, el que indicaria que la manca d'aquests residus han produït la pèrdua de la funció quinàsica del DAGK i, per tant, de CERKL. No obstant, encara que no es comporti com una quinasa, CERKL duu a terme un paper molt important a la retina, ja que mutacions en aquest gen causen neurodegeneració retinal progressiva que finalment produeix ceguesa, indicant que la funció de CERKL és essencial.

Per aprofundir en funció de CERKL dins del metabolisme dels esfingolípid, ens vàrem proposar realitzar una cerca similituds amb altres proteïnes del metabolisme dels esfingolípid, en relació als seus dominis i obtenir alguna pista del paper que pot desenvolupar. Un alineament de la gran majoria de proteïnes implicades en la síntesi i degradació dels esfingolípid (FIGURA 50), va mostrar un agrupament clar de CERKL amb les altres 3 quinases d'esfingolípid conegudes (CERK, SPHK1 i SPHK2), allunyada de la resta de grups (sintases, desaturases, enzims de degradació, etc.). Totes elles tenen en comú la presència del domini DAGK conservat. No obstant, hem discutit anteriorment que CERK té un domini de cisteïnes essencial per la seva activitat, el qual no està present a CERKL. Podria ésser que CERKL hagués perdut aquest domini quan es va originar, o podria ser que aquest domini no fos important per CERKL i no estigués lligat a la seva funció, de fet, les SPHKs tampoc presenten aquesta regió. Per tant podria donar-se el cas que la proteïna desenvolupés un paper rellevant com a quinasa de proteïnes o lípids durant la fototransducció, on hi ha canvis en els nivells de Ca^{2+} i altres ions, que són molt importants en la regulació de nombroses proteïnes.

Com ja hem esmentat, CERKL presenta tres possibles dominis d'unió a calmodulina, i també hem mencionat que, donat que no sabem la funció de la proteïna, no coneixem com poden influir els canvis en els nivells de Ca^{2+} sobre la seva activitat. Per tant podria ser que, tal i com passa amb les GCAPs, CERKL fos activa quan els nivells de Ca^{2+} disminueixen, condicions que no hem testat. Així doncs, seria molt interessant estudiar si la disminució de la concentració d'aquest ió divalent, podria mostrar

definitivament una possible activitat quinasa per part de CERKL. Cal recordar, que CERK presenta un comportament invers, essent funcionalment activa en presència de Ca^{2+} .

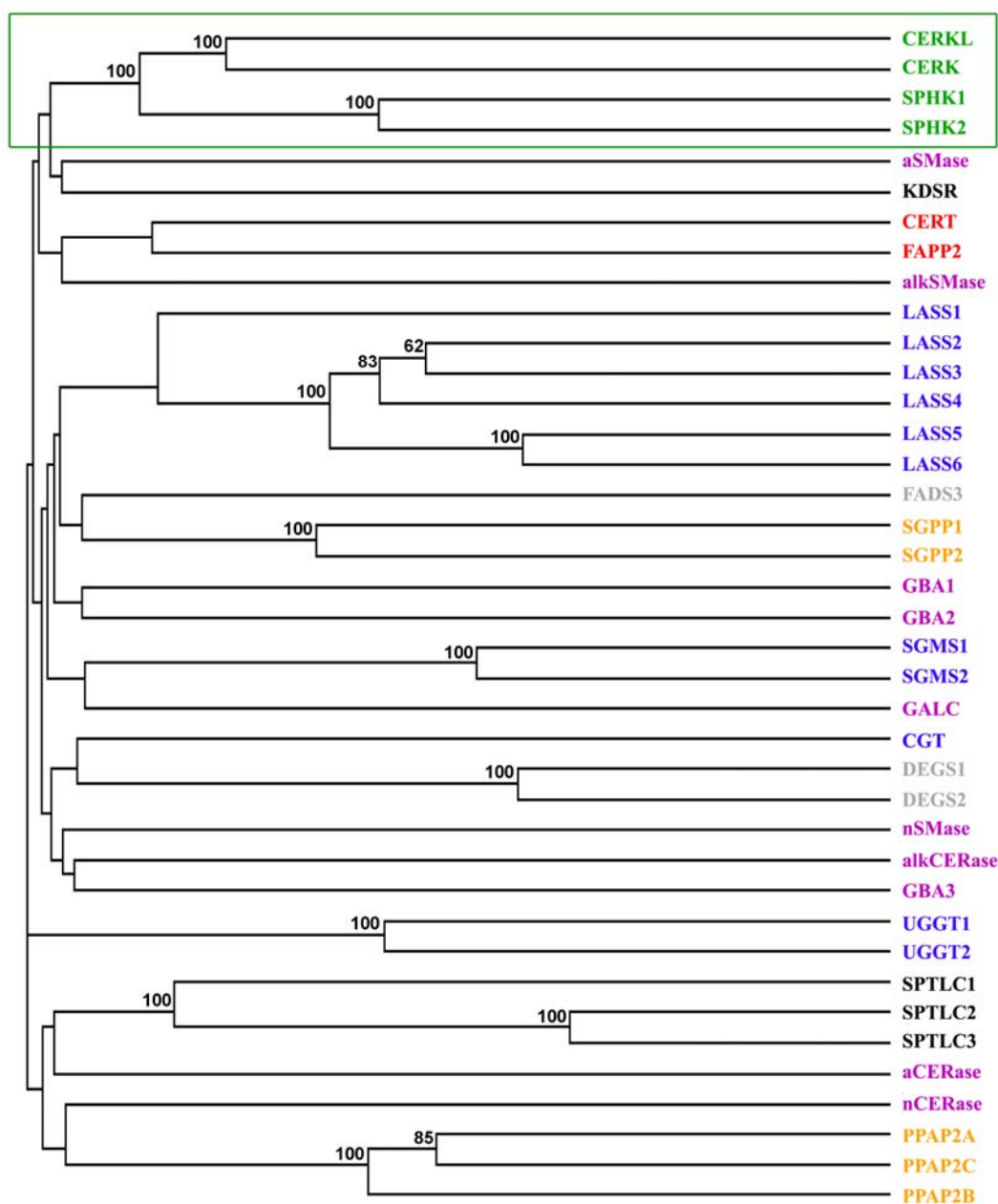


FIGURA 50 - Cladograma de diverses proteïnes del metabolisme dels esfingolípid. El requadre destaca l'englobament de CERKL dins del grup de les quinases. Els colors indiquen a la categoria la que pertanyen els enzims: verd, quinases; lila, enzims de degradació; taronja, fosfatases; negre, les serina-palmitoil transferases i la reductasa; blau, les sintases; gris, desaturases (incloent una desaturasa d'àcids grassos) i vermell, transportadors. S'indiquen els *bootstraps* superiors a 60. Els noms dels enzims es troben a la llista d'abreviatures.

Els estudis en ratolí han mostrat que no hi ha un fenotip específic de degeneració de retina associat a la deficiència en CERKL. Cal remarcar, però, que el nostre *knockout* presenta al voltant d'un 30-35% de transcrit produït per altres promotors. Aquesta davallada, tot i ser important, potser no és suficient per generar un fenotip retinal en el nostre model, malgrat en humans, la primera mutació descrita, R257X, afectaria a 2 de les 4 isoformes proteiques identificades inicialment, per tant, una

activitat residual de CERKL quedaria en aquests pacients. Actualment, hi ha 24 transcrits humans descrits, dels quals 18 contenen l'exó 5, i desconeixem quins d'ells codificarien per proteïnes i es veurien afectats per la mutació R257X. A més a més, les anàlisis informàtiques predeuen que en ratolí, tot i haver-hi metionines en pauta en els exons 1a, 3a i 3b, cap d'elles té una puntuació suficientment elevada com per ser la metionina iniciadora, fet que relleva aquest paper a la metionina de l'exó 5. Per tant, el transcrit detectat correspondria a una isoforma codificada per 9 exons que contindria la totalitat del C-terminal de la isoforma sencera, però li mancarien els senyals NLS, el domini PH i la meitat del DAGK. Hauríem de suposar que aquesta proteïna no seria un enzim catalíticament actiu. Tot i això, caldria obtenir-ne la confirmació experimental.

Revisant l'enfocament podríem considerar que potser estem buscant un lípid com a substrat quan realment aquest no existeix. En base aquesta idea, es van realitzar assaigs de fosforilació de proteïnes, i estudis de quantificació de fòsfor incorporat. En cap dels casos es va detectar un augment en la fosforilació, així doncs, la funció quinasa de CERKL quedaria descartada, a menys que pogués ser una quinasa, en condicions i moments molt concrets, com ara durant el desenvolupament, o en condicions d'estrès. Tot i que, si estigués implicada en els processos que es duen a terme durant el desenvolupament, esperaríem que l'animal KO tingués algun tipus d'afectació a nivell estructural de la retina, factor que tampoc es dona, ja que les retines, estructuralment són normals, a falta d'estudis de microscòpia electrònica que confirmin que els discos dels fotoreceptors i l'estructura d'aquests també són correctes. D'altra banda, caldria també analitzar els lípids de retines de WT i KO després del dany amb llum, tot i que per UPLC la detecció de CIP és poc sensible. Per tant, hauríem de buscar algun mètode que ens permetés quantificar els seus nivells. Una possibilitat seria realitzar explants de retina i tractar-los amb H_2O_2 mentre s'incuben amb ortofosfat. La limitació d'aquesta tècnica, és la complexitat d'aconseguir uns bons explants i la supervivència en cultiu d'aquests, ja que proves que hem realitzat en el grup mostren que en 48 hores comencen a morir. Una altra possibilitat, és que el substrat de CERKL fos el que depengués d'un moment i un estat cel·lular concret, de manera que en condicions normals, els nivells fossin tan baixos que no poguéssim detectar la fosforilació d'aquest. Per descartar aquesta possibilitat, es van estressar amb llum dues soques de rates, amb les retines de les quals, es va realitzar l'extracció lipídica, utilitzant aquests lípids com a substrat en les reaccions enzimàtiques. Novament, no es va poder detectar cap diferència en el patró de fosforilació.

Sí després de totes les proves realitzades, veritablement creiem que CERKL no té activitat quinasa, llavors la qüestió és: Què fa CERKL a la retina?

Els animals KO presenten una davallada generalitzada dels principals esfingolípid, i molt més significativa en el cas de la GlcCer/GalCer, probablement perquè estem analitzant la suma de la disminució d'ambdós compostos. Per tant, sembla probable que CERKL està implicada en aquesta via metabòlica. Els estudis dels nivells de transcripció dels principals gens d'aquest metabolisme, no es veuen afectats en el KO respecte al WT, per tant tot sembla indicar que CERKL no controlaria l'expressió dels

diferents gens, però per altra banda, queda pendent la localització nuclear de CERKL descrita per nosaltres i altres autors. Com hem esmentat, potser el paper que duu a terme la proteïna dins el nucli és la d'activar gens en resposta a l'estrès, per així poder assegurar la viabilitat cel·lular. Caldria llavors estudiar algun d'aquests gens i veure si hi ha diferències en quant a nivells d'expressió entre WT i KO. Un bon candidat seria Bcl-X, un gen descrit com anti-apoptòtic, els nivells del qual poden estar regulats per la C1P [240].

No hem d'oblidar que els esfingolípid poden regular la transcripció d'alguns gens pro- i anti-apoptòtics, per tant, o bé han d'iniciar una cadena biosenyalitzadora que finalitzi en proteïnes del nucli, o bé poden tenir la capacitat d'entrar al nucli i realitzar alguna funció dintre d'aquest compartiment. O l'altra possibilitat seria que, CERKL s'encarregués de transportar o acompanyar alguna molècula o proteïna que necessités entrar dins del nucli.

Els esfingolípid es sintetitzen en els diferents orgànuls cel·lulars i necessiten ser transportats d'uns als altres per ser modificats o degradats (FIGURA 51). La ceramida es sintetitza a l'ER, i necessita ser transportada al Golgi, on CERK la convertirà en C1P, la GCS en GlcCer i la SMS en SM. Aquest transport pot realitzar-se mitjançant la utilització de vesícules, la forma més habitual, o per un transport completament independent que correria a càrrec de la proteïna CERT [202]. Endemés la GlcCer ha de ser transportada al lumen del *trans*-Golgi per produir la LacCer, aquesta funció la realitza la proteïna FAPP2 [67]. A través també de vesícules, poden ser transportats fins a la membrana plasmàtica, lloc on per exemple, els gangliòsids, amb les seves cues d'oligosacàrids encarades cap a l'espai extracel·lular, actuen com una espècie de receptors cel·lulars, ideals per les interaccions amb altres molècules com toxines, components de la matriu, molècules d'adhesió i receptors i enzims de la superfície de les cèl·lules adjacents [103].

Un possible paper de CERKL, podria ser el transport d'aquests lípid d'un compartiment a un altre. Les diferències més grans es van poder observar en les GlcCer/GalCer i SM, essent possible que CERKL fos necessària pel transport de la ceramida al Golgi de manera: i) dependent de vesícules, fet que concordaria amb les localitzacions realitzades en el grup, en les quals es pot veure que CERKL localitza en el que anomenem ERGIC, que seria el compartiment intermedi entre l'ER i el Golgi, ii) independent de vesícules realitzant el transport per si sola, o ajudant a la CERT. En l'anàlisi dels *partners* proteics de CERKL, no vam detectar cap proteïna de transport a excepció de la clatrina, la qual no coincideix per mida i per tant, la seva credibilitat com a possible *partner* queda una mica en l'aire. També, es va immunoprecipitar la beta-tubulina dels microtúbuls, lloc pel qual algunes proteïnes es mouen per la cèl·lula. És important esmentar, que moltes d'aquestes proteïnes segurament són artefactes deguts a la sobreexpressió de CERKL en cèl·lules en cultiu, ja que estem forçant les condicions mitjançant una expressió elevada i ectòpica. En quant aquest tema, en el grup, s'està intentant trobar un bon anticòs per poder realitzar aquest mateix experiment directament sobre retines de ratolí, resultats que serien més

fiables, al tractar-se d'un teixit on CERKL està altament expressada i on realitza la seva funció real i alhora, molt més informatius.

Per últim, hem descrit en aquest treball que CERKL pot arribar a generar en humans fins a 24 transcrits diferents, dels quals no sabem amb seguretat quants codificarien per una proteïna. La possibilitat de diferents proteïnes, amb inclusió/exclusió de dominis ja descrits, fa pensar que, molt probablement, cada isoforma jugui un paper diferent. Tornant al tema del transport, podria haver-hi isoformes que s'encarreguessin de realitzar aquest transport de l'ER al Golgi, i altres al nucli. No obstant, una altra possibilitat, és que CERKL pogués estar implicada en la síntesi *de novo* de la ceramida, ja que els estudis de lipidòmica del WT i KO, van mostrar que les ceramides també disminuïen significativament, tot i que més suaument que l'SM i la GlcCer/GalCer. Per tant, CERKL, podria interactuar amb algun dels enzims de la ruta, o continuant amb la hipòtesi dels transport i donat que també s'han trobat diferències en aquest grup, que CERKL estigués implicada en el transport/modificació dels àcids grassos, que es requereixen per formar la dihidroceramida.

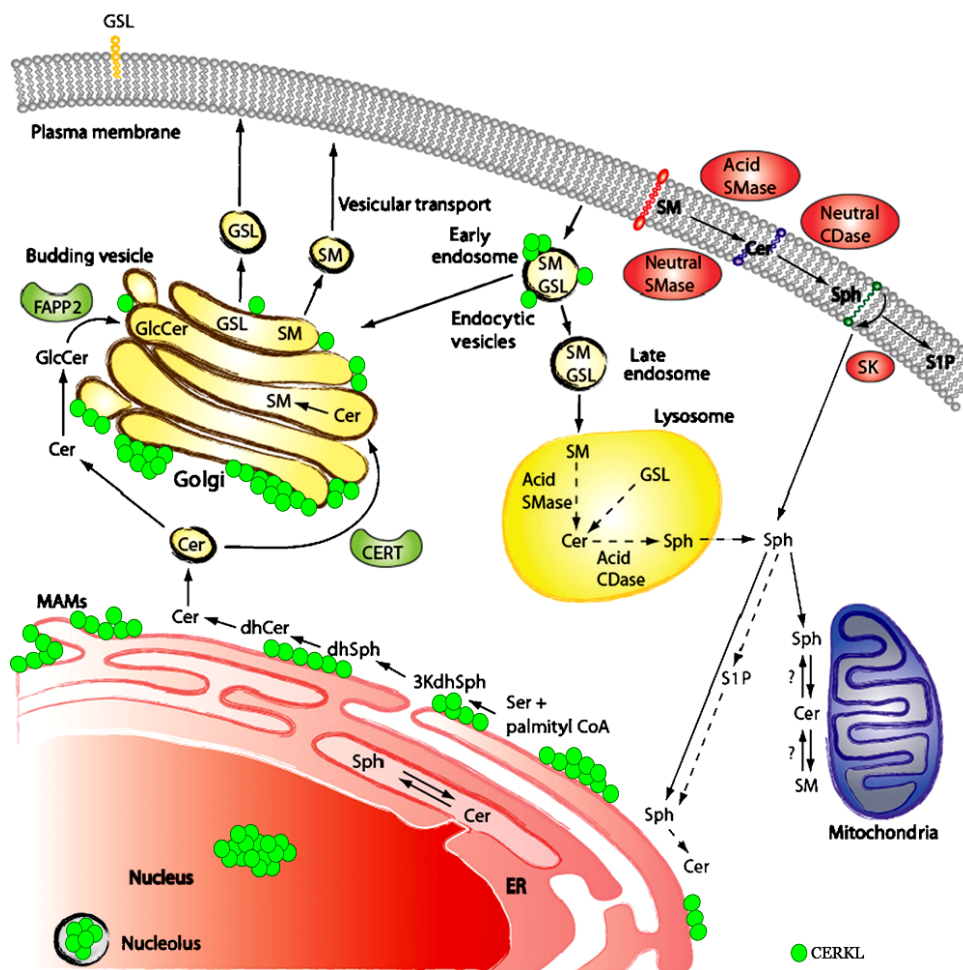


FIGURA 51 - Síntesi i transport d'esfingolípids en els diferents compartiments cel·lulars. Compartimentalització de les rutes de síntesi d'esfingolípids i localització subcel·lular de CERKL (cercles verds). CERKL localitza principalment a ER i *cis*-Golgi, i minoritàriament a nucli, *trans*-Golgi i endosomes primerencs (no mostrats en la figura). Adaptat de Bartke et al. 2009 [241].

Així doncs, amb tots aquests resultats, CERKL no semblaria tenir una activitat quinasa. Tanmateix, podria estar implicada en el transport i també en la regulació de la transcripció d'alguns gens, de manera directa (essent ella mateixa la que activa/reprimeix la transcripció) o indirecta (transportant algun esfingolípid/proteïna reguladora), efectuant una acció protectora contra l'apoptosi, almenys en situació d'estrés oxidatiu i proporcionant una argumentació per explicar que mutacions en aquest gen, farien als fotoreceptors sensibles i menys resistents al dany lumínic, fet que propiciaria la pèrdua progressiva d'aquestes neurones.